

高效液相色谱法同时测定糯米酒中 17 种氨基酸

曾玩娴,刘天质

(广东省酒类检测中心,广东 广州 510405)

摘要: 建立反相高效液相色谱法(RP-HPLC)用以测定糯米酒中的 17 种氨基酸。采用 OPA 试剂柱后衍生,RP-HPLC 经梯度洗脱后检测糯米酒中 17 种氨基酸的含量。结果表明,该方法测定 17 种氨基酸的线性相关系数 R 在 0.9990~0.9998,平均回收率为 94.5%~98.7%,精密度 RSD 为 0.51%~1.90%。该方法专属性强、操作方便、灵敏度高,可用于糯米酒和花雕酒等黄酒中 17 种氨基酸含量的检测。

关键词: 柱后衍生; 反相高效液相色谱法; OPA 试剂; 氨基酸; 黄酒

中图分类号: TS262.4; TS261.4; O652.63; O657.72 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-9286(2011)11-0120-02

Simultaneous Determination of 17 Kinds of Amino Acids Content in Yellow Rice Wine by RP-HPLC with Post-column Derivatization

ZENG Wanxian and LIU Tianzhi

(Guangdong Provincial Liquor Testing Center, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: RP-HPLC has been developed for simultaneous determination of 17 kinds of amino acids content in yellow rice wine. OPA reagent was used for post-column derivatization and RP-HPLC gradient elution was operated before the determination. The determination results suggested that the linear correlation coefficient r was within 0.9990~0.9998, the average recovery was 94.5%~98.7%, and precision RSD was 0.51%~1.90%. Such method was highly specific and easy to operate with high sensitivity. It could be used for the determination of amino acids in yellow rice wine.

Key words: post-column derivatization; RP-HPLC; OPA; amino acids; yellow rice wine

糯米酒的主要成分除乙醇和水外,还含有丰富的氨基酸。本文用高效液相色谱法(RP-HPLC)测定了糯米酒中的 17 种氨基酸,分别是天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、赖氨酸、精氨酸。

大多数氨基酸不含芳香环等生色团,无法直接用紫外法检出,需要先将氨基酸衍生为具有较强紫外或荧光吸收的衍生物。目前,氨基酸的分析应用不同的衍生试剂和衍生方法^[1-4],仅液相色谱法就有柱前衍生法、柱后衍生法 2 种^[5]。本文采用 OPA 作为衍生试剂,氨基酸的柱后 OPA 衍生化荧光检测法与传统的茚三酮方法相比,具有极佳的检测效果。采用 RP-HPLC 梯度洗脱法同时对糯米酒中 17 种氨基酸进行分析,各种氨基酸色谱峰和分离度较好,结果准确可靠,方法简便,为糯米酒和花雕酒等黄酒中多种氨基酸的检测提供了简便且实用的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2007-08-09

作者简介:曾玩娴(1969-),女,广东人,大学本科,工程师,发表论文多篇。

糯米酒。

1.2 仪器试剂

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪(在线脱气机、荧光检测器、柱温箱);梅特勒电子天平;Millipore 纯水仪。

标准品: 2.50 $\mu\text{mol/mL}$ 17 种氨基酸混标标准品, sigma 公司。

衍生化试剂: OPA 试剂 RA、RB,岛津公司。

流动相: MA、0.20 N 柠檬酸钠,高氯酸调配至 pH 值 3.2,岛津公司;MB、0.60 N 柠檬酸钠与 0.20 N 硼酸,用 4 mol/L NaOH 调配至 pH 值 10.0,岛津公司;MC,0.2 mol/L NaOH 溶液,岛津公司。所有使用的水均为 MILLIPORE 纯水仪过滤的超纯水。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件

分析柱: 钠离子交换柱(4.0 $\times$ 150 mm, 5 μm); **保护柱:** 钠离子交换柱(3.0 $\times$ 20 mm, 5 μm); **流速:** 1.0 mL/min **流动相:** OPA 衍生试剂: 0.25 mL/min; **柱温:** 50 $^{\circ}\text{C}$, **反应器温度:** 130 $^{\circ}\text{C}$; **进样体积:** 10 μL ; **检测波长:** 350~450 nm; **梯**

度洗脱条件见表 1。

表 1 洗脱条件

时间 (min)	MA (%)	MB (%)	MC (%)
0.00	100	0	0
14.00	100	0	0
30.00	89	11	0
34.01	0	100	0
39.00	0	100	0
39.10	0	0	100
44.00	0	0	100
44.10	100	0	0
70.00	100	0	0

1.3.2 样品稀释溶液

0.2 N Na⁺, 柠檬酸钠 pH 值 2.2。

1.3.3 标准氨基酸溶液

用上述样品稀释溶液, 将 2.50 μmol/mL 17 种氨基酸混标标准品稀释为 0.10 μmol/mL 标准溶液。

样品在分析前用去离子水稀释 10 倍, 经过 0.2 μm 的滤膜过滤直接进样分析。

1.3.4 标准曲线的制作

根据以上分离条件, 对氨基酸的混合标样进行测定, 使用浓度分别为 0.10 μmol/mL、0.07 μmol/mL、0.05 μmol/mL、0.03 μmol/mL、0.01 μmol/mL 的标样制作标准曲线。并且采用该色谱条件检出该方法的精密度、检出限、线性范围和回收率。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线线性范围

根据 1.3.4 项的检测结果可以看出, 17 种氨基酸在选定的分离条件下得到了很好的分离。17 种氨基酸的标准曲线线性回归系数 R 在 0.9990~0.9998 之间, 17 种氨基酸在 0.007~0.2 mg/mL 范围, 线性关系良好。

2.2 方法的精密度、检出限

根据以上色谱分离条件, 对氨基酸的混合标样进行测定, 使用浓度分别为 0.10 μmol/mL、0.07 μmol/mL、0.05 μmol/mL、0.03 μmol/mL、0.01 μmol/mL 的标样连续进样, 得出 17 种氨基酸的精密度 RSD 为 0.50 %~1.90 %, 表明该方法精密度符合氨基酸的测定要求。同时对 17 种氨基酸标样逐渐稀释后进样, 以 S/N=3 时的浓度为检出限, 得出 17 种氨基酸的检出限为 0.02~0.95 μg/mL。17 种氨基酸的精密度 RSD 为 0.51 %~1.90 %。

2.3 样品测定

本试验选用 4 种不同的黄酒进行分析, 酒样稀释 25 倍, 测得结果见表 2。

表 2 4 种黄酒氨基酸含量 (mg/L)

名称	1#黄酒	2#黄酒	3#黄酒	4#黄酒
天冬氨酸	276.7	237.3	193.9	92.8
苏氨酸	201.0	158.0	78.5	40.4
丝氨酸	235.5	203.3	136.3	66.4
谷氨酸	399.9	171.2	226.6	79.9
脯氨酸	431.0	431.2	128.3	37.4
甘氨酸	295.3	232.1	101.1	43.3
丙氨酸	659.6	443.2	228.4	427.4
半胱氨酸	26.0	62.5	56.6	11.0
缬氨酸	267.0	271.0	116.7	75.8
蛋氨酸	303.1	125.4	17.8	43.9
异亮氨酸	97.9	93.4	46.6	39.3
亮氨酸	381.7	324.7	250.5	127.4
酪氨酸	281.9	253.3	140.0	61.1
苯丙氨酸	300.5	274.1	162.2	75.4
组氨酸	53.4	56.3	157.7	23.2
赖氨酸	324.8	217.0	132.1	49.2
精氨酸	474.9	682.2	1001.1	95.7
总量	5010.2	4236.3	3174.2	1389.6

2.4 回收率试验

在上述样品中, 在 3# 黄酒酒样中分别加入 2.5 μmol/mL 标准品 0.8 mL、0.4 mL、0.2 mL 进行回收率试验, 测得 17 种氨基酸的回收率都在 94.5 %~98.7 %之间。

3 结论

本试验成功地采用液相色谱法建立了一种有效的检测糯米酒中 17 种氨基酸含量的方法。本方法专属性好, 各氨基酸衍生化后分离良好, 相互之间无干扰; 酒中的其他添加剂对氨基酸衍生物的出峰无干扰。为糯米酒和花雕酒等黄酒中多种氨基酸的检测提供了简便且实用的方法。

参考文献:

- [1] 丁永胜, 牟世芬. 氨基酸的分析方法及其进展[J]. 色谱, 2004, 22(3): 210-215.
- [2] Heinrikson RL, Meredith SC. Amino acid analysis by reversed-phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate[J]. Anal Biochem, 1984, 136: 65-74.
- [3] 付宜和, 杨国庆, 龚道芬, 等. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生化测定复方氨基酸注射液 HPLC 色谱条件的优化[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 762-76.
- [4] 倪维芳, 金瓯, 张劲松. HPLC 法测定复合氨基酸胶囊中氨基酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(4): 402-405.
- [5] 张志然. 葡萄酒中游离氨基酸的 HPLC 测定方法[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003(3): 44.