

文章编号 :1009-038X(2003)01-0074-03

柱前衍生反相高效液相色谱法分析碱性氨基酸

吴艳¹, 艾连中¹, 丁先锋², 彭奇均², 汤坚¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:采用柱前衍生反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定碱性氨基酸含量,衍生化试剂为 2,4-二硝基氯苯(CDNB),流动相为 0.2 mol/L 的醋酸-醋酸盐缓冲液(pH 5.20)和甲醇的混合溶液,其体积配比为 75:25,不需梯度洗脱;采用 C₁₈柱,在波长 360 nm 条件下进行紫外检测,碱性氨基酸质量浓度与峰面积呈良好的线性关系,相关系数均在 0.98 以上,分离效果较好。

关键词:碱性氨基酸; 2,4-二硝基氯苯; 柱前衍生化; 反相高效液相色谱

中图分类号: Q 517

文献标识码: A

Precolumn Derivation RP-HPLC Method of Basic Amino Acids

WU Yan¹, AI Lian-zhong¹, DING Xian-feng², PENG Qi-jun², TANG Jian¹

(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A method for determination of basic amino acids by RP-HPLC with 2,4-dinitrochlorobenzene precolumn derivation has been developed. Chromatographic conditions were as follows: mobile phase—0.2 mol/L acetate buffer (pH 5.20) and methanol in a ratio of 75:25; separation column C₁₈; detection wavelength 360 nm. Good linear relation between the concentration of basic amino acids and peak area was obtained, and correlative coefficient was over 0.98. Basic amino acids were well separated by the method.

Key words: basic amino acids; 2,4-dinitrochlorobenzene; precolumn derivatization; RP-HPLC

氨基酸分析在食品、生化、医学乃至生命科学领域中有广泛的应用。传统的分析方法主要是采用氨基酸自动分析仪测定,但该仪器对氨基酸测定的专用性强,且仪器的价格昂贵,不能广泛应用于其它成分的分析。近 20 年来,随着键合反相色谱的应用及柱前衍生化技术的发展^[1],氨基酸的分析多采用高效液相色谱法,它具有分辨率高、灵敏度高,操作简单且可一机多用的优点。常用的衍生化试

剂^[2]包括邻苯二甲醛(OPA)、丹酰氯(Dansyl-Cl)、2,4-二硝基氟苯(FDNB)、异硫氰酸苯胺(PITC)等。

随着对氨基酸研究的不断深入,碱性氨基酸在医药、食品及饲料等领域的应用也日益普遍。赖氨酸是人体及动物自身不能合成的一种必需氨基酸,可用于治疗营养缺乏、发育不全及氮平衡失调症,同时还用于食品及饲料强化剂。精氨酸与脱氧胆酸制成的复合制剂(明诺芬)是主治疗病毒性黄疸的

收稿日期: 2002-07-08; 修回日期: 2002-09-05.

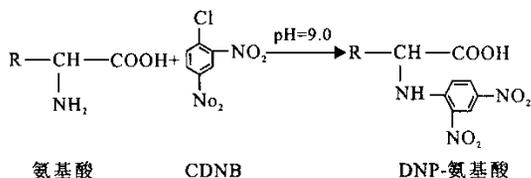
作者简介: 吴艳(1977-),女,山东烟台人,食品科学与工程硕士研究生。

万方数据

有效药物,组氨酸可用于生产治疗心脏病、贫血、风湿性关节炎和消化道溃疡等的重要药物^[3]。目前,从提取胱氨酸母液或者猪血粉中制备碱性氨基酸都需要对其进行分析检测,作者采用 2,4-二硝基氯苯(CDNB)作为柱前衍生化试剂来分析碱性氨基酸,其柱前衍生和色谱分析条件与 FDNB 法^[4]类似,但与 FDNB 法相比,具有衍生试剂价廉易得,理化性质稳定,制备试样方便简单,过量的 CDNB 对测定结果无干扰等特点^[5]。

CDNB 在碱性条件下能与氨基酸缩合,生成二硝基苯基氨基酸(DNP-氨基酸)^[6]及副产物 DNP-OH 等。该衍生物由于硝基苯环的引入有强的紫外吸收,并且有很好的稳定性。各种 DNP-碱性氨基酸由于 R 基不同,在流动相洗脱过程中其保留时间有所不同,从而达到分离的目的。

衍生化反应的方程式如下:



1 材料与方法

1.1 试剂

组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)均为上海化学试剂公司产品;2,4-二硝基氯苯(CDNB)、醋酸、醋酸钠、无水碳酸钠、甲醇、盐酸均为分析纯试剂。

1.2 仪器

高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器(DAD K-2700 型),德国 KNAUER 公司产品;PHS-3 型精密数显酸度计,上海天达仪器有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 碱性氨基酸的衍生化 从待测的碱性氨基酸溶液中各精密量取 1 mL 置 10 mL 的容量瓶中,加质量分数 1% 的 Na_2CO_3 溶液($\text{pH}=9$)1 mL,再加质量分数 1% 的 2,4-二硝基氯苯(CDNB)的甲醇溶液 1 mL,密封摇匀,置 85 °C 恒温水浴中暗处反应 1 h,取出冷却,分别加入稀盐酸 0.5 mL,用水稀释至刻度,摇匀。在一定的色谱条件下(见表 1)取 20 μL 进样测定。

1.3.2 线性关系的测定 准确称取适量组氨酸、赖氨酸、精氨酸,配成质量浓度分别为 0.005、0.01、0.05、0.10、0.16、0.20、0.25、0.30 mg/mL 的溶液,

按上述衍生化方法制得 DNP-氨基酸并测定其线性关系。

表 1 CDNB 衍生化氨基酸的分离条件

Tab. 1 Separation conditions of CDNB derivatization of alkaline amino acids

色谱条件	参 数
色谱柱	Kromasil C ₁₈ 4.6 mm × 250 mm
流动相	A: 甲醇; B: 0.2 mol/L NaAc-HAc 缓冲体系($\text{pH}=5.20$); V(A): V(B) = 25:75 经 0.45 μm 滤膜过滤,超声波水浴脱气 30 min.
柱温	40 °C
检测波长	360 nm
流量	1 mL/min

2 结果与讨论

2.1 回归方程

以 DNP-氨基酸峰面积为纵坐标 Y,碱性氨基酸的质量浓度为横坐标 X,对测得的数据进行直线回归,结果见图 1。回归方程、相关系数和线性范围见表 2。结果表明,被测氨基酸在此质量浓度范围内,经衍生化后生成的 DNP-氨基酸峰面积与碱性氨基酸质量浓度呈线性关系。

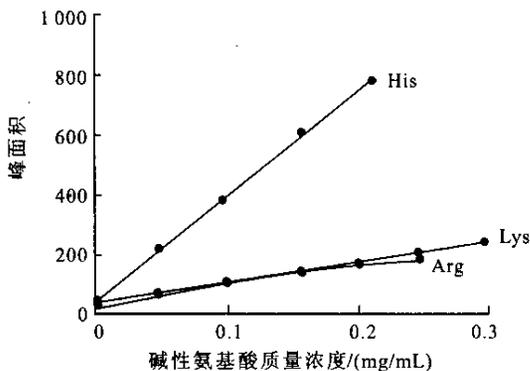


图 1 碱性氨基酸的回归直线

Fig. 1 The regression line of basic amino acids

2.2 衍生化试剂 CDNB 的加入质量

根据上述反应方程式可知,1 mol 碱性氨基酸与 1 mol CDNB 在碱性条件下可生成 1 mol DNP-氨基酸,1 mg 碱性氨基酸需要衍生剂的理论质量见表 3,但为了保证衍生反应完全,衍生试剂应适当过量。多次试验的结果表明,当衍生剂的实际加入质量是理论加入质量的 4~6 倍时,衍生反应完全且对分离不产生干扰,故作者在实验过程中选用衍生剂的质量为理论质量的 5 倍。

表2 线性关系测定结果

Tab.2 The linear regression equation and correlation coefficient of basic amino acids

碱性氨基酸	回归方程	相关系数	质量浓度的线性范围/(mg/mL)
His	$Y = 3387.7X + 55.295$	0.9933	0~0.21
Lys	$Y = 777.17X + 11.808$	0.9897	0~0.30
Arg	$Y = 563.11X + 39.586$	0.9912	0~0.25

表3 每毫克碱性氨基酸衍生化所需 CDNB 理论加入质量

Tab.3 The theoretical value of CDNB needed for per mg basic amino acid

碱性氨基酸	CDNB 理论加入质量/mg
His	1.31
Lys	1.39
Arg	1.16

2.3 衍生化反应的条件

2.3.1 温度 氨基酸与 CDNB 分别在碱性条件下于 50、60、80、90 °C 各反应 1h, 80 °C 和 90 °C 反应条件下, DNP-氨基酸得率较高. 为使衍生化反应完全, 反应条件选定为 85 °C. 虽然甲醇的沸点为 65 °C, 在此反应条件下极易挥发, 但是甲醇并不参加衍生化反应, 而是将 CDNB 溶解为 CDNB 的甲醇溶液, 当氨基酸与过量的 CDNB 接触, 反应就开始发生, 这样有利于反应的快速进行.

2.3.2 缓冲体系的 pH 值 经过多次实验摸索, 在缓冲液和甲醇的体积配比不变时, 降低缓冲体系的 pH 值可以明显提高各组分的分离度, 但并不意味着 pH 值越低分离效果就越好. 在 pH 值为 5.30, 5.20, 5.10 3 个不同条件下对混样进行分析, 因组氨酸和 DNP-OH 较难分离, 故主要考察两者的分离度. 结果发现在 pH 值为 5.20 时分离效果最好(见表 4).

表4 缓冲液 pH 值与分离度的关系

Tab.4 The relationship between pH of buffer solution and resolution

pH 值	R
5.30	1.43
5.20	1.92
5.10	1.54

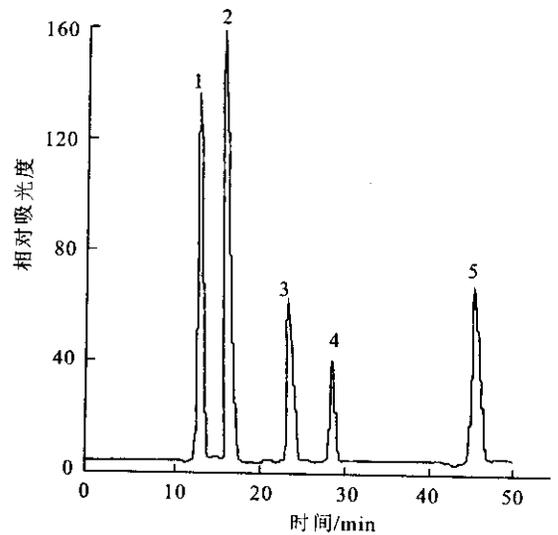
参考文献:

- [1] GIDDINGS J G. Advances in Chromatography[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1983.
 [2] 常碧影, 梁冬生, 阎惠文, 等. 氨基酸分析技术研究进展[J]. 分析化学, 1993, 21(10): 1220-1227. (下转第 81 页)

2.4 衍生化产物

本方法于 30 min 内可较好地分离碱性氨基酸, 结果见图 2.

其中赖氨酸为二氨基氨基酸, 可与 CDNB 衍生反应生成 3 种物质, 色谱图中标有两种赖氨酸衍生物. 在样品测定时, 可任选一种衍生物峰定量. 另外, 衍生化产物 DNP-氨基酸的最佳 pH 值为 9, 为避免因进样量大对色谱柱填料及组分的分离产生影响, 应加适量稀盐酸将试液调至 pH 值为 8 左右, 稀盐酸用量不可太大, 否则当 pH 值小于 6 时, DNP-氨基酸会产生沉淀.



1. DNP-OH 2. DNP-His 3. DNP-Lys 第一个峰 4. DNP-Arg;
5. DNP-Lys 第二个峰

图2 碱性氨基酸的标准色谱图

Fig.2 The standard chromatogram of basic amino acids

3 结论

采用柱前衍生反相高效液相色谱法分析碱性氨基酸是一种灵敏、快速的方法. 该法具有衍生反应完全、分离测定无干扰、结果准确可靠等特点. 所采用的衍生化试剂为 2,4-二硝基氯苯(CDNB), 流动相为醋酸-醋酸盐缓冲液(pH 5.20)和甲醇的混合溶液, 其体积配比 75:25, 不需梯度洗脱, 在 85 °C 衍生化反应 1 h, 碱性氨基酸能得到很好的分离.

由图 8 可以看出,原淀粉与丙烯酰胺接枝聚合后,其团粒结构仍然存在,丙烯酰胺只是覆盖在淀粉团粒的表面,淀粉团粒内部还没有进行反应。

3 结 论

1) 引发剂用量、单体用量、反应温度和反应时间对玉米淀粉与丙烯酰胺合成产物的接枝率和单体聚合率有很大影响。当淀粉用量为 5.0 g,丙烯酰胺为 8.0 g, Ce^{4+} 用量为 1.0 mL, 温度为 60 °C, 反应 2 h 时, 其接枝率达 83.40%, 单体聚合率为 98.13%。

2) 淀粉是一种弱还原剂,除了作为接枝共聚反应的骨架材料以外,它对单体的聚合本身有一定的促进作用。

3) $\text{Ce}^{4+}-\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ 复合体系可以提高单体的聚合率,其原因是实现了 $\text{Ce}^{4+}-\text{Ce}^{3+}-\text{Ce}^{4+}$ 的多次循环,既保证了 Ce^{4+} 引发的高接枝率和高聚合速率,又可减少 Ce^{4+} 的用量。

4) 从扫描电镜观察可以看出,原淀粉与丙烯酰胺的接枝聚合只发生在淀粉颗粒表面,内部没有发生反应,且有氮时的接枝率和单体聚合率都比较大。

参考文献:

- [1] 曾宪家. 接枝淀粉的应用[J]. 广西化工, 1991(1): 12-19.
- [2] 谢铁凌, 邱学青, 杨卓如. 淀粉化工的研究现状及进展[J]. 广东化工, 1997(2): 6-8.
- [3] 鲁德忠, 巫拱生, 胡应模, 等. 丙烯酰胺与玉米淀粉接枝共聚的合成及其对含石油废水的处理[J]. 吉林大学自然科学学报, 1989(1): 81-85.
- [4] 潘松汉, 黎国康, 王真智, 等. 淀粉与丙烯酰胺接枝共聚反应动力学的研究[J]. 石油化工, 1993(3): 177-181.
- [5] 张友松. 变性淀粉生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [6] 潘松汉, 王贞, 黎国康, 等. 淀粉糊化对淀粉-丙烯酰胺接枝聚合的影响[J]. 精细化工, 1993(10): 56-59.
- [7] 巫拱生, 阎少羽, 鲁德忠, 等. Ce^{4+} 引发丙烯酸丁酯与玉米淀粉接枝共聚反应规律的研究[J]. 吉林大学自然科学学报, 1989(3): 97-98.
- [8] 王玉芹, 杨巍, 崔丹. 钨盐-过硫酸盐复合引发淀粉与丙烯酰胺接枝共聚产物的研究[J]. 高分子学报, 1996(1): 111-114.
- [9] 张连生, 王玉芹, 杨巍. $\text{Ce}^{4+}-\text{Ce}^{3+}$ 循环体系引发淀粉与丙烯酰胺接枝共聚反应动力学的研究[J]. 高分子学报, 1994, (3): 354-357.

(责任编辑: 李春丽, 杨萌)

(上接第 76 页)

- [3] 张伟国, 钱和. 氨基酸生产技术及其应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [4] 陈娅兰, 付宜和, 王国林, 等. 十八种氨基酸注射液的 HPLC 2- μ -二硝基氟苯柱前衍生化法含量测定[J]. 药物分析杂志, 1990, 10(3): 149-151.
- [5] 蒋新宇, 周春山. 氨基酸的柱前衍生高效液相色谱分析述评[J]. 湖南化工, 1999, 29(2): 9-11.
- [6] 杨胜. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.

(责任编辑: 朱明)