

高效液相色谱法测定饲料中 17 种游离氨基酸的含量

王惠玉, 张佳佳

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 济南 250104)

摘要: 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定饲料中 17 种游离氨基酸的含量。色谱条件: C₁₈ 色谱柱 (4.6×250mm, 5μm), 流速为 1.0mL/min, 柱温为 40°C, 进样量为 10μL, 检测器为紫外检测器, 检测波长 254nm。实验结果: 重复性测试中, 将 17 种氨基酸混合标准溶液连续进样 7 针, 保留时间的 RSD 范围为 0.021%~0.099%, 峰面积的 RSD 范围为 0.086%~0.966%; 17 种氨基酸的仪器检出限均小于 0.320μmol/L, 仪器定量限均小于 1.068μmol/L; 17 种氨基酸在测定浓度范围内均具有良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.999$)。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪满足饲料中游离氨基酸含量测定的需求。

关键词: 饲料;氨基酸;高效液相色谱

蛋白质的基本构成单位是氨基酸, 已知的氨基酸有 20 多种, 以不同的组合形式, 形成不同的蛋白质。饲料中的蛋白质只有被消化分解为简单的氨基酸才能够被动物吸收利用。因此, 蛋白质营养的实质是氨基酸营养。在必需氨基酸中, 赖氨酸、蛋氨酸、色氨酸在植物性饲料中的含量常不能满足动物的需要 (复胃动物、盲肠发达的动物如兔、大鼠除外), 而且饲料中上述氨基酸的缺乏还会影响其它氨基酸的利用。在饲料学中, 赖氨酸被称为第一限制性氨基酸, 蛋氨酸则被称为第二限制性氨基酸。因此, 测定游离氨基酸对饲料的质量控制具有重要意义。

1 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

甲醇: 色谱纯;

乙腈: 色谱纯;

三乙胺: 色谱纯;

正己烷: 色谱纯;

冰乙酸: 优级纯;

无水乙酸钠: 优级纯;

异硫氰酸苯酯;

浓盐酸：分析纯；

20%（体积比）乙酸溶液：取 2mL 冰乙酸（3.6）至 10mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀；

异硫氰酸苯酯的乙腈溶液：移取 0.12mL 异硫氰酸苯酯（3.8）至 10mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，混匀；

三乙胺-乙腈溶液：移取 1.40mL 三乙胺（3.4）至 10mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，混匀；

0.1mol/L 盐酸溶液：取 0.90mL 浓盐酸（3.9）至 100mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀；

乙酸钠缓冲液：称取 1.64g 无水乙酸钠（3.7），加适量水溶解，再加入 0.5mL 三乙胺（3.4），用水定容至 1000mL，用 20%乙酸溶液（3.10）调 pH 至 6.20，用 0.22 μ m 水系滤膜过滤，超声后备用；

D-天冬氨酸标准品：CAS 号：1783-96-6，纯度为 99.3%，相对分子质量为 133.10；

L-谷氨酸标准品：CAS 号：56-86-0，纯度为 99.7%，相对分子质量为 147.13；

L-丝氨酸标准品：CAS 号：56-45-1，纯度为 99.2%，相对分子质量为 105.09；

甘氨酸标准品：CAS 号：56-40-6，纯度为 99.8%，相对分子质量为 75.07；

L-组氨酸标准品：CAS 号：71-00-1，纯度为 99.5%，相对分子质量为 155.16；

L-精氨酸标准品：CAS 号：74-79-3，纯度为 99.2%，相对分子质量为 174.20；

L-苏氨酸标准品：CAS 号：72-19-5，纯度为 99.9%，相对分子质量为 119.12；

L-丙氨酸标准品：CAS 号：56-41-7，纯度为 99.8%，相对分子质量为 89.09；

L-脯氨酸标准品：CAS 号：147-85-3，纯度为 99.9%，相对分子质量为 115.13；

L-酪氨酸标准品：CAS 号：60-18-4，纯度为 99.9%，相对分子质量为 181.19；

L-缬氨酸标准品：CAS 号：72-18-4，纯度为 99.5%，相对分子质量为 117.15；

L-蛋氨酸标准品：CAS 号：63-68-3，纯度为 99.5%，相对分子质量为 149.21；

L-异亮氨酸标准品：CAS 号：73-32-5，纯度为 98.0%，相对分子质量为 131.17；

DL-亮氨酸标准品：CAS 号：328-39-2，纯度为 97.0%，相对分子质量为 131.17；

DL-苯丙氨酸标准品：CAS 号：150-30-1，纯度为 99.9%，相对分子质量为 165.19；

L-色氨酸标准品：CAS 号：73-22-3，纯度为 99.1%，相对分子质量为 204.23；

L-(+)-赖氨酸标准品：CAS 号：56-87-1，纯度为 97.2%，相对分子质量为 146.19；

17 种氨基酸单独标准储备液：各自准确称取一定量的各氨基酸标准品（3.15~3.31）于

10mL 容量瓶中，用 0.1mol/L 盐酸（3.13）超声溶解并定容至刻度，各氨基酸的浓度均为 10mmol/L，于 4℃保存，有效期 3 个月；

17 种氨基酸混合标准工作液：将 17 种氨基酸标准储备液（3.32）用水稀释并定容配制成混合标准工作液。天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、赖氨酸系列浓度依次为 20 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L 和 400 μ mol/L；

微孔滤膜：0.22 μ m，有机系；

微孔滤膜：0.22 μ m，水系。

2 仪器与设备

高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025 UVD 紫外检测器、Wookinglab 色谱工作站；

分析天平：精确到 0.0001g；

pH 计；

超声波清洗机；

涡旋混合器；

离心机：转速不低于 4000r/min；

离心管：10mL、50mL；

针头注射器；

容量瓶：10mL、50mL、100mL、1000mL，棕色带刻度。

3 测定步骤

3.1 样品前处理

3.1.1 样品提取

称取 1~2g (精确至 0.0001g) 饲料试样于 50mL 离心管中，加入 0.1mol/L 盐酸溶液（3.13）20mL，用超声提取 30min，于 4000r/min 离心 10min，上清液移取 50mL 容量瓶中，残渣用 25mL 0.1mol/L 盐酸溶液（3.13）重复提取一次，离心后合并上清液，用水定容至刻度线，备用。

3.1.2 样品衍生

准确吸取上述提取的样品 0.5mL 于 10mL 离心管中，依次加入异硫氰酸苯酯的乙腈溶液（3.11）250 μ L、三乙胺-乙腈溶液（3.12）250 μ L，混匀后室温下避光放置 1h，加入 50 μ L

乙酸溶液（3.10），混匀后加入 1.0mL 正己烷，涡旋混合器振荡 1min，静置分层后，弃去上层正己烷溶液，用针头注射器小心吸取下层溶液，过 0.22 μ m 有机系滤膜后供高效液相色谱仪测定。

3.1.3 标准工作液衍生

准确吸取上述配制好的混合标准工作液（3.33）各 0.5mL 于 10mL 离心管中，按 5.1.2 中步骤进行衍生。

3.2 色谱条件

a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，4.6 \times 250mm，5 μ m 或者相当的色谱柱；

b) 流动相：流动相 A 为 80%乙腈-水溶液，流动相 B 为乙酸钠缓冲液（3.14），按下表进行梯度洗脱：

时间 /(min)	流速/(mL/min)	A/(%)	B/(%)
0.00	1.000	3.0	97.0
10.00	1.000	5.0	95.0
12.00	1.000	15.0	85.0
19.00	1.000	18.0	82.0
21.00	1.000	21.0	79.0
23.00	1.000	22.0	78.0
27.00	1.000	25.0	75.0
32.00	1.000	35.0	65.0
35.00	1.000	35.0	65.0
37.00	1.000	42.0	58.0
40.00	1.000	100.0	0.0
43.00	1.000	100.0	0.0
43.10	1.000	3.0	97.0
50.00	1.000	3.0	97.0

c) 柱温：40 $^{\circ}$ C；

d) 进样量：10 μ L；

e) 检测器及波长：紫外检测器，检测波长 254nm。

4 结果

4.1 重复性测试

按照上述色谱条件（5.2）进行采集，17种氨基酸混合标准溶液（天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、赖氨酸浓度均为 $100\mu\text{mol/L}$ ）的色谱图如图1所示，积分结果如表1所示。

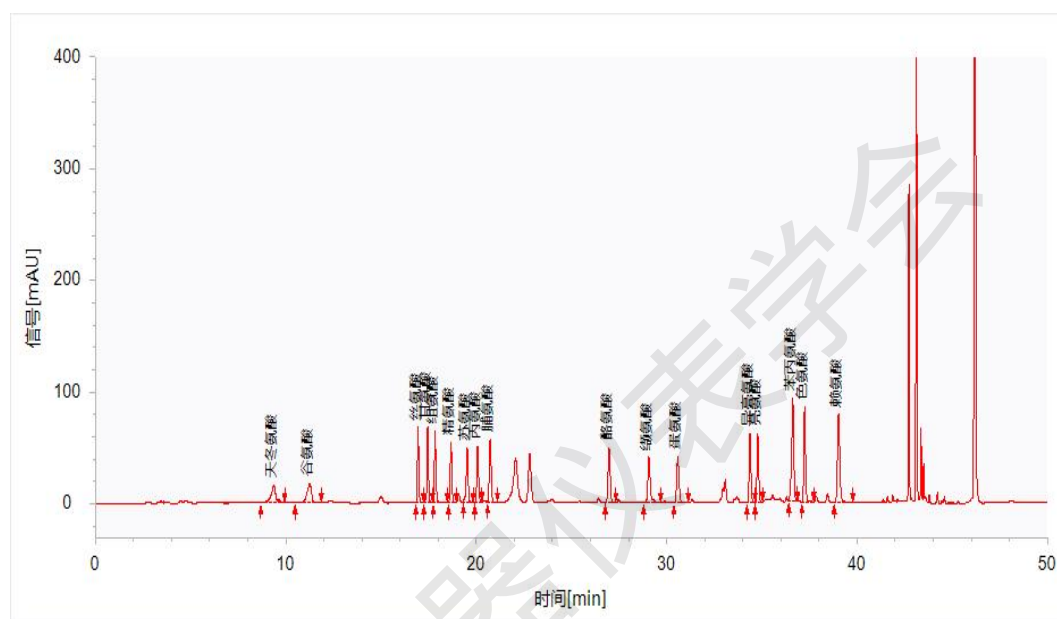


图1 17种氨基酸混合标准溶液的色谱图

表1 17种氨基酸混合标准溶液积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板 数	分离度	对称/拖尾因子
天冬氨酸	9.400	271.325	15.442	10521	-	0.94
谷氨酸	11.292	274.891	16.851	11317	4.78	0.78
丝氨酸	16.983	341.654	67.682	270699	20.51	1.07
甘氨酸	17.483	354.713	68.041	287637	3.83	1.05
组氨酸	17.867	349.851	63.858	276151	2.88	1.35
精氨酸	18.708	327.751	54.326	226522	5.74	1.06
苏氨酸	19.550	333.990	49.070	219409	5.19	0.86
丙氨酸	20.100	334.456	49.677	205425	3.20	1.14
脯氨酸	20.758	397.917	56.351	199978	3.63	1.16
酪氨酸	27.008	381.611	49.019	281533	32.12	1.10
缬氨酸	29.100	380.286	40.795	265438	9.74	1.55
蛋氨酸	30.617	368.631	41.409	275953	6.61	1.12

异亮氨酸	34.408	393.299	61.886	685476	18.99	1.10
亮氨酸	34.817	380.232	61.093	738016	2.49	1.13
苯丙氨酸	36.658	708.196	91.973	632166	10.63	0.87
色氨酸	37.275	562.207	85.772	790593	3.50	1.18
赖氨酸	39.058	685.183	78.978	501471	9.19	1.16

由表 1 中数据可知，17 种氨基酸的分离度均不小于 2.49，均可以达到基线分离。

将 17 种氨基酸混合标准溶液连续进样 7 针，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

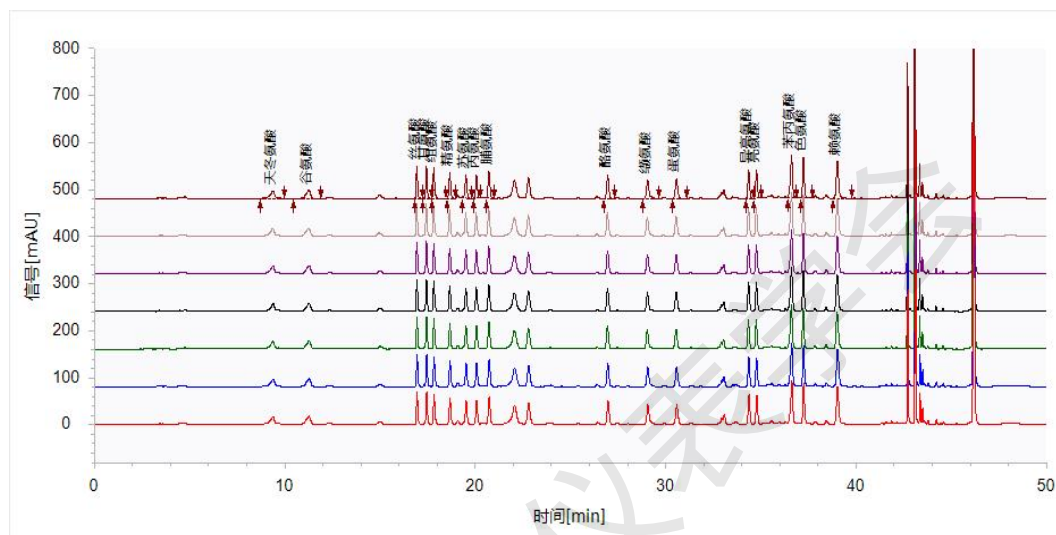


图 2 17 种氨基酸混合标准溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 17 种氨基酸混合标准溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物		1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
天冬氨酸	保留时间	9.400	9.417	9.400	9.417	9.408	9.392	9.408	9.406	0.099
	峰面积	271.325	274.234	271.775	274.314	276.853	278.122	277.097	274.817	0.966
谷氨酸	保留时间	11.292	11.308	11.308	11.300	11.300	11.283	11.292	11.298	0.081
	峰面积	274.891	274.223	274.088	273.956	274.313	274.943	275.855	274.610	0.243
丝氨酸	保留时间	16.983	16.983	16.975	16.975	16.975	16.958	16.967	16.974	0.052
	峰面积	341.654	341.099	341.115	340.729	340.709	340.550	340.586	340.920	0.116
甘氨酸	保留时间	17.483	17.483	17.475	17.475	17.475	17.467	17.467	17.475	0.037
	峰面积	354.713	354.113	354.163	354.485	354.516	354.784	354.915	354.527	0.086
组氨酸	保留时间	17.867	17.867	17.867	17.858	17.858	17.850	17.858	17.861	0.037
	峰面积	349.851	348.978	348.598	347.972	347.594	347.701	347.548	348.320	0.248
精氨酸	保留时间	18.708	18.708	18.700	18.692	18.692	18.683	18.692	18.696	0.050
	峰面积	327.751	327.095	326.742	326.342	326.115	326.434	326.428	326.701	0.171

苏氨酸	保留时间	19.550	19.550	19.542	19.542	19.542	19.533	19.542	19.543	0.030
	峰面积	333.990	333.058	332.113	331.409	330.908	330.809	330.404	331.813	0.396
丙氨酸	保留时间	20.100	20.100	20.092	20.092	20.092	20.083	20.092	20.093	0.029
	峰面积	334.456	333.611	332.414	331.812	331.246	330.784	330.330	332.093	0.454
脯氨酸	保留时间	20.758	20.758	20.750	20.742	20.742	20.742	20.750	20.749	0.035
	峰面积	397.917	397.713	395.791	395.126	395.193	395.356	395.035	396.019	0.316
酪氨酸	保留时间	27.008	26.992	26.975	26.983	26.983	26.975	26.983	26.986	0.042
	峰面积	381.611	381.154	380.685	380.292	380.110	379.825	379.892	380.510	0.177
缬氨酸	保留时间	29.100	29.092	29.067	29.075	29.075	29.067	29.083	29.080	0.043
	峰面积	380.286	379.236	377.801	376.810	376.166	375.227	374.493	377.146	0.557
蛋氨酸	保留时间	30.617	30.608	30.575	30.583	30.583	30.583	30.600	30.593	0.051
	峰面积	368.631	368.455	367.512	367.243	366.884	366.896	366.785	367.487	0.208
异亮氨酸	保留时间	34.408	34.392	34.375	34.383	34.383	34.383	34.392	34.388	0.031
	峰面积	393.299	392.074	390.944	390.127	389.142	388.241	387.241	390.153	0.547
亮氨酸	保留时间	34.817	34.800	34.783	34.800	34.792	34.792	34.800	34.798	0.030
	峰面积	380.232	379.728	379.307	379.276	378.798	378.572	378.246	379.166	0.181
苯丙氨酸	保留时间	36.658	36.650	36.633	36.642	36.642	36.642	36.642	36.644	0.021
	峰面积	708.196	708.333	702.387	706.531	706.732	706.114	708.395	706.670	0.299
色氨酸	保留时间	37.275	37.267	37.250	37.258	37.267	37.258	37.267	37.263	0.022
	峰面积	562.207	560.083	558.376	557.279	555.882	555.512	554.404	557.678	0.494
赖氨酸	保留时间	39.058	39.058	39.033	39.033	39.050	39.050	39.050	39.047	0.027
	峰面积	685.183	684.180	683.232	683.073	682.978	683.493	682.871	683.573	0.122

由表 2 中数据可知, 17 种氨基酸混合标准溶液连续进样 7 针, 其中 17 种氨基酸保留时间的 RSD 范围为 0.021%~0.099%, 峰面积的 RSD 范围为 0.086%~0.966%, 均具有良好的定性定量重复性。

4.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的色谱图如图 3 所示, 计算结果见表 3。

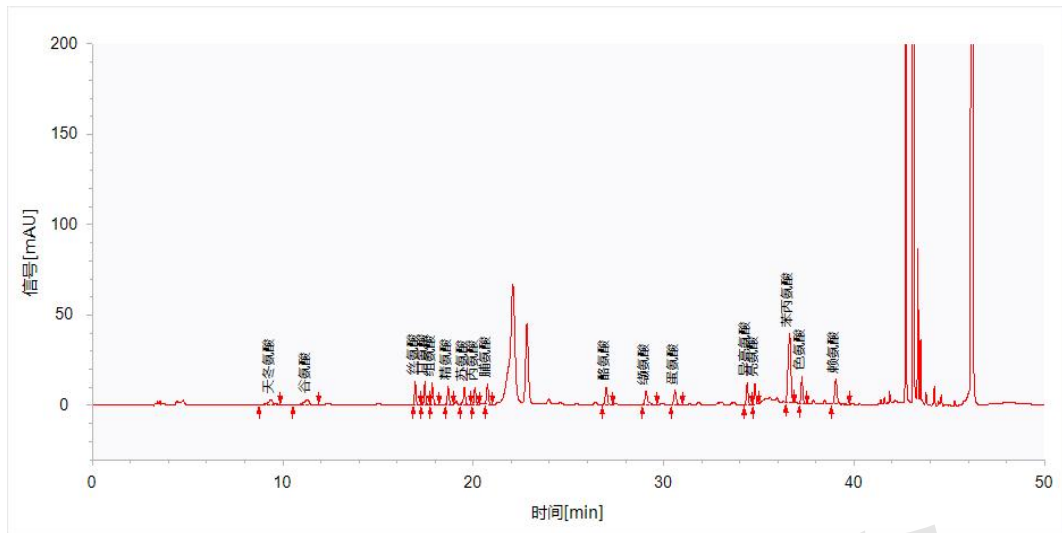


图3 仪器灵敏度的色谱图

表3 仪器灵敏度测试数据

目标物	浓度	峰高	噪声	S/N	LOD	LOQ
天冬氨酸	20	2.809	0.015	187.3	0.320	1.068
谷氨酸	20	2.946	0.015	196.4	0.305	1.018
丝氨酸	20	12.995	0.015	866.3	0.069	0.231
甘氨酸	20	12.698	0.015	846.5	0.071	0.236
组氨酸	20	12.011	0.015	800.7	0.075	0.250
精氨酸	20	9.951	0.015	663.4	0.090	0.301
苏氨酸	20	9.515	0.015	634.3	0.095	0.315
丙氨酸	20	9.339	0.015	622.6	0.096	0.321
脯氨酸	20	11.147	0.015	743.1	0.081	0.269
酪氨酸	20	9.230	0.015	615.3	0.098	0.325
缬氨酸	20	7.765	0.015	517.7	0.116	0.386
蛋氨酸	20	7.830	0.015	522.0	0.115	0.383
异亮氨酸	20	11.897	0.015	793.1	0.076	0.252
亮氨酸	20	11.599	0.015	773.3	0.078	0.259
苯丙氨酸	20	38.264	0.015	2550.9	0.024	0.078
色氨酸	20	15.074	0.015	1004.9	0.060	0.199
赖氨酸	20	14.129	0.015	941.9	0.064	0.212

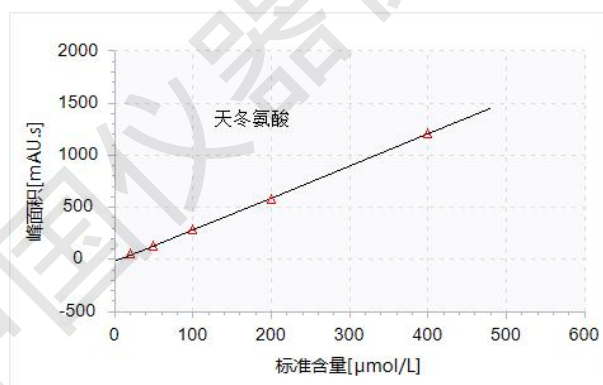
由表3中数据可知,天冬氨酸的仪器检出限为 $0.320\mu\text{mol/L}$,仪器定量限为 $1.068\mu\text{mol/L}$;谷氨酸的仪器检出限为 $0.305\mu\text{mol/L}$,仪器定量限为 $1.018\mu\text{mol/L}$;丝氨酸的仪器检出限为 $0.069\mu\text{mol/L}$,仪器定量限为 $0.231\mu\text{mol/L}$;甘氨酸的仪器检出限为 $0.071\mu\text{mol/L}$,仪器定量限为 $0.236\mu\text{mol/L}$;组氨酸的仪器检出限为 $0.075\mu\text{mol/L}$,仪器定量限为 $0.250\mu\text{mol/L}$;精氨酸

酸的仪器检出限 0.090 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.301 $\mu\text{mol/L}$ ；苏氨酸的仪器检出限为 0.095 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.315 $\mu\text{mol/L}$ ；丙氨酸的仪器检出限为 0.096 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.321 $\mu\text{mol/L}$ ；脯氨酸的仪器检出限为 0.081 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.269 $\mu\text{mol/L}$ ；酪氨酸的仪器检出限为 0.098 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.325 $\mu\text{mol/L}$ ；缬氨酸的仪器检出限为 0.116 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.386 $\mu\text{mol/L}$ ；蛋氨酸的仪器检出限为 0.115 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.383 $\mu\text{mol/L}$ ；异亮氨酸的仪器检出限为 0.076 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.252 $\mu\text{mol/L}$ ；亮氨酸的仪器检出限为 0.078 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.259 $\mu\text{mol/L}$ ；苯丙氨酸的仪器检出限为 0.024 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.078 $\mu\text{mol/L}$ ；色氨酸的仪器检出限为 0.060 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.199 $\mu\text{mol/L}$ ；赖氨酸的仪器检出限为 0.064 $\mu\text{mol/L}$ ，仪器定量限为 0.212 $\mu\text{mol/L}$ 。

4.3 含量测定

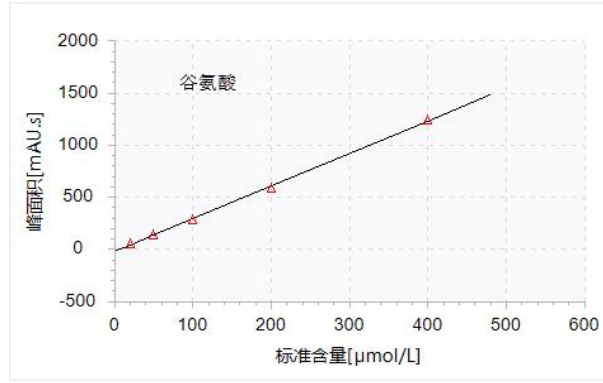
4.3.1 校准曲线

将配制好的 17 种氨基酸系列混合标准工作液（3.33）在 HPLC 上进行测定，以浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程及确定系数见图 4~图 20，叠加色谱图见图 21。17 种氨基酸在测定浓度范围内，曲线的确定系数 R^2 均大于 0.999，线性关系均良好。



方程式	$y=3.06296*x-29.87456$
相关系数(R)	0.9996
确定系数(R^2)	0.9992

图 4 天冬氨酸系列标准溶液的校准曲线

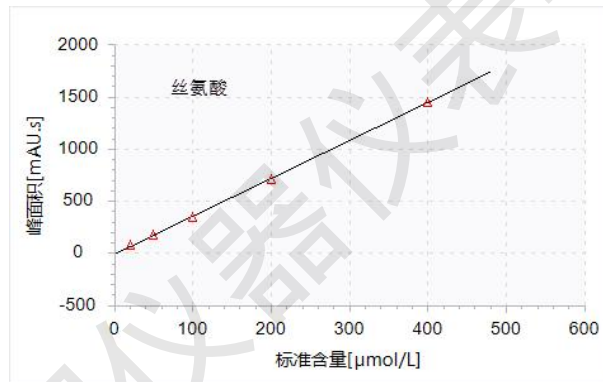


方程式 $y=3.13494*x-28.10387$

相关系数(R) 0.9996

确定系数(R²) 0.9992

图 5 谷氨酸系列标准溶液的校准曲线

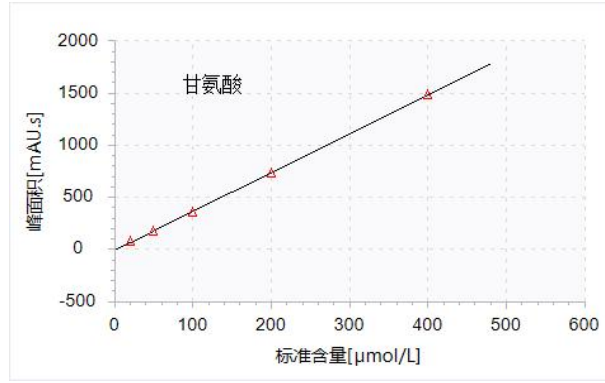


方程式 $y=3.64663*x-16.60974$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9998

图 6 丝氨酸系列标准溶液的校准曲线

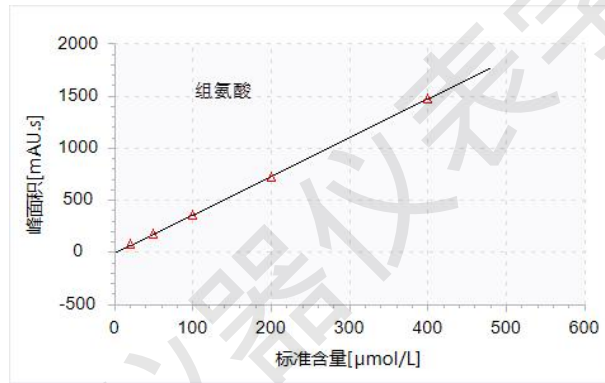


方程式 $y=3.71588*x-12.38484$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 7 甘氨酸系列标准溶液的校准曲线

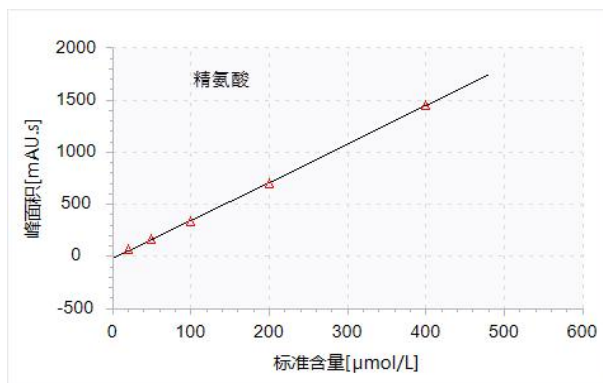


方程式 $y=3.70066*x-14.71519$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9998

图 8 组氨酸系列标准溶液的校准曲线

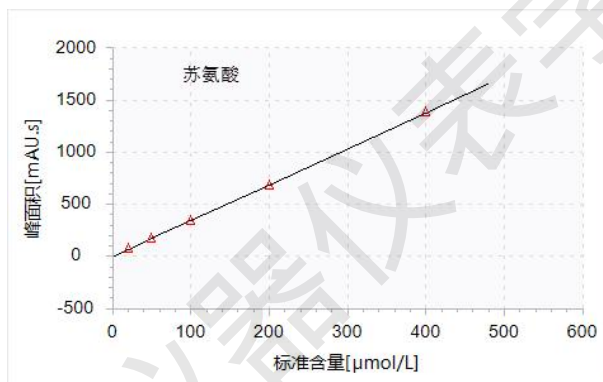


方程式 $y=3.67002*x-28.24441$

相关系数(R) 0.9998

确定系数(R²) 0.9995

图 9 精氨酸系列标准溶液的校准曲线

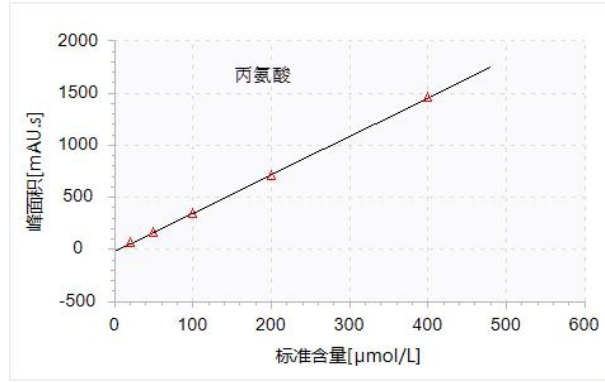


方程式 $y=3.45389*x-7.83477$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 10 苏氨酸系列标准溶液的校准曲线

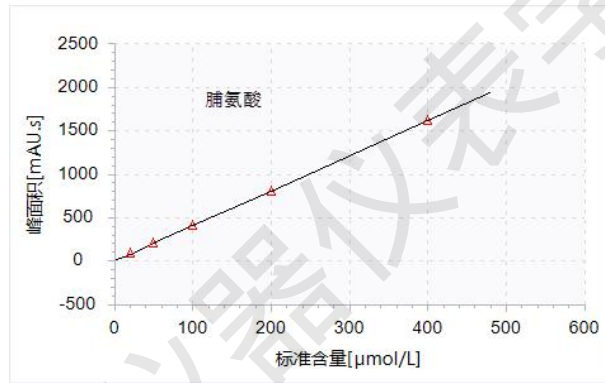


方程式 $y=3.67797*x-24.59464$

相关系数(R) 0.9998

确定系数(R²) 0.99964

图 11 丙氨酸系列标准溶液的校准曲线

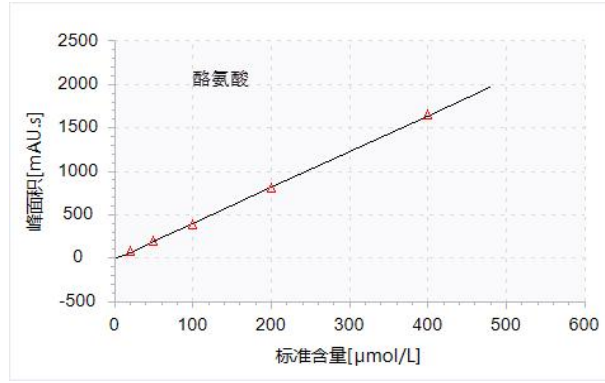


方程式 $y=4.02843*x-4.90249$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 12 脯氨酸系列标准溶液的校准曲线

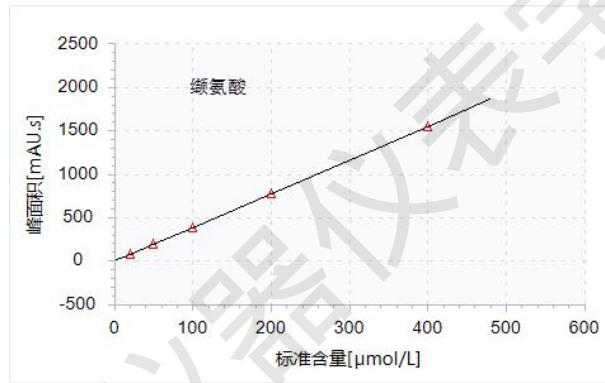


方程式 $y=4.13983*x-23.59639$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9998

图 13 酪氨酸系列标准溶液的校准曲线

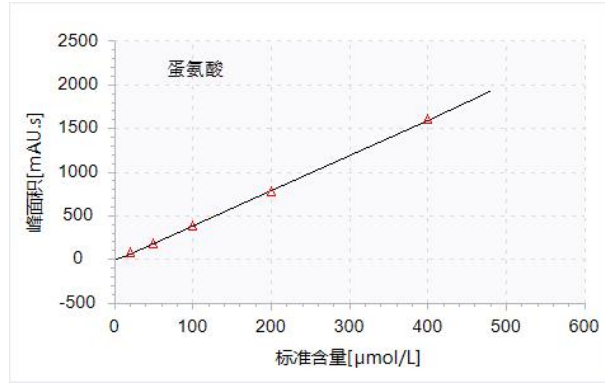


方程式 $y=3.87305*x-6.82341$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 14 缬氨酸系列标准溶液的校准曲线

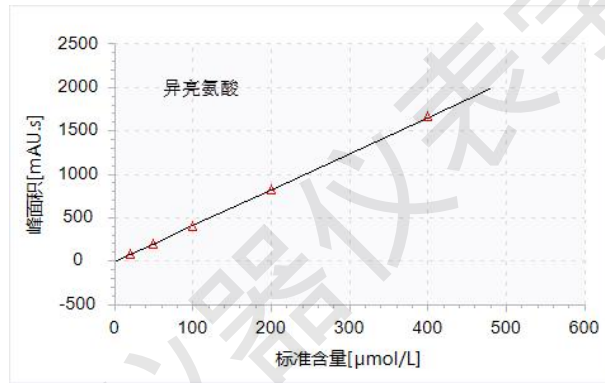


方程式 $y=4.03284*x-25.22428$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9997

图 15 蛋氨酸系列标准溶液的校准曲线

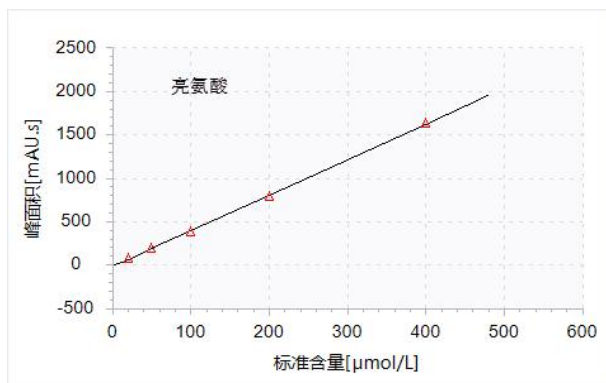


方程式 $y=4.15530*x-17.14116$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 16 异亮氨酸系列标准溶液的校准曲线

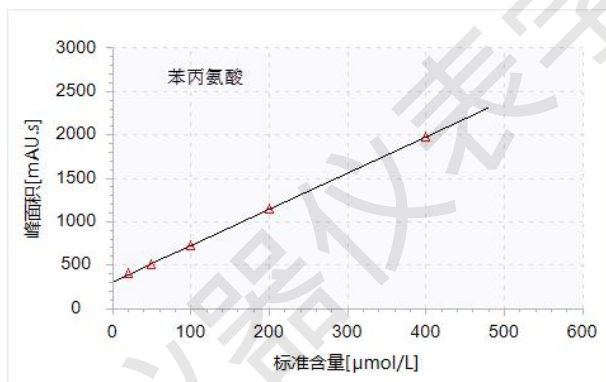


方程式 $y=4.10595*x-23.94822$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9998

图 17 亮氨酸系列标准溶液的校准曲线

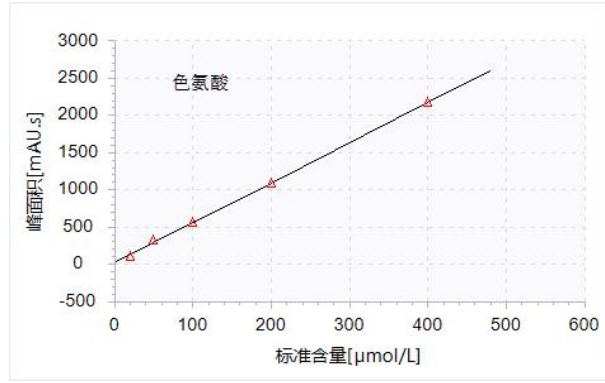


方程式 $y=4.18275*x+296.20099$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9999

图 18 苯丙氨酸系列标准溶液的校准曲线

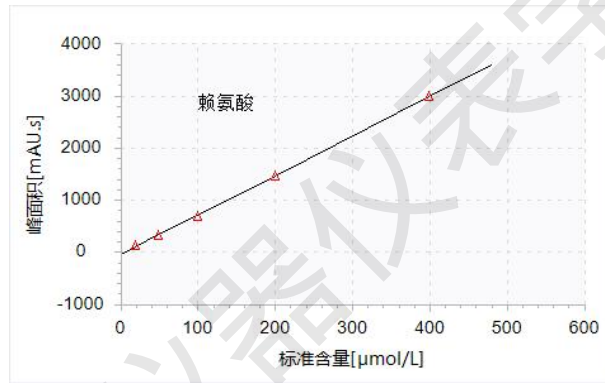


方程式 $y=5.35960*x+16.46808$

相关系数(R) 0.9996

确定系数(R²) 0.9993

图 19 色氨酸系列标准溶液的校准曲线



方程式 $y=7.57041*x-51.39666$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R²) 0.9997

图 20 赖氨酸系列标准溶液的校准曲线

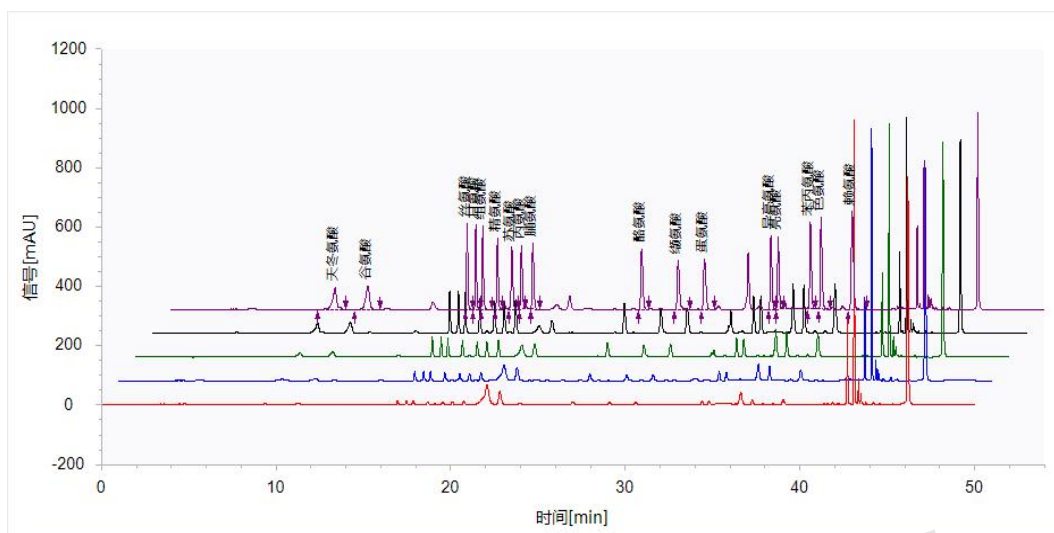


图 21 17 种氨基酸混合标准溶液浓度系列曲线叠加色谱图

4.3.2 样品含量测定

将客户提供的样品（棉粕和蛋鸡料）按照 5.1 的流程进行处理，并计算样品中游离氨基酸的含量并进行加标测试。按照公式（1）进行计算，样品的色谱图如图 22、图 23 所示，加标样品的色谱图如图 24 所示。

$$\omega = \frac{C \times V \times f \times M \times 100}{m \times 10^9} \quad \text{----公式（1）}$$

式中： ω ----试样中氨基酸（天冬氨酸等 17 种氨基酸）的含量，以其质量分数计（%）；

C ----为通过校准曲线计算的氨基酸（天冬氨酸等 17 种氨基酸）的浓度，单位为微摩尔每升（ $\mu\text{mol/L}$ ）；

V ----为样品的定容体积，单位为毫升(mL)；

m ----为样品质量，单位为克(g)；

f ----为稀释倍数；

M ----为氨基酸(天冬氨酸等 17 种氨基酸)的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol)；

100、 10^9 ----为单位换算系数。

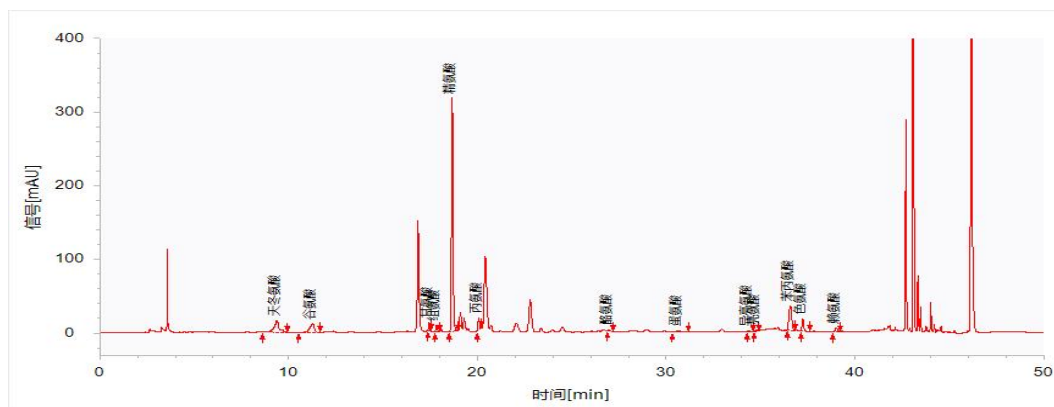


图 22 棉粕样品的色谱图

表 4 棉粕样品氨基酸含量

目标物	氨基酸含量 (%)
天冬氨酸	0.070
谷氨酸	0.050
甘氨酸	0.006
组氨酸	0.013
精氨酸	0.463
丙氨酸	0.015
酪氨酸	0.008
蛋氨酸	0.010
异亮氨酸	0.004
亮氨酸	0.006
苯丙氨酸	0.010
色氨酸	0.018
赖氨酸	0.009

由表 4 中数据可知，棉粕样品中各氨基酸的含量范围为 0.004%~0.463%。

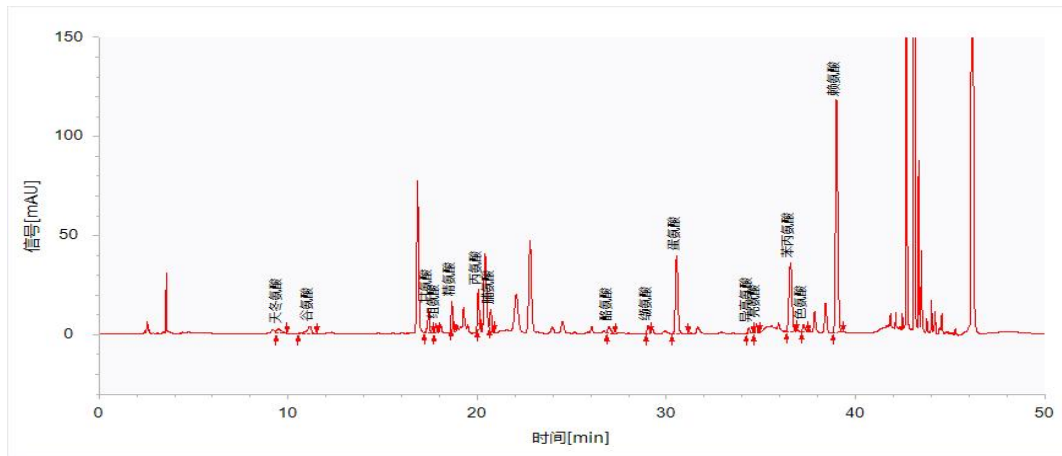


图 23 蛋鸡料样品的色谱图

表 5 蛋鸡料样品氨基酸含量

目标物	氨基酸含量 (%)
天冬氨酸	0.015
谷氨酸	0.020
甘氨酸	0.009
组氨酸	0.009
精氨酸	0.026
丙氨酸	0.018
脯氨酸	0.015
酪氨酸	0.010
缬氨酸	0.007
蛋氨酸	0.062
异亮氨酸	0.007
亮氨酸	0.013
苯丙氨酸	0.015
色氨酸	0.002
赖氨酸	0.100

由表 5 中数据可知，蛋鸡料样品中各氨基酸的含量范围为 0.002%~0.100%。

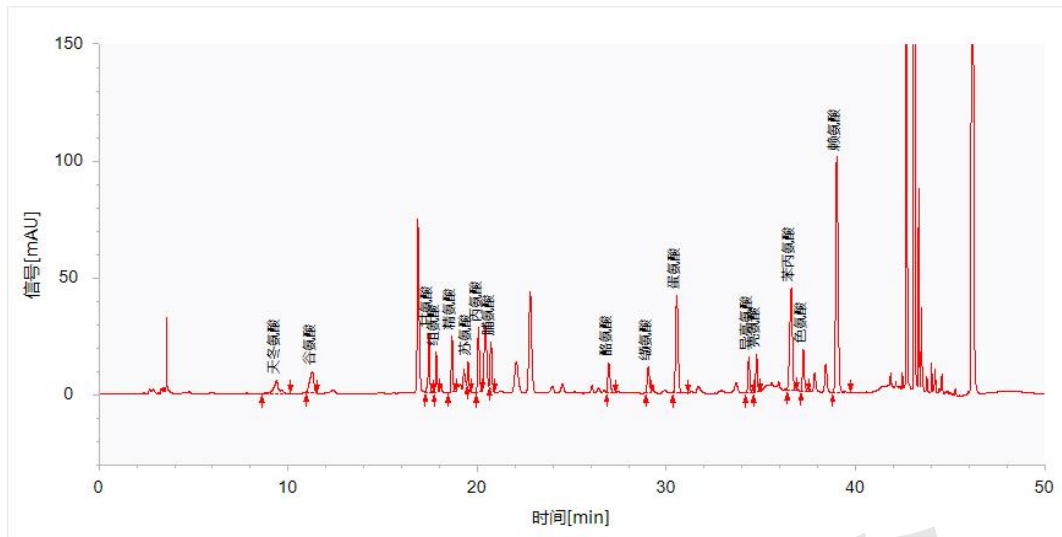


图 24 蛋鸡料样品加标色谱图

表 6 蛋鸡料加标样品中氨基酸回收率统计表

目标物	加标回收率 %
天冬氨酸	101.46
甘氨酸	82.26
组氨酸	87.06
精氨酸	87.38
苏氨酸	100.94
丙氨酸	78.41
脯氨酸	84.89
酪氨酸	84.92
缬氨酸	81.32
异亮氨酸	92.97
亮氨酸	86.54
色氨酸	82.04

由表 6 中数据可知，蛋鸡料加标样品中氨基酸的回收率范围为 78.41%~101.46%。

5 结论

通过对氨基酸的分离度、重复性、灵敏度、线性的测试以及对饲料样品中氨基酸含量进行测定，实验结果表明：17 种氨基酸的分离度均不小于 2.49，均可实现良好的分离；重

复性测试中，17种氨基酸混合标准溶液连续进样7针，17种氨基酸保留时间的RSD范围为0.021%~0.099%，峰面积的RSD范围为0.086%~0.966%，均具有良好的定性定量重复性，17种氨基酸的仪器检出限均小于0.320 μ mol/L，仪器定量限均小于1.068 μ mol/L；17种氨基酸在测定浓度范围内均具有良好的线性关系（ $R^2 \geq 0.999$ ）；样品加标测试中，氨基酸的回收率范围为78.41%~101.46%。因此，Wooking K2025高效液相色谱仪满足饲料中游离氨基酸含量测定的需求。

附1:

仪器配置清单	
序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit 泵单元</u>
1	62Mpa 二元高压输液泵（内置溶剂托盘）
2	流动相瓶（肖特瓶，1L）
3	脱气机
4	四通道溶剂切换阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector 进样器</u>
1	自动进样器
2	样品瓶（2mL，含瓶盖）
3	脱气组件
4	100 μ L 定量环
C)	<u>Column Oven 柱温箱</u>
1	色谱柱恒温箱（室温以下 10 $^{\circ}$ C至 85 $^{\circ}$ C）
2	色谱柱：CP C ₁₈ MGII 4.6 \times 250mm，5 μ m
D)	<u>Detector 检测器</u>
1	紫外-可见光检测器
E)	<u>Workstation 工作站</u>
1	Wookinglab（中文版）

附 2:

悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)

