

# 高效液相色谱法测定保健食品中 丙氨酰-酪氨酸的含量

陈彩云, 魏鲜娥\*, 林丽, 黎小兰, 刘光兰, 陈宏璧

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要: 目的** 建立高效液相色谱法测定保健食品中丙氨酰-酪氨酸含量的分析方法。**方法** 样品经一级水超声提取, 采用 Agilent C<sub>18</sub> 柱(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm)进行分离, 以乙腈-水溶液为流动相进行梯度洗脱, 采用高效液相色谱法检测, 外标法定量。**结果** 很好地分离了丙氨酰-酪氨酸, 在浓度 0.01~0.05 mg/mL 之间呈现良好的线性关系, 平均回收率在 95%~105%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.0%。

**结论** 该方法准确、灵敏度高、重现性好, 适用于保健食品中丙氨酰-酪氨酸含量的测定。

**关键词:** 丙氨酰-酪氨酸; 保健食品; 高效液相色谱法

## Determination of alanyl tyrosine in health products by high performance liquid chromatography

CHEN Cai-Yun, WEI Xian-E\*, LIN Li, LI Xiao-Lan, LIU Guang-Lan, CHEN Hong-Bi

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

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of alanyl tyrosine in health products by high performance liquid chromatography. **Methods** Samples were ultrasonically extracted with Primary water solution, separated by Agilent C<sub>18</sub> column with acetonitrile-Primary water solution as the mobile phase for gradient elution, which was detected by HPLC and quantified by external standard method. **Results** Alanyl tyrosine could be separated well, it had a good linear relationship within 0.01–0.05 mg/mL range, the recovery was 95%–105%, RSD was 1.0%. **Conclusion** This method is accurate, sensitive and reproducible. It is suitable for the determination of alanyl tyrosine in health foods.

**KEY WORDS:** alanyl tyrosine; health products; high performance liquid chromatography

## 1 引言

丙氨酰-酪氨酸(alanyl tyrosine, AY)是一种丙酪二肽, 是 α-氨基酸以肽键连接在一起而形成的化合物, 它也是蛋白质水解的中间产物<sup>[1,2]</sup>。人体很多活性物质都是以肽的形式存在的。多肽具有抗菌、抗肿瘤、增强传统抗生素对耐药菌的活性、促进创伤愈合等多项生物学功能<sup>[3]</sup>。由于具有抗菌活性强、抗菌谱广、细菌不易产生耐受性等特点<sup>[4]</sup>,

预示其在医药、食品防腐、保健品及化妆品等领域具有广阔的应用前景。而目前国标、药典或者其他文献上都没有方法检测该项目, 本研究是参考其他氨基酸类样品的检测方法<sup>[5-15]</sup>, 自主研究开发的一种方法检测该项目。本研究是采用高效液相色谱法测定保健品中丙氨酰-酪氨酸的含量, 考察了玉米低聚肽粉为原料的保健品中丙氨酰-酪氨酸测定的前处理方法和液相色谱条件, 该方法具有测定快速准确、精密度高重现性好等特点, 具有选择性广、高效、

\*通讯作者: 魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 176019964@qq.com

\*Corresponding author: WEI Xian-E, By-Health Co.Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 176019964@qq.com

低耗、快速应用广泛等特点, 以期为保健品中丙氨酰-酪氨酸含量的测定提供依据, 对保健品的质量进行有效控制。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(附荧光检测器, 美国安捷伦公司); XP205 分析天平(梅特勒-托利多中国有限公司); KQ-500VDE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈(色谱纯, 德国 CNW 公司)、三氯甲烷(分析纯, 广州化学试剂厂)、丙氨酰-酪氨酸标准品(0.4964 mg/mL, 美国 Sigma 公司)、实验用水为 Milli-Q 超纯水。

样品来源: 公司自制。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相: 一级水:乙腈=95:5(V:V), 等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 5 μL。

### 2.3 样品前处理

取待测试样品, 混合均匀, 精密称取样品约 0.1 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 加入适量一级水, 置 30~35 °C 超声(功率 500 W, 频率 50 kHz)处理至提取完全(约 10 min), 冷却至室温, 再用一级水定容至刻度, 振摇 1 min, 将溶液转移至离心管, 加入 5~10 mL 三氯甲烷, 振摇 1 min, 离心, 取上清液经 0.45 μm 的滤膜过滤, 备用。

## 2.4 标准溶液的制备

### 2.4.1 标准储备液的配制

精密称取丙氨酰-酪氨酸对照品约 20 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 加适量一级水溶解并定容至刻度, 摇匀, 作储备液备用。精密量取丙氨酰-酪氨酸储备液, 用一级水配成浓度约 0.10 mg/mL 的对照品溶液。

### 2.4.2 标准工作曲线绘制

精密吸取对照品溶液分别制成 0.01408、0.02112、0.02816、0.03520、0.05280 mg/mL 的浓度(根据供试品的含量进行选定), 精密吸取以上浓度的对照品溶液及供试品溶液 30 μL, 注入高效液相色谱仪, 建立标准曲线方程。供试品色谱中应呈现与对照品色谱峰保留时间相同的色谱峰来进行定量。

## 3 结果与分析

### 3.1 色谱条件的确定

采用液相色谱法能快速检测保健品中的丙氨酰-酪氨酸, 不会因为其他因素而影响检测。用荧光检测器进行检测, 丙氨酰-酪氨酸在激发波长 210 nm 与发射波长 303 nm 处吸收峰最大, 采用一级水和乙腈按一定的比例(95:5, V:V)等度进行洗脱, 6 min 就能使样品中的丙氨酰-酪氨酸流出, 流动相的比例也能让丙氨酰-酪氨酸不受其他杂质峰的影响, 达到准确的分离和定量, 具体见图 1 和图 2。说明选择的该色谱条件适合对保健品中的丙氨酰-酪氨酸进行测定。

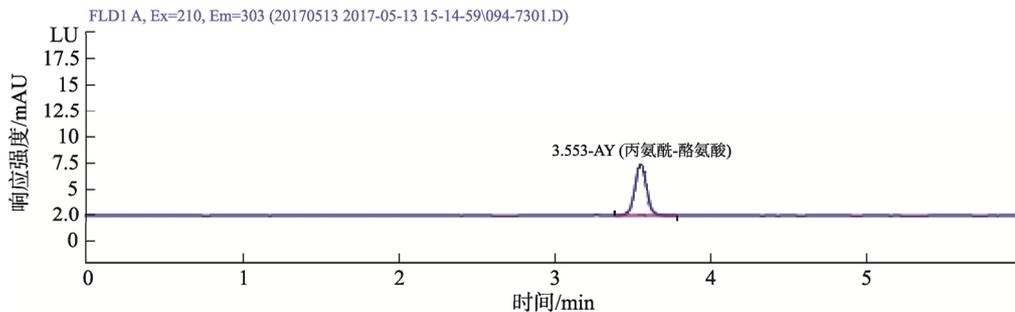


图 1 丙氨酰-酪氨酸标准品的色谱图

Fig.1 Alanyl- glutamine dipeptide standard of chromatogram map

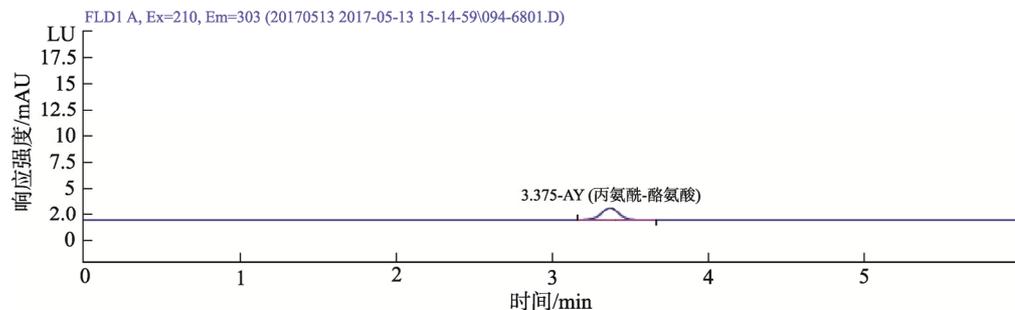


图 2 样品的色谱图

Fig.2 Chromatogram map of the sample

### 3.2 线性关系

线性实验结果如表 1 所示, 相关系数  $r^2$  为 1.0000, 所以用该方法测定 AY(丙氨酰-酪氨酸)的含量, 在浓度为 0.01~0.05 mg/mL 之间呈现良好的线性关系, 可以满足对保健品中丙氨酰-酪氨酸含量的测定。

表 1 线性实验结果  
Table 1 Linear experimental results

序号	浓度 C/(mg/mL)	AY(丙氨酰-酪氨酸)峰面积/A
1	0.01408	7.60499
2	0.02112	10.95289
3	0.02816	14.37642
4	0.03520	17.69454
5	0.05280	26.23899
线性方程		$Y=482.2X+0.804$
相关系数( $r^2$ )		1.0000

### 3.3 定量限和检出限

分析方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantity, LOQ)由信噪比(S/N)计算。LOD 定义为  $S/N=3$  时对应的待分析物浓度, LOQ 定义为  $S/N=10$  时对应的分析物浓度。当信噪比(S/N)为 3 时, AY(丙氨酰-酪氨酸)检出限为 0.02112  $\mu\text{g/mL}$ , 得到方法的检出限为 2.112  $\mu\text{g/g}$ 。以  $S/N=10$  定方法的检测浓度为 0.06336  $\mu\text{g/mL}$ , 得到方法的定量限为 6.336  $\mu\text{g/g}$ 。

### 3.4 稳定性

取 AY(丙氨酰-酪氨酸)标准品溶液分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样, 其峰面积的 RSD 为 0.80%, 说明 AY(丙氨酰-酪氨酸)标准溶液在 10 h 内较稳定, 结果见表 2。

### 3.5 精密度

精密称取样品 6 份, 按 2.4.2 试样制备方法处理样品, 检测样品含量, 计算其 RSD(%). 6 个样品的相对标准偏差

(relative standard deviation, RSD)为 1.40%, 具有良好的精密度, 结果见表 3。

表 2 稳定性实验( $n=3$ )  
Table 2 Stability test ( $n=3$ )

组分	时间/h						RSD/%
	0	2	4	6	8	10	
丙氨酰-酪氨酸	9.62629	9.75039	9.72328	9.57864	9.56565	9.6073	0.80

表 3 精密度实验( $n=3$ )  
Table 3 Precision experiment ( $n=3$ )

序号	称样量/g	浓度/(mg/mL)	含量/%	平均含量/%	RSD/%
1	0.11233	0.013425	1.2	1.2	1.9
2	0.10115	0.011904	1.18		
3	0.10432	0.012979	1.24		
4	0.10507	0.012462	1.19		
5	0.10468	0.012468	1.19		
6	0.10369	0.011957	1.15		

### 3.6 加标回收率

精密称取约 0.1 g 待测试样品 9 份, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 分成 3 组, 每组 3 份, 于每一组中分别精密加入 AY(丙氨酰-酪氨酸)标准品 3.60、4.50、5.40 mL, 加入适量一级水, 在 30~35  $^{\circ}\text{C}$  温度下超声(功率 500 W, 频率 50 kHz)处理至提取完全(约 10 min), 冷却至室温, 再用一级水定容至刻度, 振摇 1 min, 将溶液转移至离心管, 加入 5~10 mL 三氯甲烷, 振摇 1 min, 离心, 取上清液经 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 作为加标样品溶液, 按色谱条件进行检测, 结果见表 4。从表 4 中可以看出, 在不同添加水平下, 保健品中 AY(丙氨酰-酪氨酸)方法的回收率范围为 95.0%~105.0%, 平均回收率为 99.3%, 相对标准偏差(RSD)为 1.0%。说明该方法准确度较高, 适用于测定保健品中的丙氨酰-酪氨酸。

表 4 加标回收率实验( $n=3$ )  
Table 4 Standard addition recovery experiment ( $n=3$ )

序号	样品称样量/g	样品浓度/(mg/mL)	测得对照品量/(mg/100 g)	加标量/(mg/100 g)	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.10532	0.034849	1.76337	1.78704	98.67	99.3	1.0
2	0.10775	0.035080	1.78395	1.78704	99.82		
3	0.10949	0.035256	1.77377	1.78704	99.25		
4	0.10125	0.038480	2.22798	2.23380	99.73		
5	0.10074	0.038019	2.19002	2.23380	98.04		
6	0.10227	0.038274	2.19108	2.23380	98.08		
7	0.09059	0.041036	2.65420	2.68056	99.01		
8	0.09004	0.041252	2.68454	2.68056	100.14		
9	0.09206	0.041711	2.69812	2.68056	100.65		

## 4 结论与讨论

本研究是在国家标准未有方法的情况下,又在其他检测方法的基础上,确定了提取条件和色谱条件,同时优化了线性范围和检出限,来适应比样品基质复杂的保健品检测。结果表明,以一级水超声提取,以三氯甲烷去除杂质,使样品能净化完全,减少杂质干扰,保证检测结果的准确性,以一级水:乙腈=95:5(V:V)等度洗脱时,AY(丙氨酸-酪氨酸)色谱峰与样品基质峰能完全分离,峰型良好且分析时间短,能提高效率,节省流动相成本。本文通过高效液相色谱法对保健品中的AY(丙氨酸-酪氨酸)含量进行了测定,通过检测其线性范围,检出限,定量限,精密度,稳定性和回收率实验,结果表明该方法具有准确性好、精密度高和重现性好等优点,可用于保健品中AY(丙氨酸-酪氨酸)含量的检测,对其质量控制具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 陈宇堃, 蒋玉辉, 梁蔚阳. HPLC 法测定复方氨基酸(15)双肽(2)注射液中有关物质的含量[J]. 中国药品标准, 2019, 20(1): 25-30.  
Chen YK, Jiang YH, Liang WY. Determination of related substances in compound amino acids (15) and dipeptides (2) injection [J]. Drug Stand China, 2019, 20(1): 25-30.
- [2] 张丹, 陈红. HPLC 法测定甘氨酸-L-酪氨酸含量及有关物质[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(5): 664-666.  
Zhang D, Chen H. RP-HPLC determination of glycyl-L-tyrosine and its related substance [J]. Chin J Pharm Anal, 2006, 26(5): 664-666.
- [3] 陈宇堃, 梁蔚阳. HPLC 法测定小儿复方氨基酸注射液(19AA-I)中乙酰酪氨酸含量[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 5(35): 166-168.  
Chen YK, Liang WY. Determination of content of acetyl tyrosine in pediatric compound amino acid injection (19AA-I) by HPLC [J]. Chin J Biochem Pharm, 2015, 5(35): 166-168.
- [4] 邢健, 李巧玲, 耿涛华, 等. 氨基酸分析方法的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2012, 1(5): 187-191.  
Xing J, Li QL, Geng TH, et al. Research development for amino acid analysis and determination [J]. Chin Food Addit, 2012, 1(5): 187-191.
- [5] 支小平, 崔盼盼, 柳英霞. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定人体尿液中的酪氨酸和色氨酸[J]. 南昌大学学报, 2016, 40(4): 341-345.  
Zhi XP, Cui PP, Liu YX. Simultaneous determination of tyrosine and tryptophan in human urine by HPLC-MS/MS [J]. J Nanchang Univ, 2016, 40(4): 341-345.
- [6] 朱珍, 朱俊霖, 庄松娟, 等. 高效液相色谱法检测电子束辐照水产品中的游离邻酪氨酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4): 1446-1451.  
Zhu Z, Zhu JL, Zhuang SJ, et al. Detection of dissociative o-tyrosine in electron beam irradiated seafood by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(4): 1446-1451.
- [7] 潘海亮, 李贵伶, 王灿, 等. 基于乙醇预处理的发酵液中丙氨酸 RP-HPLC 检测方法[J]. 生物资源, 2018, 40(6): 530-535.  
Pan HL, Li GL, Wang C, et al. Detection of alanine by RP-HPLC in fermentation broth based on ethanol pretreatment [J]. Biolog Res, 2018, 40(6): 530-535.
- [8] 徐豪杰, 高山, 任艳丽, 等. 酪氨酸对映体的柱前手性衍生高效液相色谱-化学发光联用法研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(11): 1994-1999.  
Xu HJ, Gao S, Ren YL, et al. Determination of tyrosine enantiomers by HPLC-CL with precolumn chiral derivatization [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(11): 1994-1999.
- [9] Nalewajko SE, Malejko J, Mozolewski AM, et al. Determination of polyphenolic compounds in *Cirsium palustre* L. extracts by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection [J]. Talanta, 2015, 133: 38.
- [10] 付刚, 付相敏, 刘寒, 等. 大肠杆菌 JH-B2 产 L-丙氨酸发酵工艺的研究[J]. 湖北工业大学学报, 2017, 32(1): 116-120.  
Fu G, Fu XM, Liu Z, et al. Research on L-alanine fermentation by *Escherichia coli* JH-B2 [J]. J Hubei Univ Technol, 2017, 32(1): 116-120.
- [11] 袁慰, 王永秋. HPLC 法测定 L-丙氨酸甲酯盐酸盐中 L-丙氨酸含量[J]. 化学工程师, 2014, 28(2): 17-18.  
Yuan W, Wang YQ. Determination of L-alanine in L-alanine methyl esterhydrochloride by HPLC [J]. Chem Eng, 2014, 28(2): 17-18.
- [12] 任向楠, 萌士安, 杨晓光, 等. 人乳中氨基酸的含量及分析方法研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(3): 63-67.  
Ren XN, Meng SA, Yang XG, et al. Progress on contents and analytical of amino acids in human milk [J]. Amino Acids Biotic Res, 2013, 35(3): 63-67.
- [13] 杜颖颖, 刘相真, 叶美君, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中游离氨基酸成分[J]. 色谱, 2019, 37(6): 597-604.  
DU YY, LIU XZ, YE MJ, et al. Detection of free aminoacids in tea using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(6): 597-604.
- [14] 苏慧, 周鑫悦, 陈莉, 等. 反向胶束电动毛细管色谱-直接紫外检测法测定康复新液中氨基酸[J]. 分析科学学报, 2019, 35(1): 90-94.  
SU H, Zhou XY, Chen L, et al. Detection of amino acids in kangfuxin liquid by reverse micellar electrokinetic capillary chromatography-direct UV detection [J]. J Anal Sci, 2019, 35(1): 90-94.
- [15] 贾载凯, 毛新刚, 苏晓岚, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定中韩泡菜中氨基酸的含量[J]. 农产品加工, 2019, 10: 47-50.  
Jia ZK, Mao XG, Su XL, et al. Determination of amino acids in Chinese and Korean pickles by pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. Farm Prod Process, 2019, 10: 47-50.

(责任编辑: 于梦娇)

## 作者简介



陈彩云, 初级药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。  
E-mail: 504990659@qq.com

魏鲜娥, 主要研究方向为保健食品的质量检测。  
E-mail: 176019964@qq.com