

不同工艺处理的烟草中游离氨基酸含量的反相 HPLC 分析

王 蕾¹, 孟广宇², 于瑞国¹, 廖旭东², 韩杰锋¹, 李 荣¹

(1 澳华达国际香料(广州)有限公司, 广东 广州 510530 2 将军烟草集团有限公司, 山东 济南 250000)

摘 要: 选取云南、贵州、河南的经不同工艺处理生丝、薄板干燥、高温气流干燥的烟丝; 采用微波协助萃取技术进行样品的前处理; 经活化的阳离子交换柱进行纯化, 再用柱前衍生反相高效液相色谱的方法对其游离态氨基酸进行含量分析。结果表明: 经过不同工艺处理的烟丝, 其游离态氨基酸含量呈现出不同程度的变化, 且不同地区的样本也表现出特征性差异。其中薄板烘丝与对照组的表现为: 在检出的 17 种氨基酸中, 组氨酸、脯氨酸、丙氨酸等含量下降 30% ~ 50%, 其余的变化不明显。而高温气流干燥与对照组则表现出明显的差异, 17 种氨基酸的含量均有不同程度降低, 尤其是如天门冬氨酸、脯氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸有明显的减少。

关键词: 游离态氨基酸; 反相高效液相色谱; 微波萃取; 烘丝

中图分类号: O657.72 Q517 TS 411 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2006)03-0046-04

Determination of Free Amino Acids in Tobacco of Different Technological Processes by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

WANG Lei¹, MENG Guang-yu², YU Ruiguo¹, LIAO Xu-dong², HAN Jie-feng¹, LI Rong¹

(1. OWADA International Flavors & Fragrances(Guangzhou) Limited Guangzhou 510530 China

2. General Tobacco Group Co., LTD, Jinan 250000, China)

Abstract A method was developed for the determination of free amino acids in tobacco of different areas(Yunnan, Guizhou and Henan) and of different technological processes using reversed phase high performance liquid chromatography(RP HPLC). The sample was pretreated with microwave-assisted extraction, purified by a cationic resin and derivatized in pre-column prior to the determination of free amino acid. The results showed that the concentration of amino acid varied with different technological processes and different areas. In comparison with the results obtained with the control group, the concentrations of His, Pro and Ala in tobacco dried on the sheet metal decreased 30% - 50%, while those of Asp, Pro, Lys, His and Arg in tobacco dried with high expansion dryer decreased significantly.

Key words Free amino acid; HPLC; Microwave-assisted extraction; Drying

烟草中的含氮化合物对烟草的感官呼吸质量和吸者健康都有重要的影响。氨基酸含量与烟草的品质有着密切的关系, 是重要的致香前体物质。烟草中氨基酸有 20 余种。在烟草调制、醇化或发酵、加工乃至燃烧过程中, 游离氨基酸与还原糖之间可发生酶催化及非酶催化的棕色反应, 即梅拉德反应(Maillard reaction)。生成多种具有蒸煮、烤香、爆米花香味特征的吡喃、吡嗪、吡咯、吡啶等杂环化合物, 某些氨基酸如苯丙氨酸还可以自身分解成香味化合物, 如苯甲醇、苯乙醇等。烟草加工过程特别是不同工艺处理所产生的氨基酸变化研究未见报道。开展此类研究对烟草在加工过程中香味物质损失的控制与补偿有着积极的指导意义。

本实验对超声波和微波两种协助萃取方法在时间、样品量及萃取效率等各方面进行了比较, 确定了以微波协助萃取分离烟草样本中的游离态氨基酸, 用反相高效液相色谱进行分析的方法。对不同地区、不同工艺处理的烟丝中游离氨基酸的变化进行了分析研究。

收稿日期: 2005-06-09 修回日期: 2005-09-05

基金项目: 国家烟草专卖局重点项目(国烟科[2004]No 615)

作者简介: 王 蕾(1975-), 女, 河北唐山人, 工程师, Tel: 020-82266888 E-mail: luxray@126.com

1 实验部分

1.1 材料与试剂

材料：选取云南、贵州、河南 3 个地区，同一年份同一等级的烟叶作为生丝样本。

HP1100型高效液相色谱仪(带 DAD、FLD、RID、自动进样器)；旋转蒸发仪(瑞士 BÜCHI公司)；超声波萃取仪(自制)；固相萃取仪；微波炉(WD800G8、800 W、2 450 MHz)。

试剂：氨基酸标样，邻苯二甲醛(OPA)和氯甲酸苄甲酯(FMCF)，硼酸缓冲溶液；三乙胺、四氢呋喃(色谱纯，德国默克公司)；二次蒸馏水。

1.2 样品制作

1.2.1 工艺处理 选取的烟叶样品先进行水分调节，控制在 10%~18% 之间后切丝。将烟丝分别进行薄板干燥和高温气流干燥(HXD)工艺处理。主要工艺参数见表 1。

待参数稳定后取样，且取样 3 次。将其混合均匀后从中取出一定数量得到实验室样品。

1.2.2 样品处理 准确称取一定量的样品于干燥洁净试管中，用一定比例一定体积的乙醇水溶液在室温下微波萃取。滤液经活化的离子交换萃取柱并经离心分离、过滤后，用 HP1100液相色谱仪进行分析。

1.3 柱前衍生化

用自动进样器吸取 5.0 μL的硼酸缓冲液，再吸取 1.0 μL的 OPA，洗针 1 次，再吸取 2.0 μL 样品，再洗针 1 次，原位混合 8 次，吸取 1.0 μL FMOC，洗针 1 次，再在原位混合 5 次，进样。

1.4 液相色谱条件

色谱柱：HypersilAA-ODS C18(2.1 mm×200 mm)，柱温 40℃。

流动相 A：(1.35±0.025) g 三水合醋酸钠，加入 500 mL 纯水溶解，加 90 μL 三乙胺，用 2% 醋酸调 pH 为 7.30±0.05，再加入 1.5 mL 四氢呋喃，混合均匀；流动相 B：(1.35±0.025) g 三水合醋酸钠，加入 100 mL 纯水溶解，用 2% 醋酸调 pH 为 7.30±0.05，再加入 200 mL 甲醇、200 mL 乙腈，混合均匀。

流速：0.45 mL/min，荧光检测波长为：激发，340 nm；发射，450 nm，PIM 增益为 12，14.5 min 开始：激发，266 nm；发射，305 nm；PIM 增益为 11，梯度：0 min 时 100% A，17 min 时 60% B，18 min 时 100% B，18.1 min 时流速 0.45 mL/min，18.5 min 时流速 0.8 mL/min，24 min 时 100% B，流速 0.45 mL/min，25 min 时 0% B。

1.5 氨基酸的定性、定量分析

对应标样谱图，应用保留时间进行定性。以正缬氨酸为内标物，采用内标法进行定量。

2 结果与讨论

2.1 烟叶中游离态氨基酸萃取方法选择

经微波萃取与超声波萃取的实验比较表明，微波萃取比超声萃取在样品量、萃取时间、萃取回收率等方面有明显的优势(见表 2)。本实验确定样品处理采用微波协助萃取。

2.2 微波萃取条件的优化

2.2.1 萃取剂的选择 在微波协助萃取中，应尽量选择对微波透明或部分透明的介质作为萃取剂，也就是选择介电常数较小的溶剂^[3]。实验选取了纯水、50% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇、90% 乙醇、100% 乙醇和 0.1

表 1 样品制作主要工艺参数

Table 1 Main technological parameters for sample preparation

Method	Threshold moisture/%	Sinocco temperature t/℃
Sheet metal drying	26	125
High expansion dryer	28	295

表 2 微波萃取与超声波萃取的比较

Table 2 Comparison of the operating conditions between microwave assisted extraction and ultrasonic extraction

Parameter	Ultrasonic extraction	Microwave assisted extraction
Sample mass m/g	5~30	0.5~1.0
Solvent volume V/mL	>300	10~20
Time t/min	60	<1

0.2 0.3 0.4 mol/L 盐酸水溶液进行萃取, 因为水是介电常数较大的物质, 所以在萃取过程中用盐酸水溶液得不到很好的萃取结果, 结果表明 50% 乙醇水溶液在微波协助萃取中能达到满意的提取效果。

2.2.2 萃取作用时间的影响 一般微波协助萃取辐射时间在 10~ 100 s 之间为最佳, 对于不同的物质萃取的时间不同, 但连续辐射的时间不可以太长, 否则容易引起溶剂沸腾。本实验所用的样品量为 1 g 经试验确定采用短时间多次的方式进行。萃取时间控制不超过 1 min 且分 3 次完成。

2.3 回收率

采用标样加入法测定回收率, 混合标样加入量为 0.200 mg/g 结果表明, 回收率在 83% ~ 102% 之间。除了丝氨酸、甘氨酸和酪氨酸的回收率低于 90% 外, 其它氨基酸的回收率均在 90% 以上, 平均回收率为 94%。说明该方法测定氨基酸的结果是比较准确的。

取浓度为 2 4 5 8 10 25 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的氨基酸混合标样各 2 μL , 分别加入等体积的 5 $\mu\text{mol/L}$ 的内标溶液, 进行 HPLC 分析, 见图 1。再以氨基酸浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 为横坐标 (x), 氨基酸与内标的色谱峰峰面积之比为纵坐标 (y) 作图, 得到各个氨基酸的工作曲线, 见表 3 结果表明, 各氨基酸在 2~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内均有良好的线性。

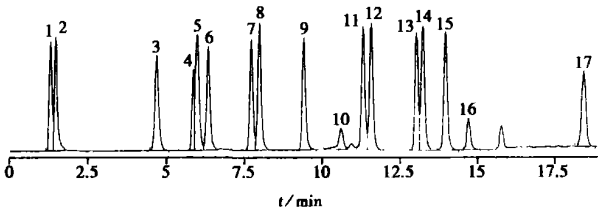


图 1 氨基酸标准样品液相色谱图
Fig 1 High performance liquid chromatogram of an amino acid standard

表 3 17 种氨基酸的对应色谱峰保留时间, 线性回归方程及相关系数
Table 3 The peak retention time, regression equations and correlation coefficients of 17 amino acids

Peak	Component	Retention time <i>t</i> /min	Linear equation	Correlation coefficient <i>r</i>
1	Asp	1.322	$y = 9.8064x + 1.2329$	0.99723
2	Glu	1.486	$y = 12.5368x + 3.0204$	0.98994
3	Ser	4.690	$y = 7.3370x + 1.7226$	0.99043
4	His	5.873	$y = 6.0061x + 0.74366$	0.99731
5	Gly	5.989	$y = 10.7399x + 2.7512$	0.98864
6	Thr	6.338	$y = 8.1596x + 1.0729$	0.99697
7	Ala	7.721	$y = 8.9233x + 1.6182$	0.99426
8	Arg	7.986	$y = 9.8203x + 0.7247$	0.99904
9	Tyr	9.407	$y = 9.3362x + 0.6186$	0.99923
10	Cys-SS-Cys	10.612	$y = 2.0152x + 0.40746$	0.99288
11	Val	11.319	$y = 10.5662x + 1.3932$	0.99695
12	Met	11.582	$y = 10.2072x + 0.5434$	0.99950
13	Pho	13.037	$y = 10.2512x + 0.4990$	0.99958
14	Ile	13.237	$y = 10.8870x + 1.1845$	0.99792
15	Leu	13.964	$y = 10.4527x + 1.5723$	0.99604
16	Lys	14.699	$y = 4.1438x + 0.6858$	0.99521
17	Pro	18.448	$y = 6.91295x + 3.3531$	0.96099

2.4 烟丝经不同工艺处理后游离氨基酸的变化

分别选取 2002 年产等级为 C3F 的云南、河南和贵州烟叶作为样本, 按“1.2”所述步骤进行处理分析, 表 4 中所列为云南烟叶样本处理后游离氨基酸含量的变化。从表 4 中可以看出:

- (1) 生丝分别经薄板干燥和高温气流干燥后氨基酸的含量均呈现不同程度的下降。其中以高温气流干燥处理的下降尤为明显。
- (2) 不同氨基酸对工艺处理的敏感程度表现不一, 表 4 所列为变化较显著的几种。该结果与文献报道基本吻合^[1]。

表 4 云南烟丝处理后游离氨基酸含量的变化
Table 4 Variation of free amino acids after treating Yunnan tobacco

Amino acid	Cut tobacco dryer $w/(mg \cdot g^{-1})$	Dried $w/(mg \cdot g^{-1})$		Change/%	
		Sheet metal drying	HXD	Sheet metal drying	HXD
Asp	0.115 1	0.071 3	0.051 8	- 38	- 55
Pro	2.126 0	1.275 6	0.425 2	- 40	- 80
Lys	0.088 2	0.030 9	0.008 8	- 65	- 90
His	0.120 3	0.055 3	0.009 6	- 54	- 92
Arg	0.029 6	0.012 4	0.026 6	- 58	- 91

(3) 不同地区的烟丝经工艺处理后游离氨基酸的变化同样表现出不同变化的差异。薄板干燥处理后烟丝的氨基酸变化不明显，除精氨酸、脯氨酸等几种有一定的下降外，大多数的变化不明显。而高温气流干燥处理后烟丝的氨基酸则表现出特征性差异。河南烟丝相对表现稳定，组氨酸、脯氨酸下降明显；云南烟丝的游离氨基酸变化显著，下降明显，有些氨基酸的下降高达 90%，如：组氨酸、精氨酸、脯氨酸、丙氨酸。

3 结 论

(1) 微波协助萃取分离烟草样本中的游离态氨基酸，经活化的阳离子交换柱进行纯化，用柱前衍生反相高效液相色谱进行分析的方法。具有简单、快速、高效等优点。

(2) 用高温气流干燥处理烟丝，某些特定的氨基酸含量有所下降。提示我们在除杂、降刺改善内在品质的同时，同样亦会带来可能存在的某些特定物质的损失。

(3) 云南烟丝经高温气流干燥处理，表现出较为明显的“热”不稳定性。提示我们在工艺处理时应采取分类处理。

(4) 从色谱图中可以看出，所分析的 17种氨基酸并非烟草中的全部种类。这需要补充完善氨基酸的标样种类，进行进一步的分析研究。为烟草在加工过程中致香成分的变化研究提供更多的信息。

参考文献:

[1] DAVIS D L, NIELSEN M T. 烟草－生产，化学和技术[M]. 刘立权译，北京：化学工业出版社，2003: 252
[2] 中国农业科学院烟草研究所. 中国烟草栽培学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1987: 85- 87.
[3] 元英进. 中药现代化生产关键技术[M]. 北京：化学工业出版社，2002: 110- 117.
[4] 李 丹，黄 龙. 反相高效液相色谱法测定烟叶中的游离氨基酸[J]. 烟草科技，2003, (2): 20- 24

(上接第 45 页)

参考文献:

[1] HARVEY J M. Table grapes and refrigeration with fumigation with sulphur dioxide[J]. Int J Refrig 1978, 1: 167- 172
[2] MUSTONEON H M. The efficiency of range of sulfur dioxide generating quality of Cameroon table grapes[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture 1992, 32: 389- 393
[3] SMILANICK J L, HARVEY J M. Influence of sulfur dioxide fumigant dose on residues and control of postharvest decay of grapes[J]. Am J Oenology and Viticulture 1990, 41: 131- 136
[4] NURY F S, BOLIN H R. Collaborative study on assay of sulfur dioxide in dried fruit[J]. JSoc off Agr Chem 1965, 48: 796
[5] 葛毅强，张维一. 鲜食葡萄采后的 SO₂熏蒸及检测方法的评述[J]. 食品科学，1997, 18(4): 59- 62
[6] 李 实. 离子色谱法同时测定水中五种阴离子[J]. 分析仪器，2003, (4): 39- 41
[7] 奚旦立，孙裕生，刘秀英. 环境检测(第 2版)[M]. 北京：高等教育出版社，1996: 127- 133