

PITC柱前衍生-高效液相色谱法测大米肽中的16种氨基酸含量

黄莹, 黄晶, 杨晓, 陈曦, 胡武瑶

Determination of 16 Amino Acids in Rice Peptides by PITC Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography

HUANG Ying, HUANG Jing, YANG Xiao, CHEN Xi, and HU Wuyao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020133>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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

Simultaneous Determination of Free Amino Acids in Wax Apple by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Phenyl Isothiocyanate Precolumn Derivatization

食品工业科技. 2020, 41(21): 230-234 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019120129>

OPA-FMOC在线柱前衍生高效液相色谱法测定不同产地燕窝中氨基酸含量

Determination of amino acids in different cubilose by method of online pre-column OPA-FMOC derivatization HPLC

食品工业科技. 2018, 39(12): 250-254,260 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.12.044>

不同产地东北林蛙卵胶膜中蛋白质和水解氨基酸含量差异比较

Comparison of protein and hydrolytic amino acids in Rana dybowskii jelly coats from different localities

食品工业科技. 2017(20): 312-316 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.20.057>

柱前衍生-高效毛细管电泳法分析不同黄酒的多糖组成

Analysis of polysaccharides in different yellow rice wine by pre-column derivatization and high performance capillary electrophoresis

食品工业科技. 2018, 39(8): 221-225 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.08.040>

柱前衍生HPLC法测定叶游游离氨基酸成分及风味评价

Determination of Free Amino Acid Compositon in *Phrynium rheedei* by Pre-column Derivatization HPLC and Flavor Quality Evaluation

食品工业科技. 2021, 42(1): 292-296,303 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030183>

基于离子液体柱前荧光衍生高效液相色谱法测定动物性食品中7种 β -受体激动剂

Detection of 7 β -agonists in Animal-derived Food based on Ionic Liquid and Pre-column Fluorescence Derivatization-High Performance Liquid Chromatography

食品工业科技. 2021, 42(23): 296-302 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030237>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

黄莹, 黄晶, 杨晓, 等. PITC 柱前衍生-高效液相色谱法测大米肽中的 16 种氨基酸含量 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 279-285. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020133

HUANG Ying, HUANG Jing, YANG Xiao, et al. Determination of 16 Amino Acids in Rice Peptides by PITC Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 279-285. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020133

· 分析检测 ·

PITC 柱前衍生-高效液相色谱法测大米肽中的 16 种氨基酸含量

黄莹, 黄晶, 杨晓*, 陈曦, 胡武瑶

(中国健康促进基金会抗衰老营养与健康研发中心, 湖北武汉 430000)

摘要: 为了建立一种以高效液相色谱检测大米肽中氨基酸含量的方法, 以异硫氰酸苯酯 (Phenyl isothiocyanate, PITC) 为柱前衍生剂, 实现大米肽中 16 种氨基酸 (天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu)、丝氨酸 (Ser)、甘氨酸 (Gly)、组氨酸 (His)、精氨酸 (Arg)、苏氨酸 (Thr)、丙氨酸 (Ala)、脯氨酸 (Pro)、酪氨酸 (Tyr)、缬氨酸 (Val)、蛋氨酸 (Met)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、苯丙氨酸 (Phe)、赖氨酸 (Lys)) 能同时、快速、有效地分析检测。采用 Athena AAA 色谱柱为分析柱, 以甲醇:乙腈:水=20:60:20 和 50 mmol/L 乙酸钠 (pH6.5) 为流动相, 进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 紫外检测器波长为 254 nm。结果表明, 16 种氨基酸在 0.125~2.5 μmol/mL 范围内具有良好的线性关系, 14 种氨基酸线性关系的决定系数 $R^2 \geq 0.9999$, 另外 2 种氨基酸的决定系数 R^2 分别为 0.9998 和 0.9994, 检出限为 0.003%~0.018%, 定量限为 0.010%~0.059%, 加标回收率在 82.21%~103.59%, RSD 均小于 5%。该方法使得大米肽中 16 种氨基酸很好地分离, 其中含量最高的氨基酸是谷氨酸 (Glu), 含量范围为 13.11%±0.39%~21.38%±0.48%, 含量最低的氨基酸是组氨酸 (His) 或蛋氨酸 (Met), 含量范围为 1.59%±0.05%~2.27%±0.03% 或 1.26%±0.05%~2.32%±0.06%, 其准确度和精密度佳, 灵敏度和回收率高, 适用于大米肽的氨基酸含量分析。

关键词: 大米肽, 氨基酸, 异硫氰酸苯酯, 柱前衍生, 高效液相色谱

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)24-0279-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020133



本文网刊:

Determination of 16 Amino Acids in Rice Peptides by PITC Pre-column Derivatization High Performance Liquid Chromatography

HUANG Ying, HUANG Jing, YANG Xiao*, CHEN Xi, HU Wuyao

(Anti-aging Nutrition & Health Research and Development Center of China Health Promotion Foundation, Wuhan 430000, China)

Abstract: To establish a methodology for detecting the amino acid content in rice peptides, the research employed the pre-column derivative phenyl isothiocyanate (PITC) for realizing simultaneous, rapid, and effective analysis of 16 amino acids, including aspartate (Asp), glutamic acid (Glu), serine (Ser), glycine (Gly), histidine (His), arginine (Arg), threonine (Thr), alanine (Ala), proline (Pro), tyrosine (Tyr), valine (Val), methionine (Met), isoleucine (Ile), leucine (Leu), phenylalanine (Phe), and lysine (Lys). The analysis was carried out using an Athena AAA chromatographic column as the analysis column, with a flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 35 °C, and UV detector wavelength of 254 nm. A gradient elution was performed with a mobile phase consisting of methanol:acetonitrile:water=20:60:20 and 50 mmol/L sodium acetate (pH6.5). The results revealed a strong linear relationship among the 16 amino acids within the range of 0.125 to

收稿日期: 2023-02-14

作者简介: 黄莹 (1992-), 女, 硕士, 研究方向: 食品工程, E-mail: 1970838354@qq.com。

* 通信作者: 杨晓 (1986-), 女, 硕士, 研究方向: 食品生物科技, E-mail: mona.yang@twinkl.com。

2.5 $\mu\text{mol/mL}$, with a coefficient of determination $R^2 \geq 0.9999$ for 14 amino acids. The remaining 2 amino acids exhibited coefficient of determination R^2 were 0.9998 and 0.9994, respectively. The detection limit ranged from 0.003% to 0.018%, while the quantitative limit ranged from 0.010% to 0.059%. The spiked recovery rate ranged from 82.21% to 103.59%, and the relative standard deviation (RSD) was less than 5% for all measurements. This method effectively separates the 16 amino acids in rice peptides, with glutamic acid (Glu) having the highest content ranging from 13.11% \pm 0.39% to 21.38% \pm 0.48%. The amino acids with the lowest content are histidine (His) or methionine (Met), ranging from 1.59% \pm 0.05% to 2.27% \pm 0.03% or 1.26% \pm 0.05% to 2.32% \pm 0.06%, respectively. The experimental method employed in this study demonstrates high accuracy, precision, sensitivity and recovery rate, thereby, indicating its suitability for analyzing the amino acid content in rice peptides.

Key words: rice peptides; amino acids; phenyl isothiocyanate; pre-column derivatization; high-performance liquid chromatography

大米肽是以大米蛋白为原料, 经过酶解得到一类含有肽混合物及少量的游离氨基酸、糖类、水分和无机盐等的物质。大米肽具有抑制酪氨酸酶活性^[1]、调节免疫力^[2]、抗氧化^[3]和降血压^[4]等功能。大米肽的氨基酸构成模式与人体需求模式基本一致^[5], 可以为人体提供所需的各种必需氨基酸。氨基酸分析是研究各种肽类物质构造、特性和营养价值的重要手段^[6]。并且, 大米肽的活性与其氨基酸的组成和含量紧密相关^[7]。因此, 分析大米肽中氨基酸的含量, 对大米肽的品质评价和开发利用等均具有重要意义。

目前, 测定氨基酸的检测方法有直接测定法和间接测定法, 直接测定法有液相色谱-串联质谱法和离子色谱-积分脉冲安培法^[8]; 间接测定法有柱前衍生法和柱后衍生法。其中, 使用最为广泛的的就是柱后衍生法^[9], 是采用氨基酸分析仪测定氨基酸的经典方法, 该方法前处理主要是采用酸水解法, 但该方法时间较长(为 22 h 左右), 同时仪器设备较为昂贵, 仪器的应用主要集中在测定氨基酸的领域^[10]; 柱前衍生(高效液相色谱法)则无需专一设备, 灵敏度高、分析时间短、仪器的适用性更广^[11], 被认为是经典氨基酸分析技术的一种替代技术^[12]。柱前衍生常用试剂有邻苯二甲醛(O-phthalaldehyde, OPA)^[13]、6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate, AQC)^[14]、2,4-二硝基氯苯(2,4-Dinitrochlorobenzene, DNCB)^[15]和异硫氰酸苯酯(PITC)等^[16]。这些衍生试剂中 PITC 与氨基酸反应迅速、产物单一稳定、衍生后易除去多余试剂且不会影响检测灵敏度^[17], 已被广泛应用于胶原蛋白肽^[18]、黄酒^[19]、烟草^[20]、水果^[21]、药物^[22]等领域中。目前鲜有关于大米肽中氨基酸含量采用柱前衍生-高效液相色谱法检测的报道, 为了证明该方法同样适用于大米肽中氨基酸的检测, 并能够同时、快速、高效、稳定的完成 16 种氨基酸的检测, 因此本文拟建立一种柱前衍生化高效液相色谱法, 以 PITC 为柱前衍生剂, 以期为大米肽的品质评价和开发利用提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

16 种氨基酸(天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝

氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys))标准混合液、苯酚(分析纯)、异硫氰酸苯酯、三乙胺、三水乙酸钠、乙腈、甲醇、正己烷 其余均为色谱纯, 上海安谱科学仪器有限公司; 盐酸、冰醋酸分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 大米肽样品市售。

MTN-2800D-12 氮吹仪 天津奥特塞恩斯仪器有限公司; Agilent1260 高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC) (ultraviolet detector, VWD) 美国 Agilent 公司; 202-2AB 电热恒温干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司; MS3digital 涡旋振荡器 德国 IKA 公司; PE20 型 pH 计 梅特勒-托利多仪器; AB204-A 分析天平 上海梅特勒-托利多仪器公司; ZORBAXSB-Aq(4.6 \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱、AthenaAAA(4.6 \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱 上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 混合标准溶液配制 分别精密量取 16 种氨基酸混合标准溶液 2.5 $\mu\text{mol/mL}$, 用 0.1 mol/L 的盐酸溶液稀释成 1.25、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{mol/mL}$ 4 个浓度, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存。

1.2.2 样品溶液制备 大米肽样品: 称取大米肽样品 80.00 mg 放入水解管中, 加入含 0.1% 苯酚 6 mol/L 盐酸 10 mL, 将水解管中充入氮气 2~3 min 后拧紧螺丝盖。将已封口的水解管放在 165 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中水解 1 h, 取出冷却至室温。打开水解管, 将水解液转移至 100 mL 容量瓶内, 用少量水多次冲洗水解管, 水解液移入同一 100 mL 容量瓶内, 定容, 过滤, 除去初滤液后收集剩余滤液。准确吸取 1 mL 滤液移入试管中, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹条件下吹干, 用 1 mL 超纯水完全溶解后转移至 1.5 mL 离心管中, 待衍生备用。

空白样品: 除了不加入大米肽样品之外, 空白样品的制备和大米肽样品的制备相同。

1.2.3 柱前衍生化 室温条件下, 取氨基酸标准混合

液或样液 200 μL 置于 1.5 mL 离心管中,加入 0.2 mol/L 异硫氰酸苯酯乙腈溶液 100 μL 、1 mol/L 三乙胺乙腈溶液 100 μL ,混匀,室温下放置 1 h 后加入 400 μL 正己烷,漩涡混合器振荡 5~10 s,静置 10 min。吸取下层溶液 200 μL 和 800 μL 超纯水混合,过 0.45 μm 有机滤膜,得样品溶液,待进样。

1.2.4 色谱条件和计算方法 色谱柱: Athena AAA 4.6 \times 250 mm, 5 μm ; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 5 μL ; 流动相 A: 甲醇:乙腈:水=20:60:20; 流动相 B: 50 mmol/L 乙酸钠溶液; 洗脱程序为: 0~38 min: 5% 流动相 A 和 95% 流动相 B、39 min: 49% 流动相 A 和 51% 流动相 B、40~50 min: 100% 流动相 A、51~60 min: 5% 流动相 A 和 95% 流动相 B。

计算公式如下:

$$A_s = \frac{X_s \times M_s \times 0.001}{\frac{m}{V} \times N} \times 100$$

A_s 表示氨基酸 s 的含量,%; X_s 表示氨基酸 s 的峰面积带入相应曲线后计算出的氨基酸 s 的浓度, $\mu\text{mol/mL}$; M_s 表示氨基酸 s 的分子量, g/mol; 0.001 表示单位换算系数; m 表示样品的质量, g; V 表示定容体积, L; N 表示浓缩倍数。

1.2.5 方法学考察 从线性关系、专属性实验、精密度实验、重复实验性、稳定性实验和加标回收实验对该方法进行方法学考察。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2016 进行数据统计,并利用 SPSS 21.0 软件进行显著性分析($P < 0.05$),每组实验进行 3 次平行,实验结果以平均值表示。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

ZORBAXSB-Aq 色谱柱最适用于增加难以分离的酸性,碱性和极性化合物的保留值,其保留作用比许多传统的 C18 HPLC 柱要强,该柱子具有亲水性

的表面,及时采用 100% 的水溶液流动相,也可以有效的防止固定相的塌陷,因此该柱子作为一种实验室常用的 HPLC 分离柱。Athena AAA 色谱柱是一种应用于生物发酵液、饲料、氨基酸注射液、食品、饮料中的氨基酸检测的专用柱,具有分离性能优,重现性好,适应性强,稳定性好的特点。

本实验先采用 ZORBAXSB-Aq 色谱柱进行氨基酸混合标准品中氨基酸的分离,发现分离效果较差,为了将各个氨基酸完全分离出来,而后采用了 Athena AAA 色谱柱进行分离,实验对比结果由图 1 可以看出,采用 Athena AAA 色谱柱的分离效果优于 ZORBAXSB-Aq 色谱柱的分离效果: a.分离度高。Athena AAA 色谱柱能将 16 种氨基酸完全分离出来,ZORBAXSB-Aq 色谱柱并没有将第 13 号和第 14 号氨基酸分离出来; b.分离时间快。Athena AAA 色谱柱分离 16 种氨基酸在 39 min 分钟全部完成,ZORBAXSB-Aq 色谱柱则需要 41 min; c.精密度高。两款柱子在分离同一浓度的氨基酸混合标准品时,Athena AAA 色谱柱分离得到各个氨基酸的峰高均高于 ZORBAXSB-Aq 色谱柱分离得到的各氨基酸的峰高。因此后续实验采用 Athena AAA 色谱柱对大米肽中氨基酸进行分离。

2.2 线性关系考察

以混合标准液的浓度为横坐标,其衍生物峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,根据信噪比($S/N=3$)和($S/N=10$)分别确定出检出限(LODs)以及定量限(LOQs)。结果见表 1,16 种氨基酸在 0.125~2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 的范围内的线性关系良好,其中 14 种氨基酸的决定系数 R^2 均 ≥ 0.9999 ,另外 2 种氨基酸的决定系数 R^2 分别为 0.9998 和 0.9994,检出限为 0.003%~0.018%,定量限为 0.010%~0.059%,表明仪器灵敏度高,较低质量浓度的氨基酸即可被进行检测。傅博强等^[23]采用 6-氨基喹啉基-羟基琥珀酰亚胺基甲酸酯柱前衍生-超高效液相色谱测定转基因大

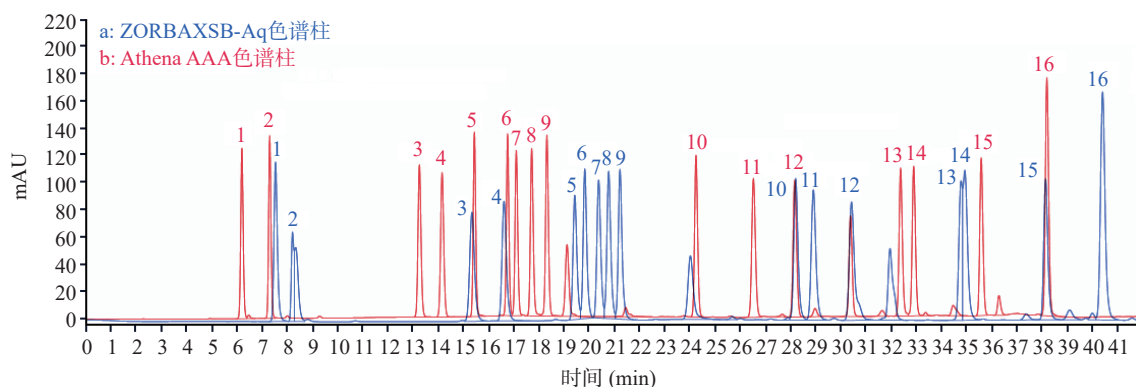


图 1 ZORBAXSB-Aq 色谱柱(a)和 Athena AAA 色谱柱(b)分离的色谱图

Fig.1 Chromatogram of separation between ZORBAXSB-Aq column (a) and Athena AAA column (b)

注: 1: 天冬氨酸(Asp)、2: 谷氨酸(Glu)、3: 丝氨酸(Ser)、4: 甘氨酸(Gly)、5: 组氨酸(His)、6: 精氨酸(Arg)、7: 苏氨酸(Thr)、8: 丙氨酸(Ala)、9: 脯氨酸(Pro)、10: 酪氨酸(Tyr)、11: 缬氨酸(Val)、12: 蛋氨酸(Met)、13: 异亮氨酸(Ile)、14: 亮氨酸(Leu)、15: 苯丙氨酸(Phe)、16: 赖氨酸(Lys),图 2 同。

表1 16种氨基酸的线性方程
Table 1 Linear equations of 16 amino acids

氨基酸	标准曲线	决定系数	线性范围($\mu\text{mol/mL}$)	检出限(%)	定量限(%)
天冬氨酸(Asp)	$y=363.31x-3.9693$	0.9999	0.125~2.5	0.009	0.030
谷氨酸(Glu)	$y=300.03x+9.57$	0.9994	0.125~2.5	0.008	0.027
丝氨酸(Ser)	$y=400.14x-11.667$	1	0.125~2.5	0.009	0.030
甘氨酸(Gly)	$y=406.9x-2.7895$	1	0.125~2.5	0.005	0.017
组氨酸(His)	$y=407.55x-10.851$	1	0.125~2.5	0.014	0.045
精氨酸(Arg)	$y=396.92x-2.5329$	0.9999	0.125~2.5	0.012	0.042
苏氨酸(Thr)	$y=392.89x-8.4138$	0.9998	0.125~2.5	0.011	0.036
丙氨酸(Ala)	$y=410.23x+2.0038$	1	0.125~2.5	0.007	0.023
脯氨酸(Pro)	$y=439.45x-0.5025$	1	0.125~2.5	0.007	0.022
酪氨酸(Tyr)	$y=460.36x-5.4433$	0.9999	0.125~2.5	0.018	0.059
缬氨酸(Val)	$y=461.64x-4.7566$	1	0.125~2.5	0.009	0.030
蛋氨酸(Met)	$y=417.56x+1.9091$	0.9999	0.125~2.5	0.010	0.034
异亮氨酸(Ile)	$y=418.82x+1.1035$	0.9999	0.125~2.5	0.010	0.034
亮氨酸(Leu)	$y=451.92x-7.7518$	0.9999	0.125~2.5	0.011	0.036
苯丙氨酸(Phe)	$y=466.6x-4.0587$	0.9999	0.125~2.5	0.003	0.011
赖氨酸(Lys)	$y=769.84x-1.966$	1	0.125~2.5	0.003	0.010

米中氨基酸的含量,发现17种氨基酸标准工作曲线的线性回归决定系数均大于0.999,这与本实验发现大米肽中各氨基酸的线性关系良好相一致,说明采用柱前衍生-高效液相色谱法适合测定大米肽中的氨基酸含量。

2.3 专属性实验

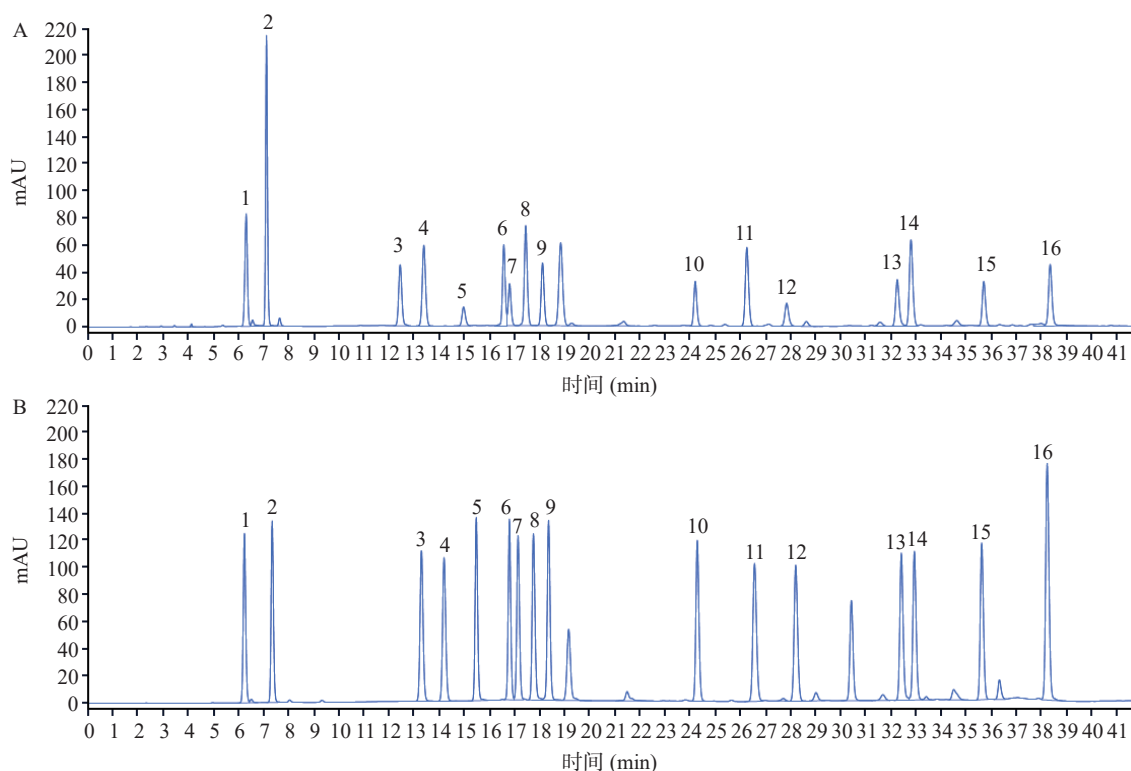
取大米肽样品、16种氨基酸混合标准品和空白样品进样测定。结果空白样品中未出现干扰主峰测定的色谱峰,供试样品与对照样品溶液色谱中,氨基酸峰保留时间一致,各氨基酸间分离度大于1.5。其色谱峰见图2。

2.4 精密度试验

精密吸取2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 氨基酸混合标准溶液,衍生后连续进样6次,测定各种氨基酸的峰面积并计算其RSD,结果如表2所示,16种氨基酸的RSD均<5%,表明该仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取6份同一大米肽样品80.00 mg分别放入6个水解管中,按1.2.2和1.2.3进行样品水解和衍生,制备6份衍生样品进样,测定各种氨基酸的峰面积并计算其RSD,结果如表2所示,16种氨基酸的RSD均<5%,说明该方法重复性良好。



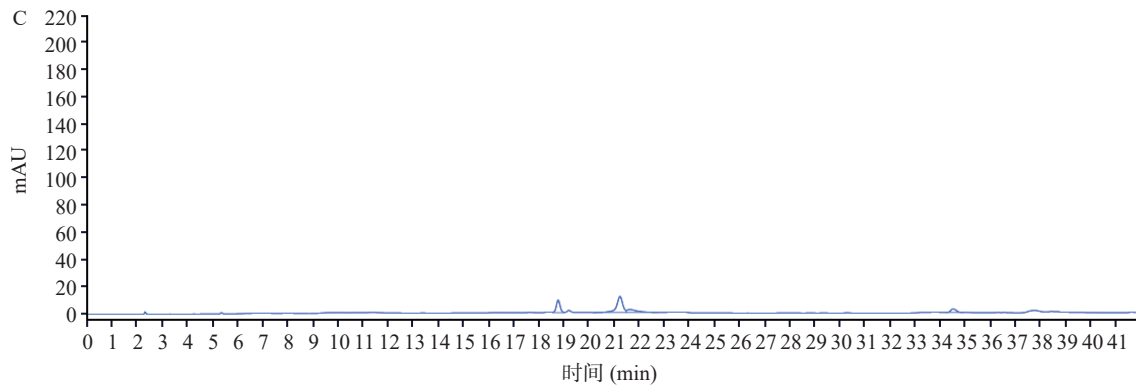


图 2 供试样品(A)、混合标准品(B)、空白样品(C)色谱图

Fig.2 Chromatogram of test sample (A), mixed standard (B) and blank sample (C)

表 2 16 种氨基酸的加标回收率

Table 2 Recovery rates of 16 amino acids

氨基酸	精密度实验(n=6) RSD(%)	重复性实验(n=6) RSD(%)	稳定性实验 RSD(%)	加标回收实验					
				平均加标回收率(%)			RSD(%)		
				2.5	1.25	0.5	2.5	1.25	0.5
天冬氨酸(Asp)	1.87	3.34	1.87	98.12	99.79	100.46	2.69	1.32	3.05
谷氨酸(Glu)	0.50	2.21	0.50	97.43	97.89	96.4	1.32	3.05	2.78
丝氨酸(Ser)	0.67	1.64	0.67	94.46	93.63	100.31	2.98	2.98	2.69
甘氨酸(Gly)	0.77	2.13	0.77	95.45	82.21	91.00	3.01	2.78	2.44
组氨酸(His)	0.32	0.24	0.32	93.34	97.93	97.52	1.99	2.56	3.68
精氨酸(Arg)	0.12	1.75	0.92	93.18	94.62	102.03	2.65	1.69	1.88
苏氨酸(Thr)	0.21	1.33	0.81	93.34	92.51	99.14	1.74	2.65	2.57
丙氨酸(Ala)	0.27	2.02	1.27	94.04	87.6	100.58	2.32	1.22	3.21
脯氨酸(Pro)	0.21	2.69	1.21	93.14	90.96	99.43	1.56	1.71	3.09
酪氨酸(Tyr)	0.33	2.66	0.33	90.96	95	100.1	3.84	2.85	2.45
缬氨酸(Val)	0.21	2.24	0.89	91.45	99.07	99.15	1.65	2.96	2.55
蛋氨酸(Met)	0.42	2.27	2.42	98.72	96.29	100.00	3.33	3.05	2.75
异亮氨酸(Ile)	0.52	2.34	0.52	89.4	91.1	87.88	1.84	1.88	2.83
亮氨酸(Leu)	0.26	1.98	0.86	91.89	94.44	103.59	2.87	1.53	3.81
苯丙氨酸(Phe)	1.28	2.26	1.28	96.05	100.42	98.94	3.68	1.41	3.49
赖氨酸(Lys)	1.73	2.35	1.73	92.71	94.08	94.76	1.98	3.09	2.19

2.6 稳定性试验

取同一大米肽样品 80.00 mg, 按 1.2.2 和 1.2.3 进行样品水解和衍生, 制备 1 份衍生样品, 在衍生后 0、2、4、8、12、24 h 后进样, 测定各种氨基酸的峰面积并计算其 RSD, 结果如表 2 所示, 16 种氨基酸的 RSD 均 < 5%, 表明衍生样品在衍生后 24 h 内稳定性良好。

2.7 加标回收试验

称取同一大米肽样品 80.00 mg(已知氨基酸含量)6 份, 分别进行水解, 其中 2 份样品用于样品浓度测定, 3 份用于加标回收实验浓度测定。加入 2.5、1.25、0.5 $\mu\text{mol/mL}$ 的氨基酸标准混合液, 每个浓度分别进行 3 次衍生平行。计算平均加标回收率和 RSD, 结果如表 2 所示, 结果表明各组分的平均加标回收率为 82.21%~103.59%, RSD 均 < 5%, 说明该方法精密度良好, 准确度高。

2.8 样品测定

精密称取 5 份不同厂家的大米肽样品, 编号为

样品 1~样品 5, 采用上述优化方法进行进样测定, 16 种氨基酸的含量见表 3。从表 3 的结果可以看出, 5 份大米肽均含有较高含量的 Glu 和 Asp, 其次是 Arg 和 Leu, 这与周侃等^[24]的研究结果相似, 均为这几种氨基酸含量较高。Glu 是生物体内氮代谢的基本氨基酸之一^[25], 可促进氨基丁酸的合成, 从而降低血氮, 促进脑细胞呼吸^[26]。Asp 具有防止和恢复疲劳的作用^[27]。Arg 是维持婴幼儿生长发育必不可少的氨基酸^[28]。Leu 具有抗氧化的作用^[29], 这也进一步说明大米肽具有抗疲劳、抗氧化等生物活性离不开这些氨基酸的作用。同时王申等^[30]采用柱后衍生高效液相色谱法测定大米中氨基酸的组成, 发现大米肽中氨基酸含量最高的也是 Glu, 其含量为 16.1%; 其次含量高的也是 Asp, 为 8.44%, 与本实验采用柱前衍生-高效液相色谱法测定五种大米肽中最高氨基酸的含量相一致, 说明柱前衍生-高效液相色谱法适合测定大米肽中的氨基酸含量。

精密称取某个厂家的大米肽样品 2 份, 编号为

表 3 不同厂家大米肽的氨基酸组成和含量

Table 3 Amino acid composition and content of rice peptides from different manufacturers

序号	物质名称	含量(%)				
		样1	样2	样3	样4	样5
1	天冬氨酸(Asp)	9.04±0.28 ^b	9.65±0.61 ^b	8.70±0.21 ^c	12.96±0.35 ^a	7.04±0.19 ^d
2	谷氨酸(Glu)	17.61±0.37 ^b	15.93±0.35 ^c	14.84±0.57 ^d	21.38±0.48 ^a	13.11±0.39 ^e
3	丝氨酸(Ser)	4.38±0.07 ^{ab}	3.47±0.08 ^c	4.15±0.14 ^b	4.82±0.17 ^a	3.66±0.08 ^e
4	甘氨酸(Gly)	4.14±0.09 ^a	3.82±0.04 ^b	4.32±0.11 ^a	4.25±0.14 ^a	3.93±0.05 ^b
5	组氨酸(His)	2.02±0.01 ^a	1.59±0.05 ^{bc}	1.96±0.08 ^{ab}	2.27±0.03 ^a	1.73±0.01 ^b
6	精氨酸(Arg)	7.40±0.14 ^{ab}	6.19±0.19 ^d	7.79±0.14 ^a	6.69±0.18 ^c	7.18±0.25 ^b
7	苏氨酸(Thr)	3.27±0.04 ^b	2.99±0.01 ^{bc}	3.09±0.09 ^b	3.72±0.07 ^a	2.86±0.04 ^c
8	丙氨酸(Ala)	5.14±0.11 ^a	3.94±0.03 ^d	4.69±0.17 ^b	4.22±0.14 ^c	4.31±0.07 ^c
9	脯氨酸(Pro)	3.94±0.11 ^c	4.22±0.15 ^b	3.89±0.27 ^c	4.78±0.12 ^a	3.60±0.05 ^d
10	酪氨酸(Tyr)	4.37±0.14 ^a	3.51±0.05 ^c	4.22±0.31 ^a	3.05±0.18 ^d	3.83±0.17 ^b
11	缬氨酸(Val)	5.53±0.13 ^a	4.50±0.16 ^b	4.48±0.04 ^b	4.71±0.02 ^b	4.14±0.14 ^c
12	蛋氨酸(Met)	2.32±0.06 ^a	1.75±0.08 ^b	1.60±0.08 ^b	1.26±0.05 ^c	1.45±0.02 ^{bc}
13	异亮氨酸(Ile)	4.02±0.10 ^{ab}	3.39±0.06 ^c	3.29±0.02 ^c	4.81±0.04 ^a	2.97±0.11 ^d
14	亮氨酸(Leu)	7.31±0.15 ^a	5.47±0.12 ^c	6.03±0.05 ^b	7.67±0.15 ^a	5.39±0.11 ^c
15	苯丙氨酸(Phe)	4.25±0.09 ^a	3.72±0.10 ^b	4.04±0.08 ^a	4.03±0.05 ^a	3.73±0.08 ^b
16	赖氨酸(Lys)	3.40±0.08 ^b	3.35±0.11 ^b	3.67±0.09 ^b	7.08±0.12 ^a	3.48±0.10 ^b
	总计	88.14±1.97	77.49±2.19	80.77±2.45	97.71±2.29	72.42±1.86

注: 同行字母不同表示差异显著(P<0.05)。

样品 6, 分别采用传统的国标方法氨基酸分析仪和 PITC 柱前衍生-高效液相色谱法测定氨基酸含量, 其检测结果如表 4 所示。结果发现, 16 种氨基酸中, 同一种氨基酸分别采用两种方法测定的含量之间无显著性差异, 氨基酸分析仪测定的氨基酸总量为 80.58%±1.32%, PITC 柱前衍生-高效液相色谱法测定的氨基酸总量为 81.62%±1.15%, 也无显著性差异, 说明柱前衍生-高效液相色谱法适用于测定大米

表 4 不同方法测定大米肽的氨基酸组成和含量

Table 4 Determination of amino acid composition and content of rice peptides by different methods

序号	物质名称	样6 含量(%)		显著性
		氨基酸分析法	PITC柱前衍生- 高效液相色谱法	
1	天冬氨酸(Asp)	8.07±0.16	9.11±0.38	P>0.05
2	谷氨酸(Glu)	3.23±0.07	2.88±0.06	P>0.05
3	丝氨酸(Ser)	3.93±0.07	4.05±0.13	P>0.05
4	甘氨酸(Gly)	17.10±0.35	17.90±0.61	P>0.05
5	组氨酸(His)	3.94±0.10	4.03±0.12	P>0.05
6	精氨酸(Arg)	4.26±0.10	3.98±0.07	P>0.05
7	苏氨酸(Thr)	5.09±0.12	4.69±0.08	P>0.05
8	丙氨酸(Ala)	2.26±0.05	1.84±0.03	P>0.05
9	脯氨酸(Pro)	3.15±0.07	3.17±0.06	P>0.05
10	酪氨酸(Tyr)	5.26±0.13	5.68±0.12	P>0.05
11	缬氨酸(Val)	3.73±0.26	3.71±0.04	P>0.05
12	蛋氨酸(Met)	3.79±0.12	3.91±0.06	P>0.05
13	异亮氨酸(Ile)	2.25±0.03	1.80±0.05	P>0.05
14	亮氨酸(Leu)	3.36±0.12	3.52±0.08	P>0.05
15	苯丙氨酸(Phe)	6.97±0.15	6.75±0.16	P>0.05
16	赖氨酸(Lys)	4.22±0.14	4.59±0.77	P>0.05
	总计	80.58±1.32	81.62±1.15	

肽中氨基酸的含量, 且准确度较高。

3 结论

本实验构建了 PITC 柱前衍生高效液相色谱法测定大米肽中的 16 种氨基酸含量的方法, 该方法能有效分离 16 种氨基酸, 各氨基酸组分的线性范围较宽, 均在 0.125~2.5 μmol/mL 范围内, 呈良好的线性关系, 14 种氨基酸线性关系的决定系数 R² ≥ 0.9999, 另外 2 种氨基酸的决定系数 R² 分别为 0.9998 和 0.9994, 检出限为 0.003%~0.018%, 定量限为 0.010%~0.059%, 加标回收率在 82.21%~103.59%, RSD 均小于 5%。说明方法精密度好, 准确度高, 适用于大米肽的氨基酸含量分析, 为后续大米肽的氨基酸含量测定提供理论基础和技术支持。

参考文献

[1] 尹曼, 魏颖, 马勇, 等. 胶原肽和大米肽对黑色素生成的影响[J]. 食品科技, 2017, 42(10): 244-247. [YIN M, WEI Y, MA Y, et al. The effects of collagen peptides and rice peptides on melanin production[J]. Food Technology, 2017, 42 (10): 244-247.]

[2] 程云辉, 毛田米, 黄璐, 等. 大米肽中压离子交换色谱分离及其免疫活性评价[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 151-155. [CHENG Y H, MAO T M, HUANG L, et al. Separation and immunological activity evaluation of rice peptides by Medium Pressure Ion Exchange Chromatography[J]. Food and Machinery, 2018, 34(3): 151-155.]

[3] 秦芸, 石沛霖, 刘维维, 等. 富硒大米肽体内抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 305-309. [QIN Y, SHI P L, LIU W W, et al. Antioxidant activity of selenium-rich rice peptides in vivo[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(17): 305-309.]

[4] YANG X, WANG L, ZHANG F, et al. Effects of multi-mode S-type ultrasound pretreatment on the preparation of ACE inhibitory peptide from rice protein[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 1-10.

[5] 史云丽, 刘芳, 潘曼, 等. 大米生物活性肽研究进展[J]. 食品

- 与机械, 2009, 25(2): 167-171. [SHI Y L, LIU F, PAN M, et al. Research progress on rice bioactive peptides[J]. Food and Machinery, 2009, 25(2): 167-171.]
- [6] KUN L L, RUN F D, FU S C. Stability of the antioxidant peptide SeMet-Pro-Ser identified from selenized brown rice protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2020, 319: 1-7.
- [7] 王申, 林利美, 周佳, 等. 大米肽的绝对分子质量与氨基酸组成集体外活性[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 19-23. [WANG S, LIN L M, ZHOU J, et al. Absolute molecular mass and amino acid composition of rice peptides[J]. Food Science, 2013, 34(13): 19-23.]
- [8] 李志坚, 李高阳, 张群, 等. PITC 柱前衍生-液相色谱法测定西瓜中 L-瓜氨酸含量[J]. 食品工业科技, 2013, 34(20): 53-55. [LI Z J, LI G Y, ZHANG Q, et al. Determination of L-citrulline in watermelon by PITC pre-column derivatization and liquid chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(20): 53-55.]
- [9] 邵瑞琪, 陈双玲. 氨基酸分析仪在医学中的应用[J]. 分析仪器, 2019, 223(2): 133-137. [SHAO R Q, CHEN S L. Application of amino acid analyzer in medicine[J]. Analytical Instrument, 2019, 223(2): 133-137.]
- [10] 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. [National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. GB 5009.124-2016 National food safety standard-termination of amino acids in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2017.]
- [11] SHEN F, NIU X Y, YANG D T, et al. Determination of amino acids in chinese rice wine by fourier transform near-infrared spectroscopy[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2010, 58(17): 9809-9816.
- [12] ADHIKARI B, DHUNGAN S K, ALI M W, et al. Antioxidant activities, polyphenol, flavonoid, and amino acid contents in peanut shell[J]. Journal Saudi Society Agriculture Science, 2019, 18(4): 437-442.
- [13] ZENG X Y, WANG M F, ZHU B K, et al. Simultaneous analysis of AY and amino acids in corn oligopeptides by HPLC-fluorescencedetector with OPA/FMOC-Cl pre-column derivatization[J]. International Journal of Food Agriculture and Environment, 2013, 11(1): 86-90.
- [14] MANDRIOLI R, MERCOLINI L, RAGGI M A. Recent trends in the analysis of amino acids in fruits and derived food stuffs[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(25): 7941-7956.
- [15] 彭真汾, 王威, 叶清华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法定量分析橄榄果实氨基酸组分[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 231-238. [PENG Z F, WANG W, YE Q H, et al. Determination of amino acids in olive fruit by HPLC tandem mass spectrometry[J]. Food Science, 2018, 39(24): 231-238.]
- [16] 张雪艳, 郭雷, 周长明, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定注射用骨肽中 15 种氨基酸含量[J]. 中国药业, 2022, 31(1): 74-78. [ZHANG X Y, GUO L, ZHOU C M, et al. Determination of 15 amino acids in bone peptides for injection by high performance liquid chromatography with pre-column derivatizations[J]. Chinese Pharmaceutical Industry, 2022, 31(1): 74-78.]
- [17] 郭晓晗, 程显隆, 柳温曦, 等. 柱前衍生化-HPLC 法同时测定不同商品规格鹿茸片中 15 种氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(10): 1780-1789. [GUO X H, CHEN X L, LIU W X, et al. Simultaneous determination of 15 amino acids in different commercial antler tablets by precolumn derivatization and HPLC[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020, 40(10): 1780-1789.]
- [18] 田洪斌, 赵可意, 孙佳玲. 氨基酸分析法测定复方骨肽注射液多肽含量[J]. 中国药事, 2011, 25(8): 816-820. [TIAN H B, ZHAO K Y, SUN J L. Determination of polypeptide content in Compound Guopeptide Injection by amino acid analysis[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2011, 25(8): 816-820.]
- [19] 芮鸿飞, 张晓瑜, 刘兴泉, 等. PITC 柱前衍生-反相高效液相色谱法测定黄酒种游离氨基酸和生物胺[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 159-163. [RUI H F, ZHANG X Y, LIU X Q, et al. Determination of free amino acids and bioamines in rice wine by PITC precolumn derivation-reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Food Science, 2016, 37(8): 159-163.]
- [20] 许永, 黄丽佳, 刘欣, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定新鲜烟叶中游离氨基酸[J]. 化学试剂, 2021, 43(6): 801-805. [XU Y, HUANG L J, LIU X, et al. Determination of free amino acids in tobacco leaves by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization[J]. Chemical Reagents, 2021, 43(6): 801-805.]
- [21] 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, 20: 230-234. [ZHANG G H, WU G B, CHEN S H, et al. Simultaneous determination of 15 kinds of free amino acids in Lotus spray by RP-HPLC with precolumn derivation of phenyl isothiocyanate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 20: 230-234.]
- [22] 周敏. 应用不同柱前衍生法于 HPLC 测定西洋参种的氨基酸[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(2): 524-530. [ZHOU M. Determination of amino acids of American ginseng by HPLC with different pre-column derivatizations[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(2): 524-530.]
- [23] 傅博强, 唐治玉, 王晶, 等. 转基因大米中氨基酸含量超高效液相色谱定量[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(1): 110-115. [FU B Q, TANG Z Y, WANG J, et al. Ultrahigh performance liquid chromatography quantification of amino acid content in genetically modified rice[J]. Chinese Journal of Cereals and Oils, 2014, 29(1): 110-115.]
- [24] 周侃, 熊华, 陈升军, 等. 高蛋白含量米蛋白肽制备及产品营养成分分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 28-33. [ZHOU K, XIONG H, CHEN S J, et al. Preparation and nutritional analysis of high protein rice protein peptide[J]. Journal of Food and Biotechnology, 2009, 28(1): 28-33.]
- [25] QIAN X, MENG W W, JU W H, et al. The role of heating time on the characteristics, functional properties and antioxidant activity of enzyme-hydrolyzed rice proteins-glucose Maillard reaction products[J]. Food Bioscience, 2020, 43: 1-8.
- [26] THIDARAT P, MASATOSHI K, PRISANA S, et al. Characterization and bioactivities of young rice protein hydrolysates[J]. Journal of Cereal Science, 2020, 95: 1-9.
- [27] XIN A Z, ZHONG Y Z, PEI B Y, et al. Rice peptide nanoparticle as a bifunctional food-grade Pickering stabilizer prepared by ultrasonication: Structural characteristics, antioxidant activity, and emulsifying properties[J]. Food Chemistry, 2021, 343: 1-10.
- [28] SAPNA R, KM P, KUMAR P G. Exploration of rice protein hydrolysates and peptides with special reference to antioxidant potential: Computational derived approaches for bio-activity determination[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 80: 61-70.
- [29] ZHANG Z L, WANG Y, JIANG H, et al. Effect of dual-frequency ultrasound on the formation of lysinoalanine and structural characterization of rice dreg protein isolates[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 67: 105-114.
- [30] 王申, 林利美, 周佳, 等. 大米肽的绝对分子质量与氨基酸组成及体外活性[J]. 食品科学, 2013, 34(1): 19-23. [WANG S, LIN L M, ZHOU J, et al. Absolute molecular weight, amino acid composition and *in vitro* activity of rice peptides[J]. Food Science, 2013, 34(1): 19-23.]