

尹丽丽, 郑红, 程志, 等. 超高效液相色谱法检测特殊医学用途配方食品中 22 种游离氨基酸 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(14): 264-271. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080065

YIN Lili, ZHENG Hong, CHENG Zhi, et al. Determination of 22 Free Amino Acids in Food for Special Medical Purposes by Ultra-performance Liquid Chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(14): 264-271. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080065

· 分析检测 ·

超高效液相色谱法检测特殊医学用途配方食品中 22 种游离氨基酸

尹丽丽, 郑红, 程志, 卢兰香, 薛霞, 王骏, 胡梅, 刘艳明*

(山东省食品药品检验研究院, 山东省特殊医学用途配方食品质量控制工程技术研究中心,
山东省食品药品安全检测工程技术研究中心, 山东济南 250101)

摘要: 本文建立了特殊医学用途配方食品中 22 种游离氨基酸的超高效液相色谱检测方法。样品中氨基酸用磺基水杨酸提取, 以 2,4 二硝基氟苯 (DNFB) 为柱前衍生试剂, 以乙腈水-甲酸铵为流动相梯度洗脱, HSS T3 色谱柱高效分离, 超高效液相-二极管阵列检测器检测, 外标法定量。结果显示, 22 种氨基酸在 2~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.99$)。方法检出限 ($S/N \geq 3$) 为 10 mg/100 g, 定量限 ($S/N \geq 10$) 为 25 mg/100 g, 低、中、高三加标水平的回收率在 90.1%~109.1%, 相对标准偏差为 0.8%~6.9%。方法简单高效、准确度高、重复性好, 适用于特殊医学用途配方食品中 22 种游离氨基酸的定性、定量分析, 为保障特殊医学用途配方食品的质量安全提供技术支持。

关键词: 特殊医学用途配方食品, 游离氨基酸, 柱前衍生, 2,4 二硝基氟苯, 超高效液相色谱法

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)14-0264-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022080065



本文网刊:

Determination of 22 Free Amino Acids in Food for Special Medical Purposes by Ultra-performance Liquid Chromatography

YIN Lili, ZHENG Hong, CHENG Zhi, LU Lanxiang, XUE Xia, WANG Jun, HU Mei, LIU Yanming*

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Quality Control of Food for Special Medical Purposes, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Safety Inspection of Food and Drug, Jinan 250101, China)

Abstract: A method was established to determine 22 free amino acids in food for special medical purposes by ultra-performance liquid chromatography. After extraction with sulfosalicylic acid and derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), the samples were eluted with acetonitrile water-ammonium formate as mobile phase. Amino acids were separated by HSS T3 column and detected with diode-array detector by external standard method. Results showed that, the 22 amino acids were linear in the range of 2~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with correlation coefficients higher than 0.99. The limits of detection ($S/N \geq 3$) were 10 mg/100 g, and the limits of quantification ($S/N \geq 10$) were 25 mg/100 g. The recoveries were in the range of 90.1% and 109.1% with relative standard deviation (RSD) from 0.8% to 6.9%. This method was simple, efficient, accurate and reproducible. It was suitable for determination of 22 free amino acids in food for special medical purposes, which could provide technical support to ensure the quality and safety.

Key words: food for special medical purposes; free amino acid; pre-column derivatization; 2,4-dinitrofluorobenzene; ultra-performance liquid chromatography

收稿日期: 2022-08-08

基金项目: 2019 年度山东省重点研发计划 (医用食品) (2019YYSP020)。

作者简介: 尹丽丽 (1987-), 女, 本科, 高级工程师, 研究方向: 食品安全分析与风险预警, E-mail: yinli_li@126.com。

* 通信作者: 刘艳明 (1981-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全分析与风险预警, E-mail: msymliu@163.com。

特殊医学用途配方食品是为满足进食受限、消化吸收障碍、代谢紊乱或特定疾病状态人群对营养素或膳食的特殊需求,而专门加工配制而成的配方食品,如氨基酸代谢障碍配方食品。氨基酸作为合成蛋白质的重要原料,因其分子量小、易吸收常成为特殊医学用途配方食品首选的营养添加剂,但若摄入不当,会影响人体的正常生命代谢^[1]。2019 年相关部门积极整顿了特殊医学用途配方食品行业乱象,被行业称为特殊医学用途配方食品发展元年,截至 2020 年,特殊医学用途配方食品已注册超过 45 款,建立和规范特殊医学用途配方食品中相关检验标准及方法意义重大。

GB 29922-2013^[2]规定了 22 种可用于特殊医学用途配方食品中的氨基酸种类及含量,但 GB 5009.124-2016^[3]中分析的目标物仅限 16 种,未能覆盖胱氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸、色氨酸和谷氨酰胺;卫生部公布的《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第二批)》中规定的 L-羟脯氨酸属于非法添加氨基酸,但目前的检验标准 SN/T 3929-2014^[4]不包括特殊医学用途配方食品基质。国外报道的氨基酸检测对象大多为生物样品或普通食品,与种类繁多、基质复杂的特殊医学用途配方食品差别大,使得常规检测手段难以直接应用。国内针对特殊医学用途配方食品的已报导文献目前仅有 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(AQC)衍生法^[5],该方法限于 GB 25596-2010^[6]中的 19 种氨基酸,且方法对流动相 pH 要求极其严苛,适应性差。

调研文献发现,现有检测氨基酸的方法有茚三酮柱后衍生-氨基酸分析仪检测^[7]、衍生化反应-液相色谱仪检测^[8-11]、液相色谱-串联质谱法^[12-15]等,氨基酸分析仪检测目标物局限性强,仪器专用,实验室普及率低;液相色谱-质谱仪器本身价格昂贵,常采用的消除基质效应方式-同位素内标法^[12]也进一步提高了检测成本。本文拟采用液相色谱法检测 22 种游离氨基酸。基于氨基酸本身没有紫外吸收,需经过衍生化反应引入生色基团后进行检测。据报道,用于柱前衍生的试剂有 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(AQC)^[16]、邻苯二甲醛(OPA)^[17]、异硫氰苯酯(PITC)^[18-20]、9-芴甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)^[21-22]、丹磺酰氯(Dansyl-Cl)^[23]、2,4-二硝基氟苯(DNFB)^[24-26]等。其中,AQC 与氨基酸反应快,副产物少,但是衍生试剂价格昂贵;OPA 主要与一级氨基酸反应,不能与二级氨基酸直接反应;PITC 衍生过程需去除多余的衍生试剂,且痕量的 PITC 会缩短分析柱的寿命;FMOC-Cl 形成的衍生产物需萃取,且与组氨酸形成衍生物不稳定,影响定量;Dansyl-Cl 易生成多级衍生产物;DNFB 衍生技术虽然已有文献或资料报道,但与普通液相色谱联合检测也存在缺陷,如衍生反应时间长;使用 5 μm 色谱柱^[24-26]柱效低,分析时间长;流

动相采用 N,N 二甲基甲酰胺^[24]、三乙胺^[25]或者磷酸盐^[26],对环境、色谱柱、仪器均不友好等。

本研究针对 GB 29922-2013 规定的所有氨基酸(色氨酸除外,因其具发色基团,可用紫外检测器直接测定)和非法添加的 L-羟脯氨酸,建立了 DNFB 衍生特殊医学用途配方食品中 22 种游离氨基酸的超高效液相色谱法,方法简单高效、试剂绿色环保,填补了 GB 29922-2013 中检测方法缺失的空白,检测范围扩增了 L-羟脯氨酸。方法为特殊医学用途配方食品企业质量控制提供技术支持,为行业发展提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、谷氨酰胺(Gln)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、组氨酸(His)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、酪氨酸(Tyr)标准品 纯度均 $\geq 99\%$, Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司;L-羟脯氨酸(L-Hyp)、瓜氨酸(Cit)、丙氨酸(Ala)、胱氨酸(Cys)标准品 纯度均 $\geq 99\%$, Bepure 公司;甘氨酸(Gly) 纯度 $\geq 99\%$, 中国计量科学研究院;天冬酰胺(Asn)、鸟氨酸(Orn)标准品 纯度 $\geq 99\%$, 上海安谱实验科技股份有限公司;牛磺酸(Tau)标准品 纯度 $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich 公司;ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm) 美国 Waters 公司;甲醇、乙腈 均为色谱纯,美国 Fisher 公司;盐酸、乙酸、氢氧化钠、甲酸铵、磺基水杨酸、亚铁氰化钾、乙酸锌、碳酸钠、磷酸二氢钾、碳酸氢钠 均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;2,4-二硝基氟苯(DNFB) 阿法埃莎-中国化学有限公司;实验用特殊医学用途配方食品:氨基酸配方、乳蛋白深度水解配方、乳蛋白部分水解配方、氨基酸代谢障碍配方 均为市售;PTFE 微孔滤膜 0.22 μm , 上海安谱科学仪器有限公司。

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪 配备 Waters 二极管阵列检测器,美国 Waters 公司;AB204-S 型电子天平 瑞士 Mettler Toledo 公司;SB-800DTD 型超声波清洗器 中国宁波新芝生物科技股份有限公司;3-18K 型冷冻离心机 德国 Sigma 公司;Milli-Q 超纯水制备器 美国 MILLIPORE 公司;MS3 涡旋混合器 德国 IKA 公司。

1.2 标准溶液的配制

1.2.1 标准储备液 分别称取 10 mg(精确至 0.1 mg)氨基酸标准品,于 25 mL 棕色容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液分别定容至刻度,配制成浓度均为 0.4 mg/mL 的标准储备液,0~4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.2.2 标准工作溶液 将标准储备液用 3.5% 磺基水杨酸溶液逐级稀释, 配成各组分浓度为 2、10、20、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作溶液。

1.3 样品前处理

提取: 样品混匀后称取 0.2 g(精确至 0.0001 g) 于 50 mL 聚丙烯具塞离心管中, 准确加入 25 mL 3.5% 磺基水杨酸溶液, 涡旋 1 min, 超声 15 min。8000 r/min 离心 5 min, 取上清液待衍生。

衍生: 分别取标准工作溶液和样品提取液 200 μL 至 15 mL 离心管, 加入 0.5 mol/L 碳酸氢钠(pH9.0) 200 μL , 涡旋混匀后加入 400 μL 1% DNFB 衍生液, 混匀后放入 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡暗反应 10 min, 取出放至室温, 加入 0.05 mol/L 磷酸二氢钾(pH7.0) 3 mL, 涡旋混匀。过 0.22 μm 滤膜后, 供超高效液相色谱-二极管阵列检测器测定。

1.4 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm); 流动相: 50% 乙腈水(A) 和 50 mmol/L 甲酸铵溶液(pH5.0)(B)。检测波长: 360 nm; 流速: 0.3 mL/min。柱温: 55 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 3 μL 。梯度洗脱程序(A): 0~6 min: 12%~18%, 6~10 min: 18%~50%, 10~28 min: 50%~90%, 28.1~33 min: 100% 保持, 33.1~40 min: 12% 保持。

1.5 数据处理

通过与仪器配套的 Empower 3 色谱数据处理系统进行数据采集与处理, Origin 8.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

氨基酸目标物极性较强, 在色谱柱上保留弱, 需衍生后测定。碱性条件下, 衍生试剂 DNFB 与末端氨基酸反应, 脱去一份子 HF, 生成具有紫外吸收的 DNP 肽(图 1)。由于 DNP 肽的极性相近, 色谱保留行为相似, 且副产物易产生干扰, 使得色谱分离难度增加。为此, 本文对色谱柱和流动相条件进行详细考察。

2.1.1 色谱柱的选择 常规液相色谱柱粒径大、分析效率低, 为实现 22 种氨基酸的有效分离, 本文选用柱效高、粒径小超高效液相色谱柱。采用 1.4 流动相条件, 比较 ACQUITY UPLC BEH Shield RP18、ACCQ-TAG ULTRA C18 和 ACQUITY UPLC HSS T3 三种色谱柱的分离效果发现, Asn 与试剂峰 R1 在保留时间上很接近, 对色谱柱的分离能力要求极高。Shield RP18 和 ULTRA C₁₈ 的粒径小(1.7 μm), 理论柱效高, 但不能有效分离出 Asn, Asn 被试剂峰 R1 覆盖, 无法检测; HSS T3(1.8 μm) 属 100% 水性流动相兼容的 C₁₈ 色谱柱, 专门用来保留和分离极性

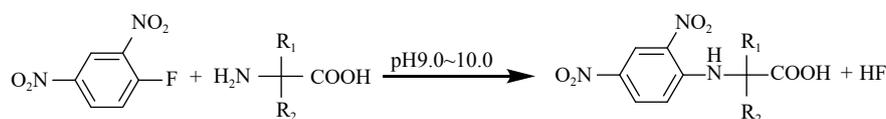


图 1 DNFB 与氨基酸反应方程式

Fig.1 Reaction equation of DNFB with amino acids

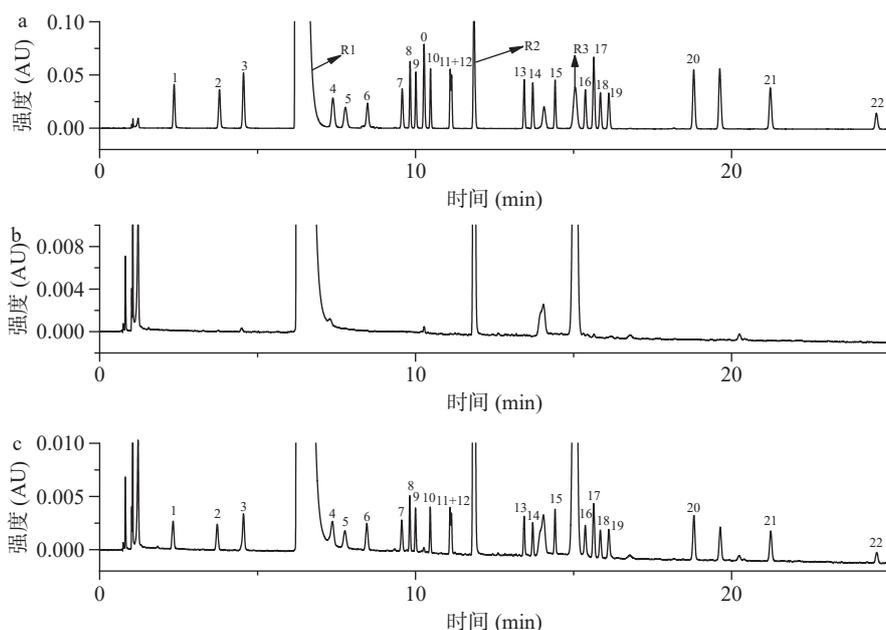


图 2 T3 柱分离 22 种氨基酸的色谱图

Fig.2 Chromatograms of 22 amino acids separated by T3 column

注: 1-Asp; 2-Glu; 3-L-Hpy; 4-Asn-; 5-Ser; 6-Gln; 7-Gly; 8-Cit; 9-Arg; 10-Thr; 11-Ala; 12-Pro; 13-Val; 14-Met; 15-Cys; 16-Ile; 17-Leu; 18-His; 19-Phe; 20-Orn; 21-Lys; 22-Lyr; 0-Tau(类氨基酸, 非本文目标物); R-试剂峰; a: 标准溶液; b: 样品; c: 加标样品。

水溶性好的有机小分子。图 2 为 HSS T3 柱分析目标物的色谱图(a、b、c 分别为标准溶液、代表性样品、样品加标的谱图), Asn 保留时间位于试剂峰 R1 之后, 且与邻近 Ser 有效分离; 除此之外, 特殊医学用途配方食品中常添加的类氨基酸成分^[5]Tau 可同时被 DNFB 衍生, Tau 与邻近目标物的分离度同样影响着目标氨基酸的准确定量, 图 2a 可以看出, HSS T3 柱能同时满足 22 氨基酸和 Tau 的有效分离。

2.1.2 流动相的选择 现有文献报道的用于分离 DNP 肽的流动相-水相常用磷酸盐缓冲液, 其中需加入三乙胺等离子对试剂, 配制过程复杂、使用过程中易析出且对色谱柱、仪器均不友好。本文尝试使用溶解性好的甲酸铵作为水相分析 DNP 肽, 一方面简化了配制流动相的繁杂性, 降低了检测成本; 另一方面该试剂对环境友好也有利于仪器或色谱柱寿命的延长。研究发现, 乙腈水&甲酸铵的流动相体系中有有机相-乙腈浓度对目标物的分离度尤其敏感, 因此对有机相进一步考察。

有机相-乙腈水作为强洗脱溶剂, 其浓度直接影响洗脱速度, 进而影响化合物的分离度, 其中 Ala、Pro 两峰、Ile、Leu、His 三峰的分离是难点(图 3)。当乙腈浓度为 100% 时, 目标峰被洗脱太快, 集中分布在色谱图前端, Ala、Pro 分离度好, 但 Ile、Leu、His 三峰明显分不开; 当乙腈浓度为 40% 时, 洗脱速度变慢, 分析效率低, 同时水相甲酸铵盐被稀释, 浓度降低, 致使末端 Leu、His 分离度差; 当乙腈浓度为 60% 时, 目标氨基酸分布相对均匀, 但 Ile、Leu、His 三峰仍分不开; 当乙腈浓度为 50% 时(图 2a),

Ala、Pro 两峰分离度稍差(定量为 Ala、Pro 之和), 可以通过光谱图辅助定性, 其他 20 种氨基酸分离效果满意。因此, 本文选择 50% 的乙腈水作为有机相, 50% 乙腈水&50 mmol/L 甲酸铵溶液为最终流动相体系。

2.1.3 特征吸收光谱定性讨论 二极管阵列检测器全波长同时采集数据的特点, 赋予了其光谱比对的功能, 衍生后生成的 DNP 肽的紫外吸收光谱形状类似, 但是一级与二级氨基酸衍生后形成的 DNP 肽光谱特征差异明显。一级或二级氨基酸是针对氨基中 N 的配位状态来说的, 一级氨基酸的氨基为伯氨基, 二级的氨基为仲氨基, 如 Pro、L-Hpy。图 4 看出, 一级氨基酸衍生产物光谱图最大吸收集中在 360±3 nm 处, 而二级氨基酸(Pro、L-Hpy)的最大吸收移至 385 nm 左右。特征紫外吸收波长可辅助定性一级氨基酸和二级氨基酸, 为后续推断更多化合物的结构与性质推断提供参考价值。

2.2 前处理条件考察

2.2.1 提取条件的考察 特殊医学用途配方食品基质复杂, 含有麦芽糊精、蛋白质、脂肪及维生素等各类小分子成分, 为防止蛋白水解为氨基酸, 游离态氨基酸需要在沉淀蛋白前提下提取, 本文基于氨基酸配方食品考察了三种前处理方式: 3.5% 磺基水杨酸(E1)、亚铁氰化钾-乙酸锌(E2)和 80% 乙腈(E3), 三种提取液均具有沉淀蛋白作用。

图 5 柱状图比较发现, E1 的提取效率明显高(其中 L-Hyp、Glu、Asn、Cit、Orn 均未检出)。E2 和

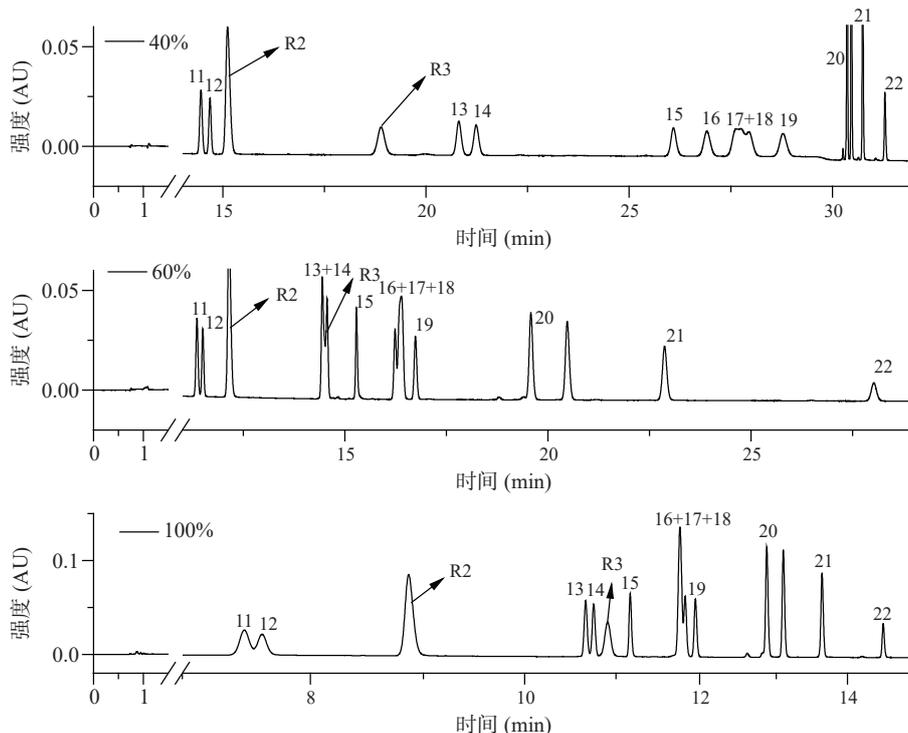


图 3 有机相比例对 22 种 DNP 肽分离度的影响

Fig.3 Effect of organic phase ratio on the separation degree of 22 amino acid derivatives

注: 11-Ala; 12-Pro; 13-Val; 14-Met; 15-Cys; 16-Ile; 17-Leu; 18-His; 19-Phe; 20-Orn; 21-Lys; 22-Lyr; 0-Tau; R: 试剂峰。

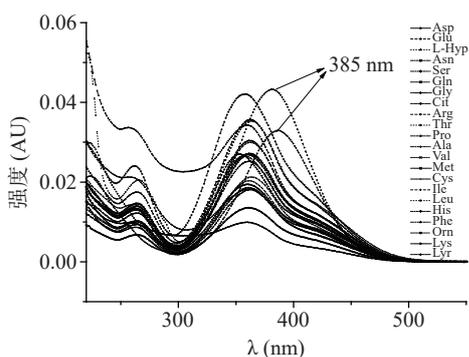


图4 22种DNP肽的光谱图

Fig.4 Spectrograms of 22 amino acid derivatives

E3 虽能较好地沉淀滤液,但是氨基酸含量出现不同程度的偏低现象,可能是二者在沉淀或者聚集过程中带走了部分氨基酸。进一步考察 E1 的回收率,发现其对 22 种氨基酸的回收率均满意。推测原因,E1 一方面通过提高离子强度,使蛋白质的溶解度降低,从而沉淀蛋白;另一方面通过提高溶液酸度,使氨基酸的溶解度增加,从而能高效提取氨基酸。综上,本实验选择 3.5% 磺基水杨酸的提取方式。

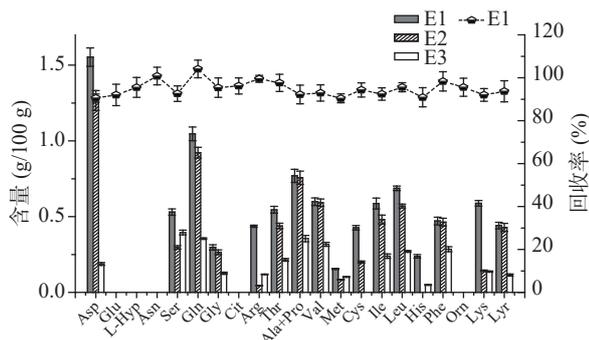


图5 提取条件的考察

Fig.5 Examination of extraction conditions

注: E1、E2、E3 柱状图代表 3 种提取条件的提取效率; E1 曲线图代表 3.5% 磺基水杨酸的回收率。

2.2.2 衍生条件的考察 衍生条件是否充分、副产物干扰等因素都会影响目标氨基酸的准确定量,因此,本文对衍生条件进行详细考察及优化。根据特殊医学用途配方食品中游离氨基酸的含量范围,本着衍生剂过量且干扰定量的原则,研究选用 100 μg/mL 混合标准溶液考察衍生试剂的最佳用量,通过考察 DNFB 的不同用量(0.1%、0.5%、1%、2%)对氨基酸响应的差异来衡量衍生效果。结果(图 6)表明, DNFB 含量与衍生反应呈正相关。当 DNFB 含量为 0.1% 时,目标峰响应明显低,衍生不充分;当含量为 0.5% 时,仅 6 种(Ser、Gln、His、Orn、Lys、Lyr)氨基酸响应低;当含量增至 1% 时,各氨基酸响应不再增加;当含量增至 2% 时,衍生试剂的峰宽增大,反而干扰附近氨基酸的准确定量,检测成本也随之增加。综合考虑,选择 1% 含量的 DNFB 作为衍生试剂。

据相关文献报道^[16-18],衍生条件有 30、60 min 恒温,衍生时间较长。本文比较不同衍生时间(0、

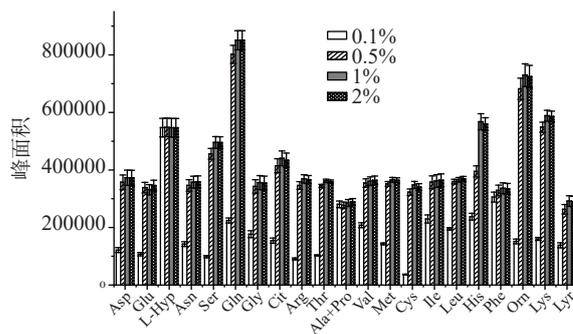


图6 衍生试剂用量的考察

Fig.6 Examination of derivative reagent dosage

10、20、30 min),在 60 °C 水浴振荡条件下的反应,记录氨基酸含量的变化发现,衍生时间为 0 min 时,无目标衍生产物,衍生 10、20、30 min 后,衍生产物的响应基本一致,随着时间的延长,响应无明显变化,说明 60 °C 水浴振荡条件下衍生 10 min 即反应完全。

2.3 方法学评价

2.3.1 线性范围、检出限和定量限 将系列标准工作溶液(2、10、20、50、100 μg/mL)由低到高依次测定,以每种氨基酸峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X, μg/mL)为横坐标绘制标准曲线。结果显示,22 种氨基酸在 2~100 μg/mL 范围内,线性回归方程及相关系数如表 1 所示。采用部分水解配方作为空白基质加标的方法,以信噪比 S/N=3 得到检出限(LOD)为 10 mg/100 g,以信噪比 S/N=10 得到定量限(LOQ)为 25 mg/100 g。

表 1 22 种氨基酸线性回归方程及相关系数

Table 1 Linear regression equations and correlation coefficients of 22 amino acids

化合物	线性回归方程	决定系数 (R ²)
Asp	Y=1.708878e+003X-7.160395e+002	0.9984
Glu	Y=1.565137e+003X+6.428316e+002	0.9997
L-Hyp	Y=1.922419e+003X-1.649680e+002	0.9994
Asn	Y=1.699338e+003X+2.475664e+002	0.9999
Ser	Y=1.641198e+003X+1.222909e+002	0.9998
Gln	Y=1.552204e+003X-8.413360e+002	0.9986
Gly	Y=1.639792e+003X+1.033586e+002	0.9999
Cit	Y=1.074429e+003X+3.671412e+002	0.9958
Arg	Y=1.672074e+003X+1.735269e+002	0.9998
Thr	Y=1.686861e+003X+4.566290e+002	0.9998
Ala+Pro	Y=1.288069e+003X+3.513061e+002	0.9999
Val	Y=1.689239e+003X+4.548071e+002	0.9999
Met	Y=1.501528e+003X-6.406490e+002	0.9991
Cys	Y=1.479431e+003X+1.628040e+002	0.9999
Ile	Y=1.721529e+003X+7.216248e+002	0.9999
Leu	Y=1.711149e+003X+6.272788e+002	0.9999
His	Y=2.124532e+003X-1.404751e+002	0.9998
Phe	Y=1.501713e+003X+3.245993e+002	0.9999
Orn	Y=1.261322e+003X-7.980346e+002	0.9959
Lys	Y=2.559017e+003X-2.071023e+003	0.9996
Lyr	Y=1.130975e+003X-1.850230e+003	0.9995

2.4 回收率及精密度

实验采取某氨基酸配方特殊医学用途配方食品

表 2 22 种游离氨基酸回收率与精密度结果(n=6)

Table 2 Recovery and precision results of 22 free amino acids (n=6)

化合物	添加量(mg/100 g)	平均回收率(%)	精密度(%)
Asp	50	95.6	6.1
	250	90.1	4.2
	500	101.8	2.1
Glu	50	109.1	5.5
	250	106.5	6.2
	500	108.0	5.4
L-Hyp	50	92.9	5.2
	250	99.4	2.9
	500	103.2	3.2
Asn	50	105.9	1.8
	250	107.4	4.0
	500	101.1	4.3
Ser	50	99.5	5.8
	250	105.4	5.0
	500	105.1	4.1
Gln	50	107.7	3.9
	250	98.5	6.1
	500	109.1	5.1
Gly	50	99.2	6.6
	250	104.5	4.2
	500	96.8	0.8
Cit	50	99.5	6.9
	250	102.8	5.9
	500	106.9	3.8
Arg	50	100.3	6.5
	250	101.9	4.3
	500	108.3	1.9
Thr	50	97.1	2.7
	250	98.3	5.6
	500	109.1	2.1
Ala+Pro	50	101.1	1.6
	250	98.9	5.6
	500	107.1	5.0
Val	50	105.3	4.1
	250	102.9	5.9
	500	101.5	4.8
Met	50	100.5	4.1
	250	98.0	5.1
	500	103.8	2.3
Cys	50	99.1	2.0
	250	94.4	5.5
	500	98.5	4.2
Ile	50	101.8	3.5
	250	97.8	6.2
	500	103.6	5.2
Leu	50	99.1	2.1
	250	109.1	4.6
	500	105.3	2.2
His	50	97.5	2.2
	250	91.9	5.9
	500	107.2	3.8
Phe	50	105.2	3.2
	250	93.1	6.0
	500	104.4	4.4
Orn	50	107.2	2.9
	250	98.5	6.8
	500	99.0	4.9
Lys	50	99.4	4.4
	250	91.1	4.5
	500	99.5	3.2
Lyr	50	90.9	5.4
	250	90.7	4.3
	500	98.8	4.9

进行回收率试验,添加含量为 50、250 和 500 mg/100 g 三水平的标准溶液,每个水平平行测定 6 次,得到方法的回收率及精密度,结果见表 2。结果显示,回收率在 90.1%~109.1% 之间,相对标准偏差为 0.8%~6.9%。

2.5 实际样品的测定

运用本方法对市售部分水解配方(F1)、深度水解配方(F2)、氨基酸配方(F3)和氨基酸代谢障碍配方(F4)特殊医学用途配方食品中 22 种游离氨基酸进行测定,结果显示四种配方均未检出可能非法添加的 L-羟脯氨酸;部分水解配方未检出其他 21 种游离氨基酸;深度水解配方未检出 Gln、Cit 和 Orn;氨基酸配方未检出 Glu、Asn、Cit 和 Orn;氨基酸代谢障碍配方未检出 Glu、Asn、Cit、Phe 和 Orn,其他检出成分含量见表 3。结果表明,部分水解配方不含游离氨基酸,深度水解配方、氨基酸配方和氨基酸代谢障碍配方中含有大量游离氨基酸,氨基酸配方和氨基酸代谢障碍配方中检出的氨基酸种类与配料表相符。

表 3 特殊医学用途配方食品中 22 FAAs 含量

Table 3 Content of 22 FAAs in special medical formula foods

化合物	F1(g/100 g)	F2(g/100 g)	F3(g/100 g)	F4(g/100 g)
Asp	ND	0.158	1.302	1.196
Glu	ND	0.826	ND	ND
L-Hyp	ND	ND	ND	ND
Asn	ND	0.910	ND	ND
Ser	ND	0.502	0.791	0.621
Gln	ND	ND	1.150	1.215
Gly	ND	0.102	0.453	0.226
Cit	ND	ND	ND	ND
Arg	ND	0.645	0.667	0.402
Thr	ND	0.527	0.828	0.495
Ala+Pro	ND	0.332	1.221	0.699
Val	ND	0.767	1.273	0.527
Met	ND	0.412	0.291	0.143
Cys	ND	0.516	0.812	0.411
Ile	ND	0.680	0.889	0.546
Leu	ND	0.856	1.025	0.662
His	ND	0.294	0.459	0.221
Phe	ND	0.680	0.671	ND
Orn	ND	ND	ND	ND
Lys	ND	1.149	0.882	0.592
Lyr	ND	0.151	0.528	0.331

注: ND表示未检出。

3 结论

本文建立了特殊医学用途配方食品中 22 种游离氨基酸的检测方法,方法详细考察了提取、衍生及色谱条件,发展了分离 DNP 肽的绿色色谱条件,缩短了衍生时间、提高了检测效率。22 种氨基酸在 2~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好($R^2>0.99$),检出限为 10 mg/100 g,定量限为 25 mg/100 g,加标回收率为 90.1%~109.1%,相对标准偏差为 0.8%~6.9%。方法针对特殊医学配方食品基质,采用碘基水杨酸沉淀蛋白、去除干扰杂质;选用超高效液相色谱法提高检测效率、降低成本;首次使用乙腈水-甲酸铵流动相条

件分离 DNP 肽, 完成了 22 种氨基酸的准确定量, 并且对可能添加的类氨基酸成分-牛磺酸实现了有效分离。本方法为特殊医学用途配方食品中氨基酸检测标准的建立提供了技术支持, 为医用食品行业的健康发展提供技术保障。

参考文献

[1] 佚名. 特殊配方食品不得随意添加氨基酸[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 1. [Anonymous. Special formula foods are not allowed to add amino acids arbitrarily[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(8): 1.]

[2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 29922-2013 食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. [The National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 29922-2013 National Food Safety Standard-General principles for special medical purpose formula foods[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2014.]

[3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.124-2016 食品安全国家标准食品中氨基酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [The National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, the State Food and Drug Administration. GB 5009.124-2016 National food safety standard. Determination of amino acids in foods[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2017.]

[4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3929-2014 出口食品中 L-羟脯氨酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. SN/T 3929-2014 Determination of L-hydroxyproline in exported food by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2014.]

[5] 卢兰香, 薛霞, 宿书芳, 等. 超高效液相色谱法测定特殊医学用途婴儿配方食品中的 19 种游离氨基酸和牛磺酸[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 190-197. [LU L X, XUE X, SU S F, et al. Determination of 19 free amino acids and taurine in formulas for special medical purposes intended for infants by ultra-performance liquid chromatography[J]. Food Science, 2022, 43(4): 190-197.]

[6] 中华人民共和国国家卫生部. GB 25596-2010 食品安全国家标准 特殊医学用途婴儿配方食品通则[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. [Ministry of Health of the People's Republic of China. GB 25596-2010 National food safety standards. Special medical purposes infant formula food[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2012.]

[7] 王芳, 林颖, 谭小宣, 等. 2 种市售羊肚菌氨基酸组成及营养价值评价[J]. 现代食品, 2021(6): 120-126. [WANG F, LIN Y, TAN X Y, et al. Amino acid composition and nutritional value evaluation of two kinds of commercial morchella esculent[J]. Nutrition and Health, 2021(6): 120-126.]

[8] 张宏杰, 周建军, 李新生, 等. 2,4-二硝基氟苯衍生法测定游离氨基酸方法的优化[J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(4): 59-62. [ZHANG H J, ZHOU J J, LI X S, et al. Optimization for determining free amino acid with FDBN method[J]. Amino Acids and Biological Resources, 2000, 22(4): 59-62.]

[9] SUNG Y S, BERTHOD A, ROY D, et al. A closer examination of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate amino acid derivatization in HPLC with multiple detection modes[J]. Chromatographia, 2021: 719-727.

[10] 李文庆, 周建桥, 李文佳, 等. 冬虫夏草鲜品及干品游离氨基酸比较分析[J]. 菌物研究, 2020, 18(2): 126-131. [LI W Q, ZHOU J Q, LI W J, et al. Comparative analysis of free amino acids in fresh and dry samples of chinese cordyceps[J]. Fungal Research, 2020, 18(2): 126-131.]

[11] 曾春梅, 雷丹青, 董乐, 等. FMOC-CL 柱前衍生 RP-HPLC 法测定大鼠脑内海马组织中谷氨酸与 γ -氨基丁酸含量[C]//第六届 CAAE 脑电图与神经电生理大会会刊. 2018.

[12] XIAO H, LIU P, ZHENG S, et al. Screening of amino acids in dried blood spots by stable isotope derivatization-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. Chinese Chemical Letters, 2020: 2423-2427.

[13] VIOLI J P, BISHOP D P, PADULA M P, et al. Acetonitrile adduct analysis of underivatized amino acids offers improved sensitivity for hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass-spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2021(2): 462530.

[14] 戴明, 苏晓明, 吴少明, 等. UPLC-MS/MS 测定铁观音茶中 21 种游离氨基酸含量[J]. 化学研究与应用, 2021, 33(7): 1410-1419. [DAI M, SU X M, WU S M, et al. Determination of 21 kinds of free amino acids in Tie Guan Yin tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chemical Research and Applications, 2021, 33(7): 1410-1419.]

[15] VIRGILIOU C, THEODORIDIS G, WILSON I D, et al. Quantification of endogenous amino acids and amino acid derivatives in urine by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2021: 462005.

[16] XIE Y, LI Z. Determination of 18 types of amino acids in the serum of ischemic stroke patients by high performance liquid chromatography-diode array detector derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate[J]. Cell Biochemistry & Biophysics, 2015, 73(1): 111-115.

[17] RUTHERFURD S M, FANNING A C, MILLER B J, et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats[J]. Journal of Nutrition, 2015, 145(2): 372-329.

[18] 李发田, 李岩, 李先玉, 等. 高效液相色谱法检测食品中 17 种游离氨基酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4842-4848. [LI F T, LI Y, LI X Y, et al. Determination of 17 free amino acids in food by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(14): 4842-4848.]

[19] 张国华, 吴光斌, 陈昭华, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生 RP-HPLC 法同时测定莲雾中 15 种游离氨基酸的含量[J]. 食品工业科技, 2020, 41(21): 230-234. [ZHANG G H, WU G B, CHEN Z H, et al. Simultaneous determination of free amino acids in wax apple by reversed phase high performance liquid chromatography with phenyl isothiocyanate precolumn derivatization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(21): 230-234.]

[20] KLIKAROV J, ESLOV L, FISCHER J. Rapid analysis of phenyl isothiocyanate derivatives of amino acids present in czech meads[J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1644(13): 462134.

[21] 温浩然, 冀艳华, 韩星, 等. 利用柱前在线衍生-高效液相色谱法测定培植牛黄及天然牛黄中 18 种氨基酸的含量[J]. 中国现代中药, 2020, 22(2): 231-236. [WEN H R, JI Y H, HAN X, et al. Determination of 18 kinds of amino acids in cultured bezoar and bovis alculus using pre-column derivatization HPLC[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(2): 231-236.]

[22] 李璐, 李丹凤. 胖大海中氨基酸的含量测定及多元化统计分

- 析[J]. 食品科技, 2020, 45(6): 352-360. [LI L, LI D F. Determination and diversification of amino acids in *Scaphium scaphigerum* [J]. Food Science and Technology, 2020, 45(6): 352-360.]
- [23] KRKAN E, AYDOAN C. Free amino acid analysis in honey samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with UV detection using precolumn derivatization with dansyl chloride[J]. *Chromatographia*, 2021, 84(2): 127-133.
- [24] 吴有锋, 谭亮, 沈建伟, 等. 柴达木枸杞中 17 种氨基酸的测定与分析[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 281-286. [WU Y F, TAN L, SHEN J W, et al. Determination and analysis of 17 amino acids in Qaidam Chinese wolfberry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(1): 281-286.]
- [25] 赵英莲, 牟德华, 李艳. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生 HPLC 检测树莓中游离氨基酸[J]. 食品科学, 2015(6): 178-182. [ZHAO Y L, MOU D H, LI Y. High performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in raspberry using pre-column derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene[J]. Food Science, 2015(6): 178-182.]
- [26] 邓红英, 张永文, 李永贵. 柱前衍生高效液相色谱法测定复方氨基酸注射液氨基酸的含量[J]. 药学研究, 2020, 39(1): 27-30. [DENG H Y, ZHANG Y W, LI Y G. Determination of amino acid in compound amino acid injection by HPLC after pre-column derivatization[J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2020, 39(1): 27-30.]