

高效液相色谱法测定特殊医学配方食品中的色氨酸

王泽鸿

(广东康怡司法鉴定中心, 广东 东莞 523000)

【摘要】目的:探索在特殊医学配方食品中,采用高效液相色谱法对色氨酸进行测定效果。方法:选择高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography,HPLC)对配方食品中的色氨酸(Trp)进行检测。结果:Trp在1~100 mg/L内线性良好($r=0.9999$);Trp的回收率在90.4%~94.1%;其中依照计算公式($S/N=3$)来对定量限进行计算,取0.5 g样量,50 mL的定容体积,依据公式获得 $20\mu\text{g/g}$;而($S/N=10$)时,获得的定量限为 $65\mu\text{g/g}$ 。结论:可见,高效液相色谱法具有操作简单、快捷以及灵敏度高等优势,在准确度、精确度等方面较高,适合特殊医学配方食品的检测。

【关键词】HPLC;测定;特殊;医学配方;食品中;色氨酸

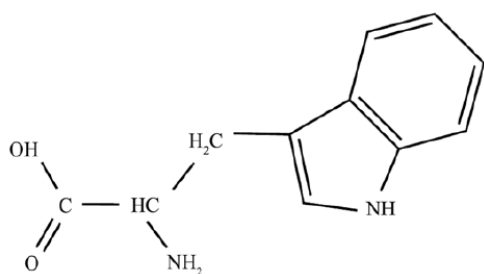


图1 Trp 结构式

Trp 主要是人体中必不可少的一种氨基酸,分子的公式为: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, 结构式如下图所示(图1)。如果人体一旦缺乏 Trp, 则会使得蛋白质、脂肪代谢等障碍,严重影响这人们的身体健康^[1]。本研究通过探索特殊医学配方食品中,采用高效液相色谱法对色氨酸进行测定效果,具体如下所示。

一、材料与方法

(一) 仪器与试剂的选择

1. 仪器: (1) 高效液相色谱仪(日本,型号 LC-20AD), 检测器: 配置二极管阵列; (2) 高速离心机(德国,型号:Sigma 4-16KS); (3) 恒温干燥箱(北京恒翔公司生产的,型号:DHG-9145A); (4) 旋涡混匀器(德国,型号:VORTEX 3); (5) 分析天平(ME204E、ME155DU); 超纯水机(Milli-Q

IQ 7000)。

2. 试剂: 色谱纯→甲醇; 分析纯→冰乙酸、乙酸钠以及氢氧化钾; L-色氨酸→取≥99.7%的标准品纯度; 氢氧化锂→优级纯; 试验用水→采取 Milli-Q 的超纯水。

(二) 试验方法

1. 标准溶液配制分析。选取1000 mg/L(色氨酸)的标准储备液,从储备液中抽取样品10 mg/L(色氨酸),将其放入容量瓶(10mg/L)之中,取2 mL 0.1mol/L 的氢氧化钾溶液,将其添加到里面给予溶解^[2],其中水定容为10 mL。在以上步骤完成后用水对其进行稀释,可以获取色氨酸质量浓度情况:1,2,5,10,20,30,70,100 mg/L 工作溶液(标准的),其他溶液配置如表1所示。

2. 样品前处理分析。将特殊医学用途食品公司提供的样品(粉剂),取0.5 g 剂量(剂量要精确到0.0001 g),将其样品放置到水解管,将5 mL 氢氧化钾溶液加入其中,并把氮气充入,随后将其盖子进行扭紧,恒温干燥箱保持110 摄氏度,将水解管放入其中进行水溶解,时间为16 个小时^[3]。取出水解管,让其进行冷却,随后通过乙酸钠进行缓冲溶液,再将其放置到容量瓶(50 mL)中,待其进行

表1 各项标准溶液配制表

名称	剂量(g)	取水量(mL)	方法
氢氧化钾溶液(0.1 mol/L)	0.27g	50 mL	将选取各项检测液的剂量溶于水中
氢氧化锂溶液(4 mol/L)	8.39 g	50 mL	
乙酸溶液(0.1%)	1 mL 冰乙酸	1000 mL	
乙酸钠溶液(缓冲,0.0079 mol/L Na)	无水乙酸钠 0.6g	1000 mL	将无水乙酸钠(0.6g)溶于水之后,利用冰乙酸,对 pH 调至 4.5

定容后转移到 50 mL 离心管中, 4500 r/分钟, 离心 3 分钟, 将其取出过滤膜 (0.22 μm)。

3. 色谱条件与数据处理分析。色谱柱主要选取 Agilent XDB-C, 4.5 mm×140 mm, 6 μm, 在流动中, 其中 A 则表示乙酸溶液 (0.1%); 而 B 则表示甲醇, 其中详细比例如表 2 所示。色谱柱柱温℃, 30 μL, 进样量 10 μL, 发射的波长为 277nm。Trp 的含量依据公式计算: $X = \frac{C \times V}{m} \times \frac{1000}{1000}$, 其中 X 是样品 Trp 的含量,

单位 ug/g; C 是由标准曲线获得的 Trp 样品质量浓度, 单位 mg/L, V 总体积 (mL), m 表示 Trp 样品的质量 (g), 换算系数用表示。

表 2 等度洗脱比例分析

时间 /min	流速 /mL, min	A/%	B/%
0.0	1.0	95	5
10.0	1.0	95	5
10.1	1.0	90	10
20.0	1.0	90	10

二、结果与分析

(一) 样品前处理及优化

1. 碱解剂类型与浓度分析。样品在进行酸解之后, Trp 则会完全受到破坏, 由于酶解中出现的产物较多, 易使其不完全, 所以对样品需要应用碱溶液进行水解。选取氢氧化锂 (4mol/L) 与氢氧化钾 (4mol/L) 两者作为此次碱解剂, 在条件相同的情况下比较相同样品实施水解状况^[4]。通过两种方法对特殊医学配方食品进行水解获取到的 Trp 量为 2970 μg/g 与 2130 μg/g, 色氨酸样品的添加量在 3060 μg/g, 其研究结果指出, 使用氢氧化锂进行水解后其各项效果明显较好; 而使用氢氧化钾水解, 具有较强的碱性, 容易使水解发生过度的情况, 伴随着 Trp 的破坏从而使得结果检测偏小。经过对氢氧化锂溶液 (1、2、3、4、5、6 mol/L) 水解进行分析。研究结果表示, 碱解剂因浓度偏大, 因此碱解的效果就更好^[5]。2. 碱解的时间。碱解时间的时间是其影响检测结果的构建原因, 选取 4h、8h、12h、16h、20h、24h 以及 28h 等时间段对其碱解效果进行分析, 研究指出, 16 小时的时候碱解获取到的结果比较好, 所以碱解时间取 16 小时为稳定。3. 中和方式。主要有 2 种方式: 第一是通过乙酸钠给予溶液进行缓冲, 并定容, 其 pH 值在 4.5; 第二是盐酸, 将其 pH 调至 6--7, 采用水进行定容。对比发现两种方式获取的 Trp 较好, 样品含量达到了 2943 μg/g 与 2946 μg/g。两者数据对比差异方

面不明显, 经过各方面 (效率情况与准确性) 的考虑, 取乙酸钠对其溶液缓冲, 调节 pH^[6]。

(二) 色谱条件优化

1. 选择波长。对于色氨酸的波长, 可以利用二极管阵列检测器来给予检测, 对比下图可以发现, 在 217nm-277nm 之间 Trp 具有较强紫外吸收, 同时在 217 nm 位置周围的干扰性比较大, 检测色氨酸的波长取 277 nm。

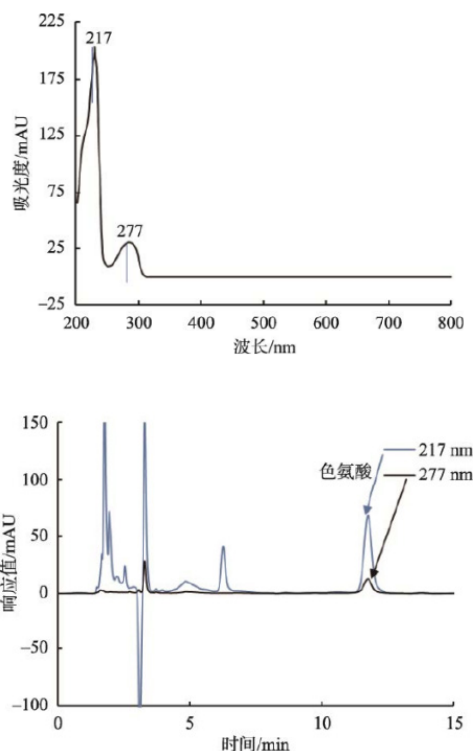


图 2 色氨酸光谱图与叠加图

2. 加强流动相的优化。根据以上内容对比 2 种方式 (乙酸钠、乙酸溶) 的流动相分离现象, 在有机相对比下两种方式均可以将其目标物进行良好的分离, 但是由于盐堵塞色谱柱风险比较大, 因此以乙酸溶液作为流动相^[7]。

(三) 验证方法

1. 线性范围和定量限。根据上诉的优化实验, 正确吸取 Trp 的标准溶液 (1000 mg/L), 取 10 mg/L 将其放入容量瓶 (10 毫升), 再将 2 mL 的氢氧化钾溶液 (0.1mol/L) 加入其中, 利用水进行定容, 其获得的标准浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 30, 70, 100 mg/L, 随后通过先后顺序, 将其注入液相色谱仪中进行检测, 将色氨酸的浓度划分为横坐标 X, 纵坐标 Y, 绘制标准曲线, $Y=14401X+787$, 相关系数: $R=0.9999$, 由此可以看出在 1~100 mg/L Trp 浓度范围内, 内线性的关系良好, 符合检测标准。依据信噪比法计算方法: $(S/$

N=3) 来对定量限进行计算, 取 0.5 g 样量, 50 mL 的定容体积, 依据公式获得 20 $\mu\text{g/g}$; 而 (S/N=10) 时, 获得的定量限为 65 $\mu\text{g/g}$ 。

表 3 线性范围和定量限分析

化合物	线性范围 (mg/L)	方程式	相关系数	定量限 (g)
Trp	1-100	$Y=14401X+787$	0.9999	0.5 g

2. 方法准确度和精密度。方法准确度: 根据以上的样品前处理分析, 对公司所提供的特殊医学配方食品样品进行测定, 计算得出标准偏差在 20% 左右, 符合研究的重复性的要求^[8]。精密度: 通过以上实验研究可知, 在特殊医学配方食品中, Trp 的含量在 3024 $\mu\text{g/g}$, 在低、中、高 3 个浓度水平 Trp 标准溶液中, 将样品加入其中, 以此来对比准确度。由下图可知, 在 90.4%-94.1% 之间, RSD 的偏差在 2.0—3.7%, 可以看出其精密度、准确度良好。

表 4 精密度实验结果分析

加标量 ($\mu\text{g/g}$)	平均回收率 %	对标准偏差 (RSD)
1500	90.4	2.1
3000	93.3	3.8
4500	94.1	3.1

三、讨论

(一) 高效液相色谱法对色氨酸测定

Trp (色氨酸) 又称之为“ α -氨基- β -吲哚丙酸”, 在人类的身体中属于必不可少的氨基酸。分子的结构式为: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ 。经过对代谢调节 (机体蛋白质) 和有效的合成, 色氨酸则是转变生物活性物质 (褪黑激素、烟酸、5-羟色胺) 的重要前提; 直接影响着人体中的糖类与蛋白质以及脂肪等营养物质的代谢。一旦人体缺乏 Trp, 则会使其出现抑郁与疲惫以及暴食等症状, 或者是引发一些特殊病症, 例如: 心肌纤维化与皮肤疾病以及退化等等。近年来, 伴随着我国老龄化人口数的增加, 各种慢性疾病逐年增加, 为了更好地满足其患者的特殊需求, 提高其生存率, 研发出了一些特殊医学用途配方食品, 针对这类食品则是为特定的人, 经过加工处理与比例配备, 而研制出的配方食品。由于其特殊性, 对其制定了相关标准《特殊医学用途配方食品通则》。现阶段, 针对特殊医学用途配方食品相关检测文献资料比较少, 目前已经有的一些 Trp 测定方法主要包含分光光度法与离子交换色谱法、电化学法、液相色谱法以及 HPLC。其中操作简单的就属电化学法, 但是不适合批量检测; 操作最简单方

便的就属分光光度法, 但是准确度不明显; 而液相色谱法的成本偏高; HPLC 检测效果较为精确, 且还稳定, 可以实施大批量的检测。

(二) 研究结果分析

本研究主要通过对特殊医学用途配方食品样品采取碱解法进行检测, 碱解剂主要选择氢氧化锂溶液。研究结果指出, 最佳的碱解时间在 16h, 水解获取到的 Trp 量为 2970 $\mu\text{g/g}$ 与 2130 $\mu\text{g/g}$, 色氨酸样品的添加量在 3060 $\mu\text{g/g}$, 使用氢氧化锂进行水解后其各项效果明显较好; 而中和方式则取乙酸钠对其溶液缓冲, 并调节 pH。由于“特殊医学用途配方食品”中成分种类较多, 较复杂。所以, 此次研究采取的是 HPLC 中的二极管阵列检测器, 来对其进行检测, 经过对其波长、流动相等测定及优化, 最终取得了干扰小与分离度高等优势, 建立了 Trp 测定方式, 该方式在定量、线性范围等具有密切关联, 且精密度与灵敏度等较高, 适合对其 Trp 检测。

参考文献:

- [1] 秦慧彬, 田翔, 王海岗, 王君杰, 乔治军, 杨洪江. 超高效液相色谱法测定传统发酵酸粥的游离氨基酸含量 [J]. 食品科技, 2021, 46(04): 273-280.
- [2] Xu Xiaoqian, Qin Yu, Zhang Ziqin, Ge Yu. Determination of tryptophan content in pumpkin by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2021, 12(13): 5114-5119.
- [3] 孙宇, 周璇, 莫慧明, 朱桂芳, 梁惠婷, 刘涛. 高效液相色谱法测定特殊医学配方食品中的色氨酸 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(14): 5803-5807.
- [4] 莫日根, 杜艳, 吕娟, 王宁, 朱叶青. 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定马铃薯中 8 种必需氨基酸 [J]. 化学分析计量, 2021, 30(09): 54-58.
- [5] 别梅, 孙立臻, 王骏, 薛霞, 刘艳明. 液相色谱内标法测定婴幼儿配方食品中色氨酸含量 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(17): 272-276.
- [6] 单晓雪. 高效液相色谱测定粮食中 L-色氨酸的方法分析 [J]. 食品科技, 2020, 45(09): 281-286.
- [7] 谢纪珍, 崔师睿, 周冲, 尹宁宁, 姜晓飞. 高效液相色谱法测定复方氨基酸 (15) 腹膜透析液中色氨酸降解产物 [J]. 食品与药品, 2019, 21(04): 298-303.
- [8] Sun Li-Zhen, BI Mei, FENG Feng, Wang Jun, Zhu Jian-hua, LIU Yan-ming, Zhang Feng. Determination of tryptophan in infant food by enzymatic hydrolysis and liquid chromatography [J]. China dairy industry, 2019, 47(09): 47-51. (in Chinese)