

# LC-30A自动柱前衍生法分析蜂蜜中的氨基酸

## LC-062

**摘要：**本文使用岛津LC-30A液相色谱仪建立了自动柱前衍生法同时测定蜂蜜中的十几种氨基酸。以邻苯二甲醛(OPA)为柱前衍生剂，使用C<sub>18</sub>柱，乙腈/甲醇和0.05 mol/L的醋酸钠(pH6.5)为流动相，荧光检测器的激发波长为330 nm，发射波长为440 nm。各氨基酸标准曲线的线性相关系数在0.9974至1.0000之间，保留时间的RSD%在0.02%-0.06%之间，峰面积的RSD%在0.73%-6.44%之间，结果的重现性良好。0.5 μmol/L的氨基酸标准溶液的信噪比S/N的平均值在2201-126824之间，具有很高的检测灵敏度。此方法省去了繁琐的前处理步骤，每个样品的总分析时间仅需1小时。

**关键词：**反相液相色谱 自动柱前衍生法 氨基酸 蜂蜜

氨基酸是生物功能大分子蛋白质的基本组成单位，是构成人类和动物营养所需蛋白质的基本物质。人体所需的氨基酸约有22种，分为必需氨基酸和必需氨基酸(须从食物中供给)。必需氨基酸指人体(或其它脊椎动物)不能合成或合成速度远不适应机体的需要，必需由食物蛋白供给，这些氨基酸称为必需氨基酸。

蜂蜜是蜜蜂采集鲜花分泌的花蜜，经过蜜蜂反复酿造转化而成的食物。蜂蜜中含有多种氨基酸，且含有生物活性很强的蔗糖转化酶和淀粉酶等，这些酶使蜂蜜具有其他糖类食品所没有的特殊功能。不同蜜源和产地的蜂蜜具有的医药和营养功效也不同，人们开始关注和寻找区分蜂蜜蜜源和产地的方法，而通过氨基酸的含量和相对比例的不同可在一定程度上判断这一特征。

本实验中即建立了一种快捷方便的氨基酸分离检测方法，并应用于蜂蜜样品的分析。

## 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

#### 1.1.1 试剂

乙腈、甲醇、乙酸，HPLC级；醋酸钠、邻苯二甲

醛(OPA)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)，硼酸钠、氢氧化钠，分析纯；氨基酸标准品。

#### 1.1.2 仪器

LC-30A液相系统

#### 1.2 色谱条件

色谱柱：Shim-pack VP-ODS (4.6 mm I.D.×250 mm L.,5 μm)；流动相：A：0.05 mol/L的醋酸钠缓冲液，pH6.5；B：甲醇/乙腈=7/3(v/v)；流速：1.0 mL/min；洗脱方式：梯度洗脱(梯度见表1)；柱温：35℃；激发波长：330 nm，发射波长：440 nm，进样量：20 μL。

表1 梯度洗脱程序

Time	Value
0	10
1	10
35	40
40	40
45	90
50	90
50.1	10
60	Stop

### 1.3 样品配制

#### 1.3.1 氨基酸标准溶液的配制

用0.1 mol/L的盐酸稀释2.5 mmol/L的氨基酸混合标准溶液，配制成0.1 mmol/L的氨基酸储备液。然后用纯水稀释氨基酸混标溶液至10 μmol/L、5.0 μmol/L、2.0 μmol/L、1.0 μmol/L、0.5 μmol/L，用来检测分析得的标准曲线。

#### 1.3.2 蜂蜜样品溶液的配制

准确称取1.0 g蜂蜜样品，用纯水定容至50 mL，配制成20 mg/mL的蜂蜜样品溶液。样品经自动柱前衍生后直接进样分析。

#### 1.3.3 氨基酸衍生方法

取12 μL蜂蜜样品置于2 mL进样瓶中，加入12 μL衍生试剂，再加入18 μL水，用进样针混合5次后，静置反应1 min，吸取20 μL进样分析。

衍生试剂的配置：

OPA试剂：50 mg OPA溶解于10 mL甲醇（4可保存10天）；

NAC试剂：400 mg NAC溶解于0.2 mol/L硼酸盐（pH9.5）（4可保存14天）；

临使用前将OPA试剂和NAC试剂以4:1(v/v)比例混合。

## 结果与讨论

### 2.1 氨基酸标准样品的标准曲线结果

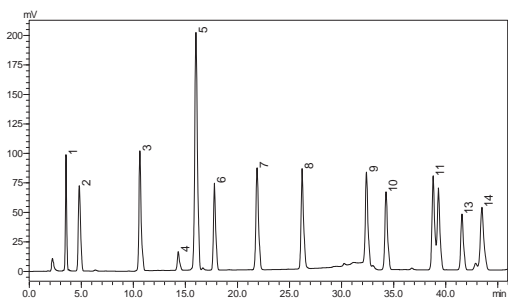


图1 氨基酸标准样品的色谱图

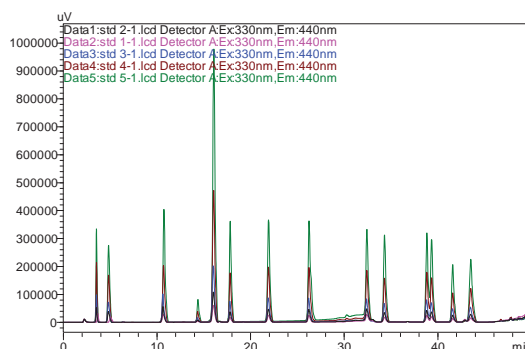
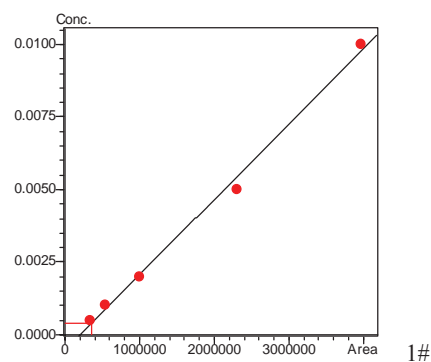


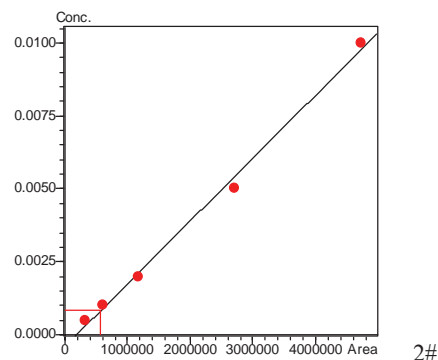
图2 五个不同浓度的氨基酸标准样品的色谱图

图1是浓度为2 μmol/L的氨基酸衍生后的色谱图，图2是五个不同浓度的氨基酸标准溶液衍生后得到的色谱图。各氨基酸的校准曲线及方程如下所示。各组分的标准曲线线性关系良好，除第1个和第2个色谱峰的R值为0.9974和0.9977外，其余氨基酸色谱峰的R值均在0.9987以上。



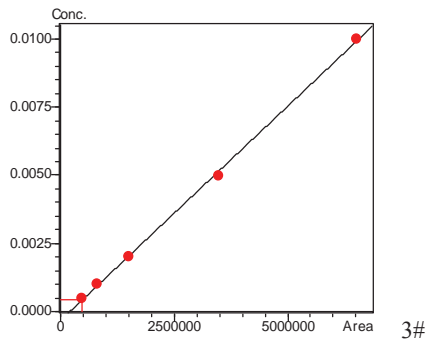
$$Y=(2.59065e-009)X+(-0.000522293)$$

$$R=0.9974$$



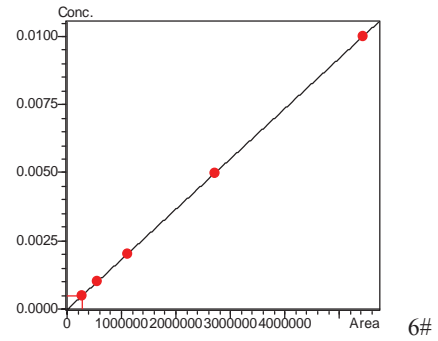
$$Y=(2.15384e-009)X+(-0.000406441)$$

$$R=0.9977$$



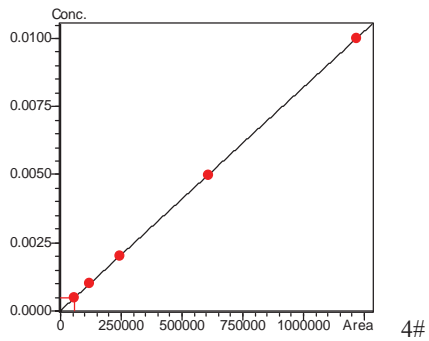
$$Y=(1.57341e-009)X+(-0.000325801)$$

$$R=0.9997$$



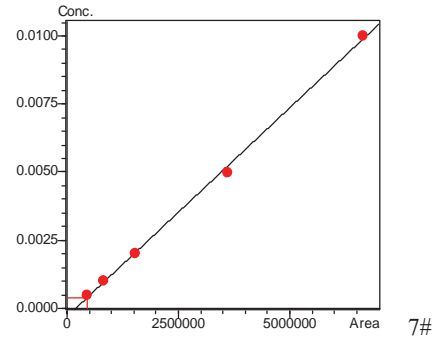
$$Y=(1.84781e-009)X+(-3.06838e-005)$$

$$R=1.0000$$



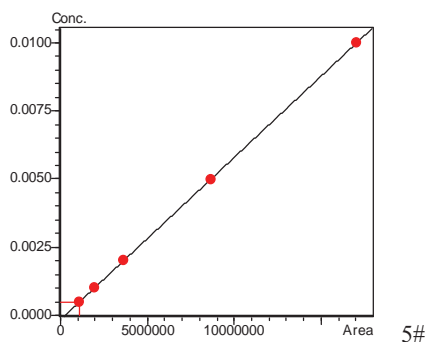
$$Y=(8.20580e-009)X+(9.75114e-006)$$

$$R=1.0000$$



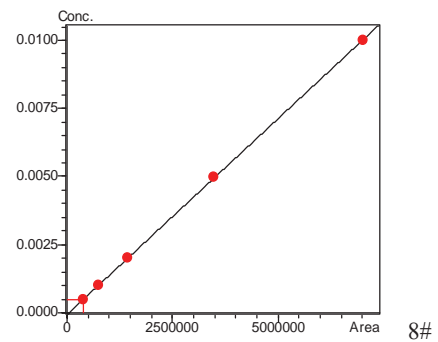
$$Y=(1.53513e-009)X+(-0.000304350)$$

$$R=0.9993$$



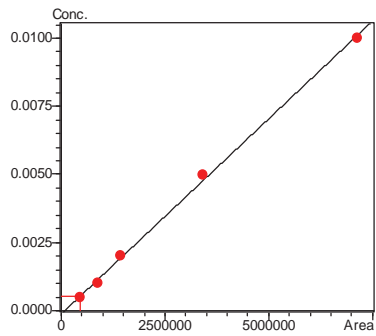
$$Y=(5.96321e-010)X+(-0.000164091)$$

$$R=1.0000$$



$$Y=(1.43855e-009)X+(-6.82176e-005)$$

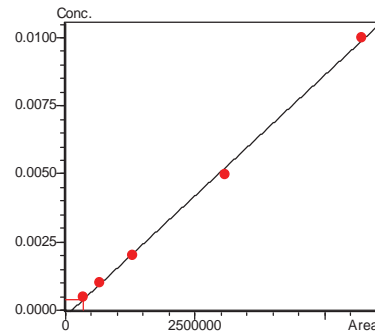
$$R=1.0000$$



9#

$$Y=(1.43345e-009)X+(-0.000126121)$$

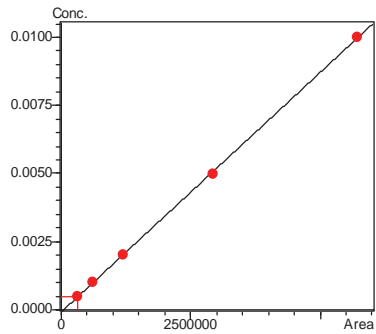
R=0.9993



12#

$$Y=(1.66867e-009)X+(-0.000363475)$$

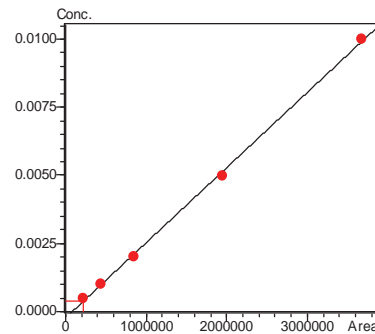
R=0.9994



10#

$$Y=(1.75911e-009)X+(-8.12133e-005)$$

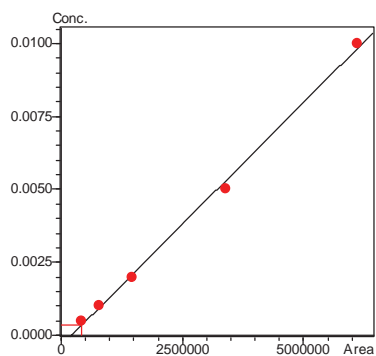
R=0.9999



13#

$$Y=(2.75916e-009)X+(-0.000230144)$$

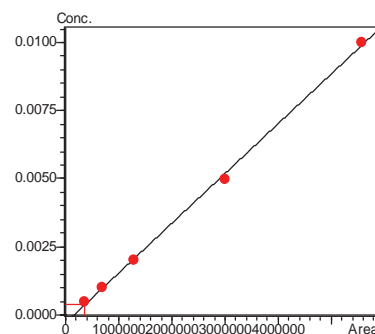
R=0.9995



11#

$$Y=(1.66868e-009)X+(-0.000363582)$$

R=0.9987



14#

$$Y=(1.82799e-009)X+(-0.000289114)$$

R=0.9994

## 2.2 方法的重现性和灵敏度

为了进一步考察该方法的重现性和灵敏度，本文对不同浓度的氨基酸标准样品均进行了3次重复实验，以2  $\mu\text{mol/L}$ 的氨基酸标准溶液为例，重现性结果(RSD%表示)汇总如下，见表2和表3。保留时间的RSD%在0.02%-0.06%之间，峰面积的RSD%在0.73%-6.44%之间，结果的重现性良好。同时，各种不同浓度的氨基酸溶液的信噪比的结果汇总于表4。其中，0.5  $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液的信噪比S/N的平均值在2201-126824之间，该方法具有很高的检测灵敏度。

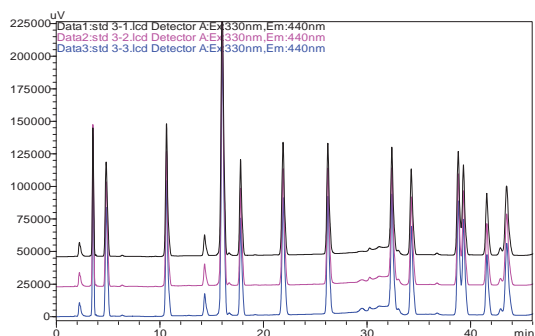


图3 氨基酸标准溶液的3次重复分析结果

表2 氨基酸标准溶液的保留时间的重现性结果

Peak#	1st	2nd	3rd	Average	RSD%
1	3.53	3.53	3.53	3.53	0.03
2	4.81	4.81	4.81	4.81	0.06
3	10.63	10.63	10.64	10.63	0.06
4	14.31	14.32	14.33	14.32	0.05
5	16.01	16.02	16.03	16.02	0.04
6	17.79	17.79	17.80	17.79	0.04
7	21.88	21.89	21.90	21.89	0.03
8	26.21	26.22	26.22	26.21	0.02
9	32.39	32.39	32.40	32.39	0.02
10	34.27	34.28	34.28	34.28	0.02
11	38.79	38.80	38.81	38.80	0.02
12	39.30	39.31	39.32	39.31	0.02
13	41.56	41.57	41.57	41.57	0.02
14	43.47	43.48	43.49	43.48	0.02

表3 氨基酸标准溶液的峰面积的重现性结果

Peak#	1st	2nd	3rd	Average	RSD%
1	1018526	1023315	1137813	1059885	6.37
2	1088253	1190900	1235464	1171539	6.44
3	1482244	1510292	1513881	1502139	1.15
4	237408	247114	250531	245018	2.78
5	3641343	3692412	3680445	3671400	0.73
6	1099951	1113448	1116570	1109990	0.80
7	1507480	1554777	1568772	1543676	2.08
8	1411096	1455932	1471179	1446069	2.16
9	1351601	1466621	1515997	1444740	5.84
10	1175028	1203233	1211853	1196705	1.61
11	1393490	1494015	1531031	1472845	4.83
12	1245554	1300739	1322261	1289518	3.07
13	855050	851197	837234	847827	1.11
14	1260988	1294558	1305331	1286959	1.80

表4 各浓度的氨基酸标准溶液的信噪比结果汇总

Peak#	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
1	3530	3637	3730	3745	3735
2	2201	2418	2353	2616	2417
3	12442	13929	14216	10467	12820
4	23776	23834	23751	23464	23600
5	18646	18596	18881	20035	21512
6	34749	35380	35913	36330	36726
7	38194	39182	39850	40479	40838
8	66674	67144	67601	67142	64368
9	79514	78879	88321	88072	85644
10	92491	93756	94707	95479	96283
11	113586	117250	119312	120504	121659
12	115835	116415	116749	116842	117824
13	126824	127774	128474	128407	129679
14	80593	85748	88858	90479	91218

### 2.3 蜂蜜样品的分析结果

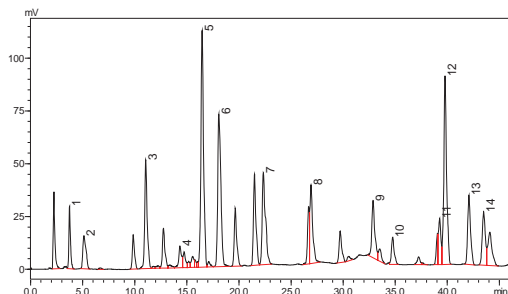


图4 蜂蜜样品中氨基酸分析的色谱图

从分析结果中可见，1 g蜂蜜中的氨基酸含量从1.97  $\mu\text{g}$ 到24.08  $\mu\text{g}$ 不等。其中，含量比较高的氨基酸如精氨酸、亮氨酸、赖氨酸等都是人体必需氨基酸。

表5 蜂蜜中氨基酸分析的定量结果

Peak#	AA	Area	Conc.	S/N	$\mu\text{g AA}$ /g honey
1	Asp	316002	0.296	4630	1.97
2	Glu	330414	0.305	2446	2.24
3	Asp	849723	1.011	8042	6.72
4	Gln	124202	1.029	1165	7.51
5	Gly	1957518	1.003	17462	3.76
6	Arg	1514352	2.768	11245	24.08
7	Ala	948722	1.152	6791	5.13
8	Tyr	675393	0.903	5813	8.17
9	Val	549907	0.662	4231	3.87
10	Phe	236199	0.334	1999	2.76
11	His	361156	0.239	3403	1.85
12	Ile	1645983	2.383	13917	15.61
13	Lys	632149	1.514	5117	11.05
14	Leu	437724	0.511	2450	3.35

### 讨论

本报告中使用LC-30A自动进样系统，利用OPA柱前衍生法同时检测了十几种氨基酸的混合标准溶液，并成功地应用于蜂蜜中氨基酸含量的分析。本法具有快速便捷和灵敏度高的优点，省去了繁琐的样品前处理步骤，可广泛应用于医药、食品等样品的氨基酸含量分析。