

赛分——氨基酸

专用柱 (Sepax AAA) 使用手册

色谱柱信息

赛分氨基酸专用柱 Sepax AAA (氨基酸分析) 色谱柱专为分离与分析游离氨基酸而设计。该柱以硅胶基质反相固定相材料为填料。Sepax AAA 固定相以高纯度具有良好机械稳定性的硅胶为基质，采用高纯度键合试剂，通过创新独有的技术确保最大单分子层覆盖和全封尾。高度可控的单分子层形成和封尾技术保证了可靠的柱间重现性。Sepax AAA 表面覆盖率已达到最大化，因此具有优异的稳定性和重现性。该填料为均一的球形颗粒，孔径为 120 Å，比表面积为 300 m²/g。通过运用独有的匀浆填装技术装填得到的 Sepax AAA 柱柱床密度均一稳定，因此可保证具有最高的柱效。通过 PITC 衍生化方法，18 种氨基酸可在 Sepax AAA 柱获得高分辨率的快速分析。

安全注意事项

氨基酸专用柱通常在高压下运行，如果管路连接不紧，将会导致有机溶剂和注入样品的泄漏，从而对操作人员的健康产生影响。一旦发生泄漏，应佩戴适当的手套进行处理。另外当打开色谱柱时还应采取适当的保护措施，以防止微小的硅胶颗粒进入呼吸道。

色谱柱安装与操作

色谱柱在运输过程中或在没有使用时，它的两端总是用堵头进行密封。当将色谱柱接入色谱仪器系统时，首先移去两端的堵头。请注意将流动相流动的方向与柱上标记的方向保持一致。除非出于特殊考虑，例如为了清除堵在色谱柱入口端的脏污等而需要将色谱柱反接以进行冲洗时，建议用户在接上色谱柱时一定要遵循柱上标记的方向。由于色谱柱的连接是整个色谱操作过程的一部分，如果密封

卡套过紧，或安装不合适，或者密封卡套与色谱柱端口不匹配，都有可能造成溶液的泄漏。请按照下面步骤将色谱柱与密封卡套相连接，从而将色谱柱接入 HPLC 系统中：

(a) 第一次使用的管线，请依次将管线接头和密封卡套装在外径 1/16”的管线上。密封卡套的宽口端应朝向管线接头。

(b) 将管线紧紧插入色谱柱的接口，向前滑动密封卡套和管线接头，并使管线接头的螺纹与色谱柱端口的螺纹相互衔接，然后拧紧管线接头。如果管线为高分子材料，请转到步骤 (d)；如果是金属管线，请继续 (c)。

(c) 在用力将管线压入柱端接口之后，用 1/4”扳手将已拧紧的螺帽再进一步紧固。

(d) 对色谱柱的另一端采用上述方法进行操作。

新的 Sepax AAA 柱中的液相是乙腈与水的混合溶液。在储存和运输过程中，硅胶填料可能会干涸。这时推荐用 5~10 倍柱体积的纯有机溶剂如甲醇、乙腈进行冲洗以活化色谱柱。接着可用用户自己选择的流动相冲洗色谱柱。流速由 0.1 mL/min 逐渐升至所需的操作条件，直至基线稳定为止。如果柱压和基线波动较大，这可能是气泡进入了色谱柱中。这时可用较高流速冲洗色谱柱 2~5 min。

样品与流动相

为了避免色谱柱的堵塞，所有样品和溶剂，包括缓冲溶液在内，都必须在使用前用 0.45 μm 或 0.2 μm 的滤膜过滤。Sepax AAA 键合固定相的性质为非极性，推荐流动相为有机试剂与水的混合物（如甲醇或乙腈的水溶液等）。流动相在使用前需要脱气。一个简单的脱气方法是将流动相在由水泵形成的真空下超声 5 min。当 Sepax AAA 柱用于梯度洗脱时，起始流动相通常为 5 % 甲醇（或乙腈）。

色谱柱的保养

pH 避免在 pH 低于 2 或高于 8 的条件下使用色谱柱。较高的 pH 会溶解硅胶，从而使部分或全部

的键合相从硅胶表面脱落，引起分离效率的降低和保留时间的改变。为了获得最佳的分离效果和延长柱的使用寿命，请尽量使用 pH 在 3~7.5 范围内的流动相。

压力 尽管氨基酸专用柱可在高至4000 psi的压力下使用，但正常的操作压力应当低于2500 psi。长时间在高压下运行会损坏色谱柱和输液泵。由于压力来源于流速，因此最大流速将受制于系统所能承受的压力。一般而言，柱压会随着色谱柱使用时间的增加而逐渐增加。压力突然增加预示色谱柱入口端的筛板发生了堵塞。在这种情况下，建议将色谱柱反接后用适宜的溶剂进行冲洗。

温度 最高操作温度为 60°C。长时间在高温 (>75°C) 下操作也会损坏色谱柱，这种情形在高的 pH (>8.5) 条件下特别突出。

色谱柱清洗 多次使用后某些样品中的杂质可能会吸附到入口筛板或填料上。当积累到一定程度时会出现压力升高并伴随峰形展宽的现象。出现这种情况时，推荐用5~80 %乙腈水溶液低流速梯度冲洗色谱柱5~10倍柱体积，结束后保存于乙腈与水的混合溶液中。

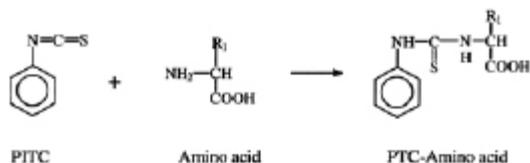
储藏 长期不用时，请不要让水或缓冲液存留在色谱柱中。在替代缓冲液时，请用至少 20~30 倍柱体积的 50 %甲醇（或乙腈）水溶液冲洗色谱柱，再用 20~30 倍柱体积的纯有机溶剂如乙腈等进行冲洗。每根色谱柱在运输过程中均会附有两个可拆卸的堵头。为了防止柱床干涸，请用堵头塞紧色谱柱的两端。

Sepax AAA 色谱柱氨基酸分析步骤

1. 原理

这种分析氨基酸的方法基于柱前衍生步骤，衍生化反应是在碱性条件下完成的，采用异硫氰酸苯酯和游离氨基酸反应生成的 PTC-氨基酸衍生物可于 UV 254 nm 处被检测到。通过 PITC 衍生法改善的氨基酸分离同样使其分析更有效。

Figure 1 Amino acid derivatization with PITC



2. 试剂

三乙胺溶液：将 1.4 mL 三乙胺和 8.6 mL 乙腈混和均匀。

异硫氰酸苯酯溶液：配成 12.5 μL/mL 的异硫氰酸苯酯的乙腈溶液。

十八种氨基酸标准溶液：溶解或稀释一定量的十八种氨基酸于 0.1 mol/L 盐酸中，配制成 0.5 μmol/mL 十八氨基酸标准溶液。

醋酸钠溶液：将 16.4 g 无水醋酸钠溶解于 2.0 L 水中，配制成 0.1 mol/L 的醋酸钠溶液，用冰醋酸调节 pH 到 6.5。

3. 衍生化反应

转移 200 μL 十八种氨基酸标准溶液(或样品溶液)入 1.5 mL 塑料管中，加入 100 μL 三乙胺溶液和 100 μL 异硫氰酸苯酯溶液，混合，至于室温下反应 1h 后，加入 400 μL 正己烷，涡旋振荡 10 min。静置 30 min，取下相用 0.45 μm 滤膜过滤后进样。

4. 液相色谱分析

色谱条件：Sepax AAA, 4.6×250 mm

流动相 A: 0.1mol/L 醋酸钠 (pH 6.5): 乙腈=93:7

流动相 B: 80% 乙腈水溶液

流速：1.0 mL/min

柱温：36 °C

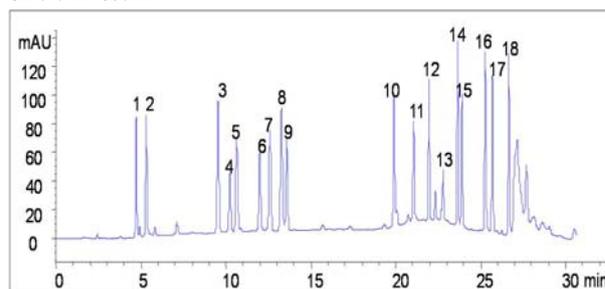
检测波长：UV 254 nm

进样量：5 μL

流动相梯度：

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
15	85	15
18	76	24
25	60	40
30	60	40
30.01	0	100
40	0	100

检测色谱图：



1.Asp,天冬氨酸	2.Glu,谷氨酸	3.Ser,丝氨酸
4.Gly,甘氨酸	5.His,组氨酸	6.Arg,精氨酸
7.Thr,苏氨酸	8.Ala,丙氨酸	9.Pro,脯氨酸
10.Tyr,酪氨酸	11.Val,缬氨酸	12.Met,甲硫氨酸
13.Cys,胱氨酸	14.Ile,异亮氨酸	15.Leu,亮氨酸
16.Phe,苯丙氨酸	17.Trp,色氨酸	18.Lys,赖氨酸

氨基酸

专用柱 (Sepax AAA) 及试剂信息

产品	货号
Sepax AAA 色谱柱(5 μm,4.6×250 mm)	Z00001-4625
氨基酸标品包, 50 mg×18	Z00001S-0001
异硫氰酸苯酯 (PITC), 100 mL	Z00001S-0002