

饲料中 17 种氨基酸的测定

氨基酸是动物的生长发育及动物体内营养物质的正常代谢所必须的重要组成部分，因此是评价饲料营养成分的一类重要指标，准确检测氨基酸的含量和种类对于饲料质量评价和控制具有重要意义。本文采用柱前衍生法，可同时对饲料中的 17 种氨基酸进行分析测定。

一、实验部分

1.1 仪器与试剂

LC1620A 高效液相色谱仪（含 UV 检测器 1 台，P1620A 高压恒流泵 2 台，上海舜宇恒平科学仪器有限公司）

FA2004 电子分析天平

恒温箱

水解管（5 型）

旋涡混匀器

氢氧火焰机

乙腈(色谱纯，沃凯)

氨基酸标准品溶液（上海月旭）

超纯水

2, 4-二硝基氟苯（DNFB）、N,N-二甲基酰胺、浓盐酸、磷酸二氢钾、碳酸氢钠、氢氧化钠、冰醋酸（均为分析纯）。

1.2 标准品溶液配制

- 1) 氨基酸标准品溶液：氨基酸标准品溶液用水稀释 10 倍到所需浓度（见表 1）。
- 2) 衍生化缓冲液的配制：称取 21g 的 NaHCO_3 于 1L 烧杯中，加水 470mL，摇匀、溶解。过滤至 500mL 试剂瓶中，再加乙腈 30mL，摇匀即得。
- 3) 衍生化试剂：取 1mL DNFB 加入 100mL 定量瓶中，乙腈定容至刻度即得。
- 4) 平衡溶液的配制：取 KH_2PO_4 3.4g，加 0.1mol/L 的 NaOH 溶液 145.5mL，加水至 500mL，摇匀，过滤，贮存置棕色瓶中即得。

5) 6mol/L 盐酸：取浓盐酸 500mL 加入 1L 烧杯中，再加水 500mL，摇匀即得。

表 1 十七种氨基酸浓度表

名称	简写	MW	C (mmol/L)	名称	简写	MW	C (mmol/L)
天冬氨酸	Asp	133.10	0.25	蛋氨酸	Met	149.21	0.25
谷氨酸	Glu	147.13	0.25	半胱氨酸	Cys	121.15	0.125
丝氨酸	Ser	105.09	0.25	异亮氨酸	Ile	131.17	0.25
精氨酸	Arg	174.20	0.25	亮氨酸	Leu	131.17	0.25
甘氨酸	Gly	75.067	0.25	苯丙氨酸	Phe	165.19	0.25
苏氨酸	Thr	119.12	0.25	组氨酸	His	155.15	0.25
脯氨酸	Pro	115.13	0.25	赖氨酸	Lys	146.19	0.25
丙氨酸	Ala	89.093	0.25	酪氨酸	Tyr	181.19	0.25
缬氨酸	Val	117.15	0.25	-	-	-	-

1.3 色谱条件：

色谱柱：Welch unitary Amino acid 柱（4.6×250mm，5um）

流动相：A：40mM 乙酸钠缓冲液（冰醋酸调 pH 调至 6.5）（含 10mM N,N-二甲基酰胺）B：乙腈：水=1：1，梯度洗脱（见表 2）

流速：1.2mL/min

柱温：28℃

波长：360nm

进样量：10ul

表 2 梯度程序表

No.	时间(min)	流动相(A %)	流动相(B %)
1	0	84	16
2	0.3	84	16
3	4	69	31
4	9.5	64	36
5	17	45	55
6	28	35	65
7	34	0	100
8	36	0	100
9	37	84	16
10	46	84	16

1.4 样品前处理（氨基酸衍生化方法）

1、精确称取研磨成细粉的样本粉末 200mg 置于水解管中，加入 6mol/L 的盐酸

- 12mL，轻微震荡。用氢氧火焰机融化水解管颈部完全密封。
- 2、放于烘箱中 145℃水解 4 小时，冷却至室温；
 - 3、小心敲碎水解管顶部；把水解液及残渣用漏斗和滤纸过滤，滤至 50mL 容量瓶中；再用水洗涤水解管，每次洗涤水均再次洗涤滤纸，反复 6-7 次，然后加水定容至容量瓶刻度；
 - 4、用微量注射器取 10ul 定量好的溶液至 1mL 玻璃细管中，真空抽干(去 HCl)，然后依次加入衍生化缓冲液和衍生化试剂各 20ul，涡旋 30s，用多层密封带封口；
 - 5、置烘箱中 64℃衍生化 30min，冷却至室温；
 - 6、加平衡缓冲液 160ul，混匀 30s，经 0.45um 滤膜过滤，作为待测样品溶液。

二、实验结果

2.1 实验数据 (峰面积及保留时间)

分别用 Welch unitary Amino acid 柱和 ACCHROM unitary 柱分析饲料样品，连续进样 3 次，计算峰面积和保留时间的相对标准偏差，结果如下：

表 3 氨基酸（饲料）-Welch unitary Amino acid 色谱柱峰面积

峰面积值/名称	Asp	Glu	Ser	Arg	Gly	Thr	Pro	Ala	Val
1	487.9	462.4	433.1	482.4	481.8	488.0	332.4	509.6	480.1
2	481.7	462.9	410.7	511.3	469.1	467.8	320.1	490.3	460.6
3	476.2	458.8	411.6	514.1	471.8	461.7	316.8	485.0	456.4
平均值	481.9	461.4	418.5	502.6	474.2	472.5	323.1	495.0	465.7
RSD%	1.2	0.5	3.0	3.5	1.4	2.9	2.5	2.6	2.7

接上表

峰面积值/名称	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	His	Lys	Tyr	-
1	383.0	787.1	316.0	443.6	919.7	145.6	1045.0	425.4	-
2	369.7	772.1	312.8	431.9	860.6	142.3	978.7	431.3	-
3	362.3	777.1	335.5	418.0	853.9	134.6	1030.5	432.5	-
平均值	371.7	778.8	321.4	431.2	878.1	140.8	1018.1	429.8	-
RSD%	1.2	0.5	3.0	3.5	4.1	4.0	2.5	2.6	-

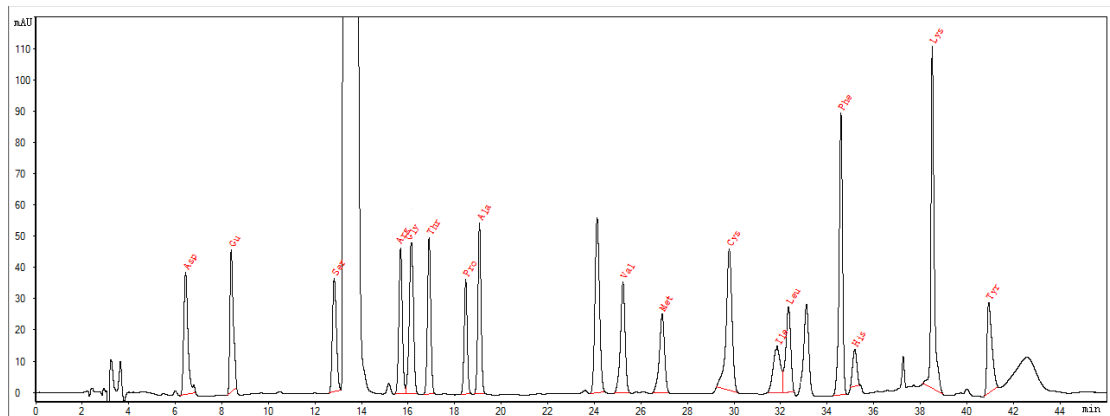
表 4 氨基酸（饲料）-Welch unitary Amino acid 色谱柱保留时间数据

保留时间/名称	Asp	Glu	Ser	Arg	Gly	Thr	Pro	Ala	Val
1	6.4	8.4	12.8	15.7	16.1	16.9	18.5	19.1	25.2
2	6.7	8.5	13.0	16.0	16.4	17.2	18.9	19.4	26.0
3	6.8	8.5	13.0	16.0	16.4	17.2	18.8	19.4	25.9
平均值	6.6	8.4	13.0	15.9	16.3	17.1	18.7	19.3	25.7
RSD%	2.5	0.5	0.9	1.2	0.9	1.1	1.1	1.0	1.6

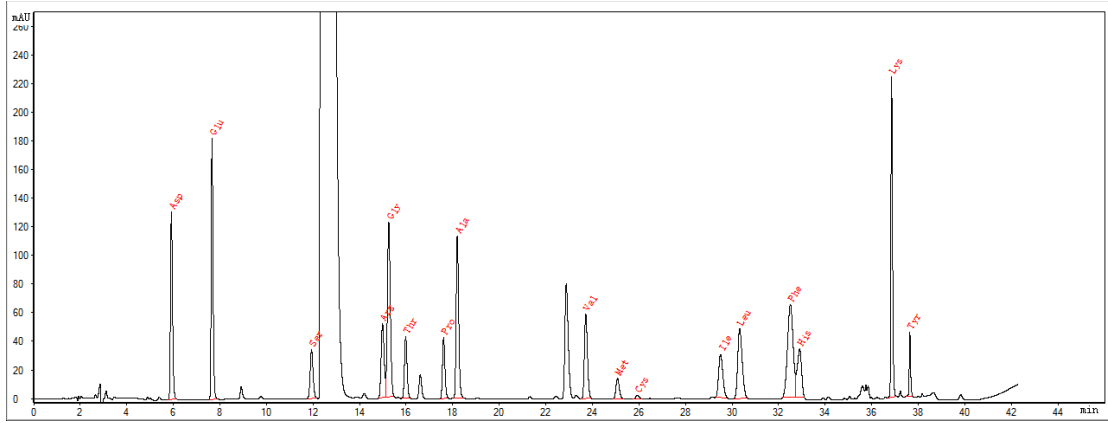
接上表

保留时间/名称	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	His	Lys	Tyr	-
1	26.9	29.8	32.1	32.6	34.6	35.2	38.5	40.9	-
2	27.7	31.0	32.5	33.0	34.9	35.3	38.6	40.9	-
3	27.6	30.8	32.4	32.9	34.9	35.2	38.5	40.8	-
平均值	27.4	30.5	32.3	32.9	34.8	35.2	38.5	40.9	-
RSD%	1.6	2.1	0.7	0.7	0.5	0.1	0.1	0.2	-

2.2 实验图谱



SHP-氨基酸标准图谱（饲料）-Welch unitary Amino acid 色谱柱



SHP-氨基酸标准图谱（鱼粉）- ACCHROM unitary 色谱柱

2.3 结论

采用 LC1620A 高效液相色谱仪，使用柱前衍生法，能有效分离饲料中的 17 种氨基酸，且方法精密度良好。