

使用氨基酸分析仪测定食品中 17 种氨基酸的含量

LC-296

摘要： 本文使用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 建立了 17 种氨基酸茚三酮柱后衍生高效液相色谱分析方法。参考 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》进行实验，实验结果表明：17 种氨基酸在 10~500 nmol/L 线性浓度范围内，相关系数均大于 0.9999，准确度为 87.0~113.1%。精密度实验中，10 nmol/L 的 17 种氨基酸标准溶液保留时间 RSD% 为 0.01~0.30%，峰面积 RSD% 为 0.39~3.57%。该方法茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成，线性良好，分离效果良好，可为食品中氨基酸的测定提供参考。

关键词： LC-16AAA 氨基酸分析仪 钠型 茚三酮柱后衍生 食品中氨基酸

氨基酸为两性电解质，在酸性条件下，能被树脂表面的活性基团 ($-\text{SO}^3^-$) 吸附，使用氨基酸分析仪时，通常利用 Na^+ 型或 Li^+ 型磺酸基强酸性阳离子交换树脂。通过不同 pH 系列的洗脱液使氨基酸逐步洗脱下来，洗脱顺序依次为酸性氨基酸、羟基氨基酸和中性氨基酸、芳香族氨基酸和碱性氨基酸等。 Na^+ 型树脂一般用于蛋白质水解液中的氨基酸分析， Li^+ 型树脂一般用于生理体液中的氨基酸分析。

目前，国内外氨基酸分析方法主要分为直接分析法和衍生化间接分析法。其中，衍生化方式又分为柱前、

柱上和柱后衍生化。柱后衍生阳离子交换色谱法是目前食品氨基酸分析最为常用的分析方法。该方法衍生反应速度非常快，衍生物极其稳定，衍生试剂能同时与一级和二级氨基酸快速反应并被检测，故可以快速测定氨基酸的总量。

本实验使用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 钠型分析柱参考国标 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》，建立了 17 种氨基酸茚三酮柱后衍生高效液相色谱分析方法。

■ 实验部分

1.1 仪器配置

LC-16AAA 氨基酸分析仪，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-16×3

阀切换单元：FCV-11AL

化学反应箱：CRB-40

检测器：SPD-16

自动进样器：SIL-16

脱气机：DGU-20A5R

鼓泡单元：DGU-10B

柱温箱：CTO-16L

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.106

1.2 分析条件

分析柱：Shimadzu Shim-pack Amino-Na (100 mm×6.0 mm I.D., 5 μm)
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 228-18837-91)

捕氨柱：Shimadzu Shim-pack ISC-30/S0504 Na (50 mm×4.0 mm I.D., 5 μm)
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 228-14206-91)

流动相：钠型氨基酸流动相试剂包流动相 A,B,C
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 228-21195-94)

衍生试剂：茚三酮溶液(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 208-09626)

流动相流速：0.6 mL/min

反应液流速：0.2 mL/min

衍生温度：130°C

柱温：60°C

进样量：20 μL

检测波长：570 nm/440 nm

洗脱方式：梯度洗脱，A 相起始浓度为 100%，时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
9.00	泵	B Conc	0
13.00	泵	B Conc	7
17.20	泵	B Conc	8
17.21	泵	B Conc	11
20.80	泵	B Conc	11
20.81	泵	B Conc	50
22.00	泵	B Conc	58
22.01	泵	B Conc	100
28.80	泵	SV(Pump A)	B-A-A
29.30	泵	B Conc	100
29.31	泵	B Conc	0
33.00	泵	SV(Pump A)	A-A-A
35.00	泵	T.Flow	0.6
36.50	泵	T.Flow	0.7
43.30	泵	T.Flow	0.7
44.00	泵	T.Flow	0.6
45.00	控制器	Stop	

1.3 标准品

17 种氨基酸混合标准品：2.5 μmol/mL（岛津（上海）实验器材有限公司，P/N：208-09625），用流动相 A 逐级稀释为 10、20、50、100、200 和 500 nmol/mL 的标准溶液。

1.4 样品前处理

1.4.1 市售纯牛奶

称量 1.001 g 摇匀后的牛奶液体于 20 mL 玻璃瓶中，加入 15 mL 6 mol/L 盐酸溶液，振荡混匀（备注：牛奶盒标签告知每 100 mL 含蛋白质 2.0 g，称量时使试样中蛋白质含量在 10~20 mg 范围内）。用氮吹仪将玻璃瓶充入氮气，置换出瓶内空气，在充氮气状态下拧紧瓶盖。放入 111°C 的电热鼓风恒温箱内，水解 22 h 后，取出，冷却至室温。打开玻璃瓶盖，将溶液过滤入 50 mL 容量瓶中，多次用纯水冲洗玻璃瓶，移入同一容量瓶中，用纯水定容至刻度，振荡混匀。

移取 1 mL 滤液到 5 mL 玻璃小瓶中，用氮吹浓缩仪在 50~60°C 加热环境下干燥，干燥后残留物用 1 mL 纯水溶解，再蒸干。用 1 mL pH 2.2 柠檬酸钠缓冲溶液（或者流动相 A 液）加入小瓶内溶解，振荡混匀后，吸取溶液通过 0.22 μm 水系过滤器后，转移至仪器进样瓶中，供测定用。

1.4.2 市售橙子

市售橙子去皮后用破壁机打碎，搅拌均匀，称量 1.195 g 橙子于 20 mL 玻璃瓶中，其他操作同市售纯牛奶。

■ 结果与讨论

2.1 化合物信息

目标化合物信息见表 2。

表 2 17 种氨基酸信息表

序号	中文名称	英文缩写	CAS. 号
1	L-天冬氨酸	Asp	56-84-8
2	L-苏氨酸	Thr	72-19-5
3	L-丝氨酸	Ser	56-45-1
4	L-谷氨酸	Glu	56-86-0
5	L-脯氨酸	Pro	147-85-3
6	甘氨酸	Gly	56-40-6
7	L-丙氨酸	Ala	56-41-7
8	L-胱氨酸	Cys	56-89-3
9	L-缬氨酸	Val	72-18-4
10	L-蛋氨酸	Met	63-68-3
11	L-异亮氨酸	Ile	73-32-5
12	L-亮氨酸	Leu	61-90-5
13	L-酪氨酸	Tyr	60-18-4
14	L-苯丙氨酸	Phe	63-91-2
15	L-组氨酸	His	71-00-1
16	L-赖氨酸	Lys	56-87-1
17	L-精氨酸	Arg	74-79-3

2.2 方法学信息

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，采用外标法建立线性校准曲线，脯氨酸的检测波长是 440 nm，其余 16 种氨基酸的检测波长是 570 nm，结果如图 1 和图 2 所示，17 种氨基酸在 10~500 nmol/L 浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均大于 0.9999，准确度为 87.0~113.1%。选择浓度为 10 nmol/L 的 17 种氨基酸标准溶液连续进样测定 6 次，保留时间 RSD% 为 0.01~0.30%；峰面积 RSD% 为 0.39~3.57%，结果见表 3 所示。实验结果表明，该分析方法具有良好的精密性。仪器检测限参照信号噪音关系的方法，以 10 nmol/L 的 17 种氨基酸标准溶液，检测限系数为 3.0，运用公式检测限 = $3 \times 10 \times N/S$ (N: 噪音, S: 峰高) 计算得出。

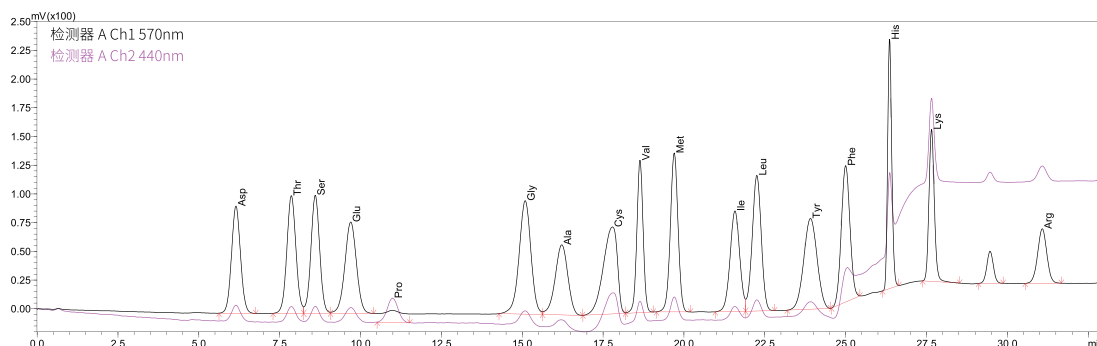
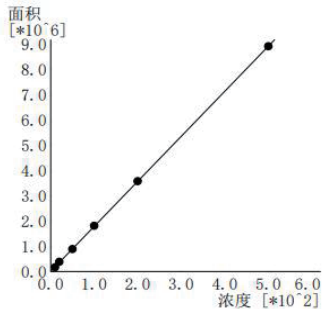
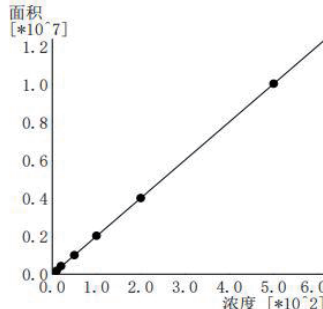


图 1 17 种氨基酸标准溶液图谱 (100 nmol/mL)

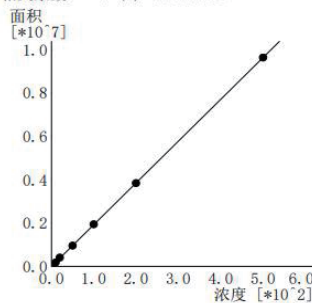
化合物名 : Asp
 校准曲线公式: $f(x) = 17856.9 * x + 12357.0$
 相关系数 : (R)=0.9999902



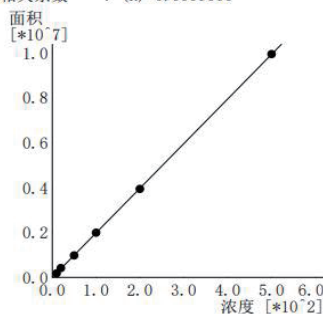
化合物名 : Thr
 校准曲线公式: $f(x) = 20055.3 * x + 4639.39$
 相关系数 : (R)=0.9999913



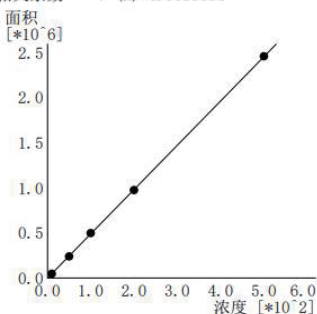
化合物名 : Ser
 校准曲线公式: $f(x) = 19276.5 * x + 5924.58$
 相关系数 : (R)=0.9999913



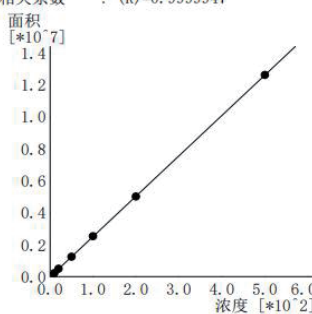
化合物名 : Glu
 校准曲线公式: $f(x) = 19907.1 * x - 6856.35$
 相关系数 : (R)=0.9999866



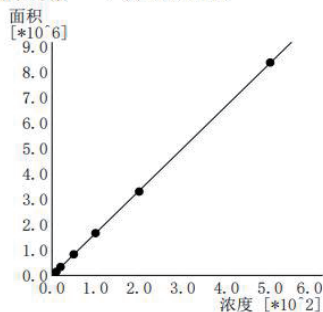
化合物名 : Pro
 校准曲线公式: $f(x) = 4922.06 * x - 2062.63$
 相关系数 : (R)=0.9999803



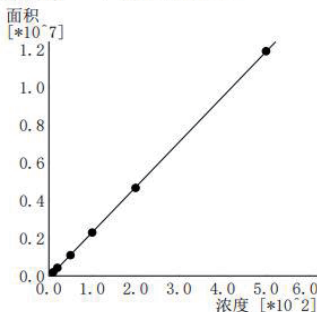
化合物名 : Gly
 校准曲线公式: $f(x) = 25236.4 * x - 13881.4$
 相关系数 : (R)=0.9999947



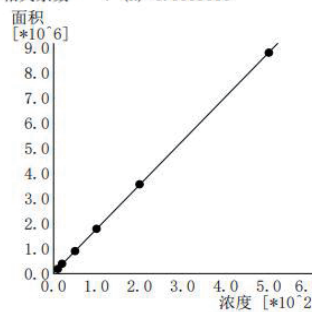
化合物名 : Ala
 校准曲线公式: $f(x) = 16789.5 * x - 15645.5$
 相关系数 : (R)=0.9999785



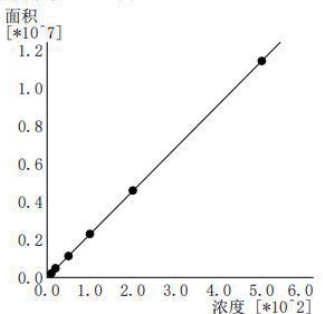
化合物名 : Cys
 校准曲线公式: $f(x) = 23893.6 * x - 76969.0$
 相关系数 : (R)=0.9999743



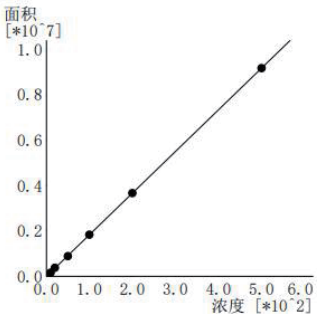
化合物名 : Val
 校准曲线公式: $f(x) = 17597.1 * x + 29756.1$
 相关系数 : (R)=0.9999886



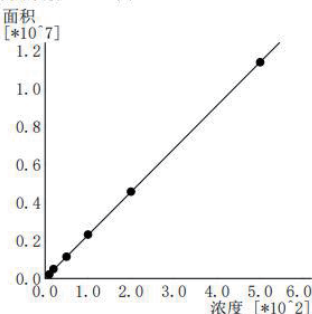
化合物名 : Met
 校准曲线公式: $f(x) = 22816.5 * x + 9541.50$
 相关系数 : (R)=0.9999910



化合物名 : Ile
 校准曲线公式: $f(x) = 18367.1 * x - 8449.54$
 相关系数 : (R)=0.9999920



化合物名 : Leu
 校准曲线公式: $f(x) = 22701.8 * x + 18322.3$
 相关系数 : (R)=0.9999885



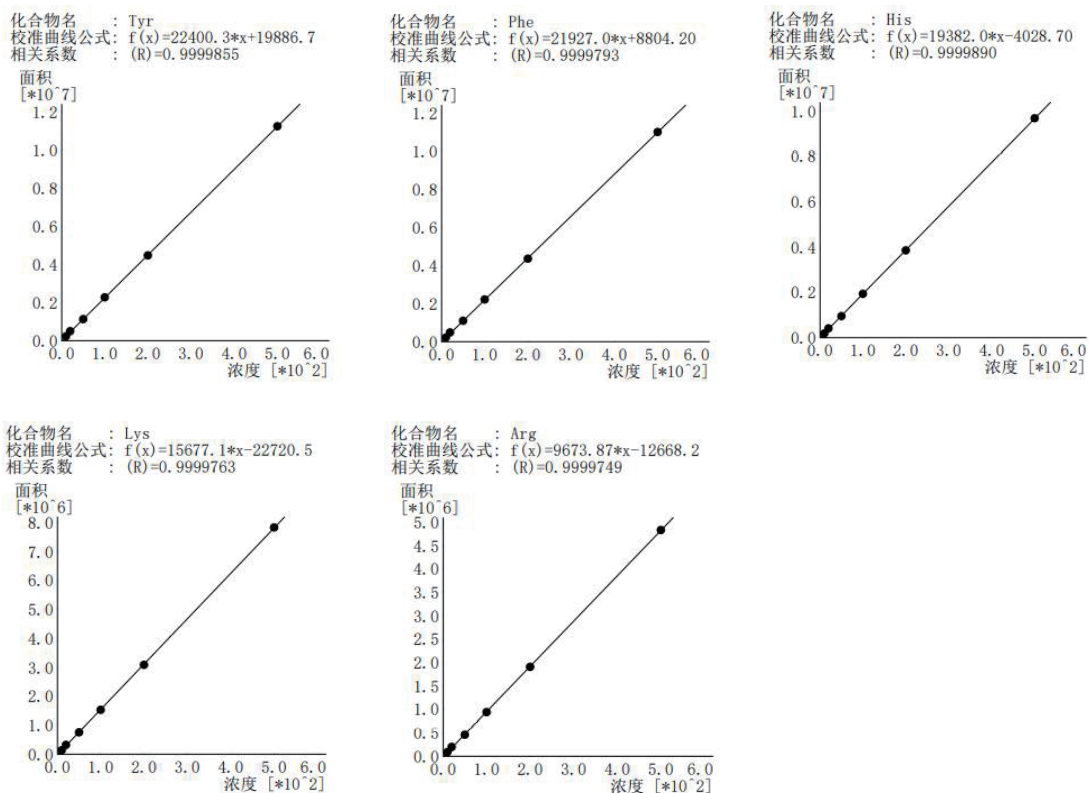


图 2 17 种氨基酸校准曲线

表 3 17 种氨基酸方法学信息

序号	英文缩写	校准曲线	相关系数 r	检测限 (nmol/mL)	准确度 (%)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	Asp	$Y = (17856.9)X + (12357.0)$	> 0.9999	0.33	89.1~104.8	0.30	1.52
2	Thr	$Y = (20055.3)X + (4639.39)$	> 0.9999	0.30	88.8~105.6	0.17	0.88
3	Ser	$Y = (19276.5)X + (5924.58)$	> 0.9999	0.30	90.2~105.1	0.13	1.25
4	Glu	$Y = (19907.1)X + (-6856.35)$	> 0.9999	0.41	95.5~107.0	0.15	2.97
5	Pro	$Y = (4922.06)X + (-2062.63)$	> 0.9999	4.58	97.2~105.9	0.24	3.57
6	Gly	$Y = (25236.4)X + (-13881.4)$	> 0.9999	0.33	92.4~102.7	0.07	1.60
7	Ala	$Y = (16789.5)X + (-15645.5)$	> 0.9999	0.54	93.2~105.2	0.09	2.25
8	Cys	$Y = (23893.6)X + (-76969.0)$	> 0.9999	0.53	97.9~113.1	0.15	1.80
9	Val	$Y = (17597.1)X + (29756.1)$	> 0.9999	0.22	88.5~105.3	0.06	2.13
10	Met	$Y = (22816.5)X + (9541.50)$	> 0.9999	0.22	90.0~104.9	0.05	0.39
11	Ile	$Y = (18367.1)X + (-8449.54)$	> 0.9999	0.37	91.9~105.6	0.05	2.10
12	Leu	$Y = (22701.8)X + (18322.3)$	> 0.9999	0.25	87.0~104.8	0.04	0.99
13	Tyr	$Y = (22400.3)X + (19886.7)$	> 0.9999	0.39	93.9~106.9	0.04	1.52
14	Phe	$Y = (21927.0)X + (8804.20)$	> 0.9999	0.26	92.5~107.8	0.02	2.22
15	His	$Y = (19382.0)X + (-4028.70)$	> 0.9999	0.15	95.4~107.6	0.01	0.61
16	Lys	$Y = (15677.1)X + (-22720.5)$	> 0.9999	0.27	99.0~109.0	0.01	0.63
17	Arg	$Y = (9673.87)X + (-12668.2)$	> 0.9999	0.75	98.1~110.7	0.01	1.38

2.3 实际样品分析

将市售牛奶和橙子按 1.4 样品前处理后，用 1.2 方法进行样分析，色谱图如图 3 和图 4 所示，所测样品中各氨基酸的含量如表 4 所示。

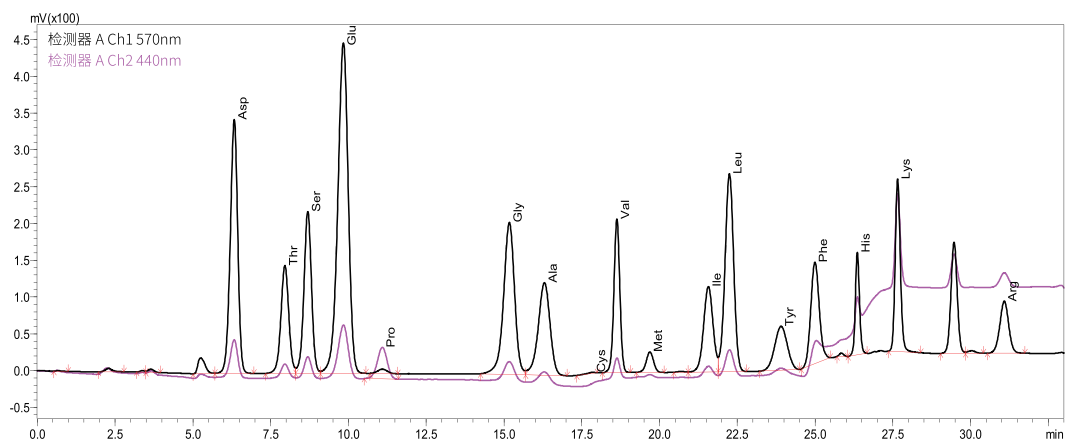


图 3 牛奶样品色谱图

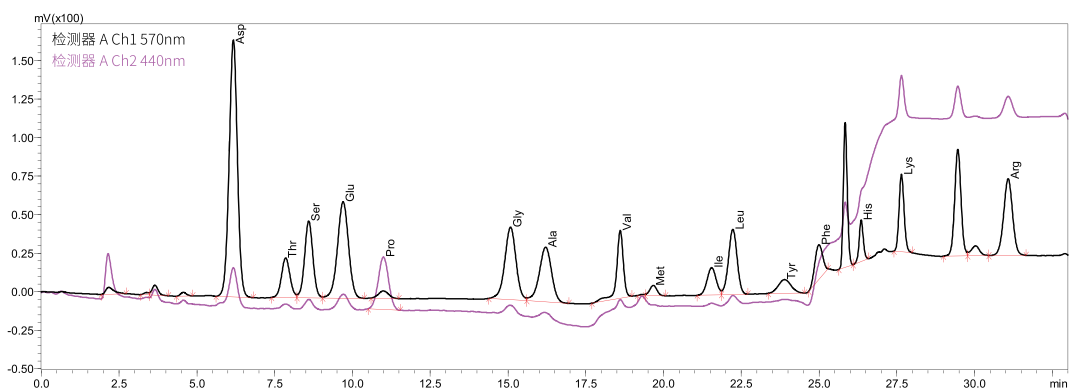


图 4 橙子样品色谱图

表 4 牛奶和橙子中氨基酸含量检测结果

序号	英文缩写	牛奶样品含量 (g/100 g)	橙子样品含量 (g/100 g)
1	Asp	0.215	0.096
2	Thr	0.077	0.012
3	Ser	0.102	0.021
4	Glu	0.386	0.048
5	Pro	0.112	0.078
6	Gly	0.076	0.015
7	Ala	0.089	0.022
8	Cys	0.005	N.D.
9	Val	0.092	0.018
10	Met	0.015	0.003

11	Ile	0.088	0.011
12	Leu	0.152	0.020
13	Tyr	0.068	0.008
14	Phe	0.099	0.012
15	His	0.052	0.009
16	Lys	0.128	0.023
17	Arg	0.129	0.077

■ 结论

本文使用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 钠型分析柱建立了 17 种氨基酸茚三酮柱后衍生高效液相色谱分析方法。结果表明，17 种氨基酸在 10~500 nmol/L 线性浓度范围内，相关系数均大于 0.9999，准确度为 87.0~113.1%。精密度实验中，10 nmol/L 的 17 种氨基酸标准溶液保留时间 RSD% 为 0.01~0.30%，峰面积 RSD% 为 0.39~3.57%。参考国标 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》对市售牛奶和橙子进行测试，得到了测试结果。该方法茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成，线性良好，分离效果良好，可为食品中氨基酸的测定提供参考。

岛津应用云

