

# 使用 Nexera™ 柱后氨基酸分析系统分析食品

氨基酸是构成人体所需蛋白质的重要营养素。一直以来，在食品和药品的质量控制等多种领域都有氨基酸分析的需求，例如蛋白质结构解析和疾病诊断等研究用途。近年来，随着分析的高速化要求不断增加，开发出了可实现更快速分析的在线预处理柱的方法。另一方面，虽然柱后衍生法相对耗时，但是测定的氨基酸应用范围广，目前仍为多数人采用。

岛津公司的柱后衍生法是一种自动分析系统，使用阳离子交换柱梯度洗脱各组分，然后利用邻苯二甲醛（OPA）进行衍生后使用荧光检测器进行分析。OPA 衍生的氨基酸具有优异的灵敏度、线性，同时可以高灵敏度检测脯氨酸等亚氨基酸。由于本方法是在分离后进行反应，因此不易受到样品中所含基质的影响，可以高灵敏度检测氨基酸，且选择性较高。分离方法包括水解氨基酸分析用的 Na 型和游离氨基酸分析用的 Li 型等 2 种分析模式。使用最适合各自分离模式的时间程序即可同时分析氨基酸，而使用专用的流动相试剂盒、及反应液试剂盒，可省去制备步骤，高准确度地进行氨基酸分析。

本文介绍了使用新发售的“Nexera 柱后氨基酸分析系统”分析食品中氨基酸的案例。

\*：详见应用报告 L529B。

A. Tanabe, H. Yamamoto

## ■ 水解氨基酸（Na 型）的分析【标准样品】

进行水解氨基酸分析（Na 型）时，可分离、定量水解蛋白质后得到的约 20 种氨基酸。Na 型柱分析总共可提供 3 个分离方法：高分离度模式的方法、高速模式方法以及包含色氨酸同时分析的方法。图 1～3 所示为三种条件下的氨基酸标样的分析案例，表 1 所示为 Na 型分析条件。

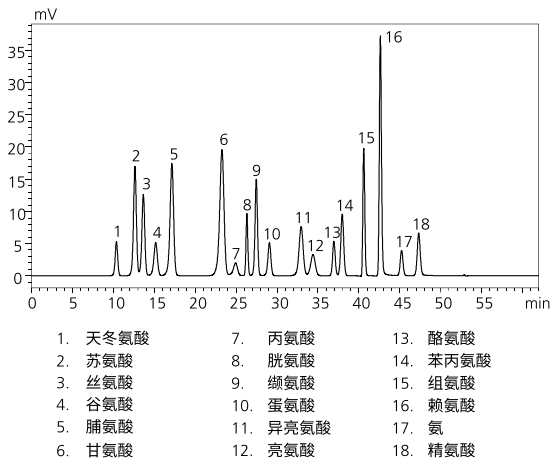


图 1 18 种标准氨基酸组分的分析 (0.1 μmol/L、Na 型高分离度模式)

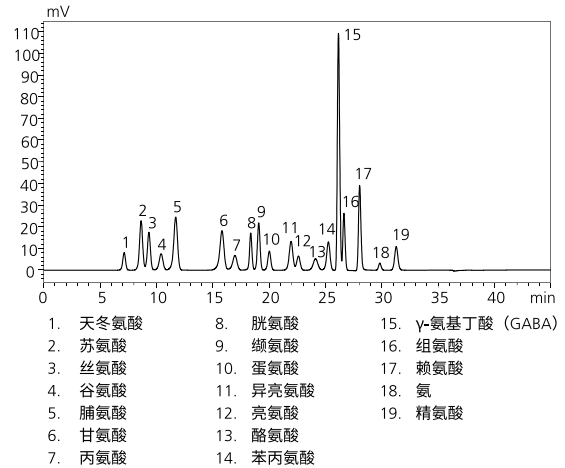


图 2 19 种标准氨基酸组分的分析 (0.1 μmol/L、Na 型高速模式)

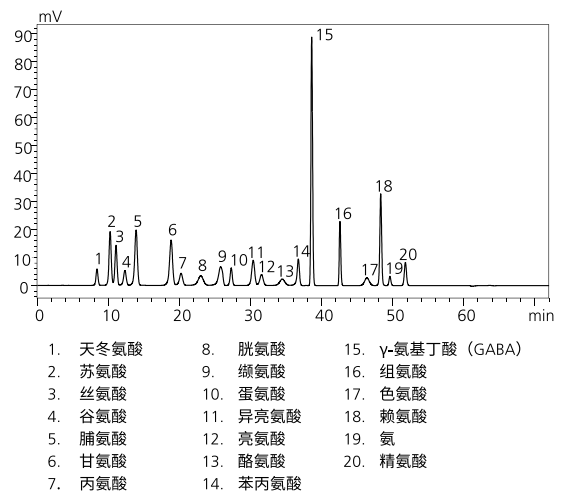


图 3 20 种标准氨基酸组分的分析 (0.1 μmol/L、Na 型色氨酸同时分析模式)

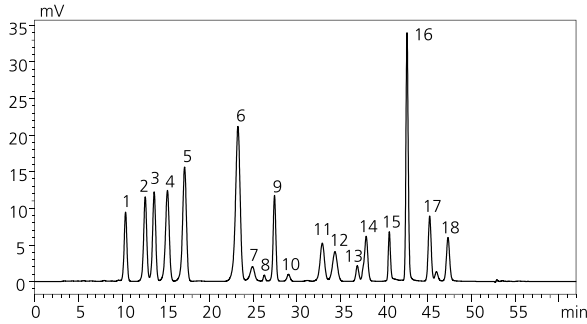
表 1 Na 型分析条件 (共通)

色谱柱	: Shim-pack™ 氨基钠 (100 mm×6.0 mm I.D., 5 μm) *1
捕氨柱	: Shim-pack ISC-30/S0504Na (50 mm×4.0 mm 内径) *2
流动相	: 氨基酸流动相试剂盒 (钠型) *3 梯度洗脱
流速	: 0.4~0.6 mL/min
柱温	: 60 °C
进样量	: 10 μL
样品瓶	: 1.5 mL 进样小瓶, 玻璃*4
反应试剂	: 氨基酸试剂盒*5
反应液流速	: 均为 0.2 mL/min
反应温度	: 60 °C
检测	: Ex. 350 nm Em. 450 nm

\*1 : P/N S228-18837-91、\*2 : P/N S228-14206-91、  
\*3 : P/N S228-21195-94、\*4 : P/N S228-15652-92、  
\*5 : P/N S228-21195-93

## Na 型高分离度模式的分析【盐酸水解：大豆、液态奶、蛋白粉】

下面介绍分析 Na 型高分离度模式的案例。图 4~9 为 18 种蛋白质结合氨基酸经盐酸水解后的分析案例。其中，由于 9 种必要氨基酸组分（苏氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、天冬氨酸、白氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸）无法在体内合成，因此需要从食物当中摄取。

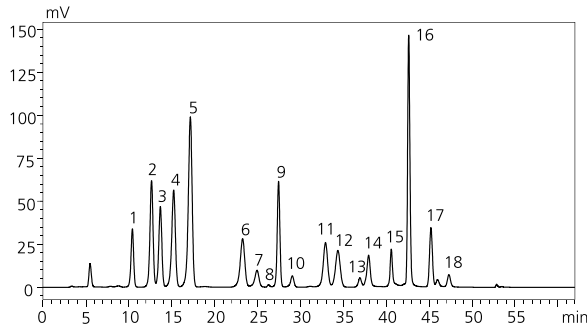


- |         |          |          |
|---------|----------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 7. 丙氨酸   | 13. 酪氨酸  |
| 2. 苏氨酸  | 8. 胱氨酸   | 14. 苯丙氨酸 |
| 3. 丝氨酸  | 9. 缬氨酸   | 15. 组氨酸  |
| 4. 谷氨酸  | 10. 蛋氨酸  | 16. 赖氨酸  |
| 5. 脯氨酸  | 11. 异亮氨酸 | 17. 氨    |
| 6. 甘氨酸  | 12. 亮氨酸  | 18. 精氨酸  |

图 4 大豆（盐酸水解）的分析（Na 型高分离度模式）

- 
- 5.03 mg 磨碎的大豆
- 6 mol/L HCl (500 μL)
  - 减压密封容器
  - 110°C 静置 22 小时
  - 在氮气下蒸发至干
  - 0.2 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 2.2) (500 μL)
  - 用涡旋混合器溶解
  - 过滤 (0.45 μm, 10000 rpm×10 分钟)
- 50 μL 滤液
- 0.2 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 2.2) (950 μL)
- HPLC
- 

图 5 大豆（盐酸水解）的预处理方案

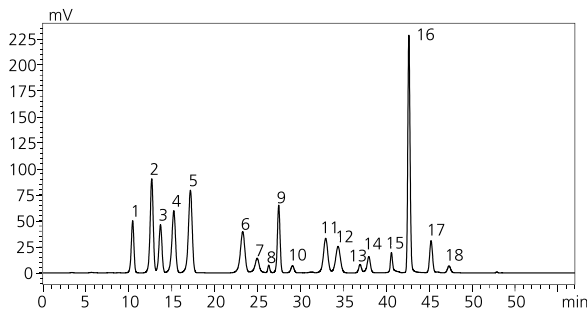


- |         |          |          |
|---------|----------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 7. 丙氨酸   | 13. 酪氨酸  |
| 2. 苏氨酸  | 8. 胱氨酸   | 14. 苯丙氨酸 |
| 3. 丝氨酸  | 9. 缬氨酸   | 15. 组氨酸  |
| 4. 谷氨酸  | 10. 蛋氨酸  | 16. 赖氨酸  |
| 5. 脯氨酸  | 11. 异亮氨酸 | 17. 氨    |
| 6. 甘氨酸  | 12. 亮氨酸  | 18. 精氨酸  |

图 6 液态奶（盐酸水解）的分析（Na 型高分离度模式）

- 
- 250 μL 婴儿配方奶
- 12 mol/L HCl (250 μL)
  - 减压密封容器
  - 110°C 静置 22 小时
  - 在氮气下蒸发至干
  - 0.2 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 2.2) (500 μL)
  - 用涡旋混合器溶解
  - 过滤 (0.45 μm, 10000 rpm×10 分钟)
- 100 μL 滤液
- 0.2 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 2.2) (900 μL)
- HPLC
- 

图 7 液态奶（盐酸水解）的预处理方案



- |         |          |          |
|---------|----------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 7. 丙氨酸   | 13. 酪氨酸  |
| 2. 苏氨酸  | 8. 胱氨酸   | 14. 苯丙氨酸 |
| 3. 丝氨酸  | 9. 缬氨酸   | 15. 组氨酸  |
| 4. 谷氨酸  | 10. 蛋氨酸  | 16. 赖氨酸  |
| 5. 脯氨酸  | 11. 异亮氨酸 | 17. 氨    |
| 6. 甘氨酸  | 12. 亮氨酸  | 18. 精氨酸  |

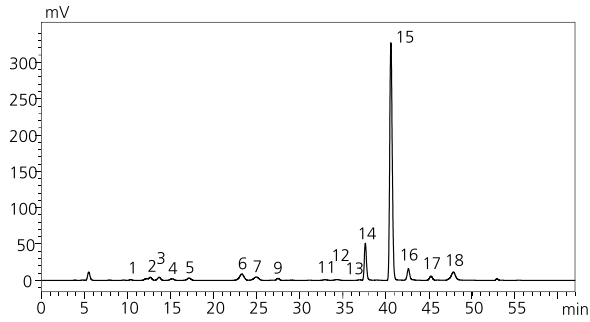
图 8 蛋白粉（盐酸水解）的分析（Na 型高分离度模式）

- 
- 5.05 mg 蛋白粉
- 6 mol/L HCl (500 μL)
  - 减压密封容器
  - 110°C 静置 22 小时
  - 在氮气下蒸发至干
  - 0.2 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 2.2) (500 μL)
  - 用涡旋混合器溶解
  - 过滤 (0.45 μm, 10000 rpm×10 分钟)
- 滤液
- HPLC
- 

图 9 蛋白粉（盐酸水解）的预处理方案

## Na 型高分离度模式的分析【鸡胸肉、大豆素肉、鱼露、氨基酸膳食补充剂】

图 10~17 为分析从样品中提取所得 18 种游离氨基酸组分的案例。这里使用超滤试剂盒去除蛋白质。



- |         |          |         |
|---------|----------|---------|
| 1. 天冬氨酸 | 7. 丙氨酸   | 15. 组氨酸 |
| 2. 苏氨酸  | 9. 缬氨酸   | 16. 赖氨酸 |
| 3. 丝氨酸  | 11. 异亮氨酸 | 17. 氨   |
| 4. 谷氨酸  | 12. 亮氨酸  | 18. 精氨酸 |
| 5. 脯氨酸  | 13. 酪氨酸  |         |
| 6. 甘氨酸  | 14. 苯丙氨酸 |         |

图 10 鸡胸肉的分析 (Na 型高分离度模式)

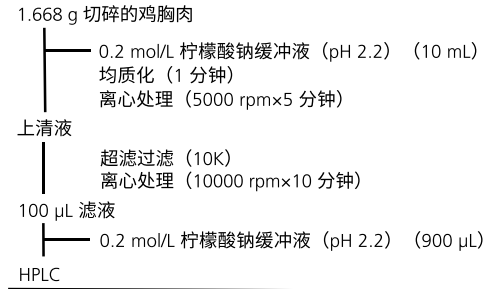
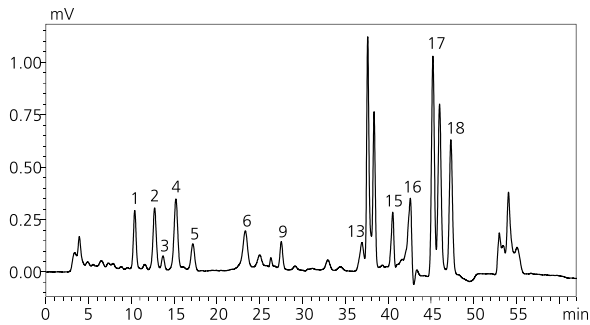


图 11 鸡胸肉的预处理方案



- |         |         |
|---------|---------|
| 1. 天冬氨酸 | 9. 缬氨酸  |
| 2. 苏氨酸  | 13. 酪氨酸 |
| 3. 丝氨酸  | 15. 组氨酸 |
| 4. 谷氨酸  | 16. 赖氨酸 |
| 5. 脯氨酸  | 17. 氨   |
| 6. 甘氨酸  | 18. 精氨酸 |

图 12 大豆素肉的分析 (Na 型高分离度模式)

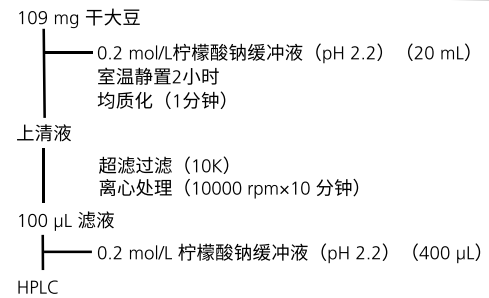
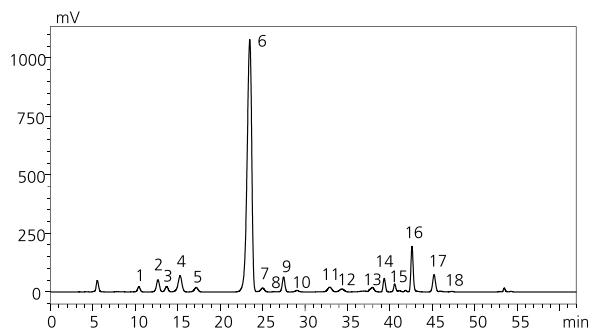


图 13 大豆素肉的预处理方案



- |         |          |          |
|---------|----------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 7. 丙氨酸   | 13. 酪氨酸  |
| 2. 苏氨酸  | 8. 胱氨酸   | 14. 苯丙氨酸 |
| 3. 丝氨酸  | 9. 缬氨酸   | 15. 组氨酸  |
| 4. 谷氨酸  | 10. 蛋氨酸  | 16. 赖氨酸  |
| 5. 脯氨酸  | 11. 异亮氨酸 | 17. 氨    |
| 6. 甘氨酸  | 12. 亮氨酸  | 18. 精氨酸  |

图 14 鱼露 (鱼酱油) 的分析 (Na 型高分离度模式)

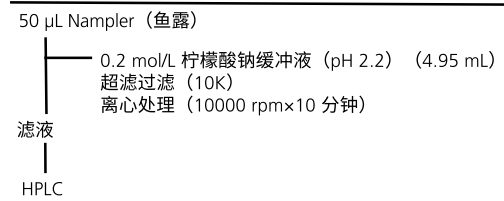
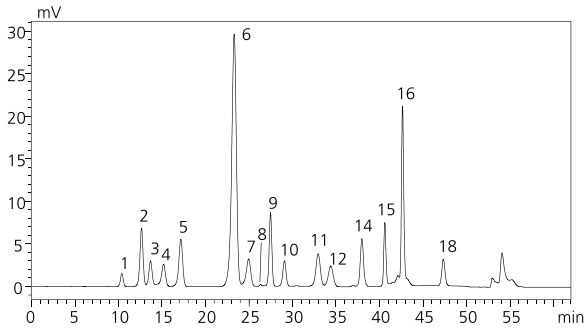


图 15 鱼露 (fish sauce) 的预处理方案



- |         |          |          |
|---------|----------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 7. 丙氨酸   | 13. 苯丙氨酸 |
| 2. 苏氨酸  | 8. 胱氨酸   | 14. 组氨酸  |
| 3. 丝氨酸  | 9. 缬氨酸   | 15. 赖氨酸  |
| 4. 谷氨酸  | 10. 蛋氨酸  | 18. 精氨酸  |
| 5. 脯氨酸  | 11. 异亮氨酸 |          |
| 6. 甘氨酸  | 12. 亮氨酸  |          |

图 16 氨基酸膳食补充剂的分析 (Na 型高分离度模式)

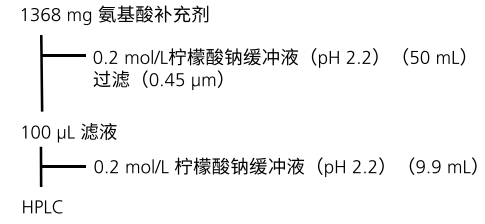
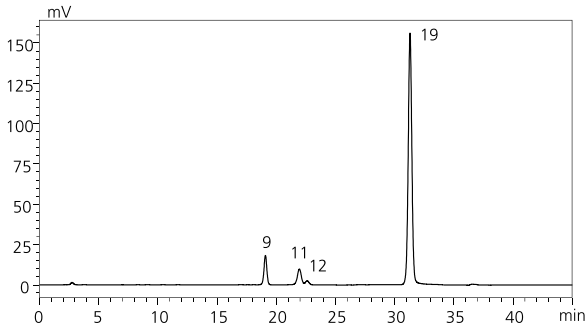


图 17 氨基酸膳食补充剂的预处理方案

## Na 型高速分析模式【运动饮料、啤酒、酸奶】

图 18~23 为使用 Na 型高速分析模式的案例。分析时间最短为 45 分钟，可在相对基质成分较少的样品中使用该分离模式。

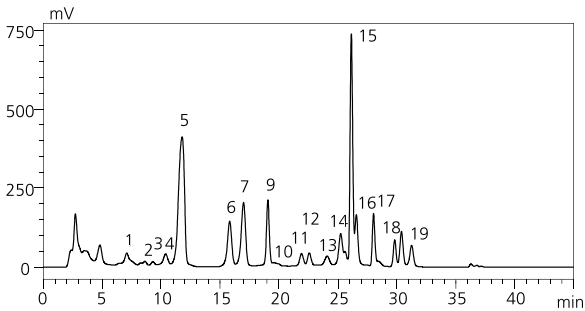


9. 缬氨酸 11. 异亮氨酸 12. 亮氨酸 19. 精氨酸

图 18 运动饮料的分析 (Na 型高速分析模式)



图 19 运动饮料的预处理方案



- |         |          |                   |
|---------|----------|-------------------|
| 1. 天冬氨酸 | 8. 缬氨酸   | 14. γ-氨基丁酸 (GABA) |
| 2. 苏氨酸  | 9. 蛋氨酸   | 15. 组氨酸           |
| 3. 丝氨酸  | 10. 异亮氨酸 | 16. 赖氨酸           |
| 4. 谷氨酸  | 11. 亮氨酸  | 17. 氨             |
| 5. 脯氨酸  | 12. 酪氨酸  | 18. 精氨酸           |
| 6. 甘氨酸  | 13. 苯丙氨酸 |                   |
| 7. 丙氨酸  |          |                   |

图 20 啤酒的分析 (Na 型高速分析模式)

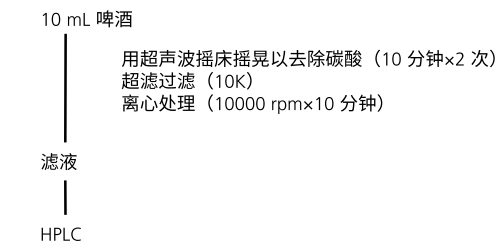


图 21 啤酒的预处理方案

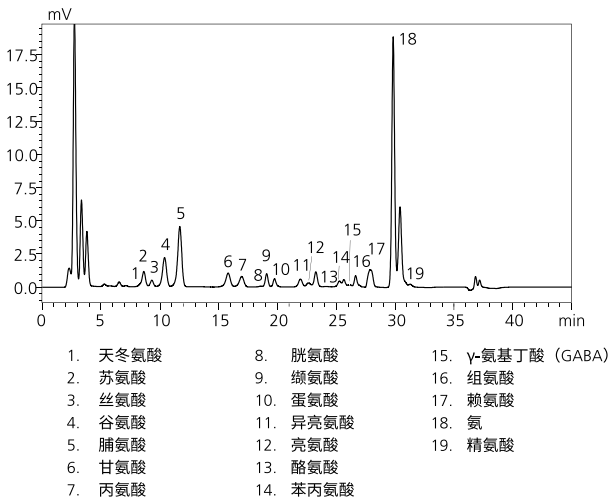


图 22 酸奶的分析 (Na 型高速分离模式)

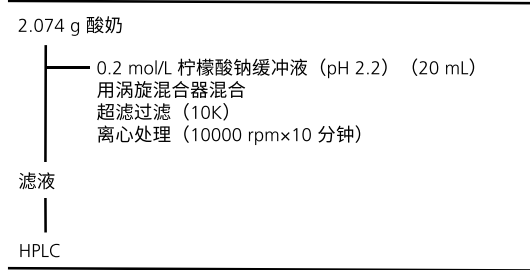


图 23 酸奶的预处理方案

## Na 型色氨酸同时分析模式【鸡胸肉 (碱水解)、蔬菜汁、味噌】

图 24~29 为使用 Na 型色氨酸同时分析模式的案例。由于色氨酸在酸水解时会被分解，因此分析包含色氨酸在内的蛋白质结合态的氨基酸时，采用碱水解的方式。

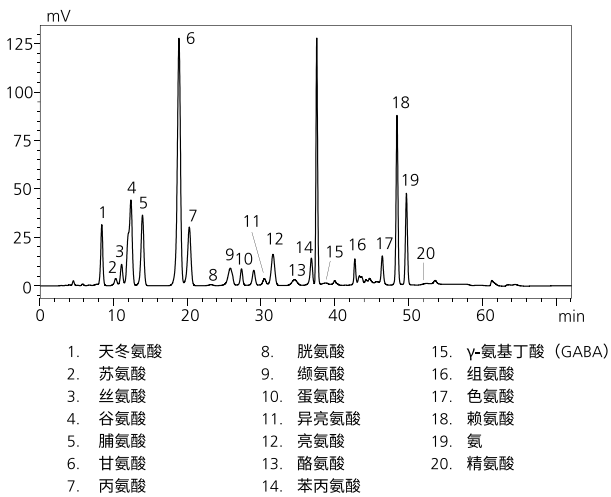


图 24 鸡胸肉 (碱水解) 的分析 (Na 型色氨酸同时分析模式)

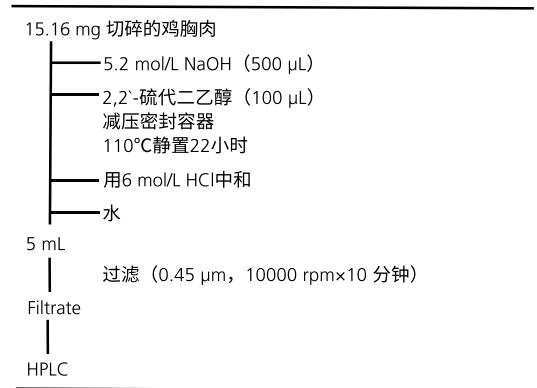


图 25 鸡胸肉 (碱水解) 的预处理方案

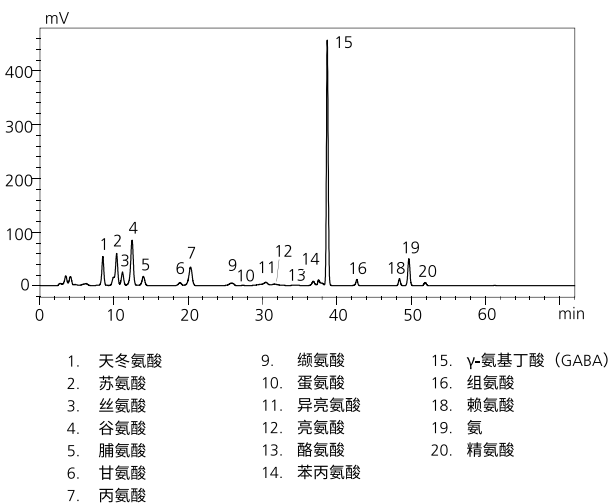


图 26 蔬菜汁的分析 (Na 型色氨酸同时分析模式)

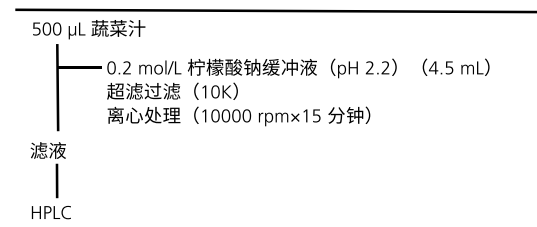
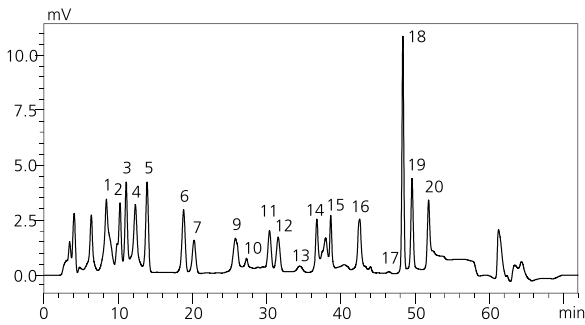


图 27 蔬菜汁的预处理方案



- |         |          |                           |
|---------|----------|---------------------------|
| 1. 天冬氨酸 | 9. 缬氨酸   | 15. $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) |
| 2. 苏氨酸  | 10. 蛋氨酸  | 16. 组氨酸                   |
| 3. 丝氨酸  | 11. 异亮氨酸 | 17. 色氨酸                   |
| 4. 谷氨酸  | 12. 亮氨酸  | 18. 赖氨酸                   |
| 5. 脯氨酸  | 13. 酪氨酸  | 19. 氨                     |
| 6. 甘氨酸  | 14. 苯丙氨酸 | 20. 精氨酸                   |
| 7. 丙氨酸  |          |                           |

图 28 味精的分析 (Na 型色氨酸同时分析模式)

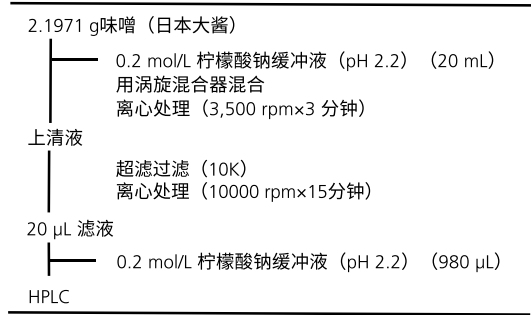


图 29 味精的预处理方案

## Na 型柱分析磺基丙氨酸和蛋氨酸砷【标准样品、鸡胸肉 (过甲酸氧化-水解)】

半胱氨酸、胱氨酸、蛋氨酸经盐酸水解后分解。因此使用过甲酸氧化-水解，将半胱氨酸和胱氨酸转化为磺丙氨酸，将蛋氨酸转化为蛋氨酸砷后进行分析。图 30 为磺丙氨酸和蛋氨酸砷的标准品色谱图，图 31 为过甲酸氧化-水解后鸡胸肉的分析谱图，表 2 为分析条件。

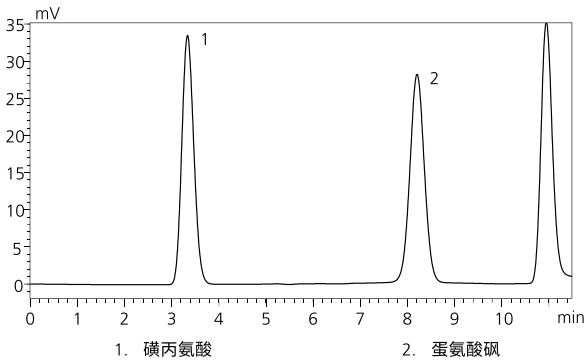


图 30 标准样品的分析  
(磺丙氨酸和蛋氨酸砷的浓度均为 0.1 mmol/L)

表 2 磺丙氨酸和蛋氨酸砷的分析条件

色谱柱	: Shim-pack Amino-Na (100 mm×6.0 mm ID, 5 $\mu$ m)
流动相	: A*6) 67 mmol/L 柠檬酸钠, 含 7% 乙醇和 0.15 mol/L 高氯酸 B) 0.2 mol/L NaOH 梯度洗脱
流速	: 0.4 mL/min
柱温	: 60 °C
进样量	: 10 $\mu$ L
反应试剂	: 氨基酸试剂盒 试剂 A 中不添加次氯酸钠
试剂流速	: 每个 0.2 mL/min
反应温度	: 60 °C
检测	: Ex. 350 nm Em. 450 nm

\*6 : 柠檬酸钠 2 水合物 19.6 g, 乙醇 70 mL, 高氯酸 (60%) 14 毫升放入 1 升水中

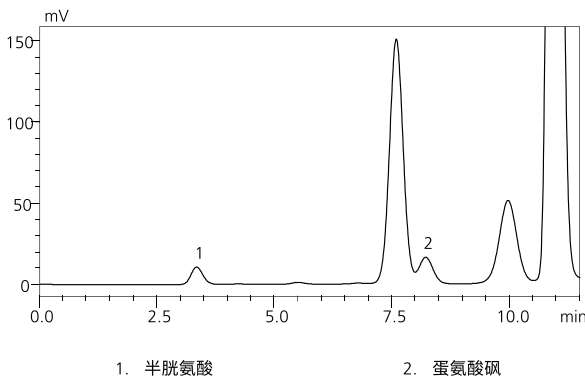


图 31 鸡胸肉 (过甲酸氧化-水解) 的分析

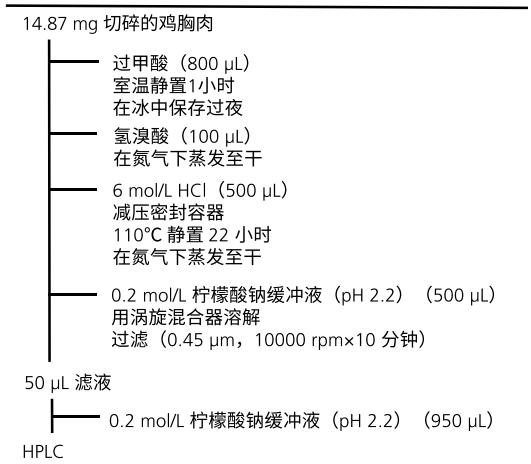
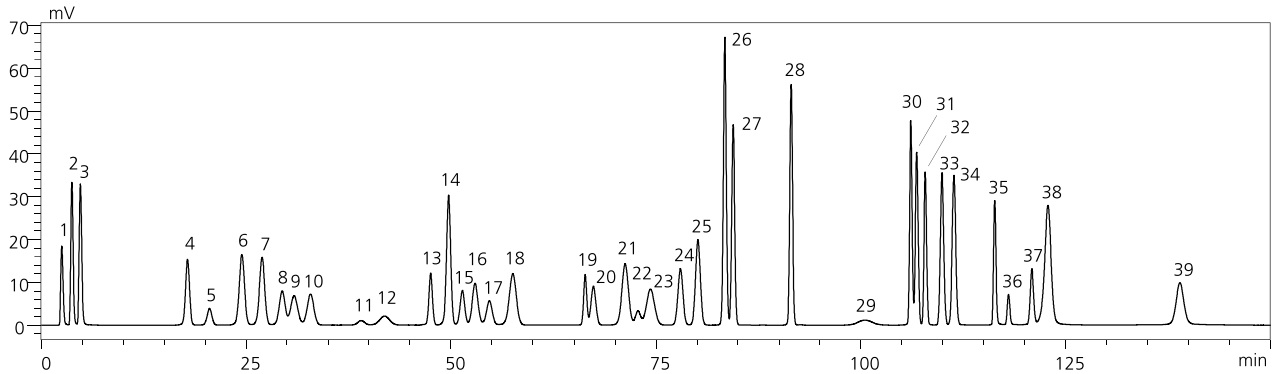


图 32 鸡胸肉 (过甲酸氧化-水解) 的预处理方案

## Na 型高分离度模式的分析【鸡胸肉、大豆素肉、鱼露、氨基酸膳食补充剂】

图 10~17 为分析从样品中提取所得 18 种游离氨基酸组分的案例。这里使用超滤试剂盒去除蛋白质。



- |             |             |                   |
|-------------|-------------|-------------------|
| 1. o-磷酸丝氨酸  | 15. 丙氨酸     | 28. γ-氨基丁酸 (GABA) |
| 2. 牛磺酸      | 16. 瓜氨酸     | 29. 色氨酸           |
| 3. 邻磷酸乙醇胺   | 17. α-氨基正丁酸 | 30. 组氨酸           |
| 4. 天冬氨酸     | 18. 缬氨酸     | 31. 3-甲基组氨酸       |
| 5. 羟脯氨酸     | 19. 胱氨酸     | 32. 1-甲基组氨酸       |
| 6. 苏氨酸      | 20. 蛋氨酸     | 33. 肌肽            |
| 7. 丝氨酸      | 21. 异亮氨酸    | 34. 鹅氨酸           |
| 8. 天冬酰胺     | 22. 胱硫醚     | 35. 羟赖氨酸          |
| 9. 谷氨酸      | 23. 亮氨酸     | 36. 鸟氨酸           |
| 10. 谷氨酰胺    | 24. 酪氨酸     | 37. 赖氨酸           |
| 11. 肌氨酸     | 25. 苯丙氨酸    | 38. 氨             |
| 12. α-氨基己二酸 | 26. β-丙氨酸   | 39. 精             |

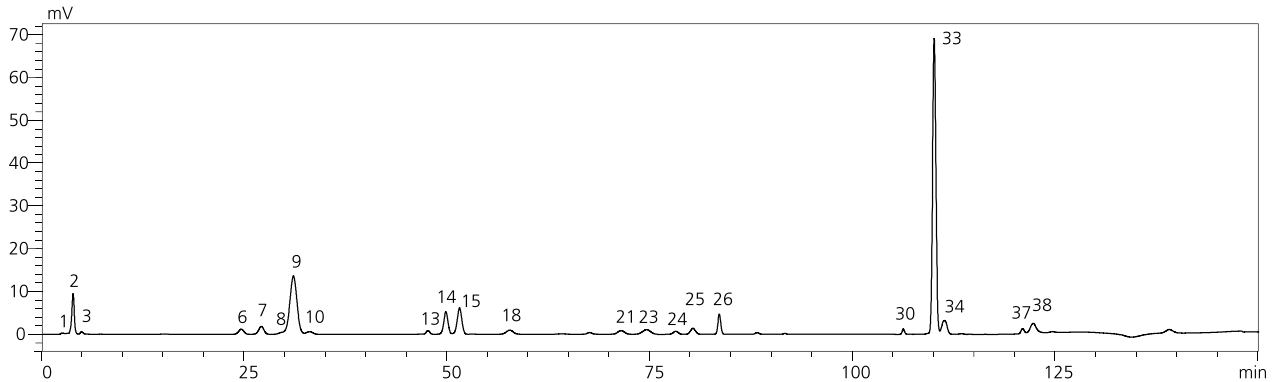
图 33 39 种标准氨基酸组分的分析 (0.1 mmol/L\*\*, Li 型条件)

\*\*：其中，1~3,12,17,22 为 0.05 mmol/L，11 为 0.25 mmol/L，29 为 0.026 mmol/L

表 3 Li 型分析条件

色谱柱	: Shim-pack Amino-Li (100 mm×6.0 mm I.D., 5 μm) *7
氨基捕集柱	: Shim-pack ISC-30/S0504Li (50 mm×4.0 mm I.D.) *8
流动相	: 氨基酸流动相试剂盒 (锂型) *9 梯度洗脱
流速	: 0.6 mL/min
柱温	: 39 °C
进样量	: 10 μL
样品瓶	: LC 1.5 mL 进样小瓶, 玻璃
反应剂	: 氨基酸试剂盒
试剂流速	: 每个 0.2 mL/min
反应温度	: 39 °C
检测	: Ex. 350 nm Em. 450 nm

\*7 : P/N S228-18837-92、\*8 : P/N S228-00821-91、\*9 : P/N S228-21195-95



- |            |          |           |
|------------|----------|-----------|
| 1. o-磷酸丝氨酸 | 10. 谷氨酰胺 | 24. 酪氨酸   |
| 2. 牛磺酸     | 13. 脯氨酸  | 25. 苯丙氨酸  |
| 3. 邻磷酸乙醇胺  | 14. 甘氨酸  | 26. β-丙氨酸 |
| 6. 苏氨酸     | 15. 丙氨酸  | 30. 组氨酸   |
| 7. 丝氨酸     | 18. 缬氨酸  | 33. 肌肽    |
| 8. 天冬酰胺    | 21. 异亮氨酸 | 34. 鹅氨酸   |

图 34 里脊火腿的分析 (Li 型条件)

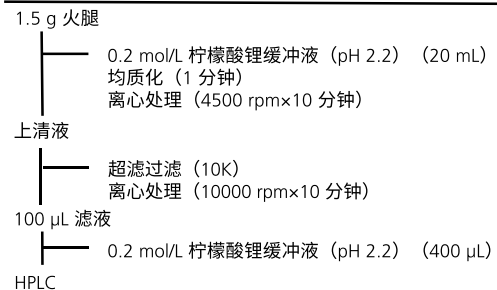
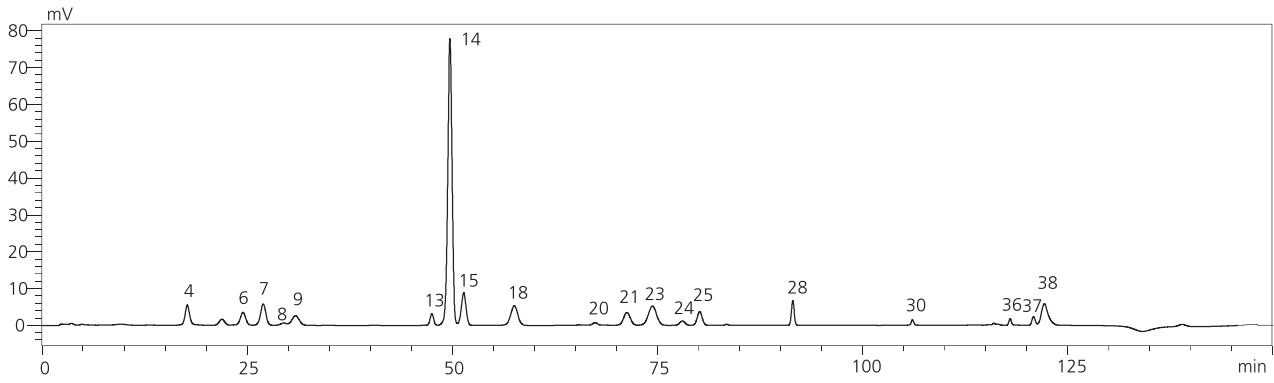


图 35 里脊火腿的预处理方案



- |         |          |                           |
|---------|----------|---------------------------|
| 4. 天冬氨酸 | 15. 丙氨酸  | 28. $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) |
| 6. 苏氨酸  | 18. 缬氨酸  | 30. 组氨酸                   |
| 7. 丝氨酸  | 20. 蛋氨酸  | 30. 组氨酸                   |
| 8. 天冬酰胺 | 21. 异亮氨酸 | 36. 鸟氨酸                   |
| 9. 谷氨酸  | 23. 亮氨酸  | 37. 赖氨酸                   |
| 13. 脯氨酸 | 24. 酪氨酸  | 38. 氨                     |
| 14. 甘氨酸 | 25. 苯丙氨酸 |                           |

图 36 黑醋的分析 (Li 型条件)

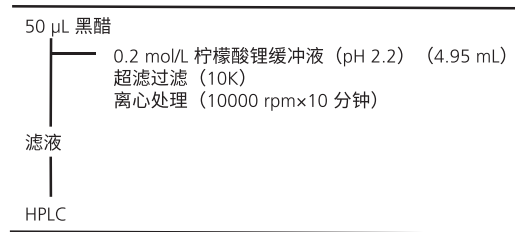
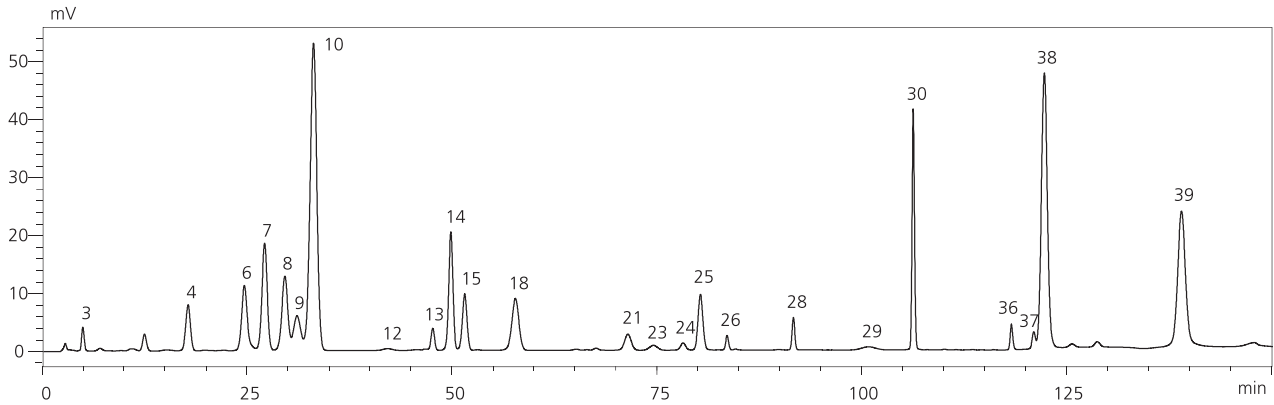


图 37 黑醋的预处理方案



- |           |          |                           |
|-----------|----------|---------------------------|
| 3. 邻磷酸乙醇胺 | 13. 脯氨酸  | 26. $\beta$ -丙氨酸          |
| 4. 天冬氨酸   | 14. 甘氨酸  | 28. $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) |
| 6. 苏氨酸    | 15. 丙氨酸  | 29. 色氨酸                   |
| 7. 丝氨酸    | 18. 缬氨酸  | 30. 组氨酸                   |
| 8. 天冬酰胺   | 21. 异亮氨酸 | 36. 鸟氨酸                   |
| 9. 谷氨酸    | 23. 亮氨酸  | 37. 赖氨酸                   |
| 10. 谷氨酰胺  | 24. 酪氨酸  | 38. 氨                     |

图 38 西兰花芽的分析 (Li 型条件)

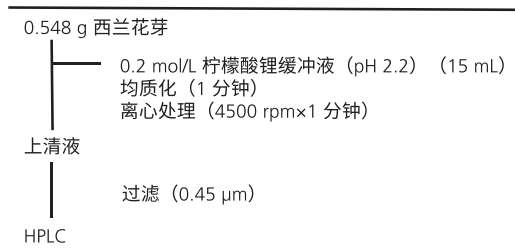


图 39 西兰花芽的预处理方案

## 结论

本文介绍了使用 Nexera 柱后氨基酸分析系统分析各种食品的案例。

此外，此次进行的预处理方案仅为示例。实际进行定量分析时，推荐在根据加标回收试验确认回收率的基础上予以实施。

岛津应用云



Nexera 和 Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司  
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2020 年 7 月