

氨基酸直接分析法原理及应用

丁永胜 牟世芬

(中国科学院生态环境研究中心, Dionex 中国有限公司应用研究中心 北京 100085)

摘要 本文介绍一种新型氨基酸分析方法——离子交换色谱-积分脉冲安培法 (HPIC-IPAD), 详细讨论了方法的原理和应用, 该方法与传统方法比较, 无须进行柱后或柱前衍生反应, 可以对氨基酸直接进行分析, 灵敏度高, 大多数氨基酸的最小检测限均小于 1pmol, 线性范围可以达到 3 个数量级以上。

关键词 氨基酸 离子交换色谱-积分脉冲安培法

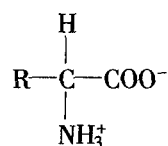
1 前言

目前, 氨基酸分析方法主要有两种类型: (1) 阳离子交换分离, 茚三酮 (Ninhydrin) 或邻苯二甲醛 (OPA) 柱后衍生反应, 分光光度法或荧光法检测¹; (2) 反相色谱分离, 柱前衍生, 荧光检测, 常用的衍生试剂有 AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl-carbamate), FMOc (9-fluorenylmethylchloroformate), Dabsyl (4-di-methylamino-azobenzene sulfonylchloride), Dansyl 等。这些方法的缺点是操作繁琐, 氨基酸衍生物不稳定, 衍生反应的副产物和试剂本身的干扰及衍生试剂昂贵等²。本文介绍 Dionex 公司新近推出的氨基酸直接分析仪是基于阴离子交换分离机理, 积分脉冲安培法检测, 无需衍生反应。

2 方法原理

2.1 阴离子交换分离

迄今为止, 自然界中已发现 180 多种氨基酸, 其中参与蛋白质合成的氨基酸只有 20 多种, 称为基本氨基酸。这些氨基酸的基本结构通式如下:



氨基酸具有两性离子结构, 在酸性介质中, 以氨基阳离子状态存在; 在碱性介质中, 以羧基阴离子状态存在, 这也是氨基酸分离分析方法的基础。阴离子交换树脂含有的碱性基团—N(CH₃)₃OH (强碱型) 或—NH₃OH (弱碱型) 可以解离出 OH⁻, 能和溶液中的氨基酸阴离子发生交换。氨基酸与树脂的亲合力, 主要取

决于它们之间的静电吸引, 其次是氨基酸侧链与树脂基质聚苯乙烯之间的疏水相互作用和氨基酸的空间构型。在 pH 12~13, 氨基酸与阴离子交换树脂之间的静电吸引的大小次序是酸性氨基酸 > 中性氨基酸 > 碱性氨基酸, 因此氨基酸的洗脱顺序大体是碱性氨基酸, 中性氨基酸和酸性氨基酸。氨基酸的全部洗脱顺序如图 1 所示。流动相由纯水、0.25M NaOH 和 1.0M NaAc 三种常见的溶液组成, 表 1 列出了分析氨基酸的典型梯度淋洗条件³ 其中氢氧化钠不仅提供淋洗离子 OH⁻, 而且碱性 pH 条件也是氨基酸在金电极表面进行氧化反应, 实现积分脉冲安培检测的必须条件。醋酸根离子 (Ac⁻) 对固定相的亲合力大于 OH⁻, 具有较强的洗脱能力, 对于保留较强的氨基酸起“推”的作用。

表 1 氨基酸分析的典型梯度淋洗条件

时间 Time (min)	E1	E2	E3	备注 (流速: 0.25mL/min)
初始	76	24	0	装样
0.00	76	24	0	阀切换进样
2.00	76	24	0	开始 OH ⁻ 梯度淋洗, 阀复位
8.00	64	36	0	
11.00	64	36	0	
18.00	40	20	40	开始醋酸钠梯度
21.00	44	16	40	
23.00	14	16	70	
42.00	14	16	70	
42.10	20	80	0	用高浓度氢氧化钠冲洗柱子
44.10	20	80	0	
44.20	76	24	0	系统开始重新平衡, 恢复到初始状态
75.00	76	24	0	

注 E₁ = 纯水 E₂ = 0.25M NaOH, E₃ = 1.0M NaAc

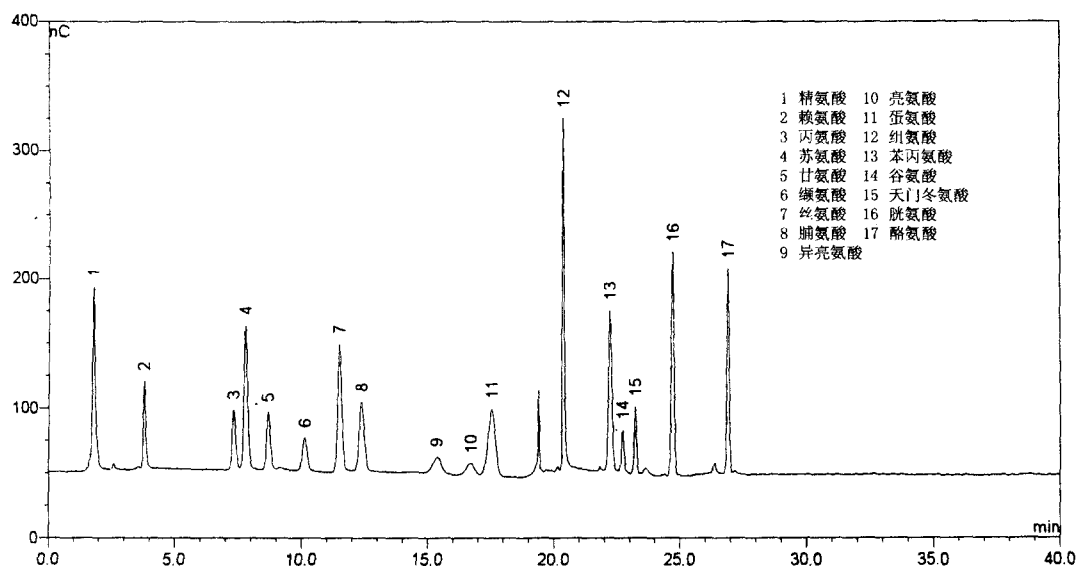
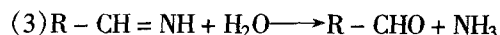
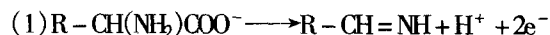


图1 常见氨基酸标准混合溶液的色谱图

(分离柱: AminoPac PA10 和 PG10; 淋洗液: E_1 = 纯水, E_2 = 250 mM NaOH, E_3 = 1.0M NaAc; 流速: 0.25mL/min; 进样体积: 10 μ L; 温度: 30 $^{\circ}$ C; 检测方式: 积分脉冲安培检测器 (IPAD), Ag/AgCl 参比电极, Au 工作电极。)

2.2 脉冲积分安培检测

在 pH 12 ~ 13 溶液中, 在金工作电极和 pH-Ag/AgCl 参比电极之间施加一个较高的电位, α -氨基酸在金电极表面被氧化, 大多数氨基酸开始先被氧化为亚胺 (1), 然后进一步氧化为腈基化合物 (2), 另外, 少量的亚胺发生水解生成醛类化合物 (3)。反应过程如下^[4]:



氨基酸的脂肪侧链抑制氨基酸的氧化反应(如亮氨酸和异亮氨酸), 而氨基酸侧链中的羟基(丝氨酸和苏氨酸)、酰胺基(天门冬氨酸)和咪唑基(组氨酸)有利于这些氨基酸的氧化反应。在金电极上得到氨基的最大氧化电流所需的电位超过金表面氧化的电位, 在高电位时, 金电极本身形成表面氧化层和氨基酸氧化产物的附着, 金电极会很快失效。金电极表面氧化时所产生的电流无疑会增加背景和基线噪音以及基线的不稳定性。为了增加氨基氧化时所产生的检测信号, 抑制金电极氧化所产生的背景信号, 1989 年 Johnson 等人⁵ 引入了一个新的技术——积分脉冲安培。与脉冲安培相似, 积分脉冲安培法中加到工作电极上的也是一种自动重复的电位对时间的脉冲电位波形, 其不同之处是采样时的电位不是恒定的, 而是在高-低值之间扫描。在高电位时, 氨基

和金的氧化同时发生。在高电位时所形成的氧化金在低电位时被还原。因为在低电位时金的氧化是可逆的, 而氨基的氧化是不可逆的, 因而来自金电极氧化的信号被大大抵消, 由积分整个高-低循环的电流所得到的信号仅仅是被分析成分的信号。

Alan P. Clarke 等人⁶ 经过对检测氨基酸和氨基糖的施加电位波形的优化克服了基线漂移, 改进了线性、信噪比和长时间的重复性, 而且不损坏金工作电极。新的波形如图 2 所示。首先采用较低的电位 E_1 和 E_2 为吸附/引发区, 保持电极的活性。在较高电位 E_3 和 E_4 进行积分区, 此时金电极表面会形成一层单分子 AuOH 催化膜, 可以促进氨基酸的氧化反应。 E_5 和 E_6 为清洗活化电位, 去除金电极表面的反应产物。每个电位的持续时间影响氨基酸测定的灵敏度、线性范围、色谱峰对称性和基线, 总的积分时间约为 450ms。

3 应用

样品的前处理方法在氨基酸分析中具有重要的地位。由于能够直接用于分析的样品有限, 样品中的氨基酸大多以蛋白质, 多肽的形式存在, 需要进行前处理, 包括样品的提取, 纯化和水解。表 3 列出了常用的 4 种水解方法, 这些方法处理的样品都能在 Dionex 公司的 AAA-Direct 氨基酸直接分析系统上进行分析。

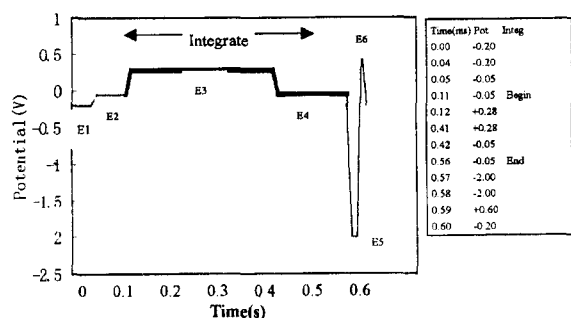


图2 测定氨基酸的积分安培电位波形图

表3 氨基酸样品分析的水解方法

方法	适用范围
6M HCl 介质中 110℃ 水解 6~72 小时	最常用的水解方法 缺点: 丝氨酸, 苏氨酸, 酪氨酸和甲硫氨酸的回收率较低; 色氨酸被破坏。 加入还原剂巯基乙酸, 可减少甲硫氨酸和色氨酸的损失
过甲酸氧化/6M HCl	用于测定含硫氨基酸, 如半胱氨酸和胱氨酸
4M 甲基磺酸中 110℃ 水解 22 小时	条件温和, 可用于测定色氨酸
4.2M NaOH 中 110℃ 水解 18 小时	色氨酸测定的首选方法, 可以直接与 AAA-Direct 方法兼容, 而对茚三酮衍生化方法, 则需要对样品进行中和或稀释, 中和产物 NaCl 干扰衍生化反应, 样品稀释倍数受茚三酮衍生化方法灵敏度的限制。

电化学检测法作为一种通用而灵敏的检测手段, 在许多领域得到广泛的应用, 尤其在检测糖类和氨基酸方面的优势已被人们所接受。DIONEX公司推出的 AAA-Direct 氨基酸直接分析仪, 无需衍生, 采用积分脉冲安培法对氨基酸和部分糖类直接测定, 方法简单, 灵敏度高, 最小检测限在 1 pmol 以下, 结果可靠。色谱条件如下:

分离柱: AminoPac PA10 (2mm × 250mm)
淋洗液: 纯水, 0.25M NaOH, 1.0M NaAc
流速: 0.25mL/min
进样体积: 10μL
温度: 30℃
检测方式: 积分脉冲安培检测器 (IPAD), Ag/AgCl 参比电极, 金工作电极。

表4 用积分脉冲安培法和茚三酮光度法测定胶原蛋白中氨基酸结果的比较

氨基酸 Amino Acid	积分安培法 Integrated Amperometry		茚三酮光度检测法 Ninhydrin
	pmol	mole%	mole%
Arg	143	5.3	5.8
Hydroxy Lys	20	0.8	0.8
Lys	74	2.8	2.7
Ala	313	11.6	11.0
Thr	48	1.8	1.7
Gly	860	31.8	32.7
Val	58	2.1	2.1
Hydroxypro	264	9.8	9.0
Ser	90	3.4	3.3
Pro	321	11.9	12.4
Ile	31	1.2	1.2
Leu	66	2.4	2.5
His	15	0.6	0.5
Phe	38	1.4	1.3
Glu	178	6.6	7.6
Asp	119	4.4	4.7
Tyr	11	0.4	0.4

此方法已用于蛋白质和肽的水解产物, 食品和饮料及动物饲料等样品中氨基酸的分析。Alan P. Clarke 等人⁶对胶原蛋白和胎球蛋白的水解物中的 20 种基本氨基酸的进行分离测定, 并且与经典的茚三酮光度检测法进行比较 (见表 4), 结果无显著差异。Petr Jandik 等人⁷对细胞培养基与发酵肉汤中氨基酸, 部分糖类化合物进行了分析监测。他们还对糖含量高的样品采用在线除糖的方法测定其中的氨基酸。此外, 还可以改变积分电位, 氨基酸的氧化电位比糖的氧化电位高, 可以选择较低的积分电位测定糖, 而氨基酸不被检测, Petr Jandik 等人⁸使用两种不同积分电位的积分安培法对发酵液中的氨基酸和糖类进行测定。他们还采用阳离子交换-积分安培法对血液中的高半胱氨酸进行测定⁹。在测定色氨酸、含磷氨基酸和含硫氨基酸氧化物较衍生化方法具有明显优点。蛋白质在酸水解时, 色氨酸会被破坏, 需要在碱性条件下水解。碱水解后的样品可以在 AAA-Direct 上直接进样分析, 可以与其它氨基酸同时测定。亦可以同时测定含磷氨基酸、含硫氨基酸氧化产物和部分单糖和寡糖。

参考文献

- 1 Spackman, D. H.; Stein, W. H.; Moore, S., Anal. Chem. 1958, 30, 1190~1205
- 2 Cohen, S. A.; Michaud, D. P., Anal. Biochem.

- 1993, 211: 279 ~ 287
- 3 Installation Instructions and Troubleshooting Guide for the AAA-Direct Amino Acid Analysis System. Document No. 031481; Dionex Corporation 2000, 25 ~ 27
 - 4 Petr Jandik, Anion Exchange Chromatography and Integrated Amperometric Detection of Amino Acids, in Methods in Molecular Biology, vol. 159: Amino Acid Analysis Protocols (Cooper C.Ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 63 ~ 85
 - 5 Welch, L. E.; LaCourse, W. R.; Mead, D. A.; Johnson, D. C., Anal. Chem. 1989, 61, 555 ~ 559
 - 6 Alan P. Clarke, Petr Jandik, Roy D. Rocklin et al., Anal. Chem. 1999, 71: 2774 ~ 2781
 - 7 Petr Jandik, Jun Cheng, Jovan Evrovski et al., J. Chromatogr. B, 2000, 759, 145 ~ 151
 - 8 Petr Jandik, Alan P. Clarke, J. Chromatogr. B 1999, 732: 193 ~ 201
 - 9 Petr Jandik, Jun Cheng, Jovan Evrovski et al., J. Chromatogr. B, 2000, 759, 145 ~ 151

The principle and application of amino acids analysis direct system

Ding Yongsheng Mou Shifen

(Ecological Environment research Center, Chinese Academy of Sciences

Dionex China Ltd. Applied Research Center)

Abstract A new method to analyze amino acids by ion-exchange chromatography-integrated pulsed amperometric detection is introduced. The principle and application of this method are discussed in detail. Comparing with traditional method, analysis of amino acids by this new method can be performed direct without post-column and pre-column derivatization. The new method has high sensitivity with the detection limit under 1 pmol and the linearity over three orders of magnitude for most common amino acids.

Key words Amino-acids HPIC-IPAD.

(下接 19 页)

4 结 论

基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱与其它相关的分析手段相比,独特新颖,以其高灵敏度、极高的质量上限、分离效率高、分析速度快、信息直观等特点,在测定多肽、蛋白质和高分子聚合物方面具有无法比拟的作用。是我们研究与分析大分子质量、纯度、结构的手段之一。

参考文献

- 1 季怡萍 余益民 张杰 分析化学 1999, 27 (7): 814 ~ 816
- 2 季怡萍 孔明忠 赵大庆 分析化学 1999,27(5):513 ~ 516
- 3 季怡萍 刘淑莹 分析测试技术与仪器 1999, 5 (2): 94 ~ 95
- 4 季怡萍 刘淑莹 福建分析测试 1999, 8 (4): 1147 ~ 1149
- 5 季怡萍 刘志强 刘淑莹 分析测试学报 2000, 19 (3): 61 ~ 62
- 6 赵善楷 质谱学报 1996, 17 (2): 1 ~ 7
- 7 季怡萍 余益民 姜洪焱 分析测试学报 1999, 18 (5): 50 ~ 51
- 8 季怡萍 姜洪焱 余益民 分析化学 1997, 25 (12): 1451 ~ 1453
- 9 季怡萍 刘淑莹 高军波 分析化学 1998, 26 (12): 1498 ~ 1500

The technology and application of matrix-assisted laser desorption ionization Time-of-flight mass spectrometry

Ji Yiping Zhang Hongming

(Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract In this paper we synopsised the technology and application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The structure, principle and property of MALDI-TOF-MS were introduced.

Key word MALDI-TOF-MS technology application