

氨基酸的 HPLC 分析

黄一玲* 姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

提 要

本文综述和讨论了 HPLC 用于氨基酸分析的特点, 特别是各种柱前衍生技术, 反相色谱的分离条件等, 并涉及了这一技术的某些新发展。

1951 年, Moore 等首先在离子交换树脂上完成了氨基酸的分离, 1958 年他们又成功地进行了氨基酸的定量分析及自动化分析, 奠定了现代氨基酸自动分析的基础。六十年代中期, 氨基酸分析技术被应用到生理体液的分析中, 同期由于该项技术采用双柱系统, 使分析时间缩短到 24 小时^[1]。

时至今日, 氨基酸自动分析仪已发展成为一类高度自动化的仪器, 每次分析所需的样品量已降低到 pmol 水平, 所需时间也已降至 1~2 小时。但是, 氨基酸自动分析仪是一类昂贵的仪器, 而且其功能也主要是进行氨基酸分析。

另一方面, 七十年代高效液相色谱技术(简称 HPLC) 迅速发展, 并日益广泛地用于生物化学领域^[2]。虽然从本质上说, 现代的氨基酸自动分析仪, 也可以说是一种专用化的高效液相色谱, 但本文中所讨论的高效液相色谱, 则主要指通用型的高效液相色谱, 并以某些在传统氨基酸自动分析仪中所不采用的技术为特征, 如反相色谱分离, 硅胶基的微粒型填料, 柱前衍生法等。HPLC 是一类通用型仪器, 但也能代替氨基酸自动分析仪, 其应用日益广泛, 并已在许多蛋白质化学实验室中部分或全部地代替了氨基酸自动分析仪。本文拟就这一发展加以综述。

一、衍生技术

大多数氨基酸本身既不具有紫外吸收又不

发射荧光, 无法与 HPLC 常用的高灵敏度检测器相匹配, 因此对色谱流出液中氨基酸检测的先决条件是将制成能被检测器测知的衍生物。在传统氨基酸自动分析仪中, 一般使用柱后衍生检测, 需要专用的柱后反应检测器, 而在 HPLC 分析氨基酸的技术中, 一般都采用柱前衍生法, 这种方法简便易行, 无需专用设备, 特别适用于通用型仪器。在选择衍生试剂时, 应从以下几点考虑: ① 对每一种氨基酸而言, 其衍生物应具有单一性及稳定性; ② 氨基酸的衍生物在检测时应具有较高的灵敏度; ③ 衍生方法简便、重现性好。下面是几种常用的氨基酸衍生剂。

1. 邻苯二甲醛 (OPA) 邻苯二甲醛是一种广泛应用的衍生试剂。其衍生方法具有简便、快速、灵敏等特点。1971 年, Roth 首先介绍了 OPA 与氨基酸的反应^[3], 有关 OPA 与氨基酸反应的动力学已有报道^[4]。在碱性 pH 条件下, 以 2-巯基乙醇作还原剂, OPA 与氨基酸反应形成 OPA-氨基酸(简称 OPA-AA), 反应 5 分钟后, 衍生物的荧光强度即可达到峰值, 其荧光峰分别在 230 nm 和 335 nm 处。在衍生时, 需采用新鲜配制的 OPA 试剂, 否则会影响色谱分离的本底值及灵敏度。有报告认为, 若采用乙硫醇替代 2-巯基乙醇, 可增加衍生物的稳定性^[5]。OPA 的最大缺点是不能与二级

* 北京阜外医院进修生。

胺类氨基酸反应,例如脯氨酸和羟脯氨酸,而且 OPA-Cys 的产量很低,人们曾采用 NaOCl 将上述氨基酸先氧化,然后再用 OPA 衍生^[6]。但是,根据我们的观察,效果并不理想。

2. 氯甲酸苄甲酯 (FMOC-Cl) 在 pH7.7 的条件下,氯甲酸苄甲酯与氨基酸反应迅速形成 FMOC-氨基酸 (简称 FMOC-AA), 由于 FMOC-Cl 本身发射荧光, 因此在反应 30 秒后,需迅速用戊烷萃取,以除掉过量的 FMOC-Cl,并减少 FMOC-Cl 的水解产物^[7]。FMOC-

AA 在 4℃或室温避光的条件下, 至少可稳定存在 13 天。在检测 FMOC-AA 时, 一般采用的激发波长为 260nm, 而发射波长为 310nm。在衍生过程中, 也可采用胺基金刚烷与过量的 FMOC-Cl 加合以替代萃取步骤, 这种加合物对各种氨基酸的分析不产生干扰, 从而简化了衍生方法,为 FMOC-AA 衍生过程的自动化提供有利条件^[8]。

3. 异硫氰酸苯 (PITC) 异硫氰酸苯又称 Edmann 试剂, 是对多肽进行顺序分析的主要

表 1 常用衍生剂的特性

衍生剂	衍生剂 化学结构	衍生物化学结构	检测			检测下限 (pmol)	可否与 二级胺 反应	参考文献
			紫外	荧光	可见			
邻苯二甲醛 (OPA)			+	+		0.05	-	[12]
氯甲酸苄甲酯 (FMOC-Cl)			+	+		<1	+	[7]
异硫氰酸苯 (PITC)			+			1	+	[13]
丹酰氯 (DNS-Cl)				+		0.5-5	+	[14]
磺酰氯二甲 胺偶氮苯 (DABS-Cl)					+	<1	+	[15]

试剂。在过去十年中广泛使用的 PITC 衍生方法为：氨基酸经 PITC 衍生形成苯氨基硫代甲酰-氨基酸（简称 PTC-AA），再转化为苯基乙内酰硫脲-氨基酸（简称 PTH-AA）后进行分析。但在 1982 年，Knoop 等首先确定了 PTC-AA 的稳定性，从而简化了衍生步骤^[9]。PTC-AA 的干粉在冰冻条件下，至少几个星期内不会降解。该衍生物虽无荧光，但在紫外 244nm 处有一吸收峰。由于这种衍生方法需经过温育及多步蒸干，所以与 OPA 和 FMOC-Cl 衍生方法比较，显得复杂且时间长。

4. 丹酰氯 (DNS-Cl) 丹酰氯是一种七十年代经常使用的荧光衍生剂。可以与一级和二级氨基氨基酸反应，反应时间一般需要 30—50 分钟，其反应的完全程度取决于 DNS-Cl 和氨基酸的浓度之比^[10]。在检测 DNS-Cl 时，一般使用的激发波长为 250nm，发射波长为 470 nm。该衍生方法的缺点是衍生时间长。

5. 磺酰氯二甲胺偶氮苯 (DABS-Cl) 磺酰氯二甲胺偶氮苯是近几年来人们采用的一种衍生试剂^[11]。这种衍生方法的一个显著特点是：其衍生产物 DABS-氨基酸（简称 DABS-AA）是一种有颜色的化合物，在可见光区（ $\lambda = 436\text{nm}$ ）就能进行检测。一般在紫外检测时，流动相中如有紫外吸收的微量杂质就可以导致本底值和噪声的提高，而在可见光区可避

免这种干扰。DABS-AA 很稳定，在室温条件下可保存二个月而不发生降解。

现将上述衍生剂的特性归纳为表 1。

二、反相色谱上的分离条件

反相色谱主要是指在硅胶表面键合极性很小的烃基，例如十八烷基、辛烷基和苯基等，从而形成疏水性的色谱介质，用极性大的溶剂淋洗，使样品按其疏水性的大小得以分离。反相色谱具有以下几个特点：① 分辨力强；② 以水作为流动相的基本组分之一；③ 色谱柱较易平衡；④ 有较广的适用范围，是目前 HPLC 中应用最广的一类色谱技术。

1. 色谱柱 在氨基酸分析中经常采用的色谱柱有： C_{18} 柱、 C_8 柱和 CN 柱。色谱柱的硅胶粒度一般控制在 $5\sim 10\mu\text{m}$ ，柱长选用 $15\sim 30\text{cm}$ ，柱内径选用 4.0mm 左右。近年来为了提高分析速度及灵敏度，做了以下一些新的探索。其一是降低硅胶的粒度，例如使用 $3\mu\text{m}$ 粒度的硅胶，有可能提高柱效，缩短分析时间。其二是采用窄径柱，有人报道在分析 PTH-AA 时，将柱径由 4.0mm 缩至 2.0mm ，柱径缩小了 50%，而灵敏度却提高 4 倍^[12]。该柱的特点是：由于减少了峰扩散，使灵敏度提高，所以适用于灵敏度要求高的分析，但是柱的反压较高、易污染、且寿命短。此外在分析氨基酸时，适当

表 2 氨基酸色谱分离条件

氨基酸衍生物	色 谱 柱	流 动 相	流 速 (ml/min)	参考文献
OPA-AA	μ -Bondapak C_{18} 柱 $10\mu\text{m}$, $300 \times 3.9\text{mm}$ I. D.	A: 12.5mmol/L 磷酸氢二钠 pH7.2 B: 乙腈	2.0	[2]
FMOC-AA	C_8 色谱柱 $4\mu\text{m}$, $125 \times 4\text{mm}$ I. D.	A: 20% 乙腈+80% 50mmol/L 醋酸缓冲液 pH4.2 B: 70% 乙腈+30% 50mmol/L 醋酸缓冲液 pH4.2	1.75	[8]
PTC-AA	Pico-Tag 柱	A: 0.14mol/L 醋酸钠+ 0.5ml 三乙胺/升 B: 60% 乙腈+40% 水	1.0	[13]
DNS-AA	C_{18} 色谱柱 $5\mu\text{m}$, $125 \times 4.6\text{mm}$ I. D.	A: 50mmol/L 醋酸钠 pH6.1 B: 50mmol/L 醋酸钠 pH5.0		[14]
DABS-AA	Zorbax ODS 柱	A: 50mmol/L 醋酸缓冲液 pH4.13 B: 乙腈	1.2	[20]

的调节柱温,也可提高分离度和缩短分析时间。

2. 流动相

① 流动相的基本组成 用反相色谱分析氨基酸时,大多采用强极性溶剂(水、乙腈和甲醇等)和含无机盐的缓冲液。在流动相中加入少量的有机修饰剂,将有助于提高氨基酸的分离度。如在分析 OPA-AA 时,控制洗脱液中四氢呋喃的浓度,对分离甘氨酸和苏氨酸的影响大于 pH 值的影响^[17]。

② 缓冲液的种类 在分析氨基酸时,经常采用的缓冲溶液有醋酸缓冲液和磷酸缓冲液。缓冲液的种类不同,则氨基酸的容量因子 k' 也不同。有人曾分别用水、硼酸盐、磷酸盐及柠檬酸盐作为缓冲液,对 13 种氨基酸进行分析,结果表明大多数氨基酸的容量因子 k' 按上述顺序依次递增^[18]。

③ 缓冲液的 pH 值 在键合相硅胶柱上, pH 一般控制在 2~7 之间, pH < 2 容易使键合基团降解; pH > 7 容易使硅胶基质溶解。缓冲液的 pH 值是影响氨基酸分离的主要因素之一,在分析 OPA-AA 时,当 pH 由 5.9 增至 7.9

时,使精氨酸与酪氨酸在色谱图上的位置发生了颠倒^[18]。

④ 缓冲液的离子强度 缓冲液的离子强度也是影响氨基酸的容量因子 k' 的因素之一。

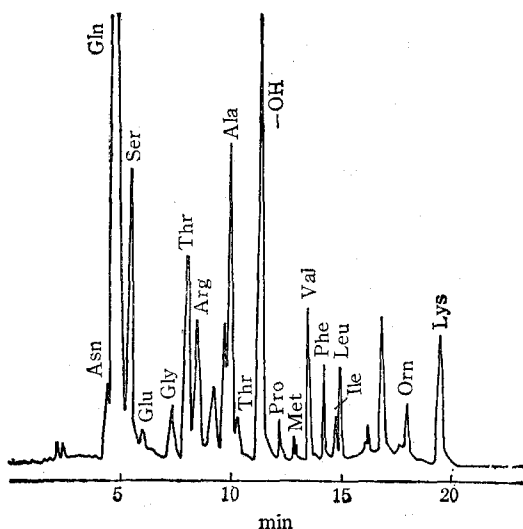


图 2 FMOC-Cl 衍生方法分析脑脊液中氨基酸的浓度

在分析 OPA-AA 时,当磷酸盐的浓度由 0 增加到 0.2 mol/L,使大多数氨基酸的容量因子 k' 增加^[18]。

表 2 为几种有代表性的分离条件供参考。

三、应用举例

HPLC 分析氨基酸已广泛应用于生理体液、活性多肽以及营养学研究等方面。图 1 所示,以 OPA 为衍生试剂,分离氨基酸混合标准液。应用该方法测定水解多肽的氨基酸残基数,结果表明与已知顺序推断的残基数是相符合的^[19]。图 2 所示,以 FMOC-Cl 为衍生试剂,分析脑脊液中氨基酸的浓度^[7]。

总之,应用 HPLC 技术进行氨基酸分析的方法已逐渐成为许多实验室的常规方法。其进一步的发展将可能是:① 提高灵敏度:例如设计新型检测器及寻找新的衍生试剂。最近 Roach 等采用二甲醛肟作衍生试剂,激光诱导荧光检测器分析氨基酸获得成功,检测下限达

(下转第 125 页)

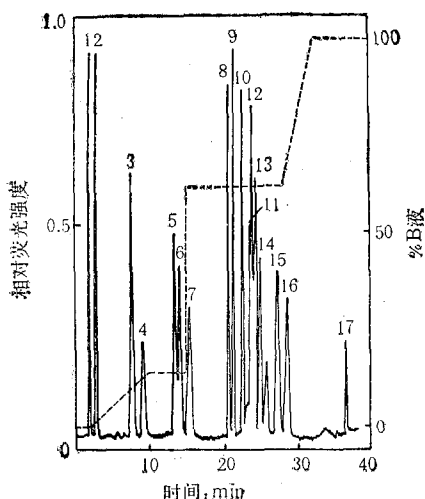


图 1 OPA 衍生方法分离氨基酸混合标准液

1.天门冬氨酸 2.谷氨酸 3.丝氨酸 4.组氨酸
5.甘氨酸 6.苏氨酸 7.精氨酸 8.丙氨酸 9.
酪氨酸 10.乙醇胺(内标) 11.色氨酸 12.蛋氨酸
13.缬氨酸 14.苯丙氨酸 15.异亮氨酸 16.
亮氨酸 17.赖氨酸。未标记的峰为甲醇中的杂质。

的激活^[16]。

目前认为,半胱氨酸-锌-DNA 结合指形区存在于大多数转录活性因子中,是转录活性因子与特异性的 DNA 顺序结合的区域。其基本结构是锌离子结合在两对半胱氨酸残基之间所形成的指形区(图 2)。当半胱氨酸-锌-DNA 结合指形区域与特异性 DNA 顺序结合时,影响邻近的 DNA 构象和转录活性因子的促进基因

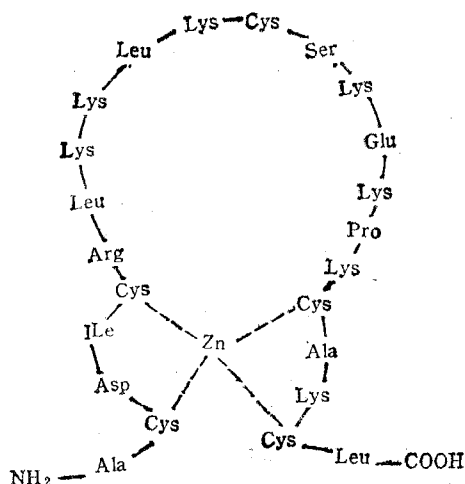


图 2 半胱氨酸-锌-DNA 结合指形区域

(上接第 106 页)

到 0.2~0.5 fmol 水平^[21]。② 提高分析速度: 主要以改善色谱条件入手,例如色谱柱的改进、流动相的配比及淋洗程序等。③ 分析过程的自动化: 目前一个广泛引起注意的问题是,如何使样品的预处理及衍生过程自动化。

参 考 文 献

- [1] Ogden, G. et al.: *LC-GC*, 1986, 5, 28.
- [2] Pfeiffer, R. F. et al.: *Adv. Chromatogr.*, 1983, 22, 37.
- [3] Roth, M.: *Anal. Chem.*, 1971, 43, 880.
- [4] Švedas, V. J. K. et al.: *Anal. Biochem.*, 1980, 101, 188.
- [5] Simons, S. Z. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 82, 250.
- [6] Böhlen, P. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 94, 313.
- [7] Einarsson, S. et al.: *J. Chromatogr.*, 1983, 282, 609.

转录活性的效应位点的构象,进而改变基因的转录水平^[17]。

随着分子生物学新技术的发展和完善,我们可以深入认识真核细胞基因表达的组织特异性,发育阶段性和诱导性的机理,从而从基因水平上揭开生物生长、发育和进化的奥秘。

参 考 文 献

- [1] Maniatis, T. et al.: *Science*, 1987, 236, 1237.
- [2] Struhl, K.: *Cell*, 1987, 49, 195.
- [3] Schorm, S. et al.: *Genes Dev.*, 1987, 1, 65.
- [4] Fujita, T. et al.: *Cell*, 1987, 49, 357.
- [5] Kingston, R. E. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 1530.
- [6] Celander, D. et al.: *J. Virol.*, 1987, 61, 269.
- [7] Gerster, J. et al.: *EMBO J.*, 1987, 6, 1323.
- [8] Lenardo, M. et al.: *Science*, 1987, 236, 1573.
- [9] Cergehni, S. et al.: *Cell*, 1981, 50, 627.
- [10] Kovesdo, I. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 2180.
- [11] Speck, N. A. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 1101.
- [12] Vogt, T. F. et al.: *Science*, 1987, 236, 301.
- [13] Gross, D. S. et al.: *TIBS*, 1987, 12, 293.
- [14] Stein, R. W. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1987, 7, 1164.
- [15] Wight, P. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 5959.
- [16] Green, S. et al.: *Nature*, 1987, 325, 75.
- [17] Johnston, M.: *Nature*, 1987, 328, 353.

[本文于 1987 年 11 月 28 日收到]

- [8] Betßer, I. et al.: *Chromatographia*, 1986, 22, 381.
- [9] Knoop, D. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 8472.
- [10] Bayer, E. et al.: *Anal. Chem.*, 1976, 48, 1106.
- [11] Rnecht, R. et al.: *Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis* (Ed. by Wittmann-Liebold, B. et al.), Springer-Verlag, Berlin, 1986, p. 56—61.
- [12] Jones, B. N.: *J. Liq. Chromatogr.*, 1981, 4, 565.
- [13] Bidlingmeyer, B. A. et al.: *J. Chromatogr.*, 1984, 336, 93.
- [14] Työppönen, J. T.: *J. Chromatogr.*, 1987, 413, 25.
- [15] Chang, J. Y.: *Methods in Enzymology*, Vol. 91 (C. H. W. Hirs et al. ed.) Academic Press, New York, 1983, p. 43.
- [16] Lottspeich, F.: *J. Chromatogr.*, 1985, 326, 321.
- [17] Sista, H. S.: *J. Chromatogr.*, 1986, 359, 231.
- [18] Lindroth, P. et al.: *Anal. Chem.*, 1979, 51, 1667.
- [19] 姚志建等:《色谱》, 1986, 4, 364.
- [20] Chang, J. Y. et al.: *Biochem. J.*, 1981, 199, 547.
- [21] Roach, M. C. et al.: *Anal. Chem.*, 1987, 59, 411.

[本文于 1987 年 10 月 28 日收到]