

(4043) 胺基酸分析法

一、前言

本法適用於分析蛋白質、肽 (peptides) 或其他藥品製劑之胺基酸組成成分。蛋白質與肽皆為由胺基酸經共價鍵結組成之線性聚合物，由其胺基酸序列可決定此分子的特性。蛋白質為大分子，常以特定折疊結構構形存在之，而肽則較小且可能僅由數個胺基酸組成。本法可用於定量蛋白質及肽、胺基酸組成鑑定蛋白質及肽、協助蛋白質及肽的結構分析、評估肽圖譜法的片段化方式及偵測蛋白質或肽中可能出現的非典型胺基酸。進行胺基酸分析之前，須將蛋白質 / 肽水解為個別胺基酸成分，蛋白質 / 肽經過水解後之胺基酸分析步驟可與其他藥品製劑中的游離胺基酸分析者相同。基本上，待測檢品的胺基酸成分須進行衍生化，以作為分析之用。

二、設備

本法通常基於層析分離檢品中所含胺基酸，現行技術係採用為分析方法學設計之自動層析裝置。胺基酸分析設備通常含低壓或高壓液相層析系統，利用所產生之移動相梯度分離層析管中之胺基酸分析物。除非檢品是以管柱前衍生化 (precolumn derivatization) 技術進行分析，否則此設備須具管柱後衍生化 (postcolumn derivatization) 能力。偵測器之選擇則依所使用之衍生物方法而定，通常為紫外光 / 可見光或螢光偵測器，另有一記錄裝置 (如積分儀) 用於轉換偵測到之類比訊號及定量。此設備通常建議專用於胺基酸分析。

三、一般注意事項

進行胺基酸分析時，須經常注意背景值的汙染，因此，必須使用高純度試劑 (如低純度鹽酸可能會造成甘胺酸 (glycine) 汙染)。分析用試劑須定期進行例行性更換，且僅使用高效液相層析 (HPLC) 等級溶劑。透過使用前過濾溶劑、保持溶劑槽加蓋及避免儀器直接曝曬於日照下等方法，可降低溶劑中潛在微生物及外來物質汙染之機會。

實驗室操作方式會影響胺基酸分析的品質，建議將儀器置放於實驗室中人員較少經過之區域，並保持實驗室整潔，依照維護計畫進行微量吸管的清潔及校正，並將微量吸管尖存放於有蓋容器之中；另分析人員應避免用手直接碰觸微量吸管尖，並穿戴無粉乳膠或同等級之手套，減少檢品瓶開關次數，以防止灰塵掉落而造成甘胺酸、絲胺酸 (serine) 及丙胺酸 (alanine) 濃度提高。

為得到適當之胺基酸分析結果，儀器之良好維護是必要的條件。若儀器頻繁性的使用，則須每日檢查是否洩漏、偵測器與燈泡的穩定度及管柱是否維持個別胺基酸之解析能力，並應根據例行保養計畫進行清潔

或替換儀器內所有的濾光片及其他維護零件。

四、對照標準品

已有市售適用於胺基酸分析之標準品，通常為胺基酸水溶液的混合物。在測定胺基酸組成時，會以蛋白質或肽標準品作對照組與待測檢品一同分析來驗證試驗過程之完整性，常以高度純化的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin) 做為試驗用蛋白質標準品。

五、儀器校正

分析胺基酸之儀器設備的校正通常包括分析不同濃度之胺基酸標準品，以決定反應因子與個別胺基酸的分析範圍。該標準品為已知濃度之胺基酸混合物，在校正過程中，須將胺基酸標準品稀釋成在預期的線性範圍內之不同分析物濃度，再於不同檢品濃度下進行重複分析。以測得各胺基酸之波峰面積與相對應之標準品稀釋液中之胺基酸已知濃度作圖，由此結果可推估胺基酸波峰面積與其濃度之線性關係範圍。進行胺基酸分析時，應注意使檢品濃度落在前述線性範圍內進行分析，以獲得正確且可重複性的結果。

為判定各個胺基酸的反應因子，應對 4~6 個不同濃度之胺基酸標準品進行分析，此反應因子係指標準品中每 nmol 胺基酸之平均波峰面積或波峰高度。應備有一份列有各胺基酸反應因子的校正文件，以計算檢品中各胺基酸之濃度，計算方式為將各胺基酸所對應的波峰面積除以其反應因子，由此得出該胺基酸之 nmol 數。如為例行性分析，單點校正應已足夠，但仍應定期更新前述校正文件，且以對照組進行分析，以確保其完整性。

六、重複性

必須注意試驗的重複性，以使在單一分析實驗室中得到之胺基酸分析結果能維持一致之高品質。在胺基酸或其衍生物層析分離的分析過程中，可於層析圖觀察到許多與胺基酸相對應之波峰。為因應如此大量波峰數目之需求，實驗室應配備有一胺基酸分析系統，可重複性的依波峰滯留時間鑑定波峰，並積分出各波峰面積以做定量分析之用。在一典型的重複性評估步驟中，包含胺基酸標準溶液的配製，並對同一標準溶液進行重複性分析 (6 次以上)，而後決定試驗中各胺基酸滯留時間及由積分而得之波峰面積之相對標準差 (RSD)。重複性評估試驗可擴大進行，由不同分析人員於數日進行多次分析試驗。進行多次分析試驗時，應重新從原料配製標準品稀釋液，以測定因處理檢品導致的變異。重複性評估通常還包括對蛋白質標準品 (如牛血清白蛋白) 胺基酸組成的分析。藉由評估重複測量間之變異 (即相對標準差)，實驗室可設定分析限值以確保分析之品質能在掌控之中，並可藉由設定最小操作變異限值來確保獲得最佳結果。若要降低胺基酸分析之變異，須注意①檢品配製、②試劑品質及 / 或實驗室操作引起的高背景值光譜干擾、③儀器

性能及維護、④數據分析與解讀及⑤分析人員能力與操作習慣。以上所有參數都必須在確效時完整評估。

七、檢品製備

要得到準確的分析結果，蛋白質及肽檢品須經純化，緩衝液成分（如鹽類、尿素、界面活性劑等）可能干擾胺基酸分析，故分析前須從檢品中移除。一般而言，與管柱前衍生化方法相比，採用管柱後胺基酸衍生化之方法較不受緩衝液成分影響。為降低潛在背景值汙染、改善分析物回收率與減少分析人員時間精力，較理想的做法是限制檢品操作次數。常用於移除蛋白質檢品中之緩衝液成分的技术包括：①將蛋白質檢品注入逆相高效液相層析系統，藉由含足量有機成分之揮發性溶劑分離蛋白質，並利用真空離心乾燥之、②利用揮發性緩衝液或水進行透析、③以超濾離心（centrifugal ultrafiltration）方式，用揮發性緩衝液或水置換緩衝液、④使用有機溶劑（如丙酮），將緩衝液內蛋白質沉澱及⑤凝膠過濾（gel filtration）。

八、內部標準品

進行胺基酸分析時，建議使用內部標準品以監控胺基酸分析過程是否有物理性或化學性耗損及變異。可於水解前，將已知精確量之內部標準品加入蛋白質溶液中，由內部標準品之回收率可推知蛋白質溶液中胺基酸的一般回收率。惟游離胺基酸於水解時釋放或裂解的速率與蛋白質鍵結之胺基酸相較變異性較大，因此若以內部標準品校正水解之耗損，可能會得到不可信賴的結果，故於試驗結果判讀時必須將此點納入考量。亦可將內部標準品添加於水解後之胺基酸混合物中，以校正進樣時之差異、試劑安定性及流速的變化。理想的內部標準品建議採用可便宜購得之非天然的一級胺基酸，應對水解安定且其反應因子與濃度呈線性關係，同時沖提時之滯留時間不應與其他胺基酸重疊。常用的胺基酸標準品包括正白胺酸（norleucine）、硝基酪氨酸（nitrotyrosine）或 α -胺基丁酸（ α -aminobutyric acid）。

九、蛋白質水解

對蛋白質及肽檢品進行胺基酸分析時，一定要先將其水解。水解時所使用之玻璃器皿必須非常乾淨，以免導致錯誤的試驗結果。水解試管上之手套粉末及指紋都可能造成汙染。欲清潔玻璃水解試管時，應將其置於 1 N 鹽酸中煮沸 1 小時、或浸於濃硝酸或將濃鹽酸及濃硝酸以 1:1 容積比製成的混液中 1 小時，再以高純水（High-purity water）沖洗已經上述步驟清潔之水解試管，接著以高效液相層析等級的甲醇沖洗，於烘箱中放置隔夜使烘乾，而後存放於有蓋容器中，直到使用前始取出。另一種清潔方法為將乾淨的水解試管於 500° 熱解 4 小時，以去除源自水解試管之汙染；亦可使用適當的拋棄式實驗材料。

在進行胺基酸分析前，最常用於水解蛋白質檢品

的方法為酸水解。由於有數種胺基酸在酸水解條件下會被完全或部分分解，造成此技術不一致之分析結果。其中，色胺酸（tryptophan）會被完全破壞、絲胺酸及蘇胺酸（threonine）則會被部分破壞、甲硫胺酸（methionine）可能會發生氧化反應、而半胱胺酸通常會以胱胺酸形式回收（但胱胺酸又因會被部分分解或還原為半胱胺酸，回收率通常較差）。於反應槽上部適當抽真空（使小於 200 μ mHg（或 26.7 Pa）），或注入惰性氣體（如氬氣），可降低氧化分解程度。另外，含異白胺酸（isoleucine）與纈胺酸（valine）的肽鍵（如 Ile-Ile、Val-Val、Ile-Val 與 Val-Ile）會部分水解。天冬醯胺酸（asparagine）與麩醯胺酸（glutamine）則有脫胺反應，分別形成天冬胺酸（aspartic acid）與麩胺酸（glutamic acid）。因為酸水解過程中會使色胺酸、天冬醯胺酸及麩醯胺酸逸失，此方法僅可對 17 種胺基酸加以定量。下述某些水解技術可解決上述問題，部分技術（例如方法四至十一）可能反而會導致其他胺基酸之修飾。因此，當使用特定水解技術時，須權衡該技術的利弊，而在進行酸水解以外的方法之前，須先經適當的測試。

一般常用時程研究（例如在酸水解 24、48 及 72 小時後進行胺基酸分析）推得部分或緩慢斷裂的胺基酸之起始濃度。以觀察到之不穩定胺基酸（例如絲胺酸及蘇胺酸）濃度對水解時間作圖，再將所得之曲線外推至原點，可得上述胺基酸的起始濃度。水解反應時程研究亦可用於緩慢斷裂之胺基酸（如異白胺酸及纈胺酸）。在水解時程中，分析人員會觀察到此類胺基酸濃度產生高原（plateau）現象，此高原值即可視為胺基酸濃度。若水解時間過長，檢品中此類胺基酸濃度會開始下降，顯示胺基酸在水解條件下進行分解。

除時程研究外，亦可使用胺基酸校正標準品，使其在與測試檢品完全相同的水解條件下反應。游離胺基酸之分解速率或許不能完全代表在肽或蛋白質中之不安定胺基酸的分解速率，此現象對於分解緩慢的肽鍵（如 Ile-Val 鍵）尤為明顯，然此技術仍可幫助分析人員解讀某些胺基酸之分解情形。微波輔助酸水解（microwave acid hydrolysis）反應快速且已經使用，但本法需特別設備並須特別小心，且必須針對各種個別蛋白質 / 肽檢品的最佳微波水解條件進行分析。以微波技術水解通常僅需數分鐘，但即使僅有 1 分鐘的偏差仍可能得到不適當的結果（如水解不完全或不安定胺基酸之分解等）。另外，可利用蛋白酶混合液使蛋白質完全水解，但其條件複雜，需要適當的對照組，而且一般較適用於肽上。（註：初次分析未知蛋白質時，需以不同的水解時間及溫度條件進行測試，以確定最佳條件）。

(一)方法一

利用含酚（phenol）鹽酸溶液進行之酸水解法

為胺基酸分析前水解蛋白質/肽檢品最常用的方法。加入酚可預防酪胺酸 (tyrosine) 的鹵化 (halogenation)。

1. 水解溶液：含 0.1 ~ 1.0% 酚之 6 N 鹽酸。

2. 液相水解 (liquid phase hydrolysis)：

取蛋白質/肽檢品於水解試管內並乾燥之 (註：乾燥檢品是為防止其所含水分稀釋用於水解之酸濃度)。於水解試管中，以凍乾蛋白質 500 µg 加入水解溶液 200 µL 之比例加入水解溶液，於乾冰—丙酮浴中冷凍檢品，再於真空中過火密封。檢品一般置於真空或惰性氣體中，於 110° 水解 24 小時，以防止氧化。若有蛋白質不完全水解之顧慮，則考慮更長的水解時間 (如 48 或 72 小時)。

3. 汽相水解 (vapor phase hydrolysis)：

本法為最常用的酸水解方法之一，微量分析時尤其偏好使用，汽相水解時由所使用之酸性試劑造成的檢品污染程度也最低。將含有乾燥檢品的小瓶放入含適量水解溶液之容器中，此水解溶液不與待測檢品接觸。於容器上部空間導入惰性氣體或抽真空使其氣壓小於 200 µmHg (或 26.7 Pa)，加熱至約 110°，以酸蒸氣水解乾燥檢品 24 小時，應注意使檢品瓶中酸冷凝量降至最低。水解後，於真空中乾燥檢品，以移除殘留的酸。

(二)方法二

以巯基乙磺酸 (mercaptoethanesulfonic acid, MESA) 為還原酸，減少水解過程中色胺酸氧化。

1. 水解溶液：2.5 M MESA 溶液。

2. 汽相水解：

取待測蛋白質/肽 1 ~ 100 µg 於水解試管內乾燥，再將此水解試管置於含水解溶液約 200 µL 的較大試管內。將此大試管在約 50 µmHg (或 6.7 Pa) 的真空中密封，以汽化水解溶液。將水解試管加熱至約 170 ~ 185° 並反應大約 12 分 30 秒。水解後，於真空中乾燥 15 分鐘，以移除殘留的酸。

(三)方法三

以巯基乙酸 (thioglycolic acid, TGA) 為還原酸，防止水解過程中色胺酸氧化。

1. 水解溶液：配製含 7 M 鹽酸、10% 三氟乙酸 (trifluoroacetic acid, TFA)、20% 巯基乙酸及 1% 苯酚之溶液。

2. 汽相水解：

取待測蛋白質/肽 10 ~ 50 µg 於水解試管內乾燥，再將此水解試管置於含水解溶液約 200 µL 的較大試管內，將此大試管在約 50 µmHg (或 6.7 Pa) 的真空中密封，以汽化巯基乙酸。將水解試管加熱至 166° 並反應大約 15 ~ 30 分鐘。

水解後，於真空中乾燥 5 分鐘，以移除殘留的酸。使用本法時，色胺酸之回收率可能會因檢品量而有所差異。

(四)方法四

於蛋白質水解前，加入過氧甲酸 (performic acid, PFA) 以氧化半胱胺酸-胱胺酸及甲硫胺酸。

1. 氧化溶液：新鮮配製甲酸：30% 過氧化氫溶液 (9:1) 之適當混液，置室溫 1 小時。

2. 步驟：

取蛋白質/肽檢品溶於甲酸 20 µL，50° 持續加熱 5 分鐘，再加入氧化溶液 100 µL，氧化約 10~30 分鐘。在此反應中，半胱胺酸會轉化為磺基丙胺酸 (cysteic acid)，甲硫胺酸則會轉化為甲硫胺酸磺 (methionine sulfone)。氧化反應後，以真空離心移除檢品中多餘試劑。於鹵化物 (halides) 存在之情況下，本法可能會導致酪胺酸殘基的修飾。以此法產生之氧化蛋白質可再以方法一或方法二進行酸水解。

(五)方法五

於進行液相水解時，利用疊氮化鈉 (sodium azide) 氧化半胱胺酸-胱胺酸。

1. 水解溶液：於含 0.2% 酚之 6 N 鹽酸中加入疊氮化鈉，使其最終濃度為 0.2%w/v。添加酚以防止酪胺酸鹵化。

2. 液相水解：

取蛋白質/肽於 110° 水解 24 小時。水解時，水解溶液中之疊氮化鈉會將檢品中之半胱胺酸-胱胺酸轉化為磺基丙胺酸。本法的酪胺酸回收率較方法四佳，但無法定量甲硫胺酸，因甲硫胺酸會轉化成含甲硫胺酸及其兩種氧化產物 (甲硫胺酸亞磺 (methionine sulfoxide) 及甲硫胺酸磺) 之混合物。

(六)方法六

利用二甲基亞磺 (DMSO) 來氧化半胱胺酸-胱胺酸。

1. 水解溶液：於含 0.1 ~ 1.0% 酚之 6 N 鹽酸中加入 DMSO，使其最終濃度為 2%v/v。

2. 汽相水解：

取蛋白質/肽於 110° 水解 24 小時。水解時，水解溶液中之 DMSO 會將檢品中之半胱胺酸-胱胺酸轉化成磺基丙胺酸。為降低本法之變異性並校正部分分解之影響，建議可使用含有 1 ~ 8 mol 半胱胺酸之蛋白質標準品來評估氧化水解後磺基丙胺酸之回收率。於蛋白質/肽水解產物中所得之磺基丙胺酸之反應因子，通常會比非水解的磺基丙胺酸標準品低 30%。由於組胺酸 (histidine)、甲硫胺酸、酪胺酸及色胺酸於此法中亦會經修飾，因此本法不適用於完整組成分

析。

(七)方法七

利用汽相吡啶乙基化 (pyridylethylation) 反應，達成半胱胺酸 - 胱胺酸的還原及烷化。

1. 還原溶液：取吡啶 (pyridine) 83.3 μL 、4- 乙烯基吡啶 (4-vinylpyridine) 16.7 μL 、三丁基膦 (tributylphosphine) 16.7 μL 及水 83.3 μL 至適當容器中均勻混和。

2. 步驟：

取蛋白質 / 肽 1 ~ 100 μg 於水解試管內，再置於一較大試管內。取還原溶液至大試管內，將此大試管在約 50 μmHg (或 6.7 Pa) 的真空中密封，於 100° 加熱約 5 分鐘。接著移出水解試管，於真空乾燥器 (vacuum desiccator) 乾燥 15 分鐘，以移除殘留試劑。以此法吡啶乙基化的蛋白質 / 肽可接著利用前述之步驟進行酸水解。同時對一含有 1 ~ 8 mol 半胱胺酸之蛋白質標準品進行吡啶乙基化反應，以提高吡啶乙基半胱胺酸 (pyridylethyl-cysteine) 回收率之準確性。吡啶乙基化反應時間較長時，可能會修飾蛋白質末端的 α - 胺基 (α -amino terminal group) 與離胺酸 (lysine) 的 ϵ - 胺基 (ϵ -amino group)。

(八)方法八

利用液相吡啶乙基化反應，達成半胱胺酸 - 胱胺酸還原及烷化。

1. 儲備溶液：配製下列三種溶液，並過濾。

(1) 儲備溶液 I：含 4 mM 乙二胺四乙酸二鈉 (edetate disodium, EDTA) 之 1 M 參羥甲胺甲烷鹽酸鹽溶液 (Tris hydrochloride)，其 pH 值為 8.5。

(2) 儲備溶液 II：8 M 胍鹽酸鹽溶液 (guanidine hydrochloride)。

(3) 儲備溶液 III：10% 2- 巰基乙醇 (2-mercaptoethanol) 水溶液。

2. 還原溶液：取上述儲備溶液 II 及儲備溶液 I，以 3:1 容積比配製成含 6 M 胍鹽酸鹽之 0.25 M 參羥甲胺甲烷鹽酸鹽緩衝液。

3. 步驟：

取檢品 10 μg 溶於還原溶液 50 μL ，並加入儲備溶液 III 約 2.5 μL ，於氮氣或氬氣保護下，避光存放於室溫 2 小時。而後加入 4- 乙烯基吡啶 2 μL 於蛋白質溶液中，於室溫下避光反應 2 小時，以進行吡啶乙基化反應。藉由逆相高效液相層析分離使蛋白質 / 肽脫鹽。收集之檢品於酸水解前可以真空離心乾燥。

(九)方法九

利用液相羧甲基化 (carboxymethylation) 反應，達成半胱胺酸 - 胱胺酸還原及烷化。

1. 儲備溶液：如同方法八配製。

2. 羧甲基化溶液：配製含 100 mg/mL 碘乙醯胺 (iodoacetamide) 之乙醇溶液。

3. 緩衝溶液：配製還原溶液如同方法八。

4. 步驟：

取檢品溶於緩衝溶液 50 μL 中，加入儲備溶液 III 約 2.5 μL ，於氮氣或氬氣的保護下，避光置室溫 2 小時，再加入硫醇 (thiols) 理論總量 1.5 倍體積之羧甲基化溶液，避光置於室溫 30 分鐘 (註：若蛋白質中硫醇量未知，則每 20 nmol 蛋白質加入 100 mM 碘乙醯胺 5 μL)。可加入過量 2- 巰基乙醇終止此反應。藉由逆相高效液相層析分離使蛋白質 / 肽脫鹽，收集之檢品於酸水解前，可利用真空離心乾燥。反應生成之 *S*- 甲醯胺 - 甲基半胱胺酸 (*S*-carboxyamido methylcysteine) 於酸水解時會轉化為 *S*- 羧甲基半胱胺酸 (*S*-carboxymethyl-cysteine)。

(十)方法十

利用二巰基二羥基乙酸 (dithiodiglycolic acid) 或二巰基二丙酸 (dithiodipropionic acid) 與半胱胺酸 - 胱胺酸反應，產生二巰化物混合物 (註：選擇使用二巰基二羥基乙酸或二巰基二丙酸取決於所需胺基酸分析方法之解析度)。

1. 還原溶液：含 10 mg/mL 二巰基二羥基乙酸或二巰基二丙酸之 0.2 M 氫氧化鈉溶液。

2. 步驟：

取檢品約 20 μg 置於水解試管中，加入還原溶液 5 μL ，再加入異丙醇 (isopropyl alcohol) 10 μL ，並以真空離心移除檢品中所有液體，最後以方法一進行水解，本法之優點為其他胺基酸不會有衍生化副反應，且檢品於水解前不需脫鹽。

採方法十一

進行酸水解時，天冬醯胺酸及麩醯胺酸會分別轉化為天冬胺酸及麩胺酸。因此進行胺基酸分析時，會以 Asx 來表示天冬醯胺酸及天冬胺酸加總的量，而 Glx 則表示麩醯胺酸與麩胺酸加總的量。於本法中，將蛋白質 / 肽與雙 (1,1- 三氟乙醯氧基) 碘基苯 (bis (1,1-trifluoroacetoxy) iodobenzene, BTI) 作用，於酸水解時可將天冬醯胺酸及麩醯胺酸分別轉化為二胺基丙酸 (diaminopropionic acid) 及二胺基丁酸 (diaminobutyric acid)。此殘基轉換方法，在蛋白質 / 肽中含有天冬胺酸及麩胺酸殘基時，仍能對天冬醯胺酸及麩醯胺酸加以定量。

1. 還原溶液：配製下列三種溶液，並過濾。

(1) 溶液 I：10 mM 三氟乙酸溶液。

(2) 溶液 II：含 5 M 胍鹽酸鹽及 10 mM 三氟乙酸之溶液。

(3) 溶液 III：新鮮配製含 36 mg/mL BTI 之二甲基

甲醯胺 (dimethylformamide) 溶液。

2. 步驟：

取檢品約 200 μg 置乾淨水解試管中，加入溶液 I 或溶液 II 2 mL 與溶液 III 2 mL，於真空下密封水解試管。檢品避光並於 60° 加熱 4 小時，接著以水進行透析以移除多餘試劑，再以同體積之乙酸丁酯萃取該透析後之檢品 3 次後冷凍乾燥。該蛋白質可藉由前述步驟進行酸水解。由於在胺基酸分析時，離子交換層析法通常無法區分離胺酸及 α -、 β - 二胺基丙酸與 α -、 γ - 二胺基丁酸，因此，若使用離子交換作為分離胺基酸的方法，檢品中天冬醯胺酸及麩醯胺酸之含量可以由比較非衍生化與 BTI- 衍生化酸水解所得之天冬胺酸及麩胺酸含量差異而得。(註：蘇胺酸、甲硫胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、組胺酸測得之含量會受 BTI 衍生化之影響，故如欲分析檢品中前述胺基酸之含量，應進行一無 BTI- 衍生化之水解反應)。

十、胺基酸分析方法學一般通則

目前已有許多胺基酸分析技術，且這些技術的選擇常取決於分析所需的靈敏度。一般而言，約有半數之方法係藉由離子交換層析法分離游離胺基酸並搭配後續的管柱後衍生化(如茚三酮(ninhydrin)或鄰苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde, OPA))來進行分析。管柱後偵測技術能應用於含有微量緩衝成分(如鹽類或尿素)之檢品，通常每次分析需蛋白質檢品 5 ~ 10 μg 。其餘胺基酸分析技術通常涉及游離胺基酸之管柱前衍生化，如異硫氰酸苯酯(phenyl isothiocyanate, PITC)、6-胺基喹啉基-N-羥基琥珀醯亞胺基胺基甲酸酯(6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC)或鄰苯二甲醛、(二甲基-胺基)環偶氮基-苯磺醯氯((dimethyl-amino) azo-benzene sulfonyl chloride, DABS-Cl)、氟甲酸-9-芴甲酯(9-fluorenylmethyl chloroformate, FMOC-Cl)及7-氟-4-硝基苯并-2-氧-1,3-二唑(7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, NBD-F)，並搭配後續的逆相高效液相層析技術。管柱前衍生化技術非常靈敏，每次分析所需蛋白質檢品通常為 0.5 ~ 1.0 μg ，但此技術可能會受到檢品中緩衝鹽類的影響，也可能導致特定胺基酸產生多種衍生物，增加結果判讀複雜度。與管柱前衍生化技術相比，管柱後衍生化技術則通常較少受到試驗中操作變異的影響。

下述方法可用於定量胺基酸分析，所使用之儀器及試劑耗材均可於市面上取得。此外，這些方法又各有各種修訂版本，其中或在試劑配製、反應步驟與層析裝置上有所調整，具體的參數可能因實際使用儀器與操作方法而有差異。許多實驗室會採用不只一種胺基酸分析技術，以擷取各方法之優點。以下各法中，類

比訊號皆透過資料擷取系統來視覺化，並積分波峰面積以進行量化。

(一)方法一——管柱後茚三酮偵測法一般通則

離子交換層析輔以管柱後茚三酮偵測法是定量胺基酸分析中最常使用的方法之一。通常會用鋰-陽離子交換系統(Li-based cation-exchange system)來分析較複雜的生理檢品；速度較快的鈉-陽離子交換系統(Na-based cation-exchange system)則用於分析蛋白質水解產物中之較單純胺基酸混合物(通常含 17 種胺基酸組成)。離子交換管柱中胺基酸的分離是透過 pH 值搭配陽離子強度的變化達成，溫度梯度也常用於提升分離效果。

當胺基酸與茚三酮反應時，會產生特徵性的紫色或黃色產物。除亞胺基酸(imino acids)外，所有胺基酸的反應物會呈紫色，最大吸收波長為 570 nm；如脯胺酸(proline)等亞胺基酸則呈黃色，最大吸收波長為 440 nm。於此法中，以 440 nm 及 570 nm 來監測茚三酮與自管柱沖提出之胺基酸進行之反應，所得之層析圖可用於判定胺基酸組成。

大部分胺基酸衍生物的偵測極限為 10 pmol，但脯胺酸為 50 pmol。在 20 ~ 500 pmol 範圍內具線性關係，其相關係數超過 0.999。為獲得良好之蛋白質/肽組成分析結果，水解前之蛋白質檢品含量最好大於 1 μg 。

(二)方法二——管柱後鄰苯二甲醛螢光偵測法一般通則

在硫醇化合物存在下，鄰苯二甲醛與一級胺反應可形成高螢光性的異吲哚(isoindole)產物。在以離子交換層析進行胺基酸分析時，此反應係用於管柱後衍生化，其分離方式與方法一相同。

雖然鄰苯二甲醛不能與二級胺(亞胺基酸，如脯胺酸)反應產生螢光物質，但可透過次氯酸鈉氧化，使鄰苯二甲醛與二級胺反應。此過程採用強酸性陽離子交換管柱分離游離胺基酸，接著再利用次氯酸鈉進行管柱後氧化作用，並使用鄰苯二甲醛及硫醇化合物，如 N-乙醯-L-半胱胺酸(N-acetyl-L-cysteine)及 2-巰基乙醇進行管柱後衍生化。一級胺基酸的衍生化，不因次氯酸鈉的連續供給而受明顯影響。

離子交換管柱中胺基酸的分離，是透過 pH 值搭配陽離子強度的變化來達成，在利用鄰苯二甲醛進行管柱後胺基酸衍生化後，反應物隨即通過螢光檢測器。胺基酸之鄰苯二甲醛衍生物可以波長為 348 nm 之激發光激發，並偵測其在波長 450 nm 之螢光強度。

大多數胺基酸衍生物之偵測極限約為數十(a few tens) pmol。在數 pmol 到數十 nmol 的範圍內具線性關係。為獲得良好的蛋白質/肽之組成分析結果，水解前之蛋白質檢品含量最好大於 500 ng。

(三)方法三——異硫氰酸苯酯管柱前衍生化一般通則

異硫氰酸苯酯與胺基酸反應形成苯胺硫甲醯基 (phenylthiocarbonyl, PTC) 衍生物, 可在波長 254 nm 處進行高靈敏度偵測, 因此, 可利用胺基酸與異硫氰酸苯酯進行管柱前衍生化, 再藉由逆相高效液相層析分離並以紫外光偵測之方式分析胺基酸組成。

於真空中移除試劑後, 其衍生化胺基酸可冷凍乾燥保存數週, 而無明顯降解。若注入用之溶液保持冰冷, 即使存放 3 日後之層析反應亦無明顯變化發生。

利用正十八烷二氧化矽 (octadecyl-silica, ODS) 管柱進行逆向層析分離苯胺硫甲醯基化 - 胺基酸 (PTC-amino acids) 時, 是以乙腈 (acetonitrile) 濃度搭配緩衝離子強度的變化來達成。自管柱沖提出之苯胺硫甲醯基化胺基酸係在波長 254 nm 處進行偵測。

大部分胺基酸衍生物的偵測極限為 1 pmol, 在 20 ~ 500 pmol 範圍內具線性關係, 其相關係數超過 0.999。為獲得良好的蛋白質 / 肽之組成分析結果, 水解前之蛋白質檢品含量最好大於 500 ng。

(四)方法四——AQC 管柱前衍生化一般通則

利用 AQC 與胺基酸進行管柱前衍生化, 再藉由逆相高效液相層析分離並以螢光偵測方法進行分析。

AQC 與胺基酸反應, 形成安定且具螢光性的不對稱之尿素衍生物 (AQC-amino acids), 此衍生物可於逆相高效液相層析中進行分析, 因此, 可利用胺基酸與 AQC 進行管柱前衍生化, 搭配後續的逆相高效液相層析分離進行胺基酸組成分析。

利用 ODS 管柱分離 AQC- 胺基酸時, 是透過乙腈濃度搭配鹽類濃度的變化來達成, 衍生物可以波長為 250 nm 之激發光激發, 而後在波長 395 nm 處偵測其發散之螢光, 此特性使直接注入之反應混合物不致受到來自唯一主要螢光性副產物 (6- 胺基喹啉 (6-aminoquinoline)) 的顯著干擾。過量試劑會快速水解 ($t_{1/2} < 15$ 秒) 產生 6- 胺基喹啉、*N*- 羥基琥珀醯亞胺 (*N*-hydroxysuccinimide) 及二氧化碳, 反應約 1 分鐘後便不再發生任何衍生化。

基本上 AQC- 胺基酸檢品的波峰面積分析, 在室溫至少可維持 1 週不變, 因此衍生物具有足夠的安定性能進行隔夜自動層析分析。

除半胱胺酸外, 各胺基酸的偵測極限大約介於 40 ~ 320 fmol 之間, 半胱胺酸偵測極限則約為 800 fmol。在 2.5 ~ 200 μ M 範圍內具線性關係, 其相關係數超過 0.999。僅需約 30 ng 的蛋白質 / 肽, 即可由其衍生化蛋白質水解產物獲得良好的胺基酸組成分析結果。

(五)方法五——鄰苯二甲醯管柱前衍生化一般通則

利用鄰苯二甲醯與胺基酸進行管柱前衍生化, 再藉由逆相高效液相層析分離並以螢光偵測方式進行分析。當胺基酸為二級胺 (如脯胺酸) 時無法以此技術進行分析。

鄰苯二甲醯與硫醇試劑結合, 可與一級胺反應形成高螢光性的異吡啶產物。2- 巰基乙醇與 3- 巰基丙酸 (3-mercaptopropionic acid) 皆能作為硫醇試劑之用。鄰苯二甲醯本身並不帶有螢光基團, 因而不會產生螢光偵測的干擾峰, 此外, 鄰苯二甲醯在水溶液中的溶解度、安定性以及快速反應動力學等特性, 使其衍生化可以自動取樣儀取樣並混和試劑與檢品, 進而進行自動衍生化及分析。然而, 無法與二級胺反應為其主要缺點, 為彌補此方法無法偵測二級胺類胺基酸 (如脯胺酸) 的缺點, 可將此技術與方法七或方法八所述之技術合併使用。

管柱前衍生化中與鄰苯二甲醯反應的胺基酸可利用逆相高效液相層析分離。因鄰苯二甲醯 - 胺基酸衍生物不安定, 衍生化後須立即執行高效液相層析分離及分析。所使用之液相層析裝置配置有螢光偵測器可測定胺基酸衍生物。鄰苯二甲醯 - 胺基酸衍生物以波長為 348 nm 的激發光激發, 並偵測其在波長 450 nm 處發散之螢光。雖曾有文獻指出偵測極限可低至 50 fmol, 但實際操作上之偵測極限為 1 pmol。

(六)方法六——DABS-Cl 管柱前衍生化一般通則

利用 DABS-Cl 與胺基酸進行管柱前衍生化, 再藉由逆相高效液相層析分離並以可見光偵測。

DABS-Cl 為一常用於標記胺基酸之呈色試劑, 被標記之胺基酸 (DABS- 胺基酸) 極為安定, 其最大吸收波長為 436 nm。

19 種天然的胺基酸之 DABS 衍生物, 能藉由 ODS 管柱、乙腈及緩衝混合液的梯度系統之逆相高效液相層析分離。DABS- 胺基酸自管柱沖提出後, 在可見光波長 436 nm 處偵測。

本法可分析如脯胺酸等亞胺基酸, 其靈敏度與其他胺基酸相同。蛋白質 / 肽藉由前述蛋白質水解方法二中之巰基乙磺酸、對甲苯磺酸 (*p*-toluenesulfonic acid) 或甲磺酸 (methanesulfonic acid) 等磺酸水解, 則可對色胺酸殘基進行同步定量。至於其他酸不安定之殘基 (天冬醯胺酸及麩醯胺酸), 也可透過 BTI 之處理, 將其分別轉化為二胺基丙酸及二胺基丁酸進行分析 (如蛋白質水解方法十一所述)。

正白胺酸 (為一非蛋白源胺基酸 (nonproteinogenic amino acid)) 無法作為本法的內部標準品, 因其沖提後在層析圖譜中之波峰位置與一級胺基酸波峰相近; 而硝基酪胺酸的波峰位於圖

譜空白區域 (clean region)，故可作為內部標準品。

DABS-胺基酸之偵測極限約為 1 pmol。個別 DABS-胺基酸僅需約 2 ~ 5 pmol 即可得到可信之定量分析結果，且每次分析僅需 DABS 化蛋白質 (dabsylated protein) 水解產物 10 ~ 30 ng。

(七)方法七——FMOC-Cl 管柱前衍生化一般通則

利用 FMOC-Cl 與胺基酸進行管柱前衍生化，再藉由逆相高效液相層析分離並以螢光偵測。

FMOC-Cl 能與一級胺及二級胺反應形成具高螢光性產物。將 FMOC-Cl 與胺基酸在溫和之水溶液條件下反應，30 秒即可反應完全。其衍生物安定，其中僅組胺酸衍生物會被分解。雖然 FMOC-Cl 本身帶有螢光基團，但過量的試劑與螢光性副產物可在不會造成 FMOC-胺基酸損失的條件下去除。

FMOC-胺基酸衍生物使用 ODS 管柱以逆相高效液相層析分離。於以 50 : 40 : 10 容積比混合之乙酸緩衝液、甲醇與乙腈混合液及以 50 : 50 容積比混合之乙腈與乙酸緩衝液間線性調整梯度，可於 20 分鐘內分離 20 種胺基酸衍生物。自管柱沖提出之各衍生物以波長為 260 nm 之激發光激發，並偵測其在波長 313 nm 處發散之螢光。

此方法的偵測極限落在 fmol 範圍內，且大多數胺基酸之線性範圍在 0.1 ~ 50 μM。

(八)方法八——NBD-F 管柱前衍生化一般通則

利用 NBD-F 與胺基酸進行管柱前衍生化，再藉由逆相高效液相層析分離，並以螢光偵測。

NBD-F 與一級胺或二級胺反應而形成具高螢光性產物，將胺基酸與 NBD-F 於 60° 加熱 5 分鐘，使其形成 NBD 化衍生物。

NBD-胺基酸衍生物使用 ODS 管柱，以逆相高效液相層析分離。分離方式採用乙腈與緩衝混合液進行梯度沖提，可在 35 分鐘內分離 17 種胺基酸衍生物。 ϵ -胺基己酸 (ϵ -aminocaproic acid) 因沖提後波峰位於圖譜空白區域，可作為內部標準品。自管柱沖提出之各衍生物以波長為 480 nm 之激發光激發，並偵測其在波長 530 nm 處發散之螢光。

此方法之靈敏度與 OPA 管柱前衍生化者 (方法五) 相當，但本法可與脯胺酸反應，是 OPA 法所無之優勢。

此方法偵測極限約為 10 fmol。為進行組成分析，於注入高效液相層析中之管柱前標記反應混合物中需含蛋白質水解產物約 1.5 mg。

十一、數據計算與分析

在測定蛋白質 / 肽水解物的胺基酸含量時，應注意酸水解步驟會破壞色胺酸與半胱胺酸，並部分分解絲胺酸與蘇胺酸，而含異白胺酸與纈胺酸殘基之肽鍵僅部分被水解，甲硫胺酸則於酸水解中發生氧化，另甘

胺酸與絲胺酸等為常見的汙染物。於汽相水解時在反應槽上部適當抽真空 (使其氣壓小於 200 μmHg (或 26.7 Pa))，或導入惰性氣體 (氬氣)，可減少氧化分解程度。因上述原因，從蛋白質 / 肽水解物中得到之半胱胺酸、色胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸、甘胺酸與絲胺酸定量結果可能變異性較大，因而需將之納入考量，進行更進一步的研究。

計算：

1. 胺基酸的莫耳百分比

此表示蛋白質中每 100 個殘基中所含特定胺基酸殘基的數目。當欲分析之蛋白質 / 肽之分子量為未知時，或可用此數據評估胺基酸分析結果，亦可以此做為蛋白質鑑別之佐證及其他應用。依附錄中相關步驟小心鑑定並積分試驗所得之波峰面積，按下式計算檢品中各個胺基酸之莫耳百分比：

$$100 r_U / r$$

r_U ：特定胺基酸之波峰值 (nmol)

r ：檢品中所有胺基酸波峰值之總和 (nmol)

將所得結果與已知蛋白質之胺基酸莫耳百分比比對，可能會有助於鑑別此蛋白質檢品或做為鑑別之佐證。

2. 未知蛋白質檢品分析

此數據分析技術可依據胺基酸分析結果估算未知檢品的蛋白質濃度。依下式計算各個胺基酸之回收量 (μg)：

$$mM_w / 1000$$

m ：特定胺基酸之回收量 (nmol)

M_w ：該特定胺基酸之分子量，扣除肽鍵形成過程中脫去的水分子量

經過對部分與完全分解的胺基酸之適當校正後，由回收胺基酸的質量總和，可以推估所分析之蛋白質的總量。若可獲知未知蛋白質的分子量 (藉由 SDS-PAGE 分析或質譜學)，則可預測此未知蛋白質之胺基酸組成。按下式計算各胺基酸殘基之數目：

$$m / (1000M / M_{WT})$$

m ：特定胺基酸之回收量 (nmol)

M ：蛋白質總質量 (μg)

M_{WT} ：未知蛋白質之分子量

3. 已知蛋白質檢品分析

可依據胺基酸分析結果，利用此數據分析技術估算一已知其分子量與胺基酸組成之蛋白質檢品的胺基酸組成與蛋白質濃度。當欲分析的蛋白質組成為已知時，此結果將有助於更進一步了解某些胺基酸的回收率較佳，某些胺基酸卻可能因為完全或部分分解 (如色胺酸、半胱胺酸、蘇胺酸，絲胺酸與甲硫胺酸)、肽鍵水解不完全 (即異白胺酸與纈胺酸)，或游離胺基酸汙染 (即被甘胺酸與絲胺酸汙

染)等因素,使回收率受到影響。

回收率佳的胺基酸較能代表該蛋白質,故可選用來定量該蛋白質。通常具良好回收率之胺基酸有天冬胺酸-天冬醯胺酸、麩胺酸-麩醯胺酸、丙胺酸、白胺酸(leucine)、苯丙胺酸(phenylalanine)、離胺酸與精胺酸(arginine),以上可依各分析系統之使用經驗再作調整。將各回收率良好之胺基酸量(以nmol為單位表示),除以該胺基酸之預期殘基數目,可得蛋白質含量。再將由各回收率良好之胺基酸計算而得之蛋白質含量結果平均,前述求得之蛋白質含量應均勻散佈於此均值附近。捨棄偏差值過大(一般當變異超過5%時,可視為偏差過大)之蛋白質含量數據,再由剩餘胺基酸所得之蛋白質含量重新計算平均值,以推得檢品中之蛋白質含量。將各胺基酸含量除以計算得出之平均蛋白質含量,以判定該分析檢品之胺基酸組成。按下列公式計算相對組成誤差(relative compositional error)百分比:

$$100 m/m_s$$

m :由實驗求得之個別胺基酸殘基含量(nmol)

m_s :已知該胺基酸之殘基數目

平均相對組成誤差為個別胺基酸相對組成誤差絕對值之平均,計算通常會將色胺酸及半胱胺酸排除。平均相對組成誤差可提供關於分析系統長期安定性之重要資訊。若由蛋白質檢品得到之胺基酸組成與已知數值一致,可做為檢品中蛋白質的鑑別與純度分析之佐證。

十二、附錄

以下列舉胺基酸分析法中所述各法之特定步驟。

(一)方法一——管柱後茚三酮偵測法
以下僅列一種管柱後茚三酮偵測法,尚有許多其他可搭配市售儀器與試劑之檢測法可採用。

1. 移動相製備:

(1)溶液A:取無水檸檬酸鈉(anhydrous sodium citrate) 1.7 g與鹽酸 1.5 mL至 100-mL 容量瓶中,加水定容混勻,必要時以鹽酸調整 pH 值至 3.0。

(2)溶液B:取無水檸檬酸鈉 1.7 g與鹽酸 0.7 mL至 100-mL 容量瓶中,加水定容混勻,必要時以鹽酸調整 pH 值至 4.3。

(3)溶液C:配製含 5% 氯化鈉、1.9% 無水檸檬酸鈉及 0.1% 酚的水溶液,調整 pH 值至 6。

(4)管柱再生溶液:配製含 0.8% 氫氧化鈉的水溶液,調整 pH 值至 13。

(5)移動相溶劑:按層析裝置項下規定採用溶液A、溶液B與溶液C之不同比例混液。

2. 管柱後試劑:取茚三酮 18 g與茚氮蘭(hydrindantin) 0.7 g,加至含 76.7% 二甲基

亞砷、0.7% 二水合乙酸鋰(dihydrate lithium acetate)及 0.1% 乙酸的混液 900 mL中,於惰性氣體(如氮氣)混和至少 3 小時。(註:此試劑於惰性氣體並於 2~8° 貯存,可維持安定 30 日)。

3. 緩衝溶液:配製含 2% 無水檸檬酸鈉、1% 鹽酸溶液、0.5% 硫二甘醇(thiodiglycol)及 0.1% 苯甲酸(benzoic acid)之水溶液,並調整 pH 值至 2。

4. 層析裝置:

液相層析裝置具波長 440-、570- 或 690-nm 檢測器,4.0-mm×120-mm 層析管,充填直徑 7.5 μm 磺酸化苯乙烯-二乙烯苯共聚物(sulfonated styrene-divinylbenzene copolymer)。層析管初始溫度設定為 48°,11.5 分後以每分鐘 3° 之速率升溫至 65°;於約第 35 分鐘時,以相同速率升溫至 77°;在第 52 分鐘時,再以每分鐘 3° 之速率降溫至 48°。移動相溶劑流速每小時約 14 mL。按下列設定程序自動作線性轉變層析:

時間(分)	溶液A (%)	溶液B (%)	溶液C (%)	管柱再生溶液 (%)
0~25	100	0	0	0
25~37	0	100	0	0
37~75	0	0	100	0
75~76	0	0	0	100
76~87	100	0	0	0

5. 步驟與管柱後反應:將經冷凍乾燥的蛋白質/肽水解物於緩衝溶液中回溶,取適量注入層析裝置,依上述設定程序分析。當胺基酸自管柱中沖提出時,會通過 T 型管,與流速為每小時 7 mL 的管柱後試劑混和後,再通過 135° 之管狀反應器,於此形成特徵性之紫色或黃色,再繼續通過配有 12-mm 的流通光析管之比色計(colorimeter)。自光析管發散出之光線分散出 3 條光束,透過檢測器搭配之濾鏡分別於波長為 440、570 或 690 nm 處偵測並進行分析。其中,波長為 690 nm 的訊號可於訊號處理時移除,來改善訊噪比;另可將波長為 440 nm (亞胺基酸)與 570 nm (胺基酸)時所得的訊號相加,以簡化數據處理。

(二)方法二——管柱後鄰苯二甲醯(OPA)螢光偵測
於此僅列一種管柱後 OPA 螢光偵測法如下:

1. 移動相製備:

(1)溶液A:取氫氧化鈉、檸檬酸及乙醇溶於高效液相層析等級水中,配製成鈉濃度為 0.2 N 並含 7%w/v 乙醇之溶液,調整 pH 值至 3.2。

(2)溶液B:取氫氧化鈉及檸檬酸溶於高效液相層

析等級水中，配製成鈉濃度為 0.6 N 之溶液，調整 pH 值至 10.0。

(3) 溶液 C：0.2 N 氫氧化鈉。

(4) 移動相溶劑：按層析裝置項下規定採用溶液 A、溶液 B 與溶液 C 之不同比例混液。

2. 管柱後試劑製備：

(1) 鹼性緩衝液：配製含 384 mM 碳酸鈉、216 mM 硼酸及 108 mM 硫酸鉀之溶液，並調整 pH 值至 10.0。

(2) 次氯酸鹽試劑 (hypochlorite reagent)：於鹼性緩衝液 1 L 中加入氯濃度為 10% 的次氯酸鈉溶液 0.4 mL。(註：次氯酸鈉溶液可安定貯存 2 週)。

(3) 鄰苯二甲醛 (OPA) 試劑：取 *N*-乙醯-L-半胱胺酸 2 g 及鄰苯二甲醛 1.6 g 至 15-mL 容量瓶中，以乙醇溶解、稀釋至定容並混勻。取此液及 10% 月桂醇聚氧乙烯 (23) 醚 (polyethylene (23) lauryl ether) 水溶液 4 mL 至 1-L 容量瓶中，並以鹼性緩衝液 980 mL 稀釋並混勻。

3. 層析裝置：

液相層析裝置具激發波長設定為 348-nm，並可於波長 450-nm 偵測發散螢光之檢測器，4.0-mm × 150-mm 層析管，充填直徑 7.5 μm 氫型磺酸化苯乙烯-二乙烯苯共聚物 (sulfonated cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer in the hydrogen form) 之強陽離子交換樹脂。層析管溫度設定於 50°。移動相溶劑流速每分鐘約 0.3 mL。按下列設定程序自動作線性轉變層析：

時間 (分)	溶液A (%)	溶液B (%)	溶液C (%)
0	100	0	0
0~20	100→85	0→15	0
20	40	60	0
20~38	40→0	60→100	0
38~45	0	100	0
45~51	0	0	100
51~59	100	0	0

4. 步驟及管柱後反應：注入各個待測胺基酸約 1.0 nmol 於層析裝置，並按層析裝置指示操作。溶液流出管柱後會與次氯酸鹽試劑混和。此混合物通過管柱後第一反應器 (含 0.5-mm × 2-m 不銹鋼管)，緊接其下游為與管柱後第一反應器相似設計之管柱後第二反應器，管柱後 OPA 反應於此進行，反應溫度設定於 55°。次氯酸鹽試劑及 OPA 試劑流速皆為每分鐘 0.2 mL，使次氯酸鹽試劑、OPA 試劑及管柱流出

物之混合物離開管柱反應器的總流速為每分鐘 0.7 mL，因此造成在 OPA 管柱後反應器中滯留時間約有 33 秒。於管柱後衍生化之後，管柱流出物會通過螢光偵測器。

(三) 方法三——管柱前 PITC 衍生化法

於此僅列一種管柱前 PITC 衍生化法如下：

1. 移動相製備：

(1) 溶液 A：0.05 M 醋酸銨 (ammonium acetate)，以磷酸調整 pH 值至 6.8。

(2) 溶液 B：配製 0.1 M 醋酸銨，以磷酸調整 pH 值至 6.8，再將此液以 1:1 之容積比與乙腈混勻。

(3) 溶液 C：配製乙腈：水 (70:30) 之混液。

(4) 移動相溶劑：按層析裝置項下規定採用溶液 A、溶液 B 與溶液 C 之不同比例混液。

2. 衍生化試劑製備：

(1) 偶合緩衝液 (coupling buffer)：配製乙腈：吡啶：三乙胺 (triethylamine)：水 (10:5:2:3) 之混液。

(2) 檢品溶劑：配製乙腈：水 (7:2) 之混液。

3. 檢品衍生化步驟：將冷凍乾燥之檢品溶於偶合緩衝液 100 μL 中，以真空離心方式乾燥 (若先前有進行蛋白質水解，則此步驟可除去其中各種鹽酸鹽)，再以偶合緩衝液 100 μL 溶解，並加入 PITC 5 μL，置於室溫 5 分鐘。回溶檢品再次以真空離心乾燥後，以檢品溶劑 250 μL 溶解。

4. 層析裝置：

液相層析裝置具波長 254-nm 檢測器，4.6-mm × 250-mm 層析管，充填直徑 5 μm 十八矽烷鍵結之多孔性矽石、無孔性矽石或陶瓷微粒 (octadecyl silane chemically bonded to porous or nonporous silica or ceramic microparticles)。層析管溫度維持 52°。移動相溶劑流速每分鐘約 1 mL。按下列設定程序自動作線性轉變層析：

時間 (分)	溶液A (%)	溶液B (%)	溶液C (%)
0	100	0	0
0~15	100→85	0→15	0
15~30	85→50	15→50	0
30~40	0	0	100
40	100	0	0

5. 步驟：注入各個待測 PITC-胺基酸約 1.0 nmol (檢品 10 μL 溶於檢品溶劑中) 於層析裝置分析，並按照層析裝置指示操作。

(四) 方法四——管柱前 AQC 衍生化法

於此僅列一種管柱前 AQC 衍生化法如下：

1. 移動相製備：

(1) 溶液 A：配製含 140 mM 醋酸鈉 (sodium acetate) 與 17 mM 三乙胺之溶液，並以磷酸調整 pH 值至 5.02。

(2) 溶液 B：配製乙腈：水 (60：40) 之混液。

(3) 移動相溶劑：按層析裝置項下規定採用溶液 A 與溶液 B 之不同比例混液。

2. 檢品衍生化步驟：取檢品 2 µg 溶於 15 mM 鹽酸 20 µL 中，並以 pH 8.8 的 0.2 M 硼酸鹽 (borate) 緩衝液稀釋至 80 µL。加入 10 mM AQC 乙腈溶液 20 µL 以啟動衍生化，置於室溫反應 10 分鐘。

3. 層析裝置：

液相層析裝置具激發波長設定為 250-nm，並可於波長 395-nm 偵測發散螢光之檢測器，3.9-mm×150-mm 層析管，充填直徑 4 µm 十八矽烷鍵結之多孔性矽石或陶瓷微粒。層析管溫度維持於 37°。移動相溶劑流速每分鐘約 1 mL。按下列設定程序自動作線性轉變層析：

時間 (分)	溶液A (%)	溶液B (%)
0	100	0
0~0.5	100→98	0→2
0.5~15	98→93	2→7
15~19	93→87	7→13
19~33	87→68	13→32
33~38	0	100
38~48	100	0

4. 步驟：注入各個待測 AQC- 胺基酸約 0.05 nmol 於層析裝置，並按照層析裝置指示操作。

(iv) 方法五——管柱前 OPA 衍生化法

於此僅列一種管柱前 OPA 衍生化法如下：

1. 移動相製備：

(1) 溶液 A：配製 100 mM 醋酸鈉 (pH 7.2)：甲醇：四氫呋喃 (tetrahydrofuran) (900：95：5) 之混液。

(2) 溶液 B：甲醇。

(3) 移動相溶劑：按層析裝置項下規定採用溶液 A 與溶液 B 之不同比例混液。

2. 衍生化試劑：取 OPA 50 mg 溶於蛋白質定序等級的甲醇 1.25 mL 中，並加入 2- 巰基乙醇 50 µL 與 0.4 M 硼酸鈉 (sodium borate, pH 9.5) 11.2 mL 混勻 (註：此試劑可安定貯存 1 週)。

3. 檢品衍生化步驟：取檢品 5 µL 至適當容器中，加入衍生化試劑 5 µL 混勻。反應 1 分鐘後，加入 pH 7.0 的 0.1 M 醋酸鈉至少 20 µL，並取此混液 20 µL 進行分析 (註：檢品衍生化時，使用之試劑體積可能會有差異，建議於定量分析時使用

如正白胺酸等內部標準品。此衍生化多採自動化線上方式進行。由於 OPA- 胺基酸衍生物較不安定，於衍生化反應後須立即執行高效液相層析分離及分析)。

4. 層析裝置：

液相層析裝置具激發波長設定為 348-nm，並可於波長 450-nm 偵測發散螢光之檢測器，4.6-mm×75-mm 層析管，充填直徑 3 µm 多孔性矽石微粒 (porous silica particles)。層析管溫度維持於 37°。移動相溶劑流速每分鐘約 1.7 mL。按下列設定程序自動作線性轉變層析：

時間 (分)	溶液A (%)	溶液B (%)
0	92	8
0~2	92→83	8→17
2~5	83	17
5~10	83→54	17→46
10~12	54	46
12~14	54→34	46→66
14~15	34	66
15~15.3	34→20	66→80
15.3~17.9	20	80
17.9~18.5	20→92	80→8
18.5~19.1	92	8

5. 步驟：注入各個待測 OPA- 胺基酸約 0.02 nmol 於層析裝置，並按照層析裝置指示操作。

(v) 方法六——管柱前 DABS-Cl 衍生化法

於此僅列一種管柱前 DABS-Cl 衍生化法如下：

1. 移動相製備：

(1) 溶液 A：配製含 4% 二甲基甲醯胺之 25 mM 醋酸鈉 (pH 6.5) 之溶液。

(2) 溶液 B：乙腈。

(3) 移動相溶劑：按層析裝置項下規定採用溶液 A 與溶液 B 之不同比例混液。

2. 衍生化試劑製備：

(1) 檢品緩衝液：50 mM 碳酸氫鈉，調整 pH 值至 8.1。

(2) 衍生化試劑：取 DABS-Cl 1.3 mg 溶於乙腈 1 mL 中 (註：衍生化步驟前新鮮配製)。

(3) 檢品稀釋緩衝液：配製 50 mM 磷酸鈉 (sodium phosphate, pH 7.0)：乙醇 (1：1) 之混液。

3. 檢品衍生化步驟：將檢品溶於檢品緩衝液 20 µL 中，加入衍生化試劑 40 µL 並混勻。檢品容器以矽橡膠密封於 70° 加熱 10 分鐘，檢品加熱過程中混合物會完全溶解。衍生化後，以適量的檢品稀釋緩衝液來稀釋檢品。

4. 層析裝置：

液相層析裝置具波長436-nm檢測器，4.6-mm×250-mm層析管，充填十八矽烷鍵結之多孔性矽石或陶瓷微粒。層析管溫度維持40°。移動相溶劑流速每分鐘約1 mL。按下列設定程序自動作線性轉變層析：

時間(分)	溶液A(%)	溶液B(%)
0	85	15
0~20	85→60	15→40
20~32	60→30	40→70
32~34	30	70

5. 步驟：注入 DABS- 胺基酸約 0.05 nmol 於層析裝置，並按照層析裝置指示操作。

(七)方法七——管柱前 FMOC-Cl 衍生化法

於此僅列一種管柱前 FMOC-Cl 衍生化法如下：

1. 移動相製備：

(1) 乙酸緩衝液：取冰醋酸 3 mL 及三乙胺 1 mL 置於 1-L 容量瓶中，並以高效液相層析等級水稀釋至定容，再以氫氧化鈉調整 pH 值至 4.20。

(2) 溶液 A：配製乙酸緩衝液：甲醇：乙腈 (50：40：10) 之混液。

(3) 溶液 B：配製乙腈：乙酸緩衝液 (50：50) 之混液。

(4) 移動相溶劑：按層析裝置項下規定採用溶液 A 與溶液 B 之不同比例混液。

2. 衍生化試劑製備：

(1) 硼酸緩衝液：配製 1 M 硼酸溶液，並以氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 6.2。

(2) 氯甲酸 9- 芴甲酯 (FMOC-Cl) 試劑：取氯甲酸 9- 芴甲酯 155 mg 溶於丙酮 40 mL 中並混勻。

3. 檢品衍生化步驟：取硼酸緩衝液 0.1 mL 與 FMOC-Cl 試劑 0.5 mL 加入檢品 0.4 mL。反應約 40 秒後，以戊烷 2 mL 萃取，隨後再以新鮮戊烷萃取。此含有胺基酸衍生物之水溶液即可注入儀器中進行分析。

4. 層析裝置：

液相層析裝置具激發波長設定為 260-nm，並可於波長 313-nm 偵測發散螢光之檢測器，4.6-mm×125-mm 層析管，充填直徑 3 μm 十八矽烷鍵結之多孔性矽石或陶瓷微粒。移動相溶劑流速每分鐘約 1.3 mL。按下列設定程序自動作線性轉變層析：

時間(分)	溶液A(%)	溶液B(%)	流速(mL/min)
0~3	100	0	1.3

3~12	100→0	0→100	1.3
12~12.5	0	100	1.3→2.0
12.5~20	0	100	2.0

5. 步驟：注入各個待測 FMOC- 胺基酸至少 0.01 nmol 於層析裝置，並按照層析裝置指示操作。FMOC- 組胺酸衍生物的反應值通常較其他 FMOC- 胺基酸衍生物為低。

(八)方法八——管柱前 NBD-F 衍生化法

於此僅列一種管柱前 NBD-F 衍生化法如下：

1. 移動相製備：

(1) 溶液 A：配製含有 75 mM 過氯酸鈉 (sodium perchlorate) 之 10 mM 檸檬酸鈉 (sodium citrate)，以鹽酸調整 pH 值至 6.2。

(2) 溶液 B：配製乙腈：水 (50：50) 之混液。

(3) 移動相溶劑：按層析裝置項下規定採用溶液 A 與溶液 B 之不同比例混液。

2. 衍生化試劑製備：

(1) 檢品緩衝液：0.1 M 硼酸溶液，以氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 9.2。

(2) 衍生化試劑：取 NBD-F 5 mg 溶於乙醇 1.0 mL 並混勻。

3. 檢品衍生化步驟：

取檢品溶於檢品緩衝液 20 μL 中，加入衍生化試劑 10 μL，均勻混和，並將檢品容器於 60° 加熱 5 分鐘。衍生化後，以溶液 A 300 μL 稀釋檢品。

4. 層析裝置：

液相層析裝置具激發波長設定為 480-nm，並可於波長 530-nm 偵測發散螢光之檢測器，4.6-mm×150-mm 層析管，充填直徑 5 μm 粒徑十八矽烷。層析管溫度維持 40°。移動相溶劑流速每分鐘約 1.0 mL。按下列設定程序自動作線性轉變層析：

時間(分)	溶液A(%)	溶液B(%)
0	94	6
0~16	94→63	6→37
16~21	63→62	37→38
21~30	62→0	38→100
30~35	0	100
35~37	0→94	100→6

5. 步驟：注入各個待測 NBD- 胺基酸約 15 pmol 於層析裝置，並按照層析裝置指示操作。

十三、胺基酸縮寫表

中文	英文	英文縮寫
----	----	------

甘胺酸	Glycine	Gly
絲胺酸	Serine	Ser
丙胺酸	Alanine	Ala
色胺酸	Tryptophan	Trp
蘇胺酸	Threonine	Thr
甲硫胺酸	Methionine	Met
半胱胺酸	Cysteine	Cys
胱胺酸	Cystine	Cys
異白胺酸	Isoleucine	Ile
纈胺酸	Valine	Val
天冬醯胺酸	Asparagine	Asn
麩醯胺酸	Glutamine	Gln
天冬胺酸	Aspartic acid	Asp
麩胺酸	Glutamic acid	Glu
酪胺酸	Tyrosine	Tyr
組胺酸	Histidine	His
離胺酸	Lysine	Lys
脯胺酸	Proline	Pro
白胺酸	Leucine	Leu
苯丙胺酸	Phenylalanine	Phe
精胺酸	Arginine	Arg