

# 高效液相色谱 - 在线衍生联用技术检测食品中氨基酸

陈春晓, 陈卫, 仲岳桐, 康莉

(深圳市疾病预防控制中心, 广东深圳 518020)

**【摘要】** 目的: 建立应用在线衍生技术和双检测器联用测定食品中氨基酸的高效液相色谱方法。方法: 使用高效液相色谱仪带全自动衍生功能的自动进样器进行在线衍生, 经梯度分离, 再利用二极管阵列 - 荧光检测器串联分析。结果: 17 种氨基酸分离良好, 线性范围为 10 ~ 1 000 pmol/ $\mu$ l。结论: 本方法测定重复性好, 灵敏度高, 定性定量准确, 结果令人满意。

**【关键词】** 在线衍生; 检测器联用; 氨基酸

**【中图分类号】** O657.7<sup>+</sup>2

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1004 - 8685(2005)04 - 0457 - 02

氨基酸是构成生物体蛋白质并同生命活动有关的最基本的物质, 是在生物体内构成蛋白质分子的基本单位, 与生物的生命活动有着密切的关系, 在抗体内具有特殊的生理功能, 是生物体内不可缺少的营养成分之一。

分析仪器中有关氨基酸的检测方法一般有氨基酸分析法、高效液相色谱法等, 前者需要购买昂贵的专用仪器(价格一般在 10 万美元以上), 后者虽然仪器普通, 但是在应用时存在结果重复性差、定性困难、手工操作繁琐等缺点, 本文应用在线衍生和检测器联用技术测定食品中 17 种氨基酸, 能有效地克服以上缺点, 可在各级食品检测机构推广应用。

## 1 材料与与方法

### 1.1 仪器及试剂

液相色谱仪: 美国安捷伦公司 Agilent1100 型(带自动进样器, 二极管阵列检测器, 荧光检测器, 在线脱气机)。色谱柱: Hypersil ODS 氨基酸分析柱, 长度 20 cm, 内径 2.1 mm。pH 计: 瑞士梅特勒公司。电子天平: 瑞士梅特勒公司 AE - 200。甲醇、乙腈、四氢呋喃(色谱纯)。醋酸钠、冰醋酸、三乙胺(分析纯)。邻苯二甲醛(OPA)溶液: 10 mg/ml(一级氨基酸衍生剂)。9-苄基甲基氯甲酸酯(FMOC)溶液: 2.5 mg/ml 乙腈溶液(二级氨基酸衍生剂)。硼酸缓冲溶液: 浓度为 0.4 mol/L, pH 为 10.4。氨基酸标准溶液(浓度分别为 10、100、250、1 000 pmol/ $\mu$ l)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 流动相的配制** 准确称量 1.13 g 三水醋酸钠, 转移入 800 ml 玻璃杯中。加 500 ml 纯水, 并搅拌至晶体全部溶解。加入 120  $\mu$ l 三乙胺并充分混合。通过滴入 1% ~ 2% 的醋酸溶液, 调节 pH 至 7.31  $\pm$  0.05。加入 1.8 ml 四氢呋喃, 混匀, 装入试剂瓶, 得流动相 A。另准确称取 1.35 g 三水醋酸钠, 转移入 200 ml 玻璃杯中。加入 100 ml 纯水, 并搅拌至晶体全部溶解。通过滴入 1% ~ 2% 的醋酸溶液, 调节 pH 至 7.20  $\pm$  0.05。将此溶液和 200 ml 乙腈以及 200 ml 甲醇混合均匀, 装入试剂瓶, 得流动相 B。

**1.2.2 在线衍生步骤** 利用带全自动衍生功能的自动进样器进行在线衍生, 衍生后直接进样分析, 消除了离线衍生进样时间不同和手工操作造成的误差, 并降低了工作量。

在线衍生的程序如下: 先抽取 5.0  $\mu$ l 硼酸溶液, 再抽取 1.0  $\mu$ l OPA 试剂。接着取 1.0  $\mu$ l 样品溶液, 在反应管中充分混合。继续抽取 1.0  $\mu$ l FMOC 试剂, 在反应管中充分混合。进样。

**1.2.3 梯度洗脱程序** 初始流速: 0.45 ml/min, 具体步骤见表 1。

表 1 梯度洗脱程序如表

步骤	时间 (min)	比例(%)		总流量 (ml/min)
		流动相 A	流动相 B	
1	0.00	98	2	0.45
2	17.00	40	60	0.45
3	18.00	0	100	0.45
4	18.10	0	100	0.45
5	18.50	0	100	0.8
6	23.90	0	100	0.80
7	24.00	0	100	0.45
8	25.00	98	2	0.45

**1.2.4 检测器参数切换程序** 由于不同种氨基酸在二极管阵列检测器和荧光检测器的最佳检测波长不同, 因此有必要在分析过程中对检测器参数进行切换, 以求达到最好的效果。具体见表 2 和表 3。

表 2 二极管阵列检测器波长转换表

时间(min)	检测波长(nm)	参比波长(nm)
0	338	390
15	262	324

**【作者简介】** 陈春晓(1972 -), 女, 学士, 主管技师, 主要从事理化检验研究。

表 3 荧光检测器波长转换表

时间 (min)	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
0	340	450
15	266	305

## 1.2.5 样品前处理

1.2.5.1 液体样品: 准确称取样品 1 g 左右, 用 0.05 mol/L 的盐酸定容至 50 ml。

1.2.5.2 固体样品: 准确称取均匀样品 100 mg 左右, 放于 25 ml 的水解管中, 再加入浓度为 6 mol/L 的盐酸 10~15 ml, 于 110℃ 的恒温干燥箱内水解 22 h, 冷却后用去离子水定量于 50 ml 容量瓶中, 供仪器测定用。

## 2 结果与讨论

17 种氨基酸的标准色谱图 (见图 1), 具体数据详见表 4。

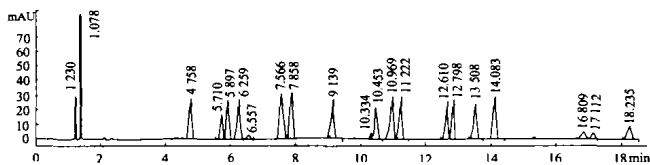


图 1 氨基酸分析的标准色谱图

表 4 浓度为 250 pmol/μl 的 17 种氨基酸数据表

英文缩写	中文名称	标准浓度 (mg/ml)	保留时间 (min)	信号峰面积	
				二极管阵列检测器	荧光检测器
Asp	天冬氨酸	0.03328	1.230	73	332
Glu	谷氨酸	0.03678	1.378	158	759
Ser	丝氨酸	0.02628	4.758	140	758
His	组氨酸	0.05240	5.710	93	498
Gly	甘氨酸	0.01878	5.897	131	771
Thr	苏氨酸	0.02978	6.259	135	731
Ala	丙氨酸	0.02228	7.566	141	725
Arg	精氨酸	0.04355	7.858	141	880
Tyr	酪氨酸	0.04530	9.139	119	0
Cys - SS - Cys	胱氨酸	0.03005	10.453	96	717
Val	缬氨酸	0.02930	10.969	138	837
Met	蛋氨酸	0.03730	11.222	141	923
Phe	苯丙氨酸	0.04130	12.610	130	770
Ile	异亮氨酸	0.03280	12.798	134	909
Leu	亮氨酸	0.03280	13.508	130	817
Lys	赖氨酸	0.04568	14.083	142	189
Pro	脯氨酸	0.2878	18.25	100	553

常规液相检测氨基酸的分析中, 衍生过程是造成测定结果不稳定的最主要因素。原因是衍生产物衰减很快, 而手工衍生操作至进样分析的时间和操作强度很难保证均一。本方法利用带全自动衍生功能的自动进样器进行在线衍生, 衍生后直接进样分析, 消除了离线衍生进样时间不同和手工操作造成的误差, 不仅提高了准确性, 而且降低了工作强度。

分析氨基酸的实验中, 一个普遍困难就是定性的问题, 单纯以保留时间定性难以保证可靠。本方法应用联用方式, 不仅以二极管阵列检测的特征吸收峰为依据定性, 还以用 2 种

性质不同的检测器对照作为定性的参考, 大大提高了定性的准确性。

在 10~1 000 pmol/μl 的浓度范围内, 二极管阵列检测器和荧光检测器均有良好的线性, 相关系数在 0.9988~0.9999 之间, 不同浓度的氨基酸重复试验的精密度均小于 5%, 当信噪比为 3 时, 使用二极管阵列检测器的检测限为 1~4 pmol, 使用荧光检测器检测限为 0.5~2.5 pmol (酪氨酸除外)。在测定液体样品时, 回收率在 90%~97% 之间, 效果理想; 但是固体样品的回收率相对较低, 在 78%~89% 之间, 主要与样品状态和前处理有关。

尽管荧光检测器的灵敏度高于二极管阵列检测器, 但是它对于酪氨酸基本无响应, 再考虑一般样品中的实际氨基酸含量用二极管阵列检测器足以满足, 而且在串联检测器时, 荧光检测器在二极管阵列之后, 死体积较大, 所以定量检测以二极管阵列检测器的结果为主; 只有当样液浓度低于 50 pmol/μl 时以下, 才以荧光检测器数据定量, 但酪氨酸仍然需以二极管阵列信号定量。

## 3 实验的难点和要点

要严格按照操作程序配制流动相。在称量醋酸钠时, 称重误差要小于 0.025 g, 在加入三乙胺时, 应使用微量进样器准确加入。

精确调节流动相的 pH 值是实验的要点之一。pH 过低, 会使缬氨酸和蛋氨酸的分离变坏, pH 过高, 不仅会使胱氨酸、缬氨酸等提前出峰, 更会加速使色谱柱内的填料键合断裂流失, 使得色谱柱很快失效。因此在调节中要认真仔细, 并使用磁力搅拌机, 在接近终点时需仔细逐滴加入, 充分混匀后测取 pH 值后再加入。如 pH 调节过头必须重新从头配制, 不可将就使用。

在流动相中, 三乙胺的实际含量虽然很低, 但是对于分离的好坏却很关键, 如果浓度稍低, 会造成组氨酸和甘氨酸、胱氨酸和缬氨酸的分离不好。三乙胺很容易被氧化, 多次开试剂瓶会造成实际浓度的降低。为了解决这个问题, 可以在买来新的三乙胺后, 尽快在充氮环境中分装在多个 2 ml 棕色安瓿瓶中, 并酒精喷灯封口后于避光阴凉处保存。每次实验时开 1 支, 一次性使用, 这样就能防止氧气的影响。

每次使用流动相都需要现配现用, 不得保存; 同样, 衍生化试剂如 OPA、FMOC、和硼酸溶液都需要每日更换。建议购买安瓿瓶装商品化衍生试剂, 放在冰箱冷藏保存, 实验前各开 1 支。

## 4 结论

本方法测定重复性好, 灵敏度高, 定性定量准确, 结果令人满意, 适合在各级食品检测单位中推广应用。

## [参考文献]

- [1] 卫生部食品卫生监督检验所. 食品卫生标准使用手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 1997. 824-831.
- [2] Angelika GH. Sensitive and reliable amino acid analysis protein hydrolysates using the HP1100 series HPLC[J]. Agilent Technical Note, 1999, 2-4.

(收稿日期: 2004-11-02)