

## 使用一体型 HPLC 系统的自动预处理功能分析食品中的氨基酸

01-00028-CN

田边 彩乃、山本 洋子

### 对用户的好处

- ◆ 可通过自动柱前衍生化法，进行高灵敏度及选择性的分析。
- ◆ 可在约 20 分钟内完成氨基酸的分析。
- ◆ 可使用通用 HPLC 系统，轻松进行氨基酸分析。

### ■ 简介

食品中包含多种氨基酸，例如以美味组分而为人所知的谷氨酸。测定各种氨基酸的含量不仅是对评估营养价值和味觉有用，对于功能性组分的研究也起到了作用。

在应用报告 L529B 中，介绍了采用一体型 HPLC 的自动预处理功能分析氨基酸的情况。本文中使用该分析方法，对 14 种食品中的氨基酸进行了分析。同时介绍了预处理方案。

### ■ 柱前衍生化

使用本系统的自动柱前衍生化流程如图 1 所示。在自动进样器的预处理程序界面中进行设置。设置界面如图 2 所示。这里，在托盘 3 的 1 号试剂瓶内放入 MPA/OPA 试剂，在 2 号内放入 FMOC 试剂，在 3 号内放入磷酸水溶液。

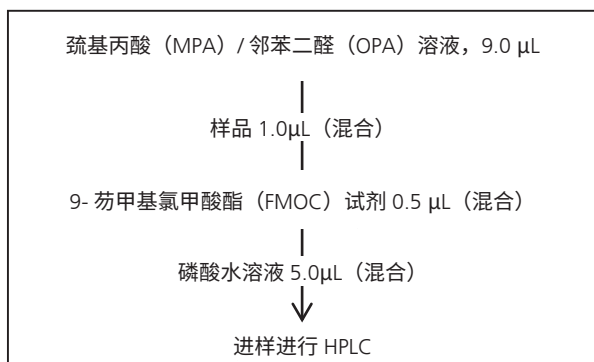


图 1 使用 LC-2050C 进行自动柱前衍生化的流程

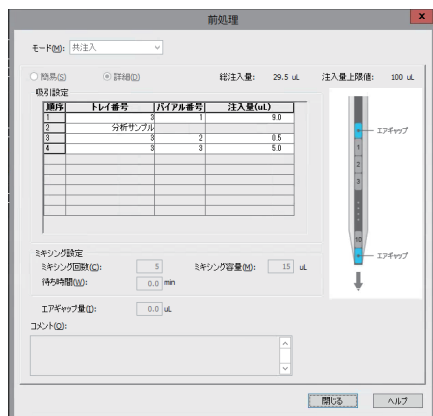


图 2 自动柱前衍生化的设置界面

### ■ 分析条件

进样前进行衍生化的柱前衍生化中，在利用色谱柱进行分离之前，氨基酸会被修饰高疏水性的官能基，因此可利用反相色谱法进行分离。分析条件如表 1 所示，梯度程序如表 2 所示。衍生化试剂及流动相的制备方法请参照表 3。

表 1 分析条件

系统	: LC-2050C *1
色谱柱	: Shim-pack™ XR-ODSII (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm) *2
流动相	: A) 20mmol/L (钠) 醋酸盐缓冲液 (pH 6) : B) 水 / 乙腈 = 10:90 : C) 20mmol/L (钠) 醋酸盐缓冲液 (pH 5) containing 0.5 mmol/L EDTA-2Na
模式	: 低压梯度
流速	: 1.0 mL/min
柱温	: 40 °C
进样量	: 1 μL
样品瓶	: 岛津样品瓶, LC, 1.5 mL, 玻璃 *3
检测	: 荧光检测器 (RF-20Axs) : Ch1) Ex. 350 nm, Em. 450 nm : Ch2) Ex. 266 nm, Em. 305 nm

\*1 也可适用于 LC-2030CPlus。

\*2 P/N S228-41624-92

\*3 P/N S228-15652-92

表 2 梯度程序

时间 (min)	组件	处理命令	数值
0.20	泵	B. 浓度	7
1.00	泵	B. 浓度	7
4.00	泵	C. 浓度	0
5.00	泵	B. 浓度	15
5.00	泵	C. 浓度	85
7.50	泵	B. 浓度	30
7.50	泵	C. 浓度	70
12.00	泵	B. 浓度	35
12.00	泵	C. 浓度	65
14.00	泵	B. 浓度	45
14.00	泵	C. 浓度	55
14.01	泵	B. 浓度	95
14.01	泵	C. 浓度	5
17.00	泵	B. 浓度	95
17.00	泵	C. 浓度	5
17.01	泵	B. 浓度	5
17.01	泵	C. 浓度	0
19.50	控制器	结束	

表 3 衍生化试剂及流动相的制备方法

- 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液  
将 0.62g 硼酸和 0.2 g 氢氧化钠加入 100mL 纯水中。
- 巯基丙酸试剂  
将 10 $\mu$ L 3- 巯基丙酸加入 10mL 0.1mol/L 硼酸盐缓冲液中。
- OPA 试剂  
将 0.3mL 乙醇加入 10mg 邻苯二醛中并完全溶解。然后加入 0.7mL 的 0.1mol/L 硼酸盐缓冲液和 4mL 纯水。
- 巯基丙酸 / OPA 溶液  
混合 300 $\mu$ L 的巯基丙酸试剂和 600 $\mu$ L 的 OPA 试剂。
- Fmoc 试剂  
将 10mg 9- 芴基甲基氯甲酸酯加入 50mL 乙腈中。
- 流动相 A  
20mmol/L (钠) 醋酸盐缓冲液 (pH 6) : 将 2.67g 三水乙酸钠和 41 $\mu$ L 醋酸加入 1000mL 纯水中。
- 流动相 B  
水 / 乙腈 = 10:90
- 流动相 C  
20mmol/L (钠) 醋酸盐缓冲液 (pH 5) 含 0.5mmol/L EDTA-2Na $\alpha$  将 0.19g EDTA-2Na、2.03g 三水乙酸钠和 308 $\mu$ L 醋酸加入 1000mL 纯水中。
- 磷酸水溶液  
将 0.5mL 磷酸加至 100mL 纯水中。

## 标准样品的分析

20 种蛋白质氨基酸、及茶氨酸和  $\gamma$ - 氨基丁酸 (GABA) 2 种组分的分析案例如图 3 所示。样品中同时存在色氨酸和 GABA 时, 源自 GABA 的谱峰中 (色谱图中带 \* 号的部分) 有杂峰可能影响色氨酸的定量, 请注意。

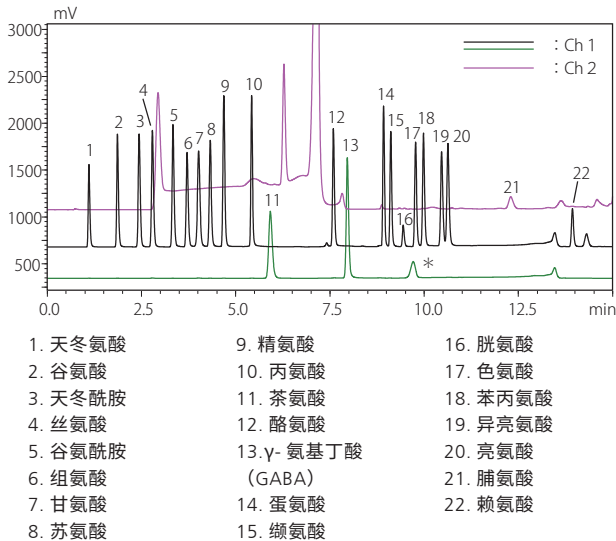


图 3 22 种标准氨基酸的色谱图 (各 25 mmol/L)

## 实际样品的分析

使用本系统, 对 4 份盐酸水解物 (玄米、大豆萃取液、水煮金枪鱼、鸡蛋) 和 10 份游离氨基酸样品 (大豆萃取液、贝类、水煮金枪鱼、膳食补充剂、蘑菇、抹茶、番茄汁、青汁、烧烤酱、椰奶) 进行了分析。色谱图和预处理方案如图 4 至图 31 所示。

使用柱前衍生化法, 会在样品中直接加入衍生化试剂进行反应, 因此可能存在样品基质影响衍生化反应的风险。这里, 为尽可能降低样品基质干扰, 使用超滤试剂盒 (分离分子量 3000) 对除蛋白进行预处理, 使用 10 mmol/L 盐酸对所有稀释溶媒进行预处理。

## 玄米 (盐酸水解物)

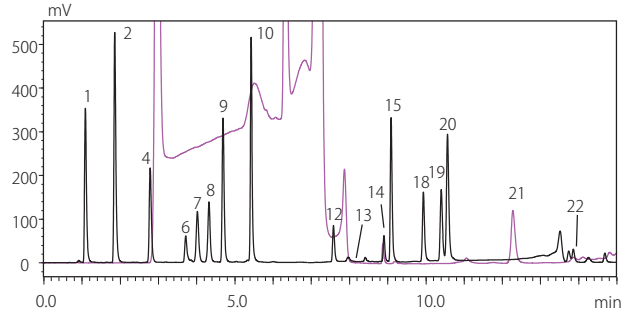


图 4 玄米 (盐酸水解物) 的色谱图

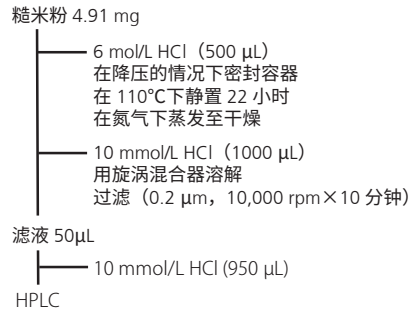


图 5 玄米 (盐酸水解物) 的预处理方案

## 鸡蛋 (盐酸水解物)

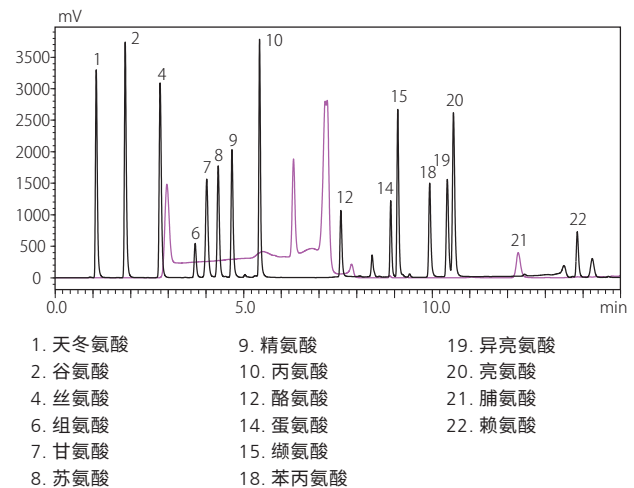


图 6 鸡蛋 (盐酸水解物) 的色谱图

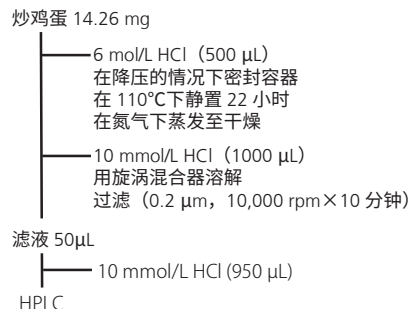
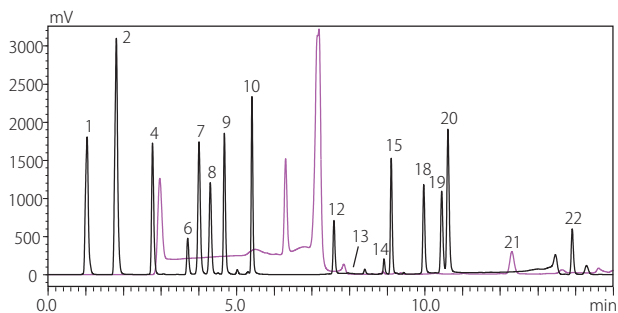


图 7 鸡蛋 (盐酸水解物) 的预处理方案

## 大豆萃取液 (盐酸水解物)



- |         |          |          |
|---------|----------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 9. 精氨酸   | 19. 异亮氨酸 |
| 2. 谷氨酸  | 10. 丙氨酸  | 20. 亮氨酸  |
| 4. 丝氨酸  | 12. 酪氨酸  | 21. 脯氨酸  |
| 6. 组氨酸  | 14. 蛋氨酸  | 22. 赖氨酸  |
| 7. 甘氨酸  | 15. 缬氨酸  |          |
| 8. 苏氨酸  | 18. 苯丙氨酸 |          |

图 8 大豆萃取液 (盐酸水解物) 的色谱图

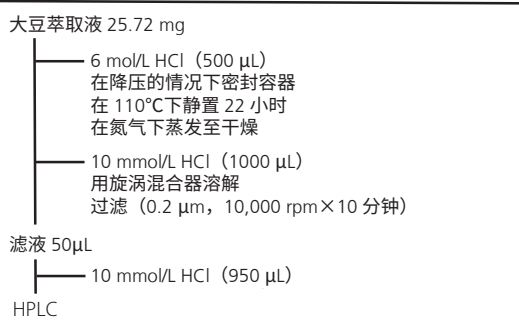
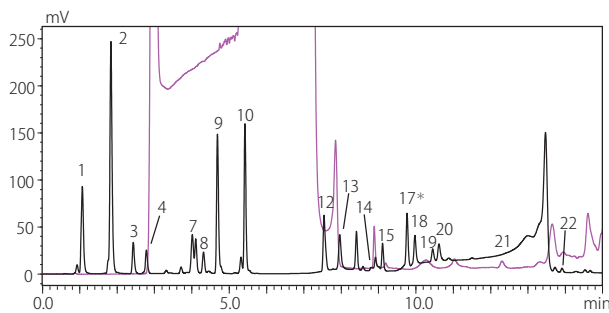


图 9 大豆萃取液 (盐酸水解物) 的预处理方案

## 大豆萃取液



- |         |                      |          |
|---------|----------------------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 10. 丙氨酸              | 18. 苯丙氨酸 |
| 2. 谷氨酸  | 12. 酪氨酸              | 19. 异亮氨酸 |
| 3. 天冬酰胺 | 13. γ-氨基丁酸<br>(GABA) | 20. 亮氨酸  |
| 4. 丝氨酸  | 14. 蛋氨酸              | 21. 脯氨酸  |
| 7. 甘氨酸  | 15. 缬氨酸              | 22. 赖氨酸  |
| 8. 苏氨酸  | 17. (色氨酸 + GABA) *   |          |
| 9. 精氨酸  |                      |          |

\* 源自色氨酸和 GABA 的谱峰可能重叠。

图 12 大豆萃取液的色谱图

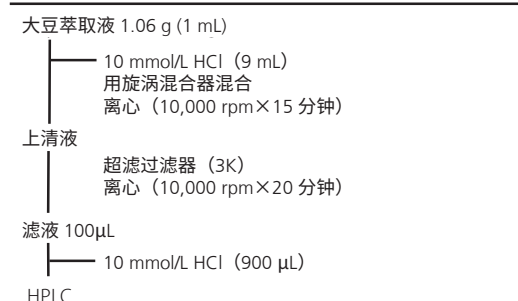
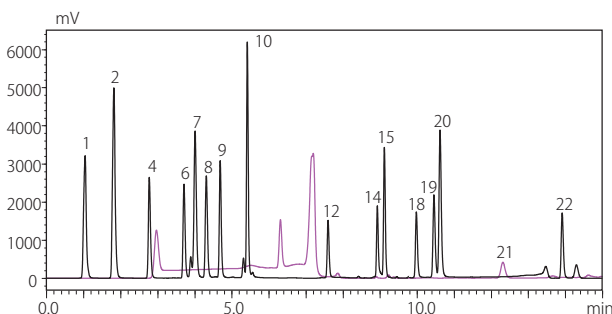


图 13 大豆萃取液的预处理方案

## 水煮金枪鱼 (盐酸水解物)



- |         |                      |          |
|---------|----------------------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 9. 精氨酸               | 15. 缬氨酸  |
| 2. 谷氨酸  | 10. 丙氨酸              | 18. 苯丙氨酸 |
| 4. 丝氨酸  | 12. 酪氨酸              | 19. 异亮氨酸 |
| 6. 组氨酸  | 13. γ-氨基丁酸<br>(GABA) | 20. 亮氨酸  |
| 7. 甘氨酸  | 14. 蛋氨酸              | 21. 脯氨酸  |
| 8. 苏氨酸  | 22. 赖氨酸              |          |

图 10 水煮金枪鱼 (盐酸水解物) 的色谱图

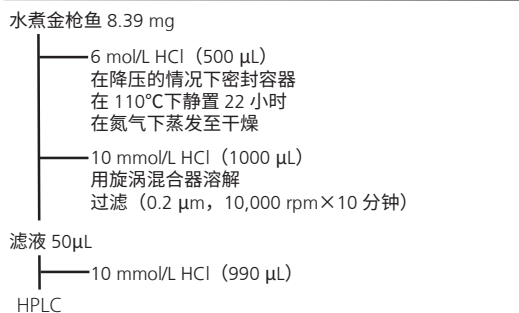
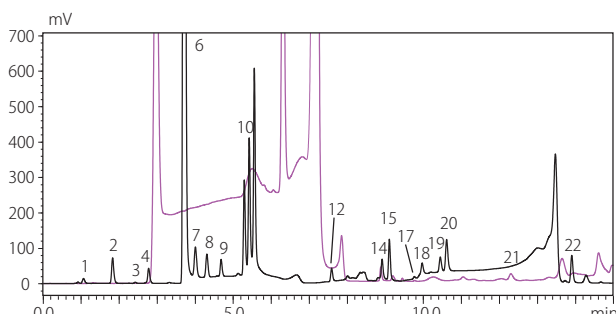


图 11 水煮金枪鱼 (盐酸水解物) 的预处理方案

## 水煮金枪鱼



- |         |         |          |
|---------|---------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 8. 苏氨酸  | 17. 色氨酸  |
| 2. 谷氨酸  | 9. 精氨酸  | 18. 苯丙氨酸 |
| 3. 天冬酰胺 | 10. 丙氨酸 | 19. 异亮氨酸 |
| 4. 丝氨酸  | 12. 酪氨酸 | 20. 亮氨酸  |
| 6. 组氨酸  | 14. 蛋氨酸 | 21. 脯氨酸  |
| 7. 甘氨酸  | 15. 缬氨酸 | 22. 赖氨酸  |

图 14 水煮金枪鱼的色谱图

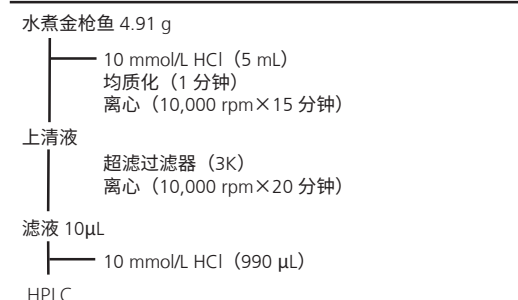
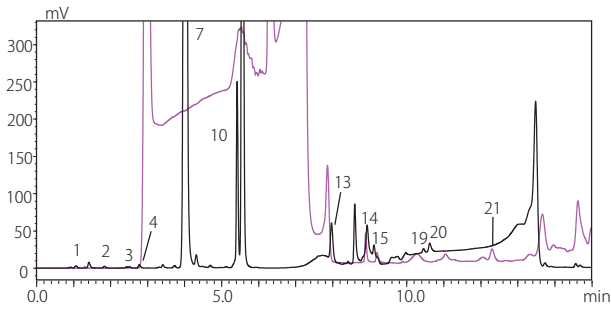


图 15 水煮金枪鱼的预处理方案

## 贝类



- |         |                           |          |
|---------|---------------------------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 10. 丙氨酸                   | 19. 异亮氨酸 |
| 2. 谷氨酸  | 13. $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) | 20. 亮氨酸  |
| 3. 天冬酰胺 | 14. 蛋氨酸                   | 21. 脯氨酸  |
| 4. 丝氨酸  | 15. 缬氨酸                   |          |
| 7. 甘氨酸  |                           |          |

图 16 贝类的色谱图

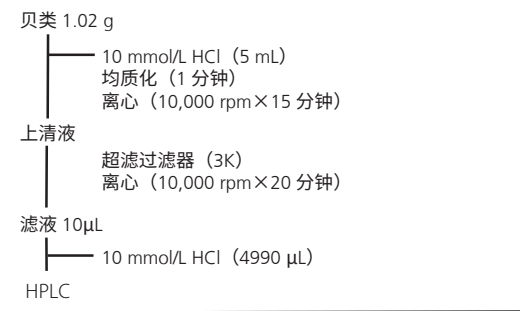
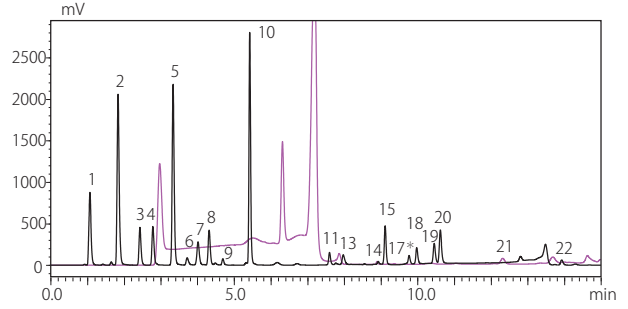


图 17 贝类的预处理方案

## 蘑菇



- |         |                           |                    |
|---------|---------------------------|--------------------|
| 1. 天冬氨酸 | 8. 苏氨酸                    | 15. 缬氨酸            |
| 2. 谷氨酸  | 9. 精氨酸                    | 17. (色氨酸 + GABA) * |
| 3. 天冬酰胺 | 10. 丙氨酸                   | 18. 苯丙氨酸           |
| 4. 丝氨酸  | 11. 酪氨酸                   | 19. 异亮氨酸           |
| 5. 谷氨酰胺 | 13. $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) | 20. 亮氨酸            |
| 6. 组氨酸  | 14. 蛋氨酸                   | 21. 脯氨酸            |
| 7. 甘氨酸  |                           | 22. 赖氨酸            |

\* 源自色氨酸和 GABA 的谱峰可能重叠。

图 20 蘑菇的色谱图

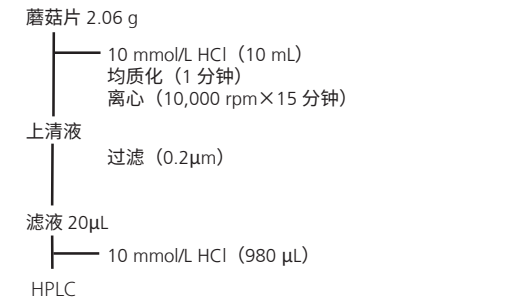
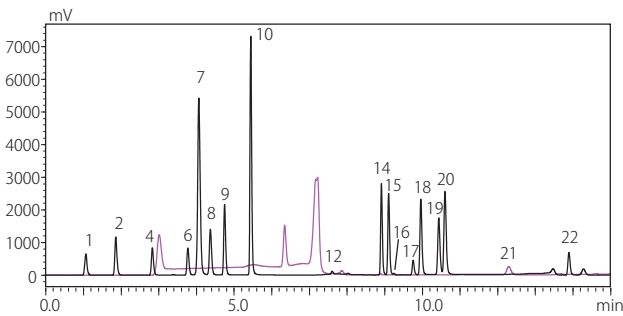


图 21 蘑菇的预处理方案

## 氨基酸膳食补充剂



- |         |         |          |
|---------|---------|----------|
| 1. 天冬氨酸 | 9. 精氨酸  | 17. 色氨酸  |
| 2. 谷氨酸  | 10. 丙氨酸 | 18. 苯丙氨酸 |
| 4. 丝氨酸  | 12. 酪氨酸 | 19. 异亮氨酸 |
| 6. 组氨酸  | 14. 蛋氨酸 | 20. 亮氨酸  |
| 7. 甘氨酸  | 15. 缬氨酸 | 21. 脯氨酸  |
| 8. 苏氨酸  | 16. 胱氨酸 | 22. 赖氨酸  |

图 18 氨基酸膳食补充剂的色谱图

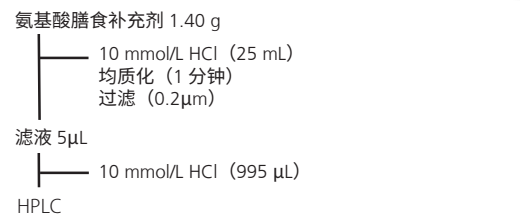
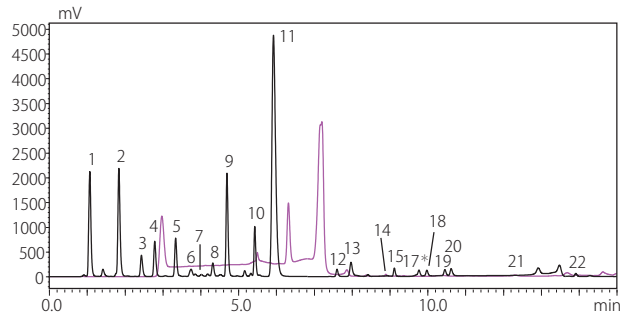


图 19 氨基酸膳食补充剂的预处理方案

## 抹茶



- |         |                           |                    |
|---------|---------------------------|--------------------|
| 1. 天冬氨酸 | 9. 精氨酸                    | 17. (色氨酸 + GABA) * |
| 2. 谷氨酸  | 10. 丙氨酸                   | 18. 苯丙氨酸           |
| 3. 天冬酰胺 | 11. 茶氨酸                   | 19. 异亮氨酸           |
| 4. 丝氨酸  | 12. 酪氨酸                   | 20. 亮氨酸            |
| 5. 谷氨酰胺 | 13. $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) | 21. 脯氨酸            |
| 6. 组氨酸  | 14. 蛋氨酸                   | 22. 赖氨酸            |
| 7. 甘氨酸  | 15. 缬氨酸                   |                    |
| 8. 苏氨酸  |                           |                    |

\* 源自色氨酸和 GABA 的谱峰可能重叠。

图 22 抹茶的色谱图

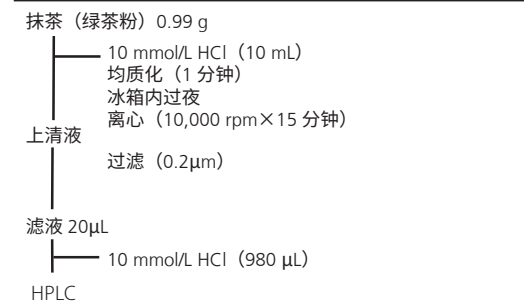
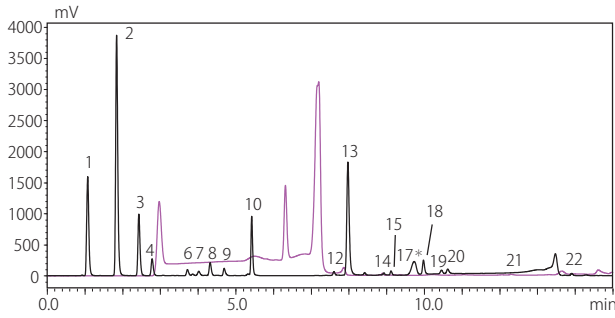


图 23 抹茶的预处理方案

## 番茄汁



- |         |                    |                    |
|---------|--------------------|--------------------|
| 1. 天冬氨酸 | 9. 精氨酸             | 17. (色氨酸 + GABA) * |
| 2. 谷氨酸  | 10. 丙氨酸            | 18. 苯丙氨酸           |
| 3. 天冬酰胺 | 12. 酪氨酸            | 19. 异亮氨酸           |
| 4. 丝氨酸  | 13. $\gamma$ -氨基丁酸 | 20. 亮氨酸            |
| 6. 组氨酸  | (GABA)             | 21. 脯氨酸            |
| 7. 甘氨酸  | 14. 蛋氨酸            | 22. 赖氨酸            |
| 8. 苏氨酸  | 15. 缬氨酸            |                    |

\* 源自色氨酸和 GABA 的谱峰可能重叠。

图 24 番茄汁的色谱图

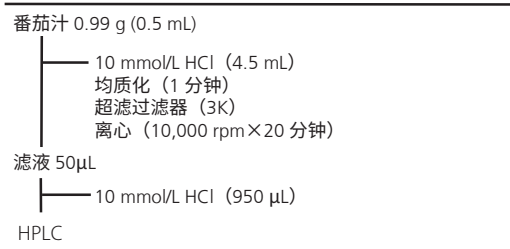
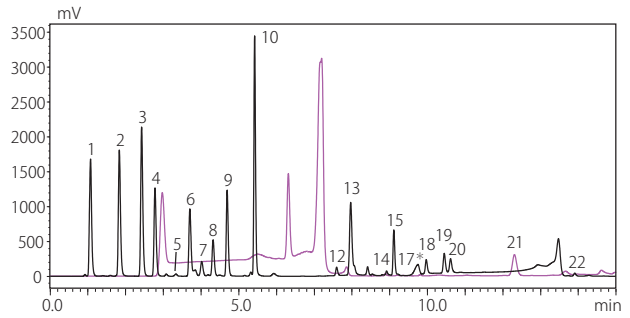


图 25 番茄汁的预处理方案

## 青汁



- |         |                    |                    |
|---------|--------------------|--------------------|
| 1. 天冬氨酸 | 8. 苏氨酸             | 15. 缬氨酸            |
| 2. 谷氨酸  | 9. 精氨酸             | 17. (色氨酸 + GABA) * |
| 3. 天冬酰胺 | 10. 丙氨酸            | 18. 苯丙氨酸           |
| 4. 丝氨酸  | 12. 酪氨酸            | 19. 异亮氨酸           |
| 5. 谷氨酰胺 | 13. $\gamma$ -氨基丁酸 | 20. 亮氨酸            |
| 6. 组氨酸  | (GABA)             | 21. 脯氨酸            |
| 7. 甘氨酸  | 14. 蛋氨酸            | 22. 赖氨酸            |

\* 源自色氨酸和 GABA 的谱峰可能重叠。

图 28 青汁的色谱图

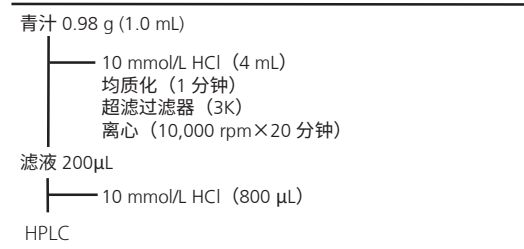
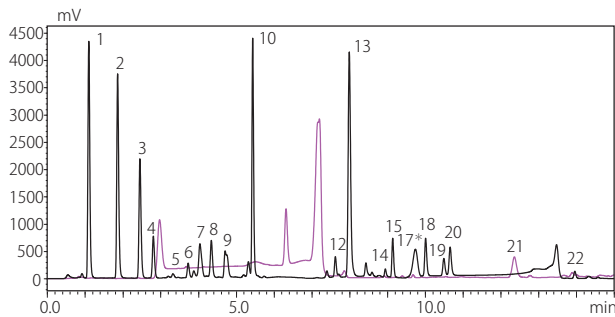


图 29 青汁的预处理方案

## 烧烤酱



- |         |                    |                    |
|---------|--------------------|--------------------|
| 1. 天冬氨酸 | 8. 苏氨酸             | 15. 缬氨酸            |
| 2. 谷氨酸  | 9. 精氨酸             | 17. (色氨酸 + GABA) * |
| 3. 天冬酰胺 | 10. 丙氨酸            | 18. 苯丙氨酸           |
| 4. 丝氨酸  | 12. 酪氨酸            | 19. 异亮氨酸           |
| 5. 谷氨酰胺 | 13. $\gamma$ -氨基丁酸 | 20. 亮氨酸            |
| 6. 组氨酸  | (GABA)             | 21. 脯氨酸            |
| 7. 甘氨酸  | 14. 蛋氨酸            | 22. 赖氨酸            |

\* 源自色氨酸和 GABA 的谱峰可能重叠。

图 26 烧烤酱的色谱图

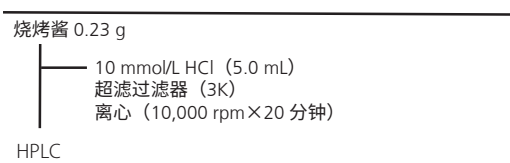
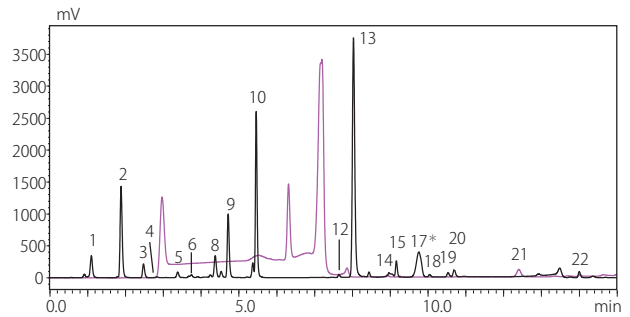


图 27 烤肉酱的预处理方案

## 椰奶



- |         |                    |                    |
|---------|--------------------|--------------------|
| 1. 天冬氨酸 | 9. 精氨酸             | 17. (色氨酸 + GABA) * |
| 2. 谷氨酸  | 10. 丙氨酸            | 18. 苯丙氨酸           |
| 3. 天冬酰胺 | 12. 酪氨酸            | 19. 异亮氨酸           |
| 4. 丝氨酸  | 13. $\gamma$ -氨基丁酸 | 20. 亮氨酸            |
| 5. 谷氨酰胺 | (GABA)             | 21. 脯氨酸            |
| 6. 组氨酸  | 14. 蛋氨酸            | 22. 赖氨酸            |
| 8. 苏氨酸  | 15. 缬氨酸            |                    |

\* 源自色氨酸和 GABA 的谱峰可能重叠。

图 30 椰奶的色谱图

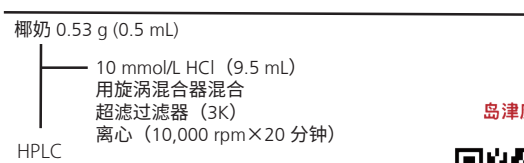


图 31 椰奶的预处理方案

岛津应用云



Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



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: 2021年3月