李晓庆,蔡颖,潘思轶,等. 氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法检测柑橘中游离氨基酸 [J].华中农业大学学报,2020,39(2):122-132.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.02.016

氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法检测柑橘中游离氨基酸

李晓庆,蔡颖,潘思轶,李秀娟

华中农业大学食品科学技术学院,武汉 430070

摘要　采用单因素试验法对氯甲酸异丁酯二次衍生条件进行优化,并建立了 1 种柑橘果肉中 18 种游离氨基酸的气相色谱定量检测方法。结果显示:当吡啶、异丁醇、第 1 次氯甲酸异丁酯和第 2 次氯甲酸异丁酯加入量分别为 20、120、50 和 50 μL,萃取溶剂为二氯甲烷时,氨基酸衍生效果最佳;18 种氨基酸在其对应范围内线性关系良好,相关系数 R^2 均大于 0.99,检测限在 0.02～0.35 μg/mL,5 次重复试验相对标准偏差不超过 10.57%;5 种柑橘提取液样品的加标回收率均在 72.82%～132.97%。该方法简便、准确、重现性好、成本低,衍生物稳定,可以用于柑橘果肉中 18 种游离氨基酸的检测。

关键词　柑橘;游离氨基酸;氯甲酸异丁酯;二次衍生;超声提取;气相色谱;定量检测

中图分类号　TS 207.3;TS 255.2　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-2421(2020)02-0122-11

柑橘具有很高的营养价值,氨基酸种类丰富且含量高[1-2]。柑橘品种繁多,分析测定不同品种以及不同生长期和贮藏条件下氨基酸的种类与含量,可为人体合理摄入氨基酸及柑橘的加工利用提供依据。

目前,氨基酸的检测方法主要有液相色谱法[3-5]、气相色谱法[6-7]、毛细管电泳法[8-9]、氨基酸自动分析仪[10-11]等。其中,气相色谱法具有衍生物稳定、分辨率高、操作简便、运行成本低、分析时间短等优点。因为氨基酸结构中含有氨基和羧基,极性较强,所以采用气相色谱法检测氨基酸时要先进行衍生,降低氨基酸的极性以满足检测的需求。常用的衍生化试剂主要有硅烷化试剂和烷基氯甲酸酯类试剂等。一般来说,烷基氯甲酸酯类衍生氨基酸操作简便、条件温和并且成本较低,对极性官能团如—NH_2、—COOH 和酚羟基具有高选择性,在衍生化反应过程中比硅烷化衍生具有较少的基质效应[12]。近年来,Yang 等[13]、Qiu 等[14]和王桂臻等[15]提出基于氯甲酸乙酯的二次衍生方法,即在调节 pH 前后分 2 次加入衍生化试剂,基本原理是在衍生反应过程中当氨基酸的羧基变成酯或者钠盐后,氨基的化学反应性能得到加强,易和酰氯反应。若将 pH 调为弱碱性,氨基酸的氨基与酰氯更易发生反应,从而增加衍生物的种类与浓度,可以使多种氨基酸同时衍生并检测[15]。有研究表明,气相色谱对氯甲酸异丁酯(isobutyl chloroformate,IBCF)衍生物的灵敏度比氯甲酸乙酯衍生物更高[16],但是采用氯甲酸异丁酯二次衍生的报道很少。

目前采用气相色谱法检测游离氨基酸的研究对象主要是生物样本[17-18],这些样品与柑橘在氨基酸含量上存在很大差异,导致之前研究的方法条件无法适用于柑橘样品,而采用气相色谱法检测柑橘中游离氨基酸的文献也很少报道。本研究采用单因素试验对氯甲酸异丁酯二次衍生条件进行优化,建立了 1 种柑橘果肉中 18 种游离氨基酸的气相色谱定量检测方法,以期为柑橘中游离氨基酸的测定提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

浓盐酸、二氯甲烷、吡啶、异丁醇购自国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯;天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸

收稿日期:2019-09-25
基金项目:湖北省农业科技创新岗位项目(201962000000131)
李晓庆,硕士研究生. 研究方向:食品科学. E-mail:1535678395@qq.com
通信作者:李秀娟,博士,教授. 研究方向:食品品质与安全. E-mail:lixiujuan@mail.hzau.edu.cn

(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、色氨酸(Trp)标准品均购自Biosharp生物科技公司(纯度均≥98.5%)；IBCF(分析纯)购自阿拉丁试剂公司；脐橙、胡柚、柠檬、沃柑、湖南蜜桔均购自武汉当地水果超市。

1.2　仪器与设备

SP-7890 型气相色谱仪(配置氢火焰离子化检测器，FID)，山东鲁南瑞虹化工有限公司；N2000 色谱数据工作站，浙江大学智达信息工程有限公司；SE-54 毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm)，兰州中科安泰分析科技有限公司；CT-1 型氮氢空气发生器，武汉科林普丰仪器有限公司；KQ-300DE 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；TG-16G 型离心机，上海安亭仪器有限公司；QL-861 型漩涡混合器，江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司；JYL-C022E 型九阳料理机，九阳股份有限公司；微量进样器，上海高鸽工贸有限公司；DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器，武汉德力祥仪器设备有限公司。

1.3　试验方法

1)柑橘样品处理方法。将新鲜柑橘用蒸馏水洗净、晾干，取去籽后的果肉打浆，冻干并粉碎，置于－18 ℃下密封保存，备用。

2)氨基酸标准溶液的配制。精确称取各氨基酸标准品 10 mg，置于 10 mL 容量瓶中，分别加入 0.1 mol/L 盐酸溶液，制备成 1 mg/mL 的混合标准储备溶液。使用时用 0.1 mol/L 盐酸逐级稀释成所需浓度的标准工作液，于 4 ℃储存。

3)气相色谱条件。以高纯氮气为载气，柱头压 0.055 MPa，空气 0.095 MPa，氢气 0.065 MPa，尾吹气 0.075 MPa，分流进样，分流比为 20∶1。柱炉程序升温：初始温度 100 ℃，以 15 ℃/min 升温至 200 ℃，以 6 ℃/min 升温至 300 ℃，保持 4 min。进样口温度 280 ℃，FID 检测器温度 300 ℃。

4)氨基酸标准溶液的衍生化操作。取 1 mL 氨基酸混标溶液于 4 mL 离心管中，依次加入 20 μL 吡啶、120 μL 异丁醇、50 μL 氯甲酸异丁酯(IBCF)，超声 2 min，然后加入 500 μL 二氯甲烷，涡旋 1 min，静置 3 min，在 3 000 r/min 下离心5 min。向上层溶液中加入 7 mol/L 氢氧化钠溶液 100 μL 调节溶液 pH，再加入 50 μL IBCF，超声2 min，加入 500 μL 二氯甲烷，涡旋 1 min，静置3 min，以 3 000 r/min 离心 5 min。取出下层溶液置于－18 ℃下冷冻，待残留水冷冻成固体冰状后，快速取出液体状有机相，在 50 ℃下氮气吹干浓缩，用 50 μL 二氯甲烷复溶，取 1 μL 进样。

5)柑橘果肉中游离氨基酸的提取与衍生化操作。参照 Vieira 等[19]与彭真汾等[20]的游离氨基酸提取方法，取 30 mg 冻干果肉粉末置于 5 mL 离心管中，按 1∶50 的料液比加入 0.1 mol/L 盐酸溶液进行第 1 次萃取，密封并放置在超声仪中，在 270 W、25 ℃条件下超声 30 min，再 5 000 r/min 离心 5 min，收集上清液；采用相同体积的萃取剂进行第 2 次萃取，涡旋 3 min，并放置在超声仪中于 270 W、25 ℃条件下超声 10 min。将第 1 次和第 2 次离心的上清液混合，用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至 5 mL。取 1 mL 氨基酸溶液样品按照本文“1.3 4)”方法自“取 1 mL 氨基酸混标溶液”起操作，制备样品衍生化溶液。

6)稳定性试验。将氨基酸标准溶液按照本文“1.3 4)”衍生方法操作，制备衍生化产物，以 300 μL 二氯甲烷复溶，加入邻苯二甲酸二乙酯作为内标物，储存于－18 ℃下。分别于贮存 0、8、12 和 24 h 取样检测，记录各氨基酸的峰面积与内标物峰面积。

7)线性关系考察及检测限、定量限测定。配制一系列的氨基酸混合标准溶液，使其质量浓度分别为 200.00、100.00、50.00、25.00、5.00、1.00、0.25 μg/mL，经过衍生化处理后进行气相色谱分析，以各氨基酸溶液的质量浓度为横坐标，以各组分色谱峰面积为纵坐标，分别绘制各组分的标准曲线，进行线性回归，求得回归方程和相关系数，根据 3δ/S 和 10δ/S 分别得出方法的检测限(LOD)和定量限(LOQ)。

8)重复性试验。取 5.00 μg/mL 氨基酸混合标准溶液 5 份，每份 1 mL，按本文“1.3 4)”方法制备混合标准品衍生化溶液，按本文“1.3 3)”气相色谱条件测定峰面积，根据各组分峰面积计算 18 种氨基酸峰面积的相对标准偏差(RSD)。

9)加标回收率试验。采用上述标准曲线分别计算脐橙、胡柚、柠檬、沃柑、湖南蜜桔果肉提取液中各游离氨基酸含量。在 1 mL 各提取物中加入 20 μL 质量浓度为 50 μg/mL 的氨基酸混合标准溶液，根据标准曲线计算各样品的回收率和 RSD。

10)氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法与茚三酮-紫外分光光度法的氨基酸检测结果对比。分别

配制质量浓度为60 μg/mL的缬氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、组氨酸标准溶液，采用氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法检测各氨基酸的质量浓度并计算衍生率(衍生率＝检测浓度/样品实际浓度)，与文献[21-22]中茚三酮-紫外分光光度法检测结果进行对比。

2 结果与分析

2.1 氨基酸混合标准溶液的衍生条件优化

烷基氯甲酸酯类作为衍生化试剂，提高了采用气相色谱法检测复杂基质如果酱、果汁和药物制剂[23]中氨基酸的适用性，特别对水相体系具有独特的优势。然而此方法的最大缺点是无法对精氨酸进行定性定量分析，精氨酸由于其胍基的亚氨基不被衍生而不可逆地吸附在色谱柱上[24-25]。另外，谷氨酰胺衍生后会出现2个色谱峰，目前无法对其进行定量分析，只能进行定性鉴别。

图1显示了氨基酸在吡啶、异丁醇和IBCF存在下衍生的过程。为了达到最优的衍生化状态，需要对影响氨基酸衍生的因素如IBCF、吡啶、异丁醇的加入量以及萃取溶剂的种类等条件进行优化。

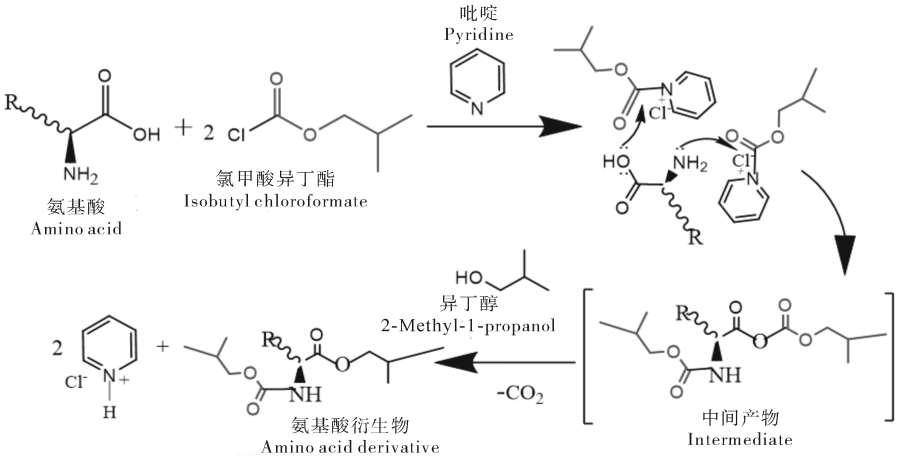
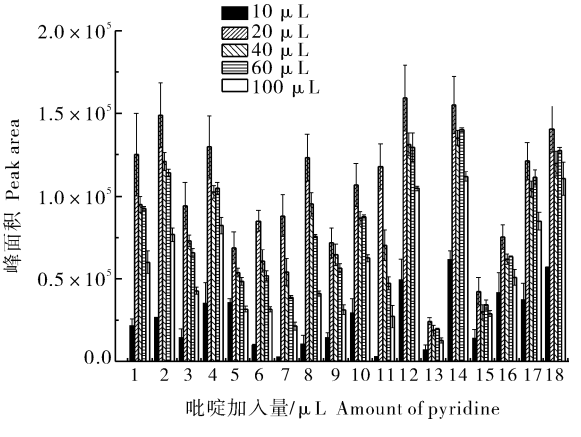


图1 在吡啶和异丁醇存在下用氯甲酸异丁酯衍生氨基酸的示意图

Fig.1 Schematic diagram of derivatization of amino acid with isobutyl chloroformate in the presence of pyridine and 2-methyl-1-propanol

1)吡啶加入量的优化。吡啶是衍生化反应的催化剂，考察了不同吡啶加入量对氨基酸标准溶液衍生的影响(图2)。其他条件：异丁醇加入量为80 μL，第1次和第2次IBCF加入量均为50 μL，18种氨基酸质量浓度均为50 μg/mL。随着吡啶加入量的增加，18种氨基酸衍生物的生成量大幅度增加；当吡啶加入量为20 μL时，所有的氨基酸都达到最大转化率；随着吡啶加入量继续增加，衍生物的峰面积反而下降，这可能是吡啶与氨基酸发生了反应，干扰了正常的衍生化反应进程。因此，确定吡啶加入量为20 μL。

2)异丁醇加入量的优化。考察了异丁醇加入量对氨基酸衍生的影响(图3)。随着异丁醇加入量的增加，所有氨基酸的衍生量均增加，衍生反应逐步趋于完全，但之后衍生物的峰面积开始下降，推测是异丁醇加入量过高后，衍生物在水中的溶解度增大，导致二氯甲烷萃取的衍生物开始减少。当异丁醇加入量为120 μL时，几乎所有氨基酸的衍生量达到最



1.丙氨酸 Ala；2.甘氨酸 Gly；3.缬氨酸 Val；4.亮氨酸 Leu；5.异亮氨酸 Ile；6.苏氨酸 Thr；7.丝氨酸 Ser；8.脯氨酸 Pro；9.天冬酰胺 Asn；10.甲硫氨酸 Met；11.天冬氨酸 Asp；12.苯丙氨酸 Phe；13.谷氨酸 Glu；14.半胱氨酸 Cys；15.赖氨酸 Lys；16.组氨酸 His；17.色氨酸 Trp；18.酪氨酸 Tyr。下同。The same as below.

图2 吡啶加入量对氨基酸标准溶液衍生的影响

Fig.2 Effects of amount of pyridine on derivatization of amino acids standard solution

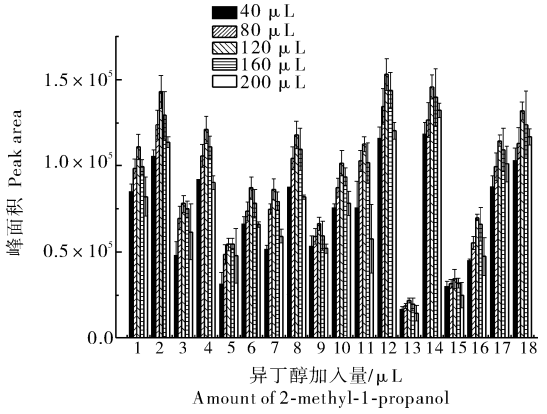


图 3　异丁醇加入量对氨基酸标准溶液衍生的影响

Fig.3　Effects of amount of 2-methyl-1-propanol on derivatization of amino acids standard solution

大，仅异亮氨酸的衍生量在异丁醇加入量为 120 和 160 μL 时相差不明显。因此，选择异丁醇加入量为 120 μL。

3)第 1 次 IBCF 加入量的优化。本研究是基于 IBCF 的二次衍生，即衍生化的过程中在调节 pH 前后分 2 次加入衍生化试剂。调节 pH 前主要是羧基衍生，pH 调成弱碱性后氨基的衍生量更大。

考察第 1 次 IBCF 加入量对氨基酸标准溶液的影响(图 4)。随着 IBCF 加入量的逐渐增加，大多数氨基酸的衍生量呈先增加后下降的趋势，后期衍生物的峰面积逐渐减小，这可能是衍生反应生成的副产物增多干扰了衍生化反应。当 IBCF 加入量为 50 μL 时，大多数氨基酸的衍生量达到最高值；当 IBCF 加入量为 50 和 70 μL 时，丙氨酸、亮氨酸和甲硫氨酸这 3 种氨基酸的衍生量大致相等；当 IBCF 加入量为 70 μL 时，天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和组氨酸

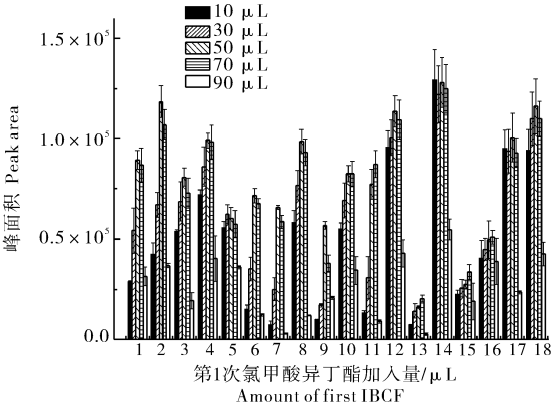


图 4　第 1 次 IBCF 加入量对氨基酸标准溶液衍生的影响

Fig.4　Effects of amount of first IBCF on derivatization of amino acids standard solution

这 4 种氨基酸的衍生量达到最高值。综合考虑，确定第 1 次 IBCF 的加入量为 50 μL。

4)第 2 次 IBCF 加入量的优化。由图 5 可见，当第 2 次 IBCF 加入量为 50 μL 时，大部分氨基酸的衍生量达到最高值；当 IBCF 加入量为 50 和 30 μL 时，谷氨酸和赖氨酸这 2 种氨基酸的衍生量相等；当 IBCF 加入量为 70 μL 时，半胱氨酸的衍生量达到最高值。综合考虑，确定第 2 次 IBCF 加入量为 50 μL。

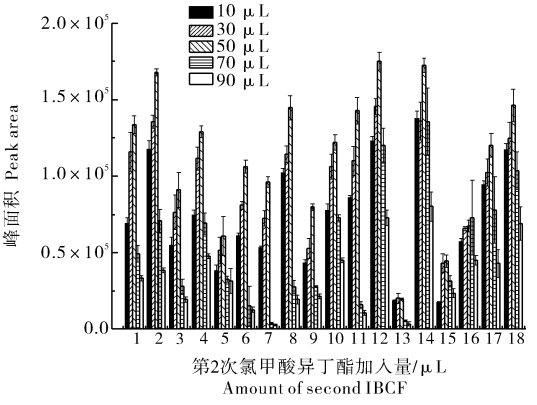


图 5　第 2 次 IBCF 加入量对氨基酸标准溶液衍生的影响

Fig.5　Effects of amount of second IBCF on derivatization of amino acids standard solution

5)萃取溶剂的选择。比较了氯仿和二氯甲烷对衍生物的萃取效果(图 6)。除缬氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和色氨酸之外，对于其他 13 种氨基酸，二氯甲烷的萃取效果优于氯仿。因此，选择二氯甲烷作为萃取溶剂。

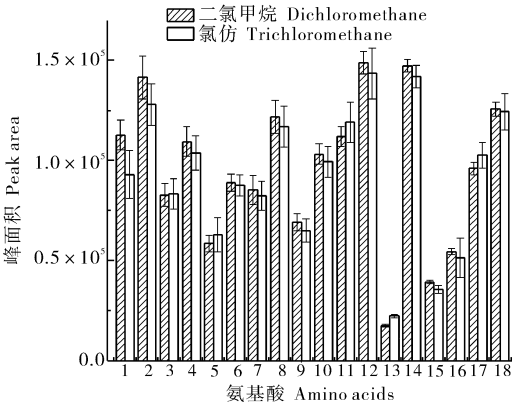


图 6　不同萃取溶剂对氨基酸标准溶液衍生的影响

Fig.6　Effects of different extraction solvents on the derivatization of amino acids standard solution

2.2　氨基酸衍生物的稳定性

图 7 反映了衍生物在 24 h 内的稳定性。从图 7 可见，各目标色谱峰与内标物的色谱峰面积比值在 24 h 内均无明显变化，表明氨基酸的衍生物在 24 h

内是稳定存在的。此结果与 Qiu 等[14]报道的氯甲酸乙酯衍生物的稳定性一致。

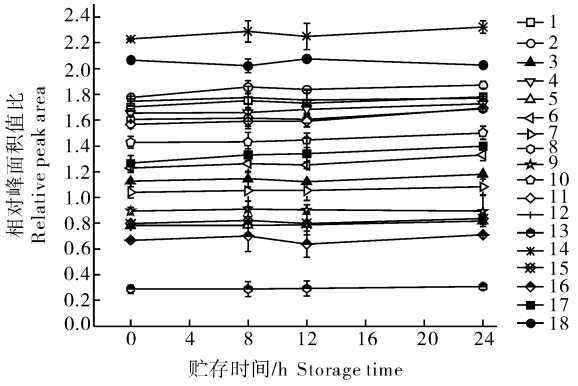


图7 18种氨基酸衍生物的稳定性

Fig.7 Stability of eighteen amino acids derivatives

2.3 氨基酸混合标准溶液的线性关系、检测限、定量限和RSD

采用氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法分析游离氨基酸标准溶液，得到标准曲线方程、线性范围、LOD、LOQ和RSD等测定结果(表1)。

酪氨酸和半胱氨酸在0.25～50.00 μg/mL内线性关系良好，线性相关系数大于0.999，甘氨酸、亮氨酸、脯氨酸和甲硫氨酸具有更宽的线性范围，在0.25～200.00 μg/mL内线性关系良好，线性相关系数均大于0.99，除此之外的其他氨基酸在质量浓度0.25～100 μg/mL内具有良好的线性关系。王桂臻等[15]采用二次衍生方法检测生物样本中的氨基酸线性范围大部分为0.5～20.0 μg/mL，考虑到柑橘样品中氨基酸种类丰富，含量差异大，优化衍生条件是十分必要的。所有氨基酸的检测限在0.02～0.35 μg/mL内灵敏度均较高。

在氨基酸质量浓度为5 μg/mL进行5次重复试验，试验所得RSD在3.46%～10.57%，表明方法重复性好。

表1 18种氨基酸的线性关系、检测限、定量限和RSD

Table 1 The linear relation, LOD, LOQ and RSD of 18 amino acids

氨基酸 Amino acids	标准曲线方程 Standard curve equation	线性相关系数 R^2	线性范围/(μg/mL) Linear range	检测限/(μg/mL) LOD	定量限/(μg/mL) LOQ	RSD/%
丙氨酸 Ala	$y=1481.5x-484.39$	0.997 8	0.25～100.00	0.05	0.16	8.02
甘氨酸 Gly	$y=1806.2x-2985.1$	0.999 2	0.25～200.00	0.06	0.20	8.57
缬氨酸 Val	$y=1179.7x-755.54$	0.995 2	0.25～100.00	0.10	0.33	4.98
亮氨酸 Leu	$y=1462.4x+84.921$	0.999 7	0.25～200.00	0.08	0.25	7.74
异亮氨酸 Ile	$y=910.38x-1246.4$	0.996 2	0.25～100.00	0.15	0.51	4.73
苏氨酸 Thr	$y=1517.8x-752.58$	0.999 6	0.25～100.00	0.07	0.22	7.78
丝氨酸 Ser	$y=1363.7x-1561.1$	0.994 3	0.25～100.00	0.07	0.22	6.40
脯氨酸 Pro	$y=1577.7x-931.4$	0.999 6	0.25～200.00	0.06	0.21	7.23
天冬酰胺 Asn	$y=982.23x-40.943$	0.999 5	0.25～50.00	0.02	0.08	10.57
甲硫氨酸 Met	$y=1454.5x-52.101$	0.995 0	0.25～200.00	0.14	0.47	7.87
天冬氨酸 Asp	$y=1674.6x+153.1$	0.999 8	0.25～100.00	0.07	0.23	9.70
苯丙氨酸 Phe	$y=2150.4x-1817.6$	0.997 1	0.25～100.00	0.02	0.07	7.23
谷氨酸 Glu	$y=294.46x+55.44$	0.999 8	0.25～100.00	0.35	1.16	3.46
半胱氨酸 Cys	$y=2542.7x-326.03$	0.996 4	0.25～50.00	0.07	0.22	7.75
赖氨酸 Lys	$y=865.93x+820.38$	0.999 3	0.25～100.00	0.09	0.31	10.13
组氨酸 His	$y=1051.6x+626.2$	0.999 5	0.25～100.00	0.04	0.13	4.66
色氨酸 Trp	$y=2610.6x-5459.2$	0.995 6	0.25～100.00	0.11	0.35	10.19
酪氨酸 Tyr	$y=2582.6x+530.35$	0.999 0	0.25～50.00	0.05	0.17	9.60

2.4 5种加标柑橘果肉提取液中游离氨基酸的回收率及RSD

5种加标柑橘果肉提取液中游离氨基酸的回收率和RSD测定结果见表2。除个别回收率超过120%，5种样品中大部分氨基酸的回收率均在70%～120%，RSD在0.27%～15.67%(除胡柚样品的半胱氨酸RSD为19.70%)。

2.5 氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法与其他参考文献中氨基酸检测方法对比

比较了氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法与其他文献方法中氨基酸检测方法的各项性能指标(表3)。与其他文献的方法相比，氯甲酸异丁酯二

表 2　5 种加标柑橘果肉提取液中游离氨基酸的回收率和 RSD

Table 2　Recoveries and RSD of free amino acids in the extract of five spiked orange samples

氨基酸 Amino acids	脐橙 Navel orange		柠檬 Lemon		胡柚 Grapefruit		湖南蜜桔 Hunan tangerine		沃柑 Wo mandarin	
	回收率/% Recovery	RSD/%	回收率/% Recovery	RSD/%	回收率/% Recovery	RSD/%	回收率/% Recovery	RSD/%	回收率/% Recovery	RSD/%
丙氨酸 Ala	101.16	2.98	114.72	0.27	110.76	3.86	110.51	3.95	118.78	3.29
甘氨酸 Gly	84.98	8.41	79.50	2.02	96.98	5.15	99.24	0.49	81.43	1.23
缬氨酸 Val	72.95	13.38	101.64	4.52	102.26	1.96	99.45	4.15	97.39	9.69
亮氨酸 Leu	95.13	6.17	108.15	2.70	90.06	4.57	84.77	2.81	74.04	4.52
异亮氨酸 Ile	107.68	1.93	84.90	10.44	99.31	5.97	94.03	6.69	91.67	9.82
苏氨酸 Thr	116.62	3.35	78.34	0.47	120.23	5.28	91.46	12.49	92.32	3.66
丝氨酸 Ser	125.00	10.76	77.52	2.56	113.04	9.00	121.25	0.49	86.33	2.59
脯氨酸 Pro	97.92	4.71	128.21	5.68	121.44	2.15	132.97	3.92	111.27	1.64
天冬酰胺 Asn	102.27	3.07	120.41	0.94	126.47	6.89	124.68	0.40	91.45	1.21
甲硫氨酸 Met	91.56	6.15	128.00	8.90	98.93	12.61	97.43	13.34	125.71	9.16
天冬氨酸 Asp	114.16	11.53	90.39	7.42	102.81	6.41	121.27	3.64	102.72	6.98
苯丙氨酸 Phe	74.79	15.67	82.34	1.11	91.33	7.53	121.25	0.59	72.82	0.99
谷氨酸 Glu	130.16	1.19	95.86	0.99	100.40	6.16	92.85	0.89	84.98	6.23
半胱氨酸 Cys	80.44	8.07	106.89	5.04	110.55	19.70	100.09	6.63	82.34	5.24
赖氨酸 Lys	114.59	7.35	99.28	0.55	88.63	2.45	116.99	0.65	126.96	0.63
组氨酸 His	103.65	0.49	89.48	13.97	99.68	6.69	122.70	1.82	114.30	6.33
色氨酸 Trp	103.66	4.38	97.46	11.26	123.35	14.10	83.38	5.62	73.87	10.11
酪氨酸 Tyr	101.95	3.98	93.73	4.67	106.85	5.94	94.62	7.84	112.06	2.13

表 3　本方法与其他参考文献中氨基酸检测方法对比

Table 3　Comparison of the proposed method with other methods reported in literatures for the determination of amino acids

方法 Method	样品 Sample	线性范围/(μg/mL) Linear range	检测限/(μg/mL) LOD	RSD/%	回收率/% Recovery	衍生时间/min Derivatization time	参考文献 Ref.
DLLME-SFO-GC/MS	烟丝 Tobacco	0.5～200.0	0.12～2.82	1.2～6.8	84.6～108.5	1	[26]
SPE/CE	血液 Blood	0.2～1.5	0.13～0.37	4.0～5.7	52.4～70.0	—	[27]
柱前衍生-HPLC Pre-column derivatization HPLC	茯苓 *Poria*	5.8～119.0	1.96～3.98	0.8～2.0	93.3～106.2	60	[28]
柱前衍生-RP-HPLC Pre-column derivatization-RP-HPLC	茶叶 Tea	0.004～1.000	0.4～300.0	0.36～15.38	90.3～105.4	10	[29]
UHPLC-Q-Orbitrap HRMS	血清、牛奶、肌肉 Serum, milk, muscle	0.1～500.0	血清和牛奶 Serum and milk 0.003～0.680 μmol/L，肌肉 muscle 0.003～0.270 nmol/g	<12.3	77.7～124.8	10	[30]
氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法 Isobutyl chloroformate second derivatization-gas chromatography	柑橘 Citrus	0.25～100.00	0.02～0.35	4.73～10.57	72.82～132.97	2	本文 This study

次衍生-气相色谱法具有更低的检测限 0.02～0.35 μg/mL，较短的衍生时间 2 min，同时 RSD 不超过 10.57%，衍生物在 24 h 内稳定，分析成本低。结果表明，本方法具有线性范围宽、重现性好、精密度高、检测限低、衍生快速、操作步骤简单、成本低的优点，能应用于不同种类的柑橘样品中氨基酸的分析。

2.6 5种柑橘果肉中游离氨基酸含量的检测

采用氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法对 5 种柑橘果肉中游离氨基酸含量进行检测，结果见表 4。本方法目前对精氨酸无法进行定性与定量分析，对谷氨酰胺只能进行定性鉴别。5 种柑橘中除柠檬之外都存在谷氨酰胺。

不同品种的柑橘中所含的游离氨基酸差异显著。脐橙中共检测到 16 种游离氨基酸，其中脯氨酸的含量高达 249.66 mg/100 g，占整个游离氨基酸总含量的71.6%。除脯氨酸之外，丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、丙氨酸和天冬氨酸的含量也较高。柠檬中检测到 16 种游离氨基酸，天冬酰胺的含量最大，达到 101.03 mg/100 g，其他含量较高的还有脯氨酸、谷氨酸、丙氨酸和丝氨酸。胡柚果肉中共检测到 17 种游离氨基酸，其中含量最高的也是天冬酰胺，为 72.12 mg/100 g，脯氨酸、天冬氨酸和谷氨酸含量均大于 10 mg/100 g，丙氨酸和丝氨酸含量也较高。湖南蜜桔中检测到 18 种游离氨基酸，比脐橙、柠檬和胡柚中的氨基酸种类要多，脯氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、丙氨酸和谷氨酸的含量较高。沃柑也检测到 18 种游离氨基酸，脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、丙氨酸和丝氨酸的含量较高。总之，5 种柑橘中含量较高的氨基酸是脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、丙氨酸和丝氨酸。此外，脐橙、湖南蜜桔和胡柚中还含有较多的天冬氨酸，胡柚、湖南蜜桔和沃柑中还含有丰富的赖氨酸。

在检测到的游离氨基酸中，脐橙的游离氨基酸总含量最高，为 348.74 mg/100 g，其次是湖南蜜桔，

表 4 5种柑橘果肉中 18 种游离氨基酸的含量

Table 4 The content of 18 free amino acids in 5 kinds of citrus pulp mg/100 g

氨基酸 Amino acids	脐橙 Navel orange	柠檬 Lemon	胡柚 Grapefruit	湖南蜜桔 Hunan tangerine	沃柑 Wo mandarin
丙氨酸 Ala	9.32	9.88	9.30	7.84	14.15
甘氨酸 Gly	2.05	1.47	1.80	1.85	1.76
缬氨酸 Val	1.56	1.06	1.85	1.21	1.60
亮氨酸 Leu	1.10	1.10	1.27	1.80	1.45
异亮氨酸 Ile	0.74	0.14	1.37	1.80	0.91
苏氨酸 Thr	4.55	1.33	3.42	4.17	3.28
丝氨酸 Ser	12.27	9.04	10.62	10.57	8.94
脯氨酸 Pro	249.66	29.79	17.44	64.73	104.19
天冬酰胺 Asn	41.18	101.03	72.12	169.35	46.86
甲硫氨酸 Met	—	4.81	—	—	—
天冬氨酸 Asp	8.64	—	16.56	22.21	4.43
苯丙氨酸 Phe	0.98	3.10	1.16	6.08	1.23
谷氨酸 Glu	10.41	51.46	17.00	13.45	19.14
半胱氨酸 Cys	3.43	—	1.39	1.97	0.84
赖氨酸 Lys	1.30	2.42	7.22	7.61	7.38
组氨酸 His	—	1.36	2.44	3.03	0.99
色氨酸 Trp	—	1.08	—	1.83	1.32
酪氨酸 Tyr	1.56	1.56	1.52	1.99	2.09
谷氨酰胺 Gln	+	—	+	+	+
总量 Total	348.74	220.63	166.50	321.49	220.57

注："—"表示未检测到；"+"表示可检测到谷氨酰胺出现 2 个色谱峰，但无法定量分析。Note："—"indicates none detected；"+" indicates that the two chromatographic peaks for glutamine are detected, but can't be quantitatively analyzed.

含量为 321.49 mg/100 g，再次是柠檬和沃柑，含量分别是 220.63 和 220.57 mg/100 g，含量最低的是胡柚(166.50 mg/100 g)。黄艳[31]通过氨基酸自动分析仪对新奇士脐橙与皇帝柑中游离氨基酸进行检测，检测结果分别为 309.65、218.63 mg/100 g；沈冬莲等[32]应用高效液相色谱法测定出桔子总游离氨基酸为 383.70 mg/100 g。本检测结果与文献相比相差不大，差异可能与提取方法、柑橘的品种和季节性有关。

总体来说，不同品种柑橘中游离氨基酸的含量存在差异，但总含量都很高且氨基酸种类丰富，应用本研究建立的方法能够满足不同品种柑橘果肉中游离氨基酸的检测。

2.7　氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法与茚三酮-紫外分光光度法的检测结果对比

如表 5 所示，采用茚三酮-紫外分光光度法检测 4 种氨基酸样品的质量浓度为 57.32～67.44 μg/mL，用氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法检测的氨基酸质量浓度为 59.35～60.87 μg/mL，2 种方法的分析结果无显著性差异(ANOVA 方差分析)；茚三酮-紫外分光光度法的衍生率为 95.53%～112.40%，本方法的衍生率为 98.91%～101.46%，表明在本试验条件下氨基酸完全衍生。

表 5　2 种检测方法下 4 种氨基酸样品的测定结果

Table 5　Results of four amino acids by two determination methods

氨基酸 Amino acids	茚三酮-紫外分光光度法 Indene-UV-spectrophotometry		氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法 Isobutyl chloroformate second derivatization-gas chromatography	
	质量浓度/(μg/mL) Mass concentration	衍生率/% Derivatization rate	质量浓度/(μg/mL) Mass concentration	衍生率/% Derivatization rate
缬氨酸 Val	59.11	98.52	60.46	100.76
天冬酰胺 Asn	67.44	112.40	59.35	98.91
苯丙氨酸 Phe	57.32	95.53	60.87	101.46
组氨酸 His	62.07	103.45	59.70	99.49

3　讨　论

气相色谱法检测氨基酸常用的衍生化试剂主要有硅烷化试剂和烷基氯甲酸酯类试剂。硅烷化试剂衍生氨基酸需要在非水介质中进行，而烷基氯甲酸酯类衍生化可以在水溶液中进行且衍生条件温和，其中应用较多的是氯甲酸乙酯[23]。研究表明，气相色谱法对氯甲酸异丁酯衍生物的灵敏度更高[16]。王桂臻等[15]在衍生过程中分 2 次加入衍生化试剂，且在第 2 次衍生化前调节 pH 可以同时衍生 20 种氨基酸。但是采用氯甲酸异丁酯二次衍生的文献报道还较少。

本试验建立了氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法用于检测柑橘果肉中 18 种游离氨基酸。该方法的检测限为 0.02～0.35 μg/mL，衍生时间为 2 min。Li 等[26]建立了分散液液微萃取-气相色谱-质谱法检测烟丝中的 11 种氨基酸，此方法为一次衍生，得到氨基酸的检测限为 0.12～2.82 μg/mL，衍生时间 1 min；陈蓉等[28]建立了柱前衍生-高效液相色谱法检测茯苓中 18 种氨基酸的检测限为 1.96～3.98 μg/mL，衍生时间 60 min；孔谦等[29]建立了柱前衍生-反相高效液相色谱法检测茶叶中 19 种氨基酸的检测限为 0.4～300.0 μg/mL，衍生时间 10 min。与上述文献相比，本方法具有更低的检测限 0.02～0.35 μg/mL，较短的衍生时间 2 min，同时 RSD 不超过 10.57%，衍生物在 24 h 内稳定，分析成本低。

目前，有关柑橘中游离氨基酸检测的文献报道不多，本研究的检测结果与黄艳[31]通过氨基酸自动分析仪检测新奇士脐橙、皇帝柑中游离氨基酸的结果及沈冬莲等[32]应用高效液相色谱法测定桔子中游离氨基酸的结果相近。但本方法还无法对精氨酸定性分析和谷氨酰胺定量分析，有待进一步研究。

参考文献 References

[1]　陈源，余亚白，钱爱萍，等.柑橘果实不同部位氨基酸的测定与分析[J].山地农业生物学报，2012，31(5)：389-392. CHEN Y，YU Y B，QIAN A P，et al. Determination of amino acids in different parts of citrus fruit[J]. Journal of mountain agriculture

and biology,2012,31(5):389-392(in Chinese with English abstract).

[2] 何莎莎. 不同类型柑橘果实氨基酸组成分析及“三度”法营养价值评价[D].重庆:西南大学,2018. HE S S. The analysis of amino acid composition of different types of citrus fruits and evaluation of nutritional value with “Three Degree” method [D]. Chongqing:Southwest University,2018(in Chinese with English abstract).

[3] 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 P,WANG W,YE Q H,et al. Quantitative analysis of amino acids in Chinese olive using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J].Food science,2018,39(24):231-238(in Chinese with English abstract).

[4] 唐晓雷,何慧楠,赵悦名,等.不同等级的梅花鹿鹿茸药材中氨基酸含量的柱前衍生-高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2019,30(3):560-563. TANG X L,HE H N,ZHAO Y M,et al. Pre-column derivatization-HPLC was used to determine amino acid levels in different grades of sika deer antler[J]. Lishizhen medicine and materia medica research,2019,30(3):560-563(in Chinese with English abstract).

[5] DU Y Q,XIA L,XIAO X H,et al. A simple one-step ultrasonic-assisted extraction and derivatization method coupling to high-performance liquid chromatography for the determination of ε-aminocaproic acid and amino acids in cosmetics[J/OL]. Journal of chromatography A,2018,1554:37-44(2018-06-15)[2019-09-25]. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.021.

[6] NAMERA A,YASHIKI M,NISHIDA M,et al. Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry[J]. Journal of chromatography B,2002,776(1):49-55.

[7] AZEVEDO M S,TISCHER SERAGLIO S K,ROCHA G,et al. Free amino acid determination by GC-MS combined with a chemometric approach for geographical classification of bracatinga honeydew honey(*Mimosa scabrella*,Bentham) [J/OL]. Food control,2017,78:383-392(2017-08)[2019-09-25]. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.008.

[8] 丁红梅,葛尔宁,许家栋. 高效毛细管电泳测定中药地龙中氨基酸含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):117-120. DING H M,GE E N,XU J D. High performance capillary electrophoresis determination of amino acids in *Pheretima* [J]. Chinese journal of experimental traditional medical formulae,2013,19(2):117-120(in Chinese with English abstract).

[9] PRIOR A,COLIVA G,DE JONG G J,et al. Chiral capillary electrophoresis with UV-excited fluorescence detection for the enantioselective analysis of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-derivatized amino acids[J]. Analytical and bioanalytical chemistry,2018,410 (20):4979-4990.

[10] 季香云,万年峰,黄志英,等. 淡足侧沟茧蜂寄生对斜纹夜蛾幼虫血淋巴游离氨基酸的影响[J].华中农业大学学报,2017,36(4):33-38. JI X Y,WAN N F,HUANG Z Y,et al. Changes in content of free amino acid in hemolymph of host larval *Spodoptera litura* parasitized by *Microplitis pallidipes*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2017,36(4):33-38 (in Chinese with English abstract).

[11] 王杰,梁旭方,李姣,等. 菜粕替代鱼粉对翘嘴鳜肠道吸收和氨基酸代谢的影响[J].华中农业大学学报,2018,37(4):93-101. WANG J,LIANG X F,LI J,et al. Effect of substituting fish meal with rapeseed meal on intestinal absorption and amino acids metabolism in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2018,37(4):93-101 (in Chinese with English abstract).

[12] MUDIAM M K R,RATNASEKHAR C. Ultrasound assisted one step rapid derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometric determination of amino acids in complex matrices[J/OL]. Journal of chromatography A,2013,1291:10-18(2013-05-23)[2019-09-25]. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.061.

[13] YANG Y,FANT W M,LANE A N,et al. Chloroformate derivatization for tracing the fate ofamino acids in cells and tissues by multiple stable isotope resolved metabolomics (mSIRM)[J/OL]. Analytica chimica acta,2017,976:63-73(2017-07-11)[2019-09-25]. http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.014.

[14] QIU Y,SU M,LIU Y,et al. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography-mass spectrometry based metabonomic profiling[J]. Analytica chimica acta,2007,583(2):277-283.

[15] 王桂臻,郝霞,刘磊,等.基于氯甲酸乙酯二次衍生化的GC-MS法同时测定生物样本中20种氨基酸[J].药学学报,2017,52(4):615-619. WANG G Z,HAO X,LIU L,et al. GC-MS separation and determination of 20 amino acids in biological samples based on ethyl chloroformate second derivation[J]. Acta pharmaceutica sinica,2017,52(4):615-619 (in Chinese with English abstract).

[16] MUDIAM M K R,RATNASEKHAR C,JAIN R,et al. Rapid and simultaneous determination of twenty amino acids in complex biological and food samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry with the aid of experimental design after ethyl chloroformate derivatization[J/OL].Journal of chromatography B,2012,907:56-64(2012-10-15)[2019-09-25]. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.08.035.

[17] NUNES DE PAIVA M J,MENEZES H C,CHRISTO P P,et al. An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry[J/OL]. Journal of chromatography B,2013,

931:97-102(2013-07-15)[2019-09-25]. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.05.014.

[18] LI J,QI H Y,WANG Y B,et al. Hollow fiber-stir bar sorptive extraction and microwave assisted derivatization of amino acids in biological matrices[J/OL]. Journal ofchromatography A,2016,1474:32-39(2016-11-25) [2019-09-25]. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.079.

[19] VIEIRA E F,SOARESC,MACHADOS,et al. Seaweeds from the portuguese coast as a source of proteinaceous material:total and free amino acid composition profile[J/OL]. Food chemistry,2018,269:264-2759(2018-12-15)[2019-09-25]. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.145.

[20] 彭真汾,谢倩,池毓斌,等. 响应面实验优化超声法提取橄榄果实游离氨基酸工艺[J]. 食品科学,2017,38(20):146-153. PENG Z P,XIE Q,CHI Y B,et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of free amino acids from the flesh of *Canarium album* fruits by response surface methodology[J]. Food science,2017,38(20):146-153(in Chinese with English abstract).

[21] 谢笔钧,何慧. 食品分析[M].北京:科学出版社,2015. XIE B J,HE H. Food analysis[M].Beijng:Science Press,2015 (in Chinese).

[22] 陈周,张美玲,尹涛,等. 4 种蛋白酶对鲢鱼骨汤特性的影响[J]. 华中农业大学学报,2019,38(6):41-47. CHEN Z,ZHANG M L,YIN T,et al. Effects of four kinds of proteases on properties of silver carp fish bone soup[J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2019,38(6):41-47(in Chinese with English abstract).

[23] MAJIDANO S A,KHUHAWAR M Y,ZOUNR R A,et al. Determination of amino acids in jams,fruits and pharmaceutical preparations by gas chromatography using trifluoroacetylacetone and ethylchloroformate as derivatizing reagents[J]. Analytical methods,2015,7:3148-3156.

[24] VANCOMPERNOLLE B,CROES K,ANGENON G. Optimization of a gas chromatography-mass spectrometry method with methyl chloroformate derivatization for quantification of amino acids in plant tissue[J/OL]. Journal of chromatography B,2016,1017:241-249(2016-04) [2019-09-25]. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.020.

[25] LEE J,HARNLY J M. Free amino acid and cysteine sulfoxide composition of 11 garlic cultivars by gas chromatography with flame ionization and mass selective detection[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2005,53(23):9100-9104.

[26] LI G,WU D,XIE W Y,et al. Analysis of amino acids in tobacco by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method[J/OL]. Journal of chromatography A,2013,1296:243-247(2013-06-28) [2019-09-25]. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.076.

[27] LI Z Q,WU J,JIA L. Analysis of amino acids in blood by combining zeolitici midazolate framework-8-based solid phase extraction and capillary electrophoresis[J/OL]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis,2019,168:30-37(2019-05-10) [2019-09-25]. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.02.015.

[28] 陈蓉,张超,顾倩,等.柱前衍生-HPLC 法同时测定不同产地茯苓中 18 种氨基酸含量[J].药物分析杂志,2017,37(2):297-303. CHEN Y,ZHANG C,GU Q,et al. Pre-column derivation HPLC determination of 18 amino acids in *Poria* from different areas[J].Chinese journal of pharmaceutical analysis,2017,37(2):297-303(in Chinese with English abstract).

[29] 孔谦,陈栋,陈庄,等.柱前衍生-反相高效液相色谱测定茶叶中 19 种氨基酸含量[J].食品科技,2018,43(10):320-325. KONG Q,CHEN D,CHEN Z,et al. Determination of amino acids in tea by reversed high performance liquid chromatography[J]. Food science and technology,2018,43(10):320-325(in Chinese with English abstract).

[30] YIN B,LI T,ZHANG S,et al. Sensitive analysis of 33 free amino acids in serum,milk,and muscle by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. Food analytical methods,2016,9(10):2814-2823.

[31] 黄艳.常见果蔬中游离氨基酸含量的测定[J]. 安徽农业科学,2013,41(9):4088-4089. HUANG Y. Determination of free amino acids in common fruits and vegetables[J]. Journal of Anhui agricultural sciences,2013,41(9):4088-4089(in Chinese with English abstract).

[32] 沈冬莲,徐巧娣,张奇. 应用高效液相色谱测定水果中游离氨基酸的含量[J]. 浙江农业科学,1988(6):38-40. SHEN D L,XU Q D,ZHANG Q. Determination of free amino acids in fruits by high performance liquid chromatography[J]. Journal of Zhejiang agricultural sciences,1988(6):38-40(in Chinese with English abstract).

Analysis of free amino acids in citrus by gas chromatography after isobutyl chloroformate second derivatization

LI Xiaoqing, CAI Ying, PAN Siyi, LI Xiujuan

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, *China*

Abstract In this paper, the single factor test was used to optimize the second derivatization conditions of isobutyl chloroformate, and a gas chromatography quantitative detection method for 18 free amino acids in citrus pulp was established. The results showed that the analysis conditions were the best when pyridine, 2-methyl-1-propanol, first isobutyl chloroformate and second isobutyl chloroformate were added in the amount of 20 μL, 120 μL, 50 μL and 50 μL, respectively, and the extraction solvent was dichloromethane. The 18 amino acids showed good linearities in their respective linear ranges, and the correlation coefficient R^2 were greater than 0.99. The detection limits were in the range of 0.02-0.35 μg/mL, and the relative standard deviations of 5 repeated tests were no more than 10.57%. The recoveries in five kinds of citrus extracts were between 72.82% and 132.97%. The method is simple, accurate, reproducible, low in cost, stable in derivatives, which can be used for the detection of 18 free amino acids in citrus pulp.

Keywords citrus; free amino acid; isobutyl chloroformate; second derivatization; ultrasonic extraction; gas chromatography; quantitative detection

（责任编辑：赵琳琳）