

使用氨基酸分析仪测定饲料中氨基酸

LC-324

摘要： 本文使用岛津氨基酸分析仪建立了 19 种氨基酸茚三酮柱后衍生分析方法，并应用于饲料中氨基酸的测定。本方法使用外标法定量，在 10-200 nmol/mL 的浓度范围内，19 种氨基酸的线性相关系数均大于 0.9996，检出限在 0.23~2.56 nmol/mL 之间，定量限在 0.76~8.54 nmol/mL 之间。精密度实验中，保留时间的 RSD 在 0.01%~0.38% 之间，峰面积的 RSD 在 0.20%~2.52% 之间。分离度满足 GB/T 18246-2019《饲料中氨基酸的测定》的要求，可为相关从业人员提供参考。

关键词： 氨基酸分析仪 饲料 柱后衍生

GB/T 18246-2019《饲料中氨基酸的测定》于 2020 年 7 月 1 日实施，标准规定了饲料中总氨基酸和游离氨基酸的测定方法，共涉及 19 种氨基酸，包括胱氨酸 ((Cys)₂)、半胱氨酸 (Cys)、蛋氨酸 (Met)、天冬氨酸 (Asp)、苏氨酸 (Thr)、丝氨酸 (Ser)、谷氨酸 (Glu)、脯氨酸 (Pro)、甘氨酸 (Gly)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、酪氨酸 (Tyr)、苯丙氨酸 (Phe)、赖氨酸 (Lys)、组氨酸 (His)、精氨酸 (Arg) 和色氨酸 (Trp)。其中，除色氨酸外的氨基酸使用氨基酸分析仪，利用茚三酮柱后衍生法测定。

前处理方法包括常规酸水解法、氧化酸水解法和酸提取法，分别测定相应氨基酸种类。当使用氧化酸水解法时，含硫氨基酸（胱氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸）氧化水解生成磺基丙氨酸和蛋氨酸砒，从而间接测定。

本文使用岛津氨基酸分析仪建立了包括磺基丙氨酸和蛋氨酸砒在内的 19 种氨基酸分析方法，同时使用氧化酸水解法，以氢溴酸为终止剂检测某饲料样品中天冬氨酸等 14 种氨基酸，分离度符合 GB/T 18246-2019 的要求，满足不同前处理下饲料中氨基酸的测定，可为相关从业人员提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A	自动进样器：SIL-16
输液泵：LC-16×3	脱气机：DGU-20A 5R
柱温箱：CTO-16L	高温反应箱：CRB-40
检测器：SPD-16	色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Amino-Na (100 mm×6.0 mm I.D., 5μm, SGLC, P/N: S228-18837-91)

捕氨柱：Shim-pack ISC-30 /S0504 Na (50 mm×4.0 mm I.D., SGLC, P/N: S228-14206-91)

洗脱液：钠型氨基酸分析流动相试剂包 (SGLC, P/N: S228-21195-94)，其中，流动相 A (SGLC, P/N: S228-21195-96) pH 调至 2.41

衍生试剂：茚三酮 衍生试剂 (SGLC, P/N: AW208-09626)

流速：0.6 mL/min 衍生液流速：0.2 mL/min

柱温：60°C 衍生反应温度：130°C

进样体积：20 μL 检测波长：570 nm/440 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度 3%，洗脱程序见表 1

SV(Pump A)：A 泵溶剂切换阀，初始值 A-A-A，不同位置流路图见图 1

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
7.00	泵	B.Conc	3
11.00	泵	B.Conc	7
15.20	泵	B.Conc	8
15.21	泵	B.Conc	11
22.00	泵	B.Conc	11
31.00	泵	B.Conc	100
36.80	泵	SV(Pump A)	B-A-A
37.30	泵	B.Conc	100
37.31	泵	B.Conc	0
41.00	泵	SV(Pump A)	A-A-A
41.50	泵	B.Conc	0
41.51	泵	B.Conc	3
43.00	泵	Total Flow	0.6
44.50	泵	Total Flow	0.7
51.30	泵	Total Flow	0.7
52.00	泵	Total Flow	0.6
55.00	控制器	Stop	

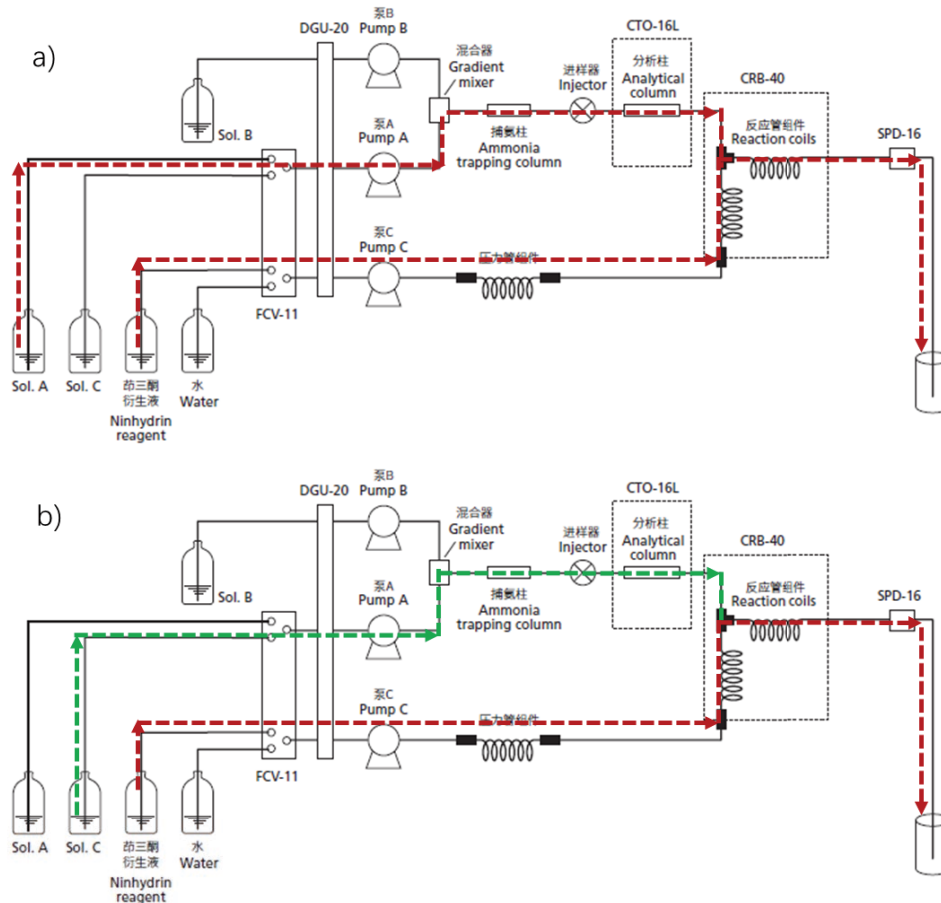


图 1 A 泵溶剂切换阀流程图 a) A-A-A; b) B-A-A

1.3 标准品溶液的配制

磺基丙氨酸、蛋氨酸砷标准储备液: 取磺基丙氨酸、蛋氨酸砷标准品各适量, 精密称定, 加水溶解分别制成 2.50 nmol/mL 的溶液, 作为标准储备液。

17 种氨基酸标准储备液: 含 17 种常规蛋白水解液分析用氨基酸 (天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、络氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸和精氨酸), 各组分浓度均为 2.50 nmol/mL (SGLC, P/N: AW208-09625)。

混合氨基酸标准工作液: 取以上两种储备液各适量, 用柠檬酸钠缓冲液定量稀释制成 10、20、50、100、200 nmol/mL 系列浓度的 19 种氨基酸混合标准工作液。

1.4 样品前处理

按照 GB/T 18246-2019 氧化酸水解法处理, 流程见图 2。

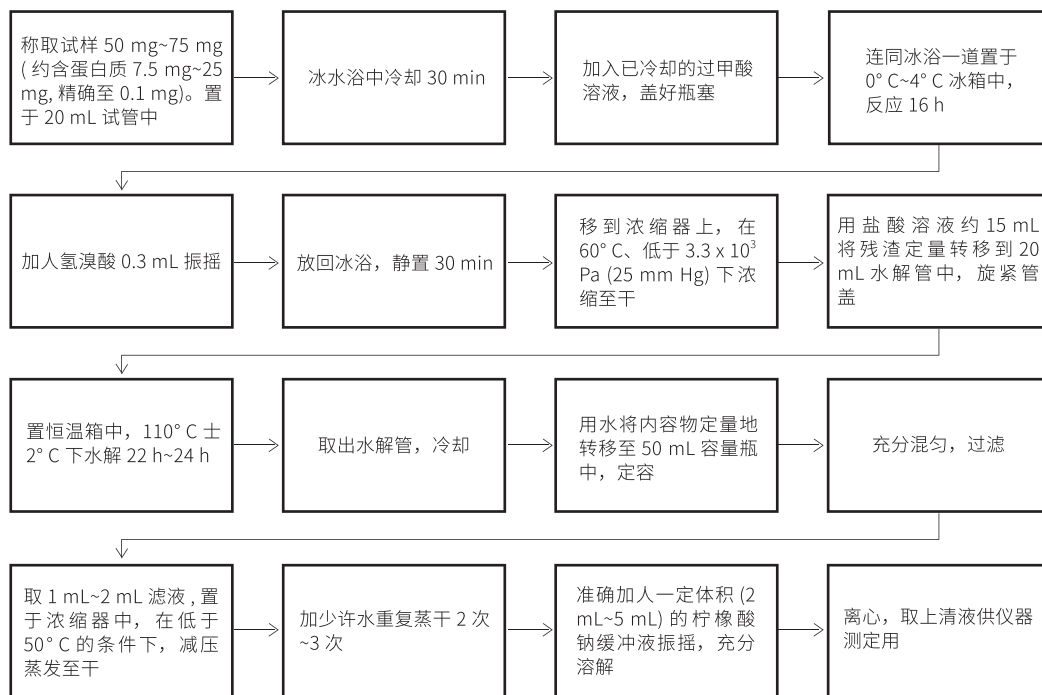


图 2 样品前处理流程图

■ 结果与讨论

2.1 系统适用性考察

标准溶液色谱图见图 1, 除脯氨酸 (Pro) 采用 440 nm 检测, 其余 18 种氨基酸均采用 570 nm。结果显示, 苏氨酸 - 丝氨酸、甘氨酸 - 丙氨酸、亮氨酸 - 异亮氨酸和蛋氨酸砷 - 天门冬氨酸的分离度分别为 93.5%、96.3%、93.8% 和 98.1%, 满足 GB/T 18246-2019 中“4.2.3 测定, 应符合 JJG 1064 氨基酸分析仪检定规程的要求并保证苏氨酸 - 丝氨酸、甘氨酸 - 丙氨酸、亮氨酸 - 异亮氨酸和蛋氨酸砷 - 天门冬氨酸的分离度分别不得小于 85%、90%、80% 和 85%”的要求。

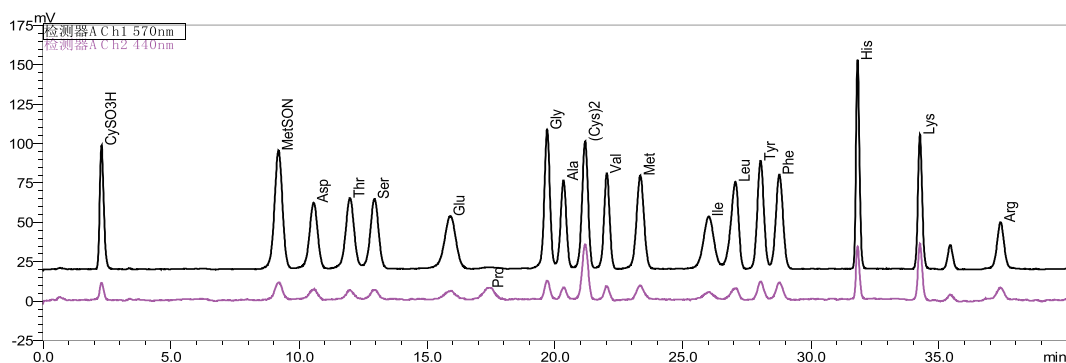


图 1 标准溶液色谱图 (各组分浓度均为 50 nmol/mL)

2.2 校准曲线、检出限和定量限

按照 1.2 项下分析条件, 对系列浓度的混合氨基酸标准工作液进样分析, 外标法定量。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线信息如表 2 所示。19 种氨基酸在校准曲线浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 均大于 0.9996, 各校准点准确度在 95.8%~105.7% 之间。使用 1.3 中配置的浓度为 10 nmol/mL 的标准样品进行分析, 根据信噪比, 计算其检出限 ($S/N=3$) 和定量限 ($S/N=10$), 结果如表 2 所示。19 种氨基酸的检出限在 0.23~2.56 nmol/mL 之间, 定量限在 0.76~8.54 nmol/mL 之间。

表 2 19 种氨基酸校准曲线、准确度、检出限及定量限

No.	化合物	简写	校准曲线	相关系数 r	准确度 (%)	检出限 (nmol/mL)	定量限 (nmol/mL)
1	磺基丙氨酸	CySO ₃ H	$Y = (17284.6)X + (-5135.27)$	0.9999	99.0~100.5	0.36	1.21
2	蛋氨酸	MetSON	$Y = (33465.8)X + (-17702.8)$	0.9999	99.5~101.6	0.39	1.29
3	天门冬氨酸	Asp	$Y = (18908.7)X + (-13209.7)$	0.9999	95.8~104.3	0.73	2.43
4	苏氨酸	Thr	$Y = (21292.7)X + (-19313.5)$	0.9999	99.1~101.1	0.67	2.24
5	丝氨酸	Ser	$Y = (19883.8)X + (-8062.61)$	0.9999	97.2~103.1	0.65	2.18
6	谷氨酸	Glu	$Y = (21213.4)X + (-32033.6)$	0.9999	97.8~103.4	0.92	3.07
7	脯氨酸	Pro	$Y = (4534.70)X + (-20346.0)$	0.9999	97.8~102.0	2.56	8.54
8	甘氨酸	Gly	$Y = (27302.9)X + (-25542.3)$	0.9999	98.0~102.1	0.35	1.16
9	丙氨酸	Ala	$Y = (17983.4)X + (-25267.6)$	0.9999	97.8~102.8	0.56	1.86
10	胱氨酸	(Cys) ₂	$Y = (26802.6)X + (-24949.5)$	0.9999	98.1~103.2	0.38	1.25
11	缬氨酸	Val	$Y = (18523.7)X + (-16315.6)$	0.9999	98.0~102.9	0.50	1.69
12	蛋氨酸	Met	$Y = (24367.2)X + (-23098.7)$	0.9998	97.8~102.5	0.51	1.71
13	异亮氨酸	Ile	$Y = (19112.0)X + (-19557.8)$	0.9998	97.1~105.2	0.96	3.22
14	亮氨酸	Leu	$Y = (23631.2)X + (-24038.3)$	0.9998	97.6~102.5	0.56	1.85
15	酪氨酸	Tyr	$Y = (24557.0)X + (-17361.4)$	0.9999	97.9~105.7	0.45	1.51
16	苯丙氨酸	Phe	$Y = (23320.9)X + (-13578.6)$	0.9999	98.2~104.0	0.51	1.71
17	组氨酸	His	$Y = (25111.3)X + (-11823.0)$	0.9999	98.3~101.9	0.23	0.76
18	赖氨酸	Lys	$Y = (19864.0)X + (-14133.1)$	0.9999	98.1~103.5	0.36	1.20
19	精氨酸	Arg	$Y = (10936.5)X + (66152.0)$	0.9996	96.1~105.7	0.84	2.78

2.3 精密度

对 50 nmol/mL 的混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器精密度，所得结果见表 3。结果显示，19 种氨基酸保留时间的 RSD 在 0.01%~0.38% 之间，峰面积的 RSD 在 0.20%~2.52% 之间，仪器精密度良好。

表 3 保留时间和峰面积精密度结果 (n=6)

No.	化合物	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	CySO ₃ H	0.02	0.20
2	MetSON	0.28	0.44
3	Asp	0.38	1.86
4	Thr	0.27	1.89
5	Ser	0.23	0.89
6	Glu	0.12	1.34
7	Pro	0.21	2.52
8	Gly	0.05	0.97
9	Ala	0.04	0.85
10	(Cys)2	0.03	0.81
11	Val	0.03	0.65
12	Met	0.04	0.79
13	Ile	0.05	1.62
14	Leu	0.03	0.49
15	Tyr	0.02	0.42
16	Phe	0.02	0.45
17	His	0.01	0.20
18	Lys	0.01	0.82
19	Arg	0.01	1.47

2.4 准确度

取某市售饲料样品按照 1.4 样品前处理后，加入适量氨基酸混合标准溶液，平行三份，按照 1.2 分析条件进行测定并计算回收率。添加浓度及回收率结果如表 4 所示，19 种氨基酸回收率在 94.3%~100.8% 之间，表明该方法准确度良好。

表 4 加标回收率结果 (n=3)

No.	化合物	样品浓度 (nmol/mL)	添加浓度 (nmol/mL)	实测浓度 (nmol/mL)	回收率 (%)	RSD(%)
1	CySO ₃ H	9.58	50.0	58.95	98.8	0.09
2	MetSON	8.87	50.0	59.10	100.4	0.15
3	Asp	43.02	50.0	92.42	98.9	0.31
4	Thr	20.84	50.0	70.86	100.7	0.71
5	Ser	27.22	50.0	76.09	98.6	0.82
6	Glu	77.31	50.0	125.43	94.9	1.28
7	Pro	29.82	50.0	77.39	94.3	2.29
8	Gly	32.77	50.0	81.58	97.9	0.24
9	Ala	36.72	50.0	84.02	95.3	0.74
10	(Cys)2	N.D.	50.0	49.43	99.4	0.53

11	Val	24.61	50.0	73.05	97.2	0.40
12	Met	N.D.	50.0	49.38	98.9	0.11
13	Ile	18.07	50.0	66.70	97.2	0.03
14	Leu	40.93	50.0	89.49	97.6	0.42
15	Tyr	N.D.	50.0	50.26	100.6	0.19
16	Phe	18.25	50.0	67.29	98.4	0.29
17	His	4.80	50.0	52.48	95.5	0.49
18	Lys	25.74	50.0	73.36	95.0	0.16
19	Arg	32.64	50.0	84.14	100.8	1.84

N.D. 表示未检出。

2.5 氧化酸水解法用于实际样品测定

取某市售饲料样品平行2份进行测定,按照GB/T 18246-2019要求,使用氧化酸水解法,以氢溴酸为终止剂时,可测定除酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸和色氨酸以外的14种氨基酸含量,典型色谱图见图2,测定结果见表5,胱氨酸((Cys)2)实为胱氨酸与半胱氨酸之和,以胱氨酸计。

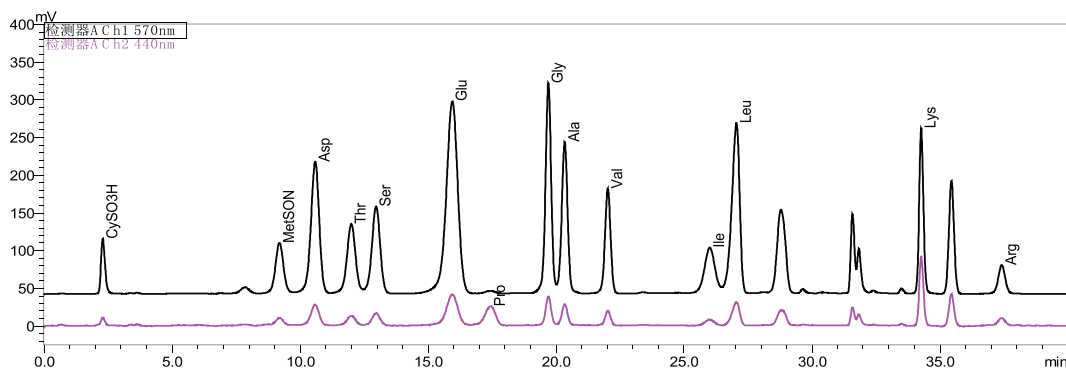


图2 某市售饲料样品色谱图

表5 样品测定结果 (n=2)

No.	化合物	饲料样品 1 (%)	饲料样品 2 (%)
1	Asp	2.41	2.27
2	Thr	1.02	0.99
3	Ser	1.11	1.12
4	Glu	4.54	4.49
5	Pro	1.48	1.44
6	Gly	0.99	0.96
7	Ala	1.37	1.30
8	(Cys)2	0.46	0.45
9	Val	1.16	1.10
10	Met	0.35	0.54
11	Ile	1.04	0.98
12	Leu	4.68	4.42
13	Lys	1.59	1.51
14	Arg	0.96	0.83

■ 结论

本文使用岛津氨基酸分析仪建立了 19 种氨基酸茚三酮柱后衍生分析方法，并应用于饲料样品中氨基酸的测定。该方法准确可靠，精密度良好，满足 GB/T 18246-2019《饲料中氨基酸的测定》要求，可为饲料中氨基酸的测定提供参考。

岛津应用云

