

# 高效液相色谱法测定特殊医学配方食品中的色氨酸

孙宇, 周璇, 莫慧明, 朱桂芳, 梁惠婷, 刘涛\*

(华测检测认证集团股份有限公司, 深圳 518101)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法测定特殊医学配方食品中色氨酸的分析方法。**方法** 样品加入 4 mol/L 的氢氧化锂溶液, 在 110 °C 恒温干燥箱中碱解 16 h, 用 pH 为 4.5 的乙酸钠缓冲溶液中和后, 经 Inertsil® ODS-SP (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 分离, 以甲醇-0.1% 乙酸溶液(95:5, V:V) 为流动相等度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 二极管阵列检测器 277 nm 波长采集数据, 外标法定量。**结果** 色氨酸在 1~100 mg/L 浓度范围内线性良好, 相关系数  $r$  为 0.9999, 3 个浓度水平的加标回收率在 91.7%~94.5% 之间, 相对标准偏差( $n=6$ ) 为 2.2%~3.7%, 精密度的相对标准偏差( $n=6$ ) 为 2.1%, 方法检出限为 20 μg/g, 定量限为 65 μg/g。**结论** 该方法操作简便, 灵敏度高, 具有良好的准确度和精密度, 适用于特殊医学配方食品中色氨酸的测定。**关键词:** 色氨酸; 高效液相色谱法; 特殊医学配方食品

## Determination of tryptophan in food for special medical purpose by high performance liquid chromatography

SUN Yu, ZHOU Xuan, MO Hui-Ming, ZHU Gui-Fang, LIANG Hui-Ting, LIU Tao\*

(Centre Testing International Group Co., Ltd., Shenzhen 518101, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an analytical method for determination of tryptophan in food for special medical purpose by high performance liquid chromatography. **Methods** The samples were added with 4 mol/L lithium hydroxide solution, hydrolyzed in a drying oven at a constant temperature of 110 °C for 16 h, neutralized with sodium acetate buffer solution with pH of 4.5, separated by Inertsil® ODS-SP (4.6 mm×150 mm, 5 μm), eluted with methanol-0.1% acetic acid solution (95:5, V:V) at flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 30 °C, and injection volume of 10 μL. Data at the wavelength of 277 nm by diode array detector were collected, and quantified by external standard method. **Results** Tryptophan had good linearity in the range of 1-100 mg/L, and the correlation coefficient was 0.9999. The recoveries of 3 different spiked concentrations were between 91.7%-94.5%, with relative standard deviations at 2.2%-3.7%. The relative standard deviation of precision was 2.1% ( $n=6$ ). The limits of detection and the limits of quantification of this method were 20 μg/g and 65 μg/g, respectively. **Conclusion** This method has simple pretreatment, high sensitivity, good accuracy and precision. It is suitable for the determination of tryptophan in food for special medical purpose.

基金项目: 科技部重点研发计划项目(2018YFB1403300、2018YFB1403305)

Fund: Supported by the Ministry of Science and Major Research Projects (2018YFB1403300, 2018YFB1403305)

\*通信作者: 刘涛, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、药品、农产品及日化产品检测研究。E-mail: tony.liu@cti-cert.com

\*Corresponding author: LIU Tao, Master, Engineer, Center Testing International Group Co., Ltd, CTI Building, No.4, Liuxian 3rd Road, Xinan Street, Bao'an District, Shenzhen 518101, China. E-mail: tony.liu@cti-cert.com

**KEY WORDS:** tryptophan; high performance liquid chromatography; food for special medical purpose

## 0 引言

色氨酸是人体必需的 8 种氨基酸之一, 人体自身无法合成, 只能从食物中获取。色氨酸参与蛋白质代谢, 并对神经递质的合成、调节免疫和保持肠道稳态有重要作用<sup>[1-4]</sup>。缺乏色氨酸可能会导致疲惫、暴食、抑郁等症状<sup>[5-8]</sup>。随着社会的发展, 老龄化人口数量上升, 慢性疾病人群增加, 满足患者对营养素或膳食的特殊要求是提高其生存率的重要条件, 特殊医学用途配方食品即是专为特定疾病人群加工配制而成的配方食品。由于特殊医学用途配方食品的特殊性, 我国对其制定了食品安全国家标准 GB 29922—2013《特殊医学用途配方食品通则》。色氨酸作为重要的营养成分, 标准中对部分配方食品中色氨酸的添加量进行了规定。然而, 我国尚未建立特殊医学用途配方食品中色氨酸的检测标准, 在企业产品研发、注册和市场流通监管等环节难以对产品中色氨酸的添加实行有效的测定。

目前, 国内外对特殊医学用途配方食品中色氨酸测定的研究比较少。文献中已报道的测定方法主要包括反相高效液相色谱法<sup>[9-12]</sup>、分光光度计法<sup>[13-15]</sup>、离子交换色谱法<sup>[16]</sup>、电化学法<sup>[17]</sup>、液相色谱-质谱联用法<sup>[18-19]</sup>、毛细管等速电泳法<sup>[20]</sup>等。分光光度法操作简便, 但测定准确度不高; 电化学法操作复杂, 不利于进行大批量的检测工作; 离子交换色谱法及液相色谱-质谱联用仪器成本高; 而反相高效液相色谱法测定结果准确、稳定, 能实行批量检测。

本研究针对特殊医学配方食品的基质特点, 利用碱溶液对样品中的蛋白质进行水解, 并用反相高效液相色谱法测定色氨酸含量。通过选择合适的碱解剂种类及浓度、水解时间等, 优化检测波长、流动相等色谱条件, 得到色氨酸测定的最佳条件, 并进行精密度、准确度等试验, 以确认方法的适用性, 最终建立特殊医学食品中色氨酸的检测方法, 为企业质量控制和政府监管提供技术支持, 有利于特殊医学用途配方食品的研发与管理。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器, 日本岛津公司); Sigma 4-16KS 高速离心机(德国 Sigma 公司); VORTEX 3 旋涡混匀器(德国 IKA 公司); DHG-9145A 恒温干燥箱(上海一恒科技有限公司); ME204E、ME155DU 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q IQ 7000 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

L-色氨酸标准品(纯度 ≥ 99.7%, 北京曼哈格生物科技

有限公司); 甲醇(色谱纯, 上海星可高纯溶剂公司); 乙酸钠、氢氧化钾、冰乙酸(分析纯, 天津大茂公司); 氢氧化锂(优级纯, 上海晶纯生化科技股份有限公司); 试验用水为 Milli-Q 超纯水。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 溶液配制

色氨酸标准储备液(1000 mg/L): 准确称取 10 mg(精确到 0.0001 g) L-色氨酸对照品置于 10 mL 容量瓶中, 加入 2 mL 0.1 mol/L 氢氧化钾溶液使其溶解, 用水定容至 10 mL。

色氨酸标准工作溶液: 用水稀释标准储备溶液后得到色氨酸质量浓度为 1、2、5、10、20、30、70、100 mg/L 的标准工作溶液。

氢氧化钾溶液(0.1 mol/L): 称取 0.28 g 氢氧化钾, 溶于 50 mL 水中。

氢氧化锂溶液(4 mol/L): 称取 8.39 g 氢氧化锂, 溶于 50 mL 水中。

乙酸钠缓冲溶液(0.0085 mol/L Na<sup>+</sup>): 称取 0.7 g 无水乙酸钠, 溶于 1000 mL 水中, 用冰乙酸调 pH 为 4.5。

乙酸溶液(0.1%): 取 1 mL 冰乙酸溶于 1000 mL 水中。

#### 1.2.2 样品前处理

称取全营养特殊医学用途食品粉剂样品(企业提供)0.5 g(精确到 0.0001 g)于水解管中, 加 5 mL 质量浓度为 4 mol/L 的氢氧化锂溶液, 充氮气并旋紧盖子后, 放入 110 °C 恒温干燥箱中水解 16 h。取出水解管冷却至室温, 用乙酸钠缓冲溶液转移水解液至 50 mL 容量瓶, 用乙酸钠缓冲液定容后, 转移至 50 mL 离心管中, 4500 r/min 离心 3 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜。

#### 1.2.3 液相色谱条件

色谱柱 Inertsil<sup>®</sup> ODS-SP (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1%乙酸溶液, B 为甲醇, 等度洗脱比例(95:5, V:V); 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C; 波长 277 nm。

#### 1.2.4 数据处理

样品中色氨酸的含量按公式(1)计算:

$$X = \frac{C \times V}{m} \times \frac{1000}{1000} \quad (1)$$

X 为样品中色氨酸的含量, μg/g; C 为由标准曲线得到的样品色氨酸的质量浓度, mg/L; V 为样品测定液总体积, mL; m 为样品质量, g;  $\frac{1000}{1000}$  为单位换算系数。

使用 Excel 进行数据计算及图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 前处理优化

#### 2.1.1 碱解剂种类及浓度

样品酸解后色氨酸几乎完全被破坏, 酶解中间产物

多, 容易造成反应不完全, 因此使用碱溶液水解样品。分别选取 4 mol/L 氢氧化锂和 4 mol/L 氢氧化钾作为碱解剂, 在其他条件相同的情况下, 比较水解同一样品的效果。用氢氧化钾、氢氧化锂溶液水解全营养特殊医学配方食品得到的色氨酸含量分别为 2131、2975  $\mu\text{g/g}$ , 样品色氨酸的理论添加量为 3080  $\mu\text{g/g}$ , 表明氢氧化锂的水解效果更好。而氢氧化钾碱性较强, 易造成样品水解过度, 色氨酸结构被破坏而导致检测结果偏小。

考察 1、2、3、4、5、6 mol/L 氢氧化锂溶液的水解效果, 结果表明, 碱解剂浓度越大, 碱解效果越好, 4 mol/L 后检测结果达到峰值, 后续随碱解剂浓度增大略有减小, 综合考虑成本及水解效果, 选择 4 mol/L 的氢氧化锂作为碱解剂。

### 2.1.2 碱解时间

碱解时间是影响碱解效果的关键因素。试验选取 4、8、12、16、20、24、28 h 考察时间对碱解效果的影响。结果表明, 当碱解时间达到 16 h 以后, 测得结果较稳定, 故选择 16 h 作为碱解时间。

### 2.1.3 中和方法

用氢氧化锂溶液水解后, 样品为碱性, 直接测定难以得到良好峰型, 影响结果的准确性, 因此需调节样品的 pH。试验比较了 2 种中和方法的效果, 一是直接用 pH 为 4.5 的乙酸钠缓冲溶液定容, 二是用盐酸调节 pH 至 6~7 后用水定容<sup>[10]</sup>。结果表明 2 种方法得到的色氨酸峰形均较好, 样品含量分别为 2948、2941  $\mu\text{g/g}$ , 无显著性差异。用盐酸调节 pH 时间较长, 综合考虑准确性及效率, 选择乙酸钠缓冲溶液调节 pH。

## 2.2 色谱条件优化

### 2.2.1 检测波长的选择

使用二极管阵列检测器考察了适合色氨酸的检测波长。从图 1 可以看出, 色氨酸在 217 nm 和 277 nm 有较强的紫外吸收。比较图 2 可知, 样品在 217 nm 附近的干扰较大, 因此, 选择 277 nm 作为检测波长。

### 2.2.2 流动相的优化

试验比较了甲醇-0.0085 mol/L 乙酸钠缓冲溶液、甲醇-0.1%乙酸溶液 2 种流动相体系的分离效果。结果表明在合适的有机相比例条件下, 2 种流动相体系均能很好地分离目标物。考虑盐堵塞色谱柱的风险较大, 选择甲醇-0.1%乙酸溶液作为流动相。

## 2.3 方法验证

### 2.3.1 线性范围、检出限和定量限

取按 1.2.1 配制得到的标准工作溶液进行测定, 以色氨酸浓度  $X$  为横坐标, 对应的峰面积  $Y$  为纵坐标, 绘制标准曲线, 其线性回归方程为  $Y=14401X+787$ , 相关系数  $r$  为 0.9999。结果表明, 色氨酸在 1~100 mg/L 浓度范围内线性

关系良好, 符合检测要求。

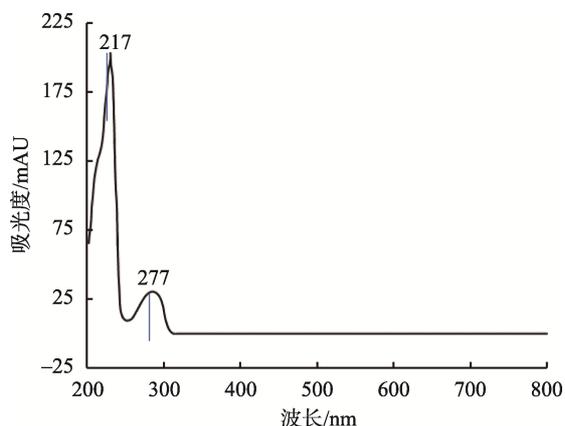


图 1 色氨酸光谱图

Fig.1 Tryptophan spectrum

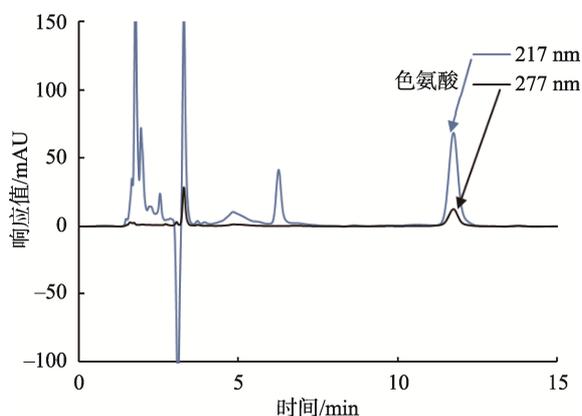


图 2 色氨酸 217 和 277 nm 色谱叠加图

Fig.2 217 and 277 nm superposition chromatogram of tryptophan

使用信噪比法计算方法的检出限和定量限。信噪比为 3 或 10 时, 对应的标准溶液质量浓度分别为 0.196、0.650 mg/L, 当取样量为 0.5 g、定容体积为 50 mL 时, 以 3 倍信噪比法 ( $S/N=3$ ) 计算得到方法的检出限为 20  $\mu\text{g/g}$ , 以 10 倍信噪比法 ( $S/N=10$ ) 计算得到方法的定量限为 65  $\mu\text{g/g}$ 。

### 2.3.2 精密度试验

按照 1.2.2 样品处理方法对特殊医学配方食品进行测定, 计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 2.1%, 符合重复性要求。

### 2.3.3 准确度

精密称取色氨酸含量为 3011.3  $\mu\text{g/g}$  的特殊医学配方食品, 向样品加入低、中、高 3 个浓度水平的色氨酸标准溶液, 考察方法的准确度。结果见表 2, 回收率在 91.7%~94.5% 之间, RSD 为 2.2%~3.7%, 精密度和准确性均较好。

### 3 结论

本研究用碱解法处理特殊医学用途配方食品,选取氢氧化锂溶液作为碱解剂,比较得到最佳的碱解溶液浓度和碱解时间,并选择了相对快速的乙酸钠缓冲液中和方法。特殊医学用途配方食品成分复杂,本研究用高效液相色谱法的二极管阵列检测器检测,优化了检测波长和流动相种类,达到干扰小、分离度高的效果,最终建立了特殊医学用途配方食品中色氨酸的测定方法。该方法在线性范围内具有良好的线性关系,灵敏度高,精密度和准确度均较好,适用于特殊医学用途配方食品中色氨酸的含量测定,为产品质量的控制提供方法依据。

表2 准确度试验结果( $n=6$ )  
Table 2 Accuracy test results ( $n=6$ )

加标量/( $\mu\text{g/g}$ )	平均回收率/%	RSD/%
1500	91.7	2.2
3000	93.8	3.7
4500	94.5	3.3

### 参考文献

- [1] DE JESUS AJ, ALLEN TW. The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2013, 1828(2): 864–876.
- [2] WALTHER DJ, PETER JU, BASHAMMAKH S, *et al.* Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform [J]. *Science*, 2003, 299(5603): 76.
- [3] MOFFETT JR, NAMBOODIRI MA. Tryptophan and the immune response [J]. *Immunol Cell Biol*, 2003, 81(4): 247–265.
- [4] SUN M, MA N, HEE T, *et al.* Tryptophan (Trp) modulates gut homeostasis via aryl hydrocarbon receptor (AhR) [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(10): 1760–1768.
- [5] SMITH KA, FAIRBURN CG, COWEN PJ. Symptomatic relapse in bulimia nervosa following acute tryptophan depletion [J]. *Arch Gen Psychiat*, 1999, 56(2): 171–176.
- [6] MIURA H, OZAKI N, SAWADA M, *et al.* A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression [J]. *Stress*, 2008, 11(3): 198–209.
- [7] YAMASHITA M. Potential role of neuroactive tryptophan metabolites in central fatigue: Establishment of the fatigue circuit [J]. *Int J Tryptophan Res*, 2020, 13: 520731479.
- [8] GAUTHIER C, HASSLER C, MATTAR L, *et al.* Symptoms of depression and anxiety in anorexia nervosa: Links with plasma tryptophan and serotonin metabolism [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, 39: 170–178.
- [9] 单晓雪. 高效液相色谱测定粮食中L-色氨酸的方法分析[J]. *食品科技*, 2020, 45(9): 281–286.  
SHAN XX. Determination of L-tryptophan in grain by ultra high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(9): 281–286.
- [10] 孙立臻, 别梅, 冯峰, 等. 酶水解-液相色谱法测定婴幼儿食品中的色氨酸[J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(9): 47–51.  
SUN LZ, BIE M, FENG F, *et al.* Detection of tryptophan in infant food by enzymatic hydrolysis-high performance liquid chromatography [J]. *China Dairy Ind*, 2019, 47(9): 47–51.
- [11] 李兰, 贾铮, 周剑, 等. 高效液相色谱法测定鱼粉中色氨酸及不确定度评定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(9): 2714–2721.  
LI L, JIA Z, ZHOU J, *et al.* Uncertainty evaluation of tryptophan in fishmeal by high performance liquid chromatography method [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(9): 2714–2721.
- [12] RITOTA M, MANZI P. Rapid determination of total tryptophan in yoghurt by ultra high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Molecules*, 2020, 25(21): 5025.
- [13] 李静, 徐礼生, 高贵珍, 等. 基于甲醛反应分光光度法快速测定鲜奶中L-色氨酸[J]. *泰山学院学报*, 2017, 39(3): 98–101.  
LI J, XU LS, GAO GZ, *et al.* Determination of L-tryptophan in fresh milk by spectrophotometry base on the reaction of formaldehyde [J]. *J Taishan Univ*, 2017, 39(3): 98–101.
- [14] 田洪芸, 王文特, 王冠群, 等. 酶解-分光光度法测定乳粉中L-色氨酸含量[J]. *中国乳品工业*, 2020, 350(1): 42–46.  
TIAN HY, WANG WT, WANG GQ, *et al.* Determination of L-tryptophan in milk powder by enzymolysis-spectrophotometry [J]. *China Dairy Ind*, 2020, 350(1): 42–46.
- [15] 段世豪, 何焕云, 王琳琳, 等. 4种藏产食用菌中色氨酸含量的测定[J]. *现代食品*, 2020, (17): 168–170.  
DUAN SH, HE HY, WANG LL, *et al.* Determination of tryptophan in four kinds of Tibetan edible fungi [J]. *Mod Food*, 2020, (17): 168–170.
- [16] 蒲云月, 陈少波. 氨基酸分析仪法测定奶粉中色氨酸[J]. *农产品加工*, 2015, 390(8): 42–43.  
PU YY, CHEN SB. Determination of tryptophan in milk powder by amino acid analyzer [J]. *Farm Prod Process*, 2015, 390(8): 42–43.
- [17] WANG C, ZOU XC, ZHAO X, *et al.* Cu-nanoparticles incorporated overoxidized-poly (3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole) film modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan [J]. *J Electroanal Chem*, 2015, 741: 36–41.
- [18] BOULET L, FAURE P, FLORE P, *et al.* Simultaneous determination of tryptophan and 8 metabolites in human plasma by liquid

chromatography/tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2017, 1054: 36–43.

[19] COUR RL, JØRGENSEN H, SCHJOERRING JK. Improvement of tryptophan analysis by liquid chromatography-single quadrupole mass spectrometry through the evaluation of multiple parameters [J]. Front Chem, 2019, 7: 797.

[20] JASTRZĘBSKA A, KOWALSKA S, SZLYK E. Determination of free tryptophan in beer samples by capillary isotachophoretic method [J]. Food Anal Method, 2020: 1-13. DOI: 10.1007/s12161-020-01699-2

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

## 作者简介



孙 宇, 硕士, 工程师, 主要研究方向为特殊食品成分检测分析技术。

E-mail: sunyu201007@163.com



刘 涛, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、药品、农产品及日化产品检测研究。

E-mail: tony.liu@cti-cert.com