

OPA-FMOC 柱前衍生法测定饲料中 23 种氨基酸

LC-089

摘要: 本文使用岛津 LC-20A 液相色谱仪, 柱前衍生法测定饲料中 23 种氨基酸。以邻苯二甲醛 (OPA)、茚甲氧羰酰氯试剂 (FMOC) 和 β - 巯基丙酸作为氨基酸柱前衍生剂 (可同时对一级氨基酸和二级氨基酸进行衍生反应), 使用 C18 柱, 乙腈/甲醇/水 (45/40/15, v/v/v) 和 20 mM 的磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 为流动相。23 种氨基酸分离良好, 且在 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 0.9995 以上; 对低、中、高三个浓度的混合标准溶液进行精密度实验, 连续测定 5 次, 保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.273% 和 6.173% 以下, 系统精密度良好, 同时具有很高的检测灵敏度。

关键词: 氨基酸、饲料、OPA-FMOC 柱前衍生法

大多数养殖户都非常关注饲料中蛋白质的含量, 并一直把蛋白质这一指标作为评价饲料好坏的标准, 但是家禽家畜对蛋白质的需要实际上是对构成蛋白质的多种氨基酸的数量和相互比例的需要。当前, 在家禽家畜的日粮配方中氨基酸指标已逐步取代蛋白质作为计算日粮配方的指标, 而蛋白质指标只作为参考。家禽家畜对氨基酸的需要可分为必需和非必需两个部分, 必需氨基酸是家禽家畜从饲料中获取才能满足其生长需要的氨基酸。

家禽家畜在不同的生长阶段对于氨基酸的种类和量都有不同的需求, 并且在喂养的过程中要注意氨基酸的平衡, 不使哪一种氨基酸不足或过多, 如果缺少哪种必需氨基酸, 特别是限制性必需氨基酸, 那么氨基酸的利

用就按这一种的比例平衡, 其它种氨基酸再多也不能利用, 而被浪费掉了。在实际应用中, 各种饲料中所含的氨基酸的种类和量是不一样的, 如果能够准确的得到饲料中各氨基酸的种类和量, 就可以使用混合饲料力争使供给量与需要量接近, 各氨基酸愈接近平衡对家禽家畜的增重产率等就愈有利, 饲料利用率也就愈高。

本文使用岛津液相色谱仪 LC-20A 系统, 建立了一种使用柱前衍生法同时准确定性检测饲料中 23 种氨基酸 (一级氨和二级氨) 的方法, 并采用所建立的方法对饲料样品进行了检测。该方法操作简便、使用成本低、准确度高, 供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津液相色谱仪。具体配置为 LC-20AD \times 2 (输液泵), DGU-20A3 (在线脱气机), SIL-20AC (自动进样器), CTO-20AC (柱温箱), CBM-20A (系统控制器), RF-20Axs (荧光检测器), LCsolution Ver. 1.26 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-20A 系统

色谱柱: InertSustain C18

(3.0 mm \times 100 mm, 3 μm)

流动相: A 相: 20 mM 磷酸钾缓冲液

(pH 6.5)

B 相: 乙腈/甲醇/水 (45/40/15, v/v/v)

流速: 0.8 mL/min

进样体积: 5 μL

柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 12%, 时间程序见表 1。

检测器: 荧光检测器 (使用波长切换功能)

0.01~14.00 min:

激发波长 350 nm, 发射波长 450 nm

14.00~27.00 min:

激发波长 266 nm, 发射波长 305 nm

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	31
4.50	Pumps	Pump B Conc.	35
8.00	Pumps	Pump B Conc.	35
13.00	Pumps	Pump B Conc.	100
15.00	Pumps	Pump B Conc.	100
15.50	Pumps	Pump B Conc.	12
27.00	Controller	Stop	

1.3 衍生试剂和标准品溶液的配制

1.3.1 衍生试剂：

β - 巯基丙酸试剂 :10 μ L β - 巯基丙酸加入 10 mL 0.1 mol/L 的硼酸缓冲液。

邻苯二甲醛试剂 (OPA) :10 mg 邻苯二甲醛加入 0.3 mL 乙醇超声完全溶解, 加入 0.7 mL 硼酸缓冲液和 4 mL 超纯水。

芴甲氧羰酰氯试剂 (FMOC) :4 mg FMOC 溶于 20 mL 乙腈。

β - 巯基丙酸和 OPA 试剂 (4 $^{\circ}$ C 可保存 1 周), FMOC 试剂 (4 $^{\circ}$ C 可保存 2~3 天)

结果讨论

2.1 氨基酸标准样品色谱图

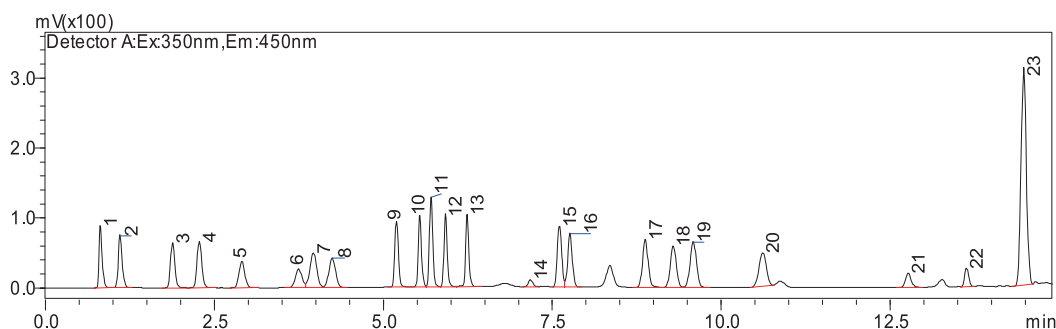


图 1. 10 μ mol/L 氨基酸标准样品色谱图

(1 天冬氨酸、2 谷氨酸、3 天冬酰胺、4 丝氨酸、5 谷氨酰胺、6 组氨酸、7 甘氨酸、8 苏氨酸、9 精氨酸、10 丙氨酸、11 牛磺酸、12 γ - 氨基丁酸、13 酪氨酸、14 胱氨酸、15 缬氨酸、16 蛋氨酸、17 色氨酸、18 苯丙氨酸、19 异亮氨酸、20 亮氨酸、21 鸟氨酸、22 赖氨酸、23 脯氨酸)

2.2 线性关系

将浓度为 0.2、0.5、1、2、5、10 μ mol/L 的混合标准工作液按 1.4 中柱前衍生方法衍生, 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。23 种氨基酸在 0.2 ~ 10 μ mol/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。

1.3.2 氨基酸标准溶液的配制

7.5 mg 天冬酰胺、7.3 mg 谷氨酰胺、6.3 牛磺酸、5.2 mg γ - 氨基丁酸、10.2 mg 色氨酸、8.5 mg 鸟氨酸分别溶于 10 mL 0.1 mol/L 盐酸, 分别配制成 5 μ mol/mL 标准溶液。

取 17 种氨基酸 2.5 μ mol/L 混标溶液 (天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸) 1 mL 和 6 种氨基酸 5 μ mol/mL 的标准溶液各 0.5 mL, 加入 6 mL 0.1 mol/L 盐酸配制成 250 μ mol/L 的 23 种氨基酸混标溶液。

用 0.1 mol/L 的盐酸稀释氨基酸混合标准溶液, 稀释至 10.0、5.0、2.0、1.0、0.5、0.2 μ mol/L。

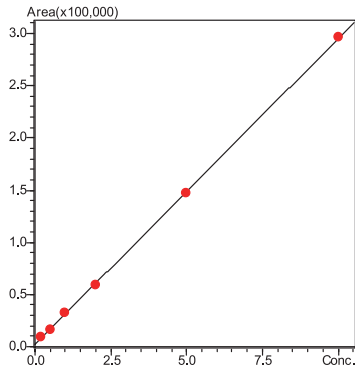
1.4 柱前衍生法

取 1.3 中配制的衍生试剂 β - 巯基丙酸试剂 45 μ L、OPA 试剂 22 μ L、23 种氨基酸混标溶液 7.5 μ L 充分混合后等待 1 分钟, 加入 FMOC 试剂 10 μ L, 充分混合 2 分钟后待测。

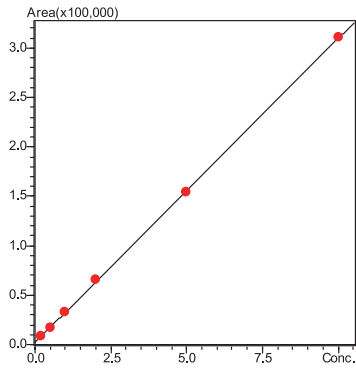
1.5 样品前处理方法

参照《GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定》中的酸提取法处理饲料样品。

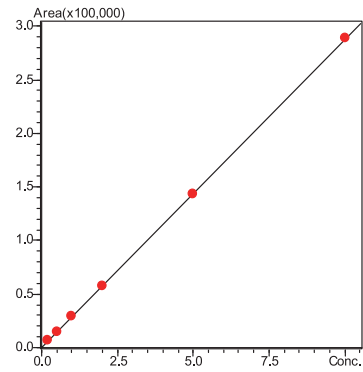
天冬氨酸



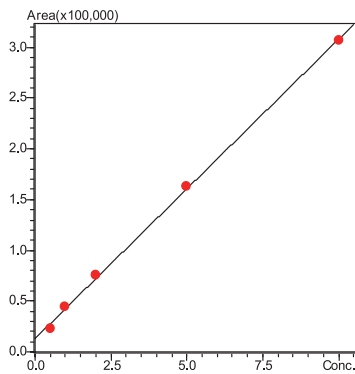
谷氨酸



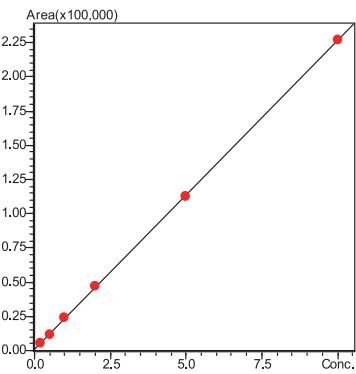
天冬酰胺



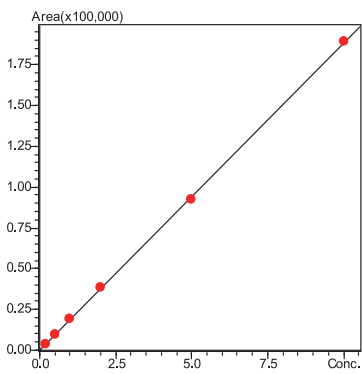
丝氨酸



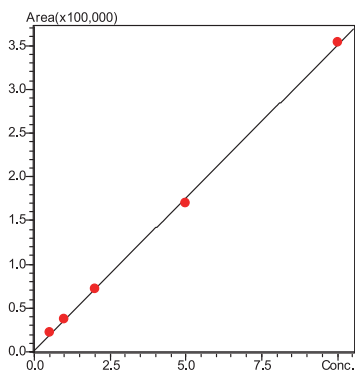
谷氨酰胺



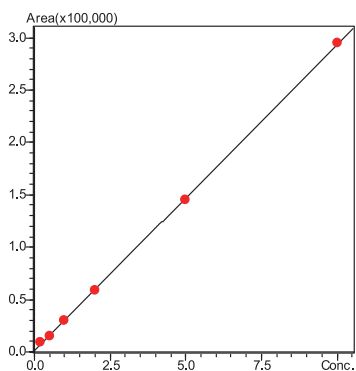
组氨酸



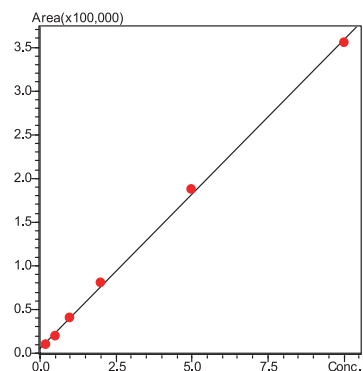
甘氨酸



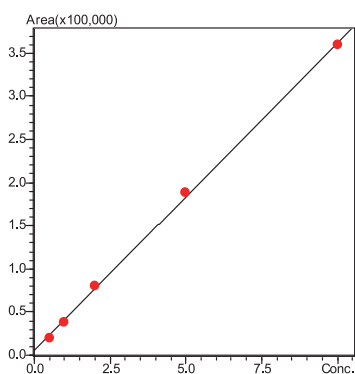
苏氨酸



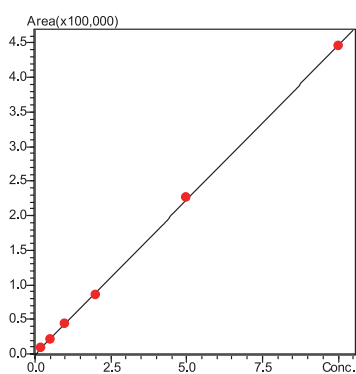
精氨酸



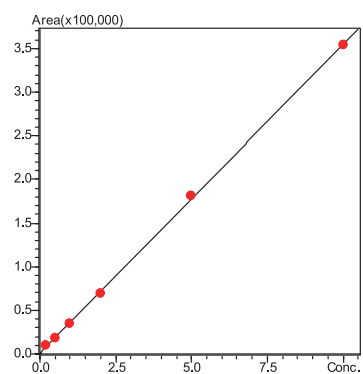
丙氨酸



牛磺酸



γ-氨基丁酸



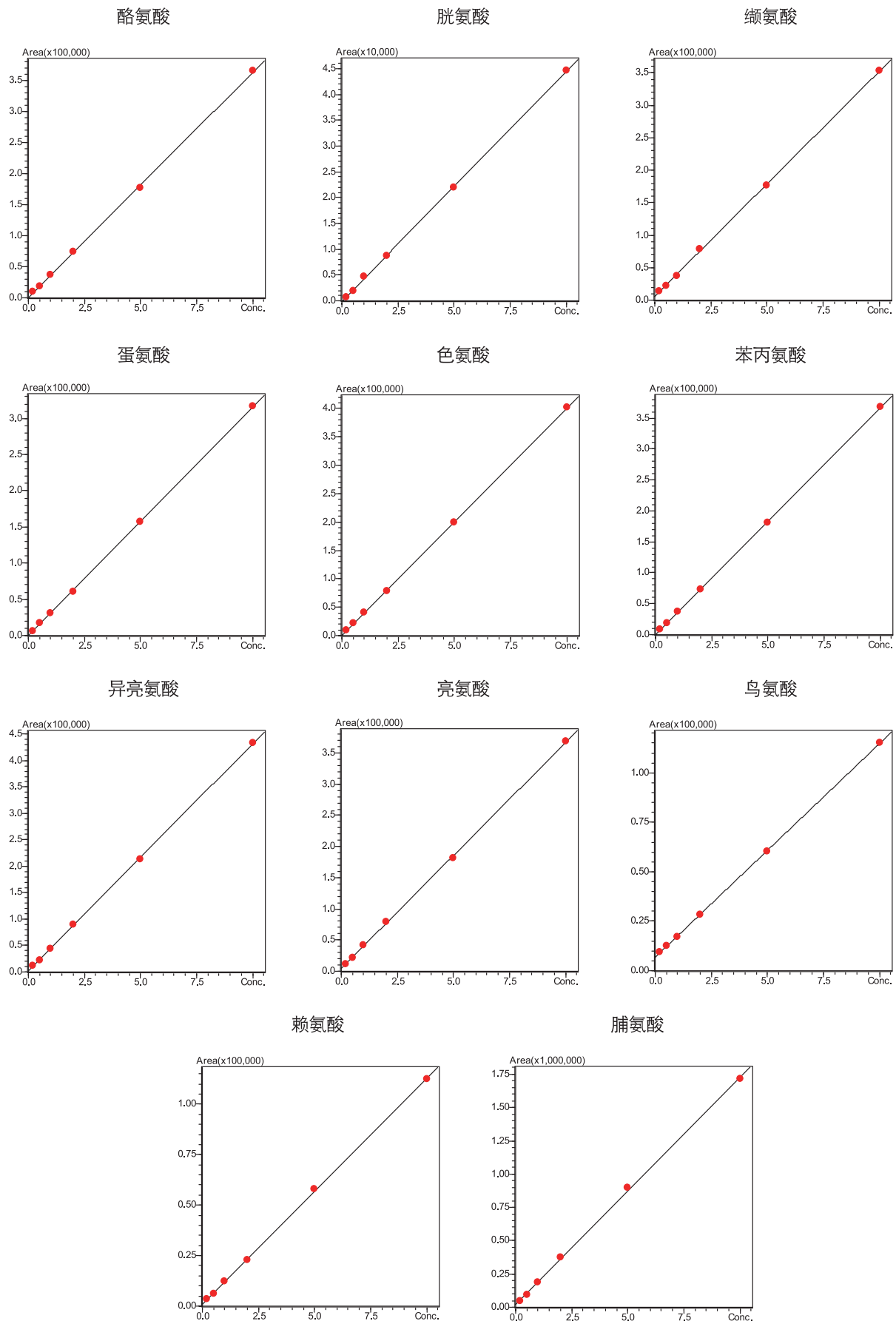


图 2.23 种氨基酸的标准工作曲线

表 2. 23 种氨基酸的校准曲线参数

No.	名称	英文名称	保留时间	校准曲线	相关系数	定量限($\mu\text{mol/L}$)
1	天冬氨酸	Aspartic acid	0.807	$Y = 29298.91X + 2198.598$	0.9999	0.06
2	谷氨酸	Glutamic acid	1.098	$Y = 30788.9X + 1926.981$	0.9999	0.07
3	天冬酰胺	Asparagine	1.876	$Y = 28795.47X + 104.3123$	0.9999	0.10
4	丝氨酸	Serine	2.272	$Y = 29498.9X + 13093.14$	0.9995	0.06
5	谷氨酰胺	Glutamine	2.902	$Y = 22534.29X + 947.6477$	0.9999	0.15
6	组氨酸	Histidine	3.742	$Y = 18830.57X - 19.14663$	0.9999	0.20
7	甘氨酸	Glycine	3.960	$Y = 34833.99X + 2044.15$	0.9997	0.09
8	苏氨酸	Threonine	4.239	$Y = 29212.64X + 1095.522$	0.9998	0.12
9	精氨酸	Arginine	5.190	$Y = 35250.52X + 5368.102$	0.9996	0.06
10	丙氨酸	Alanine	5.534	$Y = 35611.35X + 5506.035$	0.9996	0.04
11	牛磺酸	Taurine	5.700	$Y = 44719.64X - 913.0473$	0.9999	0.06
12	γ -氨基丁酸	GABA	5.914	$Y = 35412.52X + 676.9859$	0.9997	0.08
13	酪氨酸	Tyrosine	6.234	$Y = 36241.71X + 650.942$	0.9999	0.06
14	胱氨酸	Cystine	7.171	$Y = 4458.393X - 129.3862$	0.9999	0.20
15	缬氨酸	Valine	7.601	$Y = 34597.45X + 5808.942$	0.9998	0.05
16	蛋氨酸	Methionine	7.757	$Y = 31632.78X - 594.8121$	0.9999	0.07
17	色氨酸	Tryptophan	8.871	$Y = 40019.87X + 364.7068$	0.9999	0.08
18	苯丙氨酸	Phenylalanine	9.285	$Y = 36632.36X + 277.5981$	0.9999	0.09
19	异亮氨酸	Isoleucine	9.580	$Y = 42995.89X + 1883.115$	0.9999	0.08
20	亮氨酸	Leucine	10.609	$Y = 36216.17X + 4381.548$	0.9999	0.10
21	鸟氨酸	Ornithine	12.763	$Y = 10790.22X + 6822.286$	0.9999	0.16
22	赖氨酸	Lysine	13.624	$Y = 11167.31X + 1093.07$	0.9999	0.18
23	脯氨酸	Proline	14.471	$Y = 170556.2X + 20575.67$	0.9997	0.01

2.3 精密度实验

对 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 混合标准溶液连续 5 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 0.014~0.273% 和 0.205~6.173% 之间，仪器精密度良好。

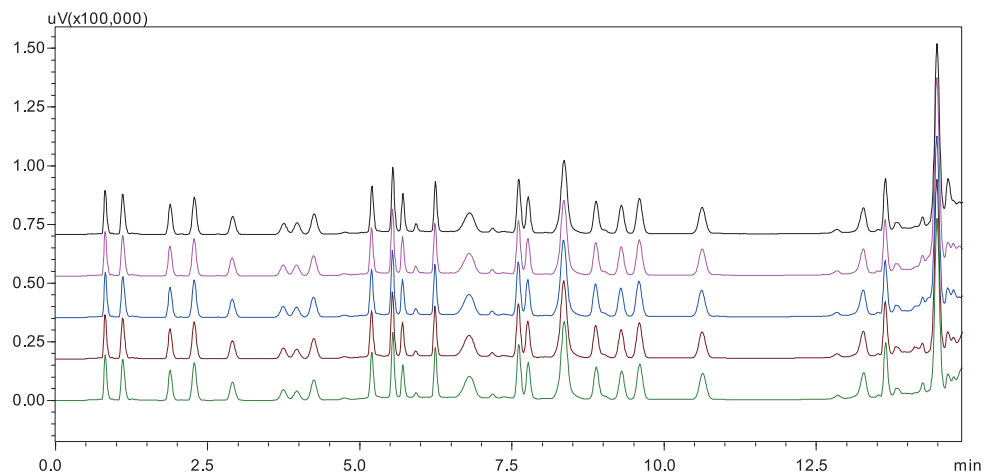

 图 3. 2 $\mu\text{mol/L}$ 氨基酸标准样品重复性数据色谱图 (n=5)

表 3 保留时间和峰面积重复性数据结果(n=6)

No.	样品名称	RSD% (0.5 $\mu\text{mol/L}$)		RSD% (2 $\mu\text{mol/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{mol/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	天冬氨酸	0.237	1.730	0.207	1.145	0.124	0.420
2	谷氨酸	0.188	1.221	0.135	0.552	0.187	0.440
3	天冬酰胺	0.211	0.395	0.174	0.282	0.084	0.262
4	丝氨酸	0.220	3.722	0.167	0.717	0.085	0.681
5	谷氨酰胺	0.273	0.463	0.206	0.353	0.117	0.264
6	组氨酸	0.236	1.914	0.192	1.128	0.138	1.004
7	甘氨酸	0.226	2.133	0.151	2.040	0.111	1.904
8	苏氨酸	0.238	1.185	0.226	0.538	0.114	0.419
9	精氨酸	0.143	3.199	0.069	0.531	0.043	0.408
10	丙氨酸	0.121	1.044	0.058	0.620	0.060	0.523
11	牛磺酸	0.111	5.660	0.103	3.912	0.057	2.741
12	γ -氨基丁酸	0.104	4.135	0.100	3.625	0.055	3.028
13	酪氨酸	0.091	0.848	0.052	0.474	0.042	0.175
14	胱氨酸	0.094	1.140	0.084	0.687	0.093	0.548
15	缬氨酸	0.088	0.610	0.088	0.397	0.044	0.211
16	蛋氨酸	0.090	0.495	0.086	0.504	0.050	0.458
17	色氨酸	0.086	0.459	0.079	0.386	0.052	0.340
18	苯丙氨酸	0.078	0.589	0.076	0.440	0.056	0.236
19	异亮氨酸	0.076	0.551	0.076	0.454	0.056	0.205
20	亮氨酸	0.081	1.623	0.073	0.565	0.061	0.386
21	鸟氨酸	0.072	6.173	0.047	4.342	0.018	3.891
22	赖氨酸	0.035	2.827	0.030	2.375	0.022	0.688
23	脯氨酸	0.035	5.882	0.014	2.431	0.021	1.320

2.4 灵敏度实验

23 种氨基酸低浓度 (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 标准品色谱图如图 4 所示, 该方法具有很高的检测灵敏度。

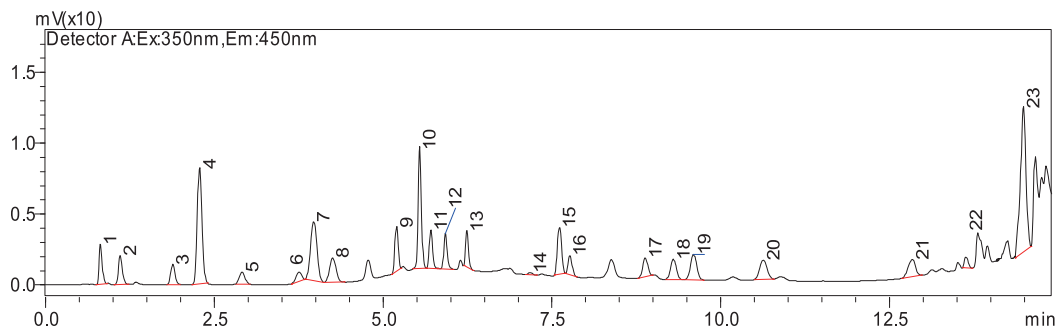


图 4. 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 23 种氨基酸标准样品色谱图

2.5 实际样品

对饲料样品用 1.5 中前处理方法处理后，对其中所含氨基酸进行分析，经测定该饲料样品中含有天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、甘氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、牛磺酸、 γ -氨基丁酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸。使用 1.5 中的酸水解法前处理饲料样品，色氨酸在水解时被全部破坏，不能测量；胱氨酸和蛋氨酸在水解时部分氧化，不能测准。

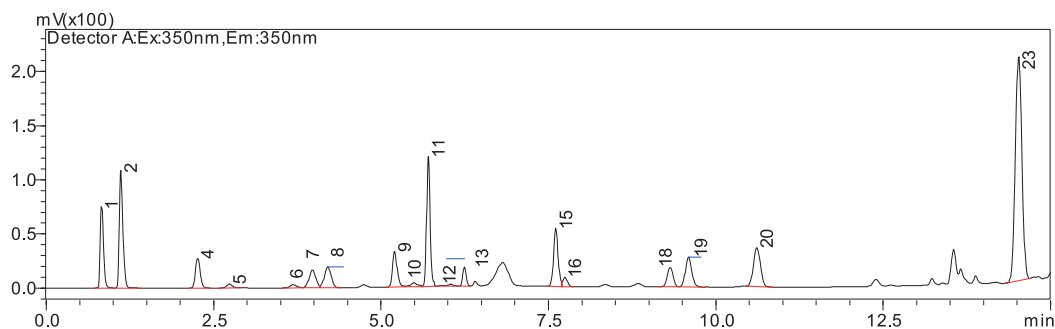


图 5. 饲料样品中氨基酸分析色谱图

结论

本文建立了使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A，OPA-FMOC 柱前衍生法同时测定饲料中 23 种氨基酸的方法。本文所用的柱前衍生法中的衍生试剂可同时与一级氨基酸和二级氨基酸发生反应，即该方法可同时测定一级氨基酸和二级氨基酸；且该液相分析方法精密度良好，在 0.2 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 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 0.9995 以上，灵敏度高，可以满足日常饲料样品中氨基酸分析测定的需要。