

AccQ-Tag柱前衍生反相高效液相色谱法测定 谷物及食糜中氨基酸含量

韩粉丽^{1,2}, 韩 飞², 李爱科², 陈 曦², 宋 歌², 范柳萍^{1,*}, 余治权³
(1.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122; 2.国家粮食局科学研究院, 北京 100037;
3.内蒙古燕谷坊生态农业发展(集团)有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010000)

摘 要: 用AccQ-Tag法测定不同谷物及食糜中氨基酸的含量, 并优化原料与酸解剂的比例。采用内标法定量, 6-氨基喹啉基-*N*-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯为柱前衍生剂, 用反相高效液相色谱仪, 2475荧光检测器(激发波长250 nm、发射波长395 nm), Waters AccQ-Tag Nova-PakTM C₁₈柱(3.9 mm×150 mm, 4 μm), 柱温37℃, 以醋酸钠(pH 4.95)缓冲液为流动相A, 纯乙腈为流动相B, 水为流动相C进行梯度洗脱, 进样量为10 μL。结果发现, 5 mg原料的最优酸解剂为500 μL; 17种氨基酸线性回归方程在25~500 μmol/L范围内线性良好(胱氨酸(Cys)浓度在12.5~250 μmol/L之间), 相关系数 r 为0.999 6~0.999 9, 测定的平均回收率为97.56%~103.92% ($n=3$), 相对标准偏差为0.31%~2.75% ($n=3$)。本法快速简便, 能够适用于谷物及食糜中氨基酸含量的测定。

关键词: 反相高效液相色谱法; AccQ-Tag柱前衍生; 谷物; 食糜; 氨基酸

Determination of Amino Acid Contents in Cereals and Ileal Digesta by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography with AccQ-Tag Pre-column Derivatization Method

HAN Fenli^{1,2}, HAN Fei², LI Aike², CHEN Xi², SONG Ge², FAN Liuping^{1,*}, YU Zhiqian³
(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China;

3. Inner Mongolia Oats House Ecological Agriculture Development (Group) Co. Ltd., Hohhot 010000, China)

Abstract: The contents of amino acids in different cereals and ileal digesta were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) according to the AccQ-Tag method. The ratio of material to acidolysis agent was optimized in this paper. Quantification was performed using an internal standard method after pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimide (AQC). The analysis procedure was carried out using a Waters 2695 HPLC system fitted with a Waters AccQ-Tag Nova-PakTM C₁₈ column (3.9 mm × 150 mm, 4 μm) and a Waters 2475 fluorescence detector (Waters Corp., USA) at an excitation wavelength of 250 nm and emission wavelength of 395 nm at 37 °C. Sodium acetate (pH 4.95), acetonitrile and water were used respectively as mobile phases A, B and C for gradient elution and the injection volume was 10 μL. The results showed that the optimum ratio of material to acidolysis agent was 1:100 (mg/μL). The calibration curves of 17 amino acids were linear within the range of 25–500 μmol/L (12.5–250 μmol/L for cystine) with correlation coefficients (r) of 0.999 6–0.999 9. The average recoveries were in the range of 97.56%–103.92% with relative standard deviation (RSD) of 0.31%–2.75% ($n = 3$). This method is rapid, simple and accurate for the determination of amino acids in cereals and ileal digesta.

Keywords: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); AccQ-Tag pre-column derivatization; cereals; ileal digesta; amino acids

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201804025

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 04-0165-06

引文格式:

韩粉丽, 韩飞, 李爱科, 等. AccQ-Tag柱前衍生反相高效液相色谱法测定谷物及食糜中氨基酸含量[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 165-170. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201804025. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-01-04

基金项目: 公益性行业(粮食)科研专项(201513003-8)

第一作者简介: 韩粉丽(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮油营养. E-mail: 1144371945@qq.com

*通信作者简介: 范柳萍(1972—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品科学. E-mail: fanliuping@jiangnan.edu.cn

HAN Fenli, HAN Fei, LI Aike, et al. Determination of amino acid contents in cereals and ileal digesta by reversed-phase high performance liquid chromatography with AccQ-Tag pre-column derivatization method[J]. Food Science, 2018, 39(4): 165-170. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201804025. http://www.spkx.net.cn

在不发达和发展中国家, 谷物是膳食蛋白质最主要的来源之一, 而蛋白质是人类膳食中的重要组成部分, 在生命系统中作为结构和功能起重要作用^[1], 因此精确评估谷物的蛋白质质量及其满足人体营养需求的氨基酸和氮代谢的要求就成了重中之重^[2]。无论从经济角度或公众健康考虑都迫切需要一种正确、方便、快捷评价蛋白质质量的方法。2013年联合国粮食与农业组织提出了基于人体回肠氨基酸消化率的可消化必需氨基酸评分来评价谷物被人体消化吸收的程度, 出于道德伦理及实验条件和费用的要求, 可以用生长大鼠或生长猪作为实验模型^[3]。准确测定大鼠或猪回肠内容物(食糜)中氨基酸含量就成为了评价谷物蛋白质质量的关键环节, 但是对于大鼠来说, 回肠内容物很少, 现行国家标准中的取样量不适用于食糜样品中氨基酸含量的测定。Rutherford等^[4-5]采用邻苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde, OPA)衍生-高效液相色谱法测定谷物及食糜中氨基酸含量, 称样量均为5 mg, 但并未说明酸解剂的用量。

目前最常用的氨基酸分析方法是柱后衍生离子交换色谱和柱前衍生的反相色谱, 而茚三酮^[6]和OPA^[7-8]是前者最常用的衍生试剂, 后者最常用的衍生试剂为2,4-二硝基氟苯^[9]、异硫氰酸苯酯(phenylisothiocyanate, PITC)^[10-12]、6-氨基喹啉基-*N*-羟基琥珀酰亚胺-氨基甲酸酯(6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC)^[13-15]、9-苄基(9-fluorenylmethyl chloroformate, FMOC)^[16]和OPA-FMOC联用^[17-18]。柱前衍生反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)法具有优于其他生物化学技术的优点, 它能快速、有效地分离和定性给定样品的分析, 此外, HPLC简单、通用, 适合于普通实验室。PITC衍生容易产生杂峰, OPA衍生产物在室温不稳定, 分解率高^[19], 而AQC可以在几秒内与伯仲胺反应, 几乎没有基质干扰, 产生高荧光强度的稳定脲衍生物, 在室温能稳定1周, 过量的试剂能自然水解, 副产物从衍生物中色谱分离, 不需要特殊的处理或提取^[20], 用RP-HPLC仪分离衍生产物, 再用紫外或荧光检测器定量检测衍生产物^[21-22]。本实验用AccQ-Tag法测定谷物及食糜中17种常规氨基酸含量, 为便于结果比较, 原料及食糜量均称取5 mg, 同时优化酸解剂用量, 为探索动物食糜及粪便等小样品量样品中氨基酸含量的测定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

燕麦胚芽米 内蒙古燕谷坊生态农业发展(集团)有限公司; 榆麩2号糜子产自陕西府谷县; 西农9940苦荞产自陕西榆林市; 矮抗58小麦 河南中鹤集团; 薏苡产自贵州兴仁县。本实验将上述谷物经分样筛去除杂物后, 粉碎, 过60目筛, 放置于-20℃冰箱中, 备用; 采取的动物回肠食糜经冷冻干燥后, 研磨, 过60目筛, 放置于-20℃冰箱中, 备用。

1.1.2 试剂

Waters AccQ-Tag氨基酸测定试剂盒(AccQ-Fluor试剂盒(包括硼酸缓冲液1、衍生剂粉2A、稀释液2B)); 17种混合氨基酸标准液, 其浓度均为2.5 mmol/L(Cys为1.25 mmol/L); AccQ-Tag流动相A溶液(醋酸盐-磷酸盐缓冲液) 美国Waters公司。

含0.1%苯酚6 mol/L恒沸盐酸的配制^[23]: 往装有18 MΩ高纯水的圆底烧瓶中加入等体积的优级纯盐酸, 连接烧瓶于一个配有温度计入口的蒸馏冷凝器, 加热混合物直到温度达到109℃, 然后收集馏出物, 并用酚酞作指示剂、6 mol/L氢氧化钠溶液滴定盐酸馏出物, 当溶液由无色变为红色并在0.5 min内不褪色即为滴定终点, 此馏出物即为恒沸6 mol/L盐酸; 溶解1 g苯酚于1 L恒沸6 mol/L盐酸中, 此含有0.1%苯酚的恒沸6 mol/L盐酸溶液在室温可存放3个月。

α -氨基丁酸(α -amino-*N*-butyric acid, AABA)内标储备液(2.5 mmol/L): 称取25.8 mg AABA置于100 mL容量瓶中, 用MiliQ纯水稀释至刻度。

标准工作液的制备: 将不同体积的氨基酸标准液、AABA标准储备液和水混合成一系列不同浓度氨基酸标准液于上样小瓶中, 见表1。

表1 不同浓度氨基酸标准液
Table 1 Preparation of different concentrations of amino acid standard solution

项目	使用量						
氨基酸标准液体积/ μ L	10	20	40	80	120	160	200
AABA标准储备液体积/ μ L	100	100	100	100	100	100	100
超纯水体积/ μ L	890	880	860	820	780	740	700
氨基酸浓度/(μ mol/L)	25	50	100	200	300	400	500

1.2 仪器与设备

2695 HPLC仪(配有2475荧光检测器和Empower 3色谱工作站)、AccQ-Tag专用色谱柱(3.9 mm \times 150 mm,

4 μm) 美国Waters公司; DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; XTP-250型高速多功能粉碎机 浙江永康市红太阳机电有限公司; ML204型电子天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; SB 25-12 DTDN型超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司; OA-HEAT型氮吹仪 美国Organomation公司; MS 3digital型涡旋发生器 德国IKA公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

称取粉碎过筛的谷物约5 mg放于安瓿瓶中, 加500 μL 6 mol/L恒沸盐酸溶液(含0.1%苯酚), 充氮气封口, 然后于110 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱中水解24 h。冷却样品水解液, 取200 μL 水解液吹氮至干, 然后加入100 μL AABA储备液、900 μL 高纯水, 涡旋混合20 s密封, 过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.3.2 衍生

移取10 μL 标准或水解工作液于6 mm \times 50 mm试管的底部, 加入70 μL 硼酸盐缓冲液涡旋10 s, 边涡旋边加入20 μL AQC, 继续涡旋15~20 s, 样品管用石蜡膜封口, 放于55 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中加热10 min, 冷却至室温后, 将衍生物转移至微量自动进样样品瓶中, 密封盖好, 准备进样。

AQC衍生剂的制备: 吸取1 mL AccQ-Fluor稀释剂放入装有AccQ-Fluor衍生剂粉末的2A瓶中, 加盖密封, 涡旋振荡10 s, 在55 $^{\circ}\text{C}$ 加热装置上加热2A瓶, 直至AccQ-Fluor衍生剂粉末全部溶解, 加热时间不超过10 min。加热的目的是将衍生酪氨酸时的副产物转化为单一的主产物, 在室温此转化反应较缓慢; 以上加热步骤应将加热装置提前预热至55 $^{\circ}\text{C}$ 。按下式计算测定结果:

$$\rho = \frac{F \times C \times M \times V}{10m}$$

式中: ρ 为样品中被测氨基酸组分的含量/(mg/g干基); F 为稀释倍数; C 为被测氨基酸组分测得的浓度/(mmol/L); V 为样品水解液最后定容的体积/mL; M 为被测氨基酸组分的摩尔质量/(g/mol); m 为称样量/mg。

1.3.3 色谱条件

表2 梯度洗脱程序
Table 2 Gradient elution program

时间/min	流速/ (mL/min)	流动相体积分数/%			曲线
		A	B	C	
起始	1.00	100.0	0.0	0.0	*
0.50	1.00	99.0	1.0	0.0	11
18.00	1.00	95.0	5.0	0.0	6
19.00	1.00	91.0	9.0	0.0	6
29.50	1.00	83.0	17.0	0.0	6
33.00	1.00	0.0	60.0	40.0	11
36.00	1.00	100.0	0.0	0.0	11
45.00	1.00	100.0	0.0	0.0	6

注: *.起始时, 曲线没有拟合。A.醋酸盐-磷酸盐缓冲溶液(pH 4.95), 按1:10用MiliQ纯水稀释; B.纯乙腈; C. MiliQ纯水。

Waters AccQ-Tag氨基酸分析柱(3.9 mm \times 150 mm, 4 μm); 流速1.0 mL/min; 柱温37 $^{\circ}\text{C}$; 荧光检测器激发波长250 nm, 发射波长395 nm; 进样量10 μL ; 流动相: A为醋酸盐-磷酸盐缓冲溶液(pH 4.95), 按1:10用MiliQ纯水稀释; B为纯乙腈; C为MiliQ纯水; 梯度洗脱程序如表2所示。

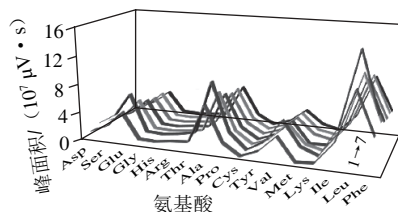
1.4 数据分析

HPLC图采用Waters Empower 3工作站采集, Excel进行数据分析和绘图。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

精确称量样品5 mg, 在相同条件下分别加入400、500、600、700、800、900 μL 和1 000 μL 不同剂量的酸解剂, 按照1.3.1节和1.3.2节步骤进行水解和衍生。不同酸解剂用量对17种常规氨基酸峰面积的影响如图1所示。对于同一种样品, 随着酸解剂用量的增加, 大部分氨基酸的峰面积逐渐增大, 当增加到一定值时, 氨基酸的峰面积最大, 继续加大酸解剂的用量, 峰面积逐渐减小。当酸解剂用量为500 μL 时, 糜子中氨基酸的峰面积达到最大值, 17种氨基酸的峰面积均高于其他酸解剂所测得的结果。因此确定糜子等谷物样品酸解剂用量为500 μL 。



1~7.酸解剂用量分别为400、500、600、700、800、900、1 000 μL 。

图1 酸解剂用量对17种氨基酸峰面积的影响

Fig. 1 Influence of varying dosages of acidolysis agent on the peak areas of 17 amino acids

2.2 氨基酸标准工作曲线

表3 氨基酸标准工作曲线回归方程
Table 3 Calibration curve equations for amino acids

序号	氨基酸	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{mol/L}$)	检出限/($\mu\text{g/L}$)
1	Asp	$A=1.56C+8.81\times 10^{-3}$	0.999 963	25~500	0.107
2	Ser	$A=1.93C+1.13\times 10^{-2}$	0.999 950	25~500	0.063
3	Glu	$A=1.71C+9.53\times 10^{-3}$	0.999 959	25~500	0.105
4	Gly	$A=1.80C+9.47\times 10^{-3}$	0.999 959	25~500	0.052
5	His	$A=2.76C+1.34\times 10^{-2}$	0.999 944	25~500	0.069
6	Arg	$A=2.62C+1.33\times 10^{-2}$	0.999 942	25~500	0.079
7	Thr	$A=2.74C+2.24\times 10^{-2}$	0.999 835	25~500	0.034
8	Ala	$A=3.06C+4.62\times 10^{-2}$	0.999 804	25~500	0.019
9	Pro	$A=1.42C+1.36\times 10^{-2}$	0.999 830	25~500	0.058
10	Cys	$A=8.35\times 10^{-3}C+6.07\times 10^{-3}$	0.999 642	12.5~250	0.197
11	Tyr	$A=2.48C+1.72\times 10^{-2}$	0.999 954	25~500	0.054
12	Val	$A=4.79C+4.07\times 10^{-2}$	0.999 874	25~500	0.020
13	Met	$A=3.92C+3.40\times 10^{-2}$	0.999 826	25~500	0.032
14	Lys	$A=2.05C+2.89\times 10^{-2}$	0.999 579	25~500	0.057
15	Ile	$A=6.08C+4.72\times 10^{-2}$	0.999 878	25~500	0.020
16	Leu	$A=6.09C+4.40\times 10^{-2}$	0.999 892	25~500	0.021
17	Phe	$A=7.43C+4.69\times 10^{-2}$	0.999 915	25~500	0.024

分别取浓度为25、50、100、200、300、400、500 μmol/L的17种氨基酸标准液10 μL按1.3.2节进行衍生。以氨基酸溶液浓度C(μmol/L)为横坐标,以峰面积/内标面积A(μV·s)为纵坐标绘制氨基酸的标准工作曲线,利用峰面积与浓度进行线性回归,并以3倍信噪比计算检出限。17种氨基酸标样的回归方程、相关系数、线性范围、检出限如表3所示。在一定质量浓度范围内,内标峰面积与氨基酸质量浓度线性关系良好,其相关系数为0.999 6~0.999 9,检出限为0.019~0.197 μg/L,可以作为定量分析依据。

2.3 方法的精密度实验结果

取浓度为100 μmol/L标准溶液,在相同条件下平行测定6次,计算测定值相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)和保留时间RSD如表4所示。结果表明,该浓度下17种氨基酸标准曲线的保留时间RSD为0.02%~0.09%,测定值的RSD为0.37%~1.15%。同一样品在相同条件下连续进样5次,结果发现,His、Tyr和Phe的RSD值均为0,其他氨基酸的RSD值均小于2%。

表4 精密度实验结果

Table 4 Results of precision test

氨基酸	RSD/%		氨基酸	RSD/%		氨基酸	RSD/%	
	测定值	保留时间		测定值	保留时间		测定值	保留时间
Asp	0.75	0.09	Thr	0.67	0.04	Met	0.60	0.03
Ser	0.62	0.07	Ala	0.50	0.04	Lys	0.69	0.03
Glu	0.83	0.08	Pro	0.61	0.03	Ile	0.37	0.02
Gly	0.84	0.07	Cys	1.15	0.03	Leu	0.55	0.02
His	0.61	0.07	Tyr	0.78	0.03	Phe	0.42	0.03
Arg	0.60	0.06	Val	0.63	0.03			

2.4 试液的稳定性

用AQC为衍生试剂,与含氨基化合物迅速反应,生成高稳定性的脲衍生试剂,在248 nm处有最大吸收波长,本实验将氨基酸衍生产物在室温分别放置0、12、24 h后进行色谱分析,结果发现各氨基酸衍生产物在放置12 h后氨基酸的峰面积没有变化,在放置24 h后只有个别氨基酸的峰面积略有下降,说明衍生产物至少在24 h以内稳定。孔彬等^[21]也发现衍生后的样品在4℃避光条件下至少在12 h内稳定。葛冬梅^[24]和高向阳^[25]等发现衍生试液在室温可稳定1周,24 h内完成测定,结果良好。陈宇堃等^[26]取衍生后的样品,15℃中放置24 h,再次测定,所得结果与原测定结果一致。

2.5 回收率实验结果

精确称量已知浓度的样品粉末5 mg于安瓿瓶中,加入氨基酸标准溶液浓度分别为已知样品浓度的80%、100%、120%的溶液,按1.3.2节方法进行加标回收率平行测定实验(n=3),结果如表5所示。由表5可知,加标回收率在97.56%~103.92%之间,RSD为0.31%~2.75%,均小于3%。

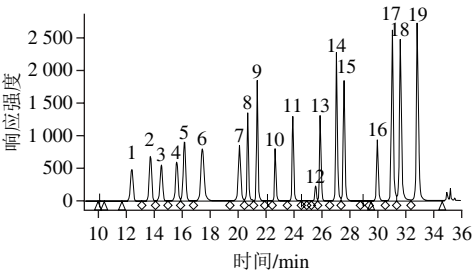
表5 17种氨基酸的加标回收率(n=3)

Table 5 Recoveries of 17 amino acids from spiked samples (n=3)

氨基酸	添加量/ (mmol/L)	检出量/ (mmol/L)	回收率/ %	RSD/%	氨基酸	添加量/ (mmol/L)	检出量/ (mmol/L)	回收率/ %	RSD/%
Asp	0.355	0.352	99.06	1.94	Cys	0.122	0.124	101.37	1.24
	0.405	0.405	99.92	1.36		0.147	0.144	97.73	1.75
	0.455	0.451	99.19	1.94		0.172	0.175	101.94	1.44
Ser	0.324	0.317	97.94	1.79	Tyr	0.257	0.265	102.98	0.87
	0.374	0.376	100.45	0.31		0.307	0.317	103.37	0.36
	0.424	0.421	99.21	2.05		0.357	0.366	102.61	0.57
Glu	0.588	0.574	97.68	0.44	Val	0.314	0.306	97.56	0.68
	0.638	0.637	99.9	1.33		0.364	0.356	97.71	0.71
	0.688	0.672	97.63	2.75		0.414	0.404	97.67	0.57
Gly	0.368	0.365	99.09	1.95	Met	0.214	0.216	100.78	1.49
	0.418	0.422	100.96	1.09		0.264	0.264	100.13	1.22
	0.468	0.467	99.79	1.83		0.314	0.325	103.40	0.78
His	0.235	0.241	102.55	1.10	Lys	0.265	0.27	101.76	1.19
	0.285	0.294	103.04	0.39		0.315	0.318	101.06	0.36
	0.335	0.343	102.49	0.73		0.365	0.364	99.63	0.84
Arg	0.308	0.304	98.70	1.51	Ile	0.274	0.277	101.22	1.37
	0.358	0.361	100.84	1.11		0.324	0.333	102.67	0.46
	0.408	0.41	100.57	0.61		0.374	0.389	103.92	0.39
Thr	0.271	0.274	101.23	1.72	Leu	0.357	0.357	99.91	1.71
	0.321	0.33	102.80	0.52		0.407	0.414	101.64	0.85
	0.371	0.374	100.90	1.2		0.457	0.459	100.36	1.31
Ala	0.33	0.324	98.18	1.93	Phe	0.286	0.291	101.75	1.50
	0.38	0.378	99.39	0.67		0.336	0.347	103.17	0.60
	0.43	0.421	97.91	1.56		0.386	0.395	102.25	1.02
Pro	0.331	0.331	100.00	1.98					
	0.381	0.387	101.66	0.79					
	0.431	0.433	100.39	1.39					

2.6 测定结果

在样品与酸解剂最佳比例条件下测定谷物及食糜中氨基酸含量。图2、3分别为标准氨基酸和生燕麦样品的氨基酸分离谱图,各谷物及燕麦食糜中各种氨基酸含量见表6。

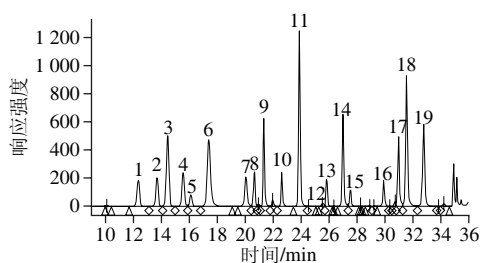


1. Asp; 2. Ser; 3. Glu; 4. Gly; 5. His; 6. NH₃; 7. Arg; 8. Thr; 9. Ala; 10. Pro; 11. AABA; 12. Cys; 13. Tyr; 14. Val; 15. Met; 16. Lys; 17. Ile; 18. Leu; 19. Phe.

图2 17种氨基酸标准溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of a mixture of 17 standard amino acids

从图3可以看出,大部分氨基酸可以达到基线分离或近于基线分离,即使是一些难于分离的氨基酸对,如Arg/Thr、Cys/Tyr、Met/Val、Ile/Leu等也都分离良好,而且基线平稳,线性好,方法的重复性与准确度良好。



1. Asp; 2. Ser; 3. Glu; 4. Gly; 5. His; 6. NH₃; 7. Arg;
8. Thr; 9. Ala; 10. Pro; 11. AABA; 12. Cys; 13. Tyr;
14. Val; 15. Met; 16. Lys; 17. Ile; 18. Leu; 19. Phe.

图3 燕麦样品中氨基酸的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of 17 amino acids in oats

表6 谷物及食糜中氨基酸含量

Table 6 Amino acid contents in cereals and ileal digesta

序号	氨基酸	苦荞	薏苡	燕麦	糜子	小麦	燕麦食糜
1	Asp	8.269 5	10.457 9	9.694 6	6.921 2	6.519 2	8.416 6
2	Ser	4.431 9	7.667 3	5.987 1	8.249 6	6.273 2	5.306 0
3	Glu	14.210 4	38.434 0	26.419 8	28.469 7	39.860 2	10.313 5
4	Gly	4.870 8	3.676 8	5.846 6	2.215 4	5.438 5	7.801 1
5	His	2.011 6	3.008 0	2.573 4	2.404 8	2.849 7	1.749 2
6	Arg	8.397 2	7.021 3	8.249 4	3.658 2	6.932 4	3.501 1
7	Thr*	3.242 0	4.679 7	3.865 7	3.454 5	3.889 6	4.437 8
8	Ala	3.625 3	16.091 4	5.354 2	13.497 6	4.636 5	4.017 9
9	Pro	3.077 0	14.215 0	6.503 8	9.440 7	14.919 9	4.402 0
10	Cys	0.596 2	1.226 0	2.657 2	0.480 6	1.471 2	0.471 2
11	Tyr*	2.397 2	7.210 6	4.355 5	4.982 7	4.252 4	2.486 9
12	Val*	4.415 4	8.606 9	6.082 8	5.857 5	5.618 4	3.732 7
13	Met*	0.664 3	3.273 5	1.363 0	2.909 6	1.065 8	0.658 3
14	Lys*	4.666 8	2.088 4	4.392 8	0.292 4	3.281 8	4.371 4
15	Ile*	3.470 8	6.491 6	4.445 9	4.984 5	4.617 7	2.636 3
16	Leu*	6.025 8	24.694 8	9.112 6	16.789 8	9.436 2	4.886 7
17	Phe*	4.163 6	9.186 6	6.432 9	7.516 1	6.236 8	2.591 2
	必需氨基酸	29.05	66.230	40.050	46.790	38.40	25.80
	总氨基酸	78.54	168.03	113.34	122.12	127.30	71.78
	必需氨基酸/总氨基酸/%	36.98	39.40	35.34	38.31	30.16	35.95

注: *.必需氨基酸。

由表6可知,燕麦、糜子、苦荞、薏苡和小麦中含有17种氨基酸,其中人和哺乳动物需要的7种必需氨基酸(Thr、Lys、Val、Ile、Leu、Met、Tyr+Phe)含量分别为40.05、46.79、29.05、66.23 mg/g和38.40 mg/g,分别占总氨基酸含量的35.34%、38.31%、36.98%、39.40%和30.16%,糜子、苦荞和薏苡均高于联合国粮食与农业组织/世界卫生组织模式的标准(36%)^[22]。从氨基酸分布看,样品含量最高的氨基酸为Asp、Glu、Arg和Leu,薏苡样品中各氨基酸含量均高于燕麦、谷子和苦荞的氨基酸含量,尤其是Glu、Ala和Leu。燕麦和小麦的氨基酸含量与Cervantespahm等^[27]所测的结果相比,燕麦中各氨基酸含量几乎相同,这可能是由于原料均为燕麦的原因;而小麦中氨基酸含量稍偏高0.07%左右,这与谷物的品种及种植时间等原因有关。

3 结论

本实验采用AccQ-Tag法测定了5种谷物和1种燕麦食糜中的17种氨基酸含量,对酸解剂的用量进行了优化。结果表明:氨基酸浓度在25~500 μmol/L(胱氨酸浓度在12.5~250 μmol/L)时,其峰面积和氨基酸浓度的线性相关系数均在0.999以上,除Tyr(2.05%)外,16种氨基酸的相对标准偏差均小于2%;流动相醋酸缓冲液的pH 4.95,在此pH值条件下酸性氨基酸Asp和Glu对酸度最为敏感^[28],最易受到影响的峰对AMQ/Asp、Asp/Ser、Ser/Glu及Glu/Gly在本实验条件下也都分离良好。陈华萍等^[29]以OPA-FMOC为柱前衍生试剂,采用HPLC法测定小麦中17种氨基酸含量,其用2倍信噪比计算检出限(0.074~0.440 mg/L)远小于本法以3倍信噪比计算的检出限(0.019~0.197 μg/L),这可能是由于本实验所用的荧光检测器的灵敏度优于其实验所用的二极管阵列检测器。莫炫永^[30]用AccQ-Tag柱前衍生法测定半夏中氨基酸含量,其RSD(1.8%, $n=6$)大于本实验测定的结果(1.53%, $n=6$),其色谱图基线较高,本实验色谱图基线平稳,分离度均高于1.5,这可能是本实验中所用的AccQ-Tag专用色谱柱的柱效比较好。本法精密度好,可用于食糜、粪便等小样品量的测定。

参考文献:

- [1] BWIBO N O, NEUMANN C G. The need for animal source foods by Kenyan children[J]. Journal of Nutrition, 2003, 133(2): 3936-3940.
- [2] LEE W T, WEISELL R, ALBERT J, et al. Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods proposed by an FAO expert working group in 2014[J]. Journal of Nutrition, 2016, 146: 929-932. DOI:10.3945/jn.115.222109.
- [3] FAO. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO Expert Consultation: ISSN 0254-4725[S/OL]. <http://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>.
- [4] RUTHERFURD S M, BAINS K, MOUGHAN P J. Available lysine and digestible amino acid contents of proteinaceous foods of India[J]. British Journal of Nutrition, 2012, 108(Suppl 2): 59-68. DOI:10.1017/S0007114512002280.
- [5] RUTHERFURD S M, FANNING A C, MILLER B J, et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats[J]. Journal of Nutrition, 2015, 145(2): 372-329. DOI:10.3945/jn.114.195438.
- [6] MOORE S, STEIN W H. Photometric nin-hydrin method for use in the chromatography of amino acids[J]. Journal of Biological Chemistry, 1948, 176(1): 367-388.
- [7] RUTHERFURD S M, KITSON T M, WOOLHOUSE A D, et al. Feline stability in the presence of selected urine compounds[J]. Amino Acids, 2007, 32(2): 235-242. DOI:10.1007/s00726-006-0369-z.
- [8] HENDRIKS W H, RUTHERFURD S M, RUTHERFURD K J. Importance of sulfate, cysteine and methionine as precursors to feline synthesis by domestic cats (*Felis catus*) [J]. Comparative Biochemistry &

- Physiology Toxicology & Pharmacology, 2001, 129(3): 211-216. DOI:10.1016/S1532-0456(01)00196-X.
- [9] 赵英莲, 牟德华, 李艳. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生HPLC检测树莓中游离氨基酸[J]. 食品科学, 2015, 36(6): 178-182. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201506033.
- [10] JANSSEN P S L, NISPEN J W V, MELGERS P A T A, et al. HPLC analysis of phenylthiocarbamyl (PTC) amino acids. I. Evaluation and optimization of the procedure[J]. Chromatographia, 1986, 22(7): 345-350. DOI:10.1007/BF02268788.
- [11] 张岳, 赵岩, 徐殿文, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定草本水杨梅叶中氨基酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 2911-2916.
- [12] 马爽, 赵岩, 赵晓红, 等. 柱前衍生RP-HPLC法测定黄芩中氨基酸含量[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(5): 113-116. DOI:10.16305/j.1007-1334.2014.05.001.
- [13] BOSCH L, ALEGRÍA A, FARRÉ R. Application of the 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods[J]. Journal of Chromatography B, 2006, 831(1/2): 176-183. DOI:10.1016/j.jchromb.2005.12.002.
- [14] FENG P, GAO M, ANITA B, et al. A nine-country study of the protein content and amino acid composition of mature human milk[J]. Food & Nutrition Research, 2016, 60. DOI:10.3402/fnr.v60.31042.
- [15] SALAZAR C, ARMENTA J M, CORTÉS D F, et al. Combination of an AccQ-Tag-ultra performance liquid chromatographic method with tandem mass spectrometry for the analysis of amino acids[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 828: 13-28. DOI:10.1007/978-1-61779-445-2_2.
- [16] LOZANOV V, PETROV S, MITEV V. Simultaneous analysis of amino acid and biogenic polyamines by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with *N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1025(2): 201-208. DOI:10.1016/j.chroma.2003.10.094.
- [17] HANCZKO R, KORÖS A, TÓTH F, et al. Behavior and characteristics of biogenic amines, ornithine and lysine derivatized with the *o*-phthalaldehyde-ethanethiol-fluorenylmethyl chloroformate reagent[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1087(1/2): 210-222. DOI:10.1016/j.chroma.2004.12.056.
- [18] KORÖS A, VARGA Z, MOLNÁR-PERL I. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their *o*-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1203(2): 146-152. DOI:10.1016/j.chroma.2008.07.035.
- [19] XIE Y, LI Z N. Determination of 18 types of amino acids in the serum of ischemic stroke patients by high performance liquid chromatography-diode array detector derivatized with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate[J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2015, 73(1): 1-5. DOI:10.1007/s12013-015-0648-y.
- [20] WHEAT T E, GRUMBACH E S, MAZZEO J R. A new amino acid analysis application[J]. LC-GC North America, 2006, 19(7): 26-27.
- [21] 孔彬. 柱前衍生RP-HPLC荧光检测法测定人血浆中17种氨基酸[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(2): 141-144.
- [22] 卢珍华, 郭彩华. AccQ-Tag法测定绿豆蛋白酶解液中的氨基酸含量[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 238-241. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2006.02.055.
- [23] RUTHERFURD S M, GILANI G S. Amino acid analysis[M]//Current Protocols in Protein Science, 2009. DOI:10.1002/0471140864.ps1109s58.
- [24] 葛冬梅, 宗雯雯, 韩宝平. AccQ-Tag法测定酱油中游离氨基酸组成[J]. 中国调味品, 2009, 34(1): 103-105.
- [25] 高向阳, 刘娜. AccQ-Tag柱前衍生反相-高效液相色谱法测定齿果酸模中的氨基酸含量[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 160-163.
- [26] 陈宇堃, 梁蔚阳, 薛巧如, 等. AccQ-Tag法测定复方氨基酸注射液(18AA-V)中17种氨基酸的含量[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(3): 243-246.
- [27] CERVANTESPAHM S K, LIU Y, STEIN H H. Digestible indispensable amino acid score and digestible amino acids in eight cereal grains[J]. British Journal of Nutrition, 2014, 111(9): 1663-1672. DOI:10.1017/S0007114513004273.
- [28] 陈永波, 饶斌, 覃兰. AccQ-Tag法中AccQ-Fluor试剂用量研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(3): 52-56. DOI:10.14188/j.ajsh.2001.03.017.
- [29] 陈华萍, 陈黎, 魏育明, 等. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定小麦中氨基酸含量[J]. 分析化学, 2005, 33(12): 1689-1692. DOI:10.3321/j.issn:0253-3820.2005.12.005.
- [30] 莫炫永. 不同产地半夏的氨基酸分析[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1): 145-148. DOI:10.16155/j.0254-1793.2010.01.029.