

2013-APP-RLC-029 母乳中氨基酸分析

一、引言

母乳是婴儿成长过程中重要的食品，国内外的孕婴保健机构都建议初生婴儿采用母乳喂养。母乳中含有的营养成分，如蛋白质、脂肪、维生素、矿物质等，易于婴儿吸收。另外其所含有的抗感染因子，如 IgA、乳铁蛋白、溶菌酶及各种细胞成分，可增强婴儿的免疫能力。因此，母乳中营养成分研究也成为营养学的一大领域。目前，已有对母乳中的维生素进行研究并加以报道，但少有氨基酸的研究报道。本研究采用酸性条件下水解母乳中蛋白质，柱前在线衍生与液相色谱紫外联用分析母乳中氨基酸。

二、实验部分

2.1 仪器与试剂

U3000 液相色谱仪，恒温水浴锅，离心机

甲醇、乙腈、水、三乙胺、四氢呋喃、乙酸钠、硼酸钠、氢氧化钠、乙醚、邻苯二甲醛、氯甲酸苄甲酯、3-巯基丙酸、硫代乙醇酸、苯酚、三氟乙酸、盐酸

17 种氨基酸混标溶液（除胱氨酸浓度为 1.25 μ mol/ml，其它氨基酸浓度为 2.5 μ mol/ml）

表 1 U3000 液相色谱仪器配置信息

仪器型号	UltiMate3000: LPG-3400, SN:8014896 WPS-3000TSL, SN:8014671 TCC-3000, SN:801179 DAD, SN:8037084 变色龙®色谱管理软件 (Chromeloeon®6.8 SR11)
色谱柱类型	Hypersil GOLD C18 色谱柱, 4.6 \times 250mm, 5 μ m, PN:25005-254630, SN:11109100TD4
检测器工作参数	检测波长: 380nm, 262nm, 3D 扫描: 190-400nm, 采集频率: 5Hz
流动相组成	A: 20mM 乙酸钠 (加0.018%三乙胺, 调节pH值至7.2, 再加入0.3%四氢呋喃), B: 100mM乙酸钠 (pH=7.2) - 乙腈-甲醇 (20:40:40)
进样参数	自动进样器, 1 μ l, 温度: 30 $^{\circ}$ C
柱温设置	35 $^{\circ}$ C

表 2 梯度洗脱程序

时间 (min)	B%
----------	----

0	5
5	10
20	30
23	100
26	100
27	5
32	5

2.2 样品处理

7M 盐酸: 量取 558ml 盐酸，用水稀释至 1000ml 量瓶中，摇匀。

水解催化剂: 称取 1g 苯酚置 100ml 量瓶中，加入 7M 盐酸 50ml 使溶解，再加入 10ml 三氟乙酸和 20ml 硫代乙醇酸，用 7M 盐酸定容至刻度，摇匀，密封低温（4°C）保存。样品由第三方医疗机构收集不同哺乳期妇女的乳液样品。样品呈乳白色悬浊液（含有少量黄色液体油脂。低温保存时，样品取出后放置在 40°C 水浴中使固体油脂融化）。

脱脂: 量取 1ml 乳液样品置于离心管中，加入乙醚 1ml，反复振摇 3 分钟，静置 5 分钟，在 5000 转/分条件下离心 5 分钟，弃去上层乙醚液。取下层溶液进行水解。

水解: 吸取 1ml 脱脂后的母乳样品转移至真空水解管中，加入 0.6ml 水解催化剂，在 0.05MPa 压力下充氮保护 3 分钟，再减压脱气 3 分钟，密塞水解管并置于沸水浴上恒温加热 8 小时，冷却至室温，用 40% 氢氧化钠溶液调节 pH 值 2-3 范围内，用 0.1N 盐酸溶液稀释并定容至 10ml，摇匀并用微孔（0.22μm）滤膜过滤用于液相分析。

2.3 衍生程序

采用邻苯二甲醛和氯甲酸苄甲酯在碱性条件下分别与一级氨基酸和二级氨基酸发生反应，生成具有强烈紫外吸收的化合物。衍生过程在自动进样器中进行。

衍生试剂:

硼酸缓冲液: 200mM 四硼酸钠溶液（pH=10.2）

邻苯二甲醛溶液（OPA）: 50mg/ml(甲醇)

OPA/MPA 溶液: 0.8ml 硼酸缓冲液-0.2ml OPA 溶液-20μl 3-巯基丙酸

氯甲酸苄甲酯（FMOC）溶液: 2.5mg/ml（乙腈）

稀释液: 流动相 A

衍生过程: 200mM 硼酸缓冲液（5μL）+样品（1μL）+OPA/MPA 溶液（1μL）+FMOC 溶液（1μL）+稀释液（8μL）

三、 结果

3.1 水解条件优化

在水解过程中，加热温度、水解持续时间和催化剂用量对水解有着重大影响。结合实际情况采用沸水浴加热进行水解，因此利用响应面法对水解时间和催化剂用量的影响进行了研究，结果见表 3 和图 1

表 3 水解研究方案

编号	水解时间(min)	用量(ml)
1	240	0.3

2	720	0.3
3	720	0.9
4	240	0.9
5	600	0.6
6	360	0.6
7	480	0.75
8	480	0.45
9(重复2次)	480	0.6

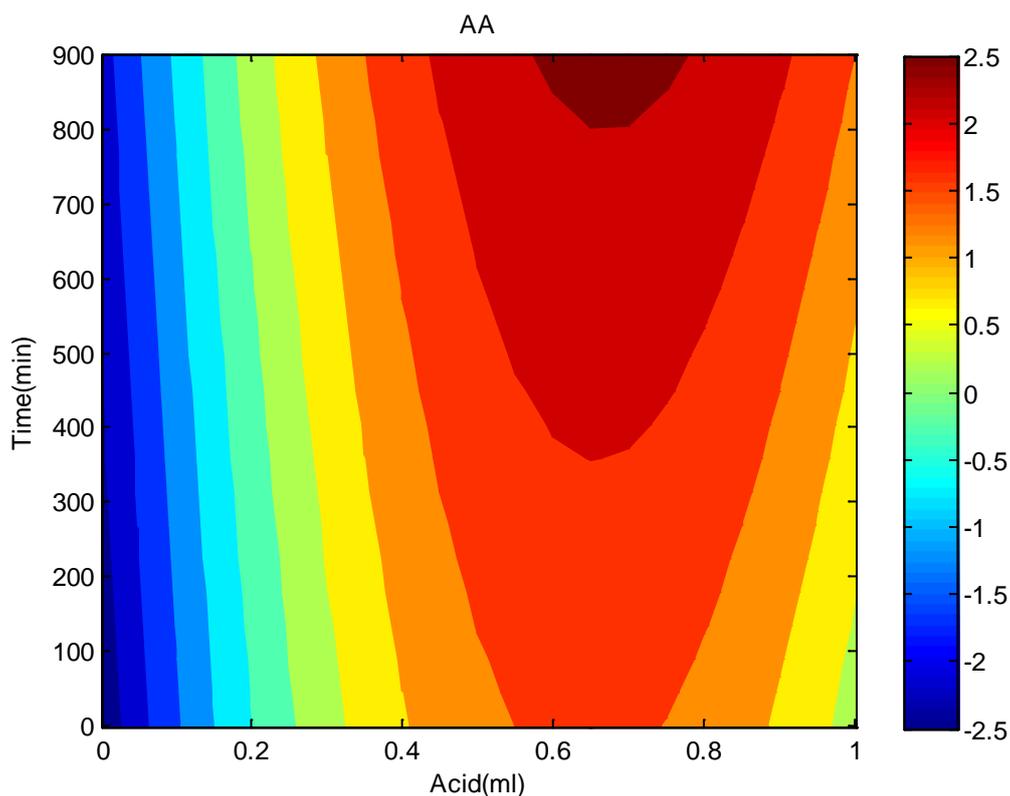


图1 氨基酸水解优化结果

从图1中可以看出，水解时间延长对氨基酸增加效果不明显，水解催化剂用量对水解效率有显著影响，随着用量增大，氨基酸含量明显增加，且达到最大值，再增加用量时，氨基酸含量开始降低，可能原因是水解后的氨基酸在强酸性环境与高温加热条件下中发生降解而引起含量降低。综合实际操作考虑，故用0.6ml水解催化剂在沸水浴中水解8小时可获得最佳水解氨基酸含量。

3.2 方法专属性

取0.1N盐酸做为空白试剂考察方法专属性，结果见图2和3

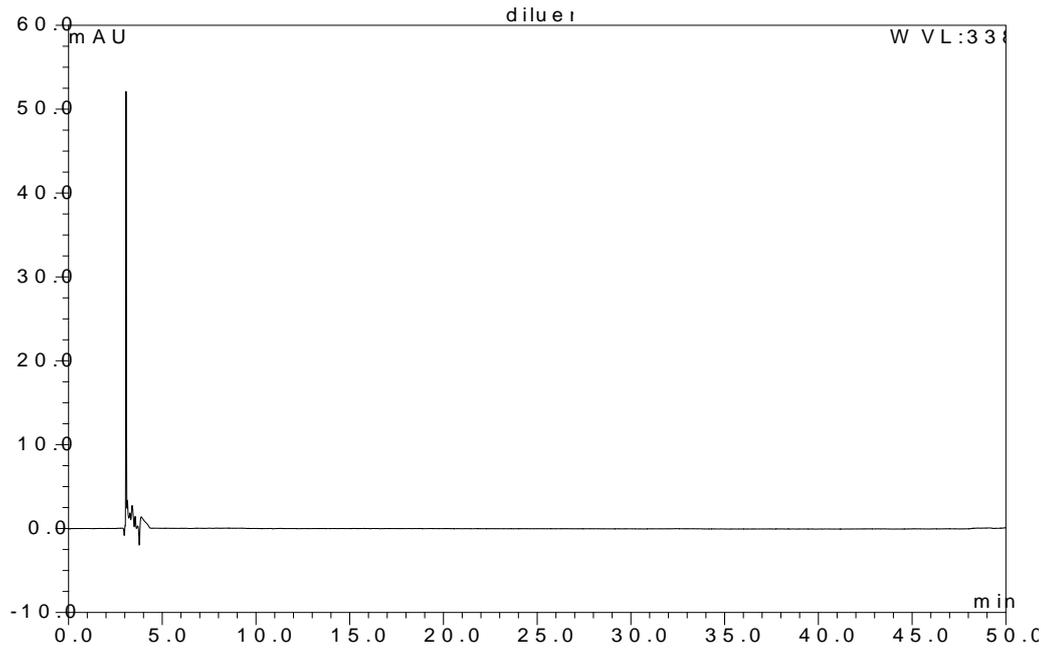


图 2 溶剂空白图谱

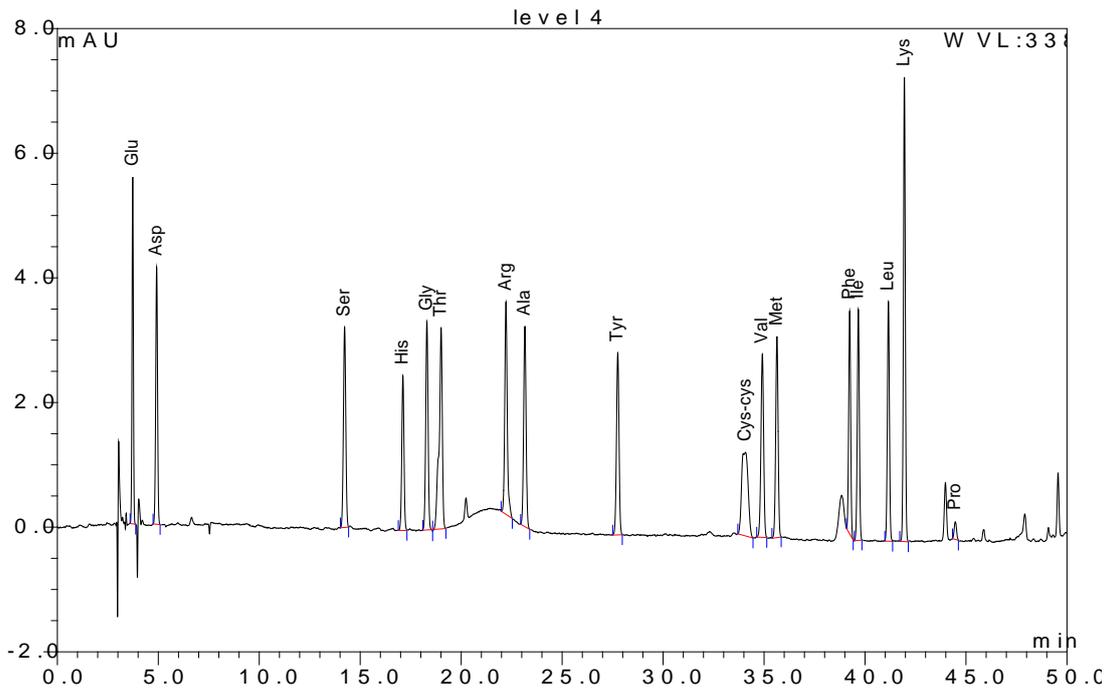


图 3 标准品图谱

3.3 线性范围

取氨基酸混标溶液用 1%盐酸（约 0.1N）稀释成浓度为 0.025、0.05、0.125、0.25、0.50 $\mu\text{mol/ml}$ 的溶液，按照前述条件测定其响应值，并与浓度做线性回归，结果见表 4。

表 4 线性范围测试结果

编号	峰名称	校准类型	相关系数.(%)	截距	斜率
1	Glu	线性, 有截距	99.9999	0.0006	4.1463
2	Asp	线性, 有截距	99.9999	0.0037	4.0950
3	Ser	线性, 有截距	99.9999	-0.0006	4.3052
4	His	线性, 有截距	99.9996	0.0003	2.2569
5	Gly	线性, 有截距	99.9727	-0.0722	2.8790
6	Thr	线性, 有截距	99.9994	0.0025	3.9876
7	Arg	线性, 有截距	99.9998	-0.0028	4.0510
8	Ala	线性, 有截距	99.9995	0.0095	4.1531
9	Tyr	线性, 有截距	99.9994	0.0012	4.0507
10	Cys-cys	线性, 有截距	99.9140	0.0765	1.3698
11	Val	线性, 有截距	99.9988	0.0034	4.2460
12	Met	线性, 有截距	99.9994	0.0053	4.1808
13	Phe	线性, 有截距	99.9985	0.0085	4.0883
14	Ile	线性, 有截距	99.9992	0.0022	4.3807
15	Leu	线性, 有截距	99.9991	0.0003	4.2382
16	Lys	线性, 有截距	99.9806	-0.0747	4.8683
17	Pro	线性, 有截距	99.9866	-0.0447	1.1915

3.4 方法精密度

取对照品溶液, 连续进样 5 针, 结果见图 4

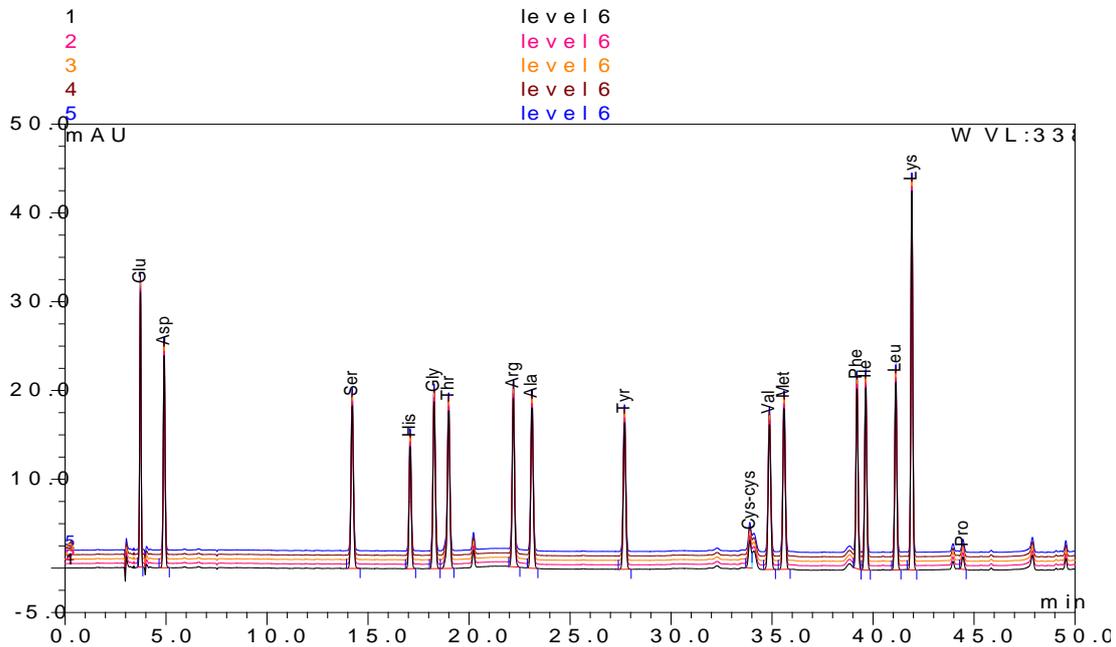


图 4 标准品重复进样图谱

3.5 方法准确度

按前述方法平行测定母乳样品与加标样品, 计算其含量与加标回收率。结果见图 5 与表 5

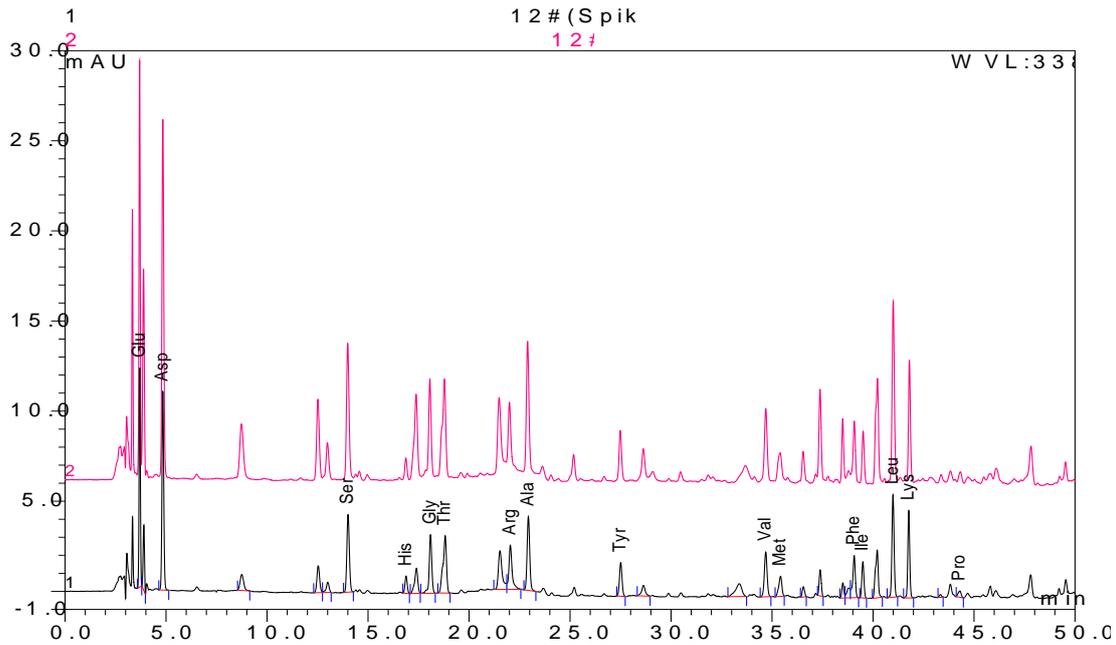


图5 样品图谱 (1.加标样品 2. 未加标样品)

表5 加标回收率 (样品编号: 12-8, n=2)

峰名称	含量(μg/ml)	加标量(μg/ml)	测定量(μg/ml)	平均回收率 (%)
Glu	1.68	0.125	1.812	105.6
Asp	2.10	0.125	2.228	102.4
Ser	0.93	0.125	1.057	101.6
His	ND	0.125	0.13	104
Gly	0.47	0.125	0.598	102.4
Thr	0.78	0.125	0.912	105.6
Arg	0.55	0.125	0.685	108
Ala	0.99	0.125	1.112	97.6
Tyr	0.45	0.125	0.582	105.6
Cys	ND	0.0625	0.064	102.4
Val	0.72	0.125	0.848	102.4
Met	0.48	0.125	0.611	104.8
Phe	0.44	0.125	0.556	92.8
Ile	0.39	0.125	0.511	96.8
Leu	1.17	0.125	1.292	97.6
Lys	0.21	0.125	0.338	102.4
Pro	ND	0.125	0.121	96.8

四、 说明

通过上述方法学考察结果分析, 本方法具有线性范围宽、专属性强、结果准确, 可用于母乳中测定氨基酸含量。