

## 电雾式检测器（CAD）应用简报—— 非衍生方式直接测定 17 种氨基酸



## 1、前言

氨基酸分析是生命科学研究中最重要的技术之一。氨基酸是人体蛋白质的基本组成物质，除个别芳香族氨基酸外，紫外吸收均较弱，直接使用紫外检测器检测灵敏度低、干扰大。而在近年来的多肽药物研究中，氨基酸组成分析（Amino Acid Composition Analysis, AACA）是不可或缺的核心环节。如**氨基酸序列验证**：多肽药物的生物活性高度依赖于其氨基酸序列及组成。通过分析氨基酸组成，可验证合成多肽是否与目标序列一致，避免因合成错误（如氨基酸缺失、置换或非预期修饰）导致的功能失效；**氨基酸结构表征**：结合质谱（MS）和色谱技术（如HPLC-CAD），氨基酸组成分析可辅助解析复杂多肽（如含非天然氨基酸或翻译后修饰的多肽）的分子结构，确保其符合设计要求。

利用**电喷雾检测器（CAD）**结合高效液相色谱（HPLC）进行非衍生化直接检测 17 种氨基酸，展现了显著的技术优势。相较于传统方法，该技术省去了繁琐的衍生化步骤，避免了因衍生试剂不稳定、副反应或产物多样性导致的灵敏度波动和定量偏差。CAD 检测器的通用性原理使其对非挥发性和弱紫外吸收化合物（如氨基酸）具有高灵敏度响应，无需依赖特定官能团修饰即可实现精准检测。此方法简化了前处理流程，缩短了分析时间，同时减少了有毒试剂的使用，符合绿色化学理念。此外，其宽动态范围和良好的线性关系支持复杂基质（如生物体液、食品样品）中多种氨基酸的同时定量分析，尤其适用于高通量实验室的快速筛查与质量控制。研究证实，该方法在保留时间稳定性、重复性和回收率方面表现优异，为生命科学、临床诊断及食品工业提供了高效可靠的分析解决方案。

本文利用使用反相 HPLC 结合英迈仪器的电雾式检测器（CAD）直接测定 17 种氨基酸，该方法快速、简便、准确，灵敏度高，重复性好，线性佳，为氨基酸检测及多肽药物研究提供了有力的技术支撑。

## 2、仪器和材料：

仪器：Agilent1200 液相色谱仪

CAD 检测器（英迈仪器，型号：CADetector a1）

试剂：纯水（屈臣氏蒸馏水），

乙腈（色谱纯），

三氟乙酸（分析纯）

七氟丁酸（分析纯）

样品：盐酸溶液中 17 种氨基酸混合溶液标准物质（伟业计量标准物质）

## 3、方法与结果：

### 3.1 色谱条件：

色谱柱：ZORBAX SB-C18 3.5 $\mu$ m 4.6\*250mm

流速：0.8mL/min

流动相 A：水（0.7%三氟乙酸+5mmol/L 七氟丁酸） 流动相 B：乙腈

梯度洗脱

稀释剂：水

CAD 条件：

仪器型号：英迈仪器 CADetector a1

漂移管温度：35 $^{\circ}$ C

雾化气流：3L/min

电晕气流：1L/min

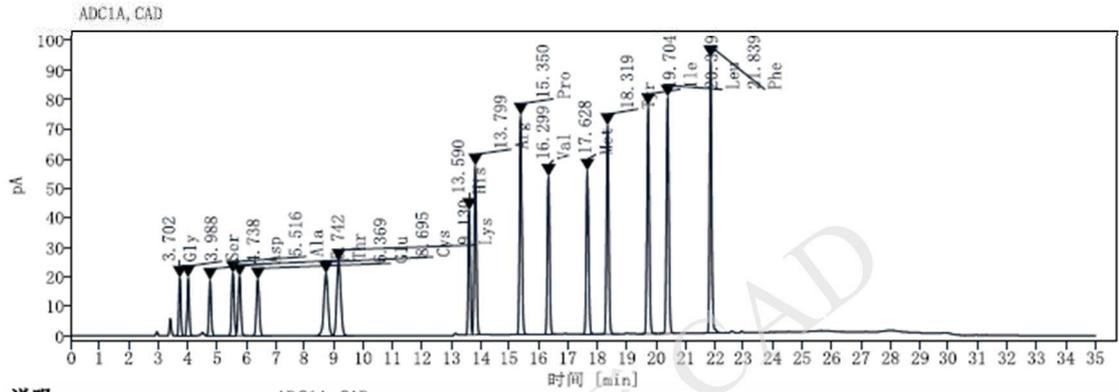
电晕电流：1 $\mu$ A

增益：0.05

RF：2.0

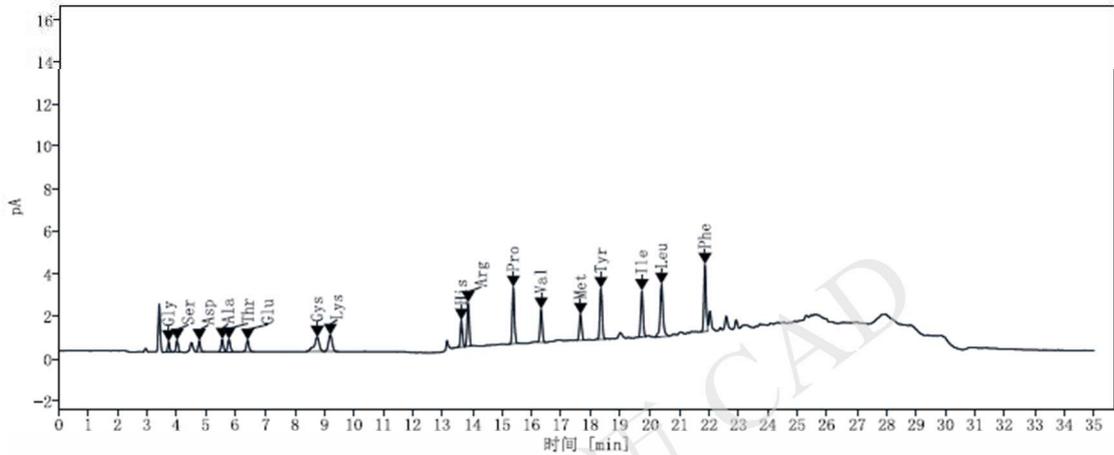
### 3.2 实验结果:

3.2.1 17种氨基酸分离情况: 此方法下17种氨基酸分离良好, 相邻组分均能有效分离, 各氨基酸峰形尖锐, 柱效高。



说明	ADC1A, CAD						
化合物名称	保留时间 [min]	峰面积	峰峰高	峰分离度 USP	峰理论塔板数 USP	峰拖尾因子	
Gly	3.702	87.10059	19.522		15487.0	1.07	
Ser	3.988	98.44951	19.697	2.27	14499.2	1.08	
Asp	4.738	100.65748	18.820	5.48	18048.5	1.04	
Ala	5.516	120.74035	21.176	5.32	21132.5	1.08	
Thr	5.742	123.41554	20.055	1.43	19966.8	0.99	
Glu	6.369	127.80462	18.986	3.68	20334.9	1.03	
Cys	8.695	209.37714	21.087	10.66	18184.4	0.97	
Lys	9.130	240.74414	25.159	1.68	20229.3	1.13	
His	13.590	192.63178	42.112	23.59	200435.4	1.11	
Arg	13.799	296.10752	57.182	1.61	161792.3	1.12	
Pro	15.350	396.05299	74.190	11.14	188634.1	1.10	
Val	16.299	271.38606	53.411	6.89	235610.6	1.08	
Met	17.628	296.89183	55.254	9.63	247759.0	1.11	
Tyr	18.319	363.48895	70.536	4.98	290596.3	1.11	
Ile	19.704	413.42942	77.208	9.96	309345.9	1.13	
Leu	20.369	432.39078	80.044	4.69	327472.6	1.12	
Phe	21.839	480.59245	93.136	10.61	421148.4	1.14	

## 3.2.2 100pmol 样品信噪比良好（软件 P2P 方式自动计算）。



噪声计算:

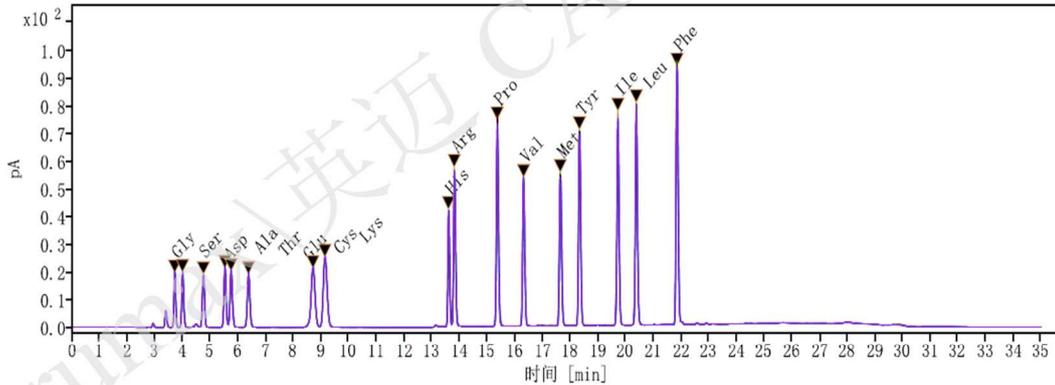
P2P

说明

化合物 名称	ADC1A, CAD 保留时间 [min]	峰面积	峰 峰高	信噪比
Gly	3.711	2.06914	0.477	44.0
Ser	3.997	2.63654	0.551	50.8
Asp	4.745	2.68363	0.520	47.9
Ala	5.524	3.19043	0.580	53.4
Thr	5.750	3.54280	0.587	54.1
Glu	6.379	3.50215	0.543	50.0
Gys	8.733	7.85154	0.667	61.5
Lys	9.176	6.67263	0.771	71.0
His	13.607	6.13839	1.266	116.6
Arg	13.833	9.92332	2.065	190.2
Pro	15.363	13.58319	2.662	245.1
Val	16.302	7.89666	1.561	143.8
Met	17.631	6.55729	1.214	111.8
Tyr	18.324	12.14298	2.397	220.8
Ile	19.706	11.43678	2.173	200.1
Leu	20.371	16.29663	2.480	228.3
Phe	21.839	16.19601	3.170	291.9

3.2.3 进样精密度，1mmol/L 标样-进样 5 $\mu$ L，连续进样 6 针，各氨基酸 RSD%均较好。

混标-1mmol, 序列行: 1-1 混标-1mmol, 序列行: 1-2 混标-1mmol, 序列行: 1-3 混标-1mmol, 序列行: 1-4  
混标-1mmol, 序列行: 1-5 混标-1mmol, 序列行: 1-6



化合物名称	平均保留时间 (min)	保留时间 RSD (%)	保留时间稳定性	峰面积平均值	峰面积 RSD (%)	峰面积稳定性
Gly	3.710	0.216	通过	89.038	1.748	通过
Ser	3.995	0.201	通过	100.395	1.212	通过
Asp	4.744	0.173	通过	100.718	0.497	通过
Ala	5.522	0.139	通过	123.397	1.600	通过
Thr	5.747	0.128	通过	126.114	1.391	通过
Glu	6.374	0.111	通过	129.017	2.045	通过
Cys	8.700	0.085	通过	212.393	1.368	通过
Lys	9.134	0.085	通过	241.700	1.303	通过
His	13.599	0.057	通过	192.312	0.521	通过
Arg	13.809	0.058	通过	292.920	0.951	通过
Pro	15.356	0.058	通过	391.846	2.082	通过
Val	16.303	0.052	通过	271.026	0.734	通过
Met	17.632	0.054	通过	290.838	1.661	通过
Tyr	18.323	0.042	通过	359.084	0.843	通过
Ile	19.707	0.036	通过	404.334	1.215	通过
Leu	20.372	0.033	通过	428.148	0.775	通过
Phe	21.842	0.038	通过	476.115	1.185	通过

3.2.4 线性

进样 1 $\mu$ L, 2 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L 和 20 $\mu$ L, 使用进样体积与峰面积做线性方程。线性良好, 各个组分的相关系数 R 均大于 0.999。

总结表格如下:

序号	成分	线性方程	相关系数 R
1	甘氨酸(Cly)	$y=18.4029x-2.4676$	0.99997
2	丝氨酸(Ser)	$y=20.6894x-2.1976$	0.99997
3	天门冬氨酸(Asp)	$y=19.6119x+0.7603$	0.99992
4	丙氨酸(Ala)	$y=23.0974x+4.0342$	0.99963
5	苏氨酸(Thr)	$y=24.4949x+3.2034$	0.99963
6	谷氨酸(Glu)	$y=24.7983x+3.3148$	0.99963
7	胱氨酸(Cys)	$y=40.0386x+6.0799$	0.99968
8	赖氨酸(Lys)	$y=45.3407x+9.2496$	0.99967
9	组氨酸(His)	$y=34.6789x+11.3921$	0.99942
10	精氨酸(Arg)	$y=55.8643x+6.4591$	0.99996
11	脯氨酸(Pro)	$y=70.7237x+20.7902$	0.99945
12	缬氨酸(Val)	$y=51.4909x+7.5024$	0.99964
13	甲硫氨酸(Met)	$y=58.4620x-13.7992$	0.99981
14	酪氨酸(Tyr)	$y=64.1751x+25.8099$	0.99912
15	异亮氨酸(Ile)	$y=76.4371x+13.1955$	0.99978
16	亮氨酸(Leu)	$y=81.4997x+14.6637$	0.99975
17	苯丙氨酸(Phe)	$y=89.0247x+22.3171$	0.99951

#### 4、结论:

本研究采用 HPLC-CAD 法测定氨基酸, 样品无需衍生化可直接进样分析, 不需要繁琐的前处理, 避免由于衍生化产生的误差, 无需筛选衍生条件(衍生试剂、反应条件等), 减小了测定误差; 操作更加简便, 结果准确、可靠, 为氨基酸的测定提供了有力的仪器及方法支撑。