

氨基酸的分析法

健康食品繁荣兴旺中受人注目的是「氨基酸」，对该物质分析最常用的是 HPLC。本篇以检测法为中心谈谈氨基酸分析法。

检测法的种类

氨基酸进行 UV 检测只能利用羧基 (-COOH) 在 200 ~ 210nm 处的吸收。一部分具有苯环的氨基酸也可在 250 ~ 280nm 检测，但是，一般在原形物质进行高灵敏度、良好选择性的分析比较困难。

因此，很早以来就使用衍生法，利用许多氨基酸构造中存在的氨基 (-NH₂, -NHR)，使用与该集团可进行选择性反应的衍生试剂。

柱前反应衍生法

进样前进行氨基酸衍生，衍生物使用 HPLC 进行分离、检测的方法。图 1 表示它的流程。

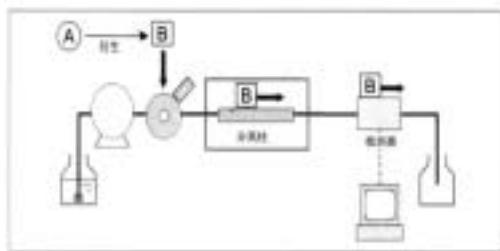


图 1 柱前反应衍生法

这种方法的优点如下。

- 反应系统小，试剂用量少。
- 可使用高价格的试剂，低背景，可提高灵敏度。
- 即使检测出未反应试剂，但经柱分离，也不会影响检测。

而它的缺点是，由于试样和衍生试剂直接混合，反应效率容易受试样基体（共存成分和溶剂等）的影响。因此可以说，柱前反应衍生法是局限在某种程度的试样种类上适用于以高灵敏度分析为目的的方法。

具有代表性的氨基酸分析用柱前反应衍生试剂有邻苯二甲醛、异硫氰酸苯脂、荧光胺、氯化丹酰等。反应操作各不相同，有的在室温下只须混合即可快速反应，有的在反应中必须加热，还有的反应后必须净化等。

衍生物的分离，多用反相色谱法。为了快速并且提高分离性能，利用条件设定顺序可作到非常高效率的分析。

柱后反应衍生法

柱后反应衍生法是在柱分离氨基酸后，将衍生试剂输入、混合后进行反应，最后导入检测器。图 2 是它的流程图。

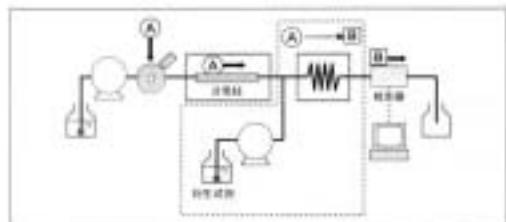


图 2 柱后反应衍生法

本方法的主要优点如下

- 由于反应可自动化，定量性、重现性优异。
- 由于反应前试样成分在柱中分离，不容易受基体的影响，可适用于广大范围的试样。

它的缺点是不易高灵敏度检测，且由于反应试剂连续输送，试剂消耗量大。因此，可以说，柱后反应衍生法，一旦反应系统最佳化即可适用于宽范围的试样，是定量优越的常规分析方法。

柱后反应衍生法由于反应试剂连续流入检测器，受到未反应试剂不能检测的限制，可使用的试剂种类有限。现在使用的氨基酸分析专用试剂仅有茚三酮和邻苯二甲醛 2 种。前者用于可见吸光度检测，后者用于荧光检测。

分离中最常用的是阳离子交换色谱法。由于氨基酸在氨基和羧基的两方构造中有两性离子，使用阳离子交换时酸性越强的（易成为阴离子的）洗脱越快；碱性越强的（易成阳离子的）洗脱越慢。

然而，现在的 HPLC 主流是反相色谱法。那么，为什么要采用阳离子交换呢？因为使用阳离子交换法可对用反相法分离比较困难的，氨基酸与它以外的含氨基物质（胺类）的分离容易而且效率好的原故。

氨基酸分析用的衍生试剂由于对氨基有反应性，对一般的胺类也会反应，可检测出这类物质的峰。然而，胺类绝大多数都具有羧基那样的阴离子的官能团，比氨基酸碱性强，阳离子交换中也比氨基酸洗脱慢。也就是说，使用阳离子交换，胺类不会妨碍氨基酸的定量。

因此，可分离氨基酸与胺的阳离子色谱法和对氨基酸有选择性反应的柱后反应衍生法可以说是理想的结合。

图 3 是最近流行的氨基酸饮料使用邻苯二甲醛的柱后反应衍生法分析的色谱图。

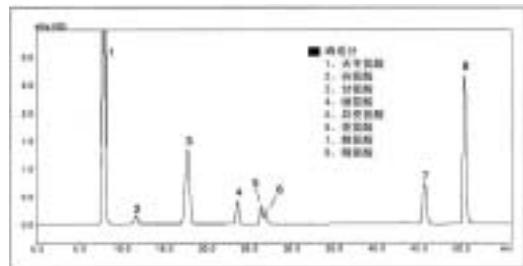


图 3 市售氨基酸饮料的分析