

毛细管电泳间接紫外检测酱油中的游离氨基酸

傅崇岗¹, 杨冬芝¹, 王立新²

(1.聊城大学化学化工学院, 山东 聊城 252059

2.聊城大学教育传播技术学院, 山东 聊城 252059)

摘 要: 以三羟甲基氨基甲烷(Tris)(pH=10.50)为缓冲液, 苯甲酸为背景吸收添加剂, 利用毛细管电泳-间接紫外检测方法分离测定了酱油中的丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸、亮氨酸、谷氨酸及天冬氨酸。在优化条件下, 上述六种氨基酸于5min内实现了基线分离, 各物质吸光度的相对标准偏差(RSD)均小于5%。线性范围为10~1000 $\mu\text{mol/L}$, 检测限(S/N=3)分别为2.0、3.5、4.0、5.0、3.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$, 六种氨基酸的加标回收率均在95.9%~104.2%范围内。

关键词: 毛细管电泳; 间接紫外检测; 氨基酸; 酱油

Improved Determination Method of Free Amino Acids in Soy Sauce by Capillary Electrophoresis with Indirect Ultraviolet Detection

FU Chong-gang¹, YANG Dong-zhi¹, WANG Li-xin²

(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

2.School of Educational Technology and Mass Medium, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract: By capillary electrophoresis with indirect ultraviolet detection, six amino acids, namely alanine, serine, valine, leucine, glutamic acid and aspartic acid were detected in Tris (pH=10.50) where benzoic acid was taken as its setting electrolyte. Under the optimum conditions, these six amino acids were well separated within 5 minutes. The relative standard deviation (RSD) of the method was better than 5%. The linear calibration range was 10~1000 $\mu\text{mol/L}$ and the detection limit were 2.0, 3.5, 4.0, 5.0, 3.5 and 5.0 $\mu\text{mol/L}$ respectively. Their recoveries were all in the range of 95.73%~104.46%.

Key words: capillary electrophoresis; indirect ultraviolet detection; amino acid; sauce

中图分类号: 0658

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0196-03

酱油是日常生活中常用的调味品之一, 国家对调味品有严格的卫生管理规定, 如铵盐不准在调味品中添加, 非食品用料“毛发水解液”不能用于制作酱油。但经典凯氏定氮法^[1]和甲醛法^[2]很难区分氨基酸态氮和铵盐态氮。茚三酮比色法^[3]无法判定酱油中是否含有毛发水解液。但“毛发水解液”酱油的氨基酸种类和含量不同于由食用植物蛋白生产的合格配制酱油。因此建立预先分离的酱油氨基酸分析法具有重要的实际意义。过去氨基酸的分离分析大多采用高效液相色谱法、纸色谱法、凝胶电泳法等, 但这些方法存在分析成本高, 时间长等缺点。毛细管电泳(CE)是20世纪80年代发展起来的一种高效液相分离技术, 具有高效、快速、灵敏、运行成本低等优点, 因此用于酱油氨基酸的分离分析具有

广阔前景。由于大多数氨基酸没有紫外吸收, 对于紫外检测器而言都需要衍生或进行间接检测^[4~6]。因衍生比较复杂, 而且衍生容易使样品受到污染, 因此本文通过选择合适缓冲液, 应用毛细管电泳-间接紫外吸收检测, 建立了一种快速分离测定酱油氨基酸的新方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Beckman P/ACE5500型毛细管电泳仪 美国Beckman公司; System Gold 软件控制仪器操作并采集数据(采集频率5Hz); 未涂层熔融石英毛细管(内径50 μm , 总长37cm, 有效长度30cm) 河北永年光导纤维厂。

苯甲酸 中国黄渡化工厂, 分析纯; Tris Aldrich

收稿日期: 2004-12-29

基金项目: 山东省教育厅科技计划项目(03A06)

作者简介: 傅崇岗(1965-), 男, 教授, 博士, 研究方向为毛细管电泳技术。

天冬氨酸、缬氨酸、丙氨酸 上海试剂三厂, 化学纯; 谷氨酸 北京化工厂, 分析纯; 丝氨酸、亮氨酸 中国科学院生物化学研究所, 色谱纯; 氨基酸标准品均由去离子水配制为 10mmol/L 储备液, 用前再由缓冲液稀释至所需浓度。运行缓冲液: 10mmol/L Tris(pH10.50), 背景吸收添加剂: 5mmol/L 苯甲酸。实验用水为二次石英亚沸蒸馏水。其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

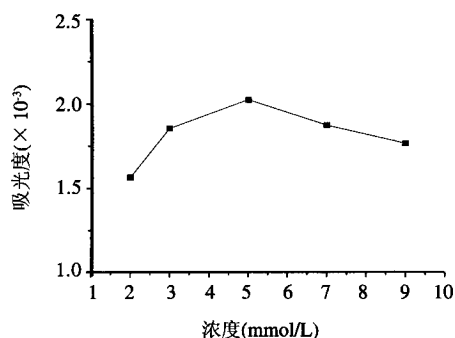
电泳分离电压为 10kV, 入口为正极, 紫外检测波长为 214nm; 进样压力 ΔP 为 0.5psi (1psi=6895Pa), 进样时间 5s。每天实验前分别用 1mol/L 的稀 HCl、0.1mol/L NaOH 溶液以及二次水各冲洗 5min, 然后用所选缓冲液冲洗 10min。每次进样前用缓冲液清洗 1min。每个样品连续运行三次, 实验均在室温下进行 (25℃)。

2 结果与分析

2.1 电泳介质的选择

毛细管电泳 - 间接紫外检测是基于样品注入后背景吸收添加剂吸光度的减小来定量的, 因此背景吸收一般较大, 这样保持基线稳定是一个很大的挑战。考察了磷酸、硼酸、醋酸和 Tris 等常用缓冲体系, 发现在相同条件下 Tris 缓冲液基线较稳定, 可能是因其背景电流和焦耳热效应较小。又考察了 Tris 浓度对分离效果的影响, 发现 10mmol/L 的 Tris 缓冲液具有足够的缓冲容量、良好的分离效果和较稳定的基线。

苯甲酸是缓冲液中的背景吸收添加剂, 其浓度大小对检测灵敏度具有一定的影响。以丝氨酸为例, 在 2~9mmol/L 浓度范围内, 考察了苯甲酸浓度对峰高的影响。如图 1 所示, 当苯甲酸浓度为 5mmol/L 时丝氨酸峰高最大。其它五种氨基酸与丝氨酸具有相同规律。因此我们选择苯甲酸浓度为 5mmol/L。

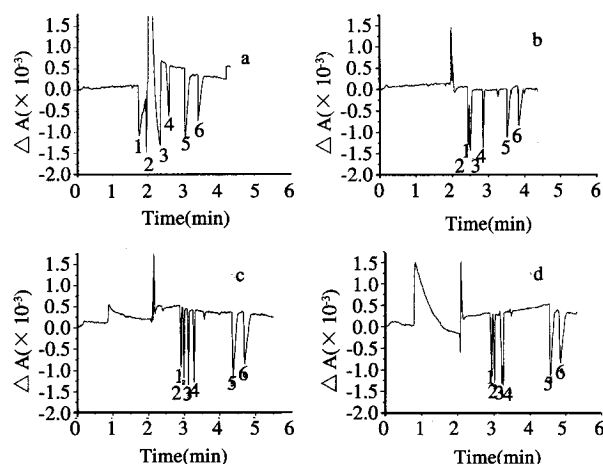


注: 丝氨酸浓度: 200 μ mol/L; 缓冲液: 10mmol/L Tris (pH10.5); 背景吸收添加剂: 5mmol/L 苯甲酸; 分离电压: 10kV; 检测波长: 214nm。

图1 苯甲酸浓度对丝氨酸峰高的影响

Fig. 1 Effect of concentration of benzoic acid on the peak height of serine

缓冲液 pH 是影响电泳分离效果的重要因素, 为此我们对最佳 pH 进行了选择。在毛细管电泳间接紫外检测模式中, 要求背景吸收添加剂与被测物质必须带相同电荷。在本研究体系中, 背景吸收添加剂为苯甲酸 ($pK_a=4.19$); 被测物质及其等电点分别为丝氨酸 (5.68)、亮氨酸 (5.96)、缬氨酸 (6.02)、丙氨酸 (6.00)、谷氨酸 (3.22) 和天冬氨酸 (2.77)。因此为满足苯甲酸与各氨基酸都带负电荷, 缓冲液应为中性或碱性。为了进一步缩小 pH 的范围, 利用以电泳理论为基础的 Peakmaster 软件^[7~9]进行了计算机模拟, 发现 pH 在 10 附近具有较好的分离效果。为此就 pH 分别为 9.5、10.0、10.5、11.0 的四种缓冲液的分离情况进行了实验考察 (图 2), 发现 pH=10.5 时六种氨基酸均可以达到基线分离。因此我们选择缓冲液 pH 为 10.5。



注: 各氨基酸浓度均为: 200 μ mol/L; 苯甲酸浓度: 5mmol/L; pH: a 9.5, b 10, c 10.5, d 11; 1 亮氨酸 (Leu), 2 缬氨酸 (Val), 3 丙氨酸 (Ala), 4 丝氨酸 (Ser), 5 谷氨酸 (Glu), 6 天冬氨酸 (Asp)。其它条件如图 1。

图2 缓冲液酸度对分离的影响

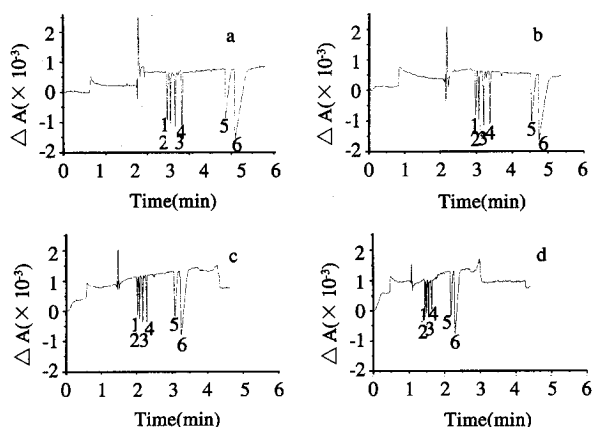
Fig. 2 Effect of buffer pH on separation

2.2 分离电压的影响

分别考察了 6、10、15、20kV 四种分离电压对分离效果的影响, 由图 3 可见如果分离电压太高, 则由于电流产生焦耳热效应, 引起的基线噪音较大, 影响检测结果的重现性; 而分离电压太低又会使迁移时间变长, 谷氨酸与天冬氨酸拖尾严重。所以实验中我们选择 10kV 作为分离电压。

2.3 方法的分析特性

配制一系列不同浓度的六种氨基酸混合标准样, 在选定的最佳实验条件下, 各氨基酸对应吸光度 ΔA 与其浓度 C 在一定范围内呈良好的线性关系, 考察了方法的线性范围及线性方程, 并基于三倍信噪比 ($S/N=3$) 分别求取了六种氨基酸的检测限。在优化条件下, 将各种氨基酸均为 200 μ mol/L 的混合标准溶液连续进样六次, 结



注 a. 6 kV, b. 10 kV, c. 15 kV, d. 20 kV。1亮氨酸(Leu), 2缬氨酸(Val), 3丙氨酸(Ala), 4丝氨酸(Ser), 5谷氨酸(Glu), 6冬氨酸(Asp)。其它条件如图1。

图3 分离电压的影响

Fig.3 Effect of separation voltage on separation

果重现性良好, 得出各物质吸光度的相对标准偏差(RSD)。各参数测定结果如表1。

表1 定量分析特性参数

Table 1 Characteristic parameters of correlation curves

待测物	回归方程 *	相关系数 r	线性范围 ($\mu\text{mol/L}$)	检测限 ($\mu\text{mol/L}$)	RSD (%, n=6)
Leu	$\Delta A = 8.633 \times 10^{-5} + 5.825C$	0.9995	10~1000	5.00	2.57
Val	$\Delta A = 11.54 \times 10^{-5} + 5.977C$	0.9993	9~1000	4.00	3.29
Ala	$\Delta A = 3.984 \times 10^{-5} + 7.123C$	0.9999	6~1000	2.00	1.39
Ser	$\Delta A = 8.960 \times 10^{-5} + 8.440C$	0.9990	8~1000	3.50	2.25
Glu	$\Delta A = 10.68 \times 10^{-5} + 2.064C$	0.9990	8~1000	3.50	4.26
Asp	$\Delta A = 6.531 \times 10^{-5} + 2.703C$	0.9992	12~1000	5.00	4.18

注: 回归方程中浓度C的单位为 mol/L。

2.4 样品分析

取0.30ml市售酱油于10ml试管中, 加缓冲液至刻度。采用0.2 μm 的微孔滤膜过滤, 清液样品按前述实验方法进行测定, 测定结果及回收率分别见表2。

3 结论

采用毛细管电泳-间接紫外检测方法, 完成了丝氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、谷氨酸与天冬氨酸六种氨基酸的检测。样品重现性良好, 各物质吸光度

表2 酱油中游离氨基酸含量(mg/100ml)及回收率测定结果

Table 2 Contents and recoveries for free amino acids in sauce

待测物	浓度 (mg/100ml)	稀释33.3倍后的浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	加入量 ($\mu\text{mol/L}$)	测得量 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 (%)
Leu	40.26	92	100	187.73	95.73
Val	50.26	129	100	232.47	103.47
Ala	85.17	287	300	580.62	97.87
Ser	61.74	176	200	369.85	96.93
Glu	137.41	280	300	593.37	104.46
Asp	73.79	166	200	358.20	96.10

相对标准偏差均小于5%, 回收率均在95.73%~104.46%范围内。该方法简便快速且节省试剂, 实验结果令人满意。

参考文献:

- [1] Less R. Laboratory handbook of methods of food analysis [M]. London: Leonard Hill, 1982.
- [2] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.
- [3] 韩志萍. 酱油中氨基氮检测方法的改进[J]. 湖州师范学院学报, 2000, 22(3): 51-53.
- [4] 陈永波, 程群, 饶斌, 等. 对一种分离测定氨基酸方法的改进[J]. 色谱, 2001, 19(6): 560-563.
- [5] 常碧影. 柱前衍生高效液相色谱法测定氨基酸[J]. 分析化学, 1995, 23(1): 100-103.
- [6] Qian D, Wenrui J, Jihao Sh. Analysis of amino acids by capillary zone electrophoresis with the electrochemical detection [J]. Electrophoresis, 2002, 23: 559-564.
- [7] Gas B, Coufal P, Jaros M, et al. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model [J]. J Chromatogr A, 2001, 905: 269-279.
- [8] Stedry M, Jaros M, Gas B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes [J]. J Chromatogr A, 2002, 960: 187-198.
- [9] Stedry M, Jaros M, Vcelakova K, et al. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II Eigenpeaks in univalent weak electrolytes [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 536-547.