

技术与方法

氨基酸的微型双向薄层色谱快速分析

吴有光 龚十妹

(江西医学院医学遗传室,南昌)

提 要

采用自制微晶纤维素-硅胶 G(或 H) 混合固定相微型薄膜 ($5 \times 5\text{cm}$) 双向色谱分离了标准氨基酸混合液、蛋白质水解物、去蛋白质血浆和新鲜尿液中的氨基酸,效果良好。双向色谱展开时间共只约 1 小时,绝大部分氨基酸分析灵敏度为 10^{-10} — 10^{-11}mol 。

双向薄层色谱分析氨基酸,分离能力高,直观而简便,是氨基酸分析中广为采用的方法之一,以往一般是在大型 ($20 \times 20\text{cm}$ 或 $10 \times 10\text{cm}$) 硅胶或微晶纤维素等薄层板上完成的,其不足是较费时费料,难于达到微量而快速的分析,故曾不断有人探索利用微型板(膜)进行快速分析,以提高它在实际应用中的效果和价值。Wadman 等^[1]曾利用微型微晶纤维素板 ($5 \times 5\text{cm}$, Alufolin 板, Merck 产) 快速分析尿中游离氨基酸,但对尿液必须预先脱盐,色谱展开时间亦要 120 分钟,从分离图谱结果看亦不十分理想。Smith^[2]认为微型薄板双向色谱只宜用来对氨基酸作极初步的筛查;利用微型聚酰胺薄膜或高效薄层板可较好地快速分析丹磺酰氨基酸^[3],但它须预先将氨基酸用丹磺酰氯酰化,而其衍生物荧光不太稳定^[4]。本文利用微晶纤维素-硅胶 G 的微型薄膜,快速双向分离氨基酸,取得了与大型薄层板^[5]一样理想分离效果。此分析法省时(双向展开约耗时 60 分钟),省料,样品前处理简单,(血与羊水等只需用乙醇去蛋白质,尿液可直接分析),斑点显色十分稳定,绝大部分氨基酸分析灵敏度可达 10^{-10} — 10^{-11}mol (10^{-3} — 10^{-9}g),利用外标校正原位扫描法^[6]亦可很方便地对氨基酸进行定量分析。

材 料 与 方 法

一、材料与试剂

微晶纤维素: 粒度小于 360 目,(上海试剂四厂产、柱层析用)。

硅胶 G: 粒度 $10-40\mu$ (青岛海洋化工厂)。

试剂: 除仲戊醇 (sec-amyl-alcohol) 为 BDH 试剂外,其他试剂皆为国产分析纯级,氨基酸一部分为国产(绝大部分为色谱纯),一部分为进口产品。

展开仪: 自制水平式薄层色谱展开仪^[7]。

二、样品及溶剂制备

10% 异丙醇氨基酸标准液的配制同文献 [6], 镉-茚三酮显色剂和血浆(血清)乙醇去蛋白液制备同文献 [8]、牛血清清蛋白水解同文献 [9], 和展开溶剂配制同文献 [5]。第一相展开剂为异丙醇: 乙酸乙酯: 丙酮: 甲醇: 仲戊醇: 26% 氨水: 水 ($9:3:3:1:1:3:3$, 体积比), 第二相展开剂为正丁醇: 丙酮: 异丙醇: 甲酸: 水 ($9:4:4:1.5:3$, 体积比), 用前临时配制。

三、方法

色谱薄膜的制作与文献 [5] 的色谱薄层板制作基本上相同。微晶纤维素-硅胶 G 混合物 ($5:2$ 或 $6:4$ W/W) 放入碾钵中, 用含 4% 乙醇

的蒸馏水制糊,铺制在预先处理好的,厚 0.07 mm 的聚酯薄膜片基上,室温下干燥后,用刀片切成 $6 \times 6\text{cm}$ 或 $5.5 \times 5.5\text{cm}$ 微型片(可长期保存),固定相干层厚约 0.15mm。样品点在薄膜片一角,距相邻两沿为 0.5—0.8cm(一般第二向底沿稍留宽些),两向展开剂前沿均为 5cm。

点样、展开和显色等方法和步骤基本同文献[5]。在冷风吹拂下点样,样点直径不宜超过 2mm;滤纸桥应距原点的基线 3mm 左右;在室温下每向展开时间均约为 25 分钟左右。第一向展开后,放在 50°C 左右烘箱中鼓风干燥 20—30 分钟,然后再进行第二向展开;显色时宜小心而匀速地把薄膜插入扁形显色槽中,全部浸润后立即取出,在空气中放置片刻,再放入 $52^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 烘箱中显色 20 分钟左右。

结果与讨论

本文利用微型薄层膜分离了 27 种标准氨基酸混合液,牛血清清蛋白水解物,PKU 去蛋白血浆(取自一例苯丙酮尿症患者)和同型胱氨酸尿症患者的新鲜尿液,结果见图 1(封二)。从图中可见分离效果好,斑点圆而扩散小,各斑点间的相对位置相当稳定,一般不需外标参考即可准确鉴定氨基酸斑点。几对较难分离的氨基酸,如亮氨酸与异亮氨酸,赖氨酸与鸟氨酸有时亦可获得较好分离;丙氨酸、 β -丙氨酸和 GABA 之间,缬氨酸和甲硫氨酸、甲硫氨酸与色氨酸之间,谷酰胺与同型胱氨酸之间有时互有浸润,但各氨基酸斑点仍有自己的核心,因而不难鉴别。镉-茚三酮对脯氨酸及羟脯氨酸显淡黄色, β -丙氨酸开始时略带紫红色、甘氨酸为桔红色,其他氨基酸皆呈鲜红色。

分析血浆时,只需用乙醇(终浓度 70% 左右)沉淀蛋白质,不必去盐,羊水亦然。尿液和干滤纸血斑洗脱液可直接分析。其分离效果与对标准氨基酸液及蛋白质水解物效果相仿,这是由于微晶纤维素中加入一定量的硅胶后有省去脱盐处理的优点,故效果较 Wadman 等的为佳。2—3 μl 血浆可显 17—21 种氨基酸,2—

3 μl (即相当 2—3 μg 肌酐量的尿)尿液可显 16—19 种。镉-茚三酮对氨基酸显色灵敏,此方法的分析灵敏度,除脯氨酸和羟脯氨酸为 10^{-7}g 外,其他氨基酸均可达 10^{-8} — 10^{-9}g (见表 1)。斑点显色稳定,如注意保存可达几个月,利于分析鉴定。自制的薄层膜均采用国产材料,平整均匀和坚固(利于定量分析),材料用量少(每块 $6 \times 6\text{cm}$ 薄膜约 0.2g 固定相,溶剂耗量少(每次展开仅耗溶剂 2ml),色谱展开所需时间少(约 1 小时)。整个分析过程可在 2 小时内完成。

表 1 微晶纤维素-硅胶 G 微型膜双向色谱分析氨基酸灵敏度

定性分析灵敏度	0.005 μg 量可较清晰显斑点 (10^{-11}mol)	0.01—0.02 μg 量可较清晰显斑点 (10^{-10}mol)	0.1—0.2 μg 量可清晰显斑点 (10^{-9}mol)
氨基酸	赖氨酸、缬氨酸、精氨酸、亮氨酸、组氨酸、异亮氨酸、谷氨酸、牛磺酸、丝氨酸、谷酰胺、甘氨酸、鸟氨酸、丙氨酸、GABA	酪氨酸、 β -丙氨酸、色氨酸、门冬酰胺、苯丙氨酸、瓜氨酸、甲硫氨酸、同型胱氨酸、苏氨酸、胱氨酸、 α -氨基丁酸、门冬氨酸	脯氨酸、羟脯氨酸 (原位扫描定量可提高灵敏度约一个数量级)

总之,此方法不需特殊试剂和材料,费用低,简便而较快速,效果好,与高效液相色谱(含高效氨基酸分析仪),一般氨基酸分析仪、丹磺酰氨基酸聚酰胺薄膜分析,以及 Guthrie 的细菌抑制法等氨基酸分析法相比,它有简便易行,样品前处理简单和有广泛的适用性等优点;利用本组建立的亚双向分离外标校正原位扫描法^[6]对双向色谱斑点进行定量分析,较双向薄层色谱中以前采用的洗脱比色法定量,更为准确、方便而快速。

参考文献

- [1] Wadman, S. K. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 1969, 25, 87.
- [2] Smith, I.: *Chromatogr. Electrophor. Techniques*, Vol. I, 4th ed., William Heinemann Medical Books, London, 1976, p105.
- [3] Woods, K.S. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1967, 133, 369
- [4] Blackburn, S.: *Amino acid Determination: Methods*

(下转第 444 页)

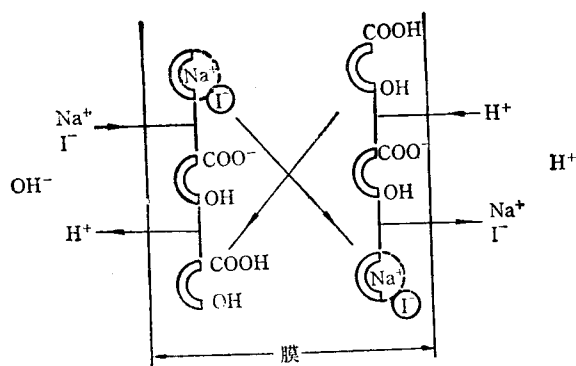


图2 在质子梯度下, Na^+ 离子在念珠菌素修饰的双层脂膜中运送的模型

时间内通过膜的离子流所造成的, 它应正比于膜内载体配合物的浓度。在本实验条件下, 在膜两侧的 Na^+ 离子浓度相同时, 念珠菌素配合物的浓度应取决于不同阴离子的亲脂性和溶液两侧的酸度差 ΔpH , 由于 I^- 的强亲脂性, 易进入膜相与念珠菌素- Na^+ 配离子形成离子对^[13]。实验表明, 当膜两侧溶液的 pH 值相同时, 在同一扫描范围内和同一扫描速度下, NaI 所得到的电流值要比其它卤化物约高 3.5 倍, 故又进一步研究了在该体系中膜两侧酸度差 ΔpH 对 I_m 的影响。

从图 2 可见, 由于膜内侧溶液的 pH 高于外侧溶液, 在内侧溶液与膜的界面上, 念珠菌素易于发生解离, 阴离子 C^- 的浓度要比膜外侧高。这种阴离子可在分子中羧基上带负电的氧原子和另一端的羧基之间形成氢键, 使其构型转变为一种环状的结构^[14]。而 Na^+ 离子则可

取代部分水化的水分子, 再与 I^- 离子一起形成离子对配合物。该配合物可沿着在双层脂膜中的浓度梯度从膜内侧运送至膜外侧, 并在膜外表面上迅速解离为 Na^+ , I^- 和 C^- 离子。不过, 因膜外侧溶液的酸度大, 念珠菌素的阴离子 C^- 会质子化为 CH , 它又会在膜中沿着浓度梯度返回扩散至膜内侧, 重新解离为 C^- 和 H^+ , 念珠菌素起着钠离子载体的作用, 直至膜两侧溶液的质子梯度完全消失。

参 考 文 献

- [1] Tien, H. T.: *Bilayer Lipid Membrane (BLM): Theory and Practice*, Marcell Dekker, New York, 1974; *Prog in Surf. Sci.*, 1985, 19(3), 169.
- [2] Winkler, R.: *Structure and Bonding*, 1972, 10, 1.
- [3] Moore, C. and Pressman, B. C.: *Biochem. Biophys. Res-Commun.*, 1964, 15, 562.
- [4] Graven, S. N. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, 56, 654.
- [5] Lutz, W. K. et al.: *Helv. Chim. Acta.*, 1970, 53, 1741.
- [6] Friik, P. U. et al.: *Helv. Chim. Acta.*, 1971, 54, 2767.
- [7] Pinkerton, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1980, 49, 533.
- [8] Agtarap, A. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 5737.
- [9] Cussler, E. L. et al.: *Science* 1971, 172, 377.
- [10] Tien, H. T.: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1986, 15, 19.
- [11] Tien, H. T. and Kutnik, J.: *Photobiochem. Photobiophys.*, 1986, 7, 319.
- [12] Benz, R. et al.: *Am. NY Acad. Sci.*, 1980, 358, 13.
- [13] Tien, H. T. and Diana, L. A.; *J. Colloid. Interface. Sci.*, 1967, 24, 287.
- [14] Lutz, W. K. et al.: *Helv. Chim. Acta.*, 1971, 54, 1103.

[本文于 1987 年 11 月 11 日收到]

(上接第453页)

and Techniques, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc, New York and Basel, 1978, p.250.

- [5] 吴有光等:《遗传与疾病》, 1986, 3, 26.
- [6] 吴有光等:《色谱》, 1987, 5, 256.
- [7] 吴有光:《分析化学》, 1987, 15, 945.

- [8] 南国华等:《江西医学院学报》, 1984, (3), 26.
- [9] 吴有光等:《色谱》, 1984, 1(2), 138.

[本文于 1987 年 9 月 21 日收到]

吴有光等:《氨基酸的微型双向薄层色谱快速分析》一文的附图

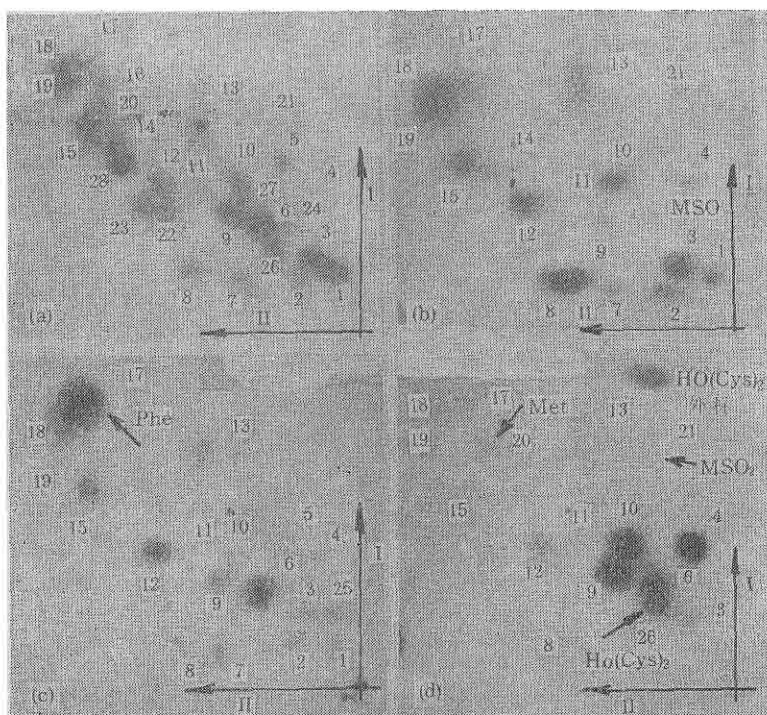


图1 微型薄层膜双向色谱分离氨基酸 (a)标准氨基酸混合液, (b)牛血清清蛋白水解物, (c) PKU 去蛋白质血浆, (d)同型胱氨酸尿症患者新鲜尿液

- | | | | |
|---------|---------|-----------|--------------------|
| 1. 胱氨酸 | 8. 谷氨酸 | 15. 缬氨酸 | 22. β -丙氨酸 |
| 2. 精氨酸 | 9. 甘氨酸 | 16. 色氨酸 | 23. GABA |
| 3. 赖氨酸 | 10. 丝氨酸 | 17. 苯丙氨酸 | 24. 门冬酰胺 |
| 4. 组氨酸 | 11. 脯氨酸 | 18. 亮氨酸 | 25. 鸟氨酸 |
| 5. 牛磺酸 | 12. 丙氨酸 | 19. 异亮氨酸 | 26. 同型胱氨酸 |
| 6. 谷酰胺 | 13. 苏氨酸 | 20. 甲硫氨酸 | 27. 羟脯氨酸 |
| 7. 门冬氨酸 | 14. 酪氨酸 | 21. 甲硫氨酸砷 | 28. α -氨基丁酸 |
- MSO 甲硫氨酸砷

周惠人等:《NMU诱发大鼠乳腺癌》一文的附图

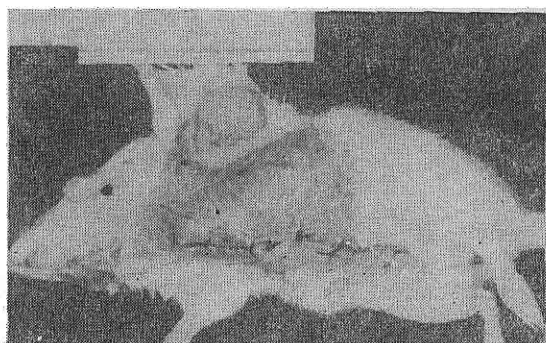


图1 NMU诱发大鼠乳腺癌



图2 大鼠乳腺癌切片ER染色