

高效液相色谱测定饲料中色氨酸含量方法的研究

李成成¹, 尤晓蒙², 付 珺³, 锁 然^{2,*}

(1. 邢台市疾病预防控制中心, 河北邢台 054000;

2. 河北农业大学, 河北保定 071001; 3. 河北省眼科医院, 河北邢台 054001)

摘要:建立了饲料中色氨酸的高效液相色谱分析方法。饲料样品通过氢氧化锂提取, 采用 C₁₈ 色谱柱, 醋酸盐缓冲液和甲醇为流动相等度洗脱, 二级阵列管检测器 280 nm 波长下检测。实验结果表明: 标准曲线在 25~500 mg/L 范围内线性良好, 相关系数 $r=0.9998$, 加标回收率为 88.33%~105.04%, 相对标准偏差在 2.80%~5.97% 之间, 饲料中色氨酸检出限为 18.3 mg/kg。本方法准确可靠, 适用于饲料中色氨酸的测定。

关键词:色氨酸, 饲料, 碱水解, 高效液相色谱法

Study on determination of tryptophan in feedstuff by high performance liquid chromatography

LI Cheng-cheng¹, YOU Xiao-meng², FU Jun³, SUO Ran^{2,*}

(1. Xingtai Center for Disease Control and Prevention, Xingtai 054000, China;

2. Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China;

3. Ophthalmologic Hospital of Hebei Province, Xingtai 054001, China)

Abstract: A method for the determination of tryptophan in feedstuff was established by high performance liquid chromatography. The samples were extracted with lithium hydroxide solution. The analysis was carried out on a C₁₈ column with acetate buffer and acetonitrile in gradient elution. The analytes were detected with DAD detector, at 280 nm as detection wavelength. The linear ranges was good from 25 mg/L to 500 mg/L with correlation coefficient 0.9998. The standard addition recoveries were 88.33%~105.04% and the relative standard deviation (RSD) were 2.80%~5.97%. The detection limit of tryptophan was 18.3 mg/kg. The established methods were proved accurate and reliable, which can be used for the detection of tryptophan in feedstuff.

Key words: tryptophan; feedstuff; alkali hydrolysis; high performance liquid chromatography

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)09-0308-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.09.051

色氨酸对动物的生长发育起到了至关重要的作用, 通常动物不能通过自身合成色氨酸, 只能从饲料中摄取, 但在饲料市场上, 一般的饲料色氨酸含量低, 不能满足动物的需要, 所以, 色氨酸是重要的氨基酸饲料添加剂之一^[1]。

目前, 饲料常规的氨基酸测定方法不能直接测定色氨酸, 因为在酸性水解条件下色氨酸几乎全都被破坏, 所以只能单独测定^[2]。饲料中色氨酸普遍采用强碱水解样品, 采用分光光度、荧光、毛细管电泳、液质联用^[3-6]的方法检测。常用的碱水解法, 强碱水解的同时, 水解剂、浓度和用量选择不当会对色氨酸结构造成破坏^[7]。采用分光光度及荧光法, 色氨酸检出限高、杂质干扰强; 采用毛细管电泳、液质联用法

测定, 仪器昂贵, 方法不易推广。本文选取常见的动物性和植物性饲料为研究对象, 采用碱法水解和高效液相色谱测定, 通过对样品前处理和色谱分离条件进行优化, 建立了操作简单、准确度高的色氨酸检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

色氨酸标准对照品 美国 Sanland 公司; 甲醇 色谱纯, 赛默飞世尔科技有限公司; 冰乙酸 色谱纯, 天津市光复精细化工研究所; 氮气 纯度 ≥ 99.999%, 保定市三教制氧站, 其他试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水。进口鱼粉、豆粕、麦麸、玉米、猪饲料、鸡饲料均购于农贸市场。

收稿日期: 2015-11-16

作者简介: 李成成 (1981-), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向: 理化检验工作, E-mail: lccpop1@163.com。

* 通讯作者: 锁然 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品检测分析, E-mail: xtjxxx@163.com。

Waters e2695 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器 美国 Waters 公司;高速中药粉碎机 浙江省兰溪市伟能达电器有限公司;电热鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司;台式低速离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;QL-861 涡旋混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;PHS-3C型 pH 计 梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 准确称取色氨酸 0.1 g(精确到 0.0001 g)置于 100 mL 的容量瓶中,用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液定容,摇匀,得到 1000 mg/L 的色氨酸标准储备液,4 ℃ 保存。然后逐级稀释,得到浓度为 25、50、100、200、300、400、500 mg/L 的色氨酸标准溶液。

1.2.2 样品前处理 将样品用高速中药粉碎机粉碎,过 40 目筛,称取 0.3 g(精确到 0.0001 g)样品于安培瓶中。植物性饲料样品加入 5 mol/L 的氢氧化锂 4 mL,通入高纯氮气,马上拧紧瓶盖,放入 110 ℃ 的电热鼓风干燥箱中水解 24 h;动物性饲料样品加入 5 mol/L 的氢氧化锂 1.5 mL,通入高纯氮气,马上拧紧瓶盖,放入 110 ℃ 的电热鼓风干燥箱中水解 16 h。取出冷却后,将水解液转移到 50 mL 的容量瓶中,用乙酸钠缓冲液润洗安培瓶,将润洗液转移到容量瓶中,加入 6 mol/L 的盐酸 7.5 mL 中和,再用乙酸钠缓冲液定容,摇匀,然后在 4000 r/min 的离心机中离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 有机滤膜,高效液相色谱仪检测。

1.2.3 色谱分析条件 美国 Kromat Universil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 为纯甲醇;流动相 B 为乙酸-乙酸钠缓冲液(0.0085 mol/L 乙酸钠溶液用冰乙酸调 pH 为 4.00 ± 0.05;流速 1.0 mL/min;进样量 10 μL;柱温 32 ℃;紫外检测波长 280 nm;等度洗脱,流动相 A: 流动相 B = 10: 90。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 碱解剂的选择 比较了常用的氢氧化锂、氢氧化钠和氢氧化钾三种碱解剂^[8-10]对豆粕和鱼粉在相同的条件下色氨酸的碱解效果。结果表明,对于同一种样品,用氢氧化锂做碱解剂时色氨酸的水解效果最好,氢氧化钠和氢氧化钾色氨酸水解效果相当。因此,选取氢氧化锂为碱解剂。

2.1.2 碱解剂浓度的选择 分别选取 2、3、4、5、6 mol/L 的氢氧化锂,不同碱解剂浓度对色氨酸峰面积的影响如图 1 所示。随着碱解剂浓度的增大,色氨酸的峰面积也随之增大,当碱解剂的浓度为 5 mol/L 时,色氨酸的峰面积达到最大值,继续增加碱解剂的浓度,色氨酸的峰面积呈下降趋势。对于不同基质的样品,碱解剂浓度对色氨酸的峰面积趋势相同。由此确定碱解剂的浓度为 5 mol/L。

2.1.3 碱解剂用量的选择 在相同条件下分别加入不同剂量的氢氧化锂,不同碱解剂用量对色氨酸峰面积的影响如图 2 所示。对于同一种样品,随着碱

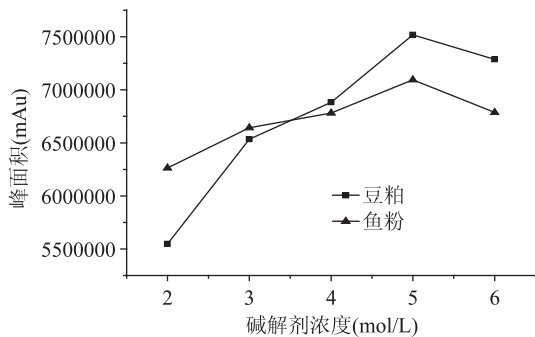


图 1 碱解剂浓度对色氨酸峰面积的影响

Fig.1 Influence of the concentration of alkaline hydrolysis agent on the peak area of tryptophan

解剂用量的增加,色氨酸的峰面积逐渐增大,当增加到一定值时,色氨酸的峰面积最大,继续加大碱解剂的用量,色氨酸的峰面积减小。对于不同基质的样品,当碱解剂用量为 4 mL 时,豆粕中色氨酸的面积达到最大值;当碱解剂用量为 1.5 mL 时,鱼粉中色氨酸的面积达到最大值。因此确定豆粕等植物性样品碱解剂用量为 4 mL,鱼粉等动物性样品碱解剂用量为 1.5 mL。

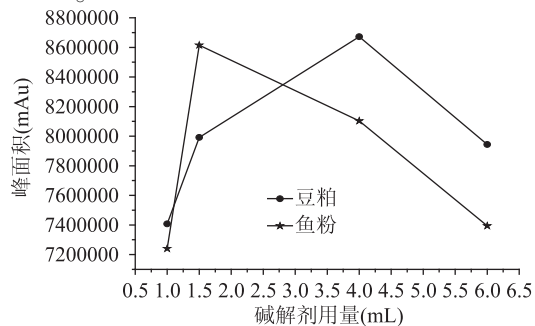


图 2 碱解剂用量对色氨酸峰面积的影响

Fig.2 Influence of the dosage of alkaline hydrolysis agent on the peak area of tryptophan

2.1.4 碱解时间和温度的选择 对比了不同时间和温度对色氨酸测定的影响,实验结果表明,对于同一样品,随着碱解时间的增加,色氨酸的峰面积也随着增大,当碱解的时间增大到一定值时,色氨酸的峰面积达到最大值。继续增长碱解时间,色氨酸的峰面积减小。当碱解的时间为 24 h 时,豆粕中色氨酸的面积达到最大值;当碱解的时间为 16 h 时,鱼粉中色氨酸的面积达到最大值。同一种样品,随着温度的增高,色氨酸的峰面积逐渐增大,当温度增高到 110 ℃ 时,色氨酸的峰面积最大,温度继续增高,色氨酸的面积呈下降趋势。碱解温度对两种样品中色氨酸的影响趋势相同。因此,确定豆粕等植物性样品碱解的时间为 24 h,鱼粉等动物性样品碱解的时间为 16 h,碱解温度为 110 ℃。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 流动相的选择 本实验用冰乙酸调流动相的 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0,结果显示,在不同 pH 条件下,色氨酸的峰面积与保留时间没有明显的变化,但是当 pH 4.0 时,色氨酸色谱峰的峰宽最小,对称因子最大。流动相中有机相的比例越大,色谱峰的保

留时间越短,色谱峰出峰越快。本实验在其他条件相同下,分别实验了甲醇的体积百分比为5%、10%、15%时,进标准溶液和样品溶液进行分析。色谱图显示,当甲醇体积分数为5%时,分析时间较长;而当甲醇体积分数为15%时,样品溶液分离的效果不好;只有当甲醇体积分数为10%时,分离效果最好,出峰时间相对较短。

2.2.2 检测波长的选择 因为色氨酸结构中存在共轭双键,所以有紫外吸收。本实验用二极管阵列检测器在210~400 nm波长范围下扫描,结果显示,色氨酸在219.6 nm和280.8 nm波长下有较强的紫外吸收,为了避免溶剂和其他杂质干扰,所以本实验选择色氨酸的检测波长为280 nm。

2.3 方法线性关系和检出限

分别取浓度为25、50、100、200、300、400、500 mg/L的色氨酸标准溶液10 μL用以上优化好的色谱条件分离,二极管阵列检测器检测,以色氨酸的浓度为横坐标X,面积为纵坐标Y,绘制出色氨酸浓度与其峰面积之间的线性回归方程, $Y = 15600X - 44100$,线性范围为25~500 mg/L,相关系数(r)为0.9998。分别以3倍噪音水平和10倍噪音水平对应的浓度确定检出限和定量限,本方法检出限为18.3 mg/kg、定量限为166.7 mg/kg。

2.4 方法的精密度和准确度

按照1.2.2的方法分别对动物性饲料和植物性饲料进行样品前处理后,在相同条件下平行进样5次,精密密度实验RSD分别为0.74%、1.35%,结果见表1。将色氨酸提取液在室温下放置0、1、2、3、4 d后在相同色谱条件下测定,本方法测定动物性饲料和植物性饲料中色氨酸日间稳定性实验RSD值分别为2.16%、1.72%。精密称量动物性饲料和植物性饲料样品分别添加标准溶液至4.17、16.67、33.33 mg/g三个水平,经碱解后进行分析测定,加标回收率结果见表2。

表1 检测精密密度结果
Table 1 Precision of method

样品	测定值(mg/g)				平均值(mg/g)	RSD(%)
动物性饲料	5.27	5.32	5.33	5.38	5.32	0.74
植物性饲料	2.33	2.41	2.36	2.38	2.36	1.35

表2 回收率测定结果($n=5$)
Table 2 Results of spiked recovery test($n=5$)

样品	本底水平(mg/g)	加标水平(mg/g)	检测值(mg/g)	回收率(%)	RSD(%)
动物性饲料	5.32	4.17	9.44	98.90	5.97
		16.67	20.34	90.08	3.31
		33.33	39.48	102.50	2.80
植物性饲料	2.36	4.17	6.64	105.04	4.08
		16.67	17.08	88.33	5.81
		33.33	33.83	94.43	3.16

2.5 样品测定

用以上优化好的前处理及色谱条件对饲料样品

进行分析测定。标准品及样品的色谱图见图3。准确称取不同饲料样品,按以上优化好的前处理方法及色谱分析方法测定样品中色氨酸的含量,结果见表3。

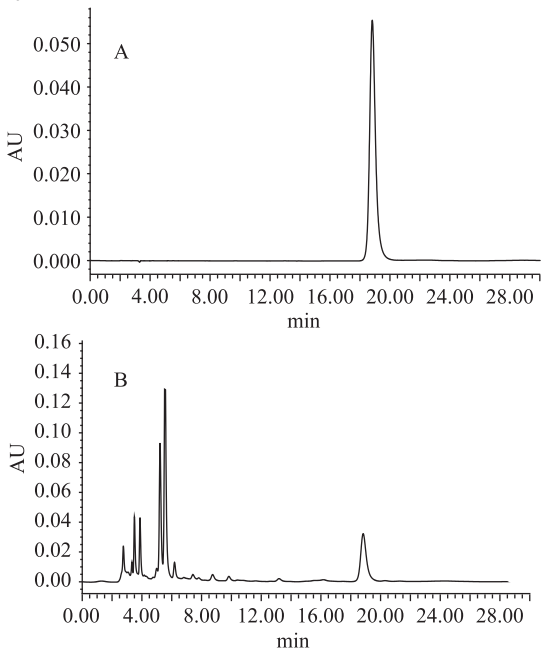


图3 标准品(A)及样品(B)的色谱图
Fig.3 Chromatograms of standard solution(A)and sample(B)

表3 样品中色氨酸含量测定结果($n=5$)
Table 3 The determination results of tryptophan content in the sample($n=5$)

样品名称	色氨酸含量平均值(%)	RSD值(%)
进口鱼粉	0.55	1.7
豆粕	0.52	1.2
麦麸	0.23	1.8
玉米	0.06	2.3
鸡料	0.16	1.4
猪料	0.17	1.6

选取饲料样品中都含有色氨酸,但含量不同。鱼粉与豆粕中色氨酸的含量相差不多,均高于其他饲料;玉米中色氨酸含量最少。采用本实验建立的方法对不同样品进行测定,RSD值在1.2%~2.3%之间,精密密度较高,能够满足饲料样品中色氨酸含量分析的要求。

3 结论

前处理方法对饲料中色氨酸含量的测定影响很大,本文对不同基质饲料的碱解剂种类、碱解剂浓度、碱解剂用量、碱解时间、碱解温度等对色氨酸的影响进行了研究,优选出了色氨酸碱解条件。同时,通过对高效液相色谱中流动相pH、有机洗脱溶剂、流动相组成和检测波长等条件的研究,建立了饲料中色氨酸的高效液相色谱测定方法。本方法操作简单,且具有较高的灵敏度、精密度和准确性,能够对植物性和动物性饲料中色氨酸进行定量分析,是评价饲料质量的有效手段。

(下转第316页)

味(或药草味)强度稳中增强。同时,这也与煎煮液的整体气味轮廓相符。

3 结论

通过采用 SAFE 和 DHS 两种风味提取技术,对当归药材中气味成分进行分析,分别鉴定出 43 种化合物和 47 种化合物。采用 AEDA 和 DHDA 并结合 GC-O-MS 共同确定 6 种关键气味,分别是 6-十一酮(泥土味、中药味)、藁本内酯(药草味)、丁烯基苯酞(药草味)、己醛(青草味)、辛醛(清香)和 2-甲氧基-4-乙基苯酚(咖喱味)。采用 SPME 法提取当归煎煮液的挥发性成分,并以内标法对关键气味化合物进行定量分析。结果表明:这些化合物在煎煮过程中含量发生改变,致使煎煮液清新香韵先增强后减弱,泥土香韵强度整体减弱,药草和咖喱香韵整体增强。这在分子水平上解释了当归煎煮液在煎煮过程中宏观上的气味变化原因。

参考文献

- [1] Yi L, Liang Y, Wu H, et al. The analysis of Radix Angelicae Sinensis (Danggui) [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1216:1991-2001.
- [2] 夏泉, 张平, 李绍平, 等. 当归的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004(3):164-166.
- [3] 陈慧珍. 当归的研究进展[J]. 海峡药学, 2008(8):83-85.
- [4] Kim M, El-Aty AMA, Kim I, et al. Determination of volatile

(上接第 307 页)

(Ctenopharyngodonidella) as affected by frozen storage [J]. Food Research International, 2014, 56:190-198.

- [17] 芦永军, 曲艳玲, 宋敏. 近红外相关光谱的多元散射校正处理研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(5):877-880.
- [18] Benjakul S, Visessanguan W C, Tanaka M. Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage [J]. Food Research International, 2003, 36(8):787-795.
- [19] Ventanas S, Heinonen M, Estevez M. Protein Carbonylation and Water-Holding Capacity of Pork Subjected to Frozen Storage: Effect of Muscle Type, Premincing, and Packaging [J]. Journal of

(上接第 310 页)

参考文献

- [1] 陈荣庆, 刘伟, 皮雄娥, 等. L-色氨酸的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(14):4438-4440.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 中国国家标准化管理委员会. GB/T 18246-2000 饲料中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [3] 徐礼生, 高贵珍, 曹稳根, 等. 紫外分光光度法快速测定发酵液中的 L-色氨酸[J]. 分析实验室, 2014, 33(6):675-677.
- [4] 侯冬岩, 回瑞华. 色氨酸和酪氨酸的双波长荧光光谱的研究[J]. 分析实验室, 2001, 20(6):88-89.
- [5] 杨晓云, 徐汉虹, 王立世, 等. 色氨酸、半胱氨酸和酪氨酸的高效毛细管电泳分析[J]. 分析测试学报, 2001, 20(3):

flavor components in danggui cultivars by solvent free injection and hydrodistillation followed by gas chromatographic - mass spectrometric analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1116:259-264.

- [5] Kim M, El-Aty AMA, Jeong H, et al. Identification of volatile components in Angelica species using supercritical - CO₂ fluid extraction and solid phase microextraction coupled to gas chromatography - mass spectrometry [J]. Biomedical Chromatography, 2006, 20:1267-1273.
- [6] Tan H, Hu D, Song J, et al. Distinguishing Radix Angelica sinensis from different regions by HS-SFME/GC-MS [J]. Food Chemistry, 2014, 186:200-206.
- [7] 宋焕禄. 分子感官科学及其在食品感官品质评价方面的应用[J]. 食品与发酵工业, 2011(8):126-130.
- [8] Engel W, Bahr W, Schieberle P. Solvent Assisted Flavour Evaporation (SAFE) - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices [J]. European Food Research & Technology, 1999, 209(3):237-241.
- [9] 胡长鹰. 当归挥发油的提取与成分分析[J]. 食品与机械, 2006(2):24-26.
- [10] 卢森华, 李耀华, 陈勇, 等. 当归藤不同部位挥发油成分 GC-MS 分析[J]. 安徽农业科学, 2012(2):733-735.
- [11] 许舜军, 杨柳, 谢培山, 等. 中药气味鉴别的研究现状与展望[J]. 中药新药与临床药理, 2011(2):228-231.

Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(10):5435-5443.

- [20] Barbin D F, Sun D W, Su C. NIR hyperspectral imaging as non-destructive evaluation tool for the recognition of fresh and frozen-thawed porcine longissimusdorsi muscles [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013, 18(2):226-236.
- [21] Calvelo A. Recent studies on meat freezing [J]. Developments in Meat Science, 1981.
- [22] Sánchez - Alonso I, Carmona P, Careche M. Vibrational spectroscopic analysis of hake (Merlucciusmerluccius L.) lipids during frozen storage [J]. Food Chemistry, 2012, 132(1):160-167.

15-18.

- [6] Jonga WHA, Smita R, Bakkerb SJL, et al. hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2009, 877(7):603-609.
- [7] 伍喜林. 色氨酸分析技术的现状和展望[J]. 饲料工业, 1994, 15(5):29-33.
- [8] 宋吉英. HPLC 法测玉米蛋白粉和乳猪教槽料中色氨酸的含量[J]. 饲料工业, 2014, 34(7):52-54.
- [9] 周虹, 毛建霖, 罗玲, 等. 微波碱水解法测定农产品中色氨酸含量[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(3):79-81.
- [10] 崔淑文, 王淑芳, 郑云兰, 等. 饲料中色氨酸测定方法研究[J]. 中国饲料, 1993, 18(3):33-35.