

柱前衍生-高效液相色谱法测定保健食品中 16种氨基酸的含量

孙 健, 张 甦, 胡 青, 毛秀红, 季 申*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘 要: **目的** 建立柱前衍生-高效液相色谱法测定保健食品中 16 种氨基酸的含量。**方法** 优化 GB/T 5009.124-2003 的前处理方法, 样品经稀释或置于顶空瓶中直接酸水解; 并采用 OPA/FMOC 柱前衍生法, 色谱柱为 Thermo ODS Hypersil, 以醋酸钠缓冲液(含三乙胺、四氢呋喃)和醋酸钠缓冲液(含乙腈、甲醇)为流动相进行梯度洗脱, 在 338 nm 和 262 nm 检测波长下进行高效液相色谱法检测。**结果** 16 种氨基酸在 4~250 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈现良好线性关系, 在 10 $\mu\text{g/mL}$ 水平下加标回收率为 85.8%~115.2%, RSD 为 0.1%~9.1% ($n=6$), 检出限在 0.2~4.6 ng 范围内。**结论** 本方法操作简便、灵敏度高, 可应用于实际样品的测定。

关键词: 保健食品; 氨基酸; 邻苯二甲醛; 9-芴甲基氯甲酸酯; 柱前衍生; 高效液相色谱法

Determination of 16 kinds of amino acids in health foods by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization

SUN Jian, ZHANG Su, HU Qing, MAO Xiu-Hong, JI Shen*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of 16 kinds of amino acids in health foods by high performance liquid chromatography (HPLC) with pre-column derivatization. **Methods** By optimizing pretreatment and analytical method of GB/T 5009.124-2003, samples were diluted or direct acid hydrolyzed in headspace bottle, and the amino acids were determined by HPLC after pre-column derivatization with *o*-Phthalaldehyde (OPA)/ 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC). A Thermo ODS Hypersil column was used for separation with sodium acetate buffer solution (containing triethylamine and THF) and sodium acetate buffer solution (containing acetonitrile and methanol) as the mobile phase for gradient elution. Samples were detected by HPLC under the detection wavelengths of 338 nm and 262 nm. **Results** Sixteen kinds of amino acids presented good linear relationships in the concentration range of 4~250 $\mu\text{g/mL}$. The recoveries spiked at the level of 10 $\mu\text{g/mL}$ were ranged in 85.8%~115.2% with RSDs of 0.1%~9.1% ($n=6$), and the limits of detection were 0.2~4.6 ng. **Conclusion** This method is simple and sensitive, which can be used for the determination in practical sample.

KEY WORDS: health food; amino acid; protein; *o*-Phthalaldehyde; 9-fluorenylmethyl chloroformate; pre-column derivatization; high performance liquid chromatography

基金项目: 上海市科学技术委员会项目(14DZ2294000, 14DZ1900302)

Fund: Supported by Science and Technology Commission of Shanghai Municipality Project (14DZ2294000, 14DZ1900302)

*通讯作者: 季申, 主任药师, 博士生导师, 主要研究方向为中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究。E-mail:

jishen2013@163.com

*Corresponding author: JI Shen, Chief Pharmacist, Ph.D Supervisor, Shanghai Institute for Food and Drug Control. No. 1500 Zhangheng Road, Pudong New District, Shanghai 201203, China. E-mail: jishen2013@163.com

1 引 言

氨基酸是组成生物体内蛋白质的基本单元。以氨基酸或蛋白质为主要原料的保健食品日益增多,可满足人们对健康的需求。目前保健食品中氨基酸按照 GB/T 5009.124-2003 检测^[1],使用氨基酸分析仪经离子交换柱分离后经茚三酮柱后衍生进行测定,但该仪器为专用仪器,价格昂贵,用途单一,且前处理方法繁琐。因此,有必要建立简单通用的方法便于一线实验室对保健食品中氨基酸的检测。

高效液相色谱法是目前最广泛使用的含量测定方法,但由于氨基酸极性大、无紫外吸收等特点会导致分离和检测困难,限制了常规高效液相色谱法的应用。为解决分离问题,可在反相色谱流动相中使用七氟丁酸溶液^[2],或使用亲水作用色谱(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)^[3],但检测多种氨基酸时仍不能完全有效分离。由于无紫外吸收,故考虑采用蒸发光检测器^[2,3]或质谱检测器^[4-6]。

另外,衍生法是氨基酸检测中常用的方法。柱后衍生法一般采用氨基酸分析仪,经茚三酮柱后衍生进行测定^[7,8]。柱前衍生常用的衍生试剂有邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde, OPA)^[9]、9-芴甲基氯甲酸酯(9-fluorenylmethyl chloroformate, FMOC)^[9]、异硫氰酸苯酯(phenyl isothiocyanate, PITC)^[10]、2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB)^[11]及 6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidy carbamate, AQC)^[12]等。

本研究改进了 GB/T 5009.124-2003 中的酸水解方法,并采用 OPA/FMOC 柱前衍生法测定保健食品中的 16 种氨基酸。即在巯基试剂存在下,一级氨基酸首先与 OPA 反应,生成 OPA-氨基酸,二级氨基酸(脯氨酸)继续与 FMOC 反应,两次反应生成的氨基酸衍生物经反相 HPLC 分离后使用紫外检测器检测。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(安捷伦公司); FD115 型恒温干燥箱(BINDER 公司); R-205 型旋转蒸发仪(BUCHI 公司)。

醋酸钠、三乙胺、四氢呋喃、醋酸、乙腈、甲醇(色谱纯, Merck 公司); 盐酸、硼酸、氢氧化钠、OPA、巯基丙酸、FMOC(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸及精氨酸对照品(中国食品药品检定研究院)。

2.2 实验方法

2.2.1 混合标准工作溶液的制备

精密称取天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸对照品适量,加水溶解配制成 250 μg/mL 的混合对照品溶液。

精密量取混合对照品溶液适量,用水依次稀释成浓度为 100、25、10 和 4 μg/mL 的系列溶液,作为混合标准工作溶液。

2.2.2 样品前处理

(1) 适用于成分为单体氨基酸的样品

精密称取样品粉末或液体适量,加水稀释一定倍数(视样品中氨基酸含量而定),摇匀,离心,取上清液。

(2) 适用于成分为蛋白质或多肽的样品

精密称取样品粉末或液体适量(视样品中氨基酸含量而定),置于顶空瓶中,在顶空瓶内加 6 mol/L 盐酸 10 mL,封口,将已封口的顶空瓶放在 110 ℃ 的恒温干燥箱内,水解 22 h 后,取出冷却。打开顶空瓶,将水解液过滤后,用去离子水多次冲洗顶空瓶。使用旋转蒸发仪将全部水解液减压在 40~50 ℃ 干燥,残留物用 10 mL 水溶解,再干燥,重复两次,最后蒸干,用适量水溶解残留物,并定容至一定体积,离心,取上清液。

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱: Thermo ODS Hypersil 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 取醋酸钠(含 3 个结晶水)7.00 g,加水 4000 mL 使溶解,加三乙胺 0.8 mL,四氢呋喃 24 mL,混匀,用 2%冰醋酸溶液调节 pH 值至 7.20; 流动相 B: 取醋酸钠(三个结晶水)10.88 g,加水 800 mL 使溶解,用 2%冰醋酸溶液调节 pH 至 7.20,加乙腈 1400 mL,甲醇 1800 mL,混匀。检测波长: 脯氨酸 262 nm,其余 15 种氨基酸 338 nm; 柱温: 35 ℃。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	流速(mL/min)
0	100	0	1
20	85	15	1
45	36	64	1
45.1	0	100	1.5
55	0	100	1.5
55.1	100	0	1

分别精密吸取标准溶液和供试品溶液各 1 μL,注入液相色谱仪,用 1%OPA 溶液与 0.5%FMOC 溶液柱前衍生化,测定,即得。

柱前衍生化进样程序(瓶 1~5 分别为 OPA、FMOC、水、硼酸盐缓冲液和水): 从瓶 3 吸取 0 μL (水, 清洗针头); 从瓶 4 吸取 5 μL (硼酸盐缓冲液); 从瓶 3 吸取 0 μL (水, 清洗针头); 从瓶 1 吸取 1 μL (OPA); 从瓶 3 吸取 0 μL (水, 清洗针头); 吸取样品 1 μL ; 从瓶 3 吸取 0 μL (水, 清洗针头); “在空气中”混合 7 μL , 10 次; 从瓶 2 吸取 1 μL (FMOC); 从瓶 3 吸取 0 μL (水, 清洗针头); “在空气中”混合 8 μL , 30 次; 从瓶 5 中吸取 32 μL (水); “在空气中”混合 20 μL , 最大速度, 2 次; 进样。

3 结果与分析

3.1 前处理优化

GB/T 5009.124-2003 主要针对蛋白质含量较高的食品, 前处理首先将样品置于硬质玻璃管中酸水解为氨基酸, 酸水解过程中滴加苯酚并充氮气, 使氨基酸免受破坏, 操作较繁。

实验中发现, 多数保健食品以单体氨基酸为原料, 直接稀释进样即可, 无需水解。部分保健食品以含蛋白质或多肽的动植物为原料, 需要水解。常见氨基酸中色氨酸^[13]、胱氨酸^[14]不稳定, 易被水解破坏, 但 GB/T 5009.124-2003 和本研究中分析的 16 种氨基酸未包括该两

种氨基酸。因此如 2.2.2 所述, 将样品直接置于顶空瓶中酸水解, 操作简便。

3.2 方法学验证

在上述液相条件下, 16 种氨基酸的液相色谱图见图 1。取混合标准工作溶液进样测定, 以各组分峰面积对浓度绘制曲线, 结果表明, 各氨基酸在 4~250 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内均呈现良好线性关系, 相关系数均在 0.999 以上。

取空白基质, 添加 10 $\mu\text{g/mL}$ 水平的混合对照品溶液, 一式 6 份, 按 2.2.2 供试品溶液制备方法和 2.2.3 液相色谱条件进样分析, 并计算回收率和精密度。结果表明, 含单体氨基酸(直接稀释)样品中 16 种氨基酸的回收率为 87.3%~105.3%, RSD 为 0.1%~9.1%($n=6$); 含蛋白质(酸水解)样品中 16 种氨基酸的回收率为 85.8%~115.2%, RSD 为 0.1%~4.7%。其中, 组氨酸回收率低于 90%, 与其色谱响应较低有关; 蛋氨酸回收率低于 90%, 因其与胱氨酸一样为含硫氨基酸, 酸水解时不稳定, 但其回收率 85.8%已能够满足保健食品检测需求; 脯氨酸精密度稍大, 因其为 FMOC 衍生, 衍生试剂及其水解产物对液相检测可能产生干扰。

测定加样溶液的信噪比, 以 $S/N=3$ 计算 16 种氨基酸的仪器检出限, 结果见表 2。

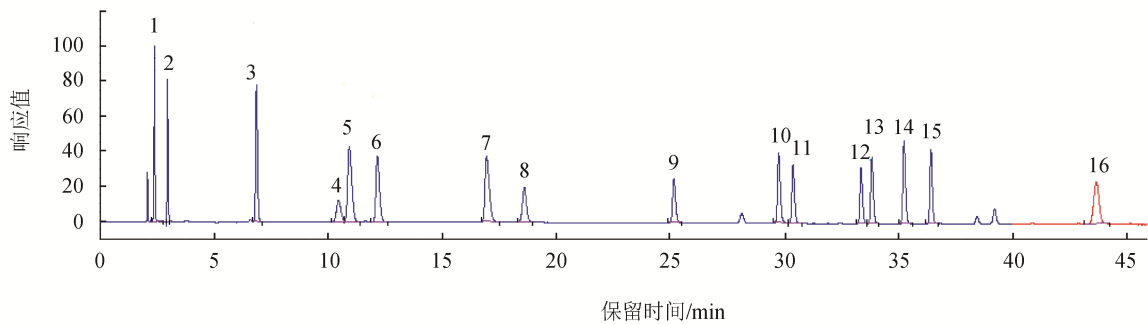


图 1 16 种氨基酸的液相色谱图

Fig. 1 Chromatogram of 16 kinds of amino acids

1: 天冬氨酸, aspartic acid; 2: 谷氨酸, glutamic acid; 3: 丝氨酸, serine; 4: 组氨酸, histidine; 5: 甘氨酸, glycine; 6: 苏氨酸, threonine; 7: 丙氨酸, alanine; 8: 精氨酸, arginine; 9: 酪氨酸, tyrosine; 10: 缬氨酸, valine; 11: 蛋氨酸, methionine; 12: 苯丙氨酸, phenylalanine; 13: 异亮氨酸, isoleucine; 14: 亮氨酸, leucine; 15: 赖氨酸, lysine; 16: 脯氨酸, proline

表 2 线性范围、回收率、精密度和检测限($n=6$)
Table 2 Linear ranges, recoveries, precisions and limits of detection ($n=6$)

	线性范围(μg/mL)	相关系数	直接稀释			酸水解		
			回收率(%)	RSD(%)	仪器检出限(ng)	回收率(%)	RSD(%)	仪器检出限(ng)
天冬氨酸	4~250	0.99968	102.8	0.1	0.2	110.3	2.2	0.2
谷氨酸	4~250	0.99965	105.3	0.7	0.3	99.5	0.7	0.4
丝氨酸	4~250	0.99939	100.1	0.2	0.3	103.5	0.7	0.4

续表 2

	线性范围(μg/mL)	相关系数	直接稀释			酸水解		
			回收率(%)	RSD(%)	仪器检出限(ng)	回收率(%)	RSD(%)	仪器检出限(ng)
组氨酸	4~250	0.99928	87.3	2.1	2.2	89.2	0.1	1.6
甘氨酸	4~250	0.99939	95.4	0.3	0.5	108.0	1.5	0.5
苏氨酸	4~250	0.99942	100.1	0.8	0.7	106.8	0.2	0.8
丙氨酸	4~250	0.99967	100.9	0.1	0.6	107.7	0.4	0.7
精氨酸	4~250	0.99899	101.9	0.1	1.4	103.9	1.9	1.5
酪氨酸	4~250	0.99962	100.3	0.4	1.2	101.0	1.3	1.3
缬氨酸	4~250	0.99967	99.5	0.5	0.5	105.3	0.7	0.6
蛋氨酸	4~250	0.99965	100.3	0.2	0.7	85.8	0.9	1.3
苯丙氨酸	4~250	0.99963	100.2	0.7	0.8	101.4	0.5	0.8
异亮氨酸	4~250	0.99970	100.2	0.2	0.6	97.7	0.4	0.6
亮氨酸	4~250	0.99972	100.3	0.1	0.6	107.6	0.5	0.6
赖氨酸	4~250	0.99952	97.7	0.6	0.5	106.9	0.1	0.6
脯氨酸	4~250	0.99978	95.9	9.1	4.6	115.2	4.7	2.9

3.3 实际样品测定

采用建立的方法,按照 GB/T 5009.124-2003 的要求,对 11 批样品中 16 种氨基酸总量进行检测,结果均符合各企业产品质量标准(见表 3)。所建方法能够满足一线实验室对于保健食品中氨基酸测定的检测需要。

表 3 实际样品结果
Table 3 Results of practical samples

样品	原料	总氨基酸含量
某氨基酸口服液 A	单体氨基酸	6.50 mg/mL
某氨基酸口服液 B		5.89 mg/mL
某氨基酸口服液 C		3.41 mg/mL
某氨基酸口服液 D		3.30 mg/mL
某氨基酸口服液 E		4.48 mg/mL
某氨基酸口服液 F		4.44 mg/mL
某氨基酸口服液 G		7.83 mg/mL
某氨基酸口服液 H		8.03 mg/mL
某乌鸡口服液 A	蛋白质	1.68 mg/mL
某乌鸡口服液 B		1.63 mg/mL
某大豆乳清蛋白粉		685 mg/g

4 结 论

本研究优化了 GB/T 5009.124-2003 的前处理方法,样

品经稀释或置于顶空瓶中直接酸水解;并使用 OPA/FMOC 柱前衍生-高效液相色谱法测定保健食品中 16 种氨基酸,方法操作简便,灵敏度高,准确性好,便于一线实验室对保健食品的检测,可为保健食品中氨基酸测定的国家标准方法的修订提供参考。

参考文献

[1] 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].

[2] 王玉红, 申克宇, 李鹏, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法直接检测 20 种未衍生基本氨基酸[J]. 色谱, 2011, 29(9): 908-911.
Wang YH, Shen KY, Li P, et al. Simultaneous determination of 20 underivatized amino acids by high performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(9): 908-911.

[3] 李玉珍, 聂舟, 吴韶敏, 等. 亲水作用色谱-蒸发光散射检测保健食品中三种支链氨基酸的含量[J]. 分析科学学报, 2014, 30(4): 537-540.
Li YZ, Nie Z, Wu SM, et al. Determination of branched chain amino acid in health foods by hydrophilic interaction chromatography-evaporative light scattering detection [J]. J Anal Sci, 2014, 30(4): 537-540.

[4] 李鹏飞, 陶蓓蓓, 张绪得, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定人体内 30 种氨基酸[J]. 分析化学, 2013, 41(9): 1347-1352.
Li PF, Tao BB, Zhang XD, et al. High-flux detection of 30 kinds amino acids with isotope-labeled internal standard by LC-MS/MS [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(9): 1347-1352.

[5] 郑重, 孙琦, 石永伟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法直接定量分析植物酵素中多种氨基酸成分[J]. 色谱, 2015, 33(3): 309-313.
Zheng Z, Sun Q, Shi YW, et al. Direct quantitative analysis of amino acids in fermented beverage of plant extract using high performance liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(3): 309–313.
- [6] 杨文潮, 杨洁, 段金殿, 等. 南五味子中氨基酸类成分分析评价 [J]. *中药材*, 2016, 39(2): 342–347.
- Yang WC, Yang J, Duan JA, *et al*. Amino acid composition analysis and evaluation in kadsura [J]. *J Chin Med Mater*, 2016, 39(2): 342–347.
- [7] 包国良, 王茵. 螺旋藻中氨基酸含量水平测定及其营养保健价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(7): 1571–1575.
- Bao GL, Wang Y. Study on amino acids level in spirulina and its health-care functions [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2012, 22(7): 1571–1575.
- [8] 籍学伟, 高文军, 肖云峰, 等. 蒙药野兔心中 17 种氨基酸的含量测定 [J]. *中药材*, 2016, 39(3): 579–581.
- Ji XW, Gao WJ, Xiao YF, *et al*. Determination of 17 kinds of amino acid content in Mongolian rabbits [J]. *J Chin Med Mater*, 2016, 39(3): 579–581.
- [9] 付迪, 沈艳红, 宛燕飞, 等. OPA-FMOC 在线柱前衍生化 HPLC 法测定甘露聚糖肽中氨基酸组成及含量 [J]. *分析实验室*, 2016, 35(3): 353–356.
- Fu D, Shen YH, Wan YF, *et al*. Determination of amino acids in mannate by online pre-column OPA-FMOC derivatization HPLC [J]. *Chin J Anal Lab*, 2016, 35(3): 353–356.
- [10] 陈萍红, 王书芳, 田守生, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定阿胶中 13 种氨基酸[J]. *中草药*, 2013, 43(14): 1995–1999.
- Chen PH, Wang SF, Tian SS, *et al*. Determination of 13 amino acids in Asini Corii Colla by RP-HPLC with precolumn derivatization [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2013, 43(14): 1995–1999.
- [11] 黄丽丹, 邢亚东, 王玲玲, 等. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生化 HPLC 法测定保健食品中牛磺酸含量[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(1): 171–175.
- Huang LD, Xing YD, Wang LL, *et al*. Determination of taurine in health food by RP-HPLC with pre-column derivatization [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(1): 171–175.
- [12] 孙言春, 许宪祝, 徐衍岭, 等. 柱前衍生-超高效液相色谱法测定鱼卵中的 17 种氨基酸[J]. *色谱*, 2013, 31(3): 275–280.
- Sun YC, Xu XZ, Xu YL, *et al*. Determination of 17 amino acids in fish eggs by ultra performance liquid chromatography coupled with precolumn derivatization [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(3): 275–280.
- [13] 周虹, 毛建霏, 罗玲, 等. 微波碱水解法测定农产品中色氨酸含量[J]. *食品与发酵科技*, 2014, 50(3): 79–81.
- Zhou H, Mao JF, Luo L, *et al*. Determination of tryptophane in agro-products via microwave alkaline hydrolysis [J]. *Food Ferment Technol*, 2014, 50(3): 79–81.
- [14] 李煜, 金瓯, 郑国钢, 等. 氨基酸分析仪法(过甲酸氧化)测定复方氨基酸注射液(18AA)中胱氨酸的含量[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(7): 871–874.
- Li Y, Jin O, Zheng GG, *et al*. Determination of the content of cystine in compound amino acids injection(18AA) with performic acid oxidation by amino acid analyzer [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2014, 31(7): 871–874.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介

孙 健, 药师, 主要研究方向为中药和保健食品质量与安全检测。
E-mail: sunjian_0000@163.com

季 申, 主任药师, 主要研究方向为中药、天然药物及保健食品和有害残留物的质量标准研究。
E-mail: jishen2013@163.com