

区带毛细管电泳-紫外检测法分离检测 13 种氨基酸

1. 背景介绍

α -氨基酸不仅是组成蛋白质的基本单位，其代谢产物在生物体内也具有重要的生理功能。 α -氨基酸也是食品、饲料等的检测指标之一。本实验参考了农业部标准《NY/T 3001-2016 饲料中氨基酸的测定——毛细管电泳法》，采用柱前衍生法对待测样品进行衍生化，建立了区带毛细管电泳-紫外检测法实现了精氨酸、赖氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、丙氨酸和甘氨酸共 13 种氨基酸的分离检测。本法如无特殊注明溶剂均为二次蒸馏水。

2. 样品制备

单一氨基酸标准储备液：分别称取精氨酸、赖氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、丙氨酸和甘氨酸各 0.0200 g，分别置于 10 mL 离心管中，准确加入 10 mL 水溶解，分别得到浓度为 2.0 mg/mL 的 13 种氨基酸的单一氨基酸标准储备液。如有必要，可在水浴锅中缓慢加热至 60~70 °C 充分溶解。苯丙氨酸和酪氨酸标准储备液可保存 2 个月，其他氨基酸标准储备液可保存 4 个月。

氨基酸混合标准溶液：准确移取 13 种单一氨基酸标准储备液各 0.500 mL，混合，稀释定容到 10 mL，得到每种氨基酸的浓度均为 0.1 mg/mL 的氨基酸混合标准溶液。混合标准溶液可保存 2 周。

衍生化样品：准确移取氨基酸混合标准溶液 0.6 mL 于 5 mL 离心管中，准确加入 0.1 mol L⁻¹ 碳酸钠溶液 0.9 mL，准确加入 1.6 % (v/v) 异硫氰酸苯酯 (PITC) 异丙酮溶液 1.8 mL，振荡，盖上盖子，室温静置反应 30 min，用氮吹仪吹干，用 3.3 mL 水溶解残留物，5000 r/min 离心 5 min，将上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤，得到氨基酸浓度为 0.02 mg/mL 的衍生化样品。

3. 测试条件

仪器	CE-1000 毛细管电泳仪		
毛细管	熔融石英毛细管（内径 75 μm ），55 cm（全长 75 cm）		
缓冲液	种类	磷酸氢二钠-磷酸二氢钠	β -环糊精
	浓度	30 mmol L ⁻¹	4 mmol L ⁻¹
	pH 值	7.75	
分离电压	-25 kV		
检测波长	254 nm		
柱温箱温度	30.0 $^{\circ}\text{C}$		
进样压力	30 mbar		
进样时间	5 s		

4. 测试结果

4.1 标准电泳图

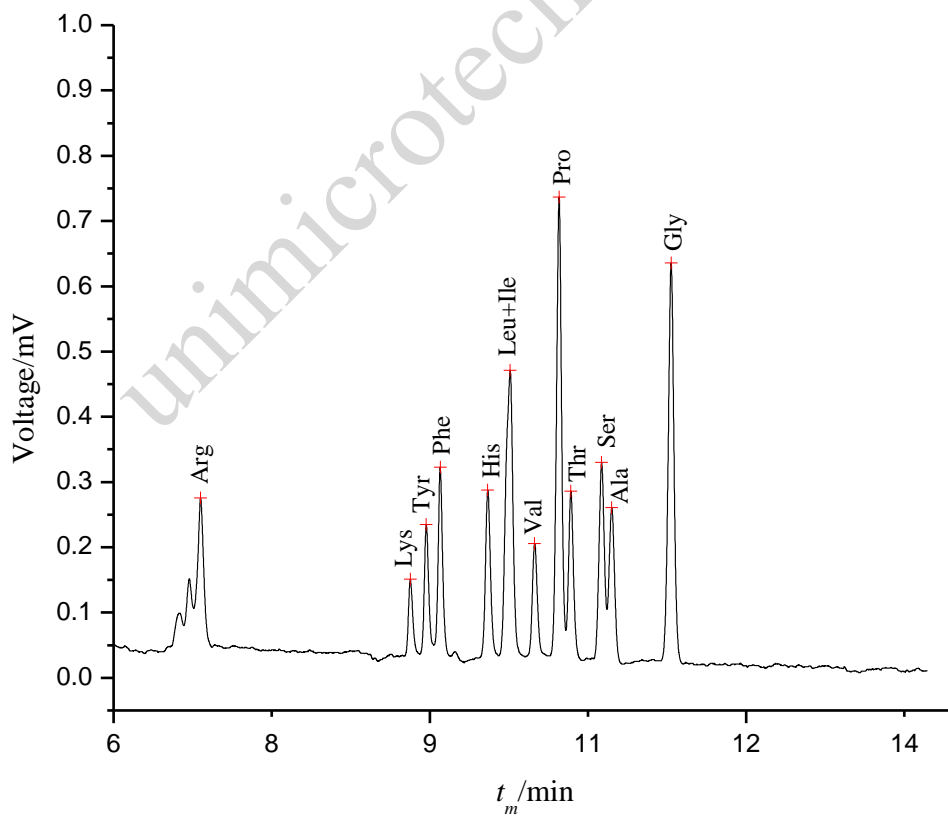


图 1 13 种氨基酸标准电泳图

4.2 线性范围

氨基酸	三字母缩写	单字母缩写	线性范围 (%，w/w)
精氨酸	Arg	R	0.5~10.0
赖氨酸	Lys	K	0.25~10.0
酪氨酸	Tyr	Y	0.25~10.0
苯丙氨酸	Pre	F	0.25~10.0
组氨酸	His	H	0.5~10.0
亮氨酸+异亮氨酸	Leu+Ile	L+I	0.25~10.0
缬氨酸	Val	V	0.5~10.0
脯氨酸	Pro	P	0.25~10.0
苏氨酸	Thr	T	0.25~10.0
丝氨酸	Ser	S	0.25~10.0
丙氨酸	Ala	A	0.25~10.0
甘氨酸	Gly	G	0.25~10.0

5. 结论

本实验参照国标条件，建立了区带毛细管电泳-紫外检测法，实现了分离检测精氨酸等 13 种氨基酸，方法可靠有效，快速方便，线性范围较宽，可以应用到日常检测当中。

6. 配置列表

仪器配置	CE-1000 毛细管电泳仪（包括主模块、柱温箱和高压电源）
	Unimicro 色谱工作站

