

# 手性柱前衍生高效液相色谱法拆分牙本质中天冬氨酸对映体\*

傅世江 范垂昌 张世鑫

魏奉群

赵 婷

(中国医科大学法医学教研室 沈阳 110001)(辽宁基础医学研究所 沈阳 110003)(辽宁省分析测试研究中心 沈阳 110015)

## 1 前言

由于氨基酸消旋化理论<sup>[1]</sup>在考古学<sup>[2]</sup>、老年学<sup>[3]</sup>、法医学<sup>[4]</sup>等领域不断推广应用,人们对氨基酸对映体拆分方法越来越重视。目前氨基酸对映体拆分的色谱方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法(HPLC)和薄层色谱法<sup>[5]</sup>。八十年代以来 HPLC 法成为氨基酸对映体拆分的最重要手段,有手性固定相(CSP)、手性流动相(CMP)和手性衍生法(CDR)<sup>[6]</sup>。其中 CDR 法由于其所用试剂价格较低,且针对所要拆分不同对映体可采用不同的紫外或荧光衍生试剂,从而得到较好的分析结果,故较常用。对于氨基酸对映体拆分的衍生试剂主要有异硫氰酸酯类<sup>[7]</sup>、酰氯和磺酰氯类<sup>[8]</sup>,以及光学活性氨基酸类<sup>[9]</sup>。我们采用邻苯二甲醛-N-乙酰-L-半胱氨酸(OPA-NAC)作为衍生试剂,用于生物体蛋白质氨基酸中消旋化速度最快的天冬氨酸的分析,取得较好结果。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

840型高效液相色谱仪,420型荧光检测器(Waters),Lichrosob C<sub>18</sub>柱(250mm×4.6mm i. d.)。试剂:NAC(Sigma),D-和L-天冬氨酸(D-Asp, L-Asp, BDH),OPA(Fluka);甲醇(色谱纯);0.4mol/L pH 9.4,硼酸钠缓冲液;50mmol/L pH 5.2、pH 5.7 醋酸钠缓冲液。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 OPA-NAC 试剂的配制** 将 OPA 8mg 溶于 600μL 甲醇中,再顺次加入 500μL 0.4mol/L pH 9.4 硼酸钠缓冲液,800μL 纯水,120μL 1.0mol/L NAC 于 4℃ 冰箱保存。

**2.2.2 天冬氨酸衍生化** 取 20μL OPA-NAC 试剂加入 3μL 1:1 D-和 L-Asp 标准液(0.1nmol~10nmol),反应 2.5 分钟后加入 200μL 50mmol/L pH

5.2 NaAc 溶液使反应停止,立即取 10μL 注入 HPLC 中。

**2.2.3 色谱条件** λ<sub>ex</sub> = 340nm, λ<sub>em</sub> = 445nm; 流速:1mL/min;流动相为 8% 甲醇和 92% 50mmol/L pH 5.7 NaAc 溶液。

**2.2.4 牙齿处理及分离** 取较纯净牙本质 30mg, 放到 1mL 6mol/L HCL 中,在 100℃ 下水解 6 小时,用 N<sub>2</sub> 吹干后加 2mL 纯水溶解,过阳离子交换柱(32cm×0.65cm i. d. 脱盐,用水洗去杂质,再用 0.2mol/L 氨水洗出氨基酸,用紫外可见分光光度计在 267nm 监测,收取氨基酸浓度最高时的流份 2mL 衍生化,分析。

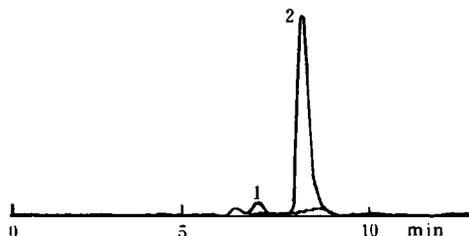


图1 69岁人牙本质 D,L-Asp 色谱图

1. D-Asp, 2. L-Asp

图1是一69岁人牙本质中天冬氨酸在上述条件下分离的谱图。

## 3 实验结果及讨论

### 3.1 工作曲线及检测限

在 D-Asp, L-Asp 各为 6pmol~600pmol 范围内进行线性研究,其线性方程为: D-Asp,  $y = 2.4x + 2.1, \gamma = 0.998$ ; L-Asp,  $y = 2.7x + 0.6, \gamma = 0.996$ 。

其中 y 为相对积分面积, x 为天冬氨酸摩尔数 (pmol)。在高于噪声两倍时, D-Asp, L-Asp 检测限为 1pmol。

### 3.2 衍生化反应时间及衍生产物稳定性

\* 本文收稿日期:1993年9月3日,修回日期:1993年11月4日

氨基酸加入 OPA-NAC 后 2.5 分后其荧光强度达最大值。10 分钟内其荧光强度保持恒定如图 2。

氨基酸的衍生物具有较强荧光强度，随时间推移其荧光逐渐熄灭，其半衰期为 3 小时。

### 3.3 流动相中甲醇浓度

在流速为 1.0 mL/min 时，我们对流动相中甲醇浓度分别为 6, 8, 10% 做了实验，表 1 列示这三个条件下 D-Asp, L-Asp 的容量因子 ( $k'$ )，选择性系数 ( $\alpha$ ) 和分离度 ( $R_s$ )。

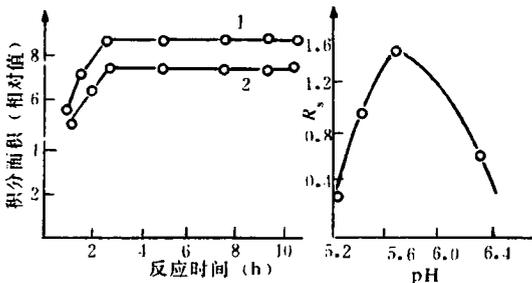


图 2 反应时间同荧光强度关系  
图 3 流动相 pH 值与  $R_s$  的关系  
1. D-Asp, 2. L-Asp .

表 1 甲醇含量与  $k'$ ,  $\alpha$ ,  $R_s$  的关系.

CH <sub>3</sub> OH%	$k_D'$	$k_L'$	$\alpha$	$R_s$
6	2.37	2.88	1.22	1.53
8	1.15	1.48	1.29	1.45
10	0.64	0.87	1.36	0.99

### 3.4 流动相 pH 值

流动相 pH 值对分离度影响很大，如图 3 所示，在流速为 1.0 mL/min, CH<sub>3</sub>OH% 为 8% pH 为 5.7 时  $R_s$  最大。

应用本实验方法作法医死亡鉴定，即通过测定牙本质中天冬氨酸 D/L 比，从而推断死者年龄，结果很好。

致谢 本实验得到中科院大连化学物理研究所商振华先生帮助，谨表谢意！

关键词 高效液相色谱，柱前衍生化，天冬氨酸，对映体分离，牙本质

### 参考文献

- Hare P E, Hoering T C, Kingjv K. Biogeochemistry of amino acids. New York: Johnwiley and Sons, 1980
- Bada J, Protsch R. Anthropology, 1973, 70(5):1331
- Masters P M, Bada J L. Nature, 1977; 268: 71
- Ohtani S, Yamamoto K. J Forensic Sci, 1991; 18: 1061
- 林炳承. 色谱, 1990, 8(6): 363
- 徐修容. 色谱, 1991, 9(6): 363. 色谱, 1992, 10(1): 22
- Nimura N, Toyama A, Kinoshita T. J Chromatogr, 1984; 316: 547
- Einarsron S, Josefsson B. Anal Chem, 1987; 59: 1191
- Nimura N, Kinoshita T. J Chromatogr, 1986; 352: 199

## Chiral Precolumn Derivatization High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Resolution of Aspartic Acid in Dentine

Fu Shijiang, Fan Chuichang and Zhang Shixin

(Department of Forensic Chemistry, China Medical University, Shenyang, 110001)

Wei Fengqun

(Liaoning Institute of Basic Medical Science, Shenyang, 110005)

Zhao Ting

(Liaoning Provincial Center of Analysis Test and Research, Shenyang, 110015)

Aspartic acid enantiomers was derivatized into fluorescence diastereomers by O-phthalaldehyde-N-acetyl-L-cysteine as a chiral fluorescence derivatization reagent. The products were separated by reversed-phase HPLC and detected by fluorescence detector. The column was eluted with 8:92 of methanol and water solution (containing 50 mmol/L NaAc, pH 5.7). The experimental results resolution ( $R_s$ ) 1.4 and limit of detection 1 pmol. The method is simple and rapid. It is applied to the separation of aspartic acid enantiomers in dentine successfully.

Key words high performance liquid chromatography, precolumn derivatization, aspartic acid, enantiomer separation, dentine