

# 饲料中的氨基酸分析

## 一. 仪器及试剂

### 仪 器:

- 1). 天平一台（精度 0.1mg）；
- 2). 恒温水浴锅一台；
- 3). 容量瓶；
- 4). 试管（1.5×15cm 或 1.5×10cm）；
- 5). 微量进样器（5 μ L 或 10 μ L）一支；
- 6). 微量可调移液枪（1000 μ L，200 μ L）一支、吸头多个；
- 7). 旋涡混匀器一台；
- 8). HPLC 系统及氨基酸分析专用柱（4.6×250mm 5 μ m）；

### 试 剂:

- 1). 超纯水（ $\geq 18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）；
- 2). 乙腈（HPLC 级）；
- 3). 三水合醋酸钠（分析纯）；
- 4). 冰醋酸（分析纯）；
- 5). 衍生试剂 A 和衍生试剂 B 溶液，至于冰箱保存（衍生试剂包对身体有害，用时请做好防护措施）；
- 6). 正己烷（HPLC 级）。
- 7). 0.1mol/L 盐酸溶液：精密量取 9.0mL 浓盐酸，加去离子水稀释至 1000mL。
- 8) 6mol/L 盐酸溶液:精密量取浓盐酸溶液，加到去离子纯化水以等比例混合，（再加入 0.1%的苯酚试剂作为保护剂）。

## 二. 流动相的配制

**流动相 A:** 0.1mol/L 醋酸钠溶液（pH 6.5）：乙腈=93.0：7.0

配制方法：准确称取三水合醋酸钠 13.6g 于 1000mL 水中，搅拌均匀，使之溶解，用冰醋酸或氢氧化钠溶液调 pH 值至 6.50；准确量取配制好的三水合醋酸钠溶液 930mL 和乙腈 70mL，混合均匀，抽滤过 0.22μm 滤膜；

**流动相 B:** 水: 乙腈=20.0: 80.0

配制方法: 准确量取水 200mL 和乙腈 800mL, 混合均匀, 抽滤过 0.22 $\mu$ m 滤膜;

### 三. 衍生化反应

#### 1. 对照品溶液浓度值

| Name | M.W.   | C(Mmol/L) | Name | M.W.   | C(Mmol/L) |
|------|--------|-----------|------|--------|-----------|
| 门冬氨酸 | 133.10 | 2.50      | 胱氨酸  | 240.3  | 1.25      |
| 谷氨酸  | 147.13 | 2.50      | 氯化铵  | 53.49  | 2.50      |
| 丝氨酸  | 105.09 | 2.50      | 酪氨酸  | 181.19 | 2.50      |
| 甘氨酸  | 75.067 | 2.50      | 缬氨酸  | 117.15 | 2.50      |
| 组氨酸  | 155.15 | 2.50      | 蛋氨酸  | 149.21 | 2.50      |
| 精氨酸  | 174.20 | 2.50      | 异亮氨酸 | 131.17 | 2.50      |
| 苏氨酸  | 119.12 | 2.50      | 亮氨酸  | 131.17 | 2.50      |
| 丙氨酸  | 89.093 | 2.50      | 苯丙氨酸 | 165.19 | 2.50      |
| 脯氨酸  | 115.13 | 2.50      | 赖氨酸  | 146.19 | 2.50      |

#### 2. 供试品溶液制备

精密称取饲料粉末样品 100mg, 置于 50ml 的圆底烧瓶中, 加入 10ml 的 6mol/L 盐酸溶液, 溶解, 并在 110 度条件下加热回流反应 24 小时, 反应完成后, 放置冷却; 冷却完后转移至 100ml 的量瓶中, 加水分别 3 次润洗反应瓶, 收集到量瓶中定容至 100ml; 充分混匀, 再量取 50ml 的溶液蒸干, 并用 2ml 水润洗定容, 待衍生用。

#### 3. 衍生步骤

- 1) 分别将 A、B 两种衍生试剂用稀释剂稀释至原来浓度的 1/5 倍;
- 2) 精密量取上述对照品溶液 200 $\mu$ L, 置于试管中, 加入稀释后的 A 溶液 100 $\mu$ L 和稀释后的 B 溶液 100  $\mu$  L, 摇匀, 室温反应 60min; 然后加入正己烷溶液 400 $\mu$ L 旋紧盖子后振摇 5~10s, 室温静置分层, 取下层 200 $\mu$ L 溶液, 加入 800  $\mu$  L 水混合均匀, 再取 200 $\mu$ L 加入 800  $\mu$  L 水混合均匀, 用孔径为 0.22 $\mu$ m 有机膜过滤, 待分析;
- 3) 供试品的衍生: 供试品溶液 200 $\mu$ L, 置于试管中, 加入稀释后的 A 溶液 100 $\mu$ L 和稀释后的 B 溶液 100  $\mu$  L, 摇匀, 室温反应 60min; 然后加入正己烷溶液 400 $\mu$ L 旋紧盖子后振摇 5~10s, 室温静置分层, 取下层 200 $\mu$ L 溶液, 加入 800  $\mu$  L 水混合均匀, 再取 200 $\mu$ L 加入 800  $\mu$  L 水混合均匀, 用孔径为 0.22 $\mu$ m 有机膜过滤, 待分析;

(注意：供试品样品前处理采用酸解提取，需要在衍生之前进行酸挥干处理，供试品中酸性强度过大在衍生过程中会发生中和，衍生过程必须在碱性条件下，才能够起到衍生完全。)

#### 四. 色谱条件

1. 色谱柱：月旭 Amino Acid, 5  $\mu$  m, 4.6 $\times$ 250mm;

2. 梯度程序：

流动相 A： 0.1mol/L 醋酸钠溶液 (pH 6.50) : 乙腈=93: 7

流动相 B： 水: 乙腈=20: 80

| T(min) | A%    | B%    |
|--------|-------|-------|
| 0.01   | 100.0 | 0.0   |
| 11     | 93.0  | 7.0   |
| 13.9   | 88.0  | 12.0  |
| 14     | 85.0  | 15.0  |
| 29     | 66.0  | 34.0  |
| 32     | 30.0  | 70.0  |
| 35     | 0.0   | 100.0 |
| 42     | 0.0   | 100.0 |
| 45     | 100.0 | 0.0   |
| 60     | 100.0 | 0.0   |

流 速： 1.0mL/min

柱 温： 40 $^{\circ}$ C

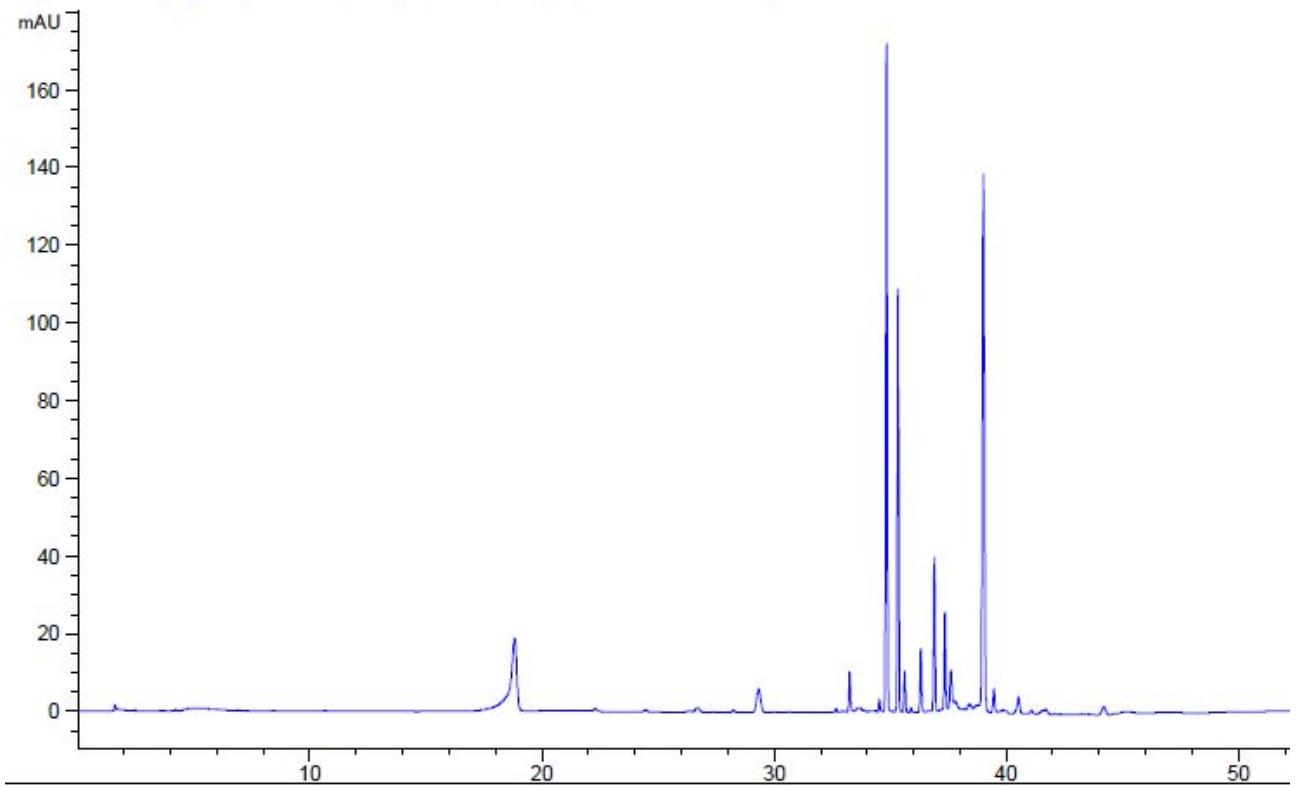
波 长： 254nm

进样量： 10 $\mu$ L

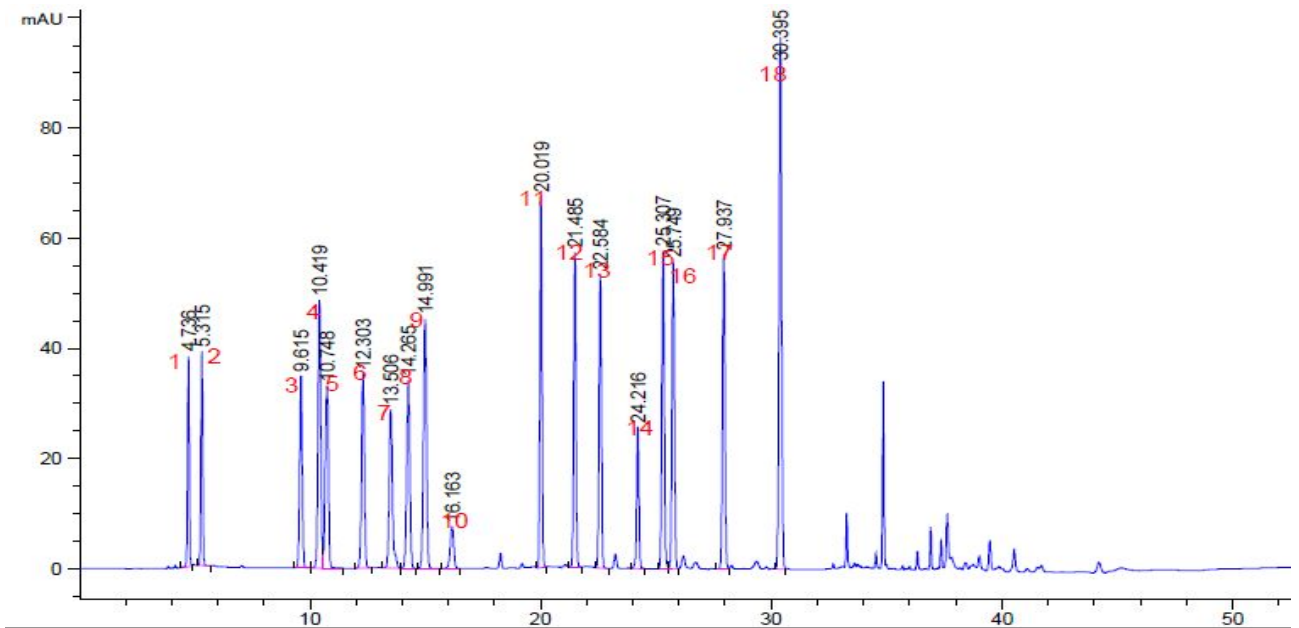
工作站记录时间： 60min

#### 五. 色谱图：

## 1. 空白



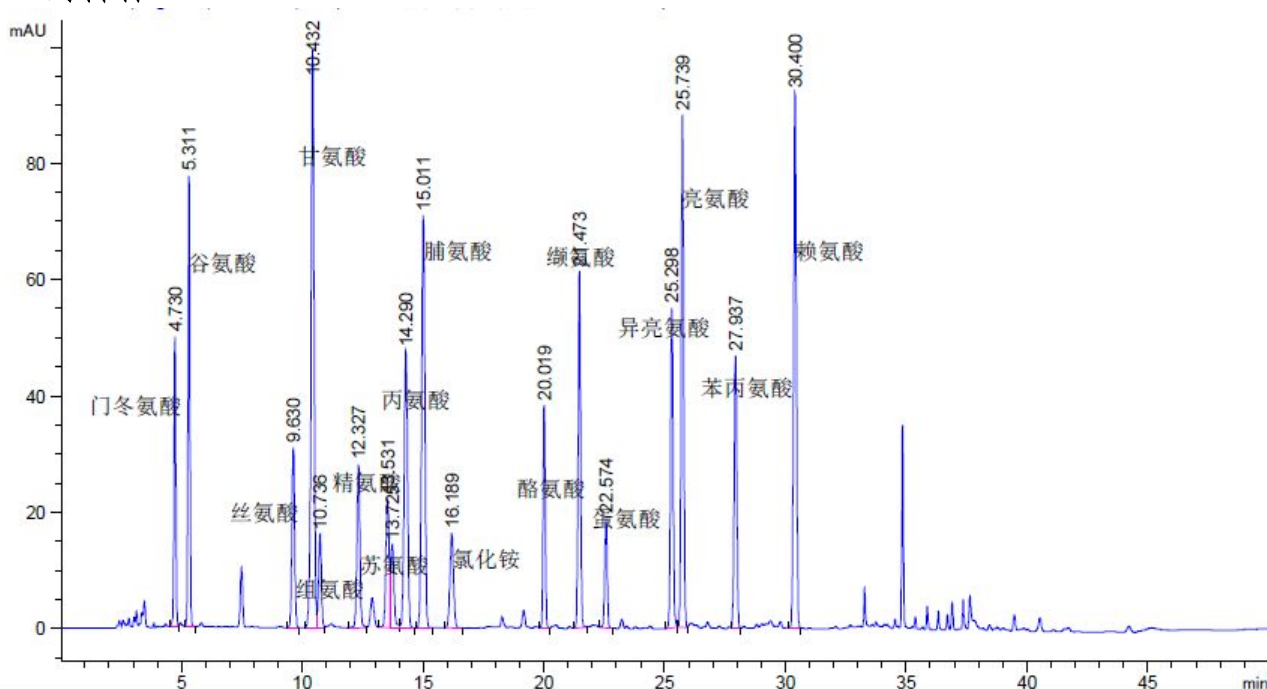
## 2. 混标



- |         |         |          |
|---------|---------|----------|
| 1. 门冬氨酸 | 8. 丙氨酸  | 15. 异亮氨酸 |
| 2. 谷氨酸  | 9. 脯氨酸  | 16. 亮氨酸  |
| 3. 丝氨酸  | 10. 氯化铵 | 17. 正亮氨酸 |
| 4. 甘氨酸  | 11. 酪氨酸 | 18. 苯丙氨酸 |
| 5. 组氨酸  | 12. 缬氨酸 | 19. 赖氨酸  |
| 6. 精氨酸  | 13. 蛋氨酸 |          |
| 7. 苏氨酸  | 14. 胱氨酸 |          |

| 保留时间<br>[min] | k' | 峰面积<br>[mAU*s] | 峰高<br>[mAU] | 对称<br>因子 | 峰宽<br>[min] | 塔板数    | 分离度   | 选择性  |
|---------------|----|----------------|-------------|----------|-------------|--------|-------|------|
| 4.736         | -  | 197.62503      | 38.32811    | 0.98     | 0.0808      | 19039  | -     | -    |
| 5.315         | -  | 209.53525      | 39.00647    | 0.98     | 0.0853      | 21552  | 4.10  | 1.12 |
| 9.615         | -  | 275.36517      | 34.94756    | 1.00     | 0.1229      | 33955  | 24.28 | 1.81 |
| 10.419        | -  | 403.19360      | 48.65473    | 1.01     | 0.1282      | 36560  | 3.76  | 1.08 |
| 10.748        | -  | 321.51151      | 33.11256    | 1.32     | 0.1551      | 26577  | 1.37  | 1.03 |
| 12.303        | -  | 308.15283      | 35.33869    | 1.04     | 0.1346      | 46298  | 6.31  | 1.14 |
| 13.506        | -  | 288.95554      | 28.87197    | 0.85     | 0.1458      | 47557  | 5.04  | 1.10 |
| 14.265        | -  | 327.96289      | 34.18203    | 1.01     | 0.1494      | 50509  | 3.02  | 1.06 |
| 14.991        | -  | 425.11047      | 45.26348    | 1.01     | 0.1457      | 58617  | 2.89  | 1.05 |
| 16.163        | -  | 79.43216       | 7.56845     | 1.05     | 0.1631      | 54445  | 4.46  | 1.08 |
| 20.019        | -  | 423.71878      | 67.42461    | 0.96     | 0.0980      | 231074 | 17.35 | 1.24 |
| 21.485        | -  | 390.52203      | 57.14494    | 0.97     | 0.1066      | 225012 | 8.42  | 1.07 |
| 22.584        | -  | 375.43536      | 53.33839    | 0.98     | 0.1099      | 233932 | 5.96  | 1.05 |
| 24.216        | -  | 173.26622      | 25.70280    | 1.02     | 0.1020      | 312527 | 9.05  | 1.07 |
| 25.307        | -  | 421.28839      | 57.81916    | 0.95     | 0.1120      | 282771 | 5.99  | 1.05 |
| 25.749        | -  | 404.67517      | 55.63848    | 0.98     | 0.1134      | 285840 | 2.30  | 1.02 |
| 27.937        | -  | 424.40143      | 57.18325    | 0.97     | 0.1151      | 326273 | 11.25 | 1.08 |
| 30.395        | -  | 751.62103      | 96.78077    | 0.98     | 0.1206      | 351613 | 12.25 | 1.09 |

### 3. 饲料样品



| 保留时间<br>[min] | k' | 峰面积<br>[mAU*s] | 峰高<br>[mAU] | 对称<br>因子 | 峰宽<br>[min] | 塔板数    | 分离度   | 选择性  |
|---------------|----|----------------|-------------|----------|-------------|--------|-------|------|
| 4.730         | -  | 259.74741      | 49.95413    | 1.01     | 0.0807      | 19045  | -     | -    |
| 5.311         | -  | 420.00626      | 77.54890    | 0.97     | 0.0849      | 21708  | 4.12  | 1.12 |
| 9.630         | -  | 245.41127      | 31.05473    | 1.00     | 0.1233      | 33824  | 24.38 | 1.81 |
| 10.432        | -  | 868.65765      | 99.39227    | 1.10     | 0.1316      | 34804  | 3.70  | 1.08 |
| 10.736        | -  | 132.68788      | 16.11931    | 1.04     | 0.1293      | 38190  | 1.37  | 1.03 |
| 12.327        | -  | 247.01346      | 28.09953    | 1.01     | 0.1347      | 46414  | 7.08  | 1.15 |
| 13.531        | -  | 210.45383      | 22.13795    | 1.01     | 0.1608      | 39228  | 4.79  | 1.10 |
| 13.725        | -  | 135.74828      | 14.30026    | 0.76     | 0.1612      | 40144  | 0.71  | 1.01 |
| 14.290        | -  | 459.87509      | 47.54440    | 1.00     | 0.1505      | 49937  | 2.13  | 1.04 |
| 15.011        | -  | 664.41956      | 71.01516    | 1.00     | 0.1453      | 59108  | 2.86  | 1.05 |
| 16.189        | -  | 171.88774      | 16.35479    | 0.99     | 0.1633      | 54460  | 4.49  | 1.08 |
| 20.019        | -  | 242.15886      | 38.43240    | 0.99     | 0.0977      | 232392 | 17.24 | 1.24 |
| 21.473        | -  | 419.06836      | 61.38869    | 0.97     | 0.1060      | 227123 | 8.38  | 1.07 |
| 22.574        | -  | 135.20473      | 19.02098    | 1.01     | 0.1101      | 232910 | 5.99  | 1.05 |
| 25.298        | -  | 403.19220      | 55.13679    | 0.95     | 0.1125      | 280281 | 14.38 | 1.12 |
| 25.739        | -  | 641.11218      | 88.31489    | 0.96     | 0.1135      | 284648 | 2.29  | 1.02 |
| 27.937        | -  | 349.03156      | 47.06548    | 0.98     | 0.1151      | 326155 | 11.29 | 1.09 |
| 30.400        | -  | 716.43866      | 92.06039    | 0.97     | 0.1210      | 349904 | 12.26 | 1.09 |

六. 测定结果:

| 氨基酸名称 | %含量      |
|-------|----------|
| 门冬氨酸  | 3.498786 |
| 谷氨酸   | 5.898341 |
| 丝氨酸   | 1.873169 |
| 甘氨酸   | 3.234552 |
| 组氨酸   | 2.383998 |
| 精氨酸   | 2.379407 |
| 苏氨酸   | 1.119227 |
| 丙氨酸   | 2.498554 |
| 脯氨酸   | 3.598812 |
| 氯化铵   | 2.315001 |
| 酪氨酸   | 2.071032 |
| 缬氨酸   | 2.514268 |
| 蛋氨酸   | 1.074694 |
| 胱氨酸   | 0        |
| 异亮氨酸  | 2.510713 |
| 亮氨酸   | 4.156157 |
| 苯丙氨酸  | 2.717075 |
| 赖氨酸   | 2.786941 |

## 五. 操作步骤和注意事项

### 1. 操作步骤:

- 1) 设置柱温 40℃和流速 1.0mL/min;
- 2) 将 A、B 两个通道用乙腈: 水=20: 80 排尽气泡 (如 B 通道的原存留液中不含缓冲盐, 则无需用乙腈: 水=20: 80 排气泡), B 通道用流动相 B 再排尽气泡;
- 3) 用乙腈: 水=20: 80 (A 通道) 冲洗系统 20min, 以防止缓冲盐析出;
- 4) A 通道用流动相 A 排尽气泡, 然后用流动相 A 走基线 30min, 平衡色谱柱;
- 5) 运行一次空白梯度;
- 6) 进样分析;
- 7) 分析完成后:
  - I) 用乙腈: 水=20: 80 代替流动相 A, 进水样 (清洗自动进样器), 进行梯度洗脱;
  - II) 换 90%乙腈冲洗色谱柱 40min 以上;

### 2. 注意事项:

- 1) 进样分析: 先进对照品溶液, 后进供试品溶液;
- 2) 缓冲溶液, 隔天需重新配制;
- 3) 防止缓冲盐析出。