

# 高效液相色谱与化学计量学方法联用 测定多种氨基酸对映体\*

刘广军

(济宁师范专科学校化学系,272025,山东省济宁市)

**摘要:**用邻苯二甲醛和N-乙酰-L半胱氨酸作为柱前手性衍生化试剂,使用常规反相高效液相色谱法拆分DL-氨基酸对映体,对于不能达到基线分离的色谱峰,应用化学计量学方法计算分析,从而达到同时定量测定多种氨基酸对映体的目的。

**关键词:**氨基酸;手性分离;高效液相色谱;衍生

**中图分类号:**O652

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-5337(2005)03-0086-04

近年来氨基酸分析在生物化学、药学和临床研究上都有着广泛而重要的应用。氨基酸的分离,尤其是氨基酸对映体的分离一直是国内外的研究热点。在手性分离这一领域,高效液相色谱法(HPLC)一直是最广泛使用的方法。目前HPLC分离手性化合物主要有两种方法:一种是直接分离法,也就是利用手性固定相直接分离手性化合物对映体。王亚丽<sup>[1]</sup>等曾用纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)(CDMPC)手性柱在正相模式下拆分了3种外消旋氨基酸的衍生物。另一种是间接分离法,目前主要是柱前衍生化法——将手性化合物柱前衍生化,将对映体转化为非对映体,进而使用常规柱完成分离分析。吕海涛<sup>[2]</sup>曾讨论过柱前衍生法拆分DL-氨基酸时流动相的影响。

本文主要讨论使用柱前衍生法分离多种氨基酸的对映体,并将化学计量学方法引入丝氨酸对映体重叠峰的分析,可以一次性地定量分析多种氨基酸对映体。所用衍生剂为邻苯二甲醛(OPA)和N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)<sup>[2,3]</sup>。NAC是一种手性硫醇,其它手性硫醇如N-乙酰-D-青霉胺(NAP)、N-异丁酰-L-半胱氨酸(IBLC)、N-异丁酰-D-半胱氨酸(IBDC)<sup>[4]</sup>也可与OPA一起做为衍生剂。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

DL-丝氨酸(上海丽珠东风生物技术有限公司);L-丝氨酸、丙氨酸、DL-丙氨酸、L-丙氨酸、DL-苯丙氨酸、L-苯丙氨酸、DL-缬氨酸、L-缬氨酸、硼酸、氯化钾、氢氧化钠、乙酸钠(中国医药集团上海化学试剂公司);邻苯二甲醛(以下简称OPA,中国医药集团上海化学试剂公司);N-乙酰-L-半胱氨酸(以下简称NAC,Lancaster公司);甲醇(HPLC级,Merck公司);高纯水。除甲醇和水外其他试剂均为分析纯。

美国Agilent HP1100高效液相色谱仪(DAD检测器),ChemStation化学工作站。美国Agilent 8453 UV-Vis光谱仪。

#### 1.2 样品预处理<sup>[5]</sup>

各氨基酸样品配制成浓度约为0.01 M的水溶液。

硼酸缓冲液的配制:硼酸(0.01 M)、氢氧化钠(0.01 M)和水按体积比50:45:5配制得到pH为9.3的硼酸缓冲液。

衍生剂的配制:将53.3 mg OPA溶于50 mL甲醇得到OPA甲醇溶液。NAC溶于硼酸缓冲液中(0.00286 M)。取12 mL OPA甲醇溶液、10 mL NAC硼酸溶液,添加3 mL硼酸缓冲液至25 mL,得到OPA/NAC衍生剂。

#### 1.3 衍生反应

将0.1 mL氨基酸与5 mL OPA/NAC衍生剂彻底混合5 min后过滤进样分析。

#### 1.4 色谱条件

\* 收稿日期:2005-01-25

作者简介:刘广军,男,1961-,副教授,主要研究方向:分析化学计量学。

ZORBAX Eclipse XDB - C8 色谱柱(4.6 mm \* 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。不同比例的甲醇和 0.05 M 醋酸钠水溶液为流动相,流速 1 mL  $\cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。所有的色谱分离均在室温下进行,在线检测波长为 334 nm,DAD 检测波长范围为 190 ~ 400 nm。非负矩阵因子分解(NMF)计算截取的数据波长范围为 320 nm ~ 390 nm。

### 1.5 数据处理方法

本实验采用非负矩阵因子分解(NMF)<sup>[6]</sup>计算两个混合组分的纯谱。非负矩阵因子分解是在“非负”限制约束条件下的一种矩阵分解新方法,它的基本思路是将非负矩阵 V 分解成两个非负因子矩阵 W 和 H。NMF 算法中采用了乘法更新公式(见公式(1)和(2)),所以不必采用其它限制条件即能保证分解结果“非负”。

$$W_i = W_i \frac{(VH^T)_i}{(WHH^T)_i} \quad (1)$$

$$H_{\mu} = H_{\mu} \frac{(W^T V)_{\mu}}{(W^T W H)_{\mu}} \quad (2)$$

具体算法参见文献[6],计算程序采用 matlab6.5 自行编制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨基酸对映体的分离

氨基酸与衍生剂的反应生成异吲哚类产物<sup>[7]</sup>,反应方程式见图 1。由紫外测量得到的图谱可看出,此类衍生物在 230 nm 和 334 nm 处各有一个最大吸收(见图 2)。但由于 230 nm 处较易受干扰,故在色谱实验中除了记录全波长数据外,选择 334 nm 作为检测波长。下文中所提到的氨基酸色谱峰均为其经过上述衍生化后所得到的衍生物的色谱峰。

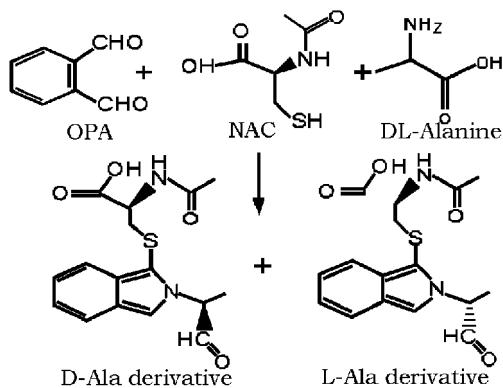


图 1 DL-丙氨酸的衍生反应方程式

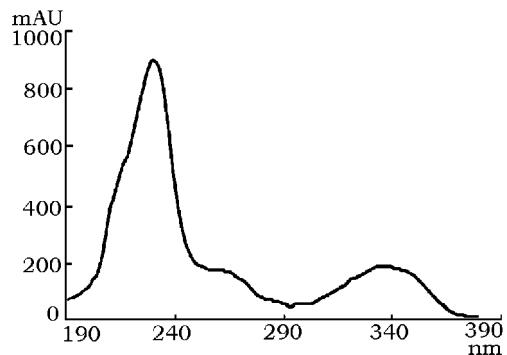


图 2 2 丙氨酸衍生物在 190 nm ~ 400 nm 处紫外吸收

实验结果表明,在甲醇 醋酸钠溶液为 30 70 的淋洗条件下,除 DL-丝氨酸的两种对映体有部分重叠外,DL-丙氨酸、DL-缬氨酸和 DL-苯丙氨酸的对映体能得到基线分离,但是 DL-缬氨酸的两种对映体出峰时间为 17 min 和 25 min,DL-苯丙氨酸的两种对映体出峰时间为 38 min 和 43 min。此分离条件下,不仅浪费流动相,而且峰形不理想。如果将流动相的比例调节至 45 55,虽然可使 DL-缬氨酸和 DL-苯丙氨酸的对映体在 10 min 内洗脱出峰,但将使 DL-丝氨酸及 DL-丙氨酸完全或部分重叠。

考虑到 DL-缬氨酸和 DL-苯丙氨酸保留过强的情况,操作中采用了简单的梯度淋洗,在前三种氨基酸全部出峰后,改变流动相配比使 DL-缬氨酸和 DL-苯丙氨酸快速出峰。淋洗方案如下:在 0 ~ 6 min 内保持甲醇 醋酸钠溶液为 30 70 不变,在 6 ~ 7 min 由此比例线性变化至 45 55,在 7 min 以后保持 45 55 不变。各对对映体的定性采用左旋光学纯标样通过内标法确定。丙氨酸没有手性,没有对映异构体,只有一个色谱峰。图 3 为 DL-丝氨酸、DL-丙氨酸、丙氨酸、DL-缬氨酸和 DL-苯丙氨酸混合物衍生后的色谱图。

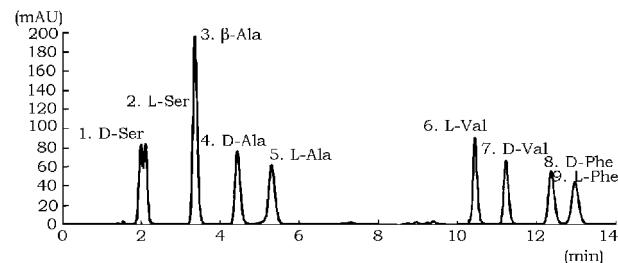


图 3 四种外消旋氨基酸和 丙氨酸的色谱

### 2.2 波谱解析法的使用

由图 3 可看出,尽管采用梯度洗脱,此谱中仍有一对重叠峰—丝氨酸的两个对映体。在这种情况下,

如果要定量分析此体系,知道两组分的实际峰面积是必需的。我们使用非负矩阵因子分析解析出两组分的纯谱(见图 4),但此结果与实际纯谱还存在一个系数关系,即  $AX_{D-Ser} + BX_{L-Ser} = Y_{DL-Ser}$ 。为得到两组分实际的纯谱,我们用最小二乘回归(least squares regress, LSR)来计算系数 A 和 B,得到的结果如下(见图 5): $A = 72.59$ ;  $B = 75.98$ 。此系数乘以各自组分的纯谱即为两组分的实际峰面积。

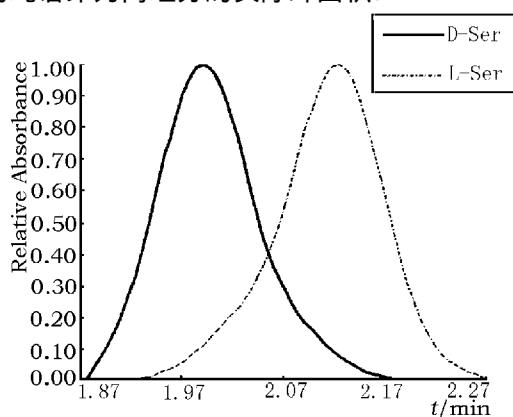


图 4 NMF 计算结果

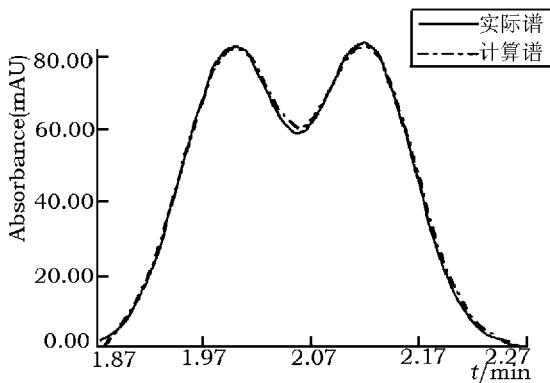


图 5 最小二乘回归的结果

### 2.3 各对映体的定量分析

2.3.1 标准曲线的建立 采用单一对映体标样在不同浓度值下的色谱峰面积或峰高建立标准曲线。实验中选用 L-丙氨酸和 L-苯丙氨酸作为两种标样,L-丙氨酸对应甲醇 醋酸钠 = 30 70 的色谱条件,L-苯丙氨酸对应甲醇 醋酸钠 = 45 55 的色谱条件。以浓度对峰面积或峰高进行线性拟合,得到标准曲线方程(见图 6,7)。通过此方程可以测定混合样品中两个标样组分的浓度。

2.3.2 其它组分相对浓度预报 在同样的色谱条件下,体系中各组分的含量比与其色谱峰面积比成线性关系。各组分的峰面积和所占面积百分比结果见表 1,其中 D-丝氨酸和 L-丝氨酸的单峰面积是根

据上述化学计量学方法计算而得。

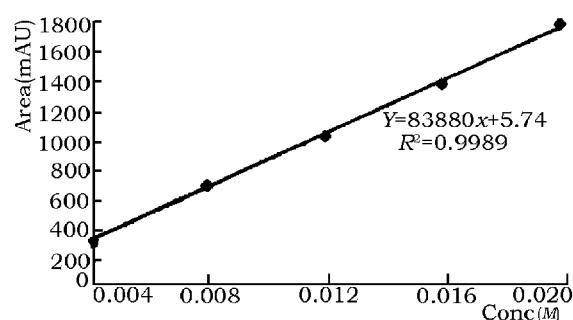


图 6(a) L-丙氨酸峰面积—浓度曲线

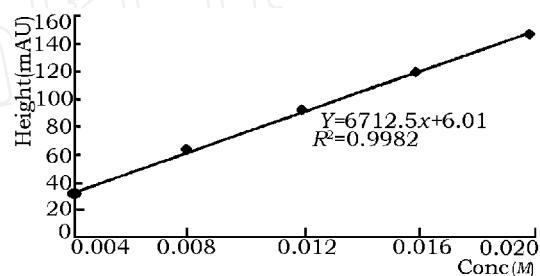


图 6(b) L-丙氨酸峰高—浓度曲线

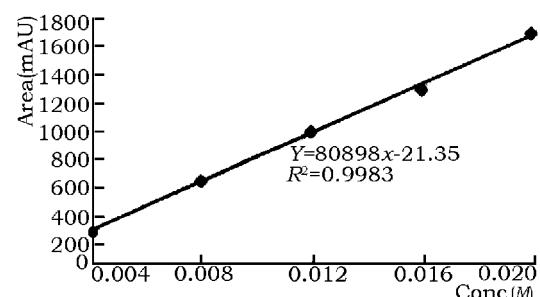


图 7(a) L-苯丙氨酸峰面积—浓度曲线

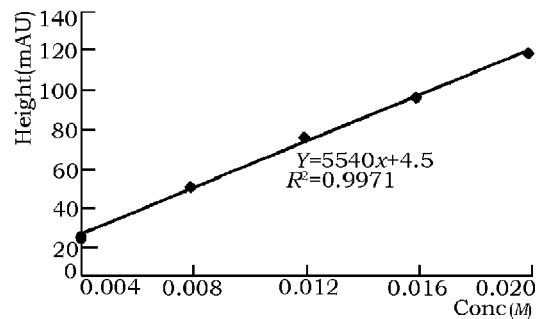


图 7(b) L-苯丙氨酸峰高—浓度曲线

## 3 结 论

本文运用柱前衍生化法使用常规反相高效液相色谱实现了 4 种氨基酸对映体的拆分,达到了较好的分离效果,并实现了多组分定量分析。文中所用的

淋洗方案也比较简单. 使用计算方法解析重叠峰相复杂的样品体系是很有帮助的.  
对降低了对色谱峰分离度的要求,这对于分析更加

表1 4种氨基酸各对映体和丙氨酸的色谱峰面积及其面积百分比

	D-Ser	L-Ser	-Ala	D-Ala	L-Ala	L-Val	D-Val	D-Phe	L-Phe
Area	288.4	313	870.9	389.1	384.9	365.7	307.8	323	298.4
Area %	8.14 %	8.84 %	24.59 %	10.99 %	10.87 %	10.33 %	8.69 %	9.12 %	8.43 %

## 参考文献:

- [1] 王亚丽,侯经国,高锦章. 高效液相色谱手性固定相分离 - 氨基酸衍生物对映体 [J]. 分析化学, 1998, 26 (12) : 1447 ~ 1450.
- [2] 吕海涛, 云自厚. 柱前手性衍生色谱拆分 DL- 氨基酸时流动相的影响 [J]. 分析化学, 1995, 23(9) : 1013 ~ 1016.
- [3] Zhao M, Bada J L. Determination of -dialkylamino acids and their enantiomers in geological samples by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of *o*-phthalaldehyde [J]. J Chromatogr A, 1995, 690: 55 ~ 63.
- [4] Bruckner H, Langer M, Lupke M, et al. Liquid chromatographic determination of amino acid enantiomers by derivatization with *o*-phthalaldehyde and chiral thiols Applications with

reference to food science [J]. J Chromatogr A, 1995, 697: 229 ~ 245.

- [5] Molnar-Perl I, Bozor I. Comparison of the stability and UV and fluorescence characteristics of the *o*-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and *o*-phthalaldehyde/N-acetyl-cysteine reagents and those of their amino acid derivatives [J]. J Chromatogr A, 1998, 798: 37 ~ 46.
- [6] Gao H T, Li T H, Chen K, et al. Overlapping spectra resolution using non-negative matrix factorization [J]. Talanta, 2005, 66: 65 ~ 73.
- [7] Molnar-Perl I. Derivatization and chromatographic behavior of the *o*-phthalaldehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives [J]. J Chromatogr A, 2001, 913: 283 ~ 302.

## Determination of Enantiomeric Amino Acids with High-Performance Liquid Chromatography and Chemometrics

*LIU Guang-jun*

(Department of Chemistry, Jining Teachers College, 272025, Jining, Shandong, PRC)

**Abstract:** A pre-column derivatization method for the separation of amino acid enantiomers using ortho-*o*-phthalaldehyde (OPA) and N-acetyl-L-cysteine (NAC) as tagging reagent followed by normal reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) has been developed. Chemometrics algorithm was used to resolve the overlapped chromatographic peaks. At the same time, least square regress was used to obtain the factors between the resolved curves and the real peaks. The quantitative determination of amino acid can be achieved from a single run.

**Key words:** amino acids; enantiomer separation; HPLC; derivatisation