

# 氨基酸衍生化试剂盒（PITC 法，不含标准品）

CAT NO.: SDK1020

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。PITC（异硫氰酸苯酯）衍生化法主要用于氨基酸的分析，其原理是基于氨基酸的伯氨基与 PITC 在碱性条件下发生反应。氨基酸的 $\alpha$ -氨基具有亲核性，而异硫氰酸苯酯中的异硫氰酸基（ $-N=C=S$ ）是一个亲电试剂，两者能够发生亲核加成反应。反应首先生成苯胺基硫甲酰基（PTC-）氨基酸中间体，这个中间体不稳定，会在酸性条件下发生环化反应，形成苯硫乙内酰脲（PTC-）氨基酸。（PTC-）氨基酸具有良好的稳定性和色谱特性，很适合用于高效液相色谱（HPLC）等分析方法进行分离和检测。

**特别说明：开始实验前，请确保检测的目标氨基酸适用于 PITC 衍生化方法。**

## 试验中所需的仪器和试剂：

高效液相色谱仪、C18 色谱柱（4.6×250 mm，耐水性≥90%）、色谱级乙腈、正己烷（≥99%），超纯水、可调式移液枪、注射器、有机系滤膜和水系滤膜等。

## 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    | 90 $\mu$ L×1 瓶 液体 | 180 $\mu$ L×1 瓶 液体 | 2-8℃，避光 |
|       | 试剂二    | 1.05 mL×1 瓶 液体    | 2.1 mL×1 瓶 液体      | RT，避光   |
|       | 试剂三    | 1.25 mL×1 瓶 液体    | 2.5 mL×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，避光   |
|       | 流动相 A3 | 液体×1 瓶            | 液体×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：

- 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 和 A2，溶解后的流动相 A1 和 A2 移至 1L 容量瓶中，并用适量的超纯水冲洗流动相 A1 和 A2 的瓶壁 1-2 次移至上述 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，用流动相 A3 调节上述溶液 PH 至 6.2，过 0.22  $\mu$ m 有机相膜后待用。
- 流动相 B 的配制（需自备）：乙腈:水=4:1（v/v）混匀，过 0.22  $\mu$ m 有机相膜后待用。
- 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 µg/mL 或 1 mM 的标准溶液，过 0.22 µm 水相膜。

5. 衍生试剂 1 的配制：移取 90 µL 试剂一和 7.41 mL 的色谱级乙腈混匀。

6. 衍生试剂 2 的配制：移取 1.05 mL 试剂二和 6.45 mL 的色谱级乙腈混匀。

## 二、衍生步骤：

移取 50 µL 标准工作液置于带塞试管中加入 250µL 的衍生试剂 1 和 250 µL 衍生试剂 2，混匀，室温下放置 1 h 后，加入 50 µL 的试剂三，混匀。

## 三、萃取净化：

向上述衍生后的溶液中加入 1 mL 正己烷，涡旋混合器振荡 1 min，静置分层后，弃去上层溶液，采用针头注射器小心吸取下层溶液，经 0.45 µm 有机系滤膜过滤，用于液相色谱测定。

## 四、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 VWD 检测器），安装上 C18 色谱柱（4.6×250 mm，耐水性≥90%），打开软件，在方法组中设置柱温为 40 °C，流速为 1.0 mL/min，波长为 254 nm，进样量为 10 µL，洗脱程序如下表，走样时间 50 min，设置完毕保存方法组。

2. 进样前，需要用初始流动相平衡色谱柱，采用初始流动相（流动相 A：流动相 B=92:8）比例平衡柱子 30 min 或更久，待基线稳定后开始进样。

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 |
| 2       | 92    | 8     |
| 10      | 90    | 10    |
| 12      | 81    | 19    |
| 19      | 74    | 26    |
| 21      | 65    | 35    |
| 31      | 54    | 46    |
| 33      | 0     | 100   |
| 36      | 0     | 100   |
| 38      | 92    | 8     |
| 50      | 92    | 8     |

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。

4. 流动相 A 相为带盐流动相，检测完毕后需用水：乙腈=90:10 冲洗色谱柱 1 h，然后使用水：乙腈=10:90 冲洗色谱柱 30 min 及以上，以免盐残留对色谱柱造成损害。

## 注意事项：

1. 该试剂盒内不包含色谱级乙腈、正己烷（≥99%）和超纯水（流动相 B），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和口罩操作。

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。