

经验交流

提高 Beckman 121 MB 型氨基酸分析仪的分辨率

张林生 路 苹 曹 让

(西北农业大学中心实验室, 陕西杨陵)

在 Stein 和 Moor 等人研究的基础上发展起来的 Beckman 121MB 型氨基酸分析仪, 以聚苯乙烯磺酸树脂作为阳离子交换剂。单柱洗脱系统由 pH 3.28、pH 3.90 和 pH 4.95 的柠檬酸钠缓冲液组成。该仪器与日本、瑞典等国的同类仪器相比最大的缺点是无滤氨柱。因此对试剂、环境的要求很高, 以消除氨对分析的污染。但在实际工作中, 蒸馏水、缓冲液、试剂及实验室环境都可能带入氨, 从而导致氨基酸分析, 特别在碱性氨基酸段分离效果差, 基线向上漂移, 出现氨台阶, 影响分析效果。若用双柱层析系统分析, 可以避免这些现象, 但由于层析柱的更换使得某种氨基酸可能被遗漏, 如 γ -氨基丁酸。为了能用一个层析柱进行完整的样品分析, 并消除氨对分离的影响, 提高碱性氨基酸的分辨率, 本文采用增加滤氨柱的方法, 同时对缓冲液 pH 值和仪器分析程序进行调整, 取得了良好的效果。

一 滤氨柱的安装

Beckman 121 MB 型氨基酸分析仪对环境要求较严, 使用国产试剂分离不太理想, 特别是碱性氨基酸段。为了提高氨基酸的分辨率, 我们在缓冲液泵与自动进样器之间安装了滤氨柱, 滤氨柱规格为 $\phi 2.8 \times 150\text{mm}$, 柱内筛板、过滤片系 Beckman 仪器公司制造, 填充剂用 HITACHI* 2650 阳离子交换树脂, 树脂床高度 50mm。当各种缓冲液流经滤氨柱时, 溶液中游离的氨就被吸附。分析一定时间后, 用 NaOH 溶液中的 Na^+ 交换滤氨柱中的 NH_4^+ , 使树脂再生, 而不影响层析柱对氨基酸组分的分离。

二 缓冲液的调试

缓冲液 pH 值对氨基酸的定位和分离起着决定性的作用, 溶液 pH 值过高或过低均会影响氨基酸的出峰时间和分辨率。滤氨柱的安装将导致原缓冲液 pH 值变化, 为此, 需在缓冲液中追补一定量的阳离子试剂——柠檬酸, 使得氨基酸的组分分离不受影响。通过试验, 各种缓冲液按下列配方制备为好:

	pH 2.20	pH 3.28	pH 3.90	pH 4.95
柠檬酸钠 (g)	19.80	19.80	34.66	19.80
盐酸 (ml)	16.50	12.00	16.50	2.50
苯酚 (g)	1.00	1.00	1.00	1.00
氯化钠 (g)	—	—	—	70.00
柠檬酸 (g)	—	0.50	0.50	—
硫二甘醇 (ml)	5.00	2.50	2.50	—
总体积 (ml)	1000	1000	1000	1000
异丙醇 (ml)	—	20.00	20.00	40.00

三 仪器分析程序改变

在增加滤氨柱和改变缓冲液 pH 值的条件下, 仪器的分析程序也需相应调整, 才能达到较好的分离效果。本试验对缓冲液的洗脱时间作了适当的改变, 将 pH 3.28 缓冲液洗脱时间减少 4 分钟, pH 3.90 缓冲液洗脱时间增加 2 分钟。经过数次对比试验和实际应用, 证明按下列分析程序进行分析效果较好。

步 骤	时间 (分钟)	总时间 (分钟)	步 骤	时间 (分钟)	总时间 (分钟)
① 准备	20.0	—	⑨ 缓冲液变换	20.0	56.1
② 停转纸带, 转送样品	0.1	0.1	⑩ 再生	4.0	60.1
③ 完成样品传送	1.9	2.0	⑪ 平衡	6.0	66.1
④ 样品注入	0.1	2.1	⑫ 换柱	2.0	68.1
⑤ 完成注入	2.9	5.0	⑬ 快速冷却	2.0	70.1
⑥ 连续分析	16.0	21.0	⑭ 纸带旋转	0.1	70.2
⑦ 缓冲液变换	0.1	21.1	⑮ 完成最后分析	10.0	
⑧ 柱温升高	15.0	36.1	⑯ 停机	20.0	

四 标准氨基酸混合液分析

含有 18 种标准氨基酸的混合液在无滤氨柱和有滤氨柱条件下用 121 MB 型氨基酸分析仪分析。二者色谱图有显著差异, 前者基线在苯丙氨酸后逐渐向上

(下转第 399 页)

(上接第 398 页)

我们感谢王应陈教授对此工作的关心,感谢施建平同志的大力支持。

参 考 文 献

[1] 张龙翔等:《生化实验方法和技术》,高等教育出版社,

(上接第 400 页)

漂移,形成较高的氨台阶, γ -氨基丁酸、赖氨酸-氨、组氨酸和精氨酸分离效果差;而后者基线较平稳,无氨台阶,既保证了碱性氨基酸的分辨率,又不影响其它氨基酸的分离,几种具有代表性的氨基酸,如苏氨酸-丝氨酸、酪氨酸-苯丙氨酸和赖氨酸-氨的分辨率分别为 81.5%、89.7% 和 97.5%。而且避免了双柱分析时 γ -氨基丁酸的遗失。

利用改变后的分析条件,对氨基酸混合液五次重复分析,各种氨基酸峰的保留时间的变异系数 $<0.5\%$,标准差 <1.2 ;各种氨基酸浓度的变异系数 $<2.5\%$,标准差 <2.5 。

综上所述,对 Beckman 121 MB 型氨基酸分析仪施加滤氨柱后,在更改过的缓冲液和分析条件下,氨基酸的分离效果尤其是碱性氨基酸明显好转,提高了分

1984 年,225—227 页。

[2] Ckérayil, J. D. et al.: *Methods in Enzymology*, 1968, Vol. XII (106a), Part B.

[本文于 1987 年 9 月 12 日收到]

辨率,基线稳定,精密度和重现性均在生化分析误差范围内,解决了缓冲液中的氨污染问题。一年多来,我们采用上述分析方法对蚜虫、牛肉、牧草、果品、谷物等样品进行测定,结果与文献[3][4]中的一致。

本文承汪沛洪教授审阅,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Beckman Instruments Inc: Training Course for 121 MB Amino Acid Analyzer, 1979.
- [2] Analysis with Ammonia Filter Column by Model 835 Amino Acid Analyzer, 1983.
- [3] 陈志辉等:《昆虫学报》,1981, 3, 338—339.
- [4] 刘兴亚等:《营养学报》,1986, 4, 374—382.

[本文于 1987 年 8 月 24 日收到]