

超高效液相色谱法测定婴幼儿乳粉中的色氨酸

冯峰¹, 王丽娜^{1,2}, 王文枝¹, 耿丽娟^{1,2}, 凌云¹, 储晓刚^{1*}

(1. 中国检验检疫科学研究院, 食品安全研究所, 北京 100123; 2. 陕西科技大学生命科学与工程学院, 西安 710021)

摘要: **目的** 建立婴幼儿乳粉中色氨酸的超高效液相色谱检测方法, 并考察乳粉中色氨酸含量与蛋白质含量的相关性。 **方法** 样品在 145 °C 下碱性水解 4 h, 经 C₁₈ 色谱柱(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm)分离。以 100 mmol/L KH₂PO₄-NaOH 缓冲溶液-甲醇为流动相, 40% 甲醇(v:v)等度洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 进样量 5 μL, 柱温 45 °C。荧光检测器检测, 激发波长 280 nm; 发射波长 350 nm。 **结果** 方法在 1~1000 μg/L 范围内线性关系良好 ($r=0.999$); 定量限为 1 μg/L。添加浓度在 0.2、0.5、1.5 mg/g 时, 色氨酸的回收率介于 110.7%~116.3%之间。 **结论** 本方法操作简便, 可应用于市售乳粉样品中色氨酸含量的测定。对市售样品的测定结果表明, 部分婴幼儿乳粉样品的色氨酸含量低于国家限量, 此外, 乳粉中色氨酸含量与蛋白质含量之间并不呈线性相关。

关键词: 超高效液相色谱法; 色氨酸; 乳粉; 碱水解

Determination of tryptophan in infant formulas using ultra-high performance liquid chromatography

FENG Feng¹, WANG Li-Na^{1,2}, WANG Wen-Zhi¹, GENG Li-Juan^{1,2}, LING Yun¹, CHU Xiao-Gang^{1*}

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China;

2. China College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

ABSTRACT: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography (U-HPLC) method for the determination of tryptophan in infant formulas, and then to investigate the relationship between tryptophan concentration and protein concentration in infant formulas. **Methods** NaOH was used as hydrolytic solution. Then sample hydrolysis under an alkaline condition at 145 °C. The U-HPLC separation was achieved using a C₁₈ column (50 mm×4.6 mm, 1.8 μm) as solid phases and KH₂PO₄-NaOH buffer solution-methanol (60:40, v:v) as mobile phases. under isocratic elution. The flow rate was 0.5 mL/min and the column oven temperature was 45 °C. The injection volume was 5 μL. It was detected on a Fluorescence Detector and quantitatively determined by the peak area at excitation wavelength of 280 nm and emission wavelength of 350 nm. **Results** The linear concentration ranges of the calibration curve were 1~1000 μg/L for tryptophan ($r=0.999$), and the limit of quantification of the method was 1 μg/L. The mean recoveries varied from 110.7%~116.3% when spiked negative samples with 0.05, 0.5 and 2.5 mg/g tryptophan. **Conclusion** The established method is simple and can be suitable for the rapid determination of tryptophan in infant formulas. The determined results demonstrated that the relationship was not linear between tryptophan concentration and protein concentration in infant formulas.

KEY WORDS: ultra-high performance liquid chromatography; tryptophan; infant formula; alkali hydrolysis

基金项目: 质检总局公益性行业科研专项项目(2012104002)。

Fund: Supported by Public Science and Technology Research Funds Project(2012104002)

*通讯作者: 储晓刚, 研究员, 主要研究方向为食品安全。 E-mail: xgchu@vip.163.com, fengf_2005@163.com.

*Corresponding author: CHU Xiao-Gang, Researcher, Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Jia 3 Gaobeidian Road, Beijing 100123, China. E-mail: xgchu@vip.163.com, fengf_2005@163.com.

1 引言

色氨酸(Tryptophan)化学名称为2-氨基-3-吲哚基-1-丙酸,分子式是 $C_{11}H_{12}N_2O_2$,结构式见图1。色氨酸作为人体的一种必需氨基酸,人体自身无法合成,必须从食品中进行摄取。研究表明,色氨酸在体内能转变为5-羟色胺、烟酸等多种生理活性物质。因此,当婴幼儿的色氨酸摄入量偏低时,不仅会引起神经系统的功能障碍,还会产生皮肤疾患、白内障等特殊病症^[1]。

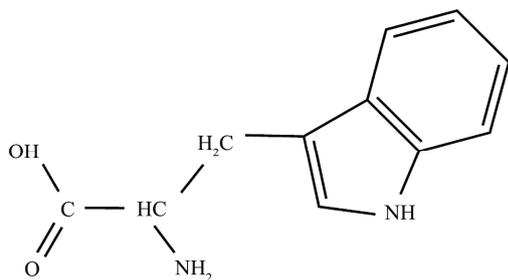


图1 色氨酸结构式

Fig. 1 Structure of tryptophan

我国的食品安全国家标准《婴儿配方食品》(GB10765-2010)中推荐的婴儿配方食品中色氨酸含量应不低于110 mg/g,同时明确要求对于婴儿配方食品中色氨酸含量未达到最低限量的乳粉,需要向其添加单体L型色氨酸^[2]。然而,目前国内外专门对于乳粉中色氨酸的检测研究较少,对于已经有的一些色氨酸测定方法,包括紫外或荧光分光光度计法^[3-5]、离子交换色谱法^[6,7]、液相色谱法^[8-12]或液-质联用法^[13,14]等,也存在着样品处理复杂,分析时间较长,灵敏度较低等不足。本研究针对乳粉样品这一基质,通过对样品前处理方法和色谱分离条件进行优化,建立了简便、快速、准确测定婴幼儿乳粉中色氨酸含量的超高效液相色谱-荧光检测分析方法。该方法已成功应用于市售乳粉样品的色氨酸含量检测当中,检测结果还揭示了婴幼儿乳粉中的色氨酸含量与蛋白含量并不呈线性相关。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LC-30A 超高效液相色谱仪配有荧光检测器(日

本岛津公司);恒温干燥箱(德国 Binder 公司);分析天平 XP 105(瑞士 Mettler 公司);振荡器 SA-31(日本 Yamato 公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司);0.22 μm 微孔尼龙膜(美国 PALL 公司)。

色氨酸(纯度>99.0%,美国 Fluka 公司)。乙醇、甲醇(色谱纯,美国 J. T. Baker 公司)。其他试剂均为分析纯,实验用水由美国 Millipore 公司超纯水仪制备。所有婴幼儿奶粉样品均购自北京当地超市。

2.2 色氨酸标准溶液的配制

色氨酸标准储备液(1000 mg/L)的配制:准确称取 10.0 mg(精确至 0.1 mg)标准品,用 100 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲液(pH 10.5)溶液溶解并定容至 10 mL,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存;色氨酸标准中间液(50 mg/L):吸取 0.5 mL 标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用 100 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲液定容;根据需要取适量标准中间液,用 100 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液配置成 1~1000 ng/mL 的标准工作液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Agilent XDB- C_{18} 柱(50 mm \times 4.6 mm, 1.8 μm); 100 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液(pH 10.5);甲醇=60:40 (v:v),等度洗脱;色谱柱柱温为 45 $^\circ\text{C}$;流速 0.5 mL/min;进样量: 5 μL ;荧光检测器激发波长: 280 nm;发射波长: 350 nm。

2.4 样品制备

准确称取 50.0 mg(精确至 0.1 mg)乳粉样品于 4 mL 自制的聚四氟乙烯水解管中。加入 4 mL 含 0.5% 可溶性淀粉的 6 mol/L NaOH 溶液(新鲜配制),盖好盖后摇动使乳粉充分溶解;放入 145 $^\circ\text{C}$ 恒温干燥箱中水解 4 h,取出后冷却至室温;转移至含有 1.5 mL 6 mol/L HCl 溶液的 50 mL 比色管中,残余水解液用少量纯水冲洗数次,全部移入比色管中。向比色管中加入一滴酚酞溶液,使溶液呈粉红色,用 6 mol/L HCl 溶液滴至无色,再用 1 mol/L NaOH 溶液滴至粉红色,纯水定容;混匀后,用 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ 缓冲溶液稀释 5 倍,过 0.22 μm 滤膜,供仪器测定。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理条件的优化

对于乳粉中色氨酸的测定,国内外的文献报道

较少。Hanko 等^[6]的研究结果表明色氨酸在酸性条件下极不稳定, 在碱性条件下比较稳定, 因此, 对色氨酸的检测一般通过碱性水解或是酶解的方法来进行^[7-11]。然而, 已有的对色氨酸采用碱性水解的方法, 都是使用 4~7 mol/L NaOH 来进行蛋白水解, 在此水解过程中还需要在水解罐中通入过量氮气以防止色氨酸在水解过程中氧化降解, 这使得样品处理过程复杂, 结果准确度差^[9-11]。也有采用酶解法进行色氨酸测定的报道, 但是这种方法往往是在对纯化后的蛋白样品进行氨基酸组成分析时采用, 无法用于乳粉样品等基质复杂的样品。在此, 本研究通过自制的聚四氟乙烯材质的消解管, 同时控制消解管的体积, 使其体积刚好为 4 mL(消解液的体积), 这样水解时通过加入满容积的水解液, 避免了在水解过程通入 N₂ 除氧的步骤, 不仅减化了水解步骤, 而且提高了回收率。随后本研究又比较了 110 °C 水解 22 h 和 145 °C 水解 4 h 两种条件下色氨酸的产率见图 2。可以明显观察到, 145 °C 水解 4 h 的产率高于 110 °C 水解 22 h。故本实验选取 145 °C 水解 4 h 作为最佳水解条件。

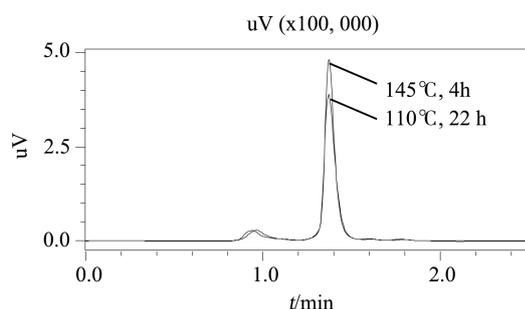


图 2 婴幼儿奶粉样品中色氨酸在不同水解条件下分离的 U-HPLC 色谱图

Fig. 2 U-HPLC chromatograms of tryptophan in real milk powder sample under different hydrolysis conditions

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 激发波长和发射波长的选择

鉴于色氨酸是一种荧光化合物, 为使色氨酸的检测能够获得较高的灵敏度, 需要确定色氨酸的最佳激发波长和发射波长。本研究首先通过二极管阵列检测器(PDAD)将色氨酸标准溶液在波长 230~450 nm 范围内进行扫描, 对不同紫外波长可能对色氨酸检测灵敏度所产生的影响进行了考察。结果表明, 在检测波长 280 nm 处, 色氨酸取得了最大吸收峰。故将

最大吸收波长 280 nm 作为检测色氨酸的最适激发波长。再通过荧光检测器于激发波长 280 nm 条件下对色氨酸标准溶液进行荧光光谱扫描, 由扫描得到的荧光光谱中可以观察到色氨酸在波长 350 nm 处具有较高的灵敏度。因此, 实验最终确定, 最佳激发波长为 280 nm, 发射波长为 350 nm。

3.2.2 流动相的优化

由于分析物只有色氨酸一种, 为了提高定量的准确度和分析速度, 本研究采用等度的方式进行分离。在使用 KH₂PO₄-NaOH (pH 10.5)-甲醇流动相体系下, 本研究分别考察了甲醇体积分数分别为 30%、40%和 50%时的分离条件。结果表明, 当甲醇的体积分数由 30%增加到 50%时, 色氨酸在 C₁₈ 色谱柱上的保留时间明显减少(如图 3 所示)。在图 3 中可以明显看到, 当甲醇的体积分数增加到 50%时, 色氨酸的色谱峰型有拖尾现象。故本实验选取 40%甲醇浓度时的流动相体系作为乳粉中色氨酸分离的适宜色谱条件。同时本研究考察了不同温度下(25 °C、35 °C、45 °C)色氨酸的分离情况, 结果表明随着温度的增加, 色氨酸的保留时间不断减少, 综合考虑到色谱柱的寿命、流动相沸点等因素, 本研究最后将分离稳定确定为 45 °C。在此条件下, 色氨酸的保留时间变为 1.35 min, 这也意味着算上上样时间, 本方法可以在 3 min 内完成一个样品的分析, 以每天 8 h 计算的话, 可以分析 160 个样品。

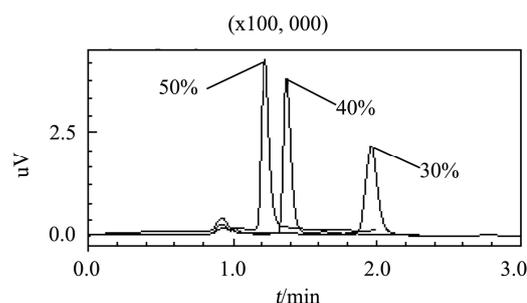


图 3 流动相中甲醇的体积分数对色氨酸分离效果影响的 U-HPLC 色谱图

Fig. 3 U-HPLC chromatograms of the effect of tryptophan separation in different volume fractions of methanol

3.3 方法线性及检出限

在上述优化的实验条件下, 本研究考察了色氨酸在 1~1000 μg/L 浓度范围内的线性关系和相关系

数。结果表明色氨酸在该浓度范围内线性关系良好,线性回归方程为: $Y = 3228.31X + 9563.94$, 相关系数 (r) 大于 0.999。当以色氨酸标准溶液的信噪比为 10 时的进样浓度定义为定量限, 可以得出色氨酸的定量限为 $1 \mu\text{g/L}$, 按照本研究方法推算, 在乳粉中的定量限是 $5 \mu\text{g/g}$ 乳粉。根据我国新修订的食品安全国家标准, 乳粉中的蛋白质含量应不小于 $16.5\text{g}/100\text{g}$ ^[15], 结合前面提到的国标《婴儿配方食品》中色氨酸的限量标准为不小于 110mg/g ^[2], 可以计算出婴儿配方乳粉中色氨酸的限量要求是不低于 2.9mg/g , 这说明本方法灵敏度高, 完全满足婴幼儿奶粉样品中色氨酸的分析要求。

3.4 精密度与回收率

回收率和精密度的测定通过向已知浓度的样品 (1.80mg/g) 中添加低、中、高 3 个浓度水平的色氨酸标准溶液进行, 使样品中色氨酸含量分别为 2.0、2.3、3.3 mg/g , 按上述样品制备方法操作, 重复测定 5 次, 得日内精密度; 连续测定 3 天, 得日间精密度。结果表明本方法色氨酸的回收率在 110.7%~116.3% 之间, 日内相对标准偏差 (RSD) 为 0.75%~1.80%, 日间的 RSD 为 1.30%~2.54%, 结果见表 1。这说明本方法完全能够满足实际样品检测的需求。

表 1 色氨酸的加标回收率及精密度

Table 1 Recoveries and precision (RSD) of tryptophan

化合物	加标浓度/ (mg/g)	回收率/ %	RSD/%	
			Intra-day ($n = 5$)	Inter-day ($n = 3$)
Tryptophan	0.2	110.7	0.75	1.30
	0.5	114.2	1.56	2.07
	1.5	116.3	1.80	2.54

3.5 方法应用

准确测定出婴幼儿乳粉中的色氨酸含量, 对于

确保婴幼儿的健康成长, 具有重要意义。本研究依照上述所建立的方法对购自市场不同品牌的 10 种国内外乳粉进行了测定, 典型样品的色谱图见图 4, 检测结果见表 2。结果表明, 目前市场上所售乳粉中的色氨酸含量确实差异比较大, 其中大部分乳粉色氨酸含量确实达不到 2.9mg/g 的限量标准, 应引起企业和监管部门足够的重视。为了了解乳粉中色氨酸的含量与蛋白质含量是否为线性相关, 在此我们也测定了乳粉样品的蛋白含量, 乳粉样品的色氨酸含量与蛋白含量的相关性见图 5, 由图 5 可以看出, 乳粉样品的色氨酸含量与蛋白含量之间并不呈完全的线性相关, 这也意味着我们在对乳粉样品蛋白含量进行关注的同时, 不能忽视作为人体必需氨基酸之一的色氨酸在乳粉中的含量。这说明在婴幼儿配方乳粉的营养强制标签中, 应尽快增加关于色氨酸的鉴于我国目前尚无婴幼儿乳粉色氨酸检测的国家标准, 且在婴幼儿乳粉的标签中并未有色氨酸含量的强制要求, 本研究结果也表明我国应尽快开展乳粉样品中的色氨酸含量调查研究, 并应尽快制定婴幼儿乳粉色氨酸检测的国家标准, 以确保我国婴幼儿配方乳粉的食用安全。

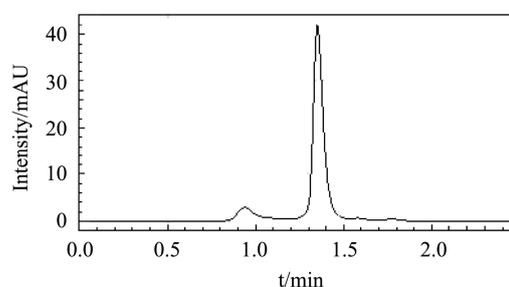


图 4 典型样品色氨酸 U-HPLC 分析色谱图

Fig. 4 U-HPLC chromatogram of typical samples for tryptophan analysis

表 2 十种乳粉样品中色氨酸检测结果

Table 2 The detection results of tryptophan in ten milk powder samples

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度(mg/g)	1.80	1.95	1.97	2.00	2.19	2.51	2.64	2.76	3.05	3.35

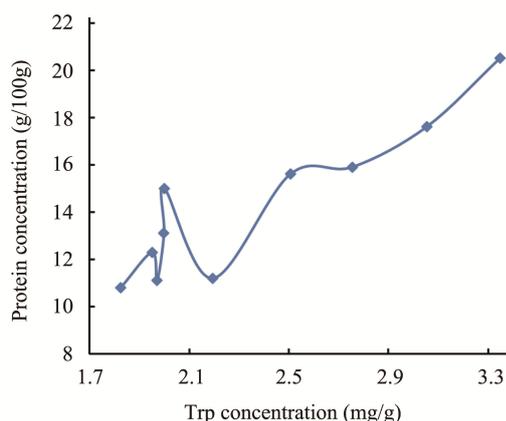


图 5 乳粉样品中色氨酸含量与蛋白质含量的相关性

Fig. 5 The correlations of protein concentrations and tryptophan concentrations in milk powder samples

4 结 论

本研究通过使用自制的乳粉样品色氨酸检测用消解装置, 并优化其消解条件和色谱分析条件, 建立了乳粉样品的超高效液相色谱-荧光检测法。该方法准确度和灵敏度高, 分析时间短。将该方法应用于实际乳粉样品的检测结果表明, 目前市售的部分婴幼儿乳粉样品中的色氨酸含量未满足我国的限量标准。此外, 乳粉中的蛋白含量与色氨酸含量之间并不存在明显的相关性, 为确保婴幼儿乳粉的食用安全, 应尽快制定婴幼儿乳粉中色氨酸检测的国家标准。

参考文献

- [1] Markus C R, Verschoor E, Firk C, *et al.* Effect of tryptophan-rich egg protein hydrolysate on brain tryptophan availability, stress and performance[J]. *Clin Nutr*, 2010, 29(5): 610–616.
- [2] GB 10765—2010 食品安全国家标准婴儿配方食品[S]. GB 10765—2010 National food safety standard Infant formula food [S].
- [3] 任大喜, 提伟钢, 李景红, 等. 荧光法测定婴儿奶粉中色氨酸的含量[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(7): 203–204. Ren DX, Ti WG, Li JH, *et al.* Determination of tryptophan in infant formulas using fluorescence method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2007, 28(7): 203–204.
- [4] 徐礼生, 高贵珍, 曹稳根, 等. 紫外分光光度法快速测定发酵液中的 L-色氨酸[J]. *分析实验室*, 2014, 33(6): 675–677. Xu LS, Gao GZ, Cao WG, *et al.* Determination of L-tryptophan in fermentation broth by ultraviolet spectrophotometry[J]. *Chin J Anal Lab*, 2014, 33(6): 675–677.
- [5] 王艳芳, 盛锋, 孙衍华, 等. 溴取代紫外分光光度法同时测定痕量色氨酸和酪氨酸[J]. *分析科学学报*, 2013, 29(3): 405–408. Wang YF, Sheng F, Sun YH, *et al.* Simultaneous determination of trace tryptophan and tyrosine by ultraviolet spectrophotometry with substituted bromination[J]. *J Anal Sci*, 2013, 29(3): 405–408.
- [6] Hanko VP, Rohrer JS. Direct determination of tryptophan using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection [J]. *Anal Biochem*, 2002, 2(15): 204–209.
- [7] Ravindran G, Bryden WL. Tryptophan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography [J]. *Food Chem*, 2005, 89(2): 309–314.
- [8] 陈永波, 饶斌, 覃兰. 高效液相色谱法快速直接测定酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸[J]. *氨基酸和生物资源*, 2000, 22(1): 55–58. Chen YB, Rao B, Xin L. Direct determination of tyrosine, phenylalanine and tryptophan by high performance liquid chromatography [J]. *Amino Acids Biotic Resources*, 2000, 22(1): 55–58.
- [9] Zhu YH, Yang Y, Zhou ZX, *et al.* Direct determination of free tryptophan contents in soy sauces and its application as an index of soy sauce adulteration [J]. *Food Chem*, 2010, 118(1): 159–162.
- [10] Molnár-Perl I. Advancements in the rapid and sensitive analyses of tryptophan and its metabolites, by chromatography [J]. *Int Congress Series*, 2007, 1304(1): 389–403.
- [11] Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Jimenez-Pérez S, *et al.* Tryptophan determination in milk-based ingredients and dried sport supplements by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Food Chem*, 2006, 98: 580–585.
- [12] GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定[S]. GB/T 18246-2000 Determination of amino acids in feeds [S].
- [13] Möller M, Preez JLD, Harvey BH. Development and validation of a single analytical method for the determination of tryptophan, and its kynurenine metabolites in rat plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 898(1): 121–129.
- [14] Jonga WHA, Smita R, Bakkerb SJL, *et al.* hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC–tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 603–609.
- [15] GB 19644—2010 食品安全国家标准 乳粉[S]. GB 19644—2010 National food safety standard Milk powder[S].

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



冯 峰, 副研究员, 主要研究方向为
食品安全检验技术。
E-mail: fengf_2005@163.com



储晓刚, 研究员, 主要研究方向为食
品安全。
E-mail: xgchu@vip.163.com.

“食品包装材料”专题征稿

食品包装材料, 以其化学稳定、制造成本低、重量轻、易于加工、装饰效果好、运输销售方便以及良好的食品保护作用而被广泛应用, 但由于与食品直接接触, 包装材料所含的有害物质会通过吸收、溶解、扩散等过程向食品发生迁移从而污染食品。食品包装材料的安全是食品安全的重要组成部分, 建立完善的食品包装材料保障体系是应对频发的由食品包装材料引起的食品安全事件的关键。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品包装材料”专题, 由上海交通大学的**李云飞**教授担任专题主编。现任上海交通大学陆伯勋食品安全研究中心副主任, 农产品贮藏与加工工程学科梯队带头人, 上海市食品学会理事, 上海市学位委员会学科评议组成员。曾任上海交通大学食品科学与工程系主任, 兼任上海市农业机械学会农副产品贮运与加工专业委员会主任, 教育部高等学校轻工与食品教学指导委员会食品科学与工程分委员会委员。本专题主要围绕**食品包装材料法律法规、食品包装材料的安全标准、食品包装材料中有毒有害化学物质的检测、有害残留物质的迁移转化机理、新型食品包装材料(环保材料, 可食性材料)**等方面或者您认为在食品包装材料方面有意义的内容进行论述, 计划在**2014年11月**出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及**李云飞**教授特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部