

文章编号: 1674-5566(2013)04-0629-05

## HPLC 法快速测水产品中游离芳香族氨基酸含量的研究

邱伟强<sup>1,2</sup>, 刘冰宣<sup>1</sup>, 陈舜胜<sup>1,2</sup>, 谢晶<sup>1,2</sup>, 黄鑫<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 江西省铅山县农业局, 江西 铅山 334500)

**摘要:** 建立了水产品中3种游离芳香族氨基酸含量的HPLC测定方法。试验确定了流动相的最佳pH、流速及浓度,并评价了方法的准确度、精密度和检测限。采用5%高氯酸溶液提取,用KOH溶液中和后进行HPLC分析。采用Waters Atlantis T3 C18(4.6×250 mm, 5 μm)色谱柱分离,以15%甲醇-85%磷酸盐溶液为流动相,用磷酸调pH为6.0;色谱条件流速:0.9 mL/min;柱温:27℃;检测波长:256.7 nm;12 min内完成测定。结果表明:Tyr、Phe、Trp分别在6~500 μg/mL、30~1 000 μg/mL和3~250 μg/mL范围内有良好的线性关系,其线性相关系数( $R^2$ )在0.998 6~0.999 5之间。三者的检测限分别为2 μg/mL、10 μg/mL、1 μg/mL,加标回收率在88.0%~105.2%之间。方法操作简便且定性可靠、定量准确。

**研究亮点:** 以往的HPLC法分离氨基酸或种类有限,或前处理复杂。特别是水产品中游离芳香族氨基酸的分离测定,目前尚未有一种快速可靠的HPLC方法。本文建立了HPLC紫外法测水产品中游离芳香族氨基酸的含量,该法具有无需衍生及梯度洗脱等优点,并通过方法学验证稳定可靠,弥补了其他方法的一些缺点。

**关键词:** 水产品;高效液相色谱;芳香族氨基酸;苯丙氨酸;酪氨酸;色氨酸

**中图分类号:** S 985

**文献标志码:** A

芳香族氨基酸包括苯丙氨酸(Phenylalanine, Phe)、酪氨酸(Tyrosine, Tyr)、色氨酸(Tryptophane, Trp)等,其中Phe、Trp属于人体内必需氨基酸,Tyr属于半必需氨基酸<sup>[1-2]</sup>。据报道芳香族氨基酸在肝、肾、神经精神疾病等诊断中有很重要的作用<sup>[3-5]</sup>,同时它们对水产食品的营养和风味也有重要贡献。因此,准确测定分析芳香族氨基酸的含量在蛋白质化学研究中有非常重要的意义。

目前测定芳香族氨基酸含量的方法主要有高效液相色谱法<sup>[6-7]</sup>、荧光法<sup>[8-9]</sup>、离子交换色谱法<sup>[10]</sup>、毛细管电泳法<sup>[11]</sup>、质谱法<sup>[12]</sup>等。其中以HPLC衍生法为代表,因其灵敏度高且可同时测定20余种氨基酸,但该方法样品前处理复杂,需梯度洗脱,且衍生产物不稳定;荧光法操作简便,但由于Phe、Tyr及Trp的荧光特性不一致,不能在

同一波长下同时对其进行测定;离子交换色谱法对氨基酸等兼性离子化合物能很好的分离,但其需要对分离柱进行平衡(再生),分析时间较长;毛细管电泳法、质谱法对芳香族氨基酸的分辨率较高,但存在仪器昂贵、重复性较差等不足之处。

以往的HPLC法测定氨基酸或种类有限,或前处理复杂。特别是水产品中芳香族氨基酸的测定,目前尚未有一种快速可靠的HPLC方法。本文建立了测定水产品中芳香族氨基酸含量的HPLC紫外法,该法具有无需衍生及梯度洗脱等优点。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要仪器和材料

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国Waters),配有Waters 2996 二极管阵列检测器及

收稿日期: 2013-03-11 修回日期: 2013-05-07

基金项目: “十二五”国家支撑计划项目(2013BAD19B06);上海市科学技术委员会工程中心建设项目(11DZ2280300)

作者简介: 邱伟强(1984—),男,博士研究生,研究方向为水产品加工及贮藏。E-mail: wqqu@shou.edu.cn

通信作者: 陈舜胜, E-mail: sschen@shou.edu.cn

Empower2 色谱软件;日本岛津 KUBOTA 520 离心机;日本岛津 SK8200 HP 超声仪;日本 YAMATO 匀浆机;梅特勒 AB104-N 分析天平。

实验用的水产品(鲜活的南美白对虾)购置于上海市浦东新区芦潮港菜市场,并将整虾置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冻藏。

## 1.2 试剂

L-Phe、L-Tyr、L-Trp 等标准品均购于 Sigma 公司;甲醇为色谱级,磷酸氢二钾;磷酸二氢钾,氢氧化钾,磷酸等为优级纯;高氯酸,三氯乙酸、磺基水杨酸等为分析纯,均购于国药集团化学试剂有限公司。实验用水为超纯水。

## 1.3 一般色谱条件

色谱柱:美国 Waters Atlantis T3 C18 ( $4.6 \times 250\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) 色谱柱;流动相为 A:B = 15:85, A 为甲醇溶液, B 为  $0.05\text{ mol/L}$  磷酸氢二钾和磷酸二氢钾溶液,用磷酸调 pH 至 6.0;等度洗脱;流速: $0.9\text{ mL/min}$ ;进样量: $30\text{ }\mu\text{L}$ ;柱温: $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;检测波长: $256.7\text{ nm}$ 。

## 1.4 标准溶液的配制及标准曲线

用 2.5% 的高氯酸溶液配制 3 种芳香族氨基酸标准混合储备液,使 Phe、Tyr 及 Trp 的浓度分别为  $1\text{ }000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $250\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,并用 2.5% 的高氯酸溶液将氨基酸标准混合储备液依次稀释 2、5、10、20、50 倍,分别取上述  $30\text{ }\mu\text{L}$  混合标准溶液进行上机测定,根据保留时间定性,以所测峰面积与其相应的浓度作图,并绘制标准曲线。

## 1.5 水产品中游离芳香族氨基酸的制备

取解冻好的去壳虾肉  $5.0\text{ g}$ ,加入预冷  $10\text{ mL}$  5% 的高氯酸匀浆 2 min,用玻璃棒搅拌均匀,在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  下  $10\text{ }000\text{ r/min}$  离心 20 min,取上清液过滤,过滤后的沉淀物加入预冷的 5% PCA 溶液再进行浸提、离心,重复 2 次后合并上清液,用 KOH 溶液中和至 pH 为 6.0。中和时先加  $5\text{ mol/L}$  的 KOH 溶液调节,待接近至所需 pH 时,改用  $1\text{ mol/L}$  的 KOH 溶液调节。用超纯水定容至  $50\text{ mL}$  容量瓶中。取上述样液  $2\text{ mL}$ ,经孔径为  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  的水相滤膜过滤后,进行上机进样分析。

## 1.6 结果与分析

采用峰保留时间比较法及标准品叠加法对 Phe、Tyr 及 Trp 进行定性分析,用外标法进行定量分析,计算公式如下:

$$X = (C \times V) / 1\text{ }000\text{ }m \quad (1)$$

式中: $X$  为样品中氨基酸的含量( $\text{g/kg}$ ); $C$  为由工作曲线上查出的样品液中芳香族氨基酸的浓度( $\mu\text{g/mL}$ ); $V$  为样品提取液的体积( $\text{mL}$ ); $m$  为样品的质量( $\text{g}$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取溶剂的选择

本试验比较了磺基水杨酸、三氯乙酸、高氯酸和甲醇等提取剂的提取效果,结果表明:用高氯酸作为提取剂时,3 种芳香族氨基酸的回收率最高。试验同时又比较了浓度为 1%、2.5%、5% 及 10% 高氯酸提取效果,结果发现 5% 的高氯酸溶液回收率最高。可能因为色氨酸上有一个吡啶环(苯并吡啶环),在高浓度的强酸下吡啶环可能会质子化开环并形成吡啶树脂,导致色氨酸含量减少。而高氯酸浓度过低则会影响到蛋白质的沉淀效果,因此本文选择 5% 的高氯酸溶液作为提取溶剂。

### 2.2 检测波长的选择( $256.7\text{ nm}$ )

分别取浓度为  $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $250\text{ }\mu\text{g/mL}$  的 L-Tyr、L-Phe 及 L-Trp 标准溶液进行  $210\text{ } \sim 400\text{ nm}$  的紫外波段扫描,因构成蛋白质的 20 多种氨基酸在远紫外区(波长小于  $220\text{ nm}$ ) 均有紫外光吸收,其他氨基酸对芳香族氨基酸的测定会有干扰,而在近紫外区( $220\text{ } \sim 320\text{ nm}$ ) 只有芳香族氨基酸有紫外光吸收,故在近紫外区选择最佳检测波长。实验发现 L-Tyr、L-Phe 及 L-Trp 3 种物质在近紫外区的最大吸收波长分别为  $274.5$ 、 $256.7$  和  $279.3\text{ nm}$ ,在  $279.3$  和  $274.5\text{ nm}$  时,仅有 L-Trp 和 L-Tyr 的谱峰出现。而在  $256.7\text{ nm}$  处 L-Ty, L-Phe 和 L-Trp 均有出峰,如图 1 所示。因此选择  $256.7\text{ nm}$  为检测波长。

### 2.3 不同缓冲溶液对芳香族氨基酸含量测定的影响

本文分别比较了乙酸铵和磷酸盐两种缓冲溶液对芳香族氨基酸含量测定的影响,通过试验发现,用乙酸铵缓冲液作流动相,基线波动较大,稳定时间较长,且色谱峰型不好。而选用  $0.05\text{ mol/L}$  磷酸盐缓冲液不仅可将目标物完全分离,而且峰型很好,能满足芳香族氨基酸分析的要求。

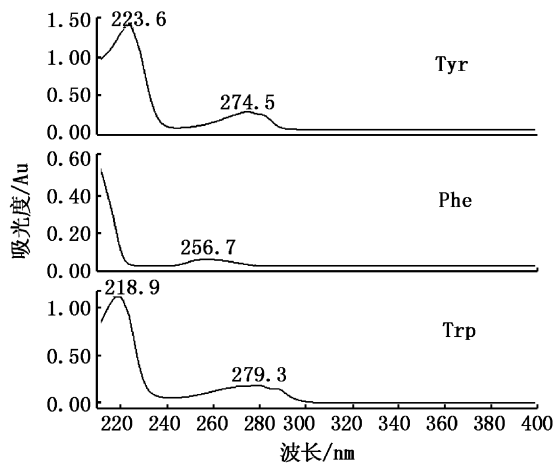


图1 L-Tyr、L-Phe 及 L-Trp 的紫外扫描光谱图  
Fig.1 UV scanning spectrum of L-Tyr, L-Phe and L-Trp

## 2.4 甲醇浓度对测定的影响

因色氨酸在 256.7 nm 时测定时保留时间较长,有文献报道用乙腈来缩短<sup>[13]</sup>,但乙腈的价格昂贵而且毒性大,本试验用甲醇替代。结果表明,适当浓度的甲醇完全能达到乙腈所得到的理想结果。试验分别比较了比例为 5:95、10:90、15:85、20:80 的甲醇与磷酸盐缓冲液,对 3 种芳香族氨基酸含量测定的影响。结果发现,随着甲醇比例的增加,氨基酸的保留时间越小,但同时仪器系统的压力也会相应升高。因此考虑到仪器检测的效率及防止仪器的压力过高,本实验选择甲醇与 0.05 mol/L 磷酸二氢钾的比例为 15:85,3 种芳香族氨基酸出峰时间较早,同时分离度及峰型也满足要求。

## 2.5 pH 对测定的影响

由于 Trp、Phe、Tyr 的等电点分别为 5.89、5.48、5.66,在 pH 大于 6 时 3 者都远离其等电点,可以避免 3 种氨基酸因在等电点处具有最小溶解度而容易析出的问题,且此时 3 者都携带负电荷<sup>[14]</sup>,故选择 pH 在 6.0~6.8 之间进行比较分析。通过实验发现,在磷酸盐与甲醇的体积比例不变的情况下,改变流动相的 pH 测定 3 种芳香族氨基酸,当 pH 为 6.0 时,3 种芳香族氨基酸保留时间最小,并且各个峰都达到了完全分离。因此,选择流动相的 pH 为 6.0。

通过上述实验结果,用所确定的色谱条件上机测定 3 种芳香族氨基酸标样的混合溶液,3 种芳香族氨基酸达到基线分离,峰型对称。如图 2

所示:

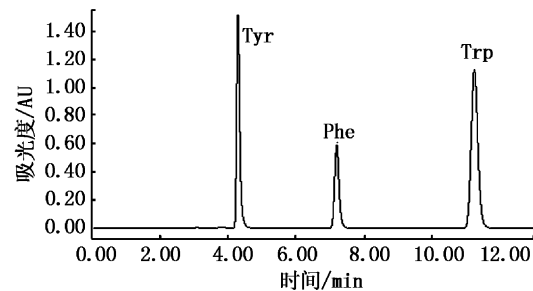


图2 芳香族氨基酸的标准样品色谱图  
Fig.2 HPLC chromatogram of aromatic amino acids standard

## 2.6 方法性能指标

### 2.6.1 线性范围与检测限

将浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$ 、1 000  $\mu\text{g/mL}$ 、250  $\mu\text{g/mL}$  的 L-Tyr、L-Phe 及 L-Trp 标准混合液,用 2.5% 的高氯酸溶液将其依次稀释 2、5、10、20、50 倍,按色谱条件检测,以峰面积  $y$  与浓度  $x$  做标准曲线。经回归分析,L-Tyr、L-Phe、L-Trp 分别在 6~500  $\mu\text{g/mL}$ 、3~1 000  $\mu\text{g/mL}$  和 3~250  $\mu\text{g/mL}$  范围内有良好的线性关系,其线性相关系数 ( $R^2$ ) 在 0.998 6~0.999 5 之间。根据信噪比,当色谱峰的峰高为噪音 3 倍时 ( $s/n=3$ ),确定最低检测限,由实验结果:L-Tyr、L-Phe、L-Trp 的最低检测限分别为 2  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$  和 1  $\mu\text{g/mL}$ ,其线性范围及检测限都能满足检测要求。如表 1 所示。

表1 回归方程、线性相关系数和检测限

Tab.1 Regression equations, correlation coefficients and detection limits

项目	回归方程	线性相关系数	检测限/ ( $\mu\text{g/mL}$ )
L-Tyr	$y = 1526x - 1325.3$	$R^2 = 0.999 1$	2
L-Phe	$y = 1167x + 3970$	$R^2 = 0.998 6$	10
L-Trp	$y = 1049x + 1174.8$	$R^2 = 0.999 5$	1

### 2.6.2 精密度实验

对同一 3 种芳香族氨基酸混合标准品分别进行六次重复性试验,得 3 种芳香族氨基酸的标准品的峰面积和保留时间。由表 2 可知,进样 6 次所测得峰面积的 RSD 在 0.42%~0.57% 之间,保留时间的 RSD 在 0.15%~0.30% 之间,表明仪器精密度良好,所用测定方法的重现性好。

表 2 精密度

Tab. 2 The precision of the method ( $\pm$ SE,  $n=6$ )

项目	峰面积	相对标准偏差/%	保留时间/min	相对标准偏差/%
L-Tyr	805 519 $\pm$ 962	0.42	4.28 $\pm$ 0.01	0.15
L-Phe	739 778 $\pm$ 806	0.57	7.18 $\pm$ 0.01	0.16
L-Trp	601 608 $\pm$ 700	0.48	11.24 $\pm$ 0.02	0.30

## 2.6.3 回收率实验

本实验以水产品(南美白对虾可食部分)作

表 3 回收率试验

Tab. 3 Recovery test ( $\pm$ SE,  $n=3$ )

项目	加标量/( $\mu$ g/g)	实际测出量/( $\mu$ g/g)	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
L-Tyr	50.0	48.7 $\pm$ 1.8	97.4	92.0	6.4
	200	185.6 $\pm$ 2.5	92.8		
	400	342.8 $\pm$ 1.9	85.7		
L-Phe	150.0	132.5 $\pm$ 1.2	87.3	88.0	2.5
	500	447.5 $\pm$ 1.8	90.5		
	1 000	862.0 $\pm$ 2.38	6.2		
L-Trp	25.0	25.6 $\pm$ 1.5	102.3	105.2	3.0
	100	105.6 $\pm$ 2.1	108.6		
	200	209.6 $\pm$ 2.4	104.8		

## 2.7 应用

将本方法应用于南美白对虾中 3 种游离芳香族氨基酸的测定,取解冻好的南美白对虾可食部分 5.0 g,做 3 个平行,并按“1.5”节所述的步骤进行样品前处理,然后经水相微孔滤膜(0.45  $\mu$ m)滤过,按上述色谱条件进样 30  $\mu$ L 得色谱图(图 3),图 4 为添加标准品后的南美白对虾可食部分 HPLC 色谱图。以标准曲线计算南美白对虾可食部分中 3 种游离芳香族氨基酸的含量。结果显示:南美白对虾可食部分中游离 L-Tyr 含量为(0.19  $\pm$  0.05) g, L-Phe 含量为(0.08  $\pm$  0.03) g, L-Trp 含量为(0.05  $\pm$  0.02) g。

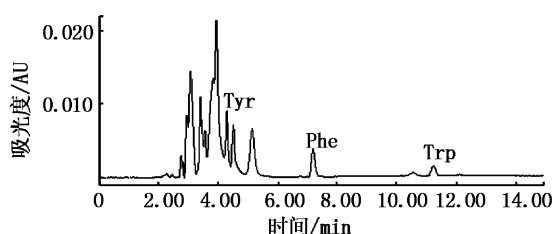


图 3 南美白对虾样品的液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of *Penaens* *Vannamei* sample

为样本。取不同量的标准品加入到 5.0 g 样品中,每个样品添加 3 个水平,每个添加水平做 3 个平行,按 1.5 节所述的步骤进行样品前处理,以标准曲线法计算其实际含量及平均回收率。结果如表 3 所示:L-Tyr、L-Phe 及 L-Trp 加标样后检测分析出的平均回收率分别为 92.0%、88.0% 和 105.2%, RSD 分别为 6.4%、2.5% 和 3.0%,表明该方法结果稳定,可应用于水产品中游离芳香族氨基酸的分析测定。

## 3 结论

本文利用 Tyr、Phe 和 Trp 含不饱和共轭环状结构具有吸收紫外光这一特性,无需衍生直接用 HPLC 紫外法进行测定。试验确定了 256.7 nm 为检测波长,采用甲醇-磷酸盐缓冲液作流动相,并用磷酸调 pH 至 6.0,用 Waters Atlantis T3 C18 色谱柱分离测定,12 min 内同时将水产品中 3 种游离芳香族氨基酸进行快速分离测定。根据保留时间为定性依据,峰面积为定量计算的参数,通过实验可知,水产品中 3 种芳香族氨基酸保留时间的 RSD% 均小于 3%,峰面积的 RSD% 均小于 3%,加标回收率在 92% ~ 105.2% 之间。表明此方法定性可靠、定量准确。可用于水产品中游离酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸含量的测定。

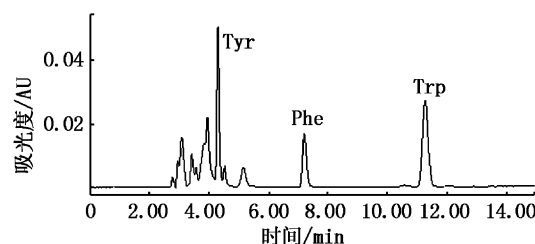


图 4 标准添加后的液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of sample added standard

## 参考文献:

- [1] MATTHEWS D E. An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans [J]. *Journal of Nutrition*, 2007, 137: 1549 – 1555.
- [2] LI Y, TANG A G, MU S A. HPLC-FLD determination of serum aromatic amino acids: application in chronic kidney disease patients [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2011, 412: 1032 – 1035.
- [3] KAWAMURA Y N, KAITO M, NAKAGAWA N, et al. Evaluating response to nutritional therapy using the branched-chain amino acid/tyrosine ratio in patients with chronic liver disease [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1999, 13(1): 31 – 34.
- [4] MUN C, WIDNER B, SPEMER-UNTERWEGER B. Immune reaction links diseases progression in cancer patients with depression [J]. *Med Hypotheses*, 2000, 55(2): 137 – 140.
- [5] DOUGHERTY D M, MOELLER F G, BJORK J M, et al. Plasma L-tryptophan depletion and aggression [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1999, 467(1): 57 – 65.
- [6] 李玉玲, 李卫华, 杨秀清. 反相高效液相色谱法检测奶粉中含硫氨基酸 [J]. *食品科学*, 2012, 33(8): 167 – 170.
- [7] 刘恒霞, 余鹏, 王慧忠. 高效液相色谱测定蕨类植物中氨基酸含量 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2011, 33(3): 30 – 33.
- [8] WANG Y X, ZHANG F, LIANG J. Determination of enantiomeric compositions of tryptophan by chemometric analysis of the fluorescence spectra of bovine serum albumin receptor-ligand mixtures [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2006, 17(12): 1599 – 1602.
- [9] 徐素琴, 孙园园, 朱霞石. 离子液体-微乳液协同增敏荧光猝灭法测定 L-色氨酸的研究 [J]. *分析化学*, 2009, 37(10): 195 – 196.
- [10] GOTO T, MATSUO N, TAKAHASHI T, et al. CSF glutamate/GABA concentrations in pyridoxine-dependent seizures: etiology of pyridoxine-dependent seizures and the mechanisms of pyridoxine action in seizure control [J]. *Brain and Development*, 2001, 23(1): 24 – 29.
- [11] 陶玉贵, 王强, 李鹤飞, 等. 毛细管电泳法测定发酵液中 L-色氨酸的含量 [J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(9): 140 – 143.
- [12] TUCHMAN M. Phenylalanine and tyrosine quantification by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry from filter paper blood spots [J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45(4): 571 – 572.
- [13] 文江平, 唐爱国. 高效液相色谱法快速测定血清中的芳香族氨基酸 [J]. *色谱*, 2003, 21(2): 154 – 157.
- [14] 王竟岩, 朱圣庚, 徐长法. *生物化学* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 133.

## Rapid analysis of free aromatic amino acids in aquatic product by high performance liquid chromatography

QIU Wei-qiang<sup>1,2</sup>, LIU Bing-xuan<sup>1</sup>, CHEN Shun-sheng<sup>1,2</sup>, XIE Jing<sup>1,2</sup>, HUANG Xin<sup>3</sup>

(1. *College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China*; 3. *Agricultural Bureau of Yanshan, Yanshan 334500, Jiangxi, China*)

**Abstract:** To establish a HPLC method for the determination of free aromatic amino acids in aquatic product. Optimal conditions such as pH, flow rate and concentration of mobile phase were confirmed. Accuracy, precision and limit of quantitation were surveyed and evaluated. The method is based on an extraction of amino acids from aquatic product with a solution of 5% perchloric acid followed by neutralization by the addition of KOH just prior to HPLC analysis. HPLC system consisted of a Waters Atlantis T3 C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of 85% 0.05 mol/L sodium phosphate buffer and 15% methanol, adjusted to pH 6.0 with phosphoric acid. The flow rate was 0.9 mL/min, the column temperature was 27 °C, and the detection wavelength was 256.7 nm. The three amino acids were separated in 12 min. The standard curves of Tyr, Phe, Trp were linear within a range of 10 – 500, 50 – 1 000 and 5 – 250 μg/mL, and the correlation coefficient deviations range from 0.999 86 to 0.995. The limits of detection were 2, 10 and 1 μg/mL. The average recovery of spiked sample deviations ranges from 88.0% to 105.2%. In conclusion, this method proved to be simple, rapid, reliable and with high accuracy and precision. It has practical value for detecting the three amino acids in aquatic product.

**Key words:** aquatic product; HPLC; aromatic amino acids; Phe; Tyr; Trp