

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.00239

高效液相色谱-柱前衍生化法测定饲料中的含硫氨基酸

于淑新¹, 冯 思¹, 孙元社^{1,2}, 唐 涛^{1,2}, 韩 晶¹, 王丰琳¹, 李 彤^{1,2*}

(1. 大连依利特分析仪器有限公司, 辽宁 大连 116023;

2. 辽宁大连依利特分析仪器工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023)

摘要: 发展了一种饲料中含硫氨基酸的检测方法。样品经过甲酸氧化, 将其中的胱氨酸和蛋氨酸分别氧化为磺基丙氨酸和蛋氨酸磺; 再经酸水解后, 采用 2,4-二硝基氟苯进行柱前衍生化, 衍生物经高效液相色谱分析。使用 Elite AAK C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分离; 以 0.05 mol/L 乙酸钠和乙腈-水 (50:50, v/v) 为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.2 mL/min; 检测波长为 360 nm; 柱温为 31 °C。结果表明, 胱氨酸在 0.4 ~ 16.0 mg/L、蛋氨酸在 0.7 ~ 29.6 mg/L 范围内的线性相关系数分别为 0.999 9、0.999 8; 胱氨酸和蛋氨酸的定量限 (信噪比 (S/N) = 10) 分别为 2.6 μg/kg 和 3.1 μg/kg; 3 次样品平行测定的胱氨酸和蛋氨酸含量的相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.79% 和 2.56%, 加标回收率分别为 100.28% ~ 102.00% 和 105.72% ~ 107.89%。该方法分析成本低, 测定结果准确, 灵敏度高, 符合饲料中含硫氨基酸的检测要求。

关键词: 高效液相色谱; 柱前衍生化; 2,4-二硝基氟苯; 胱氨酸; 蛋氨酸; 饲料

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)03-0239-05

Determination of sulfur amino acids in feedstuffs by high performance liquid chromatography coupled with pre-column derivatization

YU Shuxin¹, FENG Si¹, SUN Yuanshe^{1,2}, TANG Tao^{1,2},
HAN Jing¹, WANG Fenglin¹, LI Tong^{1,2*}

(1. Dalian Elite Analytical Instruments Co., Ltd., Dalian 116023, China;

2. Engineering Research Center of Dalian Elite Analytical Instruments, Liaoning Province, Dalian 116023, China)

Abstract: A method of quantitative analysis of sulfur amino acids in feedstuffs by high performance liquid chromatography coupled with pre-column derivatization was developed. Before the feedstuffs were hydrolyzed under acidic condition, the cystine and methionine in the feedstuffs were oxidized to cysteic acid and methionine sulfone respectively by performic acid, and then derivatized by 2,4-dinitrofluorobenzene. The separation was performed on an Elite AAK C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) by the gradient elution of 0.05 mol/L sodium acetate and acetonitrile-water (50:50, v/v) as the mobile phase with a flow rate of 1.2 mL/min at 31 °C. The detection wavelength was set at 360 nm. The linearities of cystine and methionine were good in the ranges of 0.4 - 16.0 mg/L and 0.7 - 29.6 mg/L with the correlation coefficients of 0.999 9 and 0.999 8, respectively. The quantification limits (S/N = 10) were 2.6 μg/kg, 3.1 μg/kg, and the recoveries were 100.28% - 102.00% and 105.72% - 107.89%, respectively. The method can be adapted to the accurate quantification of the sulfur amino acids in feedstuffs.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); pre-column derivatization; 2,4-dinitrofluorobenzene; cystine; methionine; feedstuffs

含硫氨基酸通常包括胱氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸, 是禽畜生长过程中所必需的基本氨基酸。含硫

氨基酸含量的测定与饲料中蛋白质量的评价、动物营养学研究^[1]、制定科学的饲料配方等密切相关,

* 通讯联系人: 李 彤, 博士, 研究员, 研究方向为分析仪器、分析化学. Tel: (0411) 84732388, E-mail: tongli@elitehplc.com.

收稿日期: 2010-12-01

是控制饲料质量的关键指标之一。

目前,氨基酸的分析方法主要有化学分析法、电化学方法、分光光度法、高效液相色谱法(HPLC)、毛细管电泳法、气相色谱法等^[2]。其中HPLC是使用最为普遍的方法之一。HPLC包括离子交换色谱和反相HPLC(RP-HPLC)两种模式。采用离子交换色谱法要用氨基酸分析仪,成本高,专属性强,普及率低。RP-HPLC模式使用通用型的HPLC梯度系统,成本低,普适性强,一机多用,因此成为研究的重点。

采用RP-HPLC分析样品中的氨基酸时,一般需要将样品中的蛋白质水解成为氨基酸,再通过衍生化,然后进行RP-HPLC分析。最常用的蛋白质水解方法为酸水解法,但含硫的氨基酸会因在酸水解条件下非常容易被破坏而无法进行准确的定量检测^[1,3-9]。近年来,氧化水解法成为分析含硫氨基酸较为常用的水解方法。杨文君等^[10]采用离子交换色谱-邻苯二甲醛柱后衍生荧光检测法测定饲料中的胱氨酸和蛋氨酸。本文采用氧化水解及2,4-二硝基氟苯柱前衍生-高效液相色谱-紫外检测法^[11,12]测定饲料中的含硫氨基酸,获得了良好的分析结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P1201 高效液相色谱仪(包括UV1201紫外-可见检测器、P1201高压恒流泵、ZW II型色谱柱恒温箱)、DAD230⁺二极管阵列检测器、EC2006色谱数据处理系统、EChrom2000 DAD数据处理系统(大连依利特分析仪器有限公司);7725i手动进样阀(Rheodyne公司)。

蛋氨酸标准品(北京奥博星生物技术责任有限公司)、胱氨酸标准品(上海政翔化学试剂研究所)、30%过氧化氢、88%甲酸、盐酸(优级纯)、偏重亚硫酸钠、乙腈(色谱纯)、2,4-二硝基氟苯、硼酸、硼砂、磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠、无水乙酸钠、去离子水等(除特别标注外,其他均为分析纯)。饲料样品由某企业提供。

1.2 主要溶液的配制方法

过甲酸溶液:将30%过氧化氢与88%甲酸按体积比1:9混合,于室温下放置1h,置于冰水浴中冷却30min。临用前配制。

衍生缓冲溶液:精密称取硼酸1.240g、硼砂7.630g,加水溶解,转移至500mL量瓶中,定容后摇匀。

平衡缓冲溶液:精密称取磷酸二氢钾0.910g、

十二水合磷酸氢二钠3.580g,加水溶解,转移至500mL量瓶中,定容后摇匀。

衍生试剂:1%(体积分数)2,4-二硝基氟苯的乙腈溶液。

1.3 样品处理

1.3.1 酸水解方法

称取一定量的饲料样品,置于5mL安瓿瓶中,加入3mL6.0mol/L盐酸,酒精灯高温拉丝封口,放入烘箱中于(110±3)℃下水解24h。用氮气吹干水解液,用衍生缓冲溶液多次洗涤安瓿瓶,合并洗涤液转移至25mL容量瓶中,并用衍生缓冲溶液定容,备用。

1.3.2 氧化水解方法

称取一定量的标准品或饲料样品,置于5mL安瓿瓶中,加入已冷却的过甲酸溶液0.3mL,连同冰水浴一道置于4℃冰箱中,反应16h。

以1.767mol/L偏重亚硫酸钠溶液为终止剂,于氧化液中加入偏重亚硫酸钠溶液0.1mL,充分摇匀后,直接加入6.80mol/L盐酸溶液2.5mL,酒精灯高温拉丝封口,置于烘箱(110±3)℃水解24h^[7],用氮气吹干水解液,用衍生缓冲溶液多次洗涤安瓿瓶,合并洗涤液并转移至25mL容量瓶中,用缓冲溶液定容,备用。

1.3.3 衍生方法

取经0.45μm滤膜过滤的样品液10mL置于50mL棕色容量瓶中,加入5mL衍生试剂,放入60℃水浴中,于暗处反应60min,反应完毕后取出冷却至室温,用平衡缓冲溶液定容,静置片刻,备用。

1.4 色谱条件

色谱柱:Elite AAK C18,5μm,4.6mm×250mm(大连依利特分析仪器有限公司)。流动相:A为0.05mol/L乙酸钠,B为乙腈-水(50:50,v/v);梯度洗脱程序:0~0.3min,16%B;0.3~4min,16%B~31%B;4~9.5min,31%B~36%B;9.5~17min,36%B~45%B;17~28min,45%B~65%B;28~34min,65%B~100%B;34~36min,100%B;36~38min,100%~16%B;流速为1.2mL/min。检测波长为360nm;柱温为31℃;进样量为20μL。

2 结果与讨论

2.1 方法的理论可行性分析

饲料中的胱氨酸和蛋氨酸先经过甲酸氧化为对酸稳定的磺基丙氨酸和蛋氨酸砷,再通过酸水解从饲料蛋白质中释放出来,水解产物磺基丙氨酸和蛋

氨酸磺与2,4-二硝基氟苯发生衍生生化反应,最后对衍生产物进行HPLC分析。

使用过甲酸为氧化剂的方法比较成熟,国家标准方法(GB/T15399-94)^[7]“饲料中含硫氨基酸测定方法——离子交换色谱法”中即采用过甲酸作为氧化剂。常碧影等^[1]对饲料中含硫氨基酸的氧化条件进行了系统的综述,包括过甲酸的组成与配制、氧化剂的用量、氧化温度与时间等,表明在过甲酸过量的条件下,蛋氨酸和胱氨酸(含7.5~25.0 mg蛋白的样品,加入2 mL过甲酸可以确保氧化剂过量)能够被完全氧化。

2,4-二硝基氟苯是一种常见的衍生生化试剂,商振华等^[11]采用2,4-二硝基氟苯衍生16种常见氨基酸,衍生产物稳定,获得了良好的定量重复性和高的回收率。

因此采用过甲酸氧化、水解再衍生的方法处理饲料样品及测定饲料中含硫氨基酸在理论上可行。

2.2 方法的实际可行性分析

2.2.1 胱氨酸和蛋氨酸标准品验证实验

将胱氨酸和蛋氨酸标准品直接衍生和氧化水解后衍生并进行HPLC分析,对比实验结果,考察该方法的可行性,实验结果如图1所示。由图1可以看出,胱氨酸和蛋氨酸与磺基丙氨酸和蛋氨酸磺衍生产物在不同时间出峰,而且氧化水解、衍生后HPLC分析谱图中没有胱氨酸和蛋氨酸衍生产物的色谱峰。说明在过甲酸过量的条件下,胱氨酸和蛋氨酸可以被完全氧化,而且氧化产物磺基丙氨酸和蛋氨酸磺可以与2,4-二硝基氟苯发生衍生生化反应。

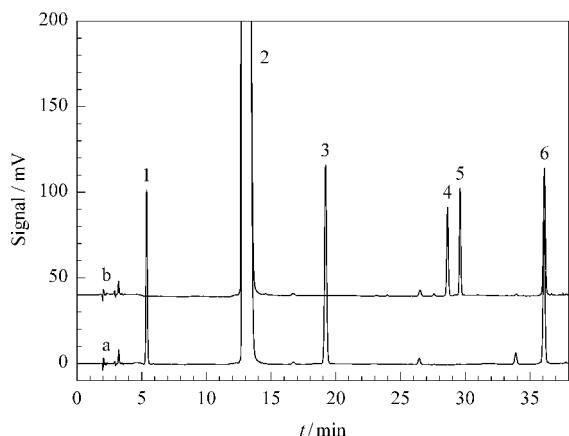


图1 胱氨酸和蛋氨酸混合标准溶液(a)直接衍生及(b)氧化水解后衍生的HPLC谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the mixed standard solution of cystine, methionine with (a) direct derivatization and (b) derivatization after oxidation-hydrolysis

1. cysteine acid; 2. 2,4-dinitrophenol; 3. methionine sulfone; 4. methionine; 5. cystine; 6. 2,4-dinitrofluorobenzene.

2.2.2 光谱图辅助定性

采用DAD230+二极管阵列检测器进行数据采集,提取胱氨酸、蛋氨酸、磺基丙氨酸、蛋氨酸磺衍生产物及2,4-二硝基氟苯的紫外吸收光谱图,如图2所示。

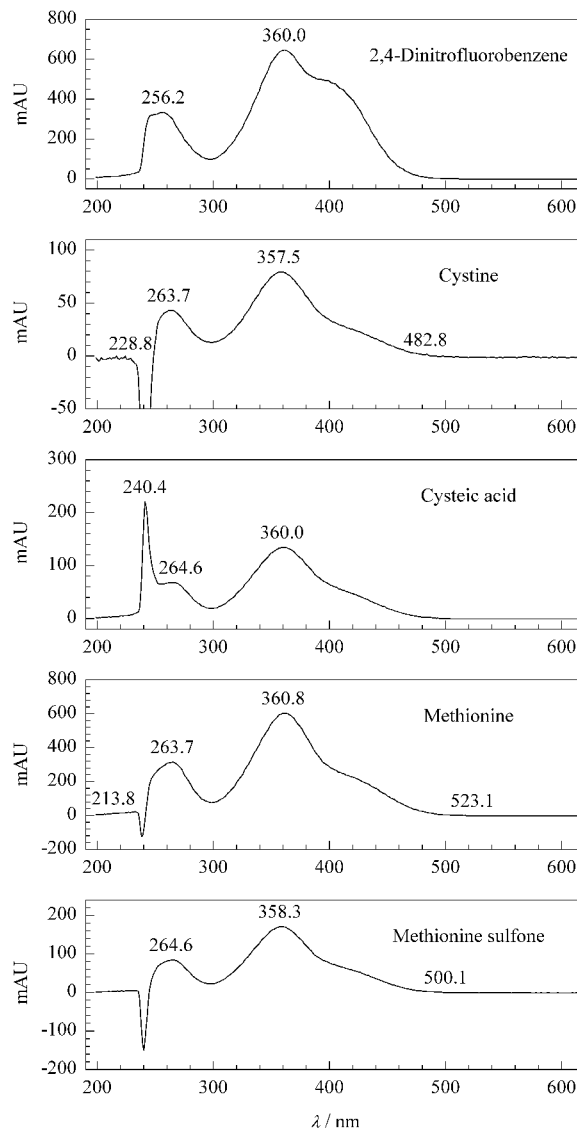


图2 胱氨酸、磺基丙氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸磺衍生产物及2,4-二硝基氟苯光谱图

Fig. 2 UV spectra of cystine, cysteine acid, methionine, methionine sulfone derivatization products and 2,4-dinitrofluorobenzene

对比图2中的各光谱图,可以看出胱氨酸、蛋氨酸、磺基丙氨酸、蛋氨酸磺衍生产物的光谱图峰形与2,4-二硝基氟苯类似,各光谱图的最大吸收峰值仅有微小的差别,进一步说明2,4-二硝基氟苯能够衍生磺基丙氨酸和蛋氨酸磺。

2.2.3 系统的重复性

对胱氨酸和蛋氨酸标准品氧化水解、衍生后的样品连续进样9次,磺基丙氨酸和蛋氨酸磺峰面积

的相对标准偏差(RSD)分别为0.65%和0.72%,保留时间的RSD分别为0.18%和0.19%。可见磺基丙氨酸和蛋氨酸磺衍生产物HPLC分析具有良好的重复性。

2.2.4 衍生产物的稳定性

胱氨酸和蛋氨酸标准品经氧化水解衍生后的样品于当天进样分析后,将样品置于4℃冰箱中保存。放置7d后,采用同一套梯度系统再次进样分析,对比贮藏前后样品中磺基丙氨酸、蛋氨酸磺衍生产物保留时间和峰面积的变化,考察衍生产物的稳定性,结果见表1。由表1可以看出,衍生产物至少在7d内具有很好的稳定性。

表1 胱氨酸和蛋氨酸衍生产物的稳定性
Table 1 Stabilities of the derivatization products of methionine and cystine

Derivatization product	Analysis time	Retention time/min	Peak area/(mV·s)
Methionine sulfone	on the day	5.38	739.64
	after 7 days	5.51	758.61
Cysteic acid	on the day	19.20	1279.12
	after 7 days	19.49	1303.63

综上所述,使用氧化水解、2,4-二硝基氟苯柱前衍生、紫外检测法测定饲料中的含硫氨基酸在实际操作中是可行的。

2.3 柱温对分离的影响

实验过程中发现,温度变化对磺基丙氨酸与相邻色谱峰(天冬氨酸)的分离基本没有影响,而对蛋氨酸磺与相邻色谱峰(脯氨酸、丙氨酸)的分离有显著影响。随着温度升高,蛋氨酸磺与脯氨酸的分离度逐渐减小,与丙氨酸的分离度逐渐增加;在31℃时两组分峰的分离度均大于1.50,因此选择31℃为实验条件。温度对不同氨基酸衍生物之间分离度影响如图3所示。

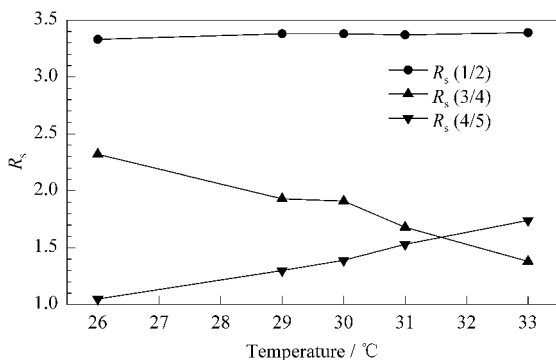


图3 温度对不同氨基酸衍生物间分离度的影响
Fig. 3 Influences of temperature on the resolutions between different derivatization products

1. cysteic acid; 2. aspartate; 3. proline; 4. methionine sulfone; 5. alanine.

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围、检出限和定量限

分别对胱氨酸质量浓度分别为0.4、0.8、1.6、3.2、8、16 mg/L,蛋氨酸质量浓度分别为0.74、1.48、2.96、5.92、14.8、29.6 mg/L的混合标准溶液进行测定,绘制峰面积(y)对质量浓度(x, mg/L)的校准曲线,得到胱氨酸和蛋氨酸的校准曲线分别为 $y = 147.76x - 13.013$ 和 $y = 111.79x - 19.782$,线性相关系数分别为0.9999和0.9998,说明胱氨酸和蛋氨酸均具有良好的线性关系。

分别以3倍信噪比(S/N)和S/N=10计算胱氨酸和蛋氨酸的检出限(LOD)和定量限(LOQ),胱氨酸的LOD为0.81 μg/kg, LOQ为2.6 μg/kg;蛋氨酸的LOD为1.0 μg/kg, LOQ为3.1 μg/kg。

2.4.2 方法的重复性

取同一饲料样品3份,按上述氧化水解方法平行处理并分析。经计算,胱氨酸和蛋氨酸的平均含量分别为0.72%和0.81%,RSD分别为0.79%和2.56%,表明该方法的定量结果准确。

2.4.3 加标回收率

在某品牌饲料样品中加入胱氨酸和蛋氨酸标准品,饲料样品中胱氨酸和蛋氨酸的本底值分别为1.44 mg/L和1.58 mg/L,加标质量浓度分别为4.6 mg/L和6.4 mg/L。按上述方法处理分析样品,胱氨酸的加标回收率为100.28%~102.0%,蛋氨酸的加标回收率为105.72%~107.89%。

2.5 实际样品分析

2.5.1 饲料样品的分析

采用建立的方法对一实际饲料样品中胱氨酸和蛋氨酸的含量进行测定,此饲料样品中胱氨酸含量为0.73%,蛋氨酸含量为0.82%。空白、饲料样品、加标样品谱图见图4。

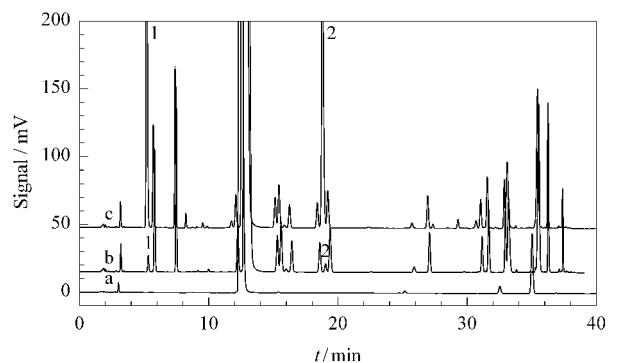


图4 (a)空白、(b)饲料样品和(c)加标样品的HPLC谱图
Fig. 4 HPLC chromatograms of (a) a blank sample, (b) a feed sample and (c) a spiked sample
1. cysteic acid; 2. methionine sulfone.

2.5.2 色谱峰纯度及光谱图辅助定性

实际饲料样品的分析结果表明饲料样品中磺基丙氨酸和蛋氨酸砒均与周围色谱峰实现了基线分离。为了进一步确认磺基丙氨酸与蛋氨酸砒的定性结果,应用DAD230⁺二极管阵列检测器的辅助定性功能,通过计算磺基丙氨酸与蛋氨酸砒的峰纯度及光谱图对比,以确认磺基丙氨酸与蛋氨酸砒是否有杂质峰干扰。经计算,磺基丙氨酸峰的纯度为99.83%,蛋氨酸砒峰的纯度为99.67%。同时饲料样品中磺基丙氨酸与蛋氨酸砒衍生产物的光谱图与图2光谱图一致。因此磺基丙氨酸和蛋氨酸砒色谱峰没有杂质峰干扰,分离情况良好,定性结果准确。

3 结论

开发了一种氧化水解、2,4-二硝基氟苯柱前衍生高效液相色谱测定饲料中含硫氨基酸的方法。从理论和实际两方面论证了该方法的可行性,并利用二极管阵列检测器的峰纯度计算及光谱图定性功能,对样品峰进行了辅助定性。通过对该方法的方法学验证,结果表明,该方法中胱氨酸和蛋氨酸具有良好的线性相关性,方法的检出限和定量限低,重复性好,加标回收率符合要求,有效降低了检测成本,可以满足饲料中含硫氨基酸的检测要求,具有一定的推广意义和普适性。

参考文献:

- [1] Chang B Y, Yan H W, Zuo J W, et al. China Feed (常碧影, 阎惠文, 左江湾, 等. 中国饲料), 1992(3): 38
- [2] Dai H, Zhang Z C, Zhang X S. Leather Science and Engineering (戴红, 张宗才, 张新申. 皮革科学与工程), 2004, 14(3): 39
- [3] Yang Y X, Zhou X Z. Feed China (杨元秀, 周孝治. 饲料广角), 2009(2): 40
- [4] Qian A P, Xu J. Fujian Agricultural Science and Technology (钱爱萍, 徐洁. 福建农业科技), 1999(1): 15
- [5] Xu J, Qian A P, Pan W. Fujian Analysis & Testing (徐洁, 钱爱萍, 潘葳. 福建分析测试), 1996, 5(2): 583
- [6] GB/T18246-2000
- [7] GB/T15399-94
- [8] Chang B Y, Yan H W, Zhang M. Scientia Agricultura Sinica (常碧影, 阎惠文, 张明. 中国农业科学), 1994, 27(5): 82
- [9] Chang B Y, Yan H W, Zhang M, et al. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association (常碧影, 阎惠文, 张明, 等. 中国粮油学报), 1994, 9(1): 49
- [10] Yang W J, Li D F, Wang R J, et al. Chinese Journal of Animal Science (杨文君, 李德发, 王若君, 等. 中国畜牧杂志), 2000, 36(1): 26
- [11] Shang Z H, Yu Y N, Guo W, et al. Chinese Journal of Chromatography (商振华, 于亿年, 郭为, 等. 色谱), 1993, 11(4): 236
- [12] Lan T, Wang F Y, Tang T, et al. Life Science Instruments (兰韬, 王风云, 唐涛, 等. 生命科学仪器), 2007, 5(11): 41