

柱前在线衍生-反相高效液相色谱法测定羊胎盘 枸杞胶囊中 16 种氨基酸的含量

游景水*, 王德伟

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立一种采用反相高效液相色谱法测定羊胎盘枸杞胶囊中 16 种氨基酸的含量。**方法** 样品中的蛋白质在 6 mol/L 盐酸溶液中水解为氨基酸, 其中一级氨基酸用邻苯二甲醛(OPA)、二级氨基酸用 9-芴甲基氯甲酸酯(FMOC)进行柱前在线衍生; 用 Agilent Hypersil AA-ODS 柱分离; 用流动相(0.16%醋酸钠)进行梯度洗脱; 经荧光检测器(FLD)检测(激发波长: 340 nm, 发射波长: 450 nm; 15 min 时, 激发波长: 266 nm, 发射波长: 305 nm)。**结果** 16 种氨基酸在 5 ~ 250 pmol/ μ L 浓度范围内呈现良好的线性关系(r : 0.99959 ~ 1.00000, $n=5$), 平均加标回收率为 91.6% ~ 104.1%($n=9$), 相对标准偏差(RSD)为 0.9% ~ 3.7%, 最低检测限为 0.4 ~ 1.2 pmol。**结论** 该方法灵敏度高, 具有良好的精密度与准确度, 可以有效地控制产品质量。

关键词: 羊胎盘枸杞胶囊; 柱前在线衍生; 氨基酸; 反相高效液相色谱法; 邻苯二甲醛; 9-芴甲基氯甲酸酯

Determination of sixteen kinds of amino acids in the capsule of sheep placenta and medlar by online pre-column derivatization-reversed-phase high performance liquid chromatography

YOU Jing-Shui*, WANG De-Wei

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of sixteen kinds of amino acids in the capsule of sheep placenta and medlar by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). **Methods** Proteins in the samples were hydrolyzed into amino acids in 6 mol/L hydrochloric acid solution, o-phthalaldehyde (OPA) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) were used as online pre-column derivatization reagents for the primary amino acids and secondary amino acids respectively, and the chromatographic experiments were performed on an Agilent Hypersil AA-ODS column. The 0.16% sodium acetate solution was used as mobile phase. Signals were detected by fluorescence detection (FLD) (excitation wavelength: 340 nm, emission wavelength: 450 nm, excitation wavelength changed to 266 nm and emission wavelength changed to 305nm at the 15 min). **Results** The concentration of sixteen kinds of amino acids demonstrated a good linearity in the range of 5 ~ 250 pmol/ μ L(r : 0.99959 ~ 1.00000, $n=5$). The recoveries were 91.6% ~ 104.1% ($n=9$). The RSD were 0.9% ~ 3.7%. The limits of detection were 0.4 ~ 1.2 pmol. **Conclusion** This method has advantages of high sensitivity, precision and accuracy. It's suitable for the determination of sixteen kinds of amino acids in the capsule of sheep placenta and medlar.

KEY WORDS: capsule of sheep placenta and medlar; online pre-column derivatization; amino acid; re-

*通讯作者: 游景水, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 752414274@qq.com

*Corresponding author: YOU Jing-Shui, Licensed Pharmacist, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 752414274@qq.com

versed-phase high performance liquid chromatography; o-phthalaldehyde; 9-fluorenylmethyl chloroformate

1 引言

羊胎盘枸杞胶囊的保健功能具有活化细胞、延缓衰老、提高免疫力、养肤润颜、调节荷尔蒙、改善更年期症状的保健功能,该产品含有丰富的氨基酸。氨基酸组成测定是蛋白质组学、食品质量检测以及药品质量检测中的重要分析项目^[1],对于含蛋白样品(保健食品、饲料和动物组织等),先对样品进行酸水解或碱水解处理^[2-8],得到游离氨基酸溶液,再进行测定^[9]。食品中氨基酸的测定(GB/T 5009.124-2003)是使用氨基酸自动分析仪进行测定^[2],但该方法的缺点是分析柱易被污染、灵敏度较低(最低检出限为(10 pmol)且分析时间长。本方法使用 OPA、FMOC 为衍生剂,对样品溶液进行柱前在线衍生,使用荧光检测器(FLD)检测^[10-15],大大提高了检测灵敏度。

2 材料与方 法

2.1 主要仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(带荧光检测器,美国 Agilent 公司),色谱工作站: Chem32; KQ-500E 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); XW-80A 型旋转混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海鸿都电子科技有限公司); BPZ-6090Lc 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

2.2 试剂

OPA 试剂(美国安捷伦公司,批号: BCBF1444); FMOC 试剂(美国安捷伦公司,批号: BCBF0657); 250 pmol/ μ L 氨基酸混合标准品(美国安捷伦公司,批号: BCBF0914); 浓盐酸(优级纯,广州化学试剂厂); 苯酚(分析纯,广州化学试剂厂); 乙腈(色谱纯,广州化学试剂厂); 甲醇(色谱纯,广州化学试剂厂); 四氢呋喃(色谱纯,广州化学试剂厂); 醋酸(分析纯,广州化学试剂厂); 三乙胺(分析纯,广州化学试剂厂); 无水醋酸钠(分析纯,广州化学试剂厂)。

2.3 色谱条件

色谱柱: Hypersil AA-ODS (200 mm \times 2.1 mm, 5

μ m, 美国安捷伦公司); 流速: 0.45 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 1 μ L; 运行时间: 30 min

流动相 A(0.16%醋酸钠): 称取无水醋酸钠 1.6 g, 加 1000 mL 纯化水, 搅拌使溶解, 加入 180 μ L 三乙胺, 并混合, 用 2%醋酸调 pH 值至 7.20 \pm 0.1, 加入 3 mL 四氢呋喃, 混匀, 用 0.45 μ m 水相滤膜抽滤, 即得; 流动相 B(0.16%醋酸钠): 称取无水醋酸钠 1.6 g, 加 200 mL 纯化水, 搅拌使溶解, 用 2%醋酸调 pH 值至 7.20 \pm 0.1, 将此溶液加入至 400 mL 乙腈和 400 mL 甲醇的混合物中, 混匀, 用 0.45 μ m 有机相滤膜抽滤, 即得。梯度洗脱比例见表 1。

表 1 梯度洗脱比例
Table 1 Gradient elution ratio

时间(min)	流速(mL/min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0.0	0.45	100	0
17.0	0.45	40	60
18.0	0.45	0	100
18.5	0.80	0	100
23.9	0.80	0	100
24.0	0.45	0	100
25.0	0.45	100	0
30.0	0.45	100	0

进样器程序: 从 1 号瓶中吸取 5.0 μ L 硼酸缓冲液; 从 2 号瓶中吸取 1.0 μ L OPA 试剂; 从 3 号瓶(无盖)中吸取 0.0 μ L 水(清洗进样针); 从 X 号瓶中吸取 1.0 μ L 样品; 从 3 号瓶(无盖)中吸取 0.0 μ L 水(清洗进样针); 8 μ L 原位混合; 最大速度, 6 次; 从 4 号瓶中吸取 1.0 μ L FMOC; 从 3 号瓶(无盖)中吸取 0.0 μ L 水(清洗进样针); 9 μ L 原位混合; 最大速度, 3 次; 进样。检测器: 荧光检测器(FLD)。检测器条件: 0 min 时, 激发波长: 340 nm, 发射波长: 450 nm, PTM 增益: 11; 15 min 时, 激发波长: 266 nm, 发射波长: 305 nm, PTM 增益: 11

2.4 对照品溶液的制备

取 250 pmol/ μ L 氨基酸混合标准品适量, 用 0.1 mol/L 的盐酸分别稀释至浓度为: 5L、10、50、100 和 250 pmol/ μ L。

2.5 样品前处理

精密称取羊胎盘枸杞胶囊约 0.12 g, 置于 25 mL 磨口的具塞比色管内, 加 6 mol/L 盐酸 15 mL, 加入 0.2 g 苯酚, 用旋转混合仪和超声仪使样品充分分散并溶解, 充氮气, 盖紧塞子, 置于 110 °C±1 °C 的恒温干燥箱内, 水解 22 小时, 取出冷却, 过滤, 用纯化水冲洗比色管, 将水解液全部转移至 50 mL 容量瓶中, 用纯化水定容至刻度, 摇匀, 精密吸取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 置于真空干燥箱内, 于 40 °C ~ 50 °C 减压干燥(真空干燥箱内放入五氧化二磷作为干燥剂), 干燥后残留物用 0.1 mol/L 的盐酸定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 即得。

3 结果与分析

3.1 线性试验和检出限试验

在 2.3 色谱条件下, 取上述 5 个浓度的对照品溶液, 以浓度(X : pmol/μL)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线。将信噪比(S/N)=3 所对应的质量(pmol)确定为检出限。16 种氨基酸的线性方程、相关系数和检出限见表 2。表 2 结果表明: 16 种氨基酸在 5 ~ 250 pmol/μL 浓度范围内呈现良好的线性关系(r : 0.99959 ~ 1.00000)($n=5$), 检出限为: 0.4 ~ 1.2 pmol。

表 2 16 种氨基酸的线性方程、相关系数和检出限
Table 2 Linear equation, correlation coefficient and detection limit of the sixteen kinds of amino acids

名称	线性方程	相关系数 [®]	检出限(pmol)
天冬氨酸	$Y=18.887 X+26.39$	0.99995	0.5
谷氨酸	$Y=21.853 X-16.05$	0.99994	0.5
丝氨酸	$Y=25.262 X-26.46$	0.99996	0.6
组氨酸	$Y=14.036 X+38.92$	0.99978	0.8
甘氨酸	$Y=22.876 X+39.18$	0.99965	0.6
苏氨酸	$Y=19.940 X+7.02$	1.00000	0.6
丙氨酸	$Y=23.335 X-14.89$	0.99998	0.6
精氨酸	$Y=24.975 X+25.50$	0.99999	0.5
酪氨酸	$Y=23.880 X-11.90$	0.99996	0.6
缬氨酸	$Y=24.815 X+39.30$	0.99987	0.5
蛋氨酸	$Y=29.005 X-5.40$	0.99991	0.5
苯丙氨酸	$Y=23.976 X+36.96$	0.99963	0.5
异亮氨酸	$Y=25.942 X+53.87$	0.99959	0.5
亮氨酸	$Y=27.078 X+12.87$	0.99998	0.5
赖氨酸	$Y=8.972 X-1.24$	0.99997	1.2
脯氨酸	$Y=48.467 X+41.03$	0.99999	0.4

3.2 精密度试验

精密称取同一批号样品 6 份, 照样品溶液制备方法操作, 在 2.3 色谱条件下, 分析测定, 16 种氨基酸的方法精密度 RSD 为 0.3% ~ 2.0%, 精密度试验见表 3, 表 3 结果表明, 该方法具有良好的精密度。

3.3 加标回收试验

精密称取上述已知含量的同一批号样品 9 份, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每一组中分别精密加入 250 nmol/μL 氨基酸混合标准品 40、50、60 μL, 照样品溶液制备方法操作, 在 2.3 色谱条件下分析测定, 16 种氨基酸的回收率为 91.6% ~ 104.1%, 其 RSD 为 0.9% ~ 3.4%。加标回收试验见表 4, 表 4 结果表明, 该方法具有良好的准确度。

3.4 方法专属性试验

取空白样品、16 种氨基酸混合标准品及羊胎盘枸杞胶囊样品处理后的样品溶液, 在 2.3 色谱条件下进样, 记录色谱图。空白样品、16 种氨基酸混合标准品及羊胎盘枸杞胶囊样品色谱图分别见图 1、图 2 和图 3, 结果表明, 结果表明空白溶液对 16 种氨基酸的测定没有干扰, 且 16 种氨基酸有良好的分离度, 表明该方法具有良好的专属性。

4 讨论

本方法采用邻苯二甲醛(OPA)和 9-芴甲基氯甲酸酯(FMOC)作为柱前衍生化试剂, 因为这两种试剂具有以下优点: (1) 可迅速衍生一级、二级氨基酸, 16 种氨基酸均生成较强荧光衍生物。(2) 从空白试验可以看出, 在 16 种氨基酸色谱峰的保留时间处, 没有产生干扰峰。

自动进样器的使用^[10,11], 实现了在线自动化衍生, 分析效率大为提高, 也减少了误差的产生。

本方法 16 种氨基酸的最低检出限为 0.4 ~ 1.2 pmol, GB/T 5009.124-2003(食品中氨基酸的测定)的最低检出限为 10 pmol, 本方法的灵敏度高。

5 结论

本试验采用反相高效液相色谱法测定羊胎盘枸杞胶囊中 16 种氨基酸的含量, 试验表明本方法灵敏度高, 具有良好的精密度与准确度, 适用于羊胎盘枸杞胶囊中氨基酸的含量测定。

表3 精密度的试验($n=6$)
Table 3 The experiment of the precision ($n=6$)

名称	平均含量(mg/g)	RSD(%)	名称	平均含量(mg/g)	RSD(%)	名称	平均含量(mg/g)	RSD(%)
天冬氨酸	22.65	1.5	丙氨酸	21.25	1.0	异亮氨酸	11.92	1.7
谷氨酸	44.14	1.3	精氨酸	12.90	0.8	亮氨酸	22.94	0.6
丝氨酸	7.74	0.3	酪氨酸	8.60	0.5	赖氨酸	13.87	1.8
组氨酸	4.14	1.8	缬氨酸	15.48	1.5	脯氨酸	16.13	0.5
甘氨酸	22.60	1.5	蛋氨酸	6.92	1.3	总氨基酸含量 (mg/g)	251.44	1.4
苏氨酸	9.89	0.4	苯丙氨酸	10.27	2.0			

表4 加标回收率试验($n=9$)
Table 4 The experiment of standard addition recovery ($n=9$)

名称	平均回收率(%)	RSD(%)	名称	平均回收率(%)	RSD(%)	名称	平均回收率(%)	RSD(%)
天冬氨酸	91.6	1.1%	丙氨酸	95.0	0.9%	异亮氨酸	98.1	3.4%
谷氨酸	94.3	1.8%	精氨酸	96.3	3.1%	亮氨酸	94.7	3.3%
丝氨酸	98.3	2.7%	酪氨酸	99.7	2.4%	赖氨酸	99.2	2.7%
组氨酸	93.1	2.6%	缬氨酸	96.8	3.7%	脯氨酸	99.2	2.1%
甘氨酸	104.1	3.0%	蛋氨酸	100.8	2.3%			
苏氨酸	100.3	3.1%	苯丙氨酸	98.7	2.4%			

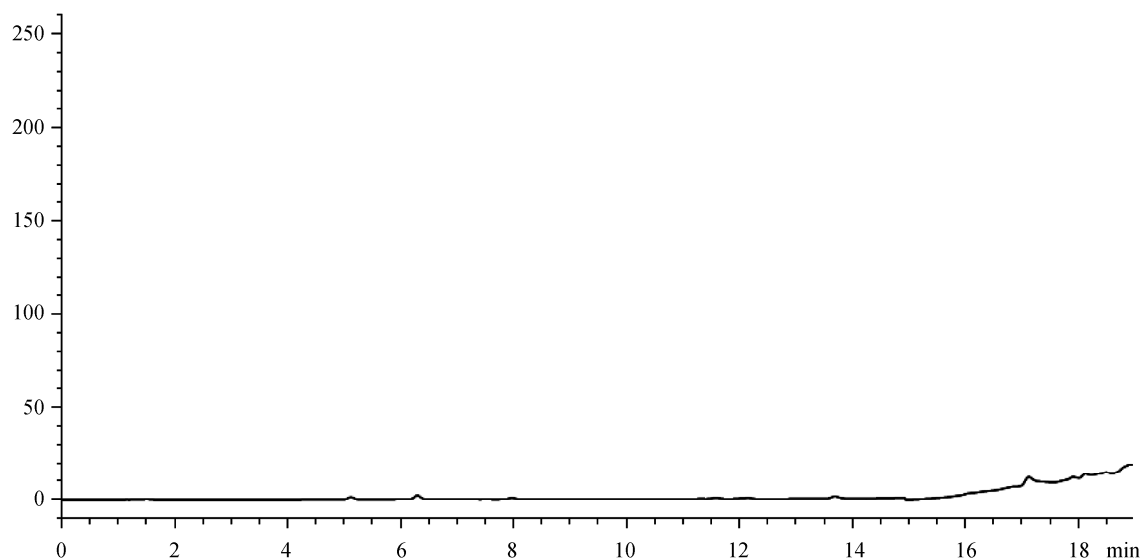


图1 空白样品图谱

Fig. 1 The chromatogram of blank samples

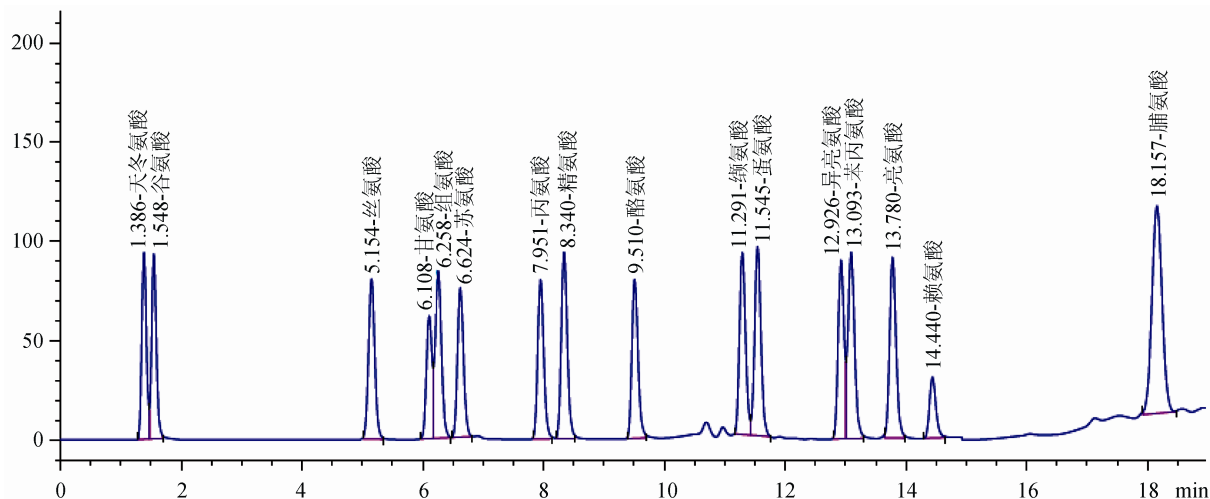


图 2 16 种氨基酸标准品图谱

Fig. 2 The chromatogram of the sixteen kinds of amino acid standards

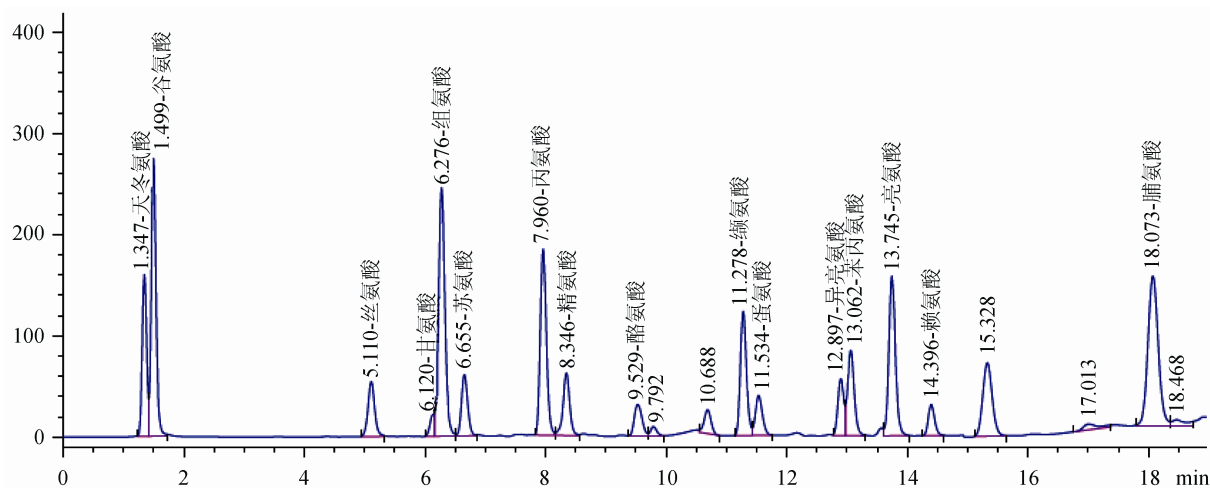


图 3 样品图谱

Fig. 3 The chromatogram of samples

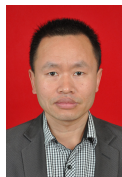
参考文献

- [1] 谭和平, 陈丽, 叶善蓉, 等. 茶叶中氨基酸的测试方法分析概述[J]. 中国测试技术, 2007, 33(6): 1-4.
Tan HP, Chen L, Ye SR, *et al.* Overview of amino acid determinations for tea [J]. China Meas Technol, 2007, 33(6): 1-4.
- [2] GB/T 5009.124-2003 食品中氨基酸的测定[S].
GB/T 5009.124-2003 Determination of amino acids in foods [S].
- [3] 张国安, 许雪, 张素艳. 蛋白质组分的分离与分析及其应用进展[J]. 分析化学, 2003, 31(5): 611-615.
Zhang GA, XU X, Zhang S. High throughput separation and identification for proteomics and recent development in proteome [J]. Anal Chem, 2003, 31(5): 611-615.
- [4] NY/T 1618-2008 鹿茸中氨基酸的测定[S].
NY/T 1618-2008 Determination of amino acids in velvet antler [S].
- [5] SN/T0930-2000 进出口花粉中全氨基酸的测定方法-氨基酸自动分析仪法[S].
SN/T0930-2000 Method for the determination of total amino acid in import and export-Amino acid automatic analyzer method [S].
- [6] GB/T 14924.10-2008 实验动物 配合饲料 氨基酸的测定[S].

- GB/T 14924.10-2008 Laboratory animal-Determination of amino acids for formula feeds [S].
- [7] QB/T 4356-2012 黄酒中游离氨基酸的测定: 高效液相色谱法 [S].
QB/T 4356-2012 Determination of free amino acids in Chinese rice wine: High performance liquid chromatography [S].
- [8] QB/T2409-1998 化妆品中氨基酸含量的测定[S].
QB/T2409-1998 Determination of amino acids in cosmetics [S].
- [9] JY/T019-1996 氨基酸分析方法通则[S].
JY/T019-1996 General rules for amino acid analysis [S].
- [10] GB/T18654.11-2008 养殖鱼类种质检验第 11 部分: 肌肉中主要氨基酸含量的测定[S].
GB/T18654.11-2008 Inspection of germplasm for cultured fishes-Part 11:Determination of amino acids content in muscle [S].
- [11] NY/T 1975-2010 水溶肥料 游离氨基酸含量的测定[S].
NY/T 1975-2010 Water-soluble fertilizers-Determination of amino-acids content [S].
- [12] 刘惠文. 柱前和柱后衍生高效液相色谱分析氨基酸方法进展与评述[J]. 氨基酸和生物资源, 1995, 2: 36-37.
Liu HW. Progress and comments on the analysis of amino acids in the column [J]. Amino Acids Biol Resour, 1995, 2: 36-37.
- [13] 桂莉, 田洪, 郑健, 等. 高效液相色谱荧光法同时测定小鼠脑组织中 4 种氨基酸类神经递质[J]. 第三军医大学学报, 2009, 8: 11-12.
Gui L, Tian H, Zhen J, *et al.* Simultaneous determination of 4 kinds of amino acids neurotransmitters in brain tissue of mice by high performance liquid chromatography [J]. J Third Military Med Univ, 2009, 8: 11-12.
- [14] 纪银福, 石来凤. 饲料中氨基酸的测定——酸水解法测试研究 [J]. 草食家禽 2007, 2: 67-68.
Ji YF, Shi LF. Assay Amino Acid in Feed -Acid Hydrolytic Method Test and Research [J]. Grass-Feeding Livestock, 2007, 2: 67-68.
- [15] 渠琛玲, 白雨萍. 微波水解衍生高效液相色谱法测定西洋参中的氨基酸[J]. 分析化学, 2009, 5: 685-690.
Qu CL, Bai YP. Determination of amino acids in Panax ginseng by microwave hydrolysis and high performance liquid chromatography [J]. Anal Chem, 2009, 5: 685-690.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



游景水, 执业药师, 质量工程师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。
E-mail: 752414274@qq.com