ЭКОНОВА
ECONOVA

ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова"
630090, Новосибирск, ул. Николаева, 8
тел.: 8(383) 330-95-57, факс: 8(383) 330-83-21
эл.почта: info@econova.nsk.su http://www.econova.ru

Г.И.Барам

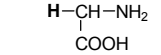
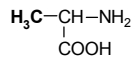
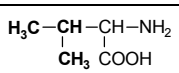
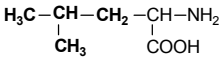
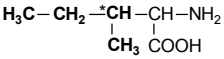
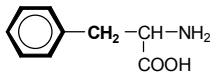
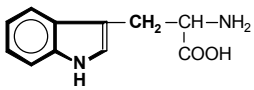
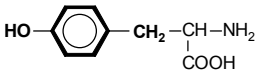
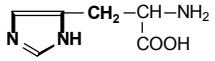
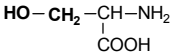
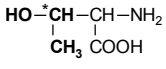
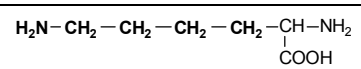
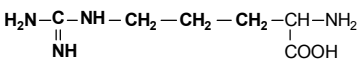
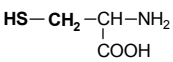
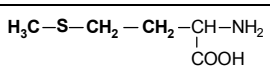
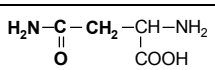
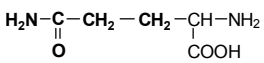
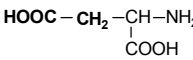
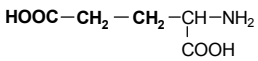
Хроматограф "Милихром А-02". Определение аминокислот в виде тиокарбомаильных производных

Иркутск - 1998

МЕТОДИКА

ВЭЖХ-определения аминокислот в автолизате дрожжей в виде фенилтиокарбамаильных производных

ТАБЛИЦА 1. Аминокислоты и их свойства

НАЗВАНИЕ	КОДЫ	M	СТРУКТУРНАЯ ФОРМУЛА	pK_a		
				-COOH	$-NH_2$	-**R**
Глицин	**G** Гли/Gly	75.1		2.35	9.78	
Аланин	**A** Ала/Ala	89.1		2.35	2.87	
Валин	**V** Вал/Val	117.1		2.29	9.74	
Лейцин	**L** Лей/Leu	131.2		2.33	9.74	
Изолейцин	**I** Илей/Ile	131.2		2.33	9.76	
Фенил-аланин	**F** Фен/Phe	165.2		2.20	9.41	
Триптофан	**W** Три/Trp	204.2		2.46	9.41	
Тирозин	**Y** Тир/Tyr	181.2		2.20	9.21	10.46
Гистидин	**H** Гис/His	155.2		1.80	9.33	6.04
Серин	**S** Сер/Ser	105.1		2.19	9.21	
Треонин	**T** Тре/Thr	119.1		2.09	9.10	
Лизин	**K** Лиз/Lys	146.2		2.16	9.06	10.54
Аргинин	**R** Арг/Arg	174.2		2.14	8.72	>13
Цистеин	**C** Цис/Cys	121.2		1.92	10.70	8.37
Метионин	**M** Мет/Met	149.2		2.13	9.28	
Аспарагин	**N** Асн/Asn	132.1		2.14	8.72	
Глутамин	**Q** Глн/Gln	146.2		2.17	9.13	
Аспарагиновая кислота	**D** Асп/Asp	133.1		1.99	9.90	3.36
Глутаминовая кислота	**E** Глу/Glu	147.1		2.10	9.47	4.07

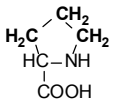
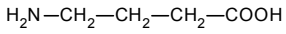
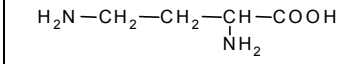
Пролин	**P** Про/Pro	115.1		1.95	10.64	
γ-Амино-масляная кислота	**GABA** **ГАМК**	103.1				
Орнитин	**O** Орн/Orn	132.1				

ТАБЛИЦА 2. Аминокислоты для приготовления контрольных растворов

№	Аминокислота	Код	Молек. масса	0.25 ммоль, мг	"Одесса" г/л	Фирма
1.	Аланин	**Ала**	89.1	22.28	0.223	Реахим
2.	γ-Аминомасляная к-та	**ГАМК**	103.1	25.78	0.258	Reanal
3.	Аргинин*HCl Аргинин	**Арг**	210.7 174.2	52.68 -	- 0.360	Serva, AS-10
4.	Аспарагиновая к-та	**Асп**	133.1	33.28	0.333	Serva, AS-10
5.	Валин	**Вал**	117.2	29.30	0.293	Serva, AS-10
6.	Гистидин*HCl Гистидин	**Гис**	209.6 173.1	52.40 -	- 0.358	Serva, AS-10
7.	Глицин	**Гли**	75.1	18.78	0.188	Serva, AS-10
8.	Глутаминовая к-та	**Глу**	147.1	36.78	0.368	Serva, AS-10
9.	Изолейцин	**Иле**	131.2	32.80	0.328	Serva, AS-10
10.	Лейцин	**Лей**	131.2	32.80	0.328	Serva, AS-10
11.	Лизин*HCl Лизин	**Лиз**	182.7 146.1	45.68 -	- 0.293	Serva, AS-10
12.	Метионин	**Мет**	149.2	37.30	0.373	Serva, AS-10
13.	Орнитин*HCl Орнитин	**Орн**	168.6 132.0	42.15 -	- 0.258	Реахим
14.	Пролин	**Про**	115.1	28.77	0.288	Serva, AS-10
15.	Серин	**Сер**	105.1	26.28	0.263	Serva, AS-10
16.	Тирозин	**Тир**	181.2	45.30	0.453	Serva, AS-10
17.	Треонин	**Тре**	119.1	29.78	0.298	Serva, AS-10
18.	Триптофан	**Трп**	204.2	51.05	0.511	Serva, AS-10
19.	Фенилаланин	**Фен**	165.2	41.30	0.413	Реахим

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

1.1.Контрольные растворы аминокислот

1.1.1. Растворы индивидуальных аминокислот (C=50 мкмоль/мл). Навески аминокислот (по ≈250 мкмоль; см. Табл. 2), растворяли в 0.1 *N* HCl. Точный объем кислоты (мл) вычисляли как

$$V = 5 \cdot [навеска, мг] / [вес\, 0.25\, ммоль, мг]$$

Раствор тирозина, который плохо растворим, готовили с концентрацией 2.5 мкмоля/мл.

1.1.2. Раствор суммы аминокислот "Одесса" (по 2.5 мкмоль/мл). Смешивали по 200 мкл растворов 18 индивидуальных аминокислот (кроме тирозина) с C=50 мкмоль/мл и добавляли 400 мкл 0.1 *N* HCl. В полученном растворе растворяли 1.81 мг тирозина.

1.2. Растворы для дериватизации аминокислот

1.2.1. Раствор "Р". 5 мл ацетонитрила смешать с 2 мл триэтиламина и с 3 мл дистилированной воды. Все компоненты не должны содержать примеси первичных и вторичных аминов и аммиака. С этой целью рекомендуется применять:

- ацетонитрил квалификации "Для ВЭЖХ", сорт 0, 1 или 2 ("Криохром", С.-Петербург);
- триэтиламин, перегнанный после кипячения с нингидрином, *пара*-толуолсульфохлоридом, фенилизотиоцианатом или другими веществами, реагирующими с первичными и вторичными аминами;
- воду, перегнанную после добавления в нее серной кислоты до концентрации 0.1-1 М.

1.2.2. Раствор "С". 1 мл ацетонитрила смешать с 9 мл элюента "А".

1.3. Растворы для хроматографии (элюенты)

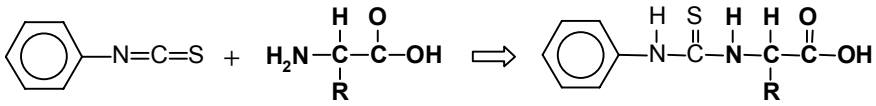
1.3.1. Раствор "N1". 77.08 г ацетата аммония растворить в стакане в 750-800 мл воды, довести значение pH раствора до 5.25 добавлением концентрированной *орто*-фосфорной кислоты, перенести раствор в мерную колбу на 1 л и довести объем до метки водой. Полученный 1.0 М раствор ацетата аммония фильтровать через фильтр 0.45 мкм и хранить при 5°С.

1.3.2. Раствор "N2". 154.16 г ацетата аммония растворить в стакане в 750-800 мл воды, довести значение pH раствора до 6.50 добавлением концентрированной *орто*-фосфорной кислоты, перенести раствор в мерную колбу на 1 л и довести объем до метки водой. Полученный 2.0 М раствор ацетата аммония фильтровать через фильтр 0.45 мкм и хранить при 5°С.

1.3.3. Элюент "А". В мерную колбу на 1 л поместить 50 мл раствора "N1" и довести объем до метки водой.

1.3.4. Элюент "Б". В мерную колбу на 1 л поместить 50 мл раствора "N2", 350 мл ацетонитрила и довести объем до метки водой.

1.4. Получение фенилтиокарбамаилов аминокислот (ФТК-АК)



ФИТЦ **Аминокислота** **ФТК-АК**

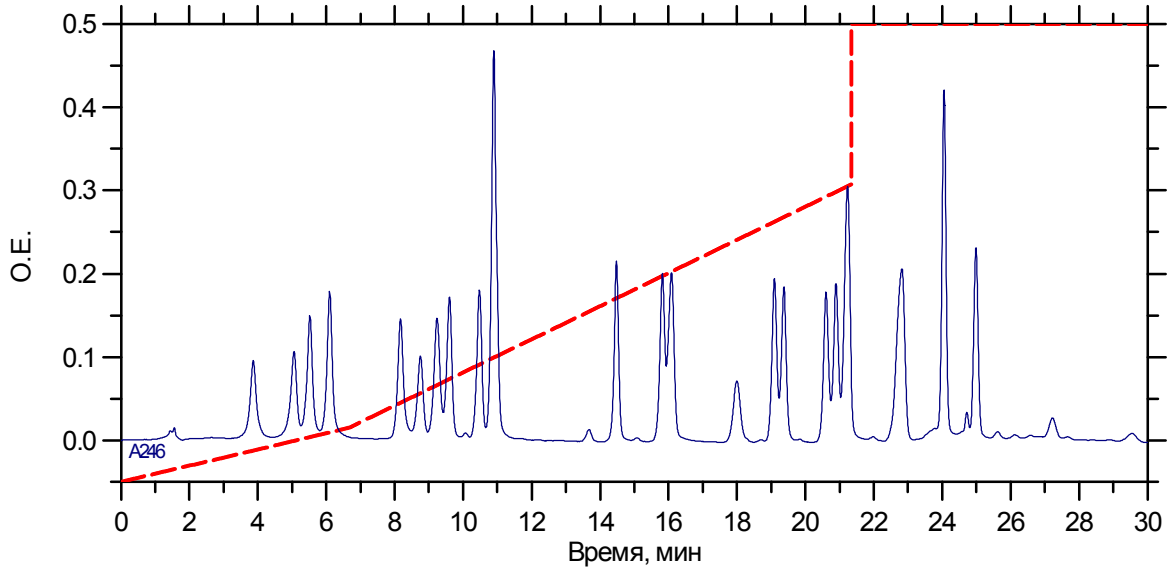
10 мкл раствора "Одесса" поместить в полипропиленовую пробирку на 1.5 мл и высушить досуха током инертного газа (He, Ar, N_2) при 30-50°С (водяная баня). Добавить в пробирку 20 мкл раствора "Р" и опять высушить досуха. Добавить20 мкл раствора "Р", 2 мкл фенилизотиоцианата (ФИТЦа), перемешать и выдержать 20-30 мин при комнатной температуре. Пробирку центрифугировать (1 мин, 5000-10000 g) и удалить растворитель током инертного газа. Для удаления остатка ФИТЦа пробирку выдержать 10-15 мин в вакууме (Р=0.005-0.01 мм рт.ст.) до отсутствия характерного запаха. При необходимости пробирку можно подогреть до 30-40°С.

Остаток растворить в 125 мкл раствора "С" и хроматографировать. Концентрация ФТК-АК 0.2 нмоль/мкл.

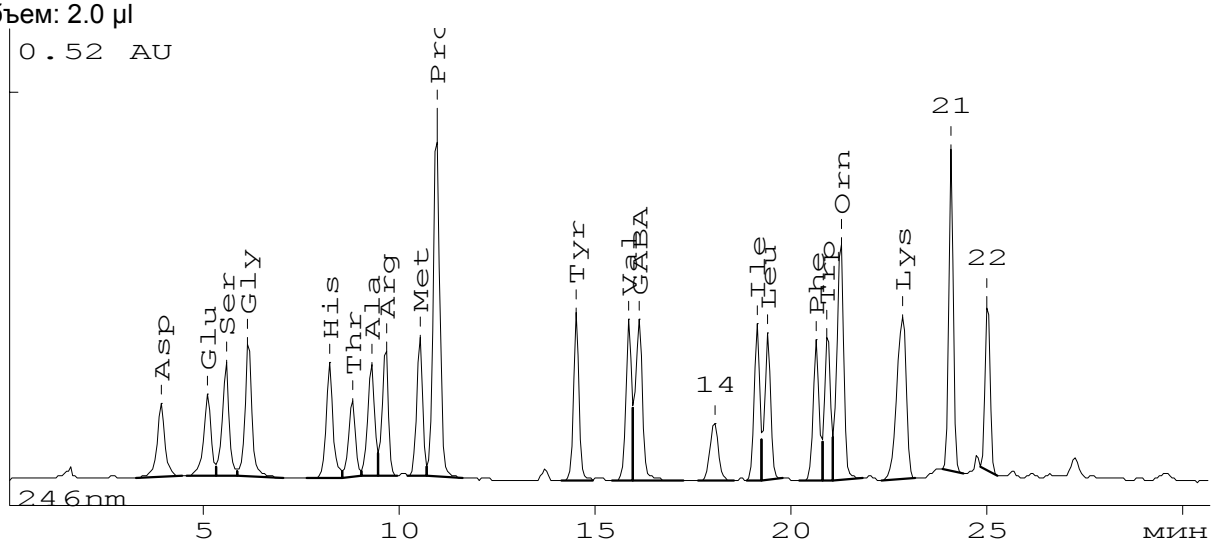
1.5. Разделение ФТК-аминокислот

Разделение ФТК-АК проводят в следующих условиях:

Колонка: 2x75 мм Nucleosil 100-5 C18 AAA-XXX.
Элюент А: [1 M CH_3COONH_4 + H_3PO_4, pH 5.25]:H_2O=5:95
Элюент Б: [1 M CH_3COONH_4 + H_3PO_4, pH 6.50]:CH_3CN:H_2O=5:35:60
Градиент: Рег. 600 мкл 0%Б; 1000 мкл 12%Б, 2200 мкл до 65%Б, 0 мкл до 100%Б, 1400 мкл 100%Б.
Скорость потока: 150 мкл/мин.
Температура: 60°C.
Детектор: 246 и 260 нм; t=0.34 сек; однолучевой режим.
Объем образца: 2 мкл (по 0.2 нмоль/мкл ФТК-АК)



Дата: 30/11/1998 05:55:43
Дата запуска: 13/11/1998 07:06:12
Файл: sum-aaa0.chw Дата записи: 13/11/1998 08:41:58
Метод: odessa_z.mtw Дата записи: 30/11/1998 05:55:30
ПРОБА: Смесь АК "Одесса" (по 0.2 нмоль/мкл)
Объем: 2.0 µl



Разведение: 1.00
КОЛОНКА: Nucleosil-100 5-C18
Размер: 2.0x 75 mm
Номер: AAA-004
Метод расчета: Заказной
Стандарт: Нет
Канал: 246nm

No	Удерж. мкл	Ширина мкл	Площадь AU*мкл	Конц. мкмоль/мл	260nm	Название
1	579.70	28.464	3.247	0.200	0.760	Asp
2	758.52	27.533	3.449	0.200	0.778	Glu
3	828.12	24.464	4.497	0.200	0.761	Ser
4	914.79	23.643	5.272	0.200	0.772	Gly
5	1225.04	25.456	4.393	0.200	0.811	His
6	1311.96	26.947	2.997	0.200	0.769	Thr
7	1384.79	28.216	4.492	0.200	0.792	Ala
8	1439.76	23.971	4.530	0.200	0.792	Arg
9	1571.15	23.837	4.679	0.200	0.702	Met
10	1633.49	24.115	12.740	0.200	0.572	Pro
11	2170.86	20.562	5.019	0.200	0.843	Tyr
12	2371.79	24.999	5.183	0.200	0.804	Val
13	2411.97	30.621	6.417	0.200	0.806	GABA
14	2863.04	23.012	4.891	0.200	0.842	Ile
15	2904.32	23.750	4.747	0.200	0.829	Leu
16	3089.19	23.775	4.659	0.200	0.875	Phe
17	3133.09	24.275	5.037	0.200	1.037	Trp
18	3183.23	27.861	9.187	0.200	0.811	Orn
19	3421.31	40.315	8.715	0.199	0.819	Lys

Число каналов: 2
Продолжительность анализа: 30.65мин
Число точек (Метод): 4979
Число точек (Анализ): 4979
Фильтрация выбросов: Да

ИНТЕГРИРОВАНИЕ
Канал: 246nm
Задержка: 3.00
Ширина: 15.00
Уширение: 1.00
Порог: 5.00
Асимметрия: 1.50
Мин.Площадь:0.00
Мин.Высота: 0.03
Наездник: 0.00

КАЛИБРОВКА
Канал: 246nm
Метод: Абс.градуировка
База: Площадь
Стандарт: Нет

6.

КОМПОНЕНТЫ

No	Удерж.	Окно%	Название
1	579.70	10.0	Asp
2	758.52	10.0	Glu
3	828.12	10.0	Ser
4	914.79	10.0	Gly
5	1225.04	10.0	His
6	1311.96	10.0	Thr
7	1384.79	10.0	Ala
8	1439.76	10.0	Arg
9	1571.15	10.0	Met
10	1633.49	10.0	Pro
11	2170.86	10.0	Tyr
12	2371.79	10.0	Val
13	2411.97	10.0	GABA
14	2863.04	10.0	Ile
15	2904.32	10.0	Leu
16	3089.19	10.0	Phe
17	3133.10	10.0	Trp
18	3183.23	10.0	Orn
19	3421.30	10.0	Lys

Литература

[1] Heinrikson R.L., Meredith S.G. Amino Acids Analysis by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization With Phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry,* **136** (1984) pp.65-74.

[2] Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J.Chromatogr.,* **336** (1984) 93-104.

[3] Yang C.-Y., Sepulveda F.I. Separation of phenylthiocarbamyl amino acids by high-performance liquid chromatography on Spherisirb octadecylsilan columns. *J.Chromatogr.,* **346** (1985) 413-416.

[4] Scholze H. Determination of phenylthiocarbamyl amino acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.,* **350** (1985) 453-460.

[5] Ebert R.F. Amino acids analysis by HPLC: optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbamyl derivatives. *Analytical Biochemistry,* **154** (1986) 431-435.

[6] O'Hare M.M.T., Tortova O., Gether U., Nielsen H.V., Schwartz T.W. High-performance liquid chromatography of phenylthiocarbamyl derivatives of amino acids and side-chain derivatived amino acids. *J.Chromatogr.,* **389** (1987) 379-388.

[7] Tedesco J.L., Schafer R. Increasing yield of the phenylthiocarbamyl-amino acids tyrosine, cycteine and phenylalanine using diethylether-based liquid-liquid extraction. *J.Chromatogr.,* **403** (1987) 299-306.

[8] Gimenez-Gallego G., Thomas K.A. High-performance liquid chromatography of phenylthiocarbamyl-amino acids. Application to carboxyl-terminal sequencing of proteins. *J.Chromatogr.,* **409** (1987) 299-304.

Заведующий лабораторией
жидкостной хроматографии
Лимнологического института
Сибирского отделения РАН,
д.х.н. Г.И.Барам

25 октября 1998 г.

ДОПОЛНЕНИЕ К МЕТОДИКЕ.

ОЧИСТКА ТРИЭТИЛАМИНА

30 мл перегнанного ТЭА поместил в колбу на 100 мл, добавил 0.3 мл ФИТЦа, перемешал, выдержал 1 час при комнатной температуре и перегнал. $T_{кип(лит)}$=89.5^{o}C.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ АВТОЛИЗАТА ДРОЖЖЕЙ.

Фильтрование:

1. Растворы 1 и 2 фильтровал через (GF/C+HA 0.45 мкм).

Твердо-фазная экстракция:

2. Колонку “Octadecyl-spe 7020-03” (Baker”) промыл 3 мл ацетонитрила и 2 мл 20% водного ацетонитрила.
3. Ввел в колонку 200 мкл раствора образца и элюировал аминокислоты 2 мл 20% водного ацетонитрила.
4. 20 мкл раствора помещал в пробирку и упаривал досуха.
5. Далее по п 1.4. Методики.

6. По 100 мг образцов 3, 4 и 5 растворял в 20 воды и далее по пп. 1-3.
7. 20 мкл раствора помещал в пробирку и упаривал досуха.
8. Далее по п 1.4. Методики.

9. По 100 мг образцов 15 и 16 растворял в 20 мл воды, фильтровал через 0.45 мкм.
10. По 10 мкл раствора помещал в пробирку и упаривал досуха.
11. Далее по п.1.4.

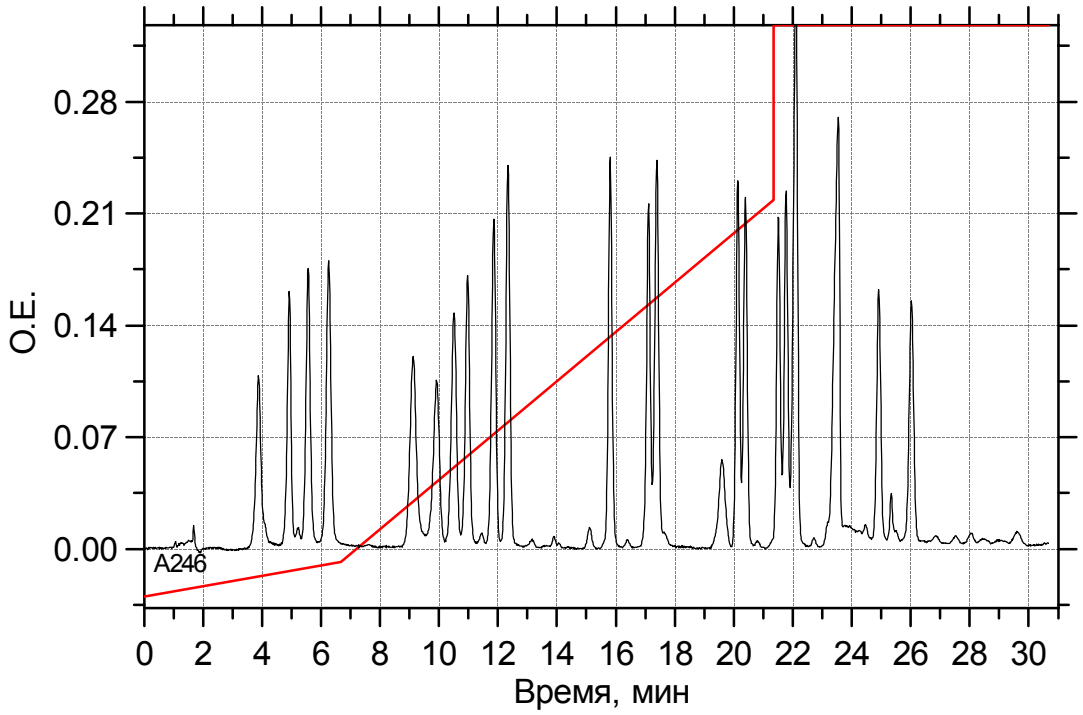
12. Растворы 176 и 178 центрифугировал (5 мин, 10000 g).
13. По 10 мкл раствора помещал в пробирку и упаривал досуха.
14. Далее по п.1.4.

Для улучшения разделения пиков форма градиента изменена (см. Приложение 1).
Калибровка показана в Приложении 2.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

МилиХром А-02 7 Март 1999, Вс 04:36:10

ФАЙЛ: c:\m-chrom\data\odessa-2\99-03-07\stnd-02.chr
ОПЕРАТОР: Барам Г.И.
МЕТОД: ФТК-АК
КОЛОНКА: ААА-006
ЭЛЮЕНТ А: [1 М NH4AcO+H3PO4, pH 5.25]:H2O=5:95
ЭЛЮЕНТ Б: [1 М NH4AcO+H3PO4, pH 6.50]:ACN:H2O=5:35:60
ОБРАЗЕЦ: пробирка 1, 2 мкл, Сумма АК «Одесса» (по 0.2 нмоля/мкл)
ДЕТЕКТОР: 246 и 260 нм, Время 0.34 с, ДНВ
ТЕМПЕРАТУРА: 60.0 °C
МАКС. ДАВЛЕН.: 1.9 МПа

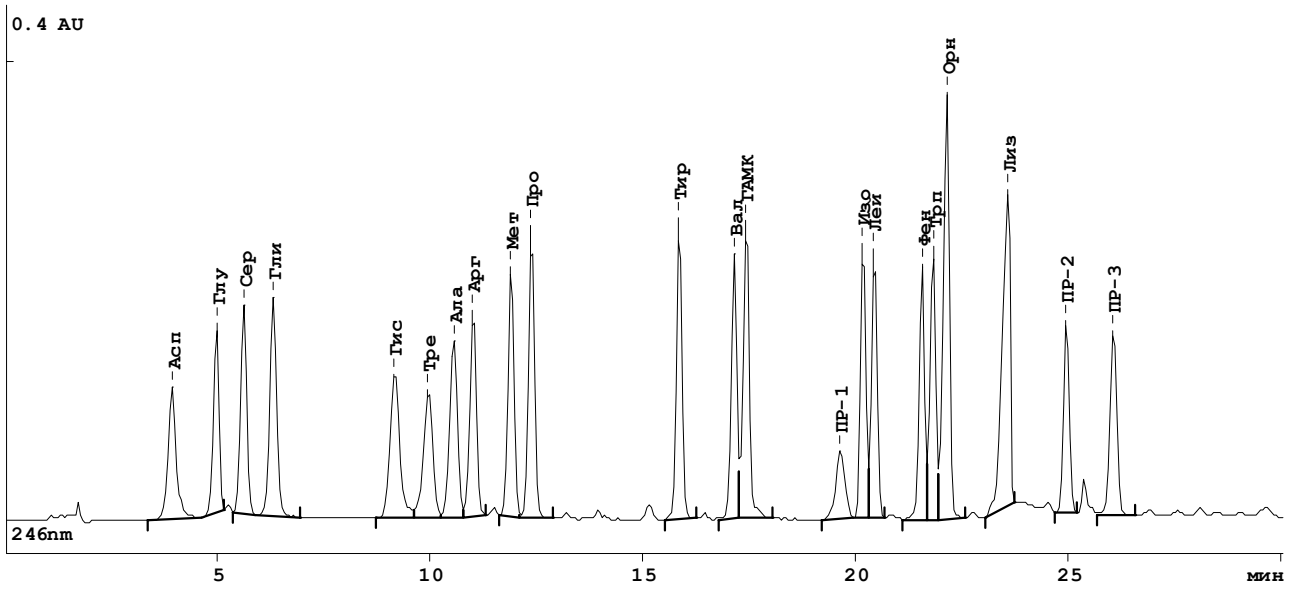


ГРАДИЕНТ: Поток: 150 мкл/мин

Шаг	Рег.	0	1	2	3	4
Объем, мкл	600	0	1000	3200	3200	4600
Б%	2	2	8	70	100	100

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Дата: 08/03/1999 18:24:37 Хроматограмма: ФТК-АК
Файл: stnd-020.chw Метод: odessa-2.mtw
Оператор анализа: Барам Г.И.
ПРОБА: Сумма АК "Одесса" (по 0.2 нмоля/мкл)
Объем: 2.0 µl Разведение: 1.00
КОЛОНКА: Nucleosil 100-5 C18 Размер: 2.0x 75 mm
Номер: AAA-006 Зерно: 5.0 µm
Метод расчета: Заказной Стандарт: Нет
Канал: 246nm



No	Удерж. мкл	Площадь AU*мкл	Конц. г/л	260nm	Название
1	582.31	3.562	0.347	0.794	Асп
2	738.59	3.415	0.378	0.842	Глу
3	834.41	4.299	0.269	0.867	Сер
4	939.14	5.070	0.190	0.833	Гли
5	1368.18	4.792	0.361	0.943	Гис
6	1487.78	3.905	0.303	0.801	Тре
7	1576.04	4.543	0.228	0.864	Ала
8	1645.52	4.356	0.368	0.875	Арг
9	1778.70	5.172	0.377	0.771	Мет
10	1850.31	6.042	0.290	0.701	Про
11	2370.23	5.383	0.456	0.947	Тир
12	2564.86	4.904	0.298	0.928	Вал
13	2607.27	6.212	0.262	0.912	ГАМК
14	2938.69	2.164	0.984	0.832	ПР-1
15	3019.33	4.951	0.333	0.967	Изо
16	3057.98	4.834	0.334	0.942	Лей
17	3225.66	4.724	0.421	1.005	Фен
18	3264.86	5.077	0.517	1.115	Трп
19	3313.83	9.207	0.261	0.924	Орн
20	3529.24	8.449	0.295	0.944	Лиз
21	3735.69	3.748	1.007	0.778	ПР-2
22	3901.68	4.157	0.995	1.317	ПР-3

Стандартный раствор аминокислот в 0.1 N HCl (по 2.5 мкмоль/мл).
Для дериватизации брали 10 мкл раствора. Продукты дериватизации растворяли в 125 мкл раствора "С".
Концентрации найдены по калибровке, сделанной по хроматограммам stnd-02.chr и stnd-03.chr.