

高效毛细管电泳-间接紫外吸收检测法测定食品中的氨基酸

陈 冰^{1,2}, 李小戈^{1,2}, 何 萍^{1,2}, 项小兰^{1,2}

(1. 南京工业大学, 江苏 南京 210009; 2. 湛江师范学院生命科学与化学学院, 广东 湛江 524048)

摘要 研究了鸟氨酸、脯氨酸和谷氨酰胺的高效毛细管电泳-间接紫外吸收检测的特征。以 5 mmol/L 对氨基苯磺酸钠-10 mmol/L KH_2PO_4 (pH 11.5) 为运行缓冲液, 在分离电压 12 kV 下, 于 11 min 实现了上述 3 种氨基酸的基线分离, 迁移时间和峰高的相对标准偏差分别小于 0.72% 和 2.0%, 检测限分别为 6.78, 8.71, 7.86 mg/L。应用该法测定食品中的氨基酸及各氨基酸在样品中的加标回收率, 3 种氨基酸的加标回收率为 96.8% ~ 104%。

关键词 高效毛细管电泳; 间接紫外检测; 氨基酸; 海天生抽; 青岛啤酒; 氨基酸口服液; 食品

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2004)01-0074-03

Simultaneous Determination of Amino Acids in Food by Capillary Electrophoresis with Indirect Ultraviolet Detection

CHEN Bing^{1,2}, LI Xiaoge^{1,2}, HE Ping^{1,2}, XIANG Xiaolan^{1,2}

(1. Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. School of Life Science and Chemistry, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: The characteristic of capillary electrophoresis (CE) with indirect ultraviolet (UV) detection of L-ornithine (Orn), L-proline (Pro) and L-glutamine (Gln) was investigated. A suitable electrolyte consists of 5 mmol/L sodium *p*-aminobenzene sulfonic acid-10 mmol/L KH_2PO_4 (pH 11.5) with UV detection at 254 nm. The applied voltage was set at 12 kV. The three amino acids were completely separated and detected by the method in 11 min. The relative standard deviations (RSD) of the method were better than 0.72% for migration time and 2.0% for peak height. The detection limits of Orn, Pro and Gln were 6.78, 8.71 and 7.86 mg/L, respectively. The proposed method was successfully applied to the determination of amino acids in foods (Haitian soybean sauce, Tsingtao beer and amino acids tonic) and the recoveries were in the range of 96.8% - 104%.

Key words: high performance capillary electrophoresis; indirect ultraviolet detection; amino acid; Haitian soybean sauce; Tsingtao beer; amino acids tonic; food

氨基酸是化学、生物、医药、农业、食品等领域的重要物质, 是组成多肽、蛋白质的基本单元及代谢中的重要物质^[1]。常用的氨基酸分析方法有纸色谱法、凝胶电泳法、免疫分析法、高效液相色谱法 (HPLC) 等^[1,2], 这些方法多只用于单一氨基酸的分离。利用高效毛细管电泳 (HPCE) 可实现多种氨基酸的同时检测, 但由于大部分氨基酸没有紫外吸收, 需进行衍生化处理^[3], 而间接检测可克服此缺点, 因此较为常用^[4,5]。本文应用 HPCE-间接紫外吸收检测, 于 11 min 内同时分离检测了鸟氨酸 (Orn)、脯氨酸 (Pro) 和谷氨酰胺 (Gln), 并应用该方法测定了食品中的氨基酸。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1229 型高效毛细管电泳仪及 UV-254 紫外检测器 (北京新技术应用研究所)。未涂层熔融石英毛细管 (内径 75 μm , 总长 58.2 cm, 有效长度 43 cm, 河北永年光导纤维厂)。X-Y 记录仪 (四川仪表厂)。

对氨基苯磺酸钠 (湘中地质实验研究所, 分析纯), 鸟氨酸标准品 (Sigma, 生化试剂), 脯氨酸标准品 (上海政翔化学试剂研究所, 生化试剂), 谷氨酰胺标准品 (上海伯奥生物科技有限公司, 生化试剂)。1

mol/L 氢氧化钠溶液(分析纯)。所有实验用水均为石英亚沸蒸馏水。海天生抽(佛山市海天调味食品有限公司),青岛啤酒(青岛啤酒股份有限公司),氨基酸口服液(东莞市燕东保健品实业公司)。

1.2 试样处理

以石英亚沸蒸馏水配制含 Orn, Pro 和 Gln 标准品各 100 mg/L 的混合标准溶液。

将适量市售海天生抽、青岛啤酒和氨基酸口服液分别以石英亚沸蒸馏水稀释(稀释体积比分别为 1:100, 1:2 和 1:10), 稀释液经过滤后用于测定。

1.3 HPCE 条件

采用阳极端手动高差方式进样,进样高度 10 cm,进样时间 10 s。分离电压 12 kV,紫外检测波长 254 nm。运行缓冲液 5 mmol/L 对氨基苯磺酸钠-10 mmol/L KH_2PO_4 , pH 11.5(用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节);试样进入毛细管之前,均用 0.30 μm 微孔滤膜过滤。新毛细管需进行冲洗^[6]。每次进样前用石英亚沸蒸馏水、1 mol/L 氢氧化钠、石英亚沸蒸馏水和缓冲溶液各冲洗 2~3 min,并更换缓冲液瓶中缓冲溶液,以保证两缓冲液瓶中缓冲组分一致,保证分析精度。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的选择

2.1.1 对氨基苯磺酸钠浓度对峰高的影响

随着对氨基苯磺酸钠浓度的升高,各氨基酸的检测峰也升高,且保留时间较小,但当对氨基苯磺酸钠浓度继续增大时,各峰逐渐降低,且由于分离电流增大,保留时间随之延长,各峰形逐渐增宽^[7]。由图 1 可见,选择 5 mmol/L 对氨基苯磺酸钠时各氨基酸的检测峰较高。

2.1.2 酸度对迁移时间的影响

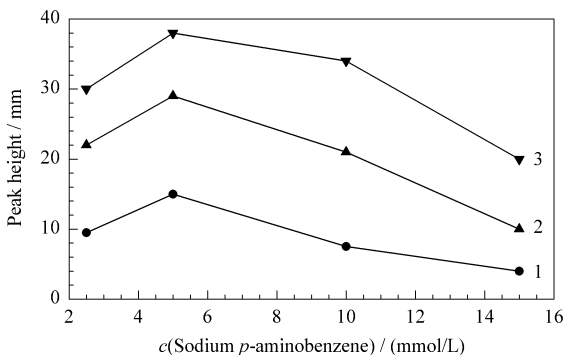


图 1 对氨基苯磺酸钠浓度对峰高的影响

Fig.1 Effect of concentration of sodium *p*-aminobenzenesulfonic acid on peak height

Running buffer: sodium *p*-aminobenzenesulfonic acid-10 mmol/L KH_2PO_4 , pH 11.5.

1. Orn; 2. Pro; 3. Gln.

采用高碱性缓冲体系,3 种氨基酸完全电离成为阴离子,有效地抑制了管壁的吸附^[5]。由图 2 可见,选择缓冲体系 pH 值为 11.5 时各氨基酸能达到基线分离,且分析时间较短。

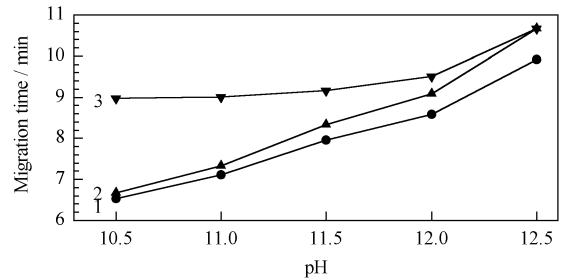


图 2 pH 值对迁移时间的影响

Fig.2 Effect of pH value of the buffer on migration time

Running buffer: 5 mmol/L sodium *p*-aminobenzenesulfonic acid-10 mmol/L KH_2PO_4 .

1. Orn; 2. Pro; 3. Gln.

2.1.3 磷酸盐浓度对迁移时间的影响

随着磷酸盐浓度的升高,缓冲体系的离子强度逐渐增加,电渗流减小,各峰迁移时间及分离度随着增大。但磷酸盐浓度过高,缓冲体系的离子强度过大,将产生大量的焦耳热,使区带增宽,峰高下降,检测灵敏度降低,磷酸盐浓度过高还会使分离电流增大,基线不稳定,从而对工作电极电位影响增大,不利于检测;而且缓冲液浓度增大,淌度变小,分析时间也随之增长^[8]。选择磷酸盐浓度为 10 mmol/L 时各峰能完全达到基线分离,分析时间较短,且各峰较高。

2.2 定量分析特征及其样品测定

在优化的分离体系(5 mmol/L 对氨基苯磺酸钠-10 mmol/L KH_2PO_4 , pH 11.5)下,Orn, Pro 和 Gln 混合标准溶液的分离谱图见图 3。定量分析特征参数及样品分析结果列于表 1 和表 2。

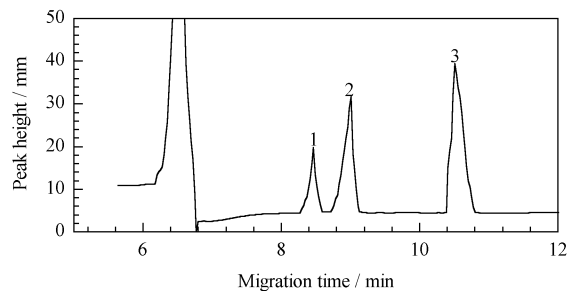


图 3 3 种氨基酸混合标准溶液的分离谱图

Fig.3 Electropherogram of a mixture of three amino acid standards

Running buffer: 5 mmol/L sodium *p*-aminobenzenesulfonic acid-10 mmol/L KH_2PO_4 , pH 11.5.

1. Orn; 2. Pro; 3. Gln.

表 1 定量分析特征参数
Table 1 Characteristic parameters of correlation curves

Amino acid	Regression equation	r	Linear range / (mg/L)	Detection limit/ (mg/L) ($S/N=3$)	RSD/($n=5$)	
					t_R	H
Orn	$H=0.458+0.0885c$	0.999	31.3-500	6.78	0.715	1.68
Pro	$H=2.04+0.138c$	0.999	15.6-500	8.71	0.599	1.98
Gln	$H=3.72+0.153c$	0.996	7.81-500	7.86	0.647	1.62

t_R : migration time; H : peak height; c : concentration of amino acids, mg/L.

表 2 样品分析及其加标回收率测定结果
Table 2 Analytical results of samples and the recoveries

Sample	Amino acid	Concentration/(mg/L)	Added/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery(RSD)/($n=5$) %
Haitian soybean sauce	Orn	-	-	-	-
	Pro	55.6	100	159.6	104 (2.56)
	Gln	85.7	100	185.3	99.6 (3.75)
Tsingtao beer	Orn	-	-	-	-
	Pro	186.0	100	282.8	96.8 (1.18)
	Gln	-	-	-	-
Amino acids tonic	Orn	18.7	100	118.7	99.5 (1.55)
	Pro	50.6	100	153.6	103 (3.23)
	Gln	10.3	100	109.2	98.9 (2.31)

致谢:在本课题研究期间,得到了南京工业大学硕士生导师、湛江师范学院生命科学与化学学院院长何金兰教授的严谨指导,在此表示衷心的感谢!

参考文献:

- [1] Shen Tong, Wang Jingyan. Biochemistry. 2nd ed. Beijing: High Education Press (沈同,王镜岩. 生物化学. 第 2 版. 北京:高等教育出版社),1990. 78,102
- [2] Stines A P, Naylor D J, Høj P B, van Heeswijck R. Plant Physiology, 1999, 120(11):923
- [3] Yang Lili, Yuan Zhuobin. Fresenius J Anal Chem, 1999,

365:541

- [4] Kuhr W G, Yeung E S. Anal Chem, 1988, 60(23):2642
- [5] Soga T, Ross G A. J Chromatogr A, 1999, 837:231
- [6] Chen Bing, He Jinlan. Chemistry (陈冰,何金兰. 化学通报),2001,(4):247
- [7] He Jinlan, Li Huiping, Chen Lie. Chemical Journal of Chinese Universities (何金兰,李惠萍,陈烈. 高等学校化学学报),1996,17(8):1198
- [8] Deng Yanzhuo, He Jinlan. High Performance Capillary Electrophoresis. Beijing: Science Press (邓延焯,何金兰. 高效毛细管电泳. 北京:科学出版社),1996. 65

《第七届全国石油化工色谱学术报告会》征文通知

由中国石油学会石油炼制分会举办的《第七届全国石油化工色谱学术报告会》将于 2004 年 9 月 24—27 日在北京举行。凡反映近年来在石油化工领域的各类色谱分析方法研究、应用经验交流及实验室信息管理系统(LIMS)开发与应用方面的论文均可应征。本次会议将邀请国内色谱界以及从事 LIMS 开发与应用的专家做大会报告,并就石油化工领域的色谱技术应用及 LIMS 发展进行研讨。

征文要求如下:内容简明扼要,写成含图表和参考文献不超过 3 页(A4 纸)的详细摘要,参考文献格式参见《色谱》2004 年第 1 期《征稿简则》;必须附有单位介绍信及未公开发表的证明。

本次会议论文由会议筹备组直接组织审查,请将稿件(打印稿一式两份)和单位证明直接寄至会议筹备组——北京市 914 信箱石油化工科学研究院一室杨海鹰处,邮编:100083,并在稿件上注明“第七届石油化工色谱会征文”字样。同时将论文通过 E-mail 发送至杨永坛信箱:yangyt@ripp-sinopec.com。征文截止日期为 2004 年 5 月底。

中国石油学会石油炼制分会
2003 年 11 月 20 日