柱前衍生-超高效液相色谱法测定鱼卵中的 17 种氨基酸

孙言春^{1,2}, 许宪祝^{1*}, 徐衍岭¹, 谭志军³, 牟振波², 杜宁宁²

(1. 哈尔滨工业大学基础与交叉科学研究院, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:建立了一种快速、灵敏的柱前衍生-超高效液相色谱-光电二极管阵列检测器(UPLC-PDA)测定史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)、达氏鲟(*Huso dauricus*)和小体鲟(*Acipenser ruthenus*)鱼卵中 17 种氨基酸含量的方法。采用 6.0 mol/L 的盐酸水解鱼卵,提取液经低压浓缩、碱性中和,然后以 6-氨基喹啉-*N*-羧基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯(AQC)为衍生试剂在 pH 8.8 硼酸盐缓冲溶液中衍生化。采用的色谱分离柱为 Waters BEH C18 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为 30 mmol/L 乙酸铵水溶液(pH 3.5)和乙腈(含 0.15% (v/v) 甲酸及 30 mmol/L 乙酸铵),梯度洗脱,流速为 0.7 mL/min,在 260 nm 波长下检测。17 种氨基酸在 5.0 ~ 1 000 μmol/L 浓度范围内,峰面积与浓度之间的线性关系良好($r^2 \geq 0.995 0$)。以标准加入法测定回收率和相对标准偏差(RSD),在 100、500、750 μmol/L 的添加水平下,17 种氨基酸的平均回收率为 75.4% ~ 107.3%, RSD 为 2.19% ~ 12.3%。以 3 倍信噪比($S/N > 3$)计方法的检出限,17 种氨基酸的检出限为 0.94 ~ 4.04 μmol/L。应用该方法检测了 3 种鲟鲤鱼卵中的 17 种氨基酸含量。结果表明,该方法简便、准确、快速、可靠。

关键词:柱前衍生;超高效液相色谱;氨基酸;鱼卵

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2013)03-0275-06

Determination of 17 amino acids in fish eggs by ultra performance liquid chromatography coupled with precolumn derivatization

SUN Yanchun^{1,2}, XU Xianzhu^{1*}, XU Yanling¹, TAN Zhijun³, MOU Zhenbo², DU Ningning²

(1. Academy of Fundamental and Interdisciplinary Sciences, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China; 2. Heilongjiang River Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: A rapid quantitative method of ultra performance liquid chromatography (UPLC) has been developed for the analysis of 17 amino acids in fish eggs from *Acipenser schrenckii*, *Huso dauricus* and *Acipenser ruthenus*. The analytes were hydrolyzed with 6.0 mol/L HCl. The extraction solution was concentrated under low pressure and neutralized with NaOH solution before derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxy-succinimidyl carbamate (AQC) as derivatization agent in borate buffer solution (pH 8.8). Gradient UPLC separation was performed on a C₁₈ column (BEH-C₁₈, 100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with 30 mmol/L ammonium acetate (pH 3.5 adjusted with formic acid) and acetonitrile (containing 0.15% (v/v) formic acid and 30 mmol/L ammonium acetate) as the mobile phases at a flow rate of 0.7 mL/min. The detection was carried out with a photo-diode array (PDA) detector and the wavelength was set at 260 nm. The linear ranges were from 5.0 to 1 000 μmol/L with the correlation coefficients (r^2) $\geq 0.995 0$. The method was validated by the analysis of seven replicates. The 17 amino acid standards were spiked in fish eggs at three levels of 100, 500 and 750 μmol/L, and the average recoveries were 75.4% – 107.3% with the relative standard deviations of 2.19% – 12.3%. The limits of detection (LOD) for the analytes were from 0.94 μmol/L to 4.04 μmol/L. The method was successfully applied to the analysis of the 17 amino acids in fish eggs from *Acipenser*

* 通讯联系人. E-mail: xuxianzhu@hit.edu.cn.

基金项目: 中央级非营利科研机构财政专项基金项目(2012A1004, 201106, 2007 HSYZX-ZH-26).

收稿日期: 2012-11-07

schrenckii, *Huso dauricus* and *Acipenser ruthenus*. The method is simple, rapid, precise and reliable.

Key words: precolumn derivatization; ultra performance liquid chromatography (UPLC); amino acids; fish eggs

氨基酸是构成生物体内蛋白质的基本结构单位,是动物体合成蛋白质的原料来源,它可以调节生物机体的生理活动,是生物体内不可缺少的营养成分之一。测定生物体内氨基酸的含量,不仅对于遗传代谢性疾病、肾病、肝病等疾病的诊断和治疗具有重要价值,而且对于了解被检对象的营养状况方面具有一定的参考价值^[1],因此氨基酸的含量分析对食品科学、生命科学、疾病诊断与控制等研究具有重要意义^[2]。由鲟鲤鱼卵加工而成的鱼子酱素有“黑黄金”之称,营养丰富,同时史氏鲟、达氏鲟和小体鲟作为被保护动物,其人工增殖、品种改良及保护遗传多样性等均需要分析检测其卵中的氨基酸含量,进而评估其营养状况等,因此对鲟鲤鱼卵中氨基酸的含量进行测定具有重要的意义。

目前,氨基酸的测定方法有很多,主要有高效液相色谱法(HPLC)^[3,4]、毛细管电泳法^[5-7]、离子交换色谱法^[8,9]、气相色谱-质谱法^[10,11]和液相色谱-质谱法等^[12-14]。经典的氨基酸分析方法一般采用氨基酸分析仪,使用茚三酮作为衍生试剂、柱后衍生测定^[15]。但氨基酸分析仪价格昂贵,分析时间长,且只能用于分析氨基酸。相对于其他几种分析方法,柱前衍生化-高效液相色谱无需特殊反应装置,具有仪器普及率高、分析时间较短、方法灵活多样、灵敏度高的优点,已有逐渐取代氨基酸自动分析仪开展氨基酸测定的趋势。柱前衍生化常用的衍生试剂有邻苯二甲醛(OPA)、9-芴甲基氯甲酸酯(FMOC)、异硫氰酸苯酯(PITC)、2,4-二硝基氟苯(DNFB)、丹酰氯(Dansyl-Cl)、萘-2,3-二甲醛(NDA)、6-氨基喹啉-*N*-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(AQC)等^[16]。但有些衍生化试剂具有一定的缺陷,如 OPA 法不能与二级氨基酸(如脯氨酸、羟脯氨酸)反应且重现性和衍生物的稳定性差;DNFB 衍生化反应时间长;FMOC 难以消除过量试剂干扰且衍生化副产物易影响分离效果;PITC 需在无水条件下操作且其毒性较大^[17]等。而 AQC 可与氨基酸迅速反应,生成高稳定性的脲及对测定无干扰的副产物 6-氨基喹啉,且衍生物性质稳定,有很强的紫外吸收,适用于应用范围较荧光检测器较广的紫外检测器检测^[18]。

本实验采用 AQC 为衍生试剂的柱前衍生-超高效液相色谱法快速测定史氏鲟、达氏鲟和小体鲟卵

中氨基酸的含量,以满足大批量样品快速检测的需要,以期疾病诊断和筛查、营养需求状况调查提供快速检测手段;为了解鲟鲤鱼卵的营养价值,更好地综合开发和利用提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY™ UPLC 仪,配光电二极管阵列(PDA)检测器,MassLynx V 4.1 操作软件(美国 Waters 公司);Biofuge Stratos 高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司);旋转蒸发仪、MS1 Mini-Shaker 涡旋振荡器(德国 IKA 公司);Milli-Q A-10 纯水器(美国 Millipore 公司);恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

衍生剂 AQC(Waters 公司);乙酸铵、高氯酸、磺基水杨酸、三氯乙酸(色谱纯,美国 Fluka 公司);甲酸(纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma-RDH 公司);乙腈(HPLC 级,美国 Merck 公司);苯酚(分析纯,上海国药)。17 种氨基酸(天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、半胱氨酸(Cys)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)和苯丙氨酸(Phe))混合标准品溶液(2.5 $\mu\text{mol/mL}$,美国 Sigma 公司)。

AQC 衍生溶液的配制:向 AQC 粉末瓶中加入 1.0 mL 乙腈,涡旋混合 15 s,然后放入 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱内加热 5.0 min,得 AQC 衍生溶液。

硼酸盐缓冲液(pH 8.8)的配制:取硼酸 12.36 g,加水 400 mL 溶解,用 400 g/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.8,然后加水稀释至 500 mL,得到 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 8.8)。

标准溶液的配制:将氨基酸标准品用超纯水配制成浓度分别为 5.0、10、20、50、100、200、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的标准溶液。

样品:史氏鲟、达氏鲟和小体鲟鱼卵于 2011 年 4 月取自北京房山鲟鱼繁育中心基地。用于采集鱼卵的史氏鲟平均体重为(32.2 $\pm$ 2.8) kg,达氏鲟平均体重为(28.4 $\pm$ 2.3) kg,小体鲟平均体重为(25.8 $\pm$ 1.6) kg。在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时,经测定,其平均密度

均为 1.08 g/mL。

1.2 实验方法

1.2.1 氨基酸标准品的衍生化

用移液器分别移取 10 μ L 系列浓度的氨基酸标准溶液,置于自动进样瓶中,分别加入 70 μ L 硼酸盐缓冲液,涡旋混合后加入 20 μ L AQC 衍生溶液,涡旋混合 15 s,于室温下静置 1.0 min,用石蜡膜封口,放入 55 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱内加热 10 min。

1.2.2 空白样品的衍生化

取 80 μ L 缓冲盐溶液,加入 20 μ L AQC 衍生溶液,按照标准品的步骤衍生。

1.2.3 样品衍生化

样品预处理及衍生化:取约 50 g 卵,用均质机充分均质,用滤网过滤掉卵膜,取 200 mg 过滤后的样品置于 10 mL 水解管中,加入 8 mL 6.0 mol/L 的盐酸溶液,0.2 mL 重新蒸馏过的苯酚,放置到冷冻剂中,将二氧化碳气体通入到盐酸液面下持续 2 min,快速盖上盖子并用纱布扎紧,充分涡旋振荡。将水解管放置到(110 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的恒温干燥箱中,水解 24 h 后,取出冷却。将水解液和用超纯水冲洗水解管的洗液合并后过滤,并在 60 $^{\circ}$ C 真空旋转蒸发至近干;在其中加入 1.0 mL 超纯水溶解,用 1.0 mol/L NaOH 溶液调 pH 到中性后,用超纯水定容到 2.0 mL。取 100 μ L 上述溶液置于自动进样瓶中,向其中加入 80 μ L 硼酸盐缓冲液(pH 8.8),涡旋振荡 30 s;加入 20 μ L 衍生化试剂,涡旋振荡 15 s,然后放入 55 $^{\circ}$ C 恒温干燥箱内加热 10 min,使其充分反应。

1.2.4 UPLC 条件

色谱柱:BEH C18 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7

μ m;美国 Waters 公司);柱温:55 $^{\circ}$ C;样品室温度:10 $^{\circ}$ C。流动相 A: 30 mmol/L 乙酸铵水溶液(用甲酸调 pH 至 3.5);流动相 B:乙腈(含 0.15% (v/v) 甲酸及 30 mmol/L 乙酸铵);流速:0.7 mL/min。流动相梯度洗脱程序:0 ~ 0.54 min, 99.9% A; 0.54 ~ 5.74 min, 99.9% A 线性降至 90.9% A; 5.74 ~ 7.74 min, 90.9% A 线性降至 78.8% A; 7.74 ~ 8.24 min, 78.8% A 线性降至 40.4% A; 8.24 ~ 8.84 min, 40.4% A; 8.84 ~ 8.93 min, 40.4% A 线性升至 99.9% A; 8.93 ~ 10.00 min, 99.9% A。检测波长:260 nm;进样体积:1 μ L,自动进样器进样;流动相使用前需充分振荡,超声脱气 30 min。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理方法及衍生化条件的优化

GB/T 5009.124-2003^[19] 中采用 6.0 mol/L 盐酸将食品中的蛋白质水解成游离氨基酸。本文参考该方法也使用 6.0 mol/L 盐酸溶液对样品进行水解,考察了盐酸溶液的用量对测定结果的影响。在 200 mg 小体鲟鱼卵液(每组 5 个平行样品)中分别加入 4、6、8、10 mL 盐酸溶液,按照 1.2.3 节方法处理,按 1.2.4 节方法测定氨基酸的含量,结果见图 1。结果表明,用 8 mL 和 10 mL 盐酸溶液水解得到的氨基酸含量基本上高于用 4 mL 和 6 mL 盐酸溶液水解的氨基酸含量;而用 8 mL 和 10 mL 盐酸溶液水解的氨基酸含量无显著性差异($P > 0.05$),因此本实验最终选择用 8 mL 6 mol/L 盐酸溶液水解样品。

图 1 不同体积的 6.0 mol/L 盐酸对鱼卵中 17 种氨基酸水解效果的影响 (n = 5)
Fig. 1 Effect of 6.0 mol/L HCl volume on the hydrolysis of the 17 amino acids from fish eggs (n = 5)

AQC 的衍生结果受衍生化时间影响较大,故本实验对衍生化时间进行了优化。文献^[3-5]报道 AQC 与氨基酸的反应时间因反应基质不同而不同,一般为 10 ~ 30 min。本实验考察了 55 $^{\circ}$ C 下分别衍生 5、10、

20、30 min 时 AQC 对鱼卵水解液(每组 5 个平行样品)的衍生效果,结果见表 1。结果显示,衍生时间为 10、20、30 min 时无显著性变化($P > 0.05$),因此针对经盐酸水解后的鱼卵体系,衍生时间选择为 10 min。

表 1 不同的衍生化时间对鱼卵水解液中氨基酸的衍生化效果的比较 ($n=5$, mean $\pm$ SD)

Table 1 Effect of different times on the derivatization with amino acids hydrolyzed from fish eggs ($n=5$, mean $\pm$ SD)

Amino acid	mmol/kg			
	5 min	10 min	20 min	30 min
His	17.5 $\pm$ 12.1	44.1 $\pm$ 7.3	46.6 $\pm$ 10.8	44.5 $\pm$ 11.2
Ser	43.4 $\pm$ 8.6	85.0 $\pm$ 6.3	83.8 $\pm$ 9.6	83.6 $\pm$ 8.7
Arg	32.4 $\pm$ 10.9	72.8 $\pm$ 7.8	69.6 $\pm$ 11.2	72.4 $\pm$ 8.6
Gly	85.4 $\pm$ 6.7	126.7 $\pm$ 8.8	121.5 $\pm$ 9.4	124.3 $\pm$ 6.8
Asp	51.4 $\pm$ 9.5	119.9 $\pm$ 5.6	123.2 $\pm$ 9.8	122.5 $\pm$ 10.3
Glu	63.3 $\pm$ 10.6	172.8 $\pm$ 7.3	167.4 $\pm$ 8.6	172.3 $\pm$ 8.6
Thr	59.8 $\pm$ 9.4	91.4 $\pm$ 11.6	92.9 $\pm$ 10.3	88.5 $\pm$ 9.4
Ala	58.8 $\pm$ 11.3	116.9 $\pm$ 7.6	109.4 $\pm$ 10.5	112.5 $\pm$ 8.5
Pro	35.6 $\pm$ 9.8	44.2 $\pm$ 9.4	47.8 $\pm$ 6.9	46.4 $\pm$ 7.6
Cys	7.7 $\pm$ 9.3	7.8 $\pm$ 9.4	7.2 $\pm$ 6.5	8.1 $\pm$ 11.4
Lys	88.1 $\pm$ 10.5	128.2 $\pm$ 8.6	124.3 $\pm$ 10.3	121.1 $\pm$ 11.6
Tyr	39.8 $\pm$ 8.6	40.5 $\pm$ 7.8	42.3 $\pm$ 9.5	39.3 $\pm$ 9.3
Met	33.1 $\pm$ 13.3	38.5 $\pm$ 7.7	40.1 $\pm$ 9.2	37.5 $\pm$ 6.9
Val	88.4 $\pm$ 10.7	96.1 $\pm$ 10.7	91.4 $\pm$ 8.7	94.5 $\pm$ 8.8
Ile	31.5 $\pm$ 8.9	81.8 $\pm$ 8.8	78.2 $\pm$ 9.2	82.5 $\pm$ 10.9
Leu	77.6 $\pm$ 9.7	117.5 $\pm$ 10.8	121.3 $\pm$ 8.9	115.9 $\pm$ 9.3
Phe	57.7 $\pm$ 12.3	77.3 $\pm$ 8.8	77.6 $\pm$ 11.5	73.4 $\pm$ 11.5

2.2 方法学考察

2.2.1 线性范围、回归方程、相关系数和检出限

对 1.1 节配制的系列浓度的标准溶液进行衍生并测定,采用峰保留时间比较法和叠加法定性,外标法定量。以氨基酸溶液的浓度 $X(\mu\text{mol/L})$ 为横坐标,峰面积 $Y(V \cdot s)$ 为纵坐标,得到 17 种氨基酸的回归方程。由表 2 可见,在 5.0 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,氨基酸的峰面积与其浓度的线性关系良好,相关系数为 0.995 0 ~ 0.999 7。以 3 倍信噪比 ($S/N > 3$) 计方法的检出限,结果见表 2。

表 2 17 种氨基酸的线性回归方程、相关系数及检出限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients (r^2) and limits of detection (LOD, $S/N > 3$) of the 17 amino acids

Amino acid	Regression equation	r^2	LOD/ ($\mu\text{mol/L}$)
His	$Y = 2.86355X + 15.4439$	0.9984	4.04
Ser	$Y = 2.16171X + 18.5736$	0.9975	1.23
Arg	$Y = 2.07843X + 12.2512$	0.9964	1.16
Gly	$Y = 2.64123X + 27.6239$	0.9984	0.94
Asp	$Y = 2.29364X + 30.4333$	0.9993	2.12
Glu	$Y = 2.31342X + 42.0562$	0.9969	1.86
Thr	$Y = 2.73902X + 17.1857$	0.9957	1.92
Ala	$Y = 2.46467X + 57.014$	0.9950	1.55
Pro	$Y = 2.45521X + 15.5429$	0.9961	1.97
Cys	$Y = 2.74757X + 1.4735$	0.9973	3.16
Lys	$Y = 3.63593X + 71.6702$	0.9961	1.85
Tyr	$Y = 4.38904X + 20.0554$	0.9986	3.41
Met	$Y = 3.37841X + 13.2625$	0.9975	2.37
Val	$Y = 3.01242X + 66.6188$	0.9974	2.18
Ile	$Y = 2.93383X + 46.3579$	0.9994	3.28
Leu	$Y = 2.96082X + 30.0627$	0.9974	2.87
Phe	$Y = 3.34423X + 26.0686$	0.9997	1.53

Y : peak area; X : concentration, $\mu\text{mol/L}$. Linear range: 5.0 – 1000 $\mu\text{mol/L}$.

2.2.2 回收率和精密度

从同一来源的鱼卵样品中取 24 份样品,每份 200 mg,其中 21 份平均分为 3 组,每组样品分别加入 100、500、750 $\mu\text{mol/L}$ 的混合标准溶液;剩余的 3 份样品中加入与混合标准溶液等体积的缓冲液作为对照;按所建立的方法对样品进行处理及测定,考察 17 种氨基酸的加标回收率,结果见表 3。由表 3 可见,在上述 3 个加标水平下,17 种氨基酸的回收率在 75.4% ~ 107.3% 之间,相对标准偏差 (RSD) 在

表 3 鱼卵中 17 种氨基酸的加标回收率及精密度 ($n=7$)

Table 3 Recoveries and precisions of the 17 amino acids spiked in fish eggs ($n=7$)

Amino acid	Spiked at 100 $\mu\text{mol/L}$		Spiked at 500 $\mu\text{mol/L}$		Spiked at 750 $\mu\text{mol/L}$		%
	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	
His	77.9	7.84	79.3	3.17	88.6	3.68	
Ser	83.7	2.39	86.2	2.19	76.9	7.49	
Arg	92.7	11.5	79.5	8.32	82.1	3.67	
Gly	75.4	8.74	88.3	9.27	84.3	5.39	
Asp	89.8	4.13	78.1	5.38	77.2	8.94	
Glu	78.7	6.97	92.7	4.43	80.7	5.71	
Thr	97.2	5.88	83.6	3.59	75.8	10.3	
Ala	93.1	9.57	77.9	9.23	88.1	3.18	
Pro	107.0	7.84	104.0	9.27	91.4	8.47	
Cys	84.6	6.39	86.8	9.55	79.3	9.56	
Lys	102.0	5.16	92.4	4.05	84.6	9.36	
Tyr	79.4	3.71	76.1	10.3	105.2	12.3	
Met	86.1	8.53	88.3	9.45	90.8	6.58	
Val	93.5	3.67	76.9	8.37	103.6	7.38	
Ile	88.1	6.62	93.6	4.83	77.5	8.52	
Leu	95.4	5.82	84.8	5.79	82.6	3.96	
Phe	77.9	7.88	92.7	3.54	107.3	4.85	

2.19%~12.3% 之间。可见该方法具有较高的回收率和较好的精密度,可以满足检测鱼卵中 17 种氨基

酸含量的需要。在优化条件下得到的 17 种氨基酸混合标准溶液(250 μmol/L)的色谱图见图 2。

图 2 17 种氨基酸混合标准溶液(250 μmol/L)的色谱图

Fig. 2 Chromatographic separation of the 17 amino acid solution (250 μmol/L)

Peak identifications; 1. His; 2. Ser; 3. Arg; 4. Gly; 5. Asp; 6. Glu; 7. Thr; 8. Ala; 9. Pro; 10. Cys; 11. Lys; 12. Tyr; 13. Met; 14. Val; 15. Ile; 16. Leu; 17. Phe.

2.3 实际样品测定

在产卵孵化季节随机采集正常养殖的史氏鲟、达氏鳇和小体鲟鱼卵,按照所建立的方法检测其中 17 种氨基酸的含量,结果如表 4 所示。

表 4 史氏鲟、达氏鳇和小体鲟鱼卵中氨基酸的含量(n=6)

Table 4 Contents of amino acids in eggs of *Acipenser schrenckii*, *Huso dauricus* and *Acipenser ruthenus* (n=6)

mmol/kg

Amino acid	<i>Acipenser schrenckii</i>	<i>Huso dauricus</i>	<i>Acipenser ruthenus</i>
His	35.6±9.2	33.1±8.4	44.1±7.3
Ser	68.0±8.5	76.2±5.3	85.0±6.3
Arg	61.0±5.3	50.6±7.4	72.8±7.8
Gly	100.2±7.7	84.7±9.5	126.7±8.8
Asp	104.9±7.2	94.5±6.2	119.9±5.6
Glu	161.3±8.1	143.1±6.5	172.8±7.3
Thr	73.7±6.4	60.0±4.3	91.4±11.6
Ala	96.8±8.7	66.6±9.6	116.9±7.6
Pro	50.6±10.2	58.2±6.8	44.3±9.4
Cys	6.1±9.2	13.5±8.4	7.8±9.4
Lys	120.0±8.6	99.4±6.8	128.2±8.6
Tyr	37.8±7.5	54.1±6.3	40.5±7.8
Met	35.7±9.1	45.6±8.5	38.5±7.7
Val	86.7±8.7	74.7±6.6	96.1±10.7
Ile	68.7±8.5	49.7±6.9	81.7±8.8
Leu	105.3±7.5	96.6±9.3	117.5±10.8
Phe	63.6±7.3	56.3±9.7	77.3±8.8

由检测结果看,鲟鳇鱼卵内含有必需的人类必需的 7 种氨基酸,分别为苏氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和缬氨酸,除蛋氨酸的含量是史氏鲟>达氏鳇>小体鲟外,其余 6 种必需氨基酸的含量是小体鲟>史氏鲟>达氏鳇。蛋白质是鱼卵营养组成的主体,而蛋白质又是由氨基酸组成的,因此,氨基酸含量的高低也就决定了其营养价值及营养状况。因此,从营养价值来看,小体鲟的鱼卵营养

价值最高,其次为史氏鲟,最低的为达氏鳇。

3 结论

本研究采用柱前衍生 UPLC-PDA 法,建立了 3 种鲟鳇鱼卵中 17 种氨基酸的快速分析方法。结果表明,本方法在 5.0~1 000 μmol/L 范围内呈现良好的线性关系,检出限在 0.94~4.04 μmol/L 之间;3 个添加水平下鱼卵中氨基酸的回收率在 75.4%~107.3% 之间,RSD 在 2.19%~12.3% 之间,完成一次分析仅需 10 min。应用该方法测定了 3 种鲟鳇鱼卵中 17 种氨基酸的含量。该方法进一步应用于水生生物的疾病诊断及营养状况评估方面的研究值得关注和深入探讨。

参考文献:

[1] Zhang L R, Jiang G R. Journal of Suzhou University: Natural Science Edition (张露蓉,江国荣.苏州大学学报:自然科学版),2004,20(3):65

[2] Ma H W, Zhang H J, Dong G Z, et al. Journal of China Medical University (麻宏伟,张海娟,董贵章,等.中国药科大学学报),2003,32(1):76

[3] Gu W G, Zhang J J, Xin M, et al. Chinese Journal of Chromatography (顾伟钢,张进杰,辛梅,等.色谱),2011,29(10):1041

[4] Yu S X, Feng S, Sun Y S, et al. Chinese Journal of Chromatography (于淑新,冯思,孙元社,等.色谱),2011,29(3):239

[5] Wang G, Lei C H, Sun W W, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (王刚,雷长海,孙巍巍,等.分析试验室),2007,26(12):91

[6] Zhang C Y, Li Y J, Hao X J, et al. Chinese Journal of Applied Chemistry (张春雨,李英杰,郝秀菊,等.应用化学),2011,28(11):1340

[7] Naz S, Sang W B, Bong C C, et al. J Chromatogr B, 2008, 865(1/2):18

[8] Wang Y H, Li P B, Deng B N, et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (王永辉, 李培兵, 邓炳楠, 等. 中国卫生检验杂志), 2009, 19(11): 2547

[9] Yu H, Mou S F. Journal of Instrumental Analysis (于泓, 牟世芬. 分析测试学报), 2007, 26(6): 862

[10] Zampolli M G, Basaglia G, Dondi F, et al. J Chromatogr A, 2007, 1150(1/2): 162

[11] Hannelore K, Katja D, Wolfram G, et al. J Chromatogr B, 2008, 870(2): 222

[12] Mansingraj S N, Sandeep R P, Nilesh V P, et al. Food Chem, 2012, 134(4): 2565

[13] Tang X X, Gu Y, Cai S, et al. Chinese Journal of Chromatography (汤新星, 顾源, 蔡尚, 等. 色谱), 2012, 30(7): 696

[14] Ulrike H, Berthold K, Wolfgang P. J Chromatogr B, 2011, 879(7/8): 495

[15] GB/T 5009.124-2003

[16] Ding Y S, Mou S F. Chinese Journal of Chromatography (丁永胜, 牟世芬. 色谱), 2004, 22(3): 210

[17] Luo X J, Wu Z P, Huang L Q, et al. Chinese Traditional and Herbal drugs (罗晓健, 吴志鹏, 黄璐琦, 等. 中草药), 2005, 36(4): 630

[18] Cohen S A, Michaud D P. Anal Biochem, 1993, 211(2): 279