

LC-30A 自动柱前衍生法快速测定蜂蜜中多种氨基酸

LC-062

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 及其自动柱前衍生功能快速测定蜂蜜中多种氨基酸的方法。以邻苯二甲醛 (OPA) 作为柱前衍生剂, 使用 C18 快速柱, 乙腈 / 甲醇 (30/70, v/v) 和 0.05 mol/L 的醋酸钠缓冲液 (pH 6.5) 为流动相, 荧光检测器的激发波长为 330 nm, 发射波长 440 nm, 14 种氨基酸在 7 分钟内得到快速分离和检测。14 种氨基酸在 0.2 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内线性良好, 标准曲线的相关系数均在 0.9998 以上; 对 2 $\mu\text{mol/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验, 连续测定 6 次, 保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.28% 和 3.41% 以下, 系统精密度良好, 同时具有很高的检测灵敏度。此方法省去了繁琐的前处理步骤, 节约了前处理所花费的时间以及手动前处理所引入的误差, 并且每个样品的总分析时间是传统方法的 1/6。

关键词: 超高效液相色谱仪 自动柱前衍生 氨基酸 蜂蜜

氨基酸 (amino acid) 是含有氨基和羧基的一类有机化合物的通称, 是生物功能大分子蛋白质的基本组成单位。人体所需的氨基酸约有 22 中, 其中必需氨基酸需从食物中供给, 因此氨基酸分析在食品分析领域中十分重要, 食品中氨基酸含量是评价食物营养价值的重要指标之一。相关文献中, 多种不同的氨基酸柱前衍生分析方法 (AQC 法、PITC 法、OPA 法、DANSYL-Cl 法等) 在氨基酸分析领域被广泛使用。在分析方法优化过

程中, 样品分析速度和试样的前处理步骤都是十分重要的考量。本实验建立了一种自动柱前衍生, 并使用岛津超高效快速液相色谱仪 LC-30A 快速测定蜂蜜中氨基酸 (天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸) 含量, 该方法减少了氨基酸柱前衍生反应的前处理时间以及样品分析时间。

实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂: 乙腈、甲醇、盐酸、醋酸钠、邻苯二甲醛 (OPA)、N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC)、硼酸、氢氧化钠、氨基酸标准品。

仪器: 本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A。具体配置为 LC-30AD \times 2 (输液泵), SIL-30AC (自动进样器), CTO-30AC (柱温箱), DGU-20A5 (在线脱气机), CBM-20A (系统控制器), RF-10AXL (荧光检测器), LabSolutions Ver 5.30 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm I.D. \times 75 mm L., 1.6 μm)

流动相: A - 0.05 M 醋酸钠缓冲液 (pH 6.5)

B - 乙腈 / 甲醇 (30/70, v/v)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 30°C

检测器: 激发波长 330 nm

发射波长: 440 nm

进样体积: 4 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, 时间程序见表 1

B 相初始浓度为 6%。

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.30	Pumps	Pump B Conc.	6
1.00	Pumps	Pump B Conc.	15
3.30	Pumps	Pump B Conc.	28
4.00	Pumps	Pump B Conc.	38
5.00	Pumps	Pump B Conc.	38
7.00	Pumps	Pump B Conc.	40
7.50	Pumps	Pump B Conc.	90
8.00	Pumps	Pump B Conc.	90
8.05	Pumps	Pump B Conc.	6
12.00	Controller	Stop	

1.3 样品制备

1.3.1 氨基酸衍生方法

衍生试剂：

OPA 试剂 – 50 mg OPA 溶解于 10 mL 甲醇（4℃可保存 10 天）

NAC 试剂 – 400 mg NAC 溶解于 0.2 mol/L 硼酸盐（pH 9.5）（4℃可保存 14 天）

临用前将 OPA 试剂和 NAC 试剂以 1:4（v/v）比例混合配制成 OPA-NAC 衍生试剂

柱前衍生反应：

由 SIL-30A（自动进样器）自动实现，取 12 μL 氨基酸标准品或蜂蜜样品溶液，加入 12 μLOPA-NAC 衍生试剂，再加入 18 μL 水，用进样针混合 10 次，静置

反应 2 分钟。

1.3.2 氨基酸标准溶液的配制

用 0.1 mol/L 的盐酸稀释 2.5 mmol/L 的氨基酸混合标准溶液，配制成 0.1 mmol/L 的氨基酸储备液。然后用纯水稀释氨基酸混标溶液至 10.0 μmol/L、5.0 μmol/L、2.0 μmol/L、1.0 μmol/L、0.5 μmol/L、0.2 μmol/L，以 1.3.1 中衍生方法自动衍生制作标准曲线。

1.3.3 蜂蜜样品溶液的配制

准确称取 1.0 g 蜂蜜样品，用纯水定容至 50 mL，配制成 20 mg/mL 的蜂蜜样品溶液。样品经自动柱前衍生后直接进样分析。

结果讨论

2.1 氨基酸标准样品色谱图

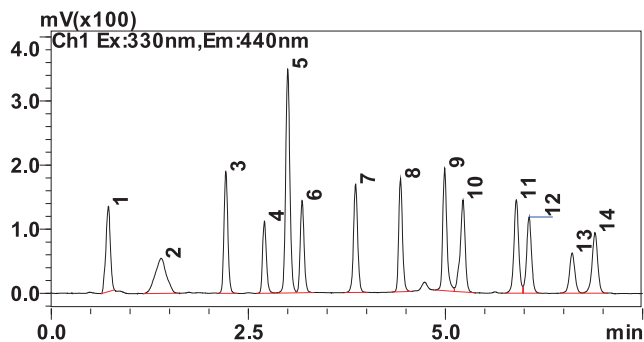


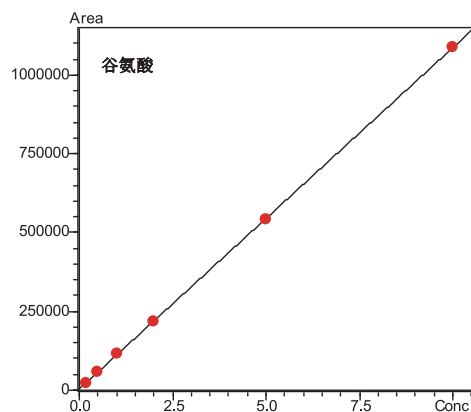
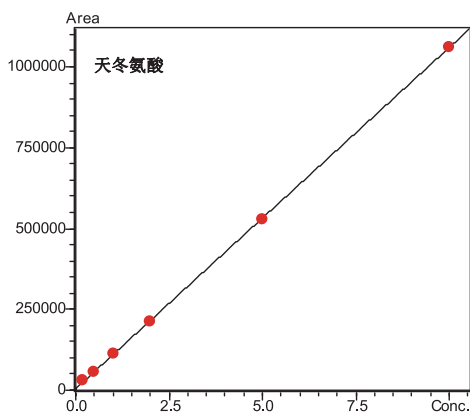
图 1. 5 μmol/L 氨基酸标准样品色谱图

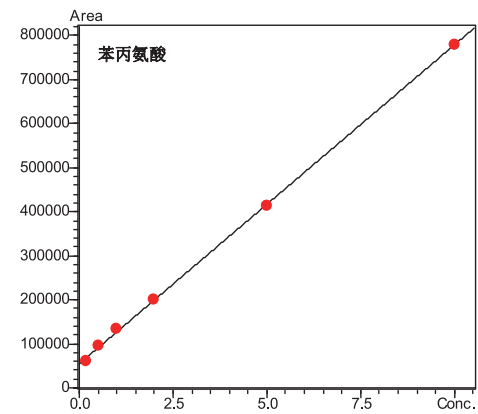
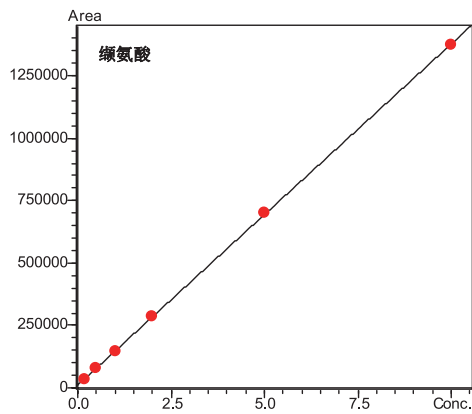
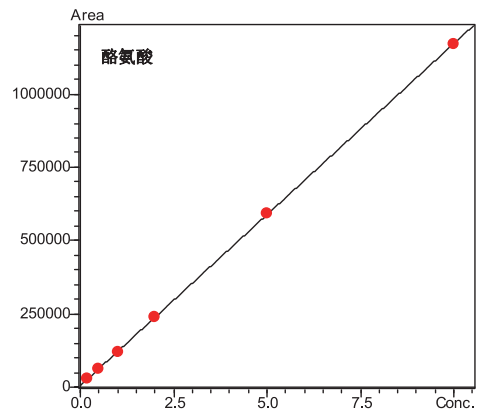
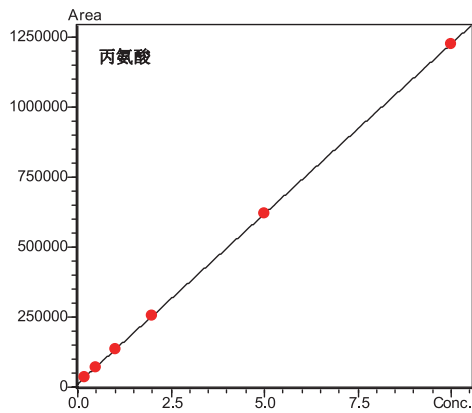
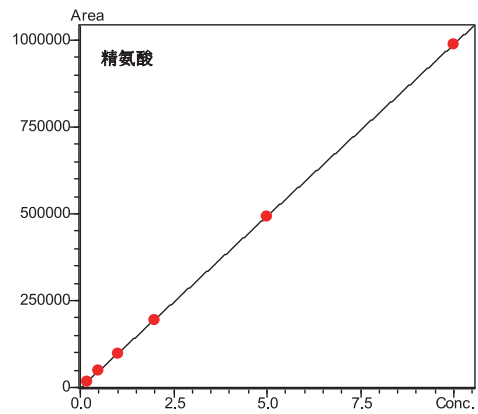
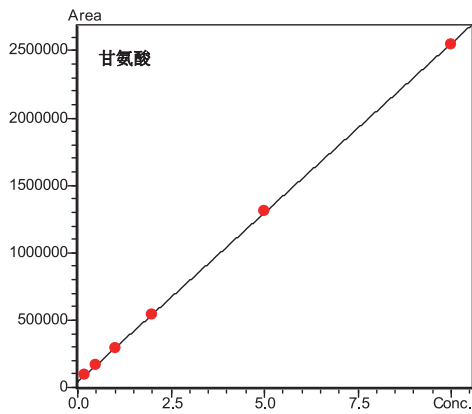
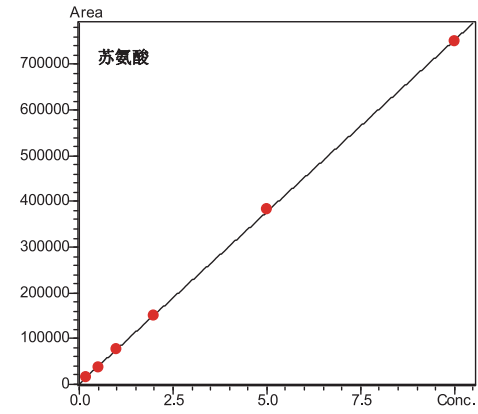
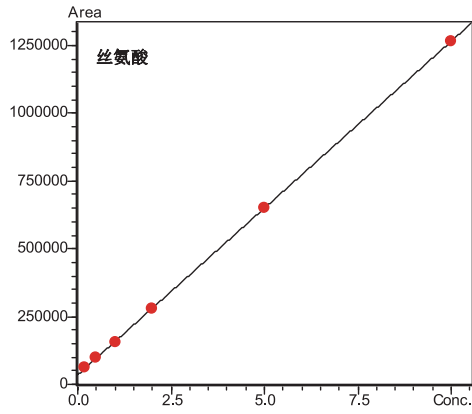
(1. 天冬氨酸 2. 谷氨酸 3. 丝氨酸 4. 苏氨酸 5. 甘氨酸 6. 精氨酸 7. 丙氨酸 8. 酪氨酸

9. 缬氨酸 10. 苯丙氨酸 11. 组氨酸 12. 异亮氨酸 13. 赖氨酸 14. 亮氨酸)

2.2 线性关系

将浓度为 0.2、0.5、1、2、5、10 μmol/L 的混合标准工作液按 1.3 中自动柱前衍生方法衍生，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示。14 种氨基酸在 0.2 ~ 10 μmol/L 浓度范围内所得校准曲线线性关系良好。线性方程、相关系数见表 2。





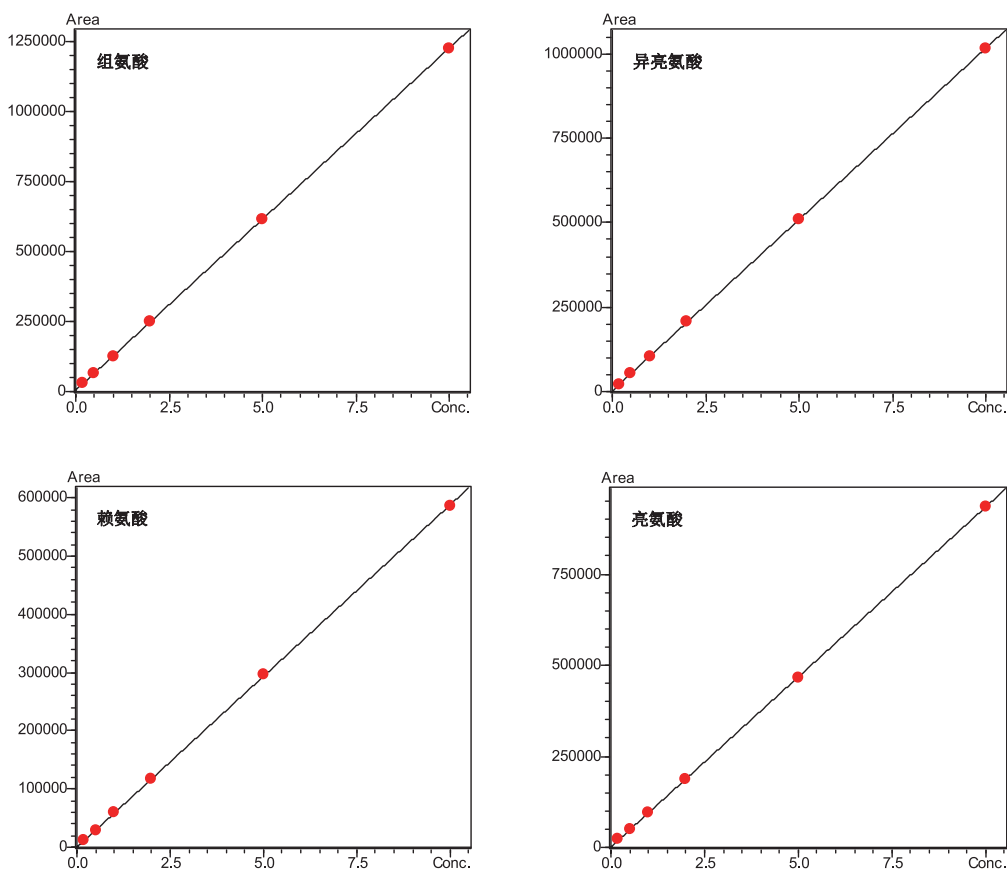


图 2. 14 种氨基酸的标准工作曲线

表 2. 14 种氨基酸的校准曲线参数

No.	中文名称	英文名称	CAS No.	校准曲线	相关系数 r	检出限 (μmol/L)	定量限 (μmol/L)
1	天冬氨酸	Aspartic Acid	6899-03-2	$Y = 105548X + 4458.78$	0.9999	0.03	0.11
2	谷氨酸	Glutamic acid	56-86-0	$Y = 108329X + 3085.06$	0.9999	0.07	0.21
3	丝氨酸	Serine	302-84-1	$Y = 123115X + 34638.9$	0.9999	0.01	0.04
4	苏氨酸	Threonine	72-19-5	$Y = 75151.2X + 1472.71$	0.9999	0.04	0.13
5	甘氨酸	Glycine	56-40-6	$Y = 251265X + 40306.5$	0.9999	0.01	0.03
6	精氨酸	Arginine	74-79-3	$Y = 99028.6X - 2323.03$	0.9999	0.04	0.12
7	丙氨酸	Alanine	338-69-2	$Y = 121675X + 11756.1$	0.9999	0.02	0.07
8	酪氨酸	Tyrosine	70642-86-3	$Y = 116701X + 4743.81$	0.9999	0.02	0.08
9	缬氨酸	Valine	7004-03-7	$Y = 136687X + 10662.6$	0.9999	0.02	0.06
10	苯丙氨酸	Phenprobamate	673-31-4	$Y = 72448.3X + 545434.1$	0.9998	0.01	0.02
11	组氨酸	Histidine	71-00-1	$Y = 122087X + 4507.10$	0.9999	0.03	0.09
12	异亮氨酸	Isoleucine	7004-09-3	$Y = 101455X + 2018.41$	0.9999	0.04	0.12
13	赖氨酸	Lysine	56-87-1	$Y = 58843.9X - 629.432$	0.9999	0.08	0.26
14	亮氨酸	Leucine	61-90-5	$Y = 93300.6X + 1189.83$	0.9999	0.05	0.16

2.3 精密度实验

对 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.01% ~ 0.28% 和 0.06% ~ 3.41% 之间，仪器精密度良好。

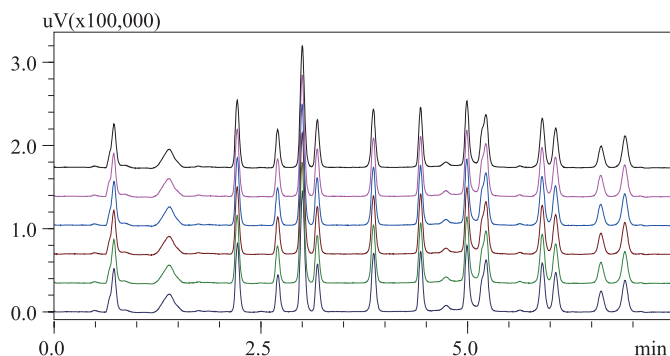


图 3. 2 $\mu\text{mol/L}$ 氨基酸标准样品重复性数据色谱图 (n=6)

表 3. 保留时间和峰面积重复性数据结果(n=6)

样品名称	RSD%(0.5 $\mu\text{mol/L}$)		RSD%(2 $\mu\text{mol/L}$)		RSD%(5 $\mu\text{mol/L}$)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
Asp	0.26	0.87	0.20	0.21	0.25	0.18
Glu	0.28	1.98	0.16	1.00	0.07	0.25
Ser	0.09	3.36	0.06	1.14	0.03	0.31
Thr	0.06	2.38	0.07	0.69	0.02	0.30
Gly	0.05	1.26	0.05	0.50	0.03	0.27
Arg	0.03	1.78	0.05	0.41	0.03	0.33
Ala	0.05	1.21	0.03	0.56	0.03	0.16
Tyr	0.03	0.94	0.01	0.18	0.03	0.06
Val	0.03	1.59	0.01	1.11	0.02	0.18
Phe	0.03	3.41	0.02	2.37	0.02	0.84
His	0.04	1.40	0.03	0.35	0.02	0.23
Lie	0.05	0.97	0.03	0.26	0.02	0.18
Lys	0.05	2.11	0.03	1.81	0.01	0.87
Leu	0.05	2.96	0.03	0.45	0.02	0.20

2.4 灵敏度实验

14 种氨基酸低浓度 (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 标准品色谱图如图 4 所示。该浓度下样品中各氨基酸的信噪比数据如表 4 所示，该方法具有很高的检测灵敏度。

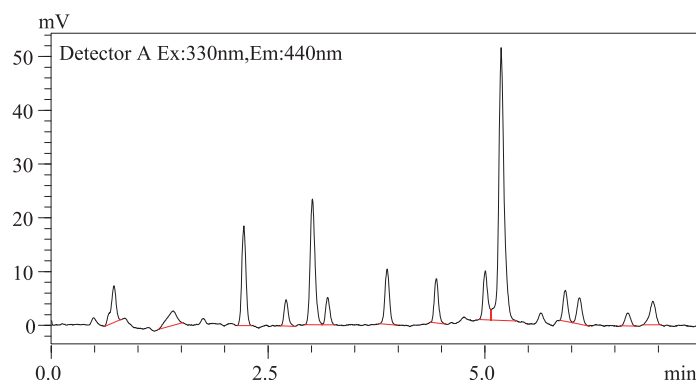


图 4. 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 14 种氨基酸标准样品色谱图

表 4. 0.2 μmol/L 各氨基酸的信噪比(S/N) 数据(n=3)

样品名称	1	2	3	平均值
Asp	27.54	28.04	25.26	26.95
Glu	11.21	11.05	11.05	11.10
Ser	76.09	74.52	68.39	73.00
Thr	20.06	19.48	18.08	19.21
Gly	93.89	94.01	86.26	91.40
Arg	21.35	21.40	18.88	20.54
Ala	41.85	41.17	38.02	40.35
Tyr	34.00	34.24	30.37	32.87
Val	36.97	37.35	33.56	35.96
Phe	195.26	201.04	187.19	194.5
His	26.27	25.91	24.00	25.40
Lie	20.33	20.86	19.09	20.09
Lys	10.16	9.83	8.88	9.63
Leu	17.69	17.19	16.20	17.03

表 5. 蜂蜜中各氨基酸含量

样品名称	含量(μg/g)	
	洋槐蜂蜜	紫云英蜂蜜
Asp	7.78	5.39
Glu	6.17	3.88
Ser	6.57	3.95
Thr	3.46	2.58
Gly	2.09	1.50
Arg	10.55	10.40
Ala	6.92	3.65
Tyr	9.00	4.56
Val	5.18	3.61
Phe	7.13	2.04
His	4.15	1.63
Lie	43.76	18.58
Lys	4.54	5.16
Leu	7.15	3.06

2.5 实际样品

对市售两种蜂蜜中氨基酸含量进行测定，洋槐蜂蜜和紫云英蜂蜜中各氨基酸含量详见表 5。

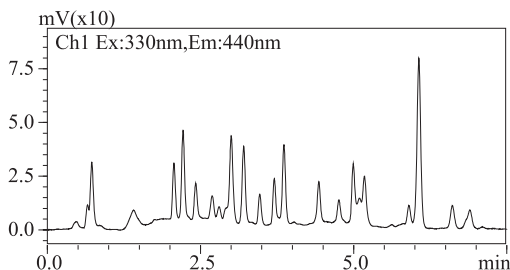


图 5. 洋槐蜂蜜氨基酸检测色谱图

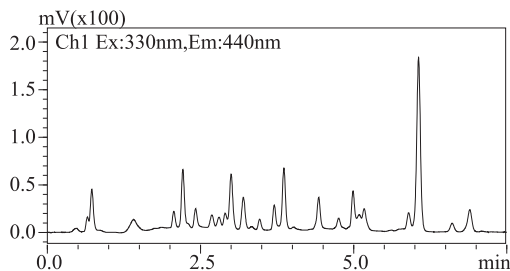


图 6. 紫云英蜂蜜氨基酸检测色谱图

结论

本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 并且利用其柱前自动衍生功能测定蜂蜜中氨基酸含量的方法。该方法分析速度快，灵敏度高，精密度良好；在 0.2 ~ 10 μmol/L 浓度范围内线性良好，所有样品的标准曲线的相关系数均在 0.9998 以上。对市售两种蜂蜜中氨基酸含量进行测定，洋槐蜂蜜和紫云英蜂蜜中各氨基酸含量如表 5 所示。