

氨基酸衍生化试剂盒（OPA 法，不含标准品）

CAT NO.: SDK1010

储存条件:2-8℃，1 year

规格: 25T/50T

产品简介：

衍生化主要是为了提高目标物质的可检测性，提高检测器对目标物质的响应。在弱碱溶液中，OPA 和 3-MPA 能够与氨基酸中的羰基和氨基发生反应，生成衍生物并通过紫外光激发后，发射出比激发光波长更长的光，称为荧光。衍生物的荧光强度与其浓度成正比，从而可以计算出样品中氨基酸的含量。这种方法具有测定快速、准确度高、灵敏度高、适用范围广等优点。

特别说明：开始实验前，请确保检测的目标氨基酸适用于 OPA 衍生化方法。

试验中所需的仪器和试剂：

高效液相色谱仪，配备 C18 色谱柱（4.6×250 mm，耐水性≥90%）、荧光（FLD）检测器、可调式移液枪、注射器、有机系滤膜、色谱级甲醇、乙醇、色谱级乙腈等。

产品组份（25T/50T）：

试剂盒组份		规格（25T）	规格（50T）	保存
衍生试剂	试剂一	60 mg×1 瓶 粉剂	120 mg×1 瓶 粉剂	2-8℃,避光
	试剂二	9.5 mL×1 瓶 液体	19 mL×1 瓶 液体	2-8℃
	试剂三	50 μL×1 瓶 液体	100 μL×1 瓶 液体	RT
流动相	流动相 A1	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	RT
	流动相 A2	液体×1 瓶	液体×2 瓶	RT
	流动相 A3	液体×1 瓶	液体×2 瓶	RT
	流动相 B	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	RT

注：1. 所有试剂注意密闭保存，防止挥发。
2. 衍生后的产物不稳定，易发生降解，需要及时检测。

实验步骤

一、实验前准备工作：

1. 流动相 A 的配制：取适量的超纯水分别在瓶内溶解流动相 A1、A2 和 A3，溶解后的流动相 A1、A2 和 A3 移至 1L 容量瓶中，并用适量的超纯水冲洗流动相 A1、A2 和 A3 的瓶壁 1-2 次并移至上述 1L 容量瓶中，以保证瓶内试剂完全被溶解移出，最后用超纯水将容量瓶定容至 1L。混匀，过 0.22 μm 有机相膜后待用。

2. 流动相 B 的配制：取适量的超纯水在瓶内溶解流动相 B，溶解后的流动相 B 移至 1L 容量瓶中，并用适量的超纯水冲洗流动相 B 的瓶壁 1-2 次并移至上述容量瓶中，然后加入 400 mL 的色谱级甲醇和 400 mL 的色谱级乙腈，最后用超纯水定容上述容量瓶至 1L。混匀，过 0.22 μm 有机相膜后待用。

3. 将配制好的流动相 A、B 超声 30 min，除去溶剂中的气体，防止阻塞色谱柱，影响实验结果。

4. 标准溶液的配制（标准品需用户自备）：取一定量氨基酸标准品，用 0.1M HCl 溶解为 100 $\mu\text{g/ml}$ 或 1mM 的标准溶液，过 0.22 μm 水相膜。

5. （25T）衍生试剂的配制：取 60 mg 试剂一加入 0.5 mL 色谱级乙醇、4.5 mL 试剂二和 50 μL 试剂三加入到棕色空瓶中（无标签），混匀，避光待用。按此配制可以获得约 5mL 的衍生化试剂，可以进行 25 次手动衍生，实际操作时需根据具体需求等倍增加或减少配制量。

（50T）衍生试剂的配制：取 120 mg 试剂一加入 1 mL 色谱级乙醇、9 mL 试剂二和 100 μL 试剂三加入到棕色空瓶中（无标签），混匀，避光待用。按此配制可以获得约 10mL 的衍生化试剂，可以进行 50 次手动衍生，实际操作时需根据具体需求等倍增加或减少配制量。

二、测定步骤：

1. 开启电脑、打开液相色谱仪各模块开关按钮（使用 FLD 检测器），安装上 C18 色谱柱（4.6 $\times$ 250 mm，耐水性 $\geq$ 90%），打开软件，在方法组中设置柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ ，流速为 1 mL/min，激发波长（ λ_{ex} ）为 340 nm，发射波长（ λ_{em} ）为 450 nm，洗脱程序如下表，走样时间 60 min，设置完毕保存方法组。

2. 进样前，需要用初始流动相平衡柱子，采用初始流动相（流动相 A：流动相 B=90:10）比例平衡色谱柱 30 min 或更久，待基线稳定后开始进样。

2.1 自动衍生（进样程序的设定）：吸取氨基酸标准溶液 1 μL 、2 μL 衍生试剂（提前过好 0.22 μm 有机相膜）、2 μL 试剂二（提前过好 0.22 μm 水相膜），空气中最大混合速度混合 5 次，等待 1 min，进样。

2.2 若色谱仪没有自动衍生功能，可选用手动衍生操作：吸取氨基酸标准溶液 100 μL 加入 200 μL 衍生试剂和 200 μL 的试剂二，涡旋 5 次，每次 30 s，静置 1 min 后过 0.22 μm 有机相膜，上样。

3. 实验需要同时做空白对照：即用等量 0.1M HCl 重复上述步骤，以排除干扰。

时间（min）	流动相/%	
	流动相 A	流动相 B
0	90	10
20	65	35
40	20	80
45	20	80
45.10	90	10
60	90	10

注：1. 由于液相仪器和色谱柱型号的不同，可以根据实际情况调整仪器设置条件。

2. 衍生试剂和流动相需现用现配。

3. 衍生后的产物不稳定，易发生降解，需要及时检测。

注意事项：

1. 该试剂盒内不包含标准品、色谱甲醇、乙醇和乙腈，需自备。

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

3. 该试剂仅用于科研领域，不适用于临床诊断或其他用途。

4. 如需订制产品，请与我们联系。