

文章编号:1003-8701(2004)06-0054-05

氨基酸分析中的柱前衍生技术

宋志峰,王 丽,纪 锋,金卫东

(吉林省农业科学院大豆研究中心,吉林 公主岭 136100)

摘 要:介绍了以邻苯二甲醛、氯甲酸苄甲酯、异硫氰酸苯酯、丹酰氯、二甲胺偶氮苯磺酰氯和 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯等作为衍生试剂的柱前衍生与反相高效液相色谱法相结合分析氨基酸的原理及特点。

关键词:反相高效液相色谱;氨基酸分析;柱前衍生

中图分类号:R151.3

文献标识码:A

1958 年 Spackman 等^[1]首先使用了离子交换色谱(IEC)与柱后茚三酮衍生相结合的技术分析蛋白质水解氨基酸,建立了经典的氨基酸自动分析技术。40 多年来,氨基酸分析及分析仪器发展迅速,日臻完善。分析时间不断缩短,灵敏度不断提高,自动化程度越来越完美。特别是柱前衍生技术与反相高效液相色谱(RP-HPLC)相结合的氨基酸分析技术的出现,形成了具有广泛适应性的现代氨基酸分析技术。

1 氨基酸分析的柱前衍生技术

大多数的氨基酸无紫外吸收也无荧光发射特性。为提高分析检测的灵敏度和分离选择特性,常常需要将氨基酸衍生。氨基酸的衍生方式有柱前衍生和柱后衍生两种。柱后衍生与 IEC 法相结合,通常的衍生试剂为茚三酮和邻苯二甲醛(OPA)。柱后衍生的缺点在于分析柱易被样品组分污染、分析时间长且灵敏度较低、需要专用仪器且仪器较复杂、试剂必须变为中性才能检测等。从色谱分析的角度上讲,柱后衍生与 IEC 法相结合分析氨基酸时没有充分发挥高效液相色谱法的优势。而柱前衍生技术与 RP-HPLC 相结合分析氨基酸正弥补了它的不足。RP-HPLC 分析技术快速、灵敏,而且仪器的适用性更广(不止局限于氨基酸的测定),被认为是经典氨基酸分析技术的一种替代技术^[2]。

目前已经报道的用于氨基酸柱前衍生的衍生试剂很多,主要有:邻苯二甲醛(OPA)、氯甲酸苄甲酯(FMOC-Cl)、异硫氰酸苯酯(PITC)、丹酰氯(Dansyl-Cl)、二甲胺偶氮苯磺酰氯(Dabsyl-Cl)和 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯(AQC)等,下面依次介绍它们与 RP-HPLC 相结合分析氨基酸的原理及特点。

1.1 邻苯二甲醛(OPA)

这种衍生试剂最早是用于代替水合茚三酮,以提高柱后衍生离子色谱法的检测灵敏度。用于柱前衍生分析氨基酸产生于 1971 年^[3]。OPA 法是目前应用于柱前衍生分析氨

收稿日期:2004-05-07

作者简介:宋志峰(1975-),男,吉林省梅河口人,吉林省农业科学院大豆研究中心研究实习员,学士,主要从事谷物品质分析。

基酸最普遍的技术之一。OPA与硫醇试剂联用,室温碱性条件下($\text{pH} \approx 9.5$)迅速与一级氨基酸反应(仅需30 s),生成具有强荧光的产物1-硫代-2-烷基-异吲哚($\lambda_{\text{ex}}=340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=450 \text{ nm}$)。所使用的硫醇试剂通常为2-巯基乙醇(2-MCE)和3-巯基丙酸(3-MPA),但前者有时造成某些氨基酸的分离度较差,故常用后者代替^[3]。改进的方法,使用小粒径填料(3 μm)的短分析柱测定生理体液中的28种游离氨基酸时,分析时间小于13 min^[4]。虽然这一方法在实际工作中的荧光检测灵敏度通常为1 pmol,但也有报道说最低可达5 fmol^[2]。

优点:①OPA本身不发荧光,色谱分离中不会形成干扰峰;②OPA与硫醇试剂连用和一级氨基酸的反应迅速,易于实现在线自动化;③柱寿命长,每100~150次分析后更换保护柱,每根分析柱至少可以作700次分析,而保留时间和峰形无明显变化。

缺点:①OPA不能直接与二级氨基酸(脯氨酸和羟基脯氨酸)反应,需预先氧化开环,补偿这一缺陷可通过与FMOC-Cl联用的方法;②OPA试剂本身不稳定,容易氧化降解(由无色透明变成微黄色),造成实际工作中试剂的保存困难;③OPA与氨基酸的衍生产物也不稳定,衍生后需立即进样分析。

1.2 氟甲酸苄甲酯(FMOC-Cl)

FMOC-Cl在中性溶液中能同时与一级和二级氨基酸迅速反应(30 s)生成具有强荧光的衍生物,可用荧光检测($\lambda_{\text{ex}}=265 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=310 \text{ nm}$),也可用紫外检测。衍生产物(组氨酸除外)非常稳定,允许24 h内分析。此方法分离生理氨基酸标准混合液中的22种氨基酸可在23 min内完成,分离20种氨基酸衍生物为20 min。检测灵敏度低于fmol级。

优点:①能够同时与一级和二级氨基酸反应,且反应速度快,易于实现自动化。②衍生产物稳定,允许24 h内上机分析。

缺点:①试剂本身及其水解产物FMOC-OH有荧光,色谱分离中会产生一定干扰。实验室中常用戊烷抽提以除去干扰,并能终止反应和防止衍生产物的自然降解^[5]。Maeder等^[6]和Keli ou^[7]等使用柱前自动衍生和多步自动控制程序,实现了不需预先除去剩余试剂而不干扰色谱分离。②FMOC-Cl与组氨酸形成的衍生物不稳定,影响定量。

1.3 异硫氰酸苯酯(PITC)

PITC柱前衍生法也是普遍用于RP-HPLC分析氨基酸的方法之一^[8,9]。虽然这种物质被研究了40多年,但直到Tarr等将其用于测定羧肽酶Y的消化物之后,才被应用到游离氨基酸定量之中,随后他们又将此方法拓展,用于分析水解多肽和蛋白质氨基酸。PITC与氨基酸反应生成苯氨基硫甲酰衍生物(PTC-AA),用紫外检测(254 nm),因此该方法的检测灵敏度不如荧光检测高。但是由于PTC-AA的紫外吸收值高,所以当分析氨基酸标样时,其检测的灵敏度也可以达到4 pmol,而分析实际样品时,它的检测灵敏度只能达到50 pmol^[2]。室温下,PITC与氨基酸的衍生反应可在5~10 min内完成。由于试剂具有挥发性,所以需用过量的试剂进行反应,反应后剩余试剂通过减压蒸发法去除。本方法已拓展至磷酸氨基酸和硫酸氨基酸等修饰氨基酸与不同组织氨基酸的分析。

优点:①可与一级和二级氨基酸同时反应;②衍生产物单一、稳定,冻干的衍生物-20℃可贮存1个月,4℃水溶液中可贮存3 d,而色谱响应值无明显变化^[10];③分析时间短,测定水解氨基酸仅需12 min。

缺点:①样品的制备较为繁琐,需预先去除剩余试剂,而且虽然严格操作,但存在于样品中的痕量PITC试剂也会缩短分析柱的寿命;②胱氨酸的线性不好,实践中此法不适用于游离胱氨酸的测定;③如前所述,由于只能使用紫外检测,所以和使用荧光检测

的方法相比,此法检测灵敏度较低。

1.4 丹酰氯(Dansyl-Cl)

1952年Weber合成了Dansyl-Cl,它是著名的测定一级、二级胺的荧光试剂,除了和RP-HPLC结合测定氨基酸外,还可以用于薄层色谱法(TLC)。Dansyl-Cl与氨基酸最适反应条件为:室温下暗反应35~50 min,Ernst等^[11]则推荐反应时间最好为60 min,并且指出反应时间的长短主要是由氨基酸的结构所决定的。Dansyl-Cl与氨基酸形成的单酰化衍生物具有很强的荧光,使用荧光检测器检测($\lambda_{\text{ex}}=330\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=550\text{ nm}$),也可以用紫外检测(250 nm)。荧光检测的灵敏度为0.1 pmol,紫外检测的灵敏度仅为100 pmol。而Fürst等^[12]则报道,当检测人体血浆中的游离氨基酸时,每种氨基酸和多肽(除胱氨酸外)的检荧光测限为1.5 pmol。Dansyl-Cl与组氨酸反应生成双峰,但次峰(单衍生物)是在天冬氨酸和谷氨酸之间洗脱出来,不会干扰其他氨基酸的定量。此法也可用于各种修饰氨基酸的分析。

优点:①一级和二级氨基酸可同时测定;②此法胱氨酸的线性优异,适用于HPLC法定量生物材料中的游离胱氨酸^[12]。

缺点:①Dansyl-Cl与氨基酸的衍生反应活性差,速度较慢,至少需要35 min才能达到最大产率;②衍生物的荧光易被缓冲液猝灭,有时需用紫外检测,但检测灵敏度低;③衍生产物不太稳定,需要在密闭和避光的条件下反应,并且衍生完成后需立即进样分析;④如前所述,由于组氨酸与Dansyl-Cl反应生成双峰,所以它的重复性较差。

1.5 二甲胺偶氮苯磺酰氯(Dabsyl-Cl)

Dabsyl-Cl为Dansyl-Cl的类似物,和Dansyl-Cl与氨基酸的反应一样,都属于磺酰卤化物的烷基化修饰。Dabsyl-Cl与氨基酸反应生成具有强紫外吸收的产物(436 nm)。紫外检测灵敏度为1 pmol,荧光检测灵敏度为0.5 pmol,两者相当。Dabsyl-Cl已经被成功地应用于纳克级浓度的蛋白水解氨基酸的分析^[13]。也有用于尿中游离氨基酸测定的报道。Vendrell等^[14]对Dabsyl-Cl与氨基酸反应条件进行了优化,使反应时间大为缩短。此方法现已拓展至磷酸氨基酸和硫酸氨基酸等修饰氨基酸的检测。

优点:①可同时分析一级和二级氨基酸;②衍生方法简单,避免了由于繁琐的操作而造成的误差;③衍生产物稳定,室温下保存1个月之久也无明显的降解;④此法既可用荧光检测又可用紫外检测,且两者的灵敏度相当。

缺点在于Dabsyl-Cl与组氨酸、赖氨酸、胱氨酸和酪氨酸反应生成多种衍生物,且这些衍生物的产生是随试剂与氨基酸的比例变化而变化的,因此造成未知样品的无法定量。

1.6 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(AQC)

AQC是由Cohen等^[15]于1993年合成的一种全新的柱前衍生试剂。它是近几年应用较为广泛的氨基酸柱前衍生试剂之一^[16,17]。AQC与氨基酸反应是快速而且特效的,典型的衍生反应是5 μL 的氨基酸溶液与35 μL 的硼酸混合,然后加入10 μL 的AQC试剂。样品于55℃下加热10 min后进样分析。此法既可用紫外检测(254 nm)又可用荧光检测($\lambda_{\text{ex}}=250\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=395\text{ nm}$, 520 nm),其中 $\lambda_{\text{em}}=520\text{ nm}$ 是避免反应副产物6-氨基喹啉形成较大的色谱峰而干扰分析。当分析纯蛋白水解氨基酸时,检测灵敏度可达fmol级,但在分析较复杂样品的水解氨基酸时,由于有背景干扰,检测灵敏度为0.1~1.0 pmol。

优点:①衍生反应简单快速,且不受介质干扰;②衍生产物稳定;③衍生产物的发射波长比AQC的水解产物的发射波长大60 nm,因而色谱分析时试剂的水解物干扰小;④

衍生缓冲液的 pH 范围宽,一般为 8.2~9.7。

缺点:①相对较长的分析时间(标准 AQC 法分析 18 种水解氨基酸需 45 min);②AQC 在低浓度流动相介质中的荧光量子仅为高浓度下的 10%,导致洗脱过程中前馏分的检测灵敏度通常比后馏分的检测灵敏度高^[8];③当样品中存在羟基脯氨酸和羟基赖氨酸时,反应副产物 6-氨基喹啉会干扰定量。Wandelen 等人虽然优化了色谱条件,提高了 AMQ 和羟基脯氨酸、羟基赖氨酸的分离度,但是以延长分析时间为代价的。

2 几种柱前衍生技术的比较

以 OPA、FMOC-Cl、PITC、Dansyl-Cl、Dabsyl-Cl 和 AQC 等为衍生试剂的氨基酸柱前衍生技术在实际应用中各具特点,它们之间的比较见表 1。

表 1 几种柱前衍生技术的比较

比较因素	衍 生 技 术					
	OPA	FMOC-Cl	PITC	Dansyl-Cl	Dabsyl-Cl	AQC
检测模式	荧光	紫外/荧光	紫外	紫外/荧光	紫外/荧光	紫外/荧光
灵敏度	fmol	fmol	pmol	pmol	pmol	fmol
衍生物稳定性	不稳定	稳定	稳定	极稳定	极稳定	极稳定
反应动力学	快速	快速	中速	慢速	慢速	快速
是否检测二级氨基酸	否	是	是	是	是	是

OPA 法是分析一级氨基酸(胱氨酸除外)的常用方法,如果需要分析二级氨基酸则一般选用 FMOC-Cl 或 OPA 与 FMOC-Cl 联用技术。PITC 法灵敏度稍差,当样品充足可用时,用此方法作临床或蛋白化学分析较好。Dansyl-Cl 法一般用于测定胱氨酸,但是灵敏度不如其他方法。Dabsyl-Cl 法可用于测定二级氨基酸和胱氨酸,但需注意控制影响定量的干扰峰。AQC 法的应用时间虽然较短,但优点甚多,缺点主要是试剂在低浓度流动相和高浓度流动相介质中的荧光量子效率不一致,导致前馏分的检测灵敏度比后馏分的高。

3 结束语

氨基酸的柱前衍生 RP-HPLC 分析技术以其特有的优势——灵敏度高、分析时间短和重复性好等,正在为人们所普遍接受。常用的几种柱前衍生试剂分析氨基酸时各具特点,实际工作中,具体用何种方法应根据衍生速度与简便程度、分析速度与灵敏度、检测二级氨基酸与胱氨酸能力、干扰因素和重复性等指标作出选择。

参考文献:

- [1] Speakman D H, et al. Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids[J]. Anal.Chem, 1958, 30(7): 1190-1206.
- [2] Fürst P, et al. Appraisal of Four Pre-Column Derivatization Methods for the High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Biological Materials[J]. Chromatogr, 1990, 499: 557-569.
- [3] Cooper J D H, et al. The Stability of o-Phthalaldehyde/2-mercaptoethanol Derivatives of Amino Acids: An Investigation Using High-Pressure Liquid Chromatography with a Precolumn Derivatization Technique[J]. Anal. Biochem, 1984, 142: 98-102.
- [4] Graser T A, et al. An Ultra Rapid and Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Tissue and Plasma Free Amino Acids[J]. Anal. Biochem, 1985, 151: 142-152.
- [5] Einarsson S. Detection of Amino Acids with 9-fluorenylmethyl Choloformate and RPLC[J]. Chromatogr, 1983, 282: 609-618.

- [6] Maeder G, et al. Determination of Amphetamines by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. On-Line Precolumn Derivatization with 9-fluorenylmethyl Chloroformate[J]. Chromatogr, 1992, 593: 9-14.
- [7] Keli ou, et al. Improved High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acids Derivatized with 9-fluorenylmethyl Chloroformate[J]. Chromatogr. A, 1996, 723: 219-225.
- [8] Heinrikson R L, and Meredith S C. Amino Acid Analysis by Reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate[J]. Anal. Biochem, 1984, 136: 65-74.
- [9] Cherry J P and Barfold R A. Methods for Protein Analysis[M]. Champaign: American Oil Chemists' Society, 1984, 13-35.
- [10] Scholze H. Determination of Phenylthiocarbamyl Amino Acids by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography[J]. Chromatogr, 1985, 350: 453-460.
- [11] Ernst B, et al. Separation of Amino Acids by High performance Liquid Chromatography[J]. Anal. Chem, 1976, 48(8): 1106-1109.
- [12] Molnár-perl I. Tryptophan Analysis in Peptides and Proteins, Mainly by Liquid Chromatography[J]. Chromatogr. A, 1997, 763: 1-10.
- [13] Chang J-Y, et al. Amino Acid Analysis at the Picomole Level. Application to the C-terminal Sequence Analysis of Polypeptides[J]. Biochem, 1981, 199: 547-555.
- [14] Vendrell J and Avilés F X. Complete Amino Acid Analysis of Proteins by Dabsyl Derivatization and Reverse-Phase Liquid Chromatography[J]. Chromatogr, 1986, 358: 402-413.
- [15] Cohen S A and Michaud D P. Synthesis of A Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids Via High-Performance Liquid Chromatography[J]. Anal. Biochem, 1993, 211: 279-287.
- [16] Liu H J. Determination of Amino Acids by Precolumn Derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate and HPLC with Ultraviolet Detection[J]. Chromatogr. A, 1994, 670: 59-66.
- [17] Cohen S A, De Antonis K M. Application of Amino Acid Derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate Analysis of Feed Grains, Intravenous Solutions and Glycoproteins[J]. Chromatogr. A, 1994, 661: 25-34.
- [18] Engstrom A, et al. Determination of 2-(9-anthryl)ethyl Chloroformate-labeled Amino Acids by CE and LC with Absorbance or Fluorescence Detection[J]. Anal. Chem, 1995, 67: 3018-3022.

Techniques of Pre-column Derivatization in Amino Acid Analysis

SONG Zhi-feng, WANG Li, JI Feng, et al.

(Soybean Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province,
Gongzhuling 136100, China)

Abstract: The theory and characteristics of amino acid analysis techniques by integrating reverse-phase high performance liquid chromatography with pro-column derivatization were introduced in the paper. The reagents of pro-column derivatization were o-phthalaldehyde, 9-fluorenylmethyl chloroformate, phenylisothiocyanate, 5-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride, 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate and so on.

Key words: Reverse-phase high performance liquid chromatography; Amino acid analysis; Pre-column derivatization