

Быстрый, точный, чувствительный и воспроизводимый метод анализа аминокислот на ВЭЖХ

Анализ аминокислот на колонках Zorbax Eclipse-AAA и ВЭЖХ Agilent 1100/1200

John W. Henderson, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer, and Cliff Woodward

Идеальный количественный анализ аминокислот должен сочетать в себе быстроту и чувствительность с надежностью как реакции дериватизации, так и самого анализа. Эти цели достигаются благодаря автоматизированной предколоночной дериватизации с использованием *о*-фталевого альдегида (ОРА) для первичных аминокислот и 9-флуорометилхлороформиата (ФМОС) для вторичных аминокислот с последующим высоконадежным ВЭЖХ анализом. А при использовании хроматографов Agilent 1100/1200 эта процедура становится быстрой, точной, чувствительной и воспроизводимой.

Комбинирование ОРА и ФМОС реагентов позволяет проводить быструю предколоночную дериватизацию аминокислот для хроматографического анализа. Реакционная смесь помещается в буфер с pH 10,2, что позволяет проводить прямую обработку белков и пептидов подвергшихся кислотному гидролизу. Первичные аминокислоты реагируют с ОРА и 3-меркаптопропионовой кислотой (3-МРА). Вторичные аминокислоты не реагируют с ОРА, но взаимодействуют с ФМОС. Включение 3-МРА в индолы понижает гидрофобность получаемых производных, что позволяет элюировать их с колонки раньше ФМОС-производных. Избыток ФМОС и продукты его деградации элюируются после последней вторичной аминокислоты и не влияют на анализ. Процесс получения производных быстр и легко автоматизируется при использовании автосамплера Agilent G1329A. А благодаря высокой скорости реакции процесс полностью проходит при комнатной температуре. Автоматизация процедуры обеспечивает высокую степень воспроизводимости результатов. Общее время анализа от "ввода до ввода" может быть менее 14 минут

(продолжительность самого разделения 10 мин) на 75-мм колонке и 26 минут (время разделения 16 мин) на 150-мм колонке. Оба варианта обеспечивают высокую производительность анализа.

УСЛОВИЯ РАЗДЕЛЕНИЯ

Колонки Zorbax Eclipse-AAA содержат протестированный сорбент с обращенной фазой. Использование данных колонок по описываемой методике позволяет разделять все аминокислоты, обычно определяемые в белковых/пептидных гидролизатах.

Компоненты А и В подвижной фазы просты в приготовлении, градиент состоит из линейных участков (см. разделы *Условия эксперимента* и *Подвижная фаза*). Это позволяет проводить данный анализ на системах, укомплектованных как бинарным (G1312A, G1312B), так и четырехканальным (G1354A) насосами.

Хроматограмма (рис. 1) иллюстрирует типичную картину обычного анализа, которую можно получить на системе, оборудованной бинарным насосом и диодно-матричным детектором (DAD, G1315B, G1315C). Анализ одного образца можно провести за 14 минут (включая время переуравновешивание колонки) с приемлемым разрешением.

Первичные аминокислоты (ОРА-производные), показанные на рис. 1А, регистрировались на длине волны 338 нм, в то время как вторичные аминокислоты (ФМОС-производные), показанные на рис. 1В, на длине волны 262 нм. Количество каждой аминокислоты 125 пмоль, суммарный объем 0,5 мкл.

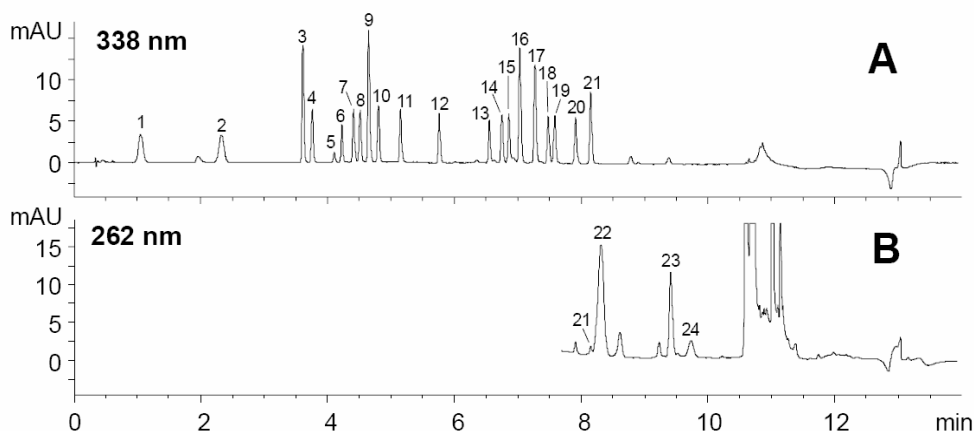


Рисунок 1: Типичный анализ, высокопроизводительное разделение 24 аминокислот с использованием протокола Eclipse-AAA. Размеры колонки: 4,6×75 мм, 3,5 мкм. Характеристику пиков см. в Таблице 1. Детекция: А. 338 нм (ОРА-аминокислоты), В. 262 нм (ФМОС-аминокислоты).

Таблица 1. Порядок элюции аминокислот при использовании протокола Eclipse-AAA.

№ Пика	Аминокислота	Сокращение
1	Аспарат	ASP
2	Глутамат	GLU
3	Аспарагин	ASN
4	Серин	SER
5	Глутамин	GLN
6	Гистидин	HIS
7	Глицин	GLY
8	Треонин	THR
9	Цитрулин	CIT
10	Аргинин	ARG
11	Аланин	ALA
12	Тирозин	TYR
13	Цистин	CY2
14	Валин	VAL
15	Метионин	MET
16	Норвалин	NVA
17	Триптофан	TRP
18	Фенилаланин	PHE
19	Изолейцин	ILE
20	Лейцин	LEU
21	Лизин	LYS
22	Гидроксипролин	HYP
23	Саркозин	SAR
24	Пролин	PRO

Если необходимо большее разрешение, чем то, которое достигается при разделении на 75-мм колонке (рис. 1), следует использовать 150-мм колонку. На рисунке 2 представлена типичная картина разделения при обычной чувствительности и высоком разрешении, полученная на двух различных 150-мм колонках Zorbax Eclipse-AAA. Одна имеет размер гранул 3,5 мкм, другая - 5 мкм. На хроматограммах изображено значение УФ сигнала при длине волны 338 нм, что соответствует ОРА-производным первичных аминокислот.

Эти разделения внешне весьма схожи, но хроматограмма, соответствующая колонке с гранулами размером 3,5-мкм, дает более высокое разрешение благодаря более высокой эффективности разделения. Противодавление на колонке с меньшими (3,5 мкм) гранулами составляет 240-300 бар, в то время как противодавление на колонке с 5-мкм гранулами составляет 160-210 бар. Таким образом, если интерес представляют лишь первичные аминокислоты и используется 15-см колонка, лучше выбирать наполнитель с 5-мкм гранулами, так как при этом в системе создается меньшее противодавление. Преимущество 15-см колонки, содержащей 3,5-мкм гранулы, перед колонкой с 5-мкм гранулами видно при сравнении рисунков 3 и 4. На рисунке 3А показано разделение первичных аминокислот, определяемое при 338 нм; на рисунке 3В – при 262 нм; и на рисунке 3С показаны результаты анализа с использованием флуоресцентной детекции. Стоит обратить внимание на разрешение между пиками №21 (лизин) и №22 (гидроксипролин) на рисунках 3 и 4.

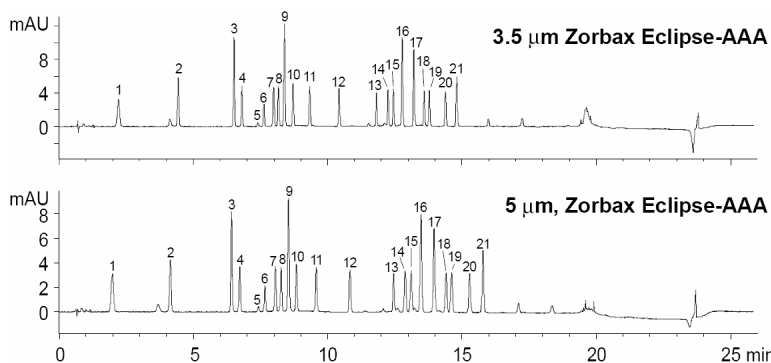


Рисунок 2. Анализ 21 аминокислоты с высокой разрешающей способностью: на 5 мкм и 3,5 мкм колонках Zorbax Eclipse-AAA. Размеры колонки: 4,6×150 мм. Характеристику пиков см. в Таблице 1. Детекция: 338 нм (ОРА-аминокислоты).

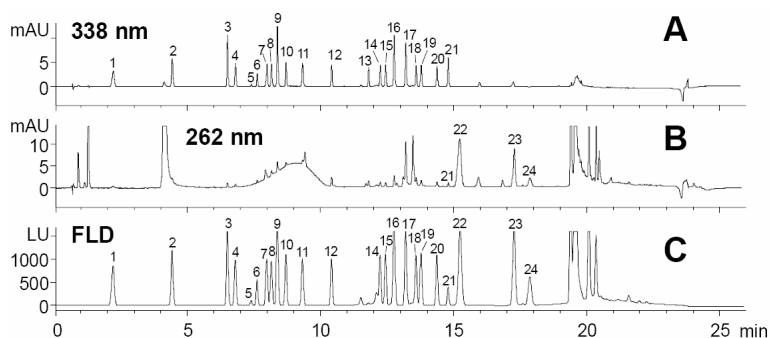


Рисунок 3. Высокочувствительный аминокислотный анализ с высокой разрешающей способностью, с использованием различных режимов детекции и протокола Zorbax Eclipse-AAA. Размеры колонки: 4,6×150 мм, 3,5 мкм. Характеристику пиков см. в Таблице 1. Детекция: А: УФ 338 нм (ОРА-аминокислоты), В: УФ 262 нм (ФМОС-аминокислоты), С: Флуоресцентная (см. раздел Условия Эксперимента).

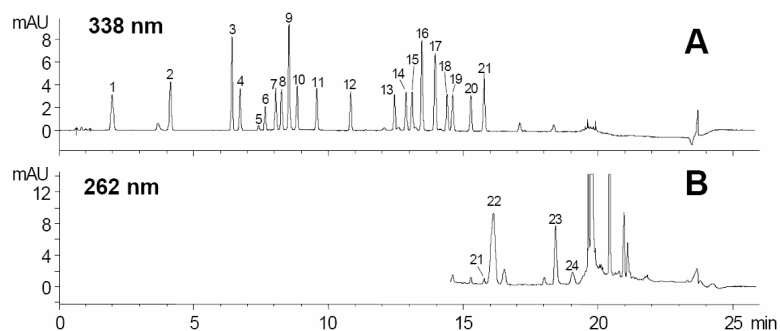


Рисунок 4. Типичный анализ 24 аминокислот с высокой разрешающей способностью, с использованием протокола Eclipse-AAA. Размеры колонки: 4,6×150 мм, 5 мкм. Характеристику пиков см. в Таблице 1. Детекция: А: УФ 338 нм (ОРА-аминокислоты), В: УФ 262 нм (ФМОС-аминокислоты).

Увеличение разрешения между этими пиками при использовании более длинной колонки с меньшим размером гранул (150 мм, 3,5 мкм) предоставляет больше времени для переключения длины волны на диодно-матричном или флуоресцентном детекторе между пиками №21 и №22.

При детекции на 262 нм (Рис. 3В), между 7 и 10 минутами отмечается небольшая "выпуклость" кривой по сравнению с базовой линией, что происходит из-за образования побочных продуктов дериватизации. Так как в это время обнаруживаются только первичные аминокислоты (338 нм), эта "выпуклость" не влияет на детекцию и разрешение. Для обнаружения вторичных аминокислот, таких как гидроксипролин, лучше всего проводить детекцию на обеих длинах волн. Если это нежелательно, то можно использовать переключение с одной длины волны на другую.

Конкретное время переключения длины волны, может меняться в зависимости от температуры, типа подвижной фазы и т.п. На рисунке 3С флуоресцентный сигнал отслеживали при 450 нм ($E_x = 340$ нм), и переключали на 305 нм ($E_x = 266$ нм) после элюции пика №21 (лизин), но перед элюцией пика №22 (гидроксипролин). В этом конкретном случае, переключение происходило запрограммировано на 15 минуте. Для более конкретной информации см. главы Условия Эксперимента, Параметры Детекции. После элюции пика №24 (пролин), градиент увеличивается до 100% для канала В, чтобы элюировать с колонки побочные продукты реакции. После ступенчатого повышения градиента до 100% в канале В в течение 3,7 минут, происходит запрограммированный возврат к исходным условиям. При этом происходит переуравновешивание колонки для следующего ввода образца. Следует отметить, что пик №13 (цистин) при флуоресцентной детекции не флуоресцирует при этих условиях и не детектируется.

Разделение лизина и гидроксипролина и переключение длины волны

Необходимость проведения анализа лизина и гидроксипролина влияет на выбор параметров детекции, типа колонки, а также на время выполнения эксперимента. Аминокислоты, элюируемые до гидроксипролина (включая лизин) вступают в реакцию дериватизации с ОРА и детектируются при 338 нм. Гидроксипролин элюируется сразу после лизина и является первой элюируемой аминокислотой, дериватизированной FMOC, следовательно, ее детекция должна вестись при 262 нм. Наиболее простым решением является постоянная

детекция двух отдельных сигналов при 338 и 262 нм, с использованием Agilent 1100/1200 DAD (диодно-матричный) или MWD (многоволновой детектор). При отсутствии DAD или MWD, возможно переключение единого детектирующего канала с одной длины волны на другую при тщательно подобранных условиях. При этом можно детектировать как ОРА-, так и FMOC-дериватизированные аминокислоты. Детекция через единый канал может быть необходимой, например, в случае использования Agilent 1100/1200 VWD (детектор с изменяемой длиной волны). Более высокое разрешение между лизином и гидроксипролином можно получить, используя более сложный профиль градиента. За дополнительной информацией обращайтесь на сайт www.agilent.com/chem в раздел Technical Support / UserContributed Software (Техническое Обеспечение / Пользовательское Обеспечение). Если гидроксипролин не представляет интереса (например, при анализе белковых гидролизатов), можно использовать любой тип колонки и переключать длину волны в период между элюцией лизина и элюцией первой FMOC-аминокислоты (саркозина или пролина). В этом случае, подходящей является колонка размером 4,6 × 75 мм, преимуществом которой является вдвое меньшее время анализа.

СРАВНЕНИЕ С МЕТОДОМ AMINOQUANT ДЛЯ ВЭЖХ HP1090

На рисунке 5А представлена хроматограмма, полученная методом AminoQuant (Application Notes, HP Pub. No. 5954-6257) на ВЭЖХ HP1090 с использованием специально подобранных подвижной фазы, колонки и скорости элюции. При таком разделении имеется пять критических пар аминокислот (*asp/glu*, *his/gly*, *ala/arg*, *val/met* and *phe/ile*), разрешение между которыми недостаточно высоко. Кроме того, пара *asp/glu* элюируется практически сразу после «мертвого» объема.

На рисунке 5В показана хроматограмма, полученная при использовании колонки Zorbax Eclipse-AAA. В случае всех критических пар разрешение повысилось, особенно для первой пары, *asp/glu*, для которой увеличилась удерживающая способность колонки, и, следовательно, эта пара элюировалась через больший промежуток времени после «мертвого» объема колонки. Стоит также отметить, что аргинин элюируется перед аланином при использовании колонки Eclipse-AAA, в отличие от оригинального метода AminoQuant на том же HP 1090 приборе.

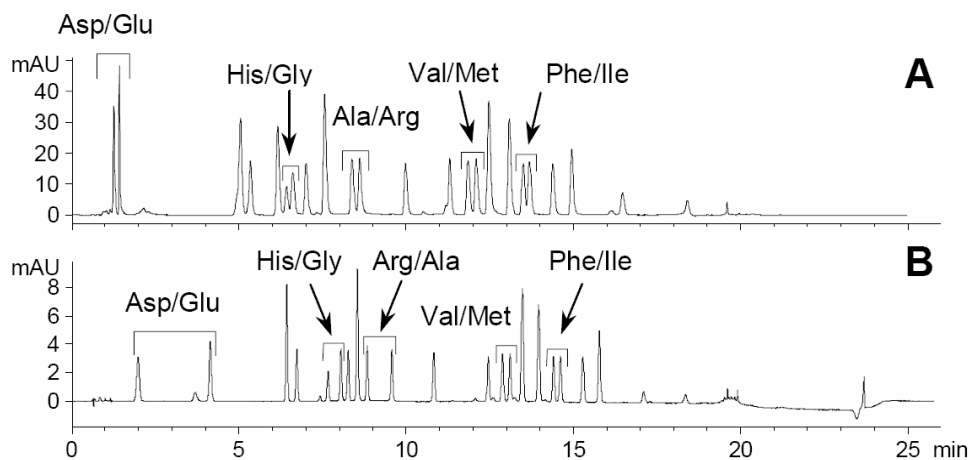


Рисунок 5. Сравнение аминокислотных анализов:
А) AminoQuant метод на ВЭЖХ HP 1090 с использованием колонки Hypersil AA.
В) Колонка Zorbax Eclipse-AAA (4,6×150 мм, 5 мкм) на ВЭЖХ Agilent 1100.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

В таблице 2 представлены результаты идентичных вводов образца (n=6) реакционной смеси аминокислот, разделяемой на колонке Zorbax Eclipse-AAA column (4,6 × 150 мм, 3,5 мкм). Каждый опыт представляет собой отдельную реакцию дериватизации и хроматографическое разделение ее продуктов. Воспроизводимость времени удерживания достаточно высока – относительное среднеквадратичное отклонение (ОСКО, RSD) равно 0,18%. Воспроизводимость дериватизации, о чем говорит площадь пика, имеет ОСКО равное 2,0%. Эти данные сравнимы с таковыми, опубликованными для изначального метода AminoQuant, полученными на приборе HP 1090 (0,23 % и 2,3 % соответственно) (LC/GC International, Volume 5, Number 2, Feb 1992, pp. 44-49)

ЛИНЕЙНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Линейность для методики Eclipse-AAA показана в пределах от 4,5 пмоль до 450 пмоль при использовании стандартных проб аминокислот (0,5 мкл образца). На рисунке 6 показаны калибровочные кривые для нескольких аминокислот, для которых использовали DAD или FLD. Коэффициент корреляции для всех 24 аминокислот имеет значения между 0,99900 и 1,00000 как при использовании DAD, так и FLD для калибровки.

Детекция производных аминокислот при двух низких концентрациях, 5 пмоль и 50 пмоль, изображена на рисунках 7 и 8, соответственно для DAD и FLD. При использовании DAD (Рис. 7), каждая аминокислота в стандартной смеси может быть определена при концентрации около 10 пмоль. FLD (Рис. 8) имеет более высокую чувствительность, чем DAD.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При использовании OPA и FMOC реагентов, колонки Zorbax Eclipse-AAA и ВЭЖХ Agilent 1100/1200, аминокислотный анализ гидролизатов белков и пептидов может быть выполнен в течение десяти минут. При этом методе разделения наблюдается большее время удерживания пяти критических пар аминокислот по сравнению с первоначальным AminoQuant методом, выполняемом на ВЭЖХ HP1090.

Воспроизводимость анализа аминокислот на колонке Eclipse-AAA сравнима с воспроизводимостью анализа в случае оригинального AminoQuant метода, а подвижная фаза более проста в приготовлении, так как при этом необходимо только доведение pH буфера (растворителя А).

Выбор колонки зависит от требуемой скорости анализа и разрешения:

ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 × 75 мм (3,5 мкм) предназначена для анализа с обычной чувствительностью и высокой производительностью с использованием DAD.

ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 × 150 мм (5 мкм) предназначена для анализа с обычной чувствительностью и высоким разрешением при более низком противодавлении с использованием DAD.

ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 × 150 мм (3,5 мкм) предназначена для анализа с высокой чувствительностью и высоким разрешением с использованием FLD.

ZORBAX Eclipse-AAA 3,0 × 150 мм, (3,5 мкм), доступная с осени 2000, предназначена для анализа с высокой чувствительностью, высоким разрешением и меньшим расходом растворителя и образца.

Используя автосамплер Agilent G1313A/G1329A для автоматизации предколоночной дериватизации, можно повысить скорость и воспроизводимость реакции, а также свести к минимуму участие оператора в процессе. Эта методика может быть использована для программируемого анализа как первичных, так и вторичных аминокислот с использованием DAD и детекцией на двух длинах волн или запрограммированным переключением длин волн. Для более высокой чувствительности следует использовать флуоресцентную детекцию.

Таблица 2. Воспроизводимость методики Zorbax Eclipse-AAA. Данные получены на системе Agilent 1100 с четырехканальным насосом. Данные соответствуют результатам шести идентичных повторяющихся анализов.

Аминокислота	Удерживание, % ОСКО	Площадь пика, % ОСКО
ASP	0,58	0,8
GLU	0,33	3,0
ASN	0,16	2,2
SER	0,12	2,8
GLN	0,12	2,4
HIS	0,11	2,7
GLY	0,15	2,5
THR	0,12	1,1
CIT	0,10	3,5
ARG	0,36	2,3
ALA	0,11	0,9
TYR	0,12	0,7
CY2	0,17	0,6
VAL	0,16	0,5
MET	0,17	1,1
NVA	0,15	0,7
TRP	0,18	0,8
PHE	0,14	0,8
ILE	0,14	1,1
LEU	0,18	1,0
LYS	0,19	3,2
HYP	0,13	4,2
SAR	0,14	6,8
PRO	0,12	2,7
Среднее	0,18	2,0

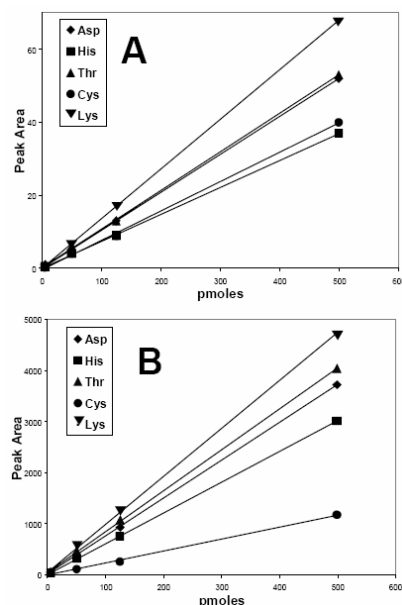


Рисунок 6. Калибровочные кривые для анализа производных аминокислот с использованием УФ (А) или флуоресцентной (В) детекции. Линейность наблюдается в пределах концентрации от 4,5 до 450 пмоль при объеме пробы 0,5 мкл.

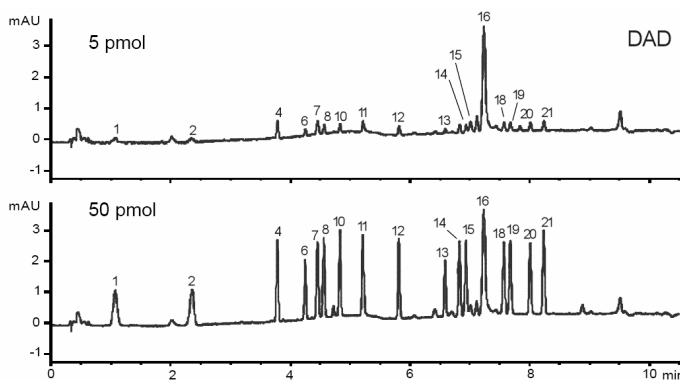


Рисунок 7. Сигнал УФ-детектора при 338 нм (ОРА-производные) при использовании различных концентраций аминокислот.

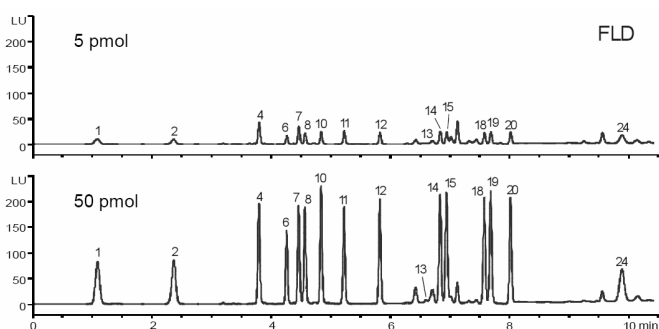


Рисунок 8. Сигнал флуоресцентного детектора при использовании различных концентраций аминокислот. Степень усиления фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) = 10.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Хроматограммы, изображенные на рисунках 1-8, были получены при следующих условиях эксперимента:

Оборудование

Рекомендуемым хроматографом является ВЭЖХ Agilent 1100/1200: G1312A Бинарный насос с диодно-матричным детектором (DAD) G1315A, 6-мм или 10-мм проточной ячейкой, и/или G1315A флуоресцентный детектор (FLD). Хотя представленные результаты были получены при использовании бинарного насоса, эта методика также применима для четырехканальных насосов Agilent 1100/1200 (G1311A/G1354A).

ВЭЖХ колонки

ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 x 75 мм, 3,5 мкм PN 966400-902
 ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 x 150 мм, 3,5 мкм PN 963400-902
 ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 x 150 мм, 5 мкм PN 993400-902

Предколонки:

ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 x 12,5 мм, 5 мкм, 4 шт. в комплекте PN 820950-931. Являются необязательными и устанавливаются прямо перед аналитической колонкой с использованием специального крепежа.

ZORBAX Eclipse-AAA 3,0 x 150 мм, 3,5 мкм доступна с осени 2000.

Подвижная фаза

A: 40 mM Na₂HPO₄ pH 7,8 [5,5 г NaH₂PO₄, моногидрат + 1 литр воды, pH доводится до 7,8 раствором NaOH (10 н)]
 B: ACN: MeOH: вода (45:45:10, об./об./об.)

Удобно готовить 10-кратный маточный (стоковый) раствор подвижной фазы А, не доводя pH. Этот раствор может храниться несколько недель, а при необходимости достаточно его развести и оттитровать до pH 7,8. Все растворители, входящие в состав подвижной фазы должны по своей чистоте подходить для ВЭЖХ.

Настройки насоса

Flow (Скорость потока): 2 мл/мин
 Stoptime (Время остановки): 14 мин (75-мм колонка) или 26 мин (150-мм колонка)
 Post time: off

Auxiliary Pump Settings (Дополнительные настройки насоса):

Max. flow ramp (Максимальный перепад скорости): 100 мл/мин²
 Compressibility A (Сжимаемость А): 50×10⁻⁶
 Minimal Stroke A (Минимальная порция А): 20 мкл
 Compressibility B (Сжимаемость В): 115×10⁻⁶
 Minimal Stroke B (Минимальная порция В): Auto

Градиенты:

Для колонки длиной 75 мм

Время (мин)	% В
0	0
1	0
9,8	57
10	100
12	100
12,5	0
14	0

Для колонки длиной 150 мм

Время (мин)	% В
0	0
1,9	0
18,1	57
18,6	100
22,3	100
23,2	0
26	0

Примечание: чтобы продлить срок службы колонки, следует промывать ее 10 объемами 100% раствора В в случаях, если колонка не будет использоваться в течение ночи или большего периода времени.

Параметры детекторов

DAD:

Необходимые лампы:

UV lamp (УФ лампа): да

Vis. lamp (Лампа видимого света): нет

УФ:

338 нм, bandwidth (полоса пропускания, bw): 10 нм, reference (волна сравнения): 390 нм, bw: 20 нм (для ОРА-аминокислот)

262 нм, bw: 16 нм, reference: 324 нм, bw: 8 нм (для ФМОС-аминокислот)

Peakwidth (Ширина пика): >0,03 мин (0,5 сек)

Slit (Ширина оптической щели): 4 нм

FLD:

Для 75 мм колонки

Время, мин	Ex/Em, нм	Усиление ФЭУ
0	340/450	10
8,5*	266/305	9

Для 150 мм колонки		
Время, мин	Ex/Em, нм	Усиление ФЭУ
0	340/450	10
15*	266/305	9

*Конкретное время переключения длины волны флуоресценции может изменяться в зависимости от температуры, типа подвижной фазы и т.д.

Peakwidth (Ширина пика): >0,5 мин

Автосамплер

Схема расположения флаконов в автосамплере указана на рисунке 9.

Injection Program (Программа ввода образца):

Draw (Отбор) 2,5 мкл из флакона 1 (боратный буфер)
Отбор 0,5 мкл образца (например, из флакона 11, содержащего образец смеси аминокислот)
Mix (Перемешивание) 3 мкм на воздухе при максимальной скорости 2х
Wait (Пауза) 0,5 мин
Отбор 0 мкл из флакона 2 (промывание иглы водой из флакона без крышки)
Отбор 0,5 мкл из флакона 3 (ОРА)
Перемешивание 3,5 мкл на воздухе при максимальной скорости 6х
Отбор 0 мкл из флакона 2 (промывание иглы водой из флакона без крышки)
Отбор 0,5 мкл из флакона 4 (ФМОС)
Перемешивание 4 мкл на воздухе при максимальной скорости 6х
 [Дополнительное промывание иглы для более высокой чувствительности: *Отбор* 0,0 мкл из флакона 6 (ACN, ацетонитрил)]
Отбор 32 мкл из флакона 5 (вода)
Перемешивание 18 мкл на воздухе при максимальной скорости 2х
Inject (Ввод образца)

Auxiliary (Дополнительные параметры):

Drawspeed (Скорость забора): 200 мкл/мин
Ejectspeed (Скорость ввода образца): 600 мкл/мин
Draw position (Положение при отборе): 0,0 мм

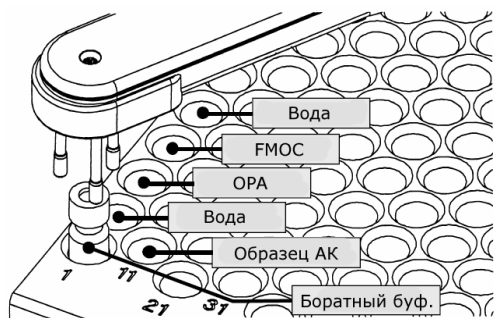


Рисунок 9. Расположение флаконов с реагентами в автосамплере Agilent 1313A/1329A. Такое расположение флаконов соответствует приведенной в тексте программе нанесения образцов.

Флаконы

Из-за небольшого объема ОРА и ФМОС реагентов, их помещают в специальные конические вставки (с полимерными ножками) (Рис. 10А). Эти вставки подходят для флаконов с широким горлышком под винтовые или зажимные крышки (Рис. 10В-С). Не рекомендуется использовать флаконы под защелкивающиеся полимерные крышки (snap-cap vials), из-за высокой летучести ФМОС и способности ОРА разлагаться в присутствии кислорода; данный вид флаконов не обеспечивает достаточной герметичности. Не

используйте флаконы и крышки, предназначенные для других приборов, так как они могут повредить автосамплер Agilent G 1313A/1329A.

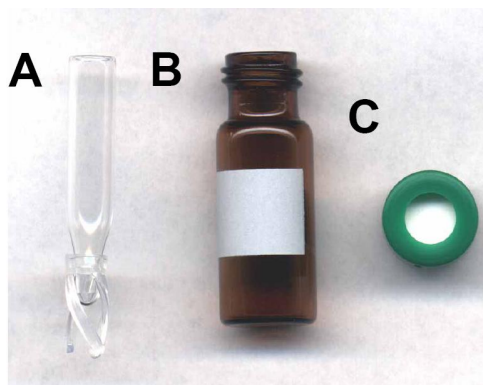


Рисунок 10. Вставка, флакон и крышка. Коническая вставка (А) (Agilent PN 5181-1270), флакон из темного стекла с широким горлышком (В) (Agilent PN 5182-0716) и винтовая крышка (С) (Agilent PN 5182-0721) для автосамплера, рекомендуемые для анализа аминокислот.

Термостат колонок

Температура: 40°C (левая и правая стороны)
 Проведение анализа возможно, если температура отличается от установленной не более чем на +/- 0,8 °C

Реагенты для дериватизации

Боратный буфер:

Agilent PN 5061-3339
 0,4 н раствор в воде, pH 10,2.
 Хранить в холодильнике (4 °C). Использовать по необходимости.

ФМОС реагент:

Agilent PN 5061-3337
 Из 1-мл ампулы отбирают аликвоты по 100-мкл ФМОС реагента и помещают в конические вставки, сразу закрывают и хранят в холодильнике (4 °C); аликвоту можно использовать максимум в течение 7–10 дней после ее отбора.

ОРА реагент:

Agilent PN 5061-3335
 Из 1-мл ампулы отбирают аликвоты по 100-мкл ФМОС реагента и помещают в конические вставки, сразу закрывают и хранят в холодильнике (4 °C); аликвоту можно использовать максимум в течение 7–10 дней после ее отбора.

Вода: деионизированная, по чистоте соответствующая требованиям для ВЭЖХ

Описание и каталожные номера см. в разделе *Информация для заказов.*

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Примечание: флаконы с каждым реагентом следует заменять каждый день. 1 мл ампулы раствора хватает на 10 дней (1000 мкл/100 мкл = 10 дней).

Смесь аминокислот для качественного анализа

Для проведения хроматографического анализа использовали смесь 17 аминокислот, входящих в состав стандартной смеси с концентрацией 250 пмоль/мкл (PN:

5061-3331), цитруллин и 6 аминокислот, входящих в дополнительный набор, с конечной концентрацией 250 пмоль/мкл. Смесь готовилась путем объединения двух стоковых растворов, следующим образом: к 100 мкл стандартной смеси (250 пмоль/л) добавляется 1 мкл смеси дополнительных аминокислот и смешивается в конической вставке для флаконов при помощи встряхивателя типа «Vortex». Полученный 24-компонентный стандартный раствор с конечной концентрацией 250 пмоль/л готов для нанесения.

Стандартный раствор 250 пмоль/л:

Из 1-мл ампулы стандартного раствора (250 пмоль/мкл) (PN 5061-3331) отбирают аликвоты по 100-мкл и помещают в конические вставки, сразу закрывают и хранят в холодильнике при 4 °С.

Дополнительный раствор аминокислот:

Взвешивают примерно 0,25 ммоль каждой из аминокислот (gln, asn, trp, pva, hyp, sar), входящих в состав дополнительного набора, (PN 5062-2478) и помещают в 20-мл флакон. Добавляют 5 мл деионизированной воды и обрабатывают ультразвуком на горячей водяной бане до растворения. Добавляют еще 5 мл деионизированной воды для полного растворения. Хранят в холодильнике (4 °С). Цитруллин (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) добавляют в эту смесь в той же концентрации.

Для хранения не объединяйте аминокислоты из дополнительного набора со стандартным раствором аминокислот. Некоторые из этих дополнительных аминокислот разрушаются в присутствии HCl (в особенности глутамин и, в меньшей степени, аспарагин).

Смесь аминокислот для количественного анализа

Для построения калибровочных кривых 17 аминокислот и 4 добавочные аминокислоты смешиваются в различных концентрациях с фиксированным количеством внутреннего стандарта. Внутренние стандарты (ISTD) (норвалин и саркосин) входят в состав дополнительного набора аминокислот (PN: 5062-2478). Остальные аминокислоты в составе этого набора (gln, asn, trp, hyp) являются собой дополнительными (extended amino acids, EAA). Для приготовления необходимых растворов для методов с низкой и высокой чувствительностью см. таблицы 3 и 4 соответственно

Стандарты аминокислот (10 пмоль/мкл до 1 нмоль/мкл):

Стандарты аминокислот с различной концентрацией (PN 5061-3330 до 5061-3334) разделяют на аликвоты по 100 мкл, помещают в конические вставки, помещают по флаконы, герметично закрывают и хранят при температуре 4 °С. Для построения калибровочных кривых можно использовать от 2 до 5 стандартов, в зависимости от целей эксперимента.

Маточный раствор дополнительных аминокислот (EAA):

Этот раствор готовится с использованием четырех из шести аминокислот, входящих в дополнительный набор аминокислот (PN: 5062-2478). Для применения со стандартом низкой чувствительности (таблица 3) готовят 25 мл раствора, содержащего 18 нмоль/мкл глутамина, аспарагина, триптофана и 4-гидроксипролина в деионизированной воде. Раствор обрабатывают ультразвуком до растворения. Хранят раствор при 4 °С. Для применения со стандартом для метода с высокой чувствительностью (таблица 4) готовят раствор с концентрацией 1,8 нмоль/мкл путем разведения 5 мл стандарта с концентрацией 18 нмоль/мкл в 45 мл деионизированной воды.

Маточный раствор для внутреннего стандарта:

Эти растворы готовятся с использованием двух из шести аминокислот, входящих в состав дополнительного набора аминокислот (PN: 5062-2478). Для использования со стандартом для метода с низкой чувствительностью (таблица 3) готовят 25 мл раствора, содержащего 10 нмоль/мкл норвалина и саркозина в деионизированной воде. Раствор обрабатывают ультразвуком до

растворения. Хранят в холодильнике при 4 °С. Для использования со стандартом для метода с высокой чувствительностью (таблица 4), готовят 1 нмоль/мкл раствор, разбавляя 5 мл стандартного раствора с концентрацией 10 нмоль/мкл в 45 мл деионизированной воды. Хранят в холодильнике (4 °С).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПОДДЕРЖКА ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

На Интернет-сайте фирмы Agilent www.chem.agilent.com/, в разделе Technical Support / User Contributed Software (Техническое Обеспечение / Пользовательское Обеспечение) можно получить файлы с методами для программного обеспечения «ChemStation» для всех типов колонок, документацию, а также примеры результатов анализа и макросы.

Таблица 3. Приготовление растворов стандартов аминокислот (низкая чувствительность).

	Конечная концентрация раствора аминокислот (пмоль/мкл)		
	900	225	90
Взять 5 мл раствора добавочных аминокислот (18 нмоль)	5 мл	5 мл	5 мл
Развести 0,1 н раствором HCl	–	15 мл	45 мл
Разведенная смесь добавочных аминокислот (АК)	5 мл	20 мл	50 мл
Взять 5 мл разведенной смеси добавочных АК	5 мл	5 мл	5 мл
Добавить раствор внутреннего стандарта (10 нмоль)	5 мл	5 мл	5 мл
Смесь добавочных АК и внутреннего стандарта	10 мл	10 мл	10 мл
Взять 100 мкл смеси добавочных АК и внутреннего стандарта	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Добавить смесь стандартных АК (1000 пмоль)	900 мкл	–	–
Добавить смесь стандартных АК (250 пмоль)	–	900 мкл	–
Добавить смесь стандартных АК (100 пмоль)	–	–	900 мкл
Конечный раствор аминокислот и внутреннего стандарта (500 пмоль/мкл ISTD)	1 мл	1 мл	1 мл

Таблица 4. Приготовление растворов стандартов аминокислот (высокая чувствительность).

	Конечная концентрация раствора аминокислот (пмоль/мкл)		
	90	22,5	9
Взять 5 мл раствора добавочных аминокислот (1,8 нмоль)	5 мл	5 мл	5 мл
Развести 0,1 н раствором HCl	–	15 мл	45 мл
Разведенная смесь добавочных аминокислот (АК)	5 мл	20 мл	50 мл
Взять 5 мл разведенной смеси добавочных АК	5 мл	5 мл	5 мл
Добавить раствор внутреннего стандарта (1 нмоль)	5 мл	5 мл	5 мл
Смесь добавочных АК и внутреннего стандарта	10 мл	10 мл	10 мл
Взять 100 мкл смеси добавочных АК и внутреннего стандарта	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Добавить смесь стандартных АК (100 пмоль)	900 мкл	–	–
Добавить смесь стандартных АК (25 пмоль)	–	900 мкл	–
Добавить смесь стандартных АК (10 пмоль)	–	–	900 мкл
Конечный раствор аминокислот и внутреннего стандарта (50 пмоль/мкл ISTD)	1 мл	1 мл	1 мл

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗОВ

Колонки Eclipse-AAA

Описание	Размер (мм)	Размер частиц (мкм)	Номер по каталогу
Стандартная чувствительность, высокое разрешение	4,6×150	5 мкм	993400-902
Высокая чувствительность при работе с FLD, высокое разрешение	4,6×150	3,5 мкм	963400-902
Стандартная чувствительность, уменьшенное время анализа	4,6×75	3,5 мкм	966400-902
Высокая чувствительность, высокое разрешение (DAD и FLD)	3,0×150	3,5 мкм	961400-302
Защитные предколонки (4 шт. в комплекте)	4,6×12,5	5 мкм	820950-931
Крепление для предколонки	-	-	820777-901

Дериватизационные реагенты

Описание	Номер по каталогу
Боратный буфер: 0,4М в воде, рН 10,2, 100 мл	5061-3339
Реагент FMOC, 2,5 мг/мл в ацетонитриле, 10 ампул по 1 мл	5061-3337
Реагент OPA, 10 мг/мл в 0,4М боратном буфере + 3-меркаптопропионовая кислота, 6 ампул по 1 мл	5061-3335
Реагент DTDPA для анализа цистеина, 5 г.	5062-2479

Виалы

Описание	Номер по каталогу
Конические вставки для виал объемом 100 мкл (100 шт. в комплекте)	5181-1270
Закручивающиеся виалы объемом 2 мл из затемненного стекла (100 шт. в комплекте)	5182-0716
Крышки для виал с прокладками PTFE/силикон (100 шт. в комплекте)	5182-0721

Стандарты

Описание	Номер по каталогу
Стандарты аминокислот в 0,1М HCl, 10 ампул по 1 мл	
1 нмоль/мл	5061-3330
250 пмоль/мл	5061-3331
100 пмоль/мл	5061-3332
25 пмоль/мл	5061-3333
10 пмоль/мл	5061-3334
Дополнительные аминокислоты:	
Nva, Sar, Asn, Gln, Trp, Nur, по 1 г. каждой	5062-2478

Перевод статьи Agilent Technologies (PN: 5980-1193EN)
«Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC
Analysis of Amino Acids»

Перевод на русский язык:
В. Панкратов
Д. Янович
Минск, 2006 г.