

食品中芳香族氨基酸的分离分析技术研究进展

鲁晨辉¹, 张毅^{1*}, 苏宇杰¹, 王文龙¹, 冯永巍^{2*}

(1. 江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 分析食品安全学研究所, 食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 国家市场监督管理总局技术创新中心(特殊食品), 无锡市食品安全检验检测中心, 江苏 无锡 214142)

摘要:苯丙酮尿症等代谢病患者因基因缺陷无法正常代谢食物中的芳香族氨基酸(aromatic amino acids, AAA), 常规饮食可能会造成永久性生理损伤, 低 AAA 肽是其重要的蛋白质等同物来源。AAA 分离分析技术对低 AAA 肽的制备和检测至关重要。该领域研究者探索了多种高效的吸附、分离材料, 从复杂的蛋白质水解液中选择性吸附脱除 AAA 以制备符合特定氨基酸限量的低 AAA 肽类食品, 或者建立对 AAA 特异性提取富集的分选分析策略。该文分析了 AAA 的结构特点与理化性质, 总结了近年来基于活性炭、树脂等吸附材料脱除 AAA 的技术进展, 并从样品前处理、手性分离和吸附-传感 3 个维度综述了二维纳米材料、分子印迹、环糊精、金属有机骨架等材料在 AAA 分离分析中的应用。通过探讨各类技术的优缺点, 为 AAA 吸附脱除和分离分析技术的进步提供支撑。

关键词:芳香族氨基酸; 吸附; 脱除; 分离; 综述

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2022)08-0686-08

Advances in separation and analysis of aromatic amino acids in food

LU Chenhui¹, ZHANG Yi^{1*}, SU Yujie¹, WANG Wenlong¹, FENG Yongwei^{2*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, International Joint Laboratory on Food Safety, Institute of Analytical Food Safety, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Technology Innovation Center of Special Food for State Market Regulation, Wuxi Food Safety Inspection and Test Center, Wuxi 214142, China)

Abstract: Amino acids are important building blocks of proteins in the human body, which are involved in many metabolic pathways. Patients with metabolic diseases such as phenylketonuria, tyrosinemia, and hepatic encephalopathy are genetically defective and cannot metabolize aromatic amino acids (AAA) in food; hence, a regular diet may lead to permanent physiological damage. For this reason, it is necessary to restrict the intake of AAA in their daily diet by limiting natural protein intake, while ensuring normal intake of low protein foods and supplementation with low-AAA protein equivalents. Sources of low-AAA protein equivalents currently rely on free amino acid complex mixtures and low-AAA peptides (also known as high-Fischer-ratio peptides), which have better absorption availability and palatability. AAA separation and analysis techniques are essential for the preparation and detection of low-AAA peptides. Researchers in this field have explored a variety of efficient adsorption materials to selectively remove AAA

收稿日期: 2022-04-15

* 通讯联系人. Tel: (0510) 85916732, E-mail: zhangyijnu@jiangnan.edu.cn (张毅); Tel: (0510) 81827802, E-mail: 402200023@qq.com (冯永巍).

基金项目: 江苏省市场监督管理局科技计划项目 (KJ204131); 国家自然科学基金 (21876066); 河北省医学科学研究课题计划 (20211856); 江南大学基础科研计划 (JUSRP21921); 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心项目。

Foundation item: Science and Technology Project of Jiangsu Market Supervision Administration (No. KJ204131); National Natural Science Foundation of China (No. 21876066); Hebei Medical Science Research Project (No. 20211856); Jiangnan University Basic Scientific Research Plan (No. JUSRP21921); Program of the "Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province".

from complex protein hydrolysates and thus prepare low-AAA peptide foods, or to establish analysis strategies for AAA. Covering more than 70 publications on AAA removal and separation in the last decade from Web of Science Core Collection and China National Knowledge Infrastructure, this review analyzes the structural characteristics and physicochemical properties of AAA, and summarizes the technological progress of AAA removal based on adsorbents such as activated carbon and resin. The applications of two-dimensional nanomaterials, molecular imprinting, cyclodextrins, and metal-organic frameworks in AAA adsorption and analysis from three dimensions, i. e., sample pretreatment, chiral separation and adsorption sensing, are also reviewed. The mainstream adsorbents for AAA removal, such as activated carbon, still suffer from poor specificity and cause environmental pollution during post-use treatment. Existing AAA separating materials show impressive selective adsorption capability in food samples and chiral mixtures as well as high sensitivity in adsorption sensing. The development of an efficient detection technology for AAA may help in detecting trace AAA in food and in evaluating chiral AAA adulteration in food samples. By exploring the advantages and disadvantages of each type of technology, we provide support for the advancement of the removal and analysis techniques for AAA.

Key words: aromatic amino acids; adsorption; removal; separation; review

芳香族氨基酸(aromatic amino acids, AAA)包括苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)、酪氨酸(tyrosine, Tyr)和色氨酸(tryptophan, Trp),其中 Phe 和 Trp 为必需氨基酸。Phe 在体内的代谢途径主要是在苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)和辅酶四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH₄)的作用下转化为 Tyr。当患者由于基因缺陷导致体内缺乏 PAH 或 BH₄ 时, Phe 会经由另一条代谢途径——转氨基作用产生苯丙酮酸,此时患者尿液中含有大量苯丙酮酸,称为苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)^[1]。Tyr 在体内正常代谢可以产生儿茶酚胺和黑色素,而当 Tyr 分解代谢途径中存在酶缺陷时,会导致患者血浆中 Tyr 水平明显升高,称为酪氨酸血症。根据产生缺陷的酶种类不同,酪氨酸血症分为 I 型(肝-肾型酪氨酸血症)、II 型(眼-皮肤型酪氨酸血症)和 III 型。Trp 是一种生糖兼生酮的氨基酸,戊二酸血症患者的 Trp 代谢途径中因戊二酰辅酶 A 脱氢酶缺陷导致戊二酸代谢产物堆积。上述 AAA 代谢异常会导致患者多个系统受损,甚至死亡。因此,需要严格限制此类患者饮食中的 AAA^[2]。根据食品安全国家标准 GB 29922-

2013《特殊医学用途配方食品(特医食品)通则》,苯丙酮尿症专用的特医食品中 Phe 含量不应超过 1.5 mg/g 蛋白质(等同物);酪氨酸血症专用的特医食品中 Phe、Tyr 含量不应超过 1.5 mg/g 蛋白质(等同物);戊二酸血症 I 型专用的特医食品中 Trp 含量不应超过 8 mg/g 蛋白质(等同物)^[3]。制备上述特医食品的途径一种是蛋白质水解物脱除特定氨基酸,另一种是游离氨基酸复配。蛋白质水解体系复杂,选择性高效脱除特定氨基酸的同时需要尽可能减少其他氨基酸和肽类物质的损失。复配游离氨基酸一般来源于工业化生产,产品中很可能含有生理差异巨大甚至毒性的对映体。因此,AAA 的脱除和分析对制备和评价 AAA 代谢疾病患者的特医食品十分必要。

本文分析了 AAA 的结构特点与理化性质,总结了近年来基于活性炭、树脂等吸附材料脱除 AAA 的技术进展,并从样品前处理、手性分离和吸附-传感 3 个维度综述了基于二维纳米材料、分子印迹、环糊精、金属有机骨架等材料分离分析 AAA 的应用,通过探讨各类技术的优缺点,为 AAA 的吸附脱除和分离分析方法的发展提供参考。

引用本文:鲁晨辉,张毅,苏宇杰,王文龙,冯永巍. 食品中芳香族氨基酸的分离分析技术研究进展. 色谱,2022,40(8):686-693.

LU Chenhui, ZHANG Yi, SU Yujie, WANG Wenlong, FENG Yongwei. Advances in separation and analysis of aromatic amino acids in food. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(8):686-693.

1 芳香族氨基酸的种类与性质

3 种 AAA 的结构如图 1 所示,由于分子中带有共轭芳环,因此可以吸收 260 nm 或 280 nm 的紫外光,这是 AAA 区别于其他氨基酸的重要特点。

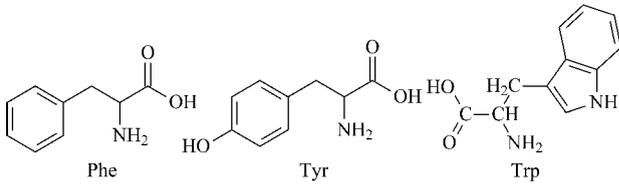


图 1 AAA 的结构式

Fig. 1 Structures of aromatic amino acids (AAA)

AAA 的吸附与吸附剂性质(如表面电荷、孔结构、表面形貌和化学性质)、吸附环境(如 pH、离子强度、溶剂组成和温度等)有关,也与 AAA 自身性质(如相对分子质量、分子结构、官能团、溶解度、极性)有关。分子间作用力在 AAA 的吸附过程中发挥着重要作用。

2 芳香族氨基酸的吸附脱除技术

蛋白质水解物类特医食品配料中的 AAA 脱除方法主要有超滤法、活性炭吸附法和树脂吸附法。超滤法分离效率高,但容易造成低相对分子质量营养成分(如游离氨基酸和寡肽)的损失^[2]。吸附法具有不易影响生物活性、使用有机溶剂少、吸附过程 pH 变化小、设备简单且廉价、操作简便和安全性高等优点,被广泛运用在食品领域。以下介绍活性炭、树脂等材料在 AAA 吸附中的应用。

2.1 基于活性炭的芳香族氨基酸吸附脱除技术

活性炭由含碳的物料加工而成,是目前应用最

广泛的吸附剂之一。活性炭对芳香族化合物的吸附能力大于脂肪族化合物,因此可以被用于 AAA 的特异性吸附。活性炭对 AAA 的吸附能力还受活性炭的理化性质和吸附环境的影响,孔径更小、比表面积更大的活性炭往往具有更强的吸附能力。与 pH 6 或 pH 9 相比,活性炭在 pH 3 的吸附体系中展现出对 Phe 更强的吸附能力,原因是氨基酸的等电点和活性炭的零电荷点在不同 pH 下会产生不同的静电作用^[4]。Belhamdi 等^[5]以农业废弃物枣核为原料,通过化学活化法制备活性炭,发现活性炭对 L-Trp 的吸附为单层物理吸附,吸附能力取决于 pH 值和离子强度。

由于活性炭成本低、吸附速率快且对 AAA 具有一定的选择性,现已作为吸附剂广泛用于 AAA 的脱除、高 *F* 值(此处 *F* 值代表 Fischer 比率,指支链氨基酸与芳香族氨基酸的物质的量之比)的寡肽产品制备以及肝性脑病和 PKU 等代谢疾病患者的辅助治疗中。

Alves 等^[6]以玉米芯为原料,通过热处理使其转化为多孔活性炭用于 Phe 的吸附,其吸附机制是 Phe 的苯环与碳表面石墨烯环之间的 π - π 相互作用。Su 等^[4]对活性炭吸附 Phe 的机制进行了研究,发现吸附过程中疏水相互作用占主导地位。如图 2 所示,活性炭上的石墨环与 Phe 的苯环发生疏水相互作用,活性炭上的羟基和羧基与 Phe 上的极性分子和官能团发生反应,形成氢键和静电相互作用。

表 1 为文献报道的以活性炭为吸附剂制备的高 *F* 值寡肽产品。相比于其他技术,活性炭依旧存在吸附特异性差、难以回收、环境污染较大等问题,对

表 1 以活性炭为吸附剂制备的高 *F* 值寡肽

Table 1 High-Fischer ratio oligopeptides prepared using activated carbon as adsorbent

Raw materials	Proteases	Adsorbents	Fischer ratio	Reference
Corn	alkaline protease, neutral protease	activated carbon	21.92	[7]
Corn	bacillus natto alkaline protease	modified activated carbon	21.80	[8]
Crude corn peptides	α -chymotrypsin, carboxypeptidase A	activated carbon (different type)	41.87	[9]
Tuna	pepsin, flavor protease	activated carbon (200 mesh)	30.33	[10]
Chlamys farreri	compound protease, flavor protease	activated carbon (200 mesh)	34.73	[11]
Antarctic krill	alkaline protease, flavor protease	activated carbon	21.12	[12]
Minced squid	pepsin, flavor protease	activated carbon (50 mesh)	/	[13, 14]
Yeast	α -chymotrypsin, carboxypeptidase A	modified activated carbon	30.00–40.00	[15]
Soy protein	alkaline protease, flavor protease	activated carbon (different type)	18.90	[16]
Grass carp	pancreatin, papain	activated carbon (different type)	/	[17]
Pearl oyster	pancreatin	activated carbon	24.58	[18]
Goat milk	pepsin, flavor protease	activated carbon (200 mesh)	26.32	[19]

/ indicates no relevant data mentioned in the reference. Fischer ratio means the molar ratio of branched-chain amino acids to AAA.

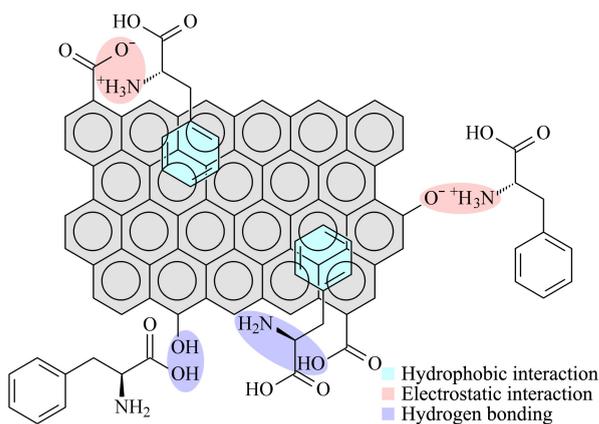


图 2 Phe 与活性炭相互作用示意图

Fig. 2 Schematic of the interaction between Phe and activated carbon

活性炭纤维表面化学改性能适当改善吸附特异性差的问题。

2.2 基于树脂的芳香族氨基酸吸附脱除技术

2.2.1 离子交换树脂

离子交换树脂是含有可交换离子的活性官能团的网状高分子化合物,分为大孔型和凝胶型。大孔型离子交换树脂具有较大的比表面积和吸附容量,吸附速度快,使用周期长,平均成本较低,且根据极性差异可以达到较好的选择性。因此,大孔型离子交换树脂是目前 AAA 吸附使用最多的树脂。AAA 具有非极性结构,因此在进行 AAA 的吸附分离时通常选择非极性的大孔型离子交换树脂。Jiao 等^[20]选用弱极性的树脂 XDA-200 为吸附剂,发现 L-Trp 的吸附主要是基于 π - π 相互作用和疏水相互作用。在低浓度下,AAA 与聚苯乙烯树脂基质之间存在非离子相互作用,其能够增强 AAA 在离子交换树脂上的吸附。

除与树脂本身的化学结构有关外,AAA 的吸附效果还受吸附环境、吸附流速等因素的影响。随着离子强度的增加,AAA 的吸附量随之增加。当料液初始 pH 值介于 3.5~4.5 时,对平衡吸附量影响不大,但 pH \leq 2.0 时则会降低 AAA 在树脂上的吸附量。张婷婷等^[21]发现随着温度升高,001 \times 7 阳离子交换树脂对 L-Trp 的吸附率逐渐升高,但温度过高时,L-Trp 的侧链与树脂的疏水相互作用被破坏,吸附量下降。

使用蛋白质水解物作为原料吸附脱除 AAA 制备特殊食品的过程中,水解液中的 AAA 可能以游离态和结合态两种形式存在。因此,吸附剂对蛋白质

水解物中 AAA 的吸附能力需要进一步评估。吸附树脂对游离氨基酸有一定的选择性,但支链氨基酸也易被吸附,氨基酸分子的极性、分子结构和分子体积对吸附能力均有一定影响。赵谋明等^[22]使用 4 种吸附树脂研究其对草鱼蛋白质水解物的吸附性能,发现比表面积大、孔径小的 XDA-200 具有更大的吸附量。Bu 等^[23]使用 D101 大孔树脂柱从乳清蛋白质水解物中去除 Phe,吸附后水解物中 Phe 含量为(1.38 \pm 0.11) mg/g 蛋白质等同物,且 600 Da 以下的肽段比例上升,测得水解物的苦涩味强度有所增加,但芳香活性化合物如美拉德反应和脂质氧化产物在吸附后减少。

2.2.2 壳聚糖树脂

壳聚糖分子中的氨基、羟基等活性基团能够赋予其较强的吸附能力,交联和接枝功能性基团可以实现壳聚糖的选择性吸附。Zhang 等^[24]使用戊二醛作为交联剂,使用 Phe 修饰交联后的壳聚糖树脂,该材料具有从混合氨基酸溶液中特异性吸附 AAA 的能力,推测 π - π 疏水相互作用和静电相互作用在吸附过程中起主导作用。Jiang 等^[25]采用苯乙胺修饰壳聚糖树脂,实现了对 AAA 的选择性吸附,材料对 3 种 AAA 的吸附能力依次为 Phe>Tyr>Trp。苯乙胺的苯环与 Phe 的苯环匹配度高能产生较强的疏水相互作用,而 Tyr 中的酚羟基会增大空间位阻,Trp 中吲哚环的电子分布与 Phe 中的苯环不同,因而导致疏水相互作用降低。

2.3 其他潜在脱除方法

二氧化钛对 AAA 的亲合力优于脂肪族氨基酸,吸附作用由疏水相互作用主导^[26]。AAA 在锐钛矿(TiO_2)纳米颗粒模型表面的吸附稳定性顺序为 Tyr>Phe>Trp^[27]。AAA 结合亲水基团后,在 TiO_2 表面的附着能力显著增加^[26,28]。在 GB 2760-2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中,二氧化钛被允许作为着色剂用于糖果蜜饯、果酱、可可制品、固体饮料等食品类别^[29],可见其毒性较低,有望以吸附剂形式应用于食品工业。

此外,接枝 β -环糊精(β -CD)的磁性碳纳米管可通过外加磁场吸附实现 Trp 的高效分离^[30]。分子印迹技术可以提高 AAA 的分离选择性,进一步结合磁性纳米材料可以提高分子印迹聚合物在料液中的分离性能,有望实现工业连续化生产^[31,32]。基于碳水化合物的反相胶束系统对 AAA 也有较好的包合效果,目前已经有两种新型 Gemini 表面活性剂用

于 AAA 的吸附,AAA 以 Phe>Tyr>Trp 的顺序被包封,且 AAA 的包封量随着表面活性剂疏水链长度的增大而增加^[33,34]。沸石、固定化 DNA 膜和金属锆对 AAA 也有良好的吸附能力,其在食品体系中的适用性及其残留毒性有待评估^[35-37]。

3 芳香族氨基酸的分离分析技术

分离技术对食品中 AAA 的分析有重要作用。柱后衍生阳离子交换色谱法、柱前衍生高效液相色谱法以及高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法等均可用于氨基酸的分离分析^[38]。但上述方法对 AAA 与对其他氨基酸无本质差异,在柱前并未对 AAA 做特异性分离富集。表 2 总结了部分材料在 AAA 特异性分离分析中的应用,以下将从样品前处理、手性分离和吸附-传感 3 个维度探讨基于选择性吸附的 AAA 分离分析技术。

3.1 样品前处理

一些无机纳米材料和有机聚合物表现出了较强的 AAA 富集能力,被应用在 AAA 分析的样品前处理环节。Niu 等^[41]开发了一种以氧化石墨烯复合 SiO₂ 的纳米材料作为吸附剂,用于分析检测黑芝麻中的 L-Trp。Keskinates 等^[50]制备了新型聚丙烯腈(PAN)和聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)纳米纤维基杯芳烃四酯单元,并发现其对 AAA 具有良好的结合能力。

金属有机骨架(metal organic frameworks, MOFs)具有孔隙率高、比表面积大、孔径均匀可调等优点,对 AAA 的吸附优于脂肪氨基酸,其吸附过程为吸热反应,机理涉及静电作用、氢键和 π - π 作

用等^[51,52]。陆思嘉等^[51]使用溶剂热法制备了 MOFs HKUST-1,对 Tyr、Phe 和 Trp 的饱和吸附量分别达到 248.65、143.67、140.09 mg/g。Jonckheere 等^[39]选用 Zr-MOF MIL-140C (Zr-4,4'-联苯二羧酸盐 MIL-140C)对水溶液和小麦秸秆蛋白质水解物溶液进行 AAA 吸附实验,发现与 L-Phe 苯基侧基相比,L-Trp 因具有较大的吡啶基而更易与 MIL-140C 的疏水部分形成氢键,促进 L-Trp 的吸附,并与在水解物溶液中带负电荷的氨基酸发生共吸附。Li 等^[40]将 MOFs 与磁性碳纳米管结合制备了 Fe₃O₄-MWCNTs-OH @ poly-ZIF67,该材料对 AAA 表现出优异的选择性和吸附亲和力,可用于百合中 3 种 AAA 的选择性测定。

3.2 手性分离

对映体具有相同的化学和物理性质,但生物学性质和药理活性以及毒理学效应常存在明显的差异。例如,L-Phe 广泛应用于制药和食品工业中的蛋白质生物合成,而 D-Phe 被认为可以抑制分解脑啡肽的酶活性,使其具有潜在的镇痛作用。因此,氨基酸对映体的分离分析在特医食品制备领域具有重要意义,而 AAA 手性识别材料的开发和应用是其关键技术。

环糊精是一种环状低聚糖,独特的环状空间结构形成了亲水外壳和疏水内腔,具有选择性包裹疏水性分子的能力。刚性 β -CD 聚合物树脂对 Phe 和 Tyr 有较强的吸附能力,其尺寸、刚性适中,热稳定性和机械稳定性较好,可用于固定床吸附和催化。李英杰等^[42]采用原位生长法制备了 ZIF-8 @ β -CDPs 金属骨架复合微球,用于手性 AAA 的吸附。

表 2 部分材料在 AAA 特异性分离分析中的应用

Table 2 Applications of some materials in selective AAA separation and analysis

Application	Target	Sample	Adsorbent	Analytical method	Reference
Sample pretreatment	L-AAA	protein hydrolysate	MOFs	HPLC	[39]
	AAA	lily	MWCNTs and MOFs composite	HPLC	[40]
	L-Trp	black sesame seed	GO@ SiO ₂	HPLC	[41]
	AAA	AAA aqueous solution	ZIF-8@ β -CDPs	/	[42]
Chiral separation	L-Phe	D,L-Phe; D,L-Trp	L-Phe-imprinted cryogel cartridge	FPLC	[43]
	L-AAA	D,L-AAA mixture	surface functionalized magnetic nanoparticles	HPLC	[44]
	D-Phe	D,L-Phe mixture	D,L-Ala-CD/SiO ₂	absorption spectroscopy	[45]
Adsorption-sensing	L-Phe	artificial plasma	L-Phe imprinted SPR sensor	SPR	[46]
	Phe, Tyr	standard solution	Ni@ CNFs@ Au	SERS	[47]
	Phe	AAA aqueous solution	pyrene@ 2 β CD	absorption spectroscopy	[48]
	L-AAA	milk	bi-enzyme nanocomposite film-based biosensor	amperometric measurements	[49]

/ indicates no relevant data mentioned in the reference. MOFs; metal-organic frameworks; MWCNTs; multi-walled carbon nanotubes; GO; graphene oxide; ZIF-8; zeolitic imidazolate framework-8; β -CDPs; β -cyclodextrin polymer microspheres; CNFs; carbon nanofibers; FPLC; fast protein liquid chromatography; SPR; surface plasmon resonance; SERS; surface-enhanced raman scattering.

具有疏水结构和咪唑环的 ZIF-8 可与 AAA 的苯环相互作用,通过改变 AAA 的手性微环境使其更易吸附 L-Phe。

磁性二氧化硅纳米粒子表面接枝羧甲基- β -CD,基于磁作用力可以实现 AAA 的手性分离^[44,53]。对映体的疏水部分渗透到 CD 的疏水腔中形成包合物,AAA 分子手性中心的氨基与吸附剂分子中的仲羟基形成氢键,促进了 L-对映体的选择性吸附^[54]。使用乙酸纤维素和海藻酸钠与 β -CD 共混合可制备用于 Phe 和 Trp 手性拆分的膜,该膜具有较高的热稳定性,对 Trp 和 Phe 对映体的最大分离率分别达到 9.0% 和 10.9%^[55]。使用 β -CD 键合二氧化硅,再使用上述材料和丙氨酸两种对映体分别衍生,以上 3 种材料对 D-Phe 的吸附能力明显高于 L-Phe,对两者的拆分因子高达 3.48,且具有良好的循环再生能力^[45]。

丙烯酰胺 CD 和 *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺与乙烯基化硅胶共聚可以增强材料的机械强度,可用于高效液相色谱固定相对 Phe 进行手性分离^[56]。吴丽仙等^[57]以 D,L-Trp 为模板分子, β -CD 及其衍生物为单体,通过不同印迹体系和合成方法制备了一系列分子印迹聚合物,筛选出了能够在 6 种 AAA 的复杂体系中特异性拆分 D,L-Trp 的分子印迹聚合物,其拆分因子为 1.477。利用自制的手性功能单体合成分子印迹聚合物或分子印迹膜可以实现对 L-Phe 的手性拆分^[58-60]。

基于分子印迹的冷冻凝胶柱可以通过两性离子使凝胶表面形成水化层,实现针对 L-Phe 的高效手性分离^[43]。使用硅胶 60F-254 高效薄层色谱(HPTLC)板可分离 D,L-Phe 和 L-Tyr,有机溶剂使用较少^[61]。Lomenova 等^[62]使用高效液相色谱法对实际样品中的 Phe 进行分离和检测,发现在膳食补充剂样品中能够检测到两种对映体形式,在能量饮料样品中只检测到 L-Phe,对两种对映体的检出限均为 0.1 g/mL。毛细管电泳在反电渗模式下通过配体交换毛细管电泳法可以在较短时间内实现 AAA 的对映体分离^[63]。

3.3 吸附-传感

表面增强拉曼散射(surface enhanced raman scattering, SERS)通过将分子吸附在金属纳米粒子的表面以增强分子的拉曼散射信号,这一技术可以用来识别传感 AAA 信号。与脂肪族氨基酸相比,Phe 的特殊取代基团是苄基。如图 3 所示,在与金

属原子(Cu、Au、Pt)发生吸附时,Phe 的羧基端结合在金属原子的顶部位点上,苄基以平坦的构象吸附在金属原子上,促进 π 电子与底物之间的相互作用,降低结合自由能,维持吸附几何结构的稳定性^[64]。SERS 光谱可以鉴定出 L-Phe 和 L-Trp 上苯环和咪唑环的特征拉曼谱线,且拉曼信号强度与物质浓度具有良好的相关性^[65]。Wu 等^[47]将 Au 沉积在碳纳米纤维包裹的磁性镍纳米颗粒上用于对 AAA 进行磁分离和 SERS 分析,Phe 和 Tyr 的检出限分别为 1×10^{-11} mol/L 和 1×10^{-13} mol/L。

碳纳米管(carbon nanotubes, CNTs)结构类似卷曲石墨烯,带负电的羧基与带正电的氨基从管表面伸向水溶液中,既能提供静电斥力防止 CNTs 团聚,又可以提供氨基酸吸附位点^[66]。相比于其他氨基酸,AAA 对 CNTs 有更强的亲和力,两者形成的聚集集体较为稳定^[67,68]。相比于扶手形碳纳米管,锯齿形碳纳米管对 Phe 分子具有更大的结合能^[69]。对单壁碳纳米管的氧化处理有利于氨基酸在纳米管上的吸附^[70],侧壁改性可以改变 CNTs 表面的理化性质,使其高效手性识别 AAA。Wang 等^[49]将辣根过氧化物酶和 L-氨基酸氧化酶固定得多壁碳纳米管修饰的玻碳电极表面制备成双酶纳米复合膜生物传感器,用于分析牛奶等复杂样品中的 AAA,具有较高的回收率。

石墨或氧化石墨烯与 Trp 形成的复合物具有高稳定性,而石墨烯与 Tyr 的结合更倾向于平行取向;氧化石墨烯或石墨烯与 Phe 和 Trp 的相互作用主要表现为物理和化学吸附共同作用,与 Tyr 则表现出更强烈的化学吸附^[71-73]。石墨对 AAA 的吸附很敏感,在吸附过程中主要表现为化学吸附,有望开发为 AAA 生物传感器^[74]。Hussain 等^[75]研究了 AAA 在二维硅烯和锗烯片上的结合原理,发现 AAA 通过物理吸附和化学吸附结合到两种薄片上,且 AAA 的引入改变了硅烯和锗烯纳米片的电子特性,

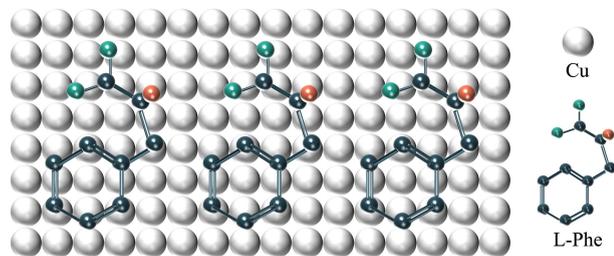


图 3 Phe 与铜原子发生吸附作用的示意图
Fig. 3 Schematic of the adsorption of Phe with copper atoms

有望用于 AAA 的检测。Song 等^[76]发现,3 种 AAA 可以通过物理吸附作用吸附在 MoS_2 的表面,AAA 的苯环可与 MoS_2 表面的硫原子之间产生平行相互作用。在 Au 修饰的 MoS_2 表面,AAA 通过与 Au 原子的共价连接及其与 MoS_2 的非共价作用形成吸附,吸附能力表现为 $\text{Trp} > \text{Tyr} > \text{Phe}$ 。碳纳米管、石墨烯等二维材料目前尚未被批准应用于食品加工工业,但其有可能在 AAA 分离分析中发挥巨大作用^[77]。

微晶天平是一种新型的、极为灵敏的检测技术,在 AAA 吸附-传感领域有初步的应用。Mirmohseni 等^[78]在石英晶体电极上涂布分子印迹聚合物,可用于石英晶体纳米天平技术识别检测 Phe。Cimen 等^[46]用紫外线聚合法将 L-Phe 分子印迹聚合物薄膜合成到表面等离子共振 (SPR) 芯片上,用于 L-Phe 的 SPR 传感检测。Titov 等^[48]制备了一种基于超分子苾-2-CD 复合物的温度依赖型荧光传感器,可用于 Trp 和 Phe 的电子吸收光谱的检测。纤维素纳米晶体具有独特的光学性能,但 Lombardo 发现单个 AAA 不会吸附到纤维素纳米晶体上,与纤维素纳米晶体的结合可能需要氨基酸数量更多的序列^[79]。

4 结论与展望

AAA 选择性吸附技术在特医食品加工和检测领域都有至关重要的作用。尽管目前发现对 AAA 具有选择性吸附能力的材料种类丰富,但实际应用于食品原料中 AAA 吸附脱除的材料仍以活性炭和大孔树脂为主。这两种方法均存在特异性差的问题,前者还有一定的环境污染风险。通过进一步评估新型吸附材料的安全性,未来可以开发更多绿色环保、特异高效的吸附方法以改进 AAA 的吸附技术。此外,二维纳米材料、分子印迹技术和金属有机骨架等材料已初步运用于 AAA 分离分析,有望实现更高特异性和更高灵敏度的 AAA 分析检测。

参考文献:

- [1] De W, Zhang Y M. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. Nanjing: Southeast University Press, 2018: 281
德伟, 张一鸣. *生物化学与分子生物学*. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 2018: 281
- [2] Lu C H, He Y X, Wei H D, et al. *Food Industry Science and Technology*, 2022, 43(16): 1
鲁晨辉, 何永熙, 魏皓东, 等. *食品工业科技*, 2022, 43(16): 1
- [3] GB 29922-2013
- [4] Su Y, Wang Y, McClements D J, et al. *Food Chem*, 2021, 364: 130285
- [5] Belhamdi B, Zoulikha M, Hamza L, et al. *Phys Chem Earth*, 2019, 114: 102791
- [6] Alves C C O, Franca A S, Oliveira L S. *LWT-Food Sci Technol*, 2013, 51(1): 1
- [7] Zheng M Y. [MS Dissertation]. Jinan: Jinan University, 2013
郑明洋. [硕士学位论文]. 济南: 济南大学, 2013
- [8] Zhang Z Y. [MS Dissertation]. Wuxi: Jiangnan University, 2021
张振洋. [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2021
- [9] Li T, Tian Y, Sun F, et al. *Process Biochem*, 2019, 84: 60
- [10] Luo H Y, Du S, Zheng B, et al. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2013, 44(4): 906
罗红宇, 杜帅, 郑斌, 等. *海洋与湖沼*, 2013, 44(4): 906
- [11] Pei J W, Cao Y N, Ding L K, et al. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2020, 11(22): 8284
裴继伟, 曹亚男, 丁连坤, 等. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(22): 8284
- [12] Chen L, Zhao Y, Li X, et al. *J Food Biochem*, 2019, 43(5): 1
- [13] Wang Q P, Yu X W, Tong X Q, et al. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(3): 113
王秋萍, 余新威, 童晓倩, 等. *中国食品学报*, 2017, 17(3): 113
- [14] Huang C. [MS Dissertation]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2015
黄程. [硕士学位论文]. 舟山: 浙江海洋学院, 2015
- [15] Wu J T, Tian Y P. *Food Industry Science and Technology*, 2019, 40(18): 194
吴警涛, 田亚平. *食品工业科技*, 2019, 40(18): 194
- [16] Yan L, Shi T, Li Y, et al. *Int J Pept Res Ther*, 2021, 27(2): 1363
- [17] Zhao M M, Ren J Y, Cui C, et al. *Food and Machinery*, 2005(6): 13
赵谋明, 任娇艳, 崔春, 等. *食品与机械*, 2005(6): 13
- [18] Zheng H, Zhang C, Cao W, et al. *Int J Food Sci Technol*, 2009, 44(6): 1183
- [19] Qin Y S. [MS Dissertation]. Jinan: Qilu University of Technology, 2021
秦于思. [硕士学位论文]. 济南: 齐鲁工业大学, 2021
- [20] Jiao P, Wei Y, Zhang M, et al. *ACS Omega*, 2021, 6(3): 2255
- [21] Zhang T T, Yang S Y. *Food Industry*, 2017, 38(2): 128
张婷婷, 杨生玉. *食品工业*, 2017, 38(2): 128
- [22] Zhao M M, Ren J Y, Cui C, et al. *Food and Fermentation Industry*, 2006, 32(4): 22
赵谋明, 任娇艳, 崔春, 等. *食品与发酵工业*, 2006, 32(4): 22
- [23] Bu T, Zhou M, Zheng J, et al. *LWT-Food Sci Technol*, 2020, 132: 109753
- [24] Zhang J, Zhou X, Zhou Z, et al. *Macromol Res*, 2014, 22(5): 515
- [25] Jiang W, Yang Y, Tao R, et al. *Carbohydr Polym*, 2017, 176: 236

- [26] Leader A, Mandler D, Reches M. *Phys Chem Chem Phys*, 2018, 20(47): 29811
- [27] Marcano E, Gregorio Cisneros J, Alayon J, et al. *J Comput Methods Sci Eng*, 2017, 17(1): 127
- [28] Shchelokov A, Palko N, Potemkin V, et al. *Langmuir*, 2019, 35(2): 538
- [29] GB 2760-2014
- [30] Yang X R, Lei L, Peng Z, et al. *Anal Methods*, 2019, 11(47): 5953
- [31] Gul S, Shah N, Arain M B, et al. *Polym Test*, 2019, 75: 262
- [32] Wei S M. [MS Dissertation]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2013
魏树梅. [硕士学位论文]. 天津: 天津科技大学, 2013
- [33] Singh N, Sharma L. *Tenside Surfactants Deterg*, 2018, 55(3): 220
- [34] Sharma L, Saroj. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2012, 74(1-4): 251
- [35] Kotova D L, Do Thi L, Krysanova T A, et al. *Russ J Phys Chem A*, 2011, 85(12): 2209
- [36] Higuchi A, Hayashi A, Kanda N, et al. *J Mol Struct*, 2005, 739(1-3): 145
- [37] Yang S, Lim H, Park E H, et al. *J Phys Chem C*, 2012, 116(49): 25840
- [38] Yu H, Mou S F. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 33(3): 398
于泓, 牟世芬. 分析化学, 2005, 33(3): 398
- [39] Jonckheere D, Steele J A, Claes B, et al. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(35): 30064
- [40] Li W, Zhang H, Shi Y. *J Chromatogr B*, 2017, 1059: 27
- [41] Niu J, Zhang X, Qin P, et al. *Food Anal Meth*, 2018, 11(9): 2438
- [42] Li Y J, Dai Q, Qin S L, et al. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2019, 38(7): 834
李英杰, 戴强, 秦世丽, 等. 分析实验室, 2019, 38(7): 834
- [43] Akgonullu S, Yavuz H, Denizli A. *Artif Cell Nanomed Biotechnol*, 2017, 45(4): 800
- [44] Ghosh S, Badruddoza A Z M, Uddin M S, et al. *J Colloid Interface Sci*, 2011, 354(2): 483
- [45] He K, Qiu F, Rong X, et al. *J Chem Technol Biotechnol*, 2014, 89(9): 1360
- [46] Cimen D, Bereli N, Denizli A. *Biosensors-Basel*, 2021, 11(1): 21
- [47] Wu H C, Chen T C, Tsai H J, et al. *Langmuir*, 2018, 34(47): 14158
- [48] Titov S V, Avakyan V G, Nazarov V B. *Russ Chem Bull*, 2018, 67(12): 2178
- [49] Wang L, Gong W, Wang F, et al. *Anal Methods*, 2016, 8(17): 3481
- [50] Keskinates M, Yilmaz B, Ulusu Y, et al. *Mater Chem Phys*, 2018, 205: 522
- [51] Lu S J, Ma X Y, Li Q S, et al. *Chinese Environmental Science*, 2019, 39(7): 2847
陆思嘉, 马晓雁, 李青松, 等. 中国环境科学, 2019, 39(7): 2847
- [52] Yan X, Yao P, Zhao G, et al. *eFood*, 2021, 2(1): 1
- [53] Mathe C, Devineau S, Aude J-C, et al. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81346
- [54] Ghosh S, Fang T H, Uddin M S, et al. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2013, 105: 267
- [55] Liu S. [MS Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2013
刘深. [硕士学位论文]. 杭州: 浙江工业大学, 2013
- [56] Akiyama T, Hishiya T, Asanuma H, et al. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2001, 41(1-4): 149
- [57] Wu L X, Zhu X F, Zeng L, et al. *Chemical Research and Applications*, 2015, 27(9): 1305
吴丽仙, 朱秀芳, 曾莉, 等. 化学研究与应用, 2015, 27(9): 1305
- [58] Wu Y X. [MS Dissertation]. Kunming: Yunnan University, 2012
邬宇茜. [硕士学位论文]. 昆明: 云南大学, 2012
- [59] Zeng L. [MS Dissertation]. Kunming: Yunnan University, 2014
曾莉. [硕士学位论文]. 昆明: 云南大学, 2014
- [60] Chen S, Huang X, Yao S, et al. *Chirality*, 2019, 31(10): 824
- [61] Mohammad A, Zehra A. *Proc Nat Acad Sci India A*, 2008, 78A: 11
- [62] Lomenova A, Hrobonova K. *Food Anal Meth*, 2018, 11(12): 3314
- [63] Adoubel A A, Morin C J, Mofaddel N, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394(2): 597
- [64] Wang D, Lei S B, Wan L J, et al. *J Phys Chem B*, 2003, 107(33): 8474
- [65] Botta R, Rajanikanth A, Bansal C. *Chem Phys Lett*, 2015, 618: 14
- [66] He Z, Zhou J. *Carbon*, 2014, 78: 500
- [67] Iwashita K, Shiraki K, Ishii R, et al. *Langmuir*, 2015, 31(32): 8923
- [68] Rajesh C, Majumder C, Mizuseki H, et al. *J Chem Phys*, 2009, 130(12): 124911
- [69] Wang C, Li S, Zhang R, et al. *Nanoscale*, 2012, 4(4): 1146
- [70] Zheng J, Song W, Wang L, et al. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009, 9(11): 6376
- [71] Mallineni S S K, Shannahan J, Raghavendra A J, et al. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(26): 16604
- [72] Pandit S, De M. *J Phys Chem C*, 2017, 121(1): 600
- [73] Ivancev-Tumbas I, Landwehrkamp L, Hobby R, et al. *Adsorpt Sci Technol*, 2020, 38(7/8): 286
- [74] Majidi R, Karami A R. *Struct Chem*, 2015, 26(1): 5
- [75] Hussain T, Vovusha H, Kaewmaraya T, et al. *Sens Actuator B-Chem*, 2018, 255: 2713
- [76] Song J, Li M, Liang H, et al. *Comput Theor Chem*, 2017, 1118: 115
- [77] Hansen S F, Lennquist A. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(1): 3
- [78] Mirmohseni A, Shojaei M, Farbodi M. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2008, 13(5): 592
- [79] Lombardo S, Eyley S, Schutz C, et al. *Langmuir*, 2017, 33(22): 5473