邻苯二甲醛柱前衍生化时间对反相高效液相色谱法测定稻米氨基酸含量的影响

齐 麟, 张长波*, 刘仲齐

(农业农村部产地环境污染防控重点实验室, 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘 要: 目的 确定反相高效液相色谱法(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定稻米氨基酸含量最适柱前衍生化时间。**方法** 以氨基酸标准品以及稻米氨基酸提取物为对象, 对柱前衍生化时间与氨基酸检测结果之间的关系进行研究。**结果** 邻苯二甲醛(O-phthalaldehyde, OPA)和 3-巯基丙酸与氨基酸的衍生化反应进行到 15 min 时, 氨基酸的峰面积达到最大值, 不同 OPA-氨基酸衍生化产物的稳定性存在很大的差异。在 15~300 min 的衍生化反应中, 酪氨酸和苯丙氨酸衍生物的峰面积保持在非常稳定的水平上; 而侧链含有羟基的丝氨酸和苏氨酸对衍生化时间特别敏感, 衍生化时间超过 15 min 后, 其衍生物的峰面积开始快速下降; 当衍生化时间在 15~60 min 之内时, 15 种氨基酸中, 只有酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和丙氨酸 9 种氨基酸的衍生物峰的面积下降幅度小于 5%。**结论** 柱前衍生化时间对稻米氨基酸衍生物峰面积的检测值较为敏感, 衍生化时间控制在 15 min 之内能有效减小实验误差。

关键词: 反相高效液相色谱法; 稻米; 氨基酸; 邻苯二甲醛; 柱前衍生

Effects of pre-column derivatization time of O-phthalaldehyde on determination of amino acids content in rice by reversed-phase high performance liquid chromatography

QI Lin, ZHANG Chang-Bo*, LIU Zhong-Qi

(*Key Laboratory of Original Agro-environmental Pollution Prevention and Control*, *Agro-environmental Protection Institute*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Tianjin* 300191, *China*)

ABSTRACT: Objective To determine the optimum pre-column derivatization time for the determination of amino acids content in rice by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). **Methods** The relationship between pre-column derivatization times and amino acid detection results was studied based on amino acid standard liquid and amino acid extractives from rice. **Results** When the derivatization reaction was carried out with O-phthalaldehyde (OPA), 3-mercaptopropionic acid and amino acids, the peak area of derivatives reached the maximum when the derivatization time was at 15 min. However, there were great differences in the stability of derivatives from different OPA-amino acids derivatives. When the derivatization reaction was in the range of 15–300 min, the peak areas

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0801100)、中国农科院科技创新工程项目(CAAS-XTCX2016018)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0801100), and the Funds for Science and Technology Innovation Project from the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-XTCX2016018)

***通信作者:** 张长波, 博士, 副研究员, 主要研究方向为环境污染与重金属生态毒理。E-mail: zhchb1976@163.com

***Corresponding author:** ZHANG Chang-Bo, Ph.D, Associate Professor, Key Laboratory of Original Agro-environmental Pollution Prevention and Control, Agro-environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China. E-mail: zhchb1976@163.com

of derivatives from tyrosine and phenylalanine remained at a very stable level. Nevertheless, the derivatives from serine and threonine with hydroxyl groups in the side chain were particularly sensitive to the derivatization time, after the derivatization time exceeded 15 min, the peak areas of derivatives began to decrease rapidly; when the derivatization time was within 15–60 min, among the 15 amino acids, the peak areas of derivatives from 9 kinds of amino acids including tyrosine, phenylalanine, arginine, glutamate, aspartic acid, lysine, leucine, isoleucine and alanine decreased by less than 5%. **Conclusion** The detection values of peak areas from amino acid derivatives from rice are sensitive to the pre-column derivatization time, and controlling the derivatization time within 15 min can effectively reduce the experimental errors.

KEY WORDS: reversed-phase high performance liquid chromatography; rice; amino acids; O-phthalaldehyde; pre-column derivatization

0 引 言

水稻是我国的主要粮食作物，也是畜牧业和食品加工等行业的主要原料。虽然稻米中的蛋白质组分只占6.70%~8.58%，但水稻蛋白质的消化率为 61.68%~93.80%，易于被人体消化吸收，其氨基酸组成比较平衡，赖氨酸、苏氨酸等几种必需氨基酸含量较高，直接关系到以大米为主食的人群蛋白质摄入量和健康水平[1−3]。因此，准确测定稻米中氨基酸的组成及其含量，对于保障食品安全及指导健康饮食有着十分重要的意义。

稻米等植物样品中氨基酸的分析主要由 3 个过程组成：样品前处理、多肽的水解、氨基酸检测。氨基酸的分析方法多样，其中柱前衍生高效液相色谱法是比较常见的一种方法[4−5]。大多数的氨基酸无紫外吸收也无荧光发射特性，为提高分析检测的灵敏度和分离选择特性，常常需要将氨基酸进行衍生化[4,6]。氨基酸的衍生化方式有柱前衍生和柱后衍生两种。常用衍生化试剂有茚三酮、邻苯二甲醛(O-phthalaldehyde, OPA)和氯甲酸芴基甲酯(fluorenylmethyloxycarbonyl, FMOC)等。当前检测中以氨基酸与 OPA、硫醇化物(巯基乙醇或巯基丙酸等)组成的柱前衍生化方式最为常见[7-9]。与柱后衍生-阳离子交换色谱法相比，柱前衍生反相高效液相色谱法具有分析时间短、准确性好、灵敏度高、适用范围广等优点[4,10−12]，已成为一种较为理想的氨基酸测定方法。

完成柱前衍生的样本，其中所含的多种氨基酸在 20 min 内即可由高效液相色谱法进行分离，经过荧光检测器或者紫外检测器获得出峰信号后，根据标准曲线就能计算出待测样品中各种氨基酸的含量。利用衍生剂进行的衍生反应，可以通过自动与手动两种方式进行。由于氨基酸-OPA 衍生物的稳定性较低，自动在线衍生化具有较高的实验精度，可以避免人为操作导致的实验误差，测量效率比较高[13−14]。但受实验室条件、样本量及人员需求的影响，实际实验中无法完全保障在线衍生、即时检测的要求。因此，柱前手动衍生是许多实验室常用的方法之一。手动衍生化时，衍生化时间控制在哪种范围才不会影响氨基酸-OPA 衍生物的稳定性，鲜见相关研究报道。因此，本研究以衍生化时间为变量，以氨基酸衍生化产物谱峰面积的变化为依据，对柱前衍生化反相高效液相色谱法(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定氨基酸含量的最适衍生化时间进行了比较和分析，确定了人工柱前衍生化操作中合理的衍生化时间范围，为减小高效液相色谱法测定稻米中氨基酸结果的实验误差、提高工作效率提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HPLC1200 高效液相色谱仪、AdvanceBio AAA 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)(美国安捷伦科技有限公司)；Milli-Q 超纯水制备系统(美国 Millipore 公司)；MTN-2800W 氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

甲醇、乙腈、Na_2HPO_4、$Na_2B_4O_7$、NaN_3[色谱纯，赛默飞世尔科技(中国)有限公司]；混合氨基酸标准品(分析纯，中国计量科学研究院)；硼酸缓冲液(pH=10.2，分析纯)、OPA 衍生化试剂(含 OPA、3-巯基丙酸和 0.4 mol/L 硼酸缓冲液)(美国安捷伦科技有限公司)；柠檬酸钠缓冲液(pH=2.4，分析纯，上海麦克林生化科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品准备

(1)氨基酸混合标准溶液配制：用定量移液器精确吸取 1 mL 氨基酸混合标准品，溶解于 9 mL 超纯水中，配制成混合标准溶液。标准溶液中天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、组氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、胱氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸含量分别为 0.136、0.150、0.103、0.161、0.119、0.178、0.090、0.174、0.233、0.111、0.142、0.160、0.130、0.130 和 0.148 mg/mL。

(2)稻米氨基酸提取：把去掉稻壳的糙米研磨至粉状，称

取样品 0.25 g 倒入 25 mL 水解管底部, 再加入 15 mL 6 mol/L 盐酸。水解管放入冰中冷冻 3~5 min, 管内充入氮气以保护反应环境、排出空气密封。最后置样品于烘箱 110 ℃水解 22 h, 取出冷却至室温。过滤后定容至 50 mL; 从中吸取 1 mL 滤液至氮吹管中, 利用氮吹仪吹干后加入 1 mL 去离子水, 再次氮吹至干燥, 加入 2 mL 柠檬酸钠缓冲液, 重悬。使用 0.22 μm 滤膜过滤进入色谱瓶保存, 待测。

1.2.2　衍生化方法

衍生化反应直接在色谱瓶的内衬管中进行。取 20 μL 氨基酸标准溶液或稻米氨基酸提取液, 加入到 50 μL 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液中(pH=10.2)。将溶液充分混合 1 min, 然后加入 10 μL OPA 衍生化试剂, 充分混合 1 min 得到衍生物, 此刻作为起点时间。内衬管中的衍生物分别静置 3~588 min 后, 吸取 20 μL 样品注入 HPLC 系统中, 在 338 nm 波长处检测紫外光强度。静置时间(3~588 min)+最长出峰时间(12 min)作为衍生化时间的统计值(15~600 min)。氨基酸-OPA 衍生物的形成过程如图 1 所示。

1.2.3　仪器条件

色谱柱: AdvanceBio AAA 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相 A: 10 mmol/L Na_2HPO_4+10 mmol/L $Na_2B_4O_7$+0.5 mmol/L NaN_3; 流动相 B: 乙腈:甲醇:水(45:45:10, *V*:*V*:*V*)。

1.2.4　检测方法

所有流动相溶剂均经由真空抽滤过滤(0.22 μm), 并使用超声仪进行除气。衍生后的氨基酸通过 AdvanceBio AAA 色谱柱, 在柱温 40 ℃、流动相流速为 1 mL/min 的条件下进行分离, 利用二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)紫外检测器进行检测。

1.2.5　数据处理

本研究中所有数据均使用软件 Office 2010 分析得到。

2　结果与分析

2.1　衍生化时间对氨基酸标准品出峰时间的影响

衍生化时间在 15~600 min 的范围内, 同一种氨基酸衍生物的出峰时间并无明显的变化, 但不同种类的氨基酸-OPA 衍生化产物, 其出峰时间有明显的差异(图 2), 其中天冬氨酸和谷氨酸出峰时间最早, 其次是丝氨酸、组氨酸、苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、酪氨酸、胱氨酸; 然后是缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和赖氨酸。

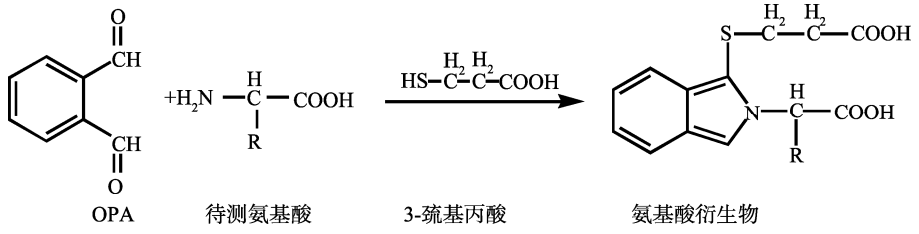

图 1　OPA 和氨基酸进行衍生化反应的示意图

Fig.1　Schematic diagram of OPA derivatization reaction with amino acids

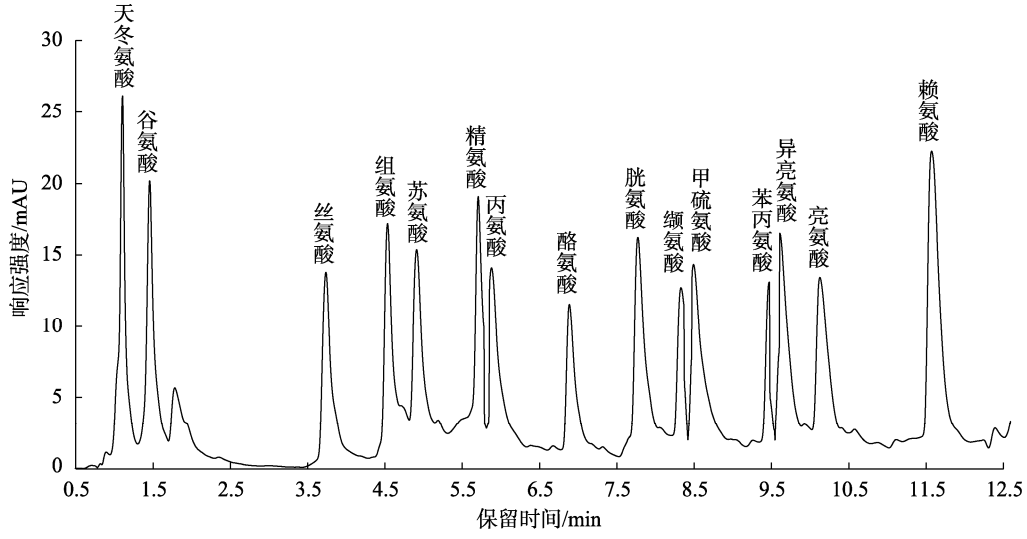

图 2　氨基酸标样溶液中各种氨基酸的色谱图

Fig.2　Chromatographic diagrams of standard amino acid samples

2.2 衍生化时间对氨基酸标准品峰面积的影响

衍生化时间对氨基酸-OPA 衍生物的有效浓度起着关键作用, 本研究的衍生化时间设定在 15~600 min 的范围内。结果表明, 衍生化时间为 15 min 时, 所有氨基酸衍生物的峰面积表现为最大值, 随着衍生化时间的延长, 氨基酸衍生物的峰面积呈下降趋势, 下降的幅度在氨基酸间有显著差异。其中丝氨酸对衍生化时间非常敏感, 超过 15 min 之后, 其峰面积持续下降; 赖氨酸和丙氨酸的衍生化时间分别为 15~60、15~120 min 时, 其峰面积没有明显变化(图 3A)。其余氨基酸对衍生化时间的长短不太敏感, 如苏氨酸、胱氨酸和缬氨酸的衍生化时间在 15~150 min 内时, 它们的峰面积没有明显变化(图 3B); 组氨酸、精氨酸、酪氨酸以及苯丙氨酸的适宜衍生化时间范围更加宽广, 只有当衍生化时间超过 300 min 后其峰面积才开始急剧下降(图 3C); 有 5 种氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)的衍生化产物非常稳定, 衍生化时间超过 540 min 后峰面积才出现明显的下降(图 3D)。这些结果表明, OPA 与天冬氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、组氨酸、精氨酸、酪氨酸以及苯丙氨酸的衍生产物较为稳定, 与丝氨酸、赖氨酸、丙氨酸、苏氨酸、胱氨酸和缬氨酸的衍生产物稳定性较差。

2.3 衍生化时间对稻米氨基酸样品峰面积的影响

和氨基酸标准液相比, 稻米氨基酸提取液中各种氨基酸的浓度差别更大。本研究以来自同一水稻品种但氨基酸含量有明显差异的 2 份样品为对象, 对衍生化时间在 15~300 min 范围内的氨基酸峰面积检出值进行了持续监测。结果发现, 稻米氨基酸的峰面积对衍生化时间的长短更加敏感, 除赖氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸外, 其他 12 种氨基酸的峰面积在衍生化时间为 15 min 时表现为最大值; 随着衍生化时间的延长, 氨基酸衍生物的峰面积呈下降趋势。衍生化时间超过 60 min 时, 丝氨酸、赖氨酸、丙氨酸、胱氨酸和缬氨酸的峰面积急剧下降(图 4A、B)。其他氨基酸如天冬氨酸、谷氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、亮氨酸和精氨酸的峰面积比较稳定, 衍生化时间在 15~180 min 的范围内时, 它们的峰面积下降幅度小于 10%(图 4C、D、E); 而异亮氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的峰面积几乎不受衍生化时间的影响(图 4F)。这些结果表明, OPA 与稻米提取液中的异亮氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸形成的衍生产物较为稳定, 与其他氨基酸形成的衍生产物稳定性较差。虽然大多数氨基酸的峰面积在 2 个样品间有明显差异, 但 2 个样品峰面积随衍生化时间延长而下降的趋势几乎完全一致, 说明稻米中氨基酸含量的高低对衍生产物的稳定性没有明显影响。

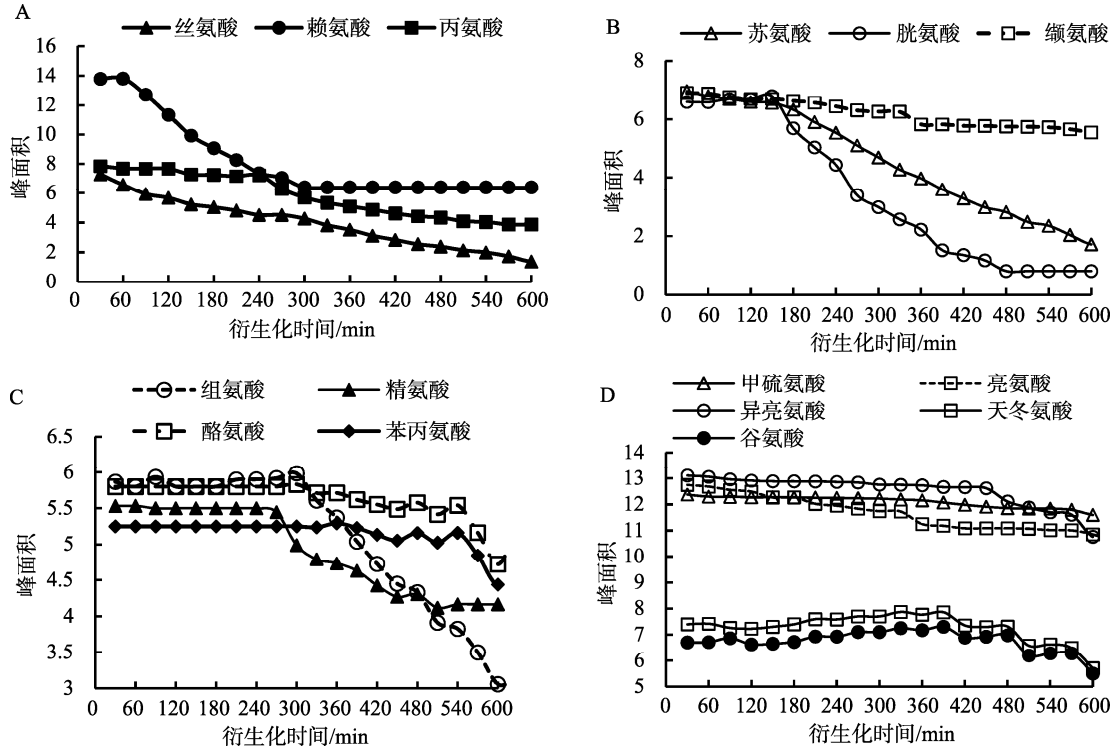

图 3 衍生化时间对标准液中氨基酸-OPA 衍生物吸收峰面积的影响

Fig.3 Effects of derivatization times on the absorption peak areas of amino acid-OPA derivatives in standard liquid

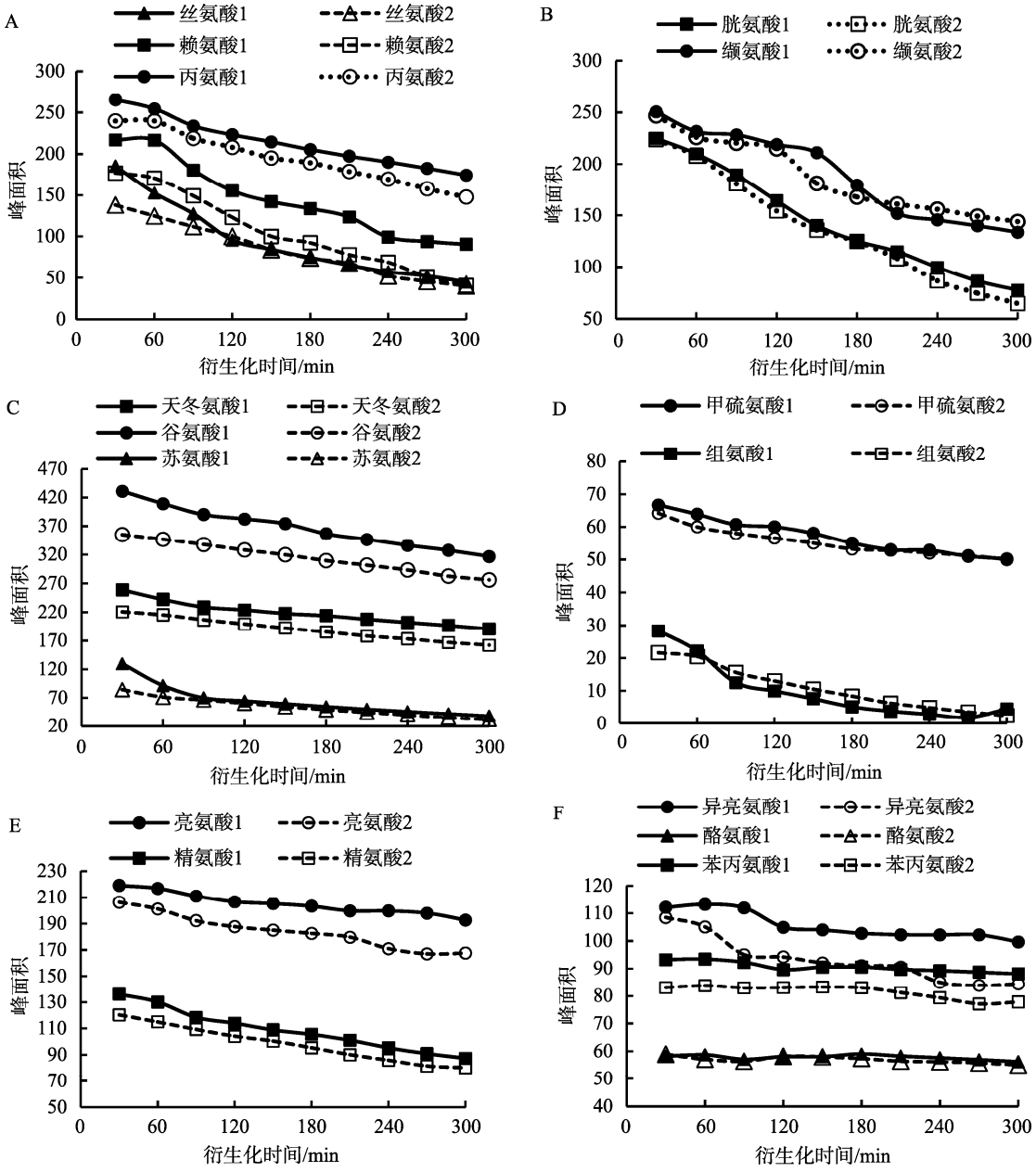

图 4　衍生化时间对稻米氨基酸提取液中氨基酸-OPA 衍生物吸收峰面积的影响

Fig.4　Effects of derivatization times on the absorption peak areas of amino acid-OPA derivatives in amino acid extracts from rice

2.4　衍生化时间对氨基酸样品峰面积下降幅度的影响

以衍生化 15 min 测得的氨基酸峰面积为对照, 比较衍生化时间为 60、120 和 240 min 时的氨基酸峰面积, 发现标准品氨基酸峰面积随衍生化时间延长而下降的幅度明显小于稻米氨基酸样品。当衍生化时间延长到 60 min 时, 标准品中只有丝氨酸的峰面积下降幅度为 9.8%, 其他氨基酸的峰面积下降幅度都小于 5%; 而此时稻米样品中酪氨酸、苯丙氨酸、精氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和丙氨酸 9 种氨基酸的峰面积下降幅度小于 5%。当衍生化时间延长到 120 min 时, 标准品中只有丝氨酸、赖氨酸和苏氨酸的峰面积下降幅度超过了 5%, 其余 12 种氨基酸的峰面积下降幅度依然小于 5%; 而此时稻米样品中只有酪氨酸和苯丙氨酸的峰面积下降幅度小于 5%, 谷氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的峰面积下降幅度为 8.2%~9.7%, 其余 11 种氨基酸的峰面积下降幅度都超过了 10%。当衍生化时间延长到 240 min 时, 标准品中仍有 8 种氨基酸的峰面积下降幅度依然小于 5%, 而此时稻米样品中只有酪氨酸和苯丙氨酸的峰面积下降幅度小于 5%, 其余 13 种氨基酸的峰面积下降幅度都超过了 10%(表 1)。

从 15 种氨基酸峰面积的下降幅度平均值来看，随着衍生化时间的延长，氨基酸峰面积的下降速率明显加快，稻米氨基酸样品的峰面积下降幅度明显大于标准品。当衍生化时间延长到 60 min 时，氨基酸标准品的峰面积和稻米氨基酸峰面积只相差 6.2%，但当衍生化时间延长到 120 min 和 240 min 时，它们之间的峰面积分别相差 18.4% 和 28.4%。这些结果说明，氨基酸峰面积的稳定性既受氨基酸种类的影响，也受氨基酸提取液中其他成分的影响。只有少数氨基酸(如酪氨酸和苯丙氨酸)的峰面积比较稳定，受衍生化时间和提取液背景的影响较小。

表 1 柱前衍生化时间对氨基酸衍生物峰面积下降幅度的影响

Table 1 Effects of pre-column derivatization times on the decrease percentage of absorption peak areas of amino acid-OPA derivatives

	标准品(d1)/%			稻米样品(d2)/%			差值(d1-d2)/%		
	60 min	120 min	240 min	60 min	120 min	240 min	60 min	120 min	240 min
酪氨酸	0.0	0.0	0.0	–0.8	–0.5	–2.7	0.8	0.5	2.7
苯丙氨酸	0.0	0.0	0.0	–0.2	–1.7	–3.6	0.2	1.7	3.6
精氨酸	0.0	–0.6	–0.6	–4.0	–13.0	–28.3	4.0	12.5	27.7
谷氨酸	0.2	–1.1	3.3	–3.0	–8.2	–18.2	3.2	7.1	21.6
天冬氨酸	0.3	–2.3	2.5	–3.9	–10.7	–20.9	4.2	8.4	23.4
赖氨酸	–0.2	–17.8	–46.6	–1.8	–29.4	–57.7	1.7	11.6	11.1
异亮氨酸	–0.3	–1.5	–1.9	–1.1	–9.7	–19.2	0.8	8.2	17.4
亮氨酸	–0.5	–2.0	–6.3	–2.5	–9.3	–17.4	2.0	7.3	11.1
胱氨酸	–0.1	1.5	–32.7	–6.9	–29.0	–58.5	6.8	30.5	25.8
缬氨酸	–0.3	–3.0	–6.7	–8.0	–12.8	–39.3	7.7	9.8	32.6
甲硫氨酸	–0.6	–0.8	–1.0	–8.0	–12.2	–23.7	7.4	11.4	22.7
组氨酸	–1.1	2.3	0.6	–16.8	–51.9	–81.4	15.6	54.2	82.0
丙氨酸	–2.1	–2.4	–8.0	–2.1	–14.6	–28.9	–0.1	12.2	20.9
苏氨酸	–2.5	–5.3	–20.6	–21.2	–38.8	–58.5	18.7	33.5	37.9
丝氨酸	–9.8	–22.0	–38.0	–13.6	–38.0	–65.7	3.8	16.0	27.7
平均值	–1.6	–4.9	–14.4	–7.8	–23.3	–42.8	6.2	18.4	28.4

3 结论与讨论

氨基酸不具有吸光基团，但能与 OPA 和巯基丙酸反应，生成带苯环的氨基酸，就能用紫外检测器进行检测[13–14]。带苯环氨基酸衍生物的生成数量，既受氨基酸浓度的影响，也受衍生化时间的影响。本研究发现，无论是氨基酸标准品还是稻米氨基酸提取液，其中酪氨酸和苯丙氨酸衍生物的峰面积几乎不受衍生化时间的影响，在 15~300 min 的衍生化反应中，其峰面积只受样品中酪氨酸和苯丙氨酸浓度的影响。这可能是因为同属芳香族氨基酸的酪氨酸和苯丙氨酸本身具有苯环，与 OPA 和巯基丙酸的反应效率较高，能在短时间内形成大量带苯环的衍生物，衍生物的数量不受底物浓度和反应时间的限制，因而表现出很强的稳定性。

氨基酸的衍生化反应需要在碱性环境下进行，本研究用 0.4 mol/L 硼酸缓冲液(pH=10.2)来提供碱性环境。但是，氨基酸所带的侧链基团对其本身的 pH 和吸收峰有明显影响[15–18]。本研究发现，侧链含有羟基的脂肪族氨基酸丝氨酸和苏氨酸对衍生化时间特别敏感，衍生化时间为 15 min 时，其峰面积达到最大值，接着峰面积开始快速下降。这说明氨基酸本身的羟基基团会影响其与 OPA 进行衍生化反应的效率，从而影响衍生化产物的数量和稳

定性。

稻米中含量最高的氨基酸为谷氨酸, 含量最低的氨基酸为半胱氨酸或组氨酸[19–20]。本研究发现, 衍生化时间为 15~60 min 时, 稻米中含量较高的氨基酸的峰面积比较稳定, 峰面积下降幅度较大的几种氨基酸(如胱氨酸、甲硫氨酸、组氨酸等)都是含量较低的氨基酸。因此, 当研究对象为含量较低的氨基酸或是含有羟基的脂肪族氨基酸时, 衍生化时间应严格控制在 15 min 以内, 以保证这类氨基酸峰面积的稳定。

参考文献

[1] CAO FB, FU MM, WANG RF, *et al*. Genotypic-dependent effects of N fertilizer, glutathione, silicon, zinc, and selenium on proteomic profiles, amino acid contents, and quality of rice genotypes with contrasting grain Cd accumulation [J]. Funct Integr Genomics, 2017, 17: 389–397.

[2] PENG B, KONG HL, LI YB, *et al*. *OsAAp6* functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4847.

[3] PENG B, SUN YF, KONG DY, *et al*. Genetic analysis and improvement strategies of protein content in rice seeds [J]. Agric Biotechnol, 2017, 6(4): 10–14.

[4] 丁松, 黄和, 胡燚. 氨基酸分析研究进展[J]. 生物加工过程, 2018, 16(3): 12–21.
DING S, HUANG H, HU Y. Research progress on amino acids analysis [J]. Chin J Bioproc Eng, 2018, 16(3): 12–21.

[5] 龚天理, 刘付芳, 王卫, 等. 食品中氨基酸测试的发展[J]. 中国标准化, 2018, 1: 154–157.
GONG TL, LIU FF, WANG W, *et al*. Research on the development of amino acid testing in food [J]. Chin Stand, 2018, 1: 154–157.

[6] 宋志峰, 王丽, 纪锋, 等. 氨基酸分析中的柱前衍生技术[J]. 吉林农业科学, 2004, 29(6): 54–58.
SONG ZF, WANG L, JI F, *et al*. Techniques of pre-column derivatization in amino acid analysis [J]. J Jilin Agric Sci, 2004, 29(6): 54–58.

[7] 曹静亚, 张丽先, 范毅, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定绞股蓝茶叶中 17 种游离氨基酸含量[J]. 氨基酸和生物资源, 2016, 3: 16–20.
CAO JY, ZHANG LX, FAN Y, *et al*. Determination of 17 kinds of free amino acids in gynostemma pentaphyllum tea by RP-HPLC [J]. Amino Acids Biotic Res, 2016, 3: 16–20.

[8] 赵岩, 赵天琦, 陆珞, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定狭叶红景天中氨基酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 1993–1998.
ZHAO Y, ZHAO TQ, LU L, *et al*. Determination of amino acid content in *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim by pre-column derivatization reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(6): 1993–1998.

[9] 淳泽利, 陈荣祥, 保玉心. OPA 柱前衍生反相高效液相色谱法测定野木瓜发酵饮料中的游离氨基酸[J]. 现代农业科技, 2019, 4: 217–221.
CHUN ZL, CHEN RX, BAO YX. Determination of free amino acids in Chaenomeles cathayensis fermented drinks using RP-HPLC coupled with O-phthalaldehyde pre-column derivation [J]. Mod Agric Sci Technol, 2019, 4: 217–221.

[10] 卢彬, 付铭, 范蕊, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定新疆特色食品馕中氨基酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 713–720.
LU B, FU M, FAN R, *et al*. Determination of amino acids in Xinjiang special food Nang by reversed-phase high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(2): 713–720.

[11] 姬厚伟, 张丽, 王芳, 等. 植物中游离氨基酸的分析方法[J]. 理化检验(化学分册), 2016, 52(1): 119–124.
JI HW, ZHANG L, WANG F, *et al*. Analysis methods of free amino acids in plants [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2016, 52(1): 119–124.

[12] 李灿明, 柏建国, 刘桂果, 等. 邻苯二甲醛柱前在线衍生反相高效液相色谱法测定功能饮料中赖氨酸的含量[J]. 化学分析计量, 2017, 26(5): 85–88.
LI CM, BAI JG, LIU GG, *et al*. Determination of lysine in functional beverage by reversed-phase high performance liquid chromatography with O-phthalaldehyde online pre-column derivatization [J]. Chem Anal Meter, 2017, 26(5): 85–88.

[13] 何继杰, 张晓凤, 钱莉莉, 等. 痕量氨基酸分析方法研究进展[J]. 分析科学学报, 2019, 35(4): 507–513.
HE JJ, ZHANG XF, QIAN LL, *et al*. Recent progress on analysis of trace amino acids [J]. J Anal Sci, 2019, 35(4): 507–513.

[14] 贾铮, 李兰, 赵根龙, 等. 饲料中氨基酸分析技术研究进展[J]. 农产品质量与安全, 2017, 6: 53–60.
JIA Z, LI L, ZHAO GL, *et al*. Analytical techniques on amino acid in feed: A review [J]. Qual Saf Agro-prod, 2017, 6: 53–60.

[15] 陶琳丽, 黄伟, 杨秀娟, 等. 20 种氨基酸近红外光谱及其分子结构的相关性[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(9): 2766–2773.
TAO LL, HUANG W, YANG XJ, *et al*. Correlations between near infrared spectra and molecular structures of 20 standard amino acids [J]. Spectrosc Spect Anal, 2016, 36(9): 2766–2773.

[16] 李艳. 优化 HPLC 测定黑皮鸡枞菌中氨基酸含量样品处理的条件[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(19): 147–152.
LI Y. Optimization conditions of processed sample for the determination of amino acid content in *Termitomyces* Spp. by HPLC [J]. Food Res Dev, 2018, 39(19): 147–152.

[17] 李红艳, 尚才人, 沈潇冰, 等. 多因素对茶氨酸柱后衍生效率的影响及在白茶酒和茶饮料中的检测应用[J]. 食品科技, 2016, 2: 314–317.
LI HY, SHANG CR, SHEN XB, *et al*. Several factors on the influence of derived efficiency of theanine determined with post-column derivatization and the application in the determination of theanine in white tea wine & tea beverages [J]. Food Sci Technol, 2016, 2: 314–317.

[18] 熊南安, 董滨, 戴晓虎. 反向高效液相色谱法检测污泥中含硫氨基酸

[J]. 中国环境科学, 2017, 37(12): 4614–4619.
XIONG NAN, DONG B, DAI XH. Determination of sulfur amino acids in sludge by RP-HPLC [J]. Chin Environ Sci, 2017, 37(12): 4614–4619.

[19] YUAN K, WANG CR, ZHANG CB, *et al*. Rice grains alleviate cadmium toxicity by expending glutamate and increasing manganese in the cadmium contaminated farmland [J]. Environ Poll, 2020, 262: 114236.

[20] 王惠君, 薛卫杰, 张昕, 等. 叶面喷施苹果酸对水稻 Cd 积累特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(2): 269–278.
WANG HJ, XUE WJ, ZHANG X, *et al*. Effects of foliar application with malic acid on the accumulation of cadmium in rice [J]. J Agro-environ Sci, 2021, 40(2): 269–278.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介

齐 麟, 高级技师, 主要研究方向为环境污染物和植物代谢产物检测技术。
E-mail: m16a2343@163.com

张长波, 博士, 副研究员, 主要研究方向为环境污染与重金属生态毒理。
E-mail: zhchb1976@163.com