Быстрый, точный, чувствительный и воспроизводимый анализ аминокислот с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Анализ аминокислот с помощью колонки Zorbax Eclipse-AAA и высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1100

Джон У. Хендерсон, Роберт Д. Рикер, Бриан Э. Бидлингмеер и Клифф Вудворд III

Краткая аннотация

Рассмотрен совершенный способ количественного анализа аминокислот, отличающийся высокой скоростью, чувствительностью и надежностью метода получения производных и их анализа. Прикладная задача решена благодаря автоматизированному получению производных до разделения на колонке (с помощью ортофталевого альдегида [OPA] для первичных амино-групп и 9-флуоренилметилхлорформиата [FMOC] для вторичных амино-групп). Проведение реакций и надежный анализ обеспечивались высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1100. При пользовании этим прибором, весь процесс оказывался быстрым, точным, чувствительным и воспроизводимым.

Общее описание

Совместное использование ортофталевого альдегида (OPA) и 9-флуоренилметилхлорформиата (FMOC) дает возможность быстрого получения производных одного и того же образца аминокислот в ходе хроматографического анализа непосредственно перед нанесением на колонку. Реакционной смеси придаются буферные свойства (pH 10,2), что облегчает непосредственное получение производных аминокислот, входящих в состав образцов гидролизованных белков или пептидов. Сперва производят обработку аминокислот с первичными амино-группами, для чего пользуются ортофталевым альдегидом (OPA) с 3-меркаптопропионовой кислотой (3-MPA). Как известно, вторичные аминогруппы не вступают в реакцию с этими реактивами. Для преодоления этого затруднения, пользуются 9- флуоренилметилхлорформиатом (FMOC). Включение 3-меркаптопропионовой кислоты (3-MPA) в индолы снижает гидрофобность индолов, в результате чего производные ортофталевого альдегида (OPA) выходят из колонки перед производными 9- флуоренилметилхлорформиата (FMOC). Избыточные количества самого реактива (FMOC) и продукты его разрушения выходят из колонки за последней аминокислотой со вторичной амино-группой (т.е. не создают помех анализу).

Процесс получения производных быстр и легко автоматизируется с помощью автоматического пробоотборника Agilent 1313A. Из-за выигрышной быстроты реакции, обработка двумя реактивами дает необходимый результат при комнатной температуре. Автоматизированная процедура характеризуется высокой степенью воспроизводимости. При пользовании колонками с длиной 7,5 см, продолжительность цикла анализа (от введения образца до введения следующего) весьма мала: 14 минут (при затратах 10 минут непосредственно на разделение). Если использовать колонки, имеющие длину 15 см, полная продолжительность анализа составляет 24 мин (разделение обеспечивается за 16 минут). Оба подхода повышают производительность аналитического оборудования (его пропускную способность).

Варианты хроматографического разделения

Колонки Zorbax Eclipse-AAA заполнены сертифицированным сорбентом с обращенной фазой. При пользовании условиями, описанными в данном бюллетене, эти колонки дают возможность разделения аминокислот, обычно обнаруживаемых в гидролизатах белков и пептидов.

Составные компоненты подвижной фазы (компоненты A и B) приготовить не сложно; градиентное изменение состава подвижной фазы обеспечивается соответственно линейным сегментам (для уточнения подробностей, см. подраздел «Состав подвижной фазы» в разделе «Условия хроматографического разделения»). Столь упрощенный и надежный режим легко реализуется высокоэффективными жидкостными хроматографами Agilent 1100, оснащенными разными градиентными насосами (насосом, смешивающим 2 компонента подвижной фазы, или насосом, смешивающим 4 компонента подвижной фазы).

Показанная на рис. 1 хроматограмма иллюстрирует типичную чувствительность высокопроизводительных разделений, получаемых при работе с насосом, смешивающим 2 компонента подвижной фазы, и детектором с диодной матрицей (т.е. с помощью хроматографа серии 1100). На одиночный анализ расходуются 14 минут (включая период ожидания возврата к исходному составу подвижной фазы); при этом обеспечивается необходимая разрешающая способность. Условия разделений пояснены в разделе « Условия хроматографического разделения». Результат разделения аминокислот с первичными амино-группами (производных, полученных с помощью OPA) показан на рис. 1A (регистрация производилась на длине волны 338 нм); результат разделения аминокислот со вторичными амино-группами (производных, полученных с помощью FMOC) – на рис. 1B (регистрация производилась на длине волны 262 нм). Вводимое количество каждой аминокислоты равнялось 150 пкмолям в 0,5 мкл.

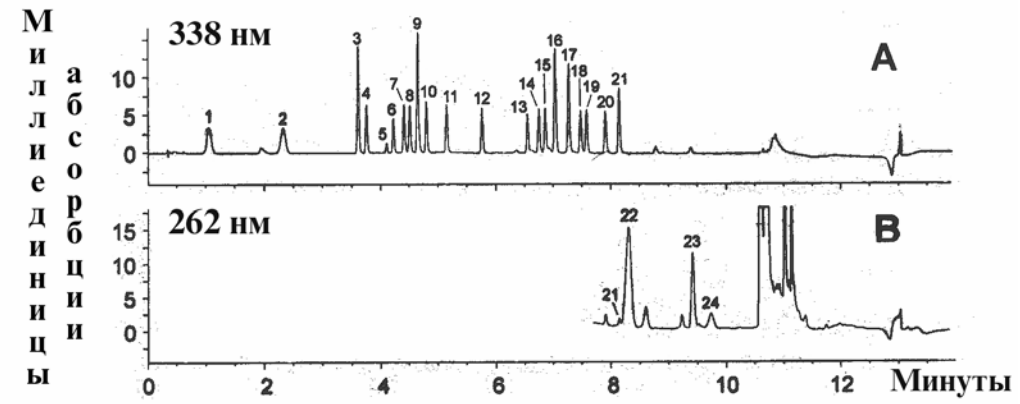


Рис. 1. Результаты рутинного анализа: высокопроизводительное разделение 24 аминокислот на колонке Zorbax Eclipse-AAA (4,6 x 75 мм; размер частиц 3,5 микрона). Для уточнения соответствия пиков, см. табл. 1. Обнаружение: A – на длине волны 338 нм (аминокислоты, прореагировавшие с OPA); B – на длине волны 262 нм (аминокислоты, прореагировавшие с FMOC).

Таблица 1. Порядок выхода аминокислот из колонки Zorbax Eclipse-AAA

Номер пика	Аминокислота	Обычно употребляемое английское сокращенное обозначение
1	Аспарагигновая кислота	ASP
2	Глутаминовая кислота	GLU
3	Аспарагин	ASN
4	Серин	SER
5	Глутамин	GLN
6	Гистидин	HIS
7	Глицин	GLY
8	Треонин	THR
9	Цитруллин	CIT
10	Аргинин	ARG
11	Аланин	ALA
12	Тирозин	TYR
13	Цистин	CYS
14	Валин	VAL
15	Метионин	MET
16	Норвалин	NVA
17	Триптофан	TRP
18	Фенилаланин	PHE
19	Изолйцин	ILE
20	Лейцин	LEU
21	Лизин	LYS
22	Окисипролин	HYP
23	Саркозин	SAR
24	Пролин	PRO

Если требуется получение более высокой разрешающей способности (по сравнению с характерной для высокопроизводительного разделения на колонке с длиной 7,5 см, показанного на рис. 1), следует воспользоваться колонкой, имеющей длину 15 см. На рис. 2 показаны типичные результаты разделения на двух различных колонках Zorbax Exlipse-AAA с длиной 15 см (одна колонка было заполнена частицами с размером 3,5 микрона, другая – частицами с размером 5 микрон). Оба результата характеризуются высокими чувствительностью и разрешающей способностью. Хроматограммы зарегистрированы на длине волны 338 нм (т.е. отображают разделение производных, полученных с помощью OPA). Результаты разделений очень похожи, но колонка с частицами 3,5 микрона дала более высокую разрешающую способность (т.е. более высокую эффективность). Давление на колонке с более мелким сорбентом (3,5 микрона) попадало в диапазон 240 – 300 бар; давление на колонке с более крупным сорбентом (5 микрон) – в диапазон 160 – 210 бар. Таким образом, если интересуют только аминокислоты с первичными амино-группами и приходится работать с колонками, имеющими длину 15 см, целесообразно пользоваться колонками с более крупными частицами сорбента (5 микрон).

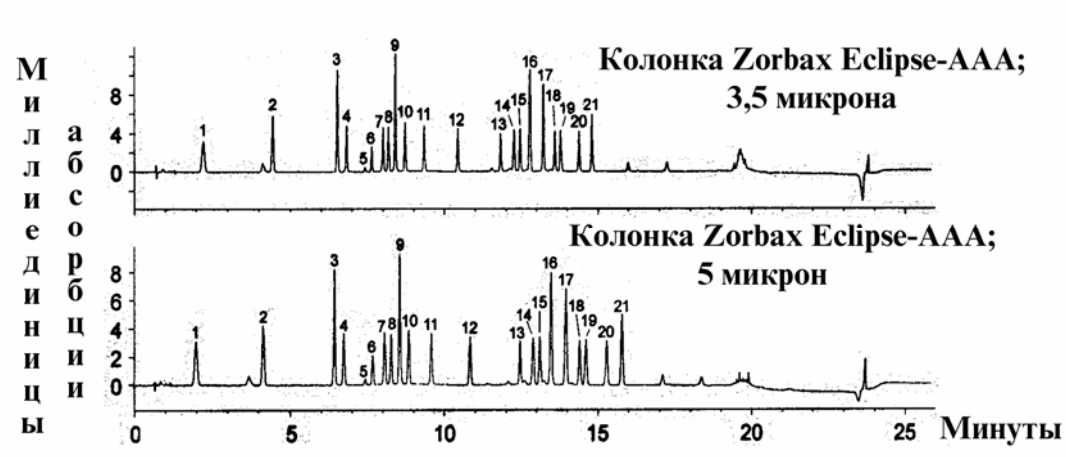


Рис. 2. Результаты анализа 21 аминокислоты, характеризующиеся высокой разрешающей способностью. Разделение выполнялось на колонках Zorbax Eclipse-AAA с размером частиц 5 микрон и 3,5 микрона. Габариты колонки: 4,6 x 150 мм. Для уточнения соответствия пиков, см. табл. 1. Регистрация на длине волны 338 нм (т.е. регистрация производных, полученных с помощью OPA).

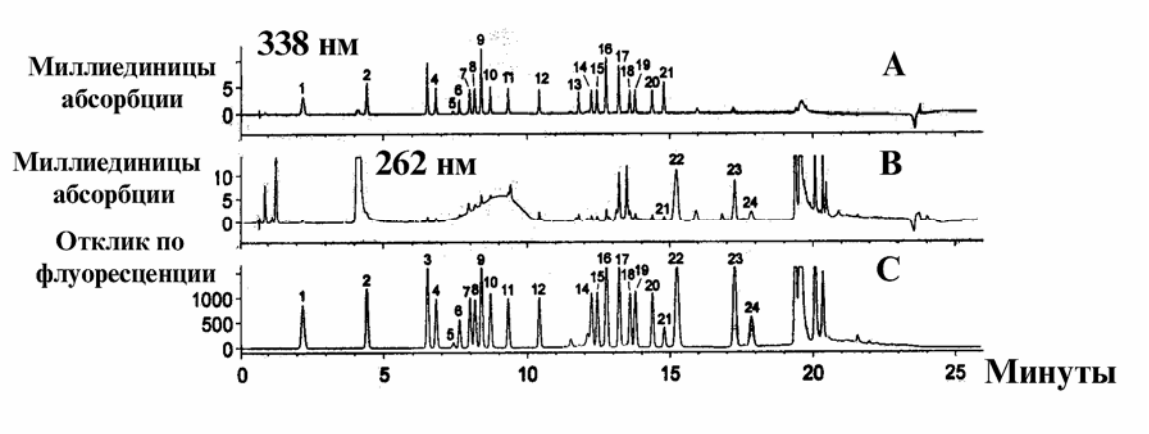
Выгодность 15-см колонок, заполненных частицами с размером 3,5 микрона (по сравнению с аналогичными колонками, заполненными частицами с размером 5 микрон) четко иллюстрируется сопоставлением рис. 3 с рис. 4. На рис. 3A показано разделение аминокислот с первичными амино-группами (регистрация производилась на длине волны 338 нм); на рис. 3B представлены результаты того же самого разделения, но при обнаружении на длине волны 262 нм; на рис. 3C показаны результаты этого же разделения, но при обнаружении по флуоресценции. Сопоставьте разделение пиков №21 (лизин) и № 22 (оксипролин) на рис. 3 и рис. 4. Повышение разрешающей способности за счет использования длинных колонок с более мелкими частицами (150 мм; 3,5 микрона) дает возможность получить более широкую вакантную зону между этими пиками (т.е. легче воспользоваться переключением длин волн при регистрации детектором с диодной матрицей или флуориметрическим детектором для более четкого выявления пиков №21 и №22).

При регистрации хроматограммы на длине волны 262 нм (рис. 3B), обнаруживается небольшой горб в зоне от 7 до 10 мин. Этот горб обуславливается выходом побочных продуктов реакции, используемой для получения производных. Поскольку регистрировались только аминокислоты с первичными амино-группами (т.е. те, которые обнаруживаются на длине волны 338 нм), этот горб не оказывает никакого влияния на обнаружение, ни на разрешающую способность (при переходе к длине волны 338 нм). Однако, регистрацию аминокислот со вторичными амино-группами (таких, как оксипролин) целесообразнее производить одновременно на двух длинах волн (или, когда 2-канальная регистрация не желательна, можно воспользоваться переключением длин волн).

При выборе моментов переключения (при регистрации флуориметрическим детектором или детектором с диодной матрицей), приходится учитывать небольшие смещения времен удерживания, обуславливаемые отклонениями температуры, состава подвижной фазы и т.д. Показанный на рис. 3C сигнал флуориметра первоначально соответствовал настройке на возбужденную длину волны 450 нм (возбуждающая длина волны 340 нм); после выхода пика №21 (лизин), но перед пиком №22 (оксипролин), обеспечивалось запрограммированное переключение длин волн (на возбужденную длину волны 305 нм и возбуждающую длину волны 266 нм). В данном случае, момент переключения приходился точно на время удерживания 15 мин. Для уточнения подробностей, см. подраздел «Параметры,

соответствующие обнаружению в разделе «Условия хроматографического разделения»). После выхода пика №24 (пролин), обеспечивалось градиентное изменение состава подвижной фазы до 100%B (ради вымывания из колонки побочных продуктов реакции). После выдержки в течение 3,7 мин при 100%B, состав подвижной фазы возвращался к исходному (для подготовки колонки к разделению очередного образца). Обратите внимание на то, что пик №13 флуориметрическим детектором не регистрируется (это вещество флуоресцировать не способно и при данных условиях не обнаруживается).

Рис. 3. Регистрация аминокислот, разделяемых на колонке Zorbax Eclipse-AAA (4,6 x 150 мм; размер частиц 3,5 микрона), при разных вариантах обнаружения. Анализ с высокой



чувствительностью и с высокой разрешающей способностью. Для уточнения соответствия пиков, см. табл. 1. Условия обнаружения: A – на длине волны 338 нм (аминокислоты, прореагировавшие с OPA); B – на длине волны 262 нм (аминокислоты, прореагировавшие с FMOC); C – регистрация флуориметрическим детектором (см. раздел «Условия хроматографического разделения»

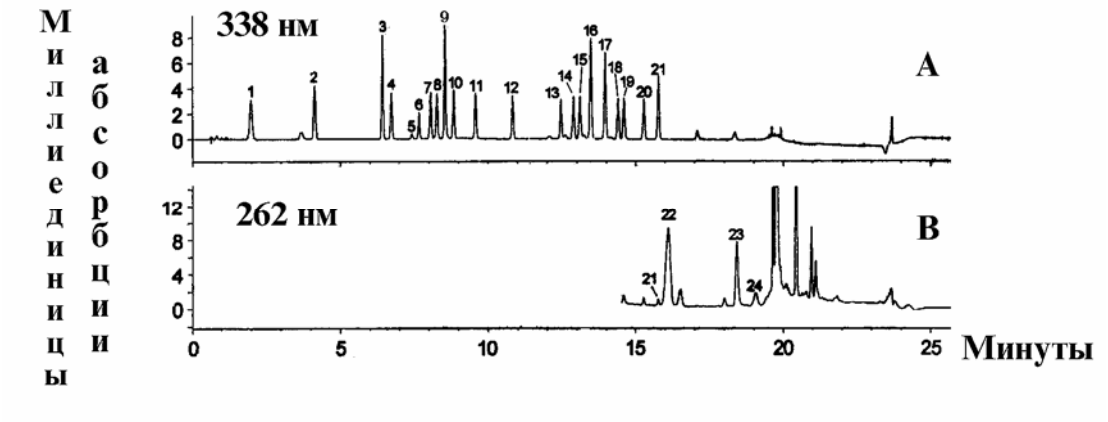


Рис. 4. Результаты рутинного анализа 24 аминокислот на колонке Zorbax Eclipse-AAA (4,6 x 150 мм; размер частиц 5 микрон). Анализ с высокой разрешающей способностью. Для уточнения соответствия пиков, см. табл. 1. Условия обнаружения: A – на длине волны 338 нм (аминокислоты, прореагировавшие с OPA); B – на длине волны 262 нм (аминокислоты, прореагировавшие с FMOC)

Разделение лизина и оксипролина; переключение длин волн

Необходимость анализа содержания лизина и оксипролина оказывает существенное влияние на выбор параметров, соответствующих обнаружению; на выбор колонки (помимо того, влияет и на продолжительность анализа). Аминокислоты, выходящие перед оксипролином (до лизина и включая лизин), реагируют с OPA и обнаруживаются на длине волны 338 нм. Оксипролин выходит сразу же за лизином и является первой из аминокислот, вступающих в реакцию с FMOC. Обнаружение оксипролина должно производиться на длине волны 262 нм. Простейшим решением этой задачи является постоянная регистрация на двух длинах волн (338 нм и 262 нм) с помощью детектора с диодной матрицей (DAD) или многоволнового детектора (MWD) серии Agilent 1100.

Если детектора с диодной матрицей или многоволнового детектора не имеется, возможна регистрация по 1 каналу с переключением длин волн при тщательно подобранных условиях регистрации аминокислот, прореагировавших с OPA и FMOC. Например, одноканальным сбором данных приходится пользоваться при наличии спектрофотометрического детектора (VWD) Agilent 1100 с изменяемой длиной волны. Улучшение разделения лизина и оксипролина возможно за счет усложнения профилей градиентного изменения состава подвижной фазы. Дополнительную информацию можно получить связавшись с фирмой Agilent Technologies (www.agilent.com/chem) и запросив техническую помощь (“Technical Support”), после чего обратившись к разделу “User Contributed Software” (программное обеспечение, составленное владельцами оборудования).

Если содержание оксипролина в образце не интересует (например, при анализе белковых гидролизатов), можно воспользоваться любой из рассматриваемых в настоящей статье колонок и переключение длин волн производить в зоне между пиком лизина и первой аминокислотой, прореагировавшей с FMOC (саркозин или пролин). При выполнении описанных здесь работ, достаточно хорошие данные были получены на колонке с габаритами 4,6 x 75 мм. Выгодным оказалось сокращение продолжительности анализа вдвое.

Сравнение с результатами пользования методом AMINOQUANT, реализуемым с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа HP 1090

На рис. 5A показана хроматограмма, полученная при работе на жидкостном хроматографе HP 1090 и при использовании метода AminoQuant (описанного в изданном фирмой «Хьюлетт-Паккард» бюллетене 5964-6257). Подвижная фаза, колонка и скорость протока были выбраны согласно методу AminoQuant. При таком разделении обнаруживаются пять критических пар: аспарагиновая и глутаминовая кислоты (Asp/Glu); гистидин/глицин (His/Gly); аланин/аргинин (Ala/Arg); валин/метионин (Val/Met) и фенилаланин/изолейцин (Phe/Ile). Пара «аспарагиновая и глутаминовая кислоты» (Asp/Glu) выходят почти в зоне, соответствующей мертвому объему колонки.

На рис. 5B показана хроматограмма, полученная на колонке Zorbax Eclipse-AAA. Разделение всех критических пар улучшено (особенно первой пары «аспарагиновая и глутаминовая кислоты» [Asp/Glu], которые оказались отодвинутыми от зоны мертвого объема колонки). Кроме того, обратите внимание на то, что на колонке Eclipse-AAA аргинин выходит до аланина (по сравнению с итогами пользования методом AminoQuant при работе на том же самом высокоэффективном жидкостном хроматографе HP 1090).

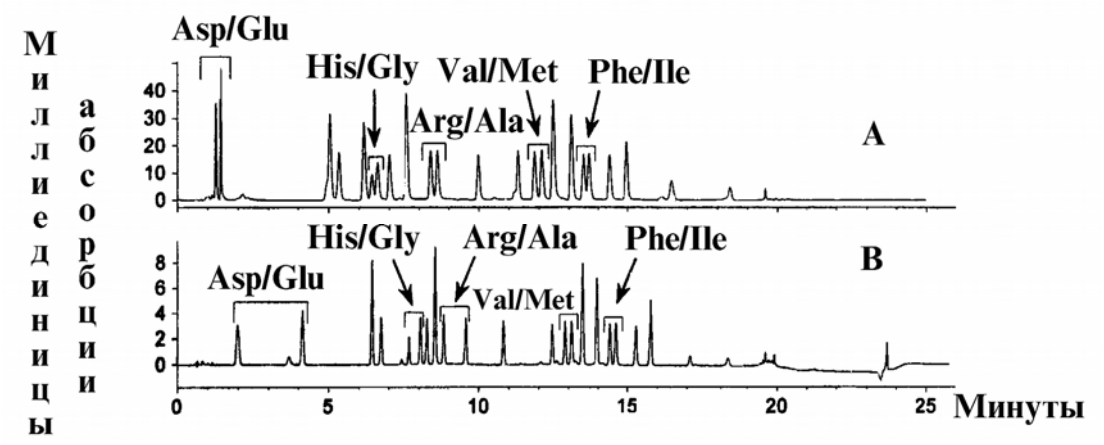


Рис. 5. Сопоставление результатов аминокислотного анализа: А – согласно методу AminoQuant при пользовании колонкой Hypersil AA и при работе на высокоэффективном жидкостном хроматографе HP 1090; В – при пользовании колонкой Zorbax Eclipse-AAA (4,6 x 150 мм; размер частиц 5 микрон) и при работе на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1100.

Воспроизводимость

В таблице 2, приведенной на следующей странице, показаны результаты многократного (6-кратного) анализа реакционной смеси аминокислот на колонке Zorbax Eclipse-AAA (4,6 X 150 мм; размер частиц 3,5 микрона). Каждому анализу предшествовало получение производных индивидуального образца, после чего выполнялось хроматографическое разделение. Усредненная воспроизводимость времен удерживания оказалась весьма хорошей (относительное стандартное отклонение = 0,18%). Усредненная воспроизводимость площадей пиков составляла (по относительному стандартному отклонению) 2,0%. Эти данные сопоставимы с сообщенными в опубликованном методе AminoQuant (полученными на высокоэффективном жидкостном хроматографе HP 1090): 0,23% и 2,3%, соответственно (журнал LC/GC International, том 5, № 2, февраль 1992 г., стр. 44 – 49).

Таблица 2. Воспроизводимость результатов анализа аминокислот на колонке Zorbax Eclipse-AAA (использовался хроматограф Agilent 1100 с градиентным насосом, смешивающим 4 компонента подвижной фазы). Данные подсчитаны по результатам 6 анализов.

Аминокислоты	**Относительное стандартное отклонение времен удерживания (%)**	**Относительное стандартное отклонение площадей пиков (%)**
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
CYS	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 значение	0,18	2,0

Линейность и чувствительность

При разделении стандартов аминокислот на колонке Exlipse-AAA (введении 0,5 мкл образца), была показана линейность в диапазоне от 4,5 пкмоль до 450 пкмоль. Рисунком 6 иллюстрируются калибровочные графики, полученные при обнаружении нескольких аминокислот детектором с диодной матрицей и флуориметрическим детектором. Величина коэффициента корреляции для всех 24 аминокислот попадала в диапазон от 0,99900 до 1,00000 (при работе с указанными выше двумя детекторами).

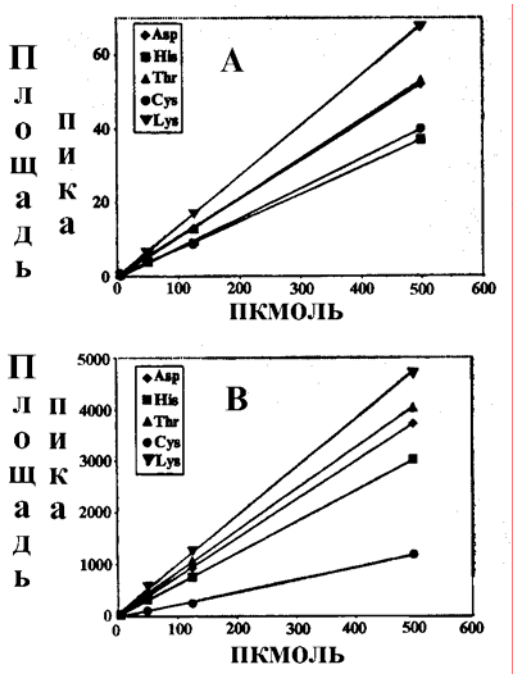


Рис. 6. Калибровочные графики , полученные для анализа производных аминокислот при обнаружении детектором с диодной матрицей (A) и флуориметрическим детектором (B). Линейность подтверждена в диапазоне концентраций от 4,5 до 450 пкмоль (при введении 0,5 мкл образца).

На рис. 7 и рис. 8 показано обнаружение производных аминокислот на двух низких уровнях концентрации (5 пкмоль и 50 пкмоль) детектором с диодной матрицей (рис. 7) и флуориметрическим детектором (рис. 8). При пользовании детектором с диодной матрицей, каждую аминокислоту можно обнаружить в смеси на уровне (приблизительно) 10 пкмоль. Флуориметрический детектор дает гораздо большую чувствительность (см. рис. 8, приведенный на следующей странице).

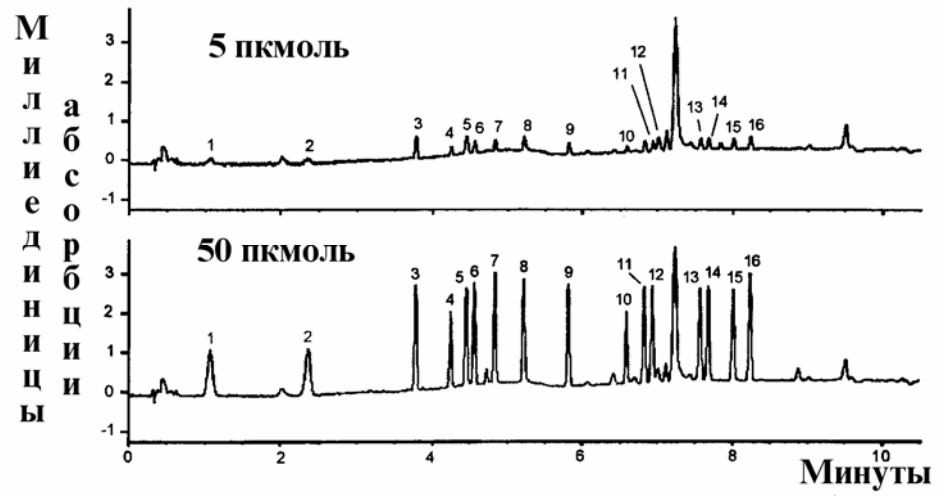


Рис. 7. Отклик детектора с диодной матрицей на различные концентрации аминокислот

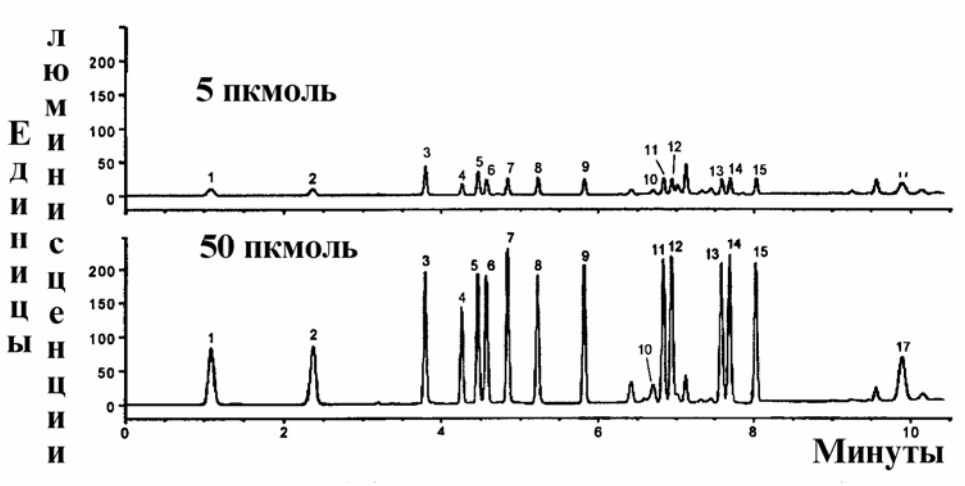


Рис. 8. Отклик флуориметрического детектора на различные концентрации аминокислот. Коэффициент умножения для фотоумножителя (PMT Gain) установлен равным 10.

Выводы

Аминокислотный анализ аминокислот, входящих в состав гидролизатов белков и пептидов, может выполняться за 10 минут при пользовании колонкой Zorbax Eclipse-AAA, высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1100 и реактивами OPA и FMOC для получения производных. Такой подход обеспечивает улучшенное разделение пяти критических пар аминокислот (по сравнению с результатами использования метода AminoQuant при работе на высокоэффективном жидкостном хроматографе HP 1090). Воспроизводимость анализа аминокислот на колонке Eclipse-AAA сопоставима с типичной для метода AminoQuant, а подготовка подвижной фазы проще, поскольку требуется лишь доводка pH буфера (компонента A подвижной фазы).

Выбор колонки зависит от желаемых скорости анализа и разрешающей способности:

Колонка ZORBAX Eclipse-AAA (4,6 x 75 мм; размер частиц 3,5 микрона) для обычной чувствительности и высокопроизводительных разделений при регистрации детектором с диодной матрицей.

Колонка ZORBAX Eclipse-AAA (4,6 x 150 мм; размер частиц 5 микрон) для обычной чувствительности и высокой разрешающей способности при низких давлениях и при регистрации детектором с диодной матрицей.

Колонка ZORBAX Eclipse-AAA (4,6 x 150 мм; размер частиц 3,5 микрона) для высоких чувствительности и разрешающей способности при регистрации флуориметрическим детектором.

Колонка ZORBAX Eclipse-AAA (3,0 x 150 мм; размер частиц 3,5 микрона) для высоких чувствительности и разрешающей способности при снижении расходов растворителей и образца (такие колонки поставляются начиная с осени 2000 г.).

Автоматический пробоотборник Agilent 1313A дает возможность автоматизировать получение производных непосредственно перед разделением на колонке; реакции быстры и воспроизводимы; вовлеченность оператора минимальна. Рассматриваемый в данной статье метод может использоваться для анализа аминокислот, имеющих и первичные, и вторичные

амино-группы. Результаты разделения можно регистрировать детектором с диодной матрицей на двух длинах волн (т.е. по двум каналам), или можно пользоваться запрограммированным переключением длин волн. Если необходима очень высокая чувствительность, требуется флуориметрический детектор.

Условия хроматографического разделения

Хроматограммы, показанные на рис. 1 – 8, были получены при следующих условиях:

Прибор

Рекомендуемая хроматографическая система**: высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1100**, в состав которого входят **градиентный насос G1312A (смешивающий 2 компонента подвижной фазы)**; детектор G1315A с диодной матрицей (оснащенный проточной кюветы с длиной оптического пути 6 или 10 мм) и (или) **флуориметрический детектор G1315A**. Несмотря на то, что приведенные в данной статье результаты были получены при пользовании градиентным насосом, смешивающим 2 компонента подвижной фазы, аналогичные результаты достижимы и при пользовании градиентным насосом G1311A, смешивающим 4 компонента подвижной фазы.

Колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии

ZORBAX Eclipse-AAA (4,6 x 75 мм; размер частиц 3,5 микрона);
каталожный № 966400-902

ZORBAX Eclipse-AAA (4,6 x 150 мм; размер частиц 3,5 микрона);
каталожный № 963400-902

ZORBAX Eclipse-AAA (4,6 x 150 мм; размер частиц 5 микрон);
каталожный № 993400-902

Может быть приобретена и предварительная колонка* ZORBAX Eclipse-AAA (4,6 x 12,5 мм; размер частиц 5 микрон); 4 шт. в одной упаковке;
каталожный № 820950-931

ZORBAX Eclipse-AAA (3,0 x 150 мм; размер частиц 3,5 микрона); эти колонки будут поставляться только с осени 2000 г.

*Предварительная (защитная) колонка устанавливается непосредственно перед аналитической колонкой с помощью соединителя, характеризующегося очень малым мертвым объемом.

Состав подвижная фазы

A: 40 мм раствор Na_2HPO_4; pH 7,8 [5,5 г однозамещенного NaH_2PO_4 на 1 литр воды; pH 7,8; доводка 10 н. раствором NaOH)

B: смесь ацетонитрила, метанола и воды (45:45:10 [соотношение объемов])

Целесообразно приготовление компонента А подвижной фазы как хранимого раствора с 10-кратным повышением концентрации соли и без доводки pH. Такой раствор может храниться в течение нескольких недель; по мере необходимости, его разбавляют и доводят pH до 7,8.

Все растворители, используемые для составления подвижной фазы, должны иметь специальную степень чистоты: для высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Указание параметров для насоса:

Скорость протока (Flow): 2 мл/мин

Время остановки (Stoptime): 14 мин (при пользовании колонкой, имеющей длину 75 см) или 26 мин (при пользовании колонкой, имеющей длину 150 мм)

Последующее время (Postime): не используется (off)

Дополнительные параметры для насоса:

Максимальный градиент скорости протока (Max. Flow ramp): 100 мл/мин^2

Сжимаемость компонента А (Compressibility): $50*10^{-6}$

Минимальный вытесняемый объем для компонента А (Minimal Stroke): 20 мкл

Сжимаемость компонента В (Compressibility): $115*10^{-6}$

Минимальный вытесняемый объем для компонента В (Minimal Stroke): установка автоматически (Auto)

Программа градиентного изменения состава подвижной фазы:

Для колонок, имеющих длину 75 мм:

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

Для колонок, имеющих длину 150 мм:

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

ПРИМЕЧАНИЕ: Для того, чтобы продлить срок службы колонки (если колонка не будет использоваться в течение ночи или в течение большего периода времени), промывайте колонку 10 объемами компонента В подвижной фазы.

Настройка детектора:

<u>Детектор с диодной матрицей (DAD)</u>:

Требуемые лампы (Required Lamps): дейтериевая (UV): да (yes)
лампа накаливания (Vis): нет (no)
338 нм; ширина полосы (bw) 10 нм; контрольная длина волны (reference): 390 нм; ширина полосы (bw) 20 нм (для аминокислот, вступивших в реакцию с OPA)

262 нм; ширина полосы (bw) 16 нм; контрольная длина волны (reference): 324 нм; ширина полосы (bw) 8 нм (для аминокислот, вступивших в реакцию с FMOC)

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

Щирина щели (Slit): 4 нм

<u>Флуориметрический детектор</u>:

Для работы с колонками, имеющими длину 75 мм:

Время (мин)	Возбуждающая/возбужденная длины волн (Ex/Em) [нм]	Коэффициент усиления фотоумножителя (PMT Gain)
0	340/450	10
8,5*	266/305	9

Для работы с колонками, имеющими длину 150 мм:

Время (мин)	Возбуждающая/возбужденная длины волн (Ex/Em) [нм]	Коэффициент усиления фотоумножителя (PMT Gain)
0	340/450	10
15*	266/305	9

*Специфичное время переключения длин волн флуориметрического детектора может отличаться, поскольку зависит от колебаний температуры, отклонений состава подвижной фазы и т.д.
Ширина пика (Peakwidth): > 0,5 мин

Автоматический пробоотборник:

Для ознакомления с выбором гнезд под флаконы, см. рис. 9.

Программа, составленная для автоматического пробоотборника:

Draw 2.5 µL from vial 1	(отбор 2,5 мкл из флакона 1 [боратный буфер])
Draw 0.5 µL from sample	(отбор 0,5 мкл образца [например, установите флакон с образцом аминокислот в гнездо 11])
Mix 3 µl “in air”, max speed, 2x	(перемешивать 3 мкл с иглой, поднятой в воздух, с максимальной скоростью, 2 раза)
Wait 0.5 min	(ожидание в течение 0,5 мин)
Draw 0 µl from vial 2	(отобрать 0 мкл из флакона 2; игла промывается водой, залитой во флакон, не закрытый крышкой)
Draw 0.5 µl from vial 3	(отобрать 0,5 мкл из флакона 3 [OPA])
Mix 3.5 µl “in air”, max speed, 6x	(перемешивать 3,5 мкл с иглой, поднятой в воздух, с максимальной скоростью, 6 раз)
Draw 0 µl from vial 2	(отобрать 0 мкл из флакона 2; игла промывается водой, залитой во флакон, не закрытый крышкой)
Draw 0.5 µl from vial 4	(отобрать 0,5 мкл из флакона 4 [FMOC])
Mix 4 µl “in air”, max speed, 6x	(перемешивать 4 мкл с иглой, поднятой в воздух, с максимальной скоростью, 6 раза)
Draw 0 µl from vial 6	**Дополнительная (не обязательная) промывка в случае работы с высокой чувствительностью** (отобрать 0 мкл из флакона 6; игла промывается ацетонитрилом)
Draw 32 µl from vial 5	(отобрать 32 мкл из флакона 5 [вода])
Mix 18 µl “in air”, max speed, 2x	(перемешивать 18 мкл с иглой, поднятой в воздух, с максимальной скоростью, 2 раза)
Inject	(введение)

Дополнительные параметры:

Скорость всасывания (Drawspeed): 200 мкл/мин
Скорость вытеснения (Ejectspeed): 600 мкл/мин
Расстояние иглы от дна флакона (Draw position): 0,0 мм

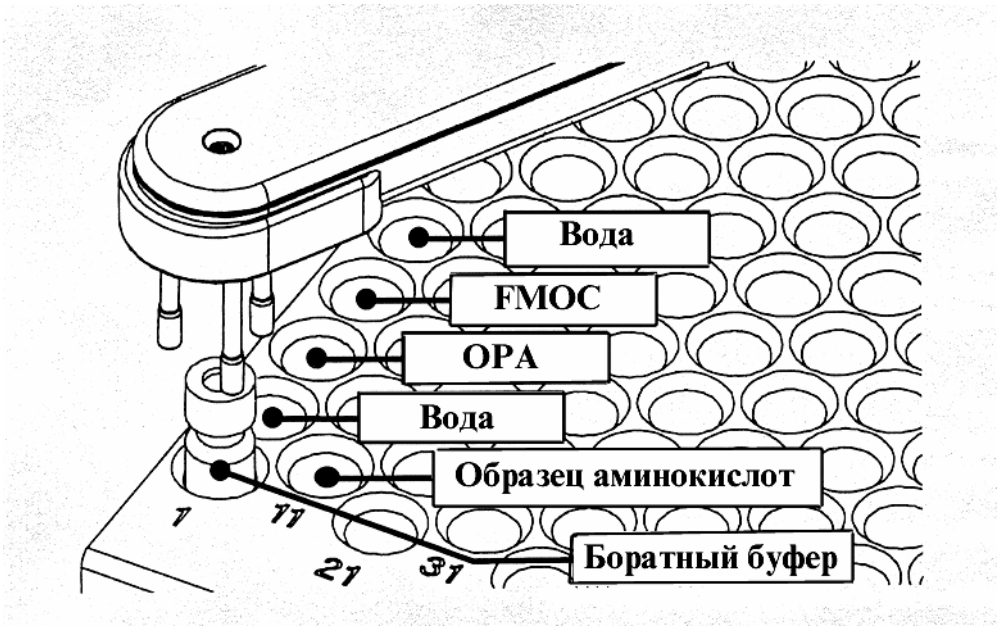


Рис. 9. Размещение флаконов с реактивами в автоматическом пробоотборнике Agilent 1313A. Такое расположение флаконов предусмотрено описанной программой, составленной для автоматического пробоотборника.

Флаконы:

Под реактивы OPA и FMOC требуются флаконы с конической вставкой (фиксируемой с помощью полимерных лапок) [см. рис. 10A]), поскольку приходится работать с очень малыми объемами. Такие вставки могут устанавливаться во флаконы под завинчивающуюся крышку (рис. 10B и рис. 10C), или во флаконы под обжимаемую крышку. Не следует пользоваться флаконами с защелкивающейся крышкой, поскольку необходимо воздухонепроницаемое уплотнение (реактив FMOC сильно летуч, а OPA постепенно разрушается в присутствии кислорода). Будьте внимательны и не пользуйтесь флаконами или крышками, предназначенными для работы с другими приборами (чтобы не повредить узлы автоматического пробоотборника Agilent G1313A).

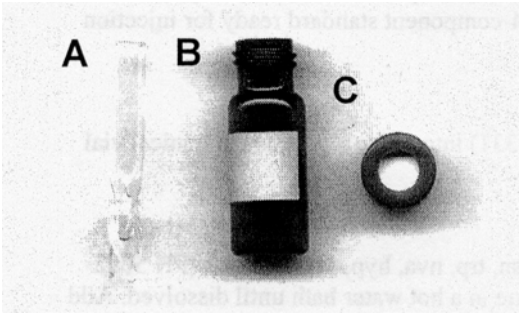


Рис. 10. Коническая вставка, флакон и крышка, используемые для аминокислотного анализа с помощью автоматического пробоотборника Agilent 1100. На фотографии показаны коническая вставка **A** (№ 5182-0721 по каталогу фирмы Agilent); флакон **B** из темного стекла (№ 5182-0716 по каталогу фирмы Agilent); завинчивающаяся крышка **C** (№ 5182-0721 каталогу фирмы Agilent).

Параметры для термостата:

Температура: 40°C (левой и правой половины термостата)

Разрешение анализа (Enable analysis): когда температура установится на заданный уровень с точностью +\-0,8°C

Реактивы, используемые для получения производных:

Боратный буфер: № 5061-3339 по каталогу фирмы Agilent (0,4 н. водный раствор; pH 10,2). Храните в холодильнике (4°C). По мере необходимости, отливайте нужное количество.

Реактив FMOC: № 5061-3337 по каталогу фирмы Agilent. Перенесите пипеткой аликвотные количества по 100 мкл реактива FMOC (из исходного количества 1 мл) в конические вставки флаконов автоматического пробоотборника. Флаконы с этими вставками сразу же закройте крышкой и храните в холодильнике (4°C). Разлитый таким образом реактив пригоден в течение периода, не превышающего 7 – 10 дней.

Реактив OPA: № 5061-3335 по каталогу фирмы Agilent. Перенесите пипеткой аликвотные количества по 100 мкл реактива OPA (из исходной ампулы на 1 мл) в конические вставки флаконов автоматического пробоотборника. Флаконы с этими вставками сразу же закройте крышкой и храните в холодильнике (4°C). Разлитый таким образом реактив пригоден в течение периода, не превышающего 7 – 10 дней.

Вода, деионизованная; степень чистоты: для высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для ознакомления с описаниями и уточнения каталожных номеров, см. приводимый далее раздел «Информация, необходимая для заказа».

Подготовка образцов

ПРИМЕЧАНИЕ: Ежедневно необходимо заменять флаконы с каждым реактивом. В каждой ампуле с 1 мл реактива содержится количество, достаточное (примерно) на 10 дней работы (1000 мкл/100 мкл = 10 дней).

Смесь стандартов аминокислот, используемая для проверки эффективности хроматографического разделения

Для хроматографического анализа, 17 аминокислот (из стандартной смеси, концентрация каждой из кислот в которой равна 250 пкмоль/мкл; каталожный № 5061-3331), цитруллин и 6 дополнительных аминокислот объединяют для получения концентрации каждой кислоты приблизительно равной 250 пкмоль/мкл. Такую смесь подготавливают благодаря объединению 2 хранимых растворов, описанных ниже. Внесите 1 мкл хранимого раствора с дополнительными аминокислотами в свежую аликвоту (100 мкл) смеси стандартов (характеризующейся концентраций 250 мкмоль/мкл). С помощью приспособления “vortex” перемешайте, чтобы получить готовую для введения смесь 24 стандартов (концентрация каждой аминокислоты в которой составляет около 250 пкмоль/мкл).

Смесь стандартов аминокислот с концентрацией 250 пкмоль/мкл:
Разлейте смесь аминокислот с концентрацией 250 пкмоль/мкл из ампулы на 1 мл (каталожный № 5061-3331) в конические вставки флаконов автоматического пробоотборника (в каждую вставку внесите по 100 мкл); флаконы со вставками закройте крышками и храните эти аликвотные количества в холодильнике при 4°C.

Хранимый раствор с дополнительными аминокислотами:
Навески по 0,25 мкмоль каждой дополнительной аминокислоты (глутамин, аспарагин, триптофан, норвалин, оксипролин, саркозин) из набора, имеющего каталожный № 5062-2478, перенесите в 20 мл флакон. Добавьте 5 мл деионизованной воды и поместите флакон в подогреваемую ультразвуковую баню, в которой перемешивайте до полного растворения. Добавьте еще 5 мл деионизованной воды и дождитесь полного смешивания. Приготовленный таким образом раствор храните в холодильнике при 4°C. Цитруллин (полученный от фирмы Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, США) добавляется в эту смесь в то же самой концентрации.

НЕ храните объединенный раствор дополнительных аминокислот со стандартной смесью аминокислот. Некоторые из этих дополнительных аминокислот способны разрушаться в HCl (особенно, глутамин; в меньшей степени – аспарагин).

Смеси аминокислот, используемые для получения калибровочных графиков

Для проведения калибровки, 17 аминокислот + 4 дополнительные аминокислоты объединяют в различных концентрациях с внутренними стандартами, добавляемое количество которых всегда одинаково. Внутренние стандарты (норвалин и саркозин) берутся из набора дополнительных аминокислот (каталожный № 5062-2478). Остальные аминокислоты из этого набора (глутамин, аспарагин, триптофан, оксипролин) являются дополнительно подмешиваемыми (как было описано выше). Приготовьте соответствующие калибровочные растворы, наводя справки в табл. 3 и табл. 4, в которых описаны составы калибровочных растворов, предназначенных для работы с низкой чувствительностью и с высокой чувствительностью.

Смеси стандартов аминокислот (от 10 пкмоль/мкл до 1 нмоль/мкл):
Разделите каждую 1 мл ампулу стандартов (каталожные №№ с 5061-3330 по 5061-3334) на аликвотные количества по 100 мкл, помещаемые в конические вставки флаконов автоматического пробоотборника (в каждую вставку внесите по 100 мкл); флаконы со вставками закройте крышками и храните эти аликвотные количества в холодильнике при 4°C. Калибровочные графики могут строиться по 2 – 5 уровням концентрации (в зависимости от требований, предъявляемых к анализу).

Хранимый раствор дополнительных аминокислот:
Этот раствор приготавливают из 4 аминокислот, поставляемых в виде набора 6 аминокислот (каталожный №5062-2478). Для приготовления раствора, используемого при работе с низкой чувствительностью (см. табл. 3), получите 25 мл раствора, содержащего глутамин, аспарагин, триптофан и 4-оксипролин (каждый в концентрации 18 нмоль/мкл) в деионизованной воде. Перемешивайте в ультразвуковой бане до полного растворения. Храните раствор в холодильнике при 4°C. Для приготовления раствора, используемого при работе с высокой чувствительностью (см. табл. 4), получите раствор с концентрацией 1,8

нмоль/мкл, для чего разведите 5 мл описанного выше раствора стандартов (с концентрацией 18 нмоль/мкл) в 45 мл деионизованной воды. Храните раствор в холодильнике при 4°С.

Хранимый раствор внутреннего стандарта:
Эти растворы приготавливаются благодаря использованию двух аминокислот из набора 6 дополнительных аминокислот (каталожный № 5062-2478). Для приготовления раствора, используемого при работе с низкой чувствительностью (см. табл. 3), получите 25 мл раствора, содержащего 10 нмоль/мкл норвалина и саркозина в деионизованной воде. Перемешивайте в ультразвуковой бане до полного растворения. Храните раствор в холодильнике при 4°С. Для приготовления раствора, используемого при работе с высокой чувствительностью (см. табл. 4), получите раствор с концентрацией 1 нмоль/мкл, для чего разведите 5 мл описанного выше раствора стандартов (с концентрацией 10 нмоль/мкл) в 45 мл деионизованной воды. Храните раствор в холодильнике при 4°С.

Таблица 3. Подготовка растворов стандартов аминокислот, используемых при работе с низкой чувствительностью. Получите три смеси стандартов благодаря смешиванию указанных объемов хранимых растворов.

	Концентрация окончательно приготовленных растворов аминокислот (пкмоль/мкл)		
	900	**225**	**90**
Отберите 5 мл хранимого раствора дополнительных аминокислот с концентрацией 18 нмоль/мкл	5 мл	5 мл	5 мл
Разбавьте 0,1 н. HCl	--	15 мл	45 мл
Разбавленный раствор смеси дополнительных аминокислот	**5 мл**	**20 мл**	**50 мл**
Отберите 5 мл разбавленного раствора смеси дополнительных аминокислот	5 мл	5 мл	5 мл
Добавьте растворы внутренних стандартов с концентрацией 10 нмоль/мкл	5 мл	5 мл	5 мл
Раствор смеси дополнительных аминокислот с внутренними стандартами	**10 мл**	**10 мл**	**10 мл**
Отберите 100 мкл раствора смеси дополнительных аминокислот с внутренними стандартами	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Добавьте раствор смеси стандартов аминокислот с концентрацией 1000 пкмоль/мкл	900 мкл	--	--
Добавьте раствор смеси стандартов аминокислот с концентрацией 250 пкмоль/мкл	--	900 мкл	--
Добавьте раствор смеси стандартов аминокислот с концентрацией 100 пкмоль/мкл	--	--	900 мкл
Окончательно приготовленный раствор стандартов аминокислот (с добавкой дополнительных аминокислот и внутренних стандартов, концентрация которых равна 500 пкмоль/мкл)	**1 мл**	**1 мл**	**1 мл**

Таблица 4. Подготовка растворов стандартов аминокислот, используемых при работе с высокой чувствительностью. Получите три смеси стандартов благодаря смешиванию указанных объемов хранимых растворов.

	Концентрация окончательно приготовленных растворов аминокислот (пкмоль/мкл)		
	90	**22,5**	**9**
Отберите 5 мл хранимого раствора дополнительных аминокислот с концентрацией 1,8 нмоль/мкл	5 мл	5 мл	5 мл
Разбавьте 0,1 н. HCl	--	15 мл	45 мл
Разбавленный раствор смеси дополнительных аминокислот	**5 мл**	**20 мл**	**50 мл**
Отберите 5 мл разбавленного раствора смеси дополнительных аминокислот	5 мл	5 мл	5 мл
Добавьте растворы внутренних стандартов с концентрацией 1 нмоль/мкл	5 мл	5 мл	5 мл
Раствор смеси дополнительных аминокислот с внутренними стандартами	**10 мл**	**10 мл**	**10 мл**
Отберите 100 мкл раствора смеси дополнительных аминокислот с внутренними стандартами	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Добавьте раствор смеси стандартов аминокислот с концентрацией 100 пкмоль/мкл	900 мкл	--	--
Добавьте раствор смеси стандартов аминокислот с концентрацией 25 пкмоль/мкл	--	900 мкл	--
Добавьте раствор смеси стандартов аминокислот с концентрацией 10 пкмоль/мкл	--	--	900 мкл
Окончательно приготовленный раствор стандартов аминокислот (с добавкой дополнительных аминокислот и внутренних стандартов, концентрация которых равна 50 пкмоль/мкл)	**1 мл**	**1 мл**	**1 мл**

Оказание дополнительной помощи

Вы можете получить составленные файлы методов для каждого типа колонок, подготовленную документацию, сообщения результатов анализа аминокислот, специально составленные макрокоманды (все это было подготовлено владельцами систем ChemStation, т.е. клиентами фирмы Agilent Technologies). Для этого, свяжитесь с фирмой Agilent Technologies (www.agilent.com/chem) и получите доступ к разделу «техническая помощь» (“Technical Support”); затем, обратитесь к разделу “User Contributed Software” (программное обеспечение, составленное владельцами оборудования) и загрузите в свою вычислительную машину все интересующее.

Информация, необходимая для заказа

Колонки ZORBAX Eclipse-AAA для высокоэффективной жидкостной хроматографии				
Описание	Габариты (мм)	Размер частиц (микроны)	Каталожный №	Цена
Для работы с обычной чувствительностью и высокой разрешающей способностью	4,6 x 150	5	993400-902	
Для работы с высокой чувствительностью и высокой разрешающей способностью при пользовании флуориметрическим детектором	4,6 x 150	3,5	963400-902	
Для работы с обычной чувствительностью и высокой производительностью	4,6 x 75	3,5	966400-902	
Для работы с высокой чувствительностью и высокой разрешающей способностью (при пользовании детектором с диодной матрицей или флуориметрическим детектором)	3,0 x 150	3,5	961400-302	
Предварительные колонки (в 1 упаковке 4 шт.)	4,6 x 12,5	5	820950-931	
Комплект деталей для предварительных колонок			820777-901	

Реактивы для получения производных		
Описание	Каталожный №	Цена
Боратный буфер; 0,4 м водный раствор; pH 10,2; 100 мл	5061-3339	
Реактив FMOC; 2,5 мг/мл в ацетонитриле; 1 мл	5061-3337	
Реактив OPA; 10 мг/мл в 0,4 м боратном буфере и 3-меркаптопропионовой кислоте; 6 ампул по 1 мл	5061-3335	
Реактив DTDPA для анализа цистеина, 5 г	5062-2479	

Флаконы		
Описание	Каталожный №	Цена
Коническая вставка на 100 мкл, фиксируемая во флаконе полимерной лапкой (в 1 упаковке 100 шт.)	5181-1270	
Флакон на 2 мл, из темного стекла, под завинчивающиеся крышки; имеет специальную площадку для маркировочных надписей (в 1 упаковке 100 шт.)	5182-0716	
Зеленая завинчивающаяся крышка; покрытая тефлоном прокладка из силиконового каучука (в 1 упаковке 100 шт.)	5182-0721	

Стандарты		
Описание	Каталожный №	Цена
Стандарты аминокислот в 0,1 м HCl; 10 ампул по 1 мл		
1 нмоль/мкл	5061-3330	
250 пкмоль/мкл	5061-3331	
100 пкмоль/мкл	5061-3332	
25 пкмоль/мкл	5061-3333	
10 пкмоль/мкл	5061-3334	
Набор дополнительных аминокислот (норвалин, саркозин, аспарагин, глутамин, триптофан и оксипролин); по 1 г. каждой аминокислоты	5062-2478	

Оказание дополнительной помощи
Описание
Составленные файлы методов для каждого типа колонок, подготовленная документация, сообщения результатов анализа аминокислот, специально составленные макрокоманды (все это было подготовлено владельцами систем ChemStation, т.е. клиентами фирмы Agilent Technologies). Свяжитесь с фирмой Agilent Technologies (www.agilent.com/chem) и получите доступ к разделу «техническая помощь» (“Technical Support”); затем, обратитесь к разделу “User Contributed Software” (программное обеспечение, составленное владельцами оборудования) и загрузите в свою вычислительную машину все интересующее.

Для получения самой последней информации и помощи от фирмы Agilent Technologies, посетите сайт http://www.Agilent.com/chem

Авторские права на данную публикацию зарегистрированы фирмой Agilent Technologies в 2000 г. Запрещены перепечатка, копирование, редактирование или перевод (если такие действия не оформлены в соответствии с Законом об охране авторских прав).

Регистрационный номер публикации: 5980-1193