

HPLC 柱前衍生法测定海水中 溶解态游离氨基酸*

王玉君 李烈英 陆田生

(中国科学院海洋研究所)

关键词 游离氨基酸, 反相高效液相色谱法, 邻二苯甲醛

提要 本文采用反相高效液相色谱法测定海水中溶解态游离氨基酸, 整个分析过程只需 40 min 就可使所有海水样品中的氨基酸得到很好分离, 对各含 6 pmol 的 16 种氨基酸混合样分析偏差在 10% 左右, 检测极限为 100 fmol, 线性范围在 1 pmol 到 1 nmol 之间。

海水中溶解态游离氨基酸 (DFAA) 是溶解态有机物质 (DOM) 的一部分, 它们在海洋环境中可发生许多化学变化^[1,2], 并且很容易被细菌及浮游生物吸收^[3,4]。由于海水中 DFAA 的含量很低, 而海水的盐度又很高, 故测定 DFAA 的含量带有很大的困难。以前测定 DFAA^[5] 都需作繁琐的脱盐、浓缩、提取等前处理工作, 给测定带来污染或损失, 使分析结果产生误差。HPLC 方法的发展为克服这些困难带来了方便, Lindroth 和 Mopper^[6] 最先用柱前衍生法使氨基酸生成邻苯二甲醛 (OPA) 的衍生物, 然后用 HPLC 进行分离、测定氨基酸的荧光衍生物, 该方法不需进行预先的浓缩、提取等预处理步骤, 方法简单方便, 适用于在现场直接测定。Evens 等^[7]也曾对该方法进行改进, 无论 Lindroth 等提出的方法还是经 Evens 等改进后的测定方法, 他们所使用的洗脱液的有机相均为乙腈, 色谱乙腈价格昂贵、毒性大。我们改用毒性小、价格便宜的甲醇代替乙腈作流动相, 同时对流动相的缓冲剂增加了乙酸盐的含量, 减少了磷酸盐的含量, 缓冲液的 pH 为 7.0, 这样延长了柱子的使用寿命。用我们改进后的测定方法测定胶州湾海水中溶解态游离氨

基酸, 其结果达到了预期的效果, 现将此法介绍如下:

一、材料和方法

1. 仪器装置

Waters 公司的 AAA 系统液相色谱仪: 包括两台 6000 A 输液泵、720 型系统控制器、U6K 型进样器、420 型荧光检测器 ($\lambda_{ex} = 334$ nm, $\lambda_{em} = 425$ nm)、730 型数据处理机和 Ham; Hon 微量进样注射器。

先后用的色谱柱是 300 × 4 mm 的 μ -Baepack 10 μ m 的 C_{18} 柱 (Waters Associates) 和国产 125 × 4 mm 的 3 μ m 的 C_{18} 柱 (大连色谱技术开发公司)。在分析柱前装有 37—50 μ m C_{18} 保护柱, 每隔一段时间, 保护柱里的填料就重新更换一次。

2. 试剂和材料

用邻苯二甲醛 (OPA) 和 β -巯基乙醇 (日本进口) 作为高纯的供生化分析用的试剂。用 NaOAc, H_3BO_3 (西德 MERCK 公司), NaH_2PO_4 、NaOH (英国 BDH 公司) 作为配缓冲液

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1589 号。

的超纯试剂。甲醇为中国科学院上海生化所监制,浙江黄岩化学实验厂生产的 HPLC 级试剂。四氢呋喃为上海化学试剂供应站供应的 AR 级试剂,用前经过重蒸。其它试剂也都为优级纯或超纯试剂。

氨基酸标准溶液 ($2.5 \mu\text{mol/L}$), H 型 (18 种)(日本和光纯药工业株式会社),在 0°C 下保存,使用前进行稀释。单个氨基酸标准 (Sigma 公司) 和用作内标的 α -氨基丁酸 (上海化学试剂供应站, Serva 进口分装) 也在用前配制成相应的浓度。

配溶液用的水经过美国 Milli-Q 纯水器处理变成高纯水,然后再加过硫酸钾在全玻璃蒸馏器里重蒸一次。

洗脱液 A 为 $0.025 \text{ mol/L NaH}_2\text{PO}_4 + 0.05 \text{ mol/L NaOAc}$ 的缓冲液 ($\text{pH} = 7.0$),再按比例加入 2% 的甲醇和 2% 的四氢呋喃 (V%),洗脱液 B 为甲醇加水 (65/35, V/V)。

衍生试剂是根据 Evens 等^[7]的方法配制的,即将 135 mg OPA 溶解在 5 ml 甲醇中,再加 $100 \mu\text{l}$ β -巯基乙醇,然后用硼酸钠的缓冲液 ($\text{pH} 9.5$) 定容为 25 ml。该溶液应隔夜陈化后使用,以降低试剂空白,应尽量在避光条件下密封保存,以防止 OPA 见光后氧化失效。用这种方法保存,该试剂一般可使用一个星期以上。

所有的洗脱液和缓冲液,在使用前都经过 $0.45 \mu\text{m}$ 的 Millipore 过滤膜抽滤脱气。

所有的玻璃器皿都用热的铬酸洗液浸泡,然后用高纯水冲洗。

3. 实验步骤

样品采取及处理 将采集到的海水样品立即用预先灼烧 ($450-500^\circ\text{C}$, 6h) 过的玻璃纤维滤膜过滤 (GF/C , 约 $1 \mu\text{m}$),接着再经 $0.45 \mu\text{m}$ Millipore 过滤器过滤后进行衍生反应。如果不能及时分析则应在 -20°C 以下的低温冰箱中保存水样。

衍生反应 在具有玻璃塞的反应瓶里加入 $300 \mu\text{l}$ 过滤后的水样,然后加入 $100 \mu\text{l}$ OPA

试剂,用手摇动混合反应后,用微量进样器吸取 $100 \mu\text{l}$ 进样。

在处理样品及玻璃器皿的过程中需十分小心,因为一个湿指印的氨基酸含量就可能高于海水中氨基酸的含量。微量进样器在每一次进样后都要反复用高纯水冲洗。用过硫酸钾重蒸过的高纯水作为空白经常进行检查。

二、实验结果

1. 衍生反应条件选择

图 1 为衍生反应与时间的关系。由于衍生反应只在 pH 大于 9 时发生,故我们选择 pH 为 9.5。从图 1 看出,反应在瞬时即可完成,反应后个别氨基酸的衍生物(如 Gly, Ala) 的荧光强度衰减很快,因此我们选择反应时间为 1 min,即样品与衍生试剂混合后立即进样。同时可看出,大多数的氨基酸衍生物的荧光强度即使 1h 后也没有多大改变,故反应时间并非十分严格,只要每次进样基本控制在相同时间即可。

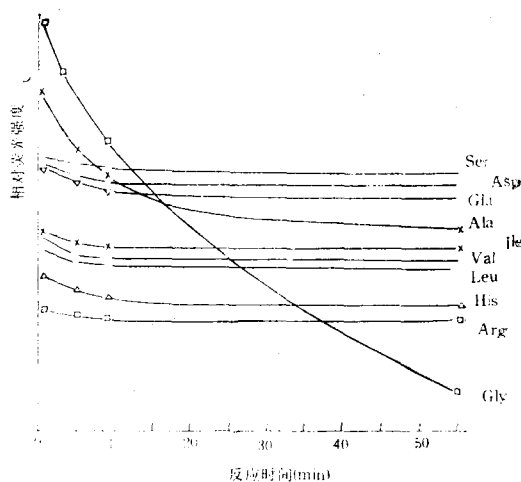


图 1 氨基酸衍生反应与时间的关系

Fig. 1 Influence of reaction time before injection on the fluorescence intensity of ten amino acids and ammonia

2. 色谱分离及定性鉴别

为了得到好的分离效果,我们采用如下的洗脱梯度(表 1),但有时还要根据实际情况进

表 1 流动相洗脱梯度
Tab. 1 Gradient table of mobile phase

时 间 min	流 速	A %	B %
0	0.8	80	20
2	1.0	80	20
3	1.0	60	40
12	1.0	60	40
17	1.0	40	60
24	1.0	40	60
28	1.0	20	80
35	0.8	80	20

行必要的调整,但一般变化不大。

图 2 为氨基酸标准溶液的液相色谱图,每个峰代表 6 pmoles 的氨基酸。图 3 为海水样品的液相色谱图。从图 2、图 3 可以看出,用磷酸盐加醋酸盐和甲醇体系,基线比较稳定,除脯氨酸和羟脯氨酸不能与 OPA 生成衍生物、phe 和 NH_4^+ 分离不太好外,其它的氨基酸一般都能得到较为满意的分离。一次氨基酸的全分析只需 40 min。

根据保留时间,通过注入单个氨基酸的标

准来确定色谱峰。

3. 校正及定量

校正溶液均为 6 个 pmoles 的标准氨基酸溶液,校正色谱图见图 2。根据校正色谱图,用内标法对峰面积积分来定量。内标物(α -氨基丁酸)为海水中没有的氨基酸,每次在衍生反应前加入到海水样品中。每分析几个样品即注入一次标准液以便进行校正。不同的氨基酸会产生不同的荧光强度,而相同的氨基酸在蒸馏水和海水中产生相同的荧光强度,故该方法不受盐度的影响,可用来测定海水中的氨基酸,以及其它方面的氨基酸。

用标准加入法把已知量的氨基酸加到海水样品中,当各个氨基酸浓度在 1 pmole—1 nmole 时,其浓度与峰面积呈线性关系。

4. 重现性

在上述条件下,我们通过用注入标准样品的方法测定了结果的重现性。表 2 为 6 次平行进样的标准偏差,每次进样时每个氨基酸的量是 6 pmoles。从表 2 看出,氨基酸的不同,其结果的重现性也是不同的,但变化范围一般在

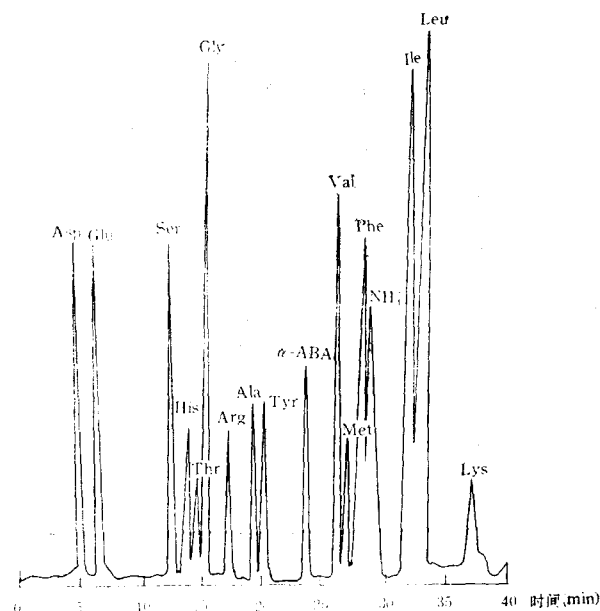


图 2 氨基酸标准的液相色谱图

Fig. 2 Profile of the amino acid standards, 6.0 picomoles each

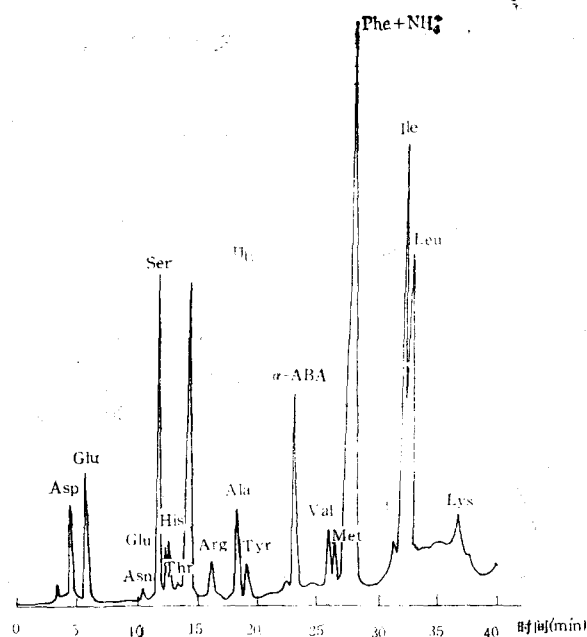


图3 海水样品氨基酸分析的液相色谱图

Fig. 3 Profile of amino acids in surface seawater (Station Y₃, Feb. 24, 1986)

表2 15种氨基酸6次平行实验结果的重现性

Tab. 2 Reproducibility of the results obtained in analysis of 6 picomoles of 15 amino acids found in seawater

氨基酸	峰 面 积						平均值	偏差 (%)
	1	2	3	4	5	6		
天门冬氨酸	29865	34757		24247	27199	28039	28845	11
谷氨酸	36320	35578	30086	28225	37230	37672	376	11
丝氨酸	37110	38609	47126	40857	33380	44500	40263	11
组氨酸	18380	17425	17019	19538	19391	18210	18327	5
苏氨酸	10468	10087	12596	8655	9582	6455	9640	19
甘氨酸	58589	62469	70841	67131	74717	68000	66891	8
精氨酸	24419	28724	22635	28351	24999	23058	25364	9
丙氨酸	25818	30608	29945	25983	27942	27198	27915	7
酪氨酸	22447	23435	22873	21682	26125	23477	23358	6
α -氨基丁酸	18575	16411	17053	17558	17315	19137	17675	5
亮氨酸	122246	105151	101359	140112	138841	116358	122177	14
蛋氨酸	13598	12427	10040	10844	17686	15150	13291	20
缬氨酸	84018	81208	91073	84614	93300	68951	83660	9
苯丙氨酸	72468	70772	75387	67244	73153	75336	72393	4
异亮氨酸	121763	1046324	146324	103229	102951	121452	116772	13

$\pm 5\% - \pm 20\%$ 之间。

水进行冲洗,再用 100 ml 甲醇进行冲洗。

因此 12 h 可分析 12 个海水样品 (不包括校正和空白)。

在每天工作结束前,整个系统需要 100 ml

三、结 论

在该方法中,我们经过许多实验后选定了

采用磷酸盐加醋酸盐缓冲液和甲醇作为洗脱液,选用该洗脱液分离效果好,基线稳定且重现性好。与 Lindroth 和 Mopper^[6] 的方法相比,该方法降低了磷酸盐的浓度,增加了醋酸盐,改善了经常发生的柱子堵塞现象,我们把洗脱液的 pH 降为 7.0,改善了柱子易变坏的现象;与 Evens 等^[7]的方法相比,该方法避免使用具有剧毒的乙晴,避免了对操作人员健康的危害。

该方法用计算机控制梯度程序并自动进行峰面积的积分计算,减少了许多繁琐人工的劳动,因此该方法比较实用。

参 考 文 献

- [1] Bada, J. Lee, C., 1977. Decomposition and alteration of organic compounds dissolved. *seawater*. *Mar. Chem.* **5**: 523—524.
- [2] Pocklington, R., 1977. Chemical processes and interactions involving marine organic matter. *Mar. Chem.* **5**: 479—496.
- [3] Crawford, C. C., Hobbie, J. E. and K.L. Webb, 1974. The utilization of dissolved free amino acids by estuarine microorganisms. *Ecology*. **55**: 551—563.
- [4] Flynn, K. J., and I. Butler, 1986. Nitrogen Sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **34**: 281—304.
- [5] Dawson, R. and R. G. Prilchard, 1978. The determination of amino acids in seawater using a fluorometric analysis. *Mar. Chem.* **6**: 27—40.
- [6] Lindroth, P. and K. Mopper, 1979. High Performance Liquid Chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with O-Phthaldialdehyde. *Analytical chemistry*. **51**: 1667—1674.
- [7] Erens, R., Braven, J., Prown, L. and I. Butler, 1982. A high performance liquid chromatographic determination of free amino acids in natural waters in the picomolar ($M \times 10^{-12}$) range suitable for shipboard use. *chem. Ecol.* **1**: 99—106.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF DISSOLVED FREE AMINO ACIDS BY PRECOLUMN DERIVATIZATION IN SEAWATER*

Wang Yujun, Li Lieying and Lu Tiansheng

(Institute of Oceanology, Academia Sinica)

Key words Free amino acids, Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), O-phthaldialdehyde (OPA)

Abstract

This paper describes a method of reversephase high performance liquid chromatography for the determination of dissolved free amino acids in seawater.

The whole process takes only 40 minutes to separate the amino-acids in all the seawater samples. The coefficient of variation of 16 kinds of amino-acids samples each containing 6 p mol is about 10%, the detection is 100 f mol, the linear range is 1p mol to 1n mol.

* Contribution No. 1589 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.