

Pico · Tag 方法测定油松花粉中的氨基酸含量

马养民

(陕西省林业科学研究所 杨陵 712100)

1 前言

自从 Pico · Tag 氨基酸分析方法推出之后^[1], 近年来已被广泛地应用到医药^[2]、生理体液^[3]和食品^[4]分析等方面。此法是一种柱前衍生-紫外检测-反相色谱法, 具有快速、灵敏、准确、重复性好等优点^[1]。本文用此方法分析了油松花粉中氨基酸的含量。

2 实验部分

2.1 仪器

美国 Millipore 公司, Waters 色谱业务部高效液相色谱系统, 包括 510 型泵(两台), U6K 型进样器, 490 型可编程多波长检测器, Pico · Tag HAA 色谱柱(150×3.9mm), TCM 柱控温器, CHM 柱加热系统, Pico · Tag 及 Maxima820 工作站。

2.2 试剂

标准氨基酸、三乙胺(TEA)、异硫氰酸苯酯(PITC)均为日本和光纯药工业株式会社试剂; 三水醋酸钠(德国 Merck 公司); 盐酸、乙醇(优级纯); 乙腈(HPLC 纯); 其余试剂均为分析纯; 超纯水(18 MΩ·cm)。

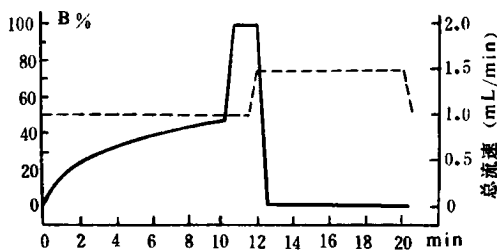


图 1 总流速变化及流动相梯度曲线

— 流动相 B%, 总流速。

2.3 流动相及其它试液的配备

流动相 A: 19.0g 三水醋酸钠和 0.5mL TEA 溶解到 1000mL 超纯水中, 用冰醋酸调至 pH 6.40, 过滤, 量取滤液 940mL, 与 60mL 乙腈混合, 脱气后备用。流动相 B: 量取 600mL 乙腈, 加水至 1000mL, 脱气后备用。再干燥液: 乙醇-水-TEA(2:2:1)混合。

衍生剂: 乙醇-水-TEA-PITC(7:1:1:1)混合。样品稀释液: 0.7100g Na₂HPO₄ 溶解到 1000mL 水中, 用 10% 磷酸-乙腈(95:5)溶液调 pH 至 7.40, 再经 0.45μm 超滤膜过滤后备用。

2.4 色谱条件

总流速和流动相梯度曲线见图 1。紫外检测波长 254nm(0.10AUFS), 柱温 40°C, 进样量 4μL。

2.5 样品处理

将油松花粉在样品磨上研磨、混匀后, 准确称取 0.1000g 放入水解瓶中。加入 15mL 6mol/L 盐酸, 抽真空、充氮气。如此重复三次后密封。110°C 水解 22 小时, 冷却, 用超纯水定容到 25mL。过滤后再经 25 000g 离心 10min, 用 0.45μm 超滤膜过滤。取 20μL 滤液于样品管中, 真空干燥(8~13Pa)30min。给残渣中加 20μL 再干燥液, 涡旋混合后, 真空干燥 30min。加入 20μL 衍生剂, 涡旋混合后, 室温放置 20min, 生成 PITC-氨基酸, 真空干燥 30min。待上机分析时加 100μL 样品稀释液, 涡旋混合后进样。

3 结果和讨论

3.1 分析结果及精密度

采自陕西陇县八渡林场的油松花粉, 经分析, 其各种氨基酸含量见表 1。变异系数小于 4.92%(n=5), 色谱图见图 2。

为了得到准确的分析结果和良好的分离效果, 样品处理中再干燥步骤和过量 PITC 的除去是关键。再干燥不充分时会影响衍生物的 pH 值, 特别是天冬氨酸(Asp)对此十分敏感, 导致结果偏低。若过量的 PITC 除去不完全, 会出现杂峰而影响分离。

3.2 重复性及线性回归

将标准 PITC-氨基酸连续进样, 测得各氨基酸保留时间和峰面积的平均变异系数分别为 0.24±0.10 和 1.80±0.68(n=5)。另外, 由各氨基酸峰面积与其浓度关系的实验还表明, 所有十七种氨基酸在 62.5~500pmol 范围内均呈现良好的线性关系($r \geq 0.9978, n=5$)。

3.3 回收率

给样品加入已知量的氨基酸进行测定,结果表明,除半胱氨酸(Cys)外,其余十六种氨基酸的回收率均在 82.89~101.35%(n=3)之间。

表 1 油松花粉中水解氨基酸含量(n=5)

氨基酸	含量(W%)	SD	CV(%)
天冬氨酸 Asp	0.914	0.045	4.92
谷氨酸 Glu	1.621	0.047	2.90
丝氨酸 Ser	0.447	0.006	1.34
甘氨酸 Gly	0.523	0.005	0.96
组氨酸 His	0.228	0.006	2.63
精氨酸 Arg	1.029	0.022	2.14
苏氨酸 Thr	0.415	0.008	1.93
丙氨酸 Ala	0.552	0.012	2.17
脯氨酸 Pro	0.861	0.015	1.74
酪氨酸 Tyr	0.327	0.004	1.22
缬氨酸 Val	0.538	0.013	2.42
蛋氨酸 Met	0.137	0.004	2.92
半胱氨酸 Cys	0.102	0.002	1.96
异亮氨酸 Ile	0.430	0.005	1.16
亮氨酸 Leu	0.705	0.012	1.70
苯丙氨酸 Phe	0.393	0.008	2.04
赖氨酸 Lys	0.675	0.018	2.67

3.4 稳定性

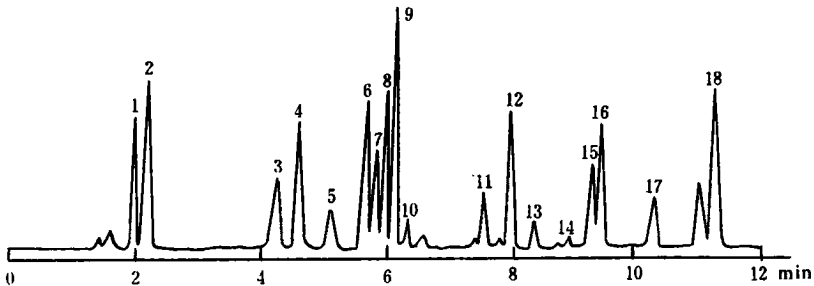


图 2 油松花粉中水解氨基酸的 RP-HPLC 图谱(色谱条件见正文)

1. Asp, 2. Glu, 3. Ser, 4. Gly, 5. His, 6. Arg, 7. Thr, 8. Ala, 9. Pro, 10. NH₃, 11. Tyr, 12. Val, 13. Met, 14. Cys, 15. Ile, 16. Leu, 17. Phe, 18. Lys.

将 PITC-氨基酸衍生物干样贮存在冰箱内 30 天,将测定结果与新衍生物相比较,变异系数小于 6.08%。将 PITC-氨基酸溶解在样品稀释液中,在冰箱内保存 48 小时,测其结果与新衍生物比较,变异系数小于 5.12%。这说明 PITC-氨基酸具有较高的稳定性。

致谢 本文承蒙西北农业大学中心实验室李连朝助理研究员审阅,谨致谢意。

关键词 氨基酸,油松花粉,异硫氰酸苯酯,柱前衍生,反相高效液相色谱

参考文献

- 1 Bidingmeyer B A, Cohen S A, Tarvin T L. J Chromatogr, 1984; 336 : 93
- 2 徐康森,郝苏丽,孙桂英等. 药物分析杂志, 1988, 8(5) : 283
- 3 Sarwar G, Botting H G. J Assoc Off Anal Chem, 1990; 73(3) : 470
- 4 Elkin R G, Wasynczuk A M. Cereal Chem, 1987; 64(4) : 226

Determination of Amino Acids in Pollen of *Pinus Tabulaeformis* by Pico • Tag Method

Ma Yangmin

(Shaanxi Institute of Forestry Science, Yangling, 712100)

An improved reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method is described for determination of amino acids in pollen of *Pinus tabulaeformis*. All 17 kinds of amino acids are derivatized with phenylisothiocyanate(PITC) and then separated on a Pico • Tag column in 12 minutes. This method is rapid, sensitive, accurate and reproducible.

Key words amino acids, pollen, *Pinus tabulaeformis*, phenylisothiocyanate, precolumn derivatization, reversed-phase high performance liquid chromatography