

## 柱前衍生化-超高效液相色谱法快速测定酱油中的18种氨基酸

陈丽梅<sup>1,2</sup>, 尚艳芬<sup>2</sup>, 赵孟彬<sup>2</sup>, 刘虎威<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871; 2. 北京锦绣大地农业股份有限公司, 北京 100049)

**摘要** :建立了一种 6-氨基喹啉基-*N*-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯(AQC)柱前衍生,超高效液相色谱(UPLC)对酱油中 18 种氨基酸进行快速分离检测的方法。采用 BEH C18 色谱柱分离,在 260 nm 波长下检测,以乙酸铵-乙酸-乙腈-水和乙腈-乙酸为流动相,将流动相梯度和流速梯度相结合,在 12 min 内实现了 18 种氨基酸衍生物分离。方法的线性回归系数( $r^2$ )均大于 0.999,检出限为 0.032 ~ 0.12 mg/L,日间相对标准偏差(RSD)为 0.72% ~ 4.05%,在酱油中 18 种氨基酸的加标回收率为 90.2% ~ 103.7%。该方法前处理过程简单,分离时间短,是检测酱油中氨基酸的有效手段,可用于酱油的质量评定。

**关键词** :柱前衍生,超高效液相色谱,6-氨基喹啉基-*N*-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯,氨基酸,酱油

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)12-1154-04

## Rapid determination of 18 amino acids in soy sauce by ultra-performance liquid chromatography with pre-column derivatization

CHEN Limei<sup>1,2</sup>, SHANG Yanfen<sup>2</sup>, ZHAO Mengbin<sup>2</sup>, LIU Huwei<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China;  
2. Beijing Glorious Land Agricultural Company Limited, Beijing 100049, China)

**Abstract** : A rapid ultra-performance liquid chromatographic (UPLC) method was developed for the separation and determination of 18 amino acids in soy sauce by using 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxyl-succinimidyl-carbamate (AQC) as pre-column derivatization reagent. The 18 amino acids were separated within 12 min using a BEH C18 column, ultraviolet (UV) detection at 260 nm, ammonium acetate-acetic acid-acetonitrile-water and acetonitrile-acetic acid as the mobile phases with combined gradient elution and gradient flow-rate. A linear relationship between the UV absorbance and the concentration of each amino acid was obtained with the correlation coefficient ( $r^2$ ) above 0.999. The detection limits were ranged from 0.032 mg/L to 0.12 mg/L for different amino acids, and the overall relative standard deviations from 0.72% to 4.05%. The recoveries of 18 analytes in a spiked soy sauce were from 90.2% to 103.7%. With simple pretreatment of the samples and shorter analysis time, the proposed method can be applied to determine amino acids in soy sauce.

**Key words** : pre-column derivatization; ultra-performance liquid chromatography (UPLC); 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxy-succinimidyl-carbamate (AQC); amino acids; soy sauce

酱油是烹饪和食品加工中的重要调味料,是以大豆、小麦为原料,经过天然晾晒或发酵制成。在酱油酿造过程中,原料中的蛋白质经蛋白酶作用逐渐分解成氨基酸等人体需要的主要营养物质。氨基酸含量是评价酱油品质的重要指标,同时氨基酸种类

及含量也影响着酱油的风味<sup>[1]</sup>。目前酱油品质的分级主要是根据其中氨基酸态氮的含量进行。

用于氨基酸检测的色谱方法主要有液相色谱法(LC)<sup>[2-4]</sup>、气相色谱法(GC)、毛细管电泳法(CE)、离子交换色谱法(IEC)<sup>[5,6]</sup>及液相色谱-质谱/质谱

\* 通讯联系人:刘虎威,博士,教授。E-mail:hwliu@pku.edu.cn.  
基金项目:北京中关村科技园区海淀园博士后工作专项资助项目。  
收稿日期:2010-09-17

法(LC-MS/MS)<sup>[7,8]</sup>。由于氨基酸分子较小,且大部分没有紫外或荧光基团,因此利用 LC 检测氨基酸需要对其衍生后再进行检测。常用的衍生试剂有异硫氰酸苯酯(PITC)<sup>[9]</sup>、邻苯二甲酐(OPA)<sup>[10,11]</sup>、氯甲酸苄基酯(FMOC-Cl)<sup>[12]</sup>、6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚胺(AQC)<sup>[13]</sup>等。

酱油中氨基酸态氮的标准检测方法是将氨基酸衍生后,通过滴定来测定含氮量。但这种方法只能测定氮的总含量,不能测定氨基酸的种类,也无法检测氨基酸态氮是否全部来自氨基酸。利用 LC 可解决这一问题。目前用于测定酱油中氨基酸的方法有电化学检测(IEC)<sup>[14]</sup>以及柱前衍生-LC 结合紫外或荧光检测<sup>[15]</sup>。

本文以 AQC 为衍生试剂对氨基酸进行柱前衍生(衍生化反应见图 1),然后采用超高效液相色谱(UPLC)对酱油中 18 种氨基酸进行分离检测,获得了满意的结果,为酱油的质量评定提供了更加有效的方法。

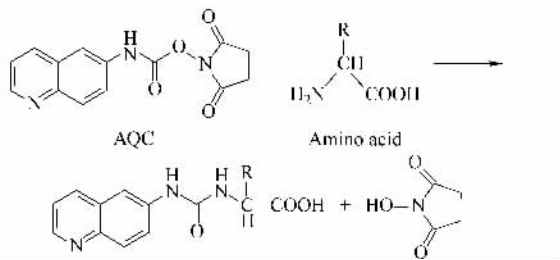


图 1 AQC 衍生反应示意图

Fig. 1 Schematic diagram of AQC derivatization

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

Acquity 超高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(PDA)(美国 Waters 公司)。DZG6050 型恒温真空干燥箱(上海森信实验仪器有限公司)。

AccQ-Tag 荧光衍生试剂盒(包括硼酸盐缓冲溶液、衍生试剂 AQC、乙腈)(美国 Waters 公司)。乙酸和乙酸铵为国产分析纯试剂。实验用水为娃哈哈纯净水。氨基酸混合标准溶液由中国计量科学研究院提供,包括组氨酸(His, 158.2 mg/L)、丝氨酸(Ser, 124.0 mg/L)、精氨酸(Arg, 162.0 mg/L)、甘氨酸(Gly, 96.1 mg/L)、天冬氨酸(Asp, 143.7 mg/L)、谷氨酸(Glu, 160.4 mg/L)、苏氨酸(Thr, 137.0 mg/L)、丙氨酸(Ala, 104.2 mg/L)、脯氨酸(Pro, 248.7 mg/L)、半胱氨酸(Cys, 72.7 mg/L)、赖氨酸(Lys, 115.5 mg/L)、酪氨酸(Tyr, 184.8 mg/L)、蛋氨酸(Met, 164.1 mg/L)、缬氨酸(Val,

125.4 mg/L)、异亮氨酸(Ile, 131.2 mg/L)、亮氨酸(Leu, 135.1 mg/L)、苯丙氨酸(Phe, 173.4 mg/L)。色氨酸(Trp, 204.2 mg/L)购自北京市营养源研究所。4 种品牌的实际酱油样品购于北京锦绣大地批发市场。

### 1.2 实验步骤

移取氨基酸混合标准溶液 0.25 mL 置于 5 mL 容量瓶中,用乙腈-水(10:90, v/v)溶液定容,配制成中间标准溶液,再将该溶液稀释至所需浓度。

取 5  $\mu$ L 氨基酸混合标准溶液,加入 35  $\mu$ L 硼酸盐缓冲溶液,涡旋混合 10 s,加入 10  $\mu$ L AccQ-Tag 荧光衍生试剂盒中的衍生试剂溶液,涡旋混合 10 s,封口膜封口,室温下放置 1 min 后于 55  $^{\circ}$ C 下加热 30 min,然后冷却至室温,直接进样分析。

取实际酱油样品 0.05 mL 加入到 10 mL 容量瓶中,用 2% 甲酸-乙腈(90:10, v/v)溶液定容,用 0.2  $\mu$ m 膜过滤后,按照上述方法进行衍生化处理,然后进样分析。

### 1.3 色谱条件

色谱柱:BEH C18(100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m, 美国 Waters 公司);检测波长:260 nm;柱温:40  $^{\circ}$ C;进样量 2  $\mu$ L;流动相(A)乙腈-乙酸(98:2, v/v)(B)15 mmol/L 乙酸铵水溶液-乙腈-乙酸-水(4.2:0.5:0.3:95, v/v/v/v)。采用流动相浓度梯度和流速梯度结合的洗脱方式,洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Program of gradient elution

Time/ min	$\phi$ (A)/ %	$\phi$ (B)/ %	Flow rate/ (mL/min)	Curve
0.00	0.1	99.9	0.5	-
0.54	0.1	99.9	0.5	6
5.74	9.1	90.9	0.6	7
7.74	21.2	78.8	0.6	6
8.04	59.6	40.4	0.6	6
8.64	59.6	40.4	0.6	6
9.00	0.1	99.9	0.6	6
9.50	0.1	99.9	0.5	6
12.0	0.1	99.9	0.5	6

Mobile phases : A , acetonitrile-acetic acid ( 98 : 2 , v/v ) ; B , ammonium acetate-acetonitrile-acetic acid-water ( 4 . 2 : 0 . 5 : 0 . 3 : 95 , v/v/v/v ) .

## 2 结果与讨论

### 2.1 分离条件的优化

我们首先采用文献[16]的分离条件对氨基酸进行分离,但由于所采用的色谱柱不同,分离效果并不理想,因此我们对分离条件进行了优化。

#### 2.1.1 水相中盐含量对分离的影响

流动相 B 中乙酸铵缓冲盐的含量对分离有较

明显的影响。随着缓冲盐浓度的增加,各种氨基酸的保留时间均增加,Arg 和 Ser 的分离度增加,但 Leu、Ile、Phe 及 Trp 的分离度随之变小,Tyr 的保留时间随盐浓度变化明显。实验证明,当盐浓度为 15 mmol/L 时,各个组分分离较好。

### 2.1.2 酸含量对分离的影响

考察了流动相 B 中乙酸含量对分离度的影响。结果表明,随着酸含量的增加,Arg 和 Ser 分离度增大,但 Leu、Ile、Phe 及 Trp 分离度有所下降,Tyr 与衍生物副产物之间的分离度减小。为了取得较好的分离效果,我们选择流动相 B 中 15 mmol 乙酸铵水溶液、乙腈、乙酸、水的体积比为 4.2:0.5:0.3:95。

### 2.1.3 流速对分离的影响

经过以上优化,Leu、Ile、Phe 及 Trp 4 个峰仍未达到基线分离。为此,我们又优化了流动相梯度,但对这 4 种氨基酸的分离度并没有得到明显的改善。最后我们通过改变流速得到了较好的结果。

当流速为 0.6 mL/min 时,Leu、Ile、Phe 及 Trp 达到了基线分离。但当流速为 0.6 mL/min 和 0.5 mL/min 时,Arg 和 Ser、Asp 中间有些小杂质峰不能得到基线分离,因此我们采用流速梯度的方法,使所有氨基酸和杂质得到了很好的分离。

最终优化条件下得到的氨基酸混合标准溶液色谱图见图 2。

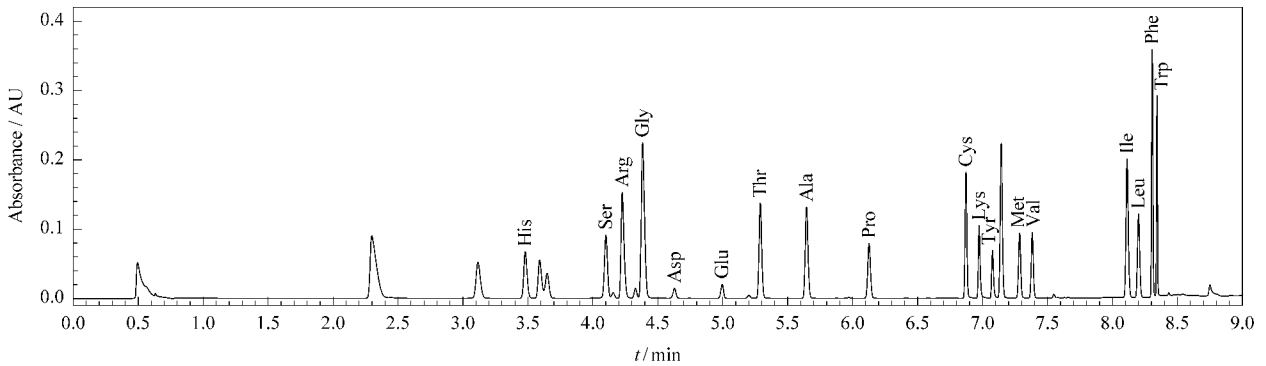


图 2 氨基酸混合标准溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a mixed solution of amino acid standards

## 2.2 方法的评价

在优化的色谱条件下,对本文所建立的 18 种氨基酸分析方法进行了方法学考察,结果列于表 2。从表 2 中可以看出,其定量线性关系良好,每种氨基酸的回归方程的线性相关系数  $r^2$  均大于 0.999;检

出限为 0.032 ~ 0.12 mg/L;对质量浓度为 7.27 ~ 24.9 mg/L 的混合标准溶液检测的日内相对标准偏差(RSD)为 0.083% ~ 0.39%,日间 RSD 为 0.72% ~ 4.05%。结果表明所建立的方法能够满足实际样品分析的要求。

表 2 18 种氨基酸的回归方程、线性范围、相关系数( $r^2$ )、检出限和重复性(RSD)

Table 2 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients ( $r^2$ ), detection limits and repeatabilities (RSD) for determination of 18 amino acids

Amino acid	Regression equation	Linear range/(mg/L)	$r^2$	Detection limit/(mg/L)	RSD/% ( $n=5$ )
Ser	$A = 10128C + 120.93$	0.79 - 15.83	0.9999	0.068	0.23
Arg	$A = 13491C + 3622.6$	0.62 - 12.4	0.9996	0.041	0.39
Gly	$A = 7780.2C - 134.09$	0.81 - 16.2	1.0000	0.094	0.30
Asp	$A = 18475C + 2527.7$	0.48 - 9.60	0.9998	0.032	0.28
Glu	$A = 9878C + 1710.8$	0.71 - 14.37	0.9997	0.065	0.29
Thr	$A = 8672.8C + 1555.3$	0.80 - 16.03	0.9998	0.072	0.083
Ala	$A = 11134C + 1227$	0.68 - 13.70	0.9999	0.058	0.18
Pro	$A = 14356C + 1043.8$	0.52 - 10.42	0.9998	0.045	0.15
Cys	$A = 10437C + 1933.8$	1.24 - 24.87	0.9998	0.063	0.20
Lys	$A = 16726C - 1396.7$	0.36 - 7.26	0.9992	0.044	0.23
Tyr	$A = 12211C - 1025.1$	0.58 - 11.55	0.9997	0.065	0.21
Met	$A = 6807C - 1090.3$	0.92 - 18.48	0.9991	0.12	0.22
Val	$A = 8667.5C + 2426.2$	0.82 - 16.41	0.9996	0.070	0.22
Ile	$A = 11052C + 1097.8$	0.63 - 12.54	0.9998	0.059	0.32
Leu	$A = 9952.2C + 1174.1$	0.66 - 13.12	0.9999	0.062	0.31
Phe	$A = 9446.7C + 1148.4$	0.68 - 13.51	0.9997	0.068	0.32
Trp	$A = 7522.5C + 864.94$	0.88 - 17.34	0.9997	0.086	0.16
His	$A = 6043.5C + 1845.4$	1.02 - 20.422	0.9998	0.098	0.088

A: peak area; C: mass concentrations of the amino acid, mg/L.

### 2.3 加标回收实验及酱油中氨基酸含量测定

取酱油样品 4 0.05 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加入氨基酸混合标准溶液 0.05 mL,按照实际样品处理方法进行定容和分析,得到 18 种氨基酸的加标回收率为 90.2% ~ 103.7%。

对 4 种酱油中的氨基酸含量进行测定,结果见图 3。从图 3 中可看出,酱油中含有丰富的氨基酸,其中 Ser、Gly、Glu、Asp、Thr、Ala、Pro、Lys、Val、

Leu、Ile、Phe 含量较多,其他氨基酸含量较少。酱油中除了发酵得到的氨基酸外,也有添加的 Glu 存在。从氨基酸含量上看,酱油样品 2 和 3 的氨基酸总含量比较接近,但酱油样品 3 中 Glu 含量很高,其他氨基酸含量较少,说明谷氨酸钠添加量较高,这也说明同一级别的酱油样品质量还是有区别的。因此,本文所建立的方法可有效地测定酱油中的氨基酸含量,有望用于酱油质量的准确判别。

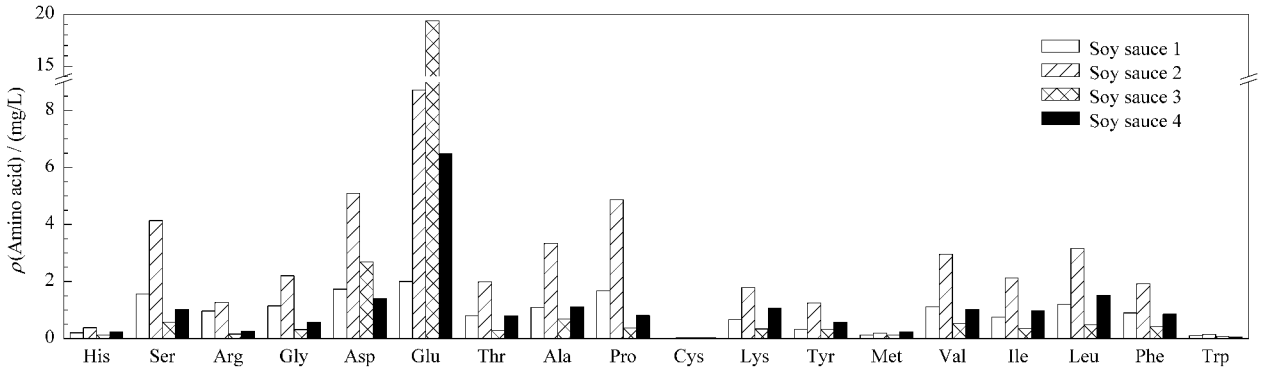


图 3 4 种酱油中 18 种氨基酸的含量

Fig. 3 Mass concentrations of 18 amino acids in four soy sauce samples

### 3 结论

以 AQC 为柱前衍生化试剂,建立了 UPLC 测定酱油中 18 种氨基酸的快速分离分析方法,分析时间只有 12 min,整个分析流程不超过 1 h。通过对实际酱油样品的检测,发现酱油中含有丰富的氨基酸,其中 Ser、Gly、Glu、Asp、Thr、Ala、Pro、Lys、Val、Leu、Ile、Phe 含量较多,其他氨基酸含量较少。该方法能够准确测定酱油中氨基酸的种类和含量,有望用于酱油质量的准确判别。

#### 参考文献:

[ 1 ] Zhou Y Z. Jiangsu Condiment and Subsidiary Food( 周永治. 江苏调味副食品 ), 2008, 25( 3 ): 30

[ 2 ] Liu H T, Zhang R J, Wu Y, et al. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics( 刘海涛, 张润婕, 吴艳, 等. 中国生化药物杂志 ), 2007, 28( 4 ): 233

[ 3 ] Jiang W, Wang J. Chinese Journal of Health Laboratory Technology( 姜雯, 王棘. 中国卫生检验杂志 ), 2008, 18( 2 ): 280

[ 4 ] Huang X, Kang X J, Meng Y B. Journal of Laboratory Medicine( 黄晓, 康学军, 蒙艳斌. 检验医学 ), 2009, 24( 2 ): 157

[ 5 ] Ding Y S, Mou S F. Chinese Journal of Chromatography( 丁永胜, 牟世芬. 色谱 ), 2004, 22( 3 ): 210

[ 6 ] Cai Y Q, Liu J S, Mou S F. Chinese Journal of Analytical Chemistry( 蔡亚岐, 刘京生, 牟世芬. 分析化学 ), 2005, 33( 4 ): 475

[ 7 ] Mariella Z, Lorena G, Franco Z, et al. J Chromatogr B, 2006, 831: 267

[ 8 ] Wang H Y, Hu P, Jiang J. Journal of Instrumental Analysis( 王洪允, 胡蓓, 江骥. 分析测试学报 ), 2007, 26( 8 ): 32

[ 9 ] Cohen S A, Strydom D J. Anal Biochem, 1988, 174( 1 ): 1

[ 10 ] Schwarz E L, Roberts W L, Pasquali M. Clin Chim Acta, 2005, 354( 1/2 ): 83

[ 11 ] Wang J, Shen L L, Cao Y X, et al. Journal of Laboratory Medicine( 王锦, 沈霖霖, 曹银祥, 等. 检验医学 ), 2005, 20( 5 ): 424

[ 12 ] Jámbo A, Molnár-Perl I. J Chromatogr A, 2009, 1216: 3064

[ 13 ] Lourdes B, Amparo A, Rosaura F. J Chromatogr B, 2006, 831: 176

[ 14 ] Mo S M, Liang L N, Cai Y Q, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory( 墨淑敏, 梁立娜, 蔡亚岐, 等. 分析试验室 ), 2006, 25( 5 ): 36

[ 15 ] Ge D M, Zong W W, Zhu X M, et al. China Brewing( 葛冬梅, 宗雯雯, 朱笑梅, 等. 中国酿造 ), 2008( 13 ): 75

[ 16 ] Wu L M, Zhou J H, Xue X F, et al. J Food Compos Anal, 2009, 22( 3 ): 242