

不同产区、不同品种酿酒葡萄汁中精氨酸含量的检测

刘欠欠,高年发,李 磊,韩德新

(教育部工业微生物重点实验室,天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

摘要: 建立了酿酒葡萄汁中精氨酸含量的柱前衍生化及高效液相色谱分析方法。以 2,4-二硝基氟苯为柱前衍生化试剂,将氨基酸在碱性条件下 60 °C 下衍生 60 min,然后进样进行高效液相色谱测定。色谱条件:Aglient Eclipse AAA (i.d.5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱 流动相 A 乙腈-水 (1:1),流动相 B 加 1 % N,N-二甲基甲酰胺的醋酸铵缓冲溶液(pH=6.4) 流速 1.0 mL/min 柱温 33 °C 紫外检测器波长 360 nm。在精氨酸含量为 10~100 mg/L 的范围内,响应峰面积与精氨酸含量线性关系良好($R^2=0.9995$),采用外标法定量,平均回收率为 96.922 % (RSD=1.427 %)。对多个产区不同品种酿酒葡萄汁样品的测定结果表明,该法准确、可靠、快速,适用于葡萄酒生产原料质量控制要求。

关键词: 分析检测; 酿酒葡萄汁; 氨基甲酸乙酯; 精氨酸; 高效液相色谱

中图分类号: TS262.6; TS261.7; O657.72

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2009)09-0122-04

Determination of L-arginine Content in Varieties of Wine Grape Juice from Different Regions

LIU Qian-qian, GAO Nian-fa, LI Lei and HAN De-xin

(Key Lab of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Pre-column derivatization and high performance liquid chromatographic method (HPLC) has been developed for the determination of arginine content in wine grape juice. In the operation, amino acids were firstly derivatized with 2,4-dinitro-fluorobenzene (DNFB) at 60 °C for 60 min under alkaline conditions, and then HPLC was carried out. The chromatographic conditions were as follows: Aglient Eclipse AAA column (i. d.5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm) used, the mobile phase A was acetonitrile -water (volume ratio was 1:1), the mobile phase B was NaAc buffer (pH 6.4) containing 1 % N,N-dimethyl-formamide, column temperature was at 33 °C, flow velocity was 1.0 mL/min, and UV-detector was operated at 360 nm. There was a good linear relationship between the peak area and the concentration of arginine over the range of 10~100 mg/L ($R^2=0.9995$). The average recovery was 96.922 % (RSD=1.427 %). The detection of L-Arginine content in varieties of wine grape juice from different regions proved the method has the advantages including high accuracy and good repeatability and rapid detection and it could be used in quality control of wine grape juice.

Key words: analysis and determination; wine grape juices; ethyl carbamate; arginine; high performance liquid chromatography (HPLC)

氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate, Urethane) 是一种主要产生于发酵食品和饮料中的致癌物质,2002 年已经成为联合国粮农组织重点监控物质,并制订了国际标准,其含量不得超过 20 μ g/L。近年来,各国食品安全部门有关氨基甲酸乙酯的报道也不断出现,2006 年 10 月 25 日,加拿大安大略省酒类管制局(LCBO)在常规测试中发现 4 种葡萄酒含有可能致癌的氨基甲酸乙酯,停止销售并发出二级回收令。2007 年 4 月 10 日,世界卫生组织的国际癌症研究机构(IARC)正式将氨基甲酸乙酯归为 2A 类致癌物。2008 年 2 月 6 日,韩国食品药物管理局颁布食

品标准及规范的修正案草案,制订了葡萄酒内氨基甲酸乙酯的标准。葡萄汁中精氨酸在葡萄酒酿酒酵母和苹果酸-乳酸菌的代谢下产生氨基甲酸乙酯的前体物质,多种研究表明,葡萄酒中氨基甲酸乙酯的生成与葡萄汁中精氨酸的含量有很大的相关性。Ough 等人^[1]的研究报道,如果葡萄汁中精氨酸的含量超过 1000 mg/L,酿造的葡萄酒中 EC 的潜在含量就有可能超过美国对葡萄酒中 EC 的限定含量 15 μ g/L。因此,控制酿酒葡萄生产过程,降低葡萄汁中精氨酸含量是降低葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量的主要途径之一。为保证葡萄酒饮用安全性,葡萄酒工业

收稿日期:2009-05-05

作者简介 刘欠欠(1984-),男,山东广饶人,硕士研究生,主要从事葡萄酒分析方面的研究。

通讯作者 高年发(1945-),教授、博士生导师,天津科技大学生物工程学院,E-mail:gaonianfa@163.com。

应该对原料葡萄汁中 L-精氨酸进行检测, 并制订含量标准, 从而实现葡萄汁的 HACCP 控制。本研究目的在于建立一种简便、快速、灵敏的葡萄汁中精氨酸含量的检测方法, 这将对葡萄酒生产企业降低葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量有着重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

葡萄汁: 选用中国各地葡萄酒厂取得压榨后的葡萄原汁 14 个: 不同产区编号分别为甲(宁夏御马庄园)、乙(沙城长城庄园)、丙(烟台长城庄园)、丁(昌黎长城庄园), 不同的酿酒葡萄品种分别编号为 A(赤霞珠)、B(梅鹿辄)、C(蛇龙珠)、D(宝石解百纳), 每个品种葡萄汁都选择 2 个生产批次的样品; L-精氨酸(L-Arginine)标准品, 纯度 > 99.5%, Sigma-Aldrich 公司; 2, 4-二硝基氟苯衍生化试剂, 东京化成工业株式会社。甲醇、乙腈、异丙醇、N, N-二甲基甲酰胺均为色谱纯; 醋酸钠、醋酸、氢氧化钠均为优级纯。

1.2 仪器设备

HPLC: Agilent 1100 series UV200 型紫外检测器、Echrom 98 色谱数据处理工作站。酸度计: mettler toledo delta320 PH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 氨基酸专用色谱柱: Agilent Eclipse AAA (i.d. 5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm); 保护柱: C18/3 保护柱组件 (货号: 600220); 25 μ L 微量进样针: Agilent, made in USA; KQ2100 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器厂); 10~100 μ L、100~1000 μ L Dragon-med 系列手动可调式移液枪; 1.5 mL 离心管若干。干式恒温器 (Block Heaters) GL-150, 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 溶液配制

①衍生剂溶液: 准确量取 2, 4-二硝基氟苯 1 mL 置于 100 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度^[2]。

②衍生缓冲溶液: 称取 NaHCO₃ 4.2 g, 加入 100 mL 量瓶中, 定容并摇匀得 0.5 mol/L NaHCO₃ 溶液。

③定容缓冲溶液: 称取 KH₂PO₄ 3.4 g 置于 500 mL 容量瓶中, 加水溶解, 加入 0.1 mol/L NaOH 145.5 mL, 蒸馏水定容至刻度^[3]。

④醋酸钠缓冲溶液: 称取 4.1 g NaAc, 于大烧杯中加双蒸水 900 mL, 滴加 36% 醋酸用酸度计调 pH 至 6.4, 加 10 mL N, N-二甲基甲酰胺, 倒入 1000 mL 容量瓶定容至刻度^[4]。

⑤精氨酸标准溶液: 准确称取精氨酸 100 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用蒸馏水溶解并稀释至刻度, 摇匀即得

精氨酸标准溶液^[5]。

1.3.2 样品处理

各地葡萄酒厂新榨取的葡萄汁, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保藏。检测前, 用离心机 3000 r/min 离心 10 min, 去除沉底泥土和杂质等。每个样品都用蒸馏水稀释 10 倍, 取 50 μ L 加入 1.5 mL 离心管中, 加 50 μ L 衍生剂, 加 50 μ L 衍生缓冲溶液, 加 850 μ L 定容缓冲溶液, 保证反应总体积为 1.0 mL, 摇匀。将离心管放置到干式恒温器中, 设定 60 $^{\circ}$ C, 避光衍生反应 60 min, 到时间取出冷却至室温。最后, 用 0.45 μ m 针头过滤器过滤备用。一般衍生后的样品避光保存一周内检测是稳定的。

1.3.3 HPLC 色谱条件

流动相 A: 乙腈-水(1:1), 在线设置溶剂管理器的 2 种溶液体积百分比相等即可; 流动相 B: 醋酸钠缓冲溶液(pH=6.4); 总流速为 1.0 mL/min; 柱温 33 $^{\circ}$ C; 紫外检测波长 360 nm; 进样量 50 μ L^[6]。

2 结果与分析

2.1 实验条件研究

首先对不同浓度的精氨酸标准溶液进行检测, 在精氨酸的浓度为 300 mg/L 时, 液相色谱图见图 1 和图 2, 过量的 2, 4-二硝基氟苯出峰很大, 精氨酸出峰时间在 9.222 min 处。

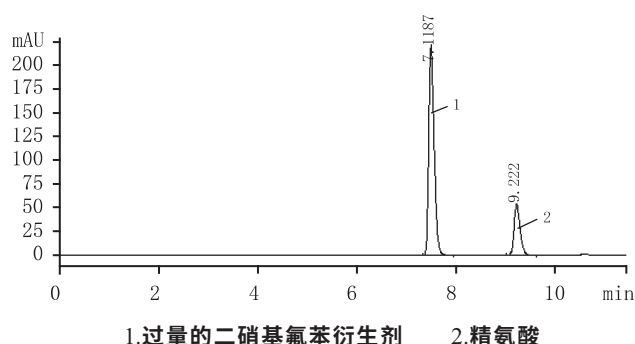
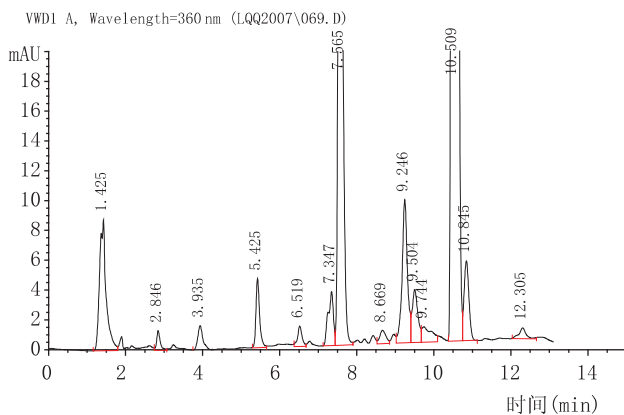
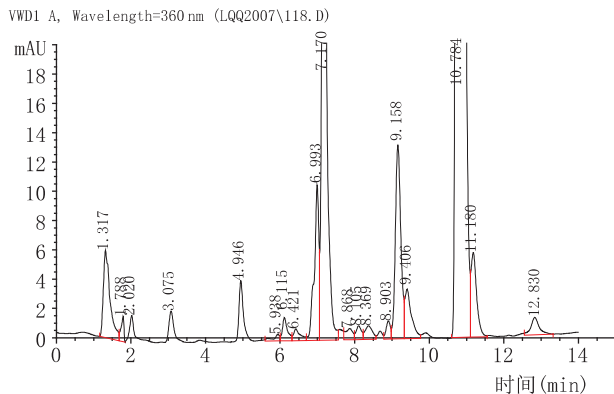
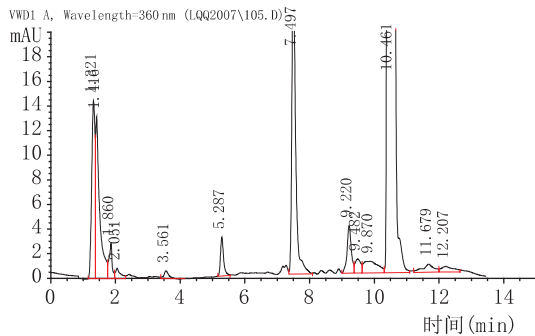


图 1 精氨酸标准品出峰时间的液相色谱图

当精氨酸浓度 < 5 mg/L 时响应很小, 工作站不能自动积分, 手动积分峰面积很小, 用于定量不准确。几乎为零。实际样品检测时发现, 由于葡萄汁中有多种芳香苯环类物质, 在 360 nm 有紫外吸收, 另外其他氨基酸也会对精氨酸的分离产生干扰^[7]。因此, 我们根据一般的检测多种氨基酸标准品的梯度洗脱方法进行了修正, 保证精氨酸出峰时间提前, 并减少其他物质的干扰, 发现洗脱梯度设为表 1 所示时分离效果较好, 反应过量的 2, 4-二硝基氟苯的出峰时间在 7.210~7.260 min 之间, 精氨酸的出峰时间在 9.150~9.250 min 之间。

2.2 精氨酸标准曲线的绘制



1. 甲 B1; 2. 乙 D1; 3. 丙 A1

图 2 不同葡萄酒样品的 HPLC 色谱图及精氨酸出峰时间

表 1 HPLC 梯度洗脱过程设计

序号	时间 (min)	水 A (%)	乙腈 B (%)	醋酸钠溶液 C (%)	备注
1	0.0	8	8	84	初始状态
2	0.3	8	8	84	—
3	4.0	15	15	70	—
4	6.0	17	17	66	—
5	10.0	23	23	54	—
6	12.0	8	8	84	恢复初始状态

配制浓度梯度为 8 mg/L、12 mg/L、16 mg/L、20 mg/L、40 mg/L 和 80 mg/L 的精氨酸标准溶液,用液相色谱检测峰面积 Y 为纵坐标,精氨酸实际质量浓度 X (mg/L) 为横坐标,得到图 3 所示标准曲线。

线性回归方程为: $y = 1.2554x + 2.5507$, 决定系数 R^2

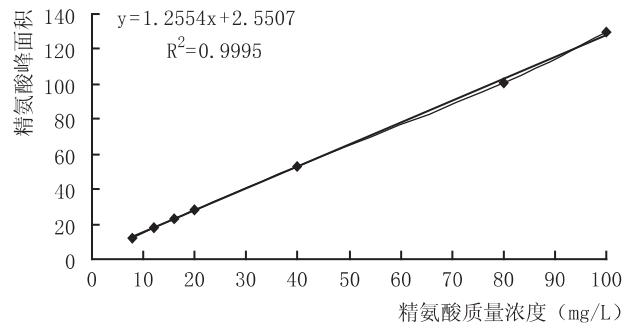


图 3 精氨酸含量的标准曲线

= 0.9995, 表明精氨酸浓度在 10~100 mg/L 范围内与液相色谱响应的峰面积线性关系良好。因此,样品中精氨酸的含量可采用外标法计算得出^[8]。

2.3 精氨酸检测的精密度和加标回收率实验

选取样品甲 A1 和乙 D1 都按前述方法衍生后连续测定 5 次,记录精氨酸响应峰面积,然后利用线性回归方程计算精氨酸含量。对结果计算平均值和相对标准偏差 (RSD, 表 2),在 2.401 %~2.792 %,表明实验稳定性较好,满足重复性要求。

表 2 酿酒葡萄汁样品中精氨酸含量检测的精密度

项目	样品编号					Average RSD (%)
	1	2	3	4	5	
甲 A1	213.27	200.91	214.83	214.62	208.88	210.50 2.792
乙 D1	617.56	623.22	610.52	591.01	629.25	614.31 2.401

对样品甲 A1 和乙 D1 添加精氨酸标准溶液,按前述方法衍生后进行回收率实验,结果见表 3。回收率在 96.69 %~97.15 %,RSD 为 1.548 %~1.589 %。

表 3 酿酒葡萄汁样品中精氨酸含量的加标回收率

样品	加标前 (mg/L)	加标量 (mg/L)	加标后 (mg/L)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
甲 A1	214.52	30	243.72	97.34	97.15	1.589
		50	264.79	95.52		
		100	313.11	98.59		
乙 D1	108.79	30	138.31	98.38	96.69	1.548
		50	156.56	95.53		
		100	204.95	96.16		

2.4 多个产区不同品种酿酒葡萄汁中精氨酸含量的测定结果

对全部样品按照如前所述的方法处理,然后用与做标准曲线时的 HPLC 相同条件进行检测,外标法定量,结果见表 4。

对多个产区不同品种的酿酒葡萄汁中精氨酸含量进行测定,结果表明,产地对精氨酸含量影响较大,甲产区明显比其他产区的精氨酸含量低很多;除了甲产区的 A 和 B 两种葡萄汁外,其他的相同产区的不同品种的酿酒

表4 多个产区不同品种酿酒葡萄汁中精氨酸含量

序号	样品编号	精氨酸含量(mg/L)	各产区平均值
1	甲 A1	213.268	284.793
2	甲 A2	274.896	
3	甲 B1	335.777	
4	甲 B2	315.229	
5	乙 A1	574.695	613.125
6	乙 A2	674.199	
7	乙 D1	617.557	
8	乙 D2	586.048	
9	丙 A1	577.226	602.821
10	丙 A2	554.612	
11	丙 C1	679.497	
12	丙 C2	599.951	
13	丁 A1	469.840	462.206
14	丁 A2	454.571	

葡萄汁精氨酸含量差别不是太大;同一个品种的葡萄汁都选择了不同压榨时间取的2个对照样品,结果表明,乙A和丙C的同一品种2个样精氨酸含量差别较大,这可能是由于酿酒葡萄原料采购的质量有差异。例如Ough等人^[1]的研究报道,如果葡萄汁中精氨酸的含量超过1000 mg/L,酿造的葡萄酒中EC的潜在含量就有可能超过美国对葡萄酒中EC的限定含量15 μg/L。总的来看,这几个产区的葡萄汁中精氨酸含量都小于1000 mg/L,从精氨酸作为葡萄酒中形成的氨基甲酸乙酯的影响因素来看,达到了质量控制要求。

3 结论

3.1 本试验选用了Aglient Eclipse AAA (i.d.5 μm, 4.6 mm×150 mm) 色谱柱,以2,4-二硝基氟苯为柱前衍生化试剂,将氨基酸在碱性条件、60℃下衍生60 min后,用高效液相色谱测定。建立了一种简便、快速、灵敏的检测葡萄汁中精氨酸含量的方法,确定了优化的色谱条件,达到较好的检测精密度和稳定性,精氨酸出峰时间比较稳定,通过改变洗脱条件使得与其他氨基酸峰的分离度提高。结果表明,精氨酸浓度在10~100 mg/L范围内与液相色谱响应的峰面积线性关系良好,葡萄汁中精氨酸含量采用外标法计算。这将对葡萄酒生产企业降低葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量有着重要的现实意义。

3.2 氨基甲酸乙酯的形成机理和质量控制的工作还需要更多更深入的研究^[9-12],进一步研究的关键点主要包括:酿酒酵母在酒精发酵后期氮源缺乏时,分解利用精氨酸、蛋白类、嘌呤嘧啶类物质形成的中间代谢产物含量的变化^[13];二次发酵过程中,乳酸菌的氮代谢与氨基甲酸乙酯的关系^[15];酿酒后期的半厌氧老熟过程中表面酵母释放到酒体中的未消耗的氨基酸、尿素、铵离子等物质的变

化,与氨基甲酸乙酯形成的直接或间接的关系^[16]。当前食品安全被高度重视,发酵食品和饮料中氨基甲酸乙酯问题也受到了国际社会的普遍关注。我国必须走在世界前列,对酒精饮料中氨基甲酸乙酯含量进行调查并制订相应的限量标准和降低措施,这将对提高葡萄酒等酒精饮料的质量控制和长远发展有重大意义。

参考文献:

- [1] Ough C.S, Stevens D, Almy J. Preliminary comments on effects of grape vineyard nitrogen fertilization on the subsequent ethyl carbamate formation in wines[J]. Am. J. Enol. Vitic. 1989, 40(3): 219-220.
- [2] 李东,孙家义. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生高效液相色谱法测定18种氨基酸[J]. 化学分析计量, 2004, 13(1): 18-20.
- [3] 李芳,史霄燕. 2,4-二硝基氟苯衍生化法在反相高效液相色谱测定氨基酸中的应用研究[J]. 色谱, 1995, 13(3): 200-202.
- [4] 梁新红. 中国葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究[D]. 西安:西北农林科技大学, 2008. 81-92.
- [5] 李瑜,江勇,李爽. 反相高效液相色谱法测定发酵液中L-精氨酸含量[J]. 工业微生物, 2004, 34(3): 32-34.
- [6] 王荔,徐玫,王宏志. 高效液相色谱法测定板蓝根中精氨酸含量[J]. 中国药业, 2005, 14(8): 29-30.
- [7] 曾新安,于淑娟. 酿造过程中葡萄酒氨基酸的变化[J]. 酿酒科技, 2006, 142(4): 50-54.
- [8] 杨浩,耿秀梅,万绍晖. 柱前衍生化反相高效液相色谱法测定板蓝根中的氨基酸[J]. 色谱, 2005, 23(4): 408-410.
- [9] 赵树欣. 饮料酒中的氨基甲酸乙酯应引起国人重视[J]. 酿酒科技, 1992, 51(3): 51-54.
- [10] 高年发,宝菊花. 氨基甲酸乙酯的研究进展[J]. 中国酿造, 2006, (9): 1-4.
- [11] 高年发,宝菊花. HPLC测定白兰地中的氨基甲酸乙酯[J]. 中国酿造, 2008, 190(13): 84-87.
- [12] Ying Zhang, Jian Zhang. Optimization of headspace solid-phase micro-extraction for analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages using a face-centered cube central composite design [J]. Analytical Chemical ACTA, 2008, (627): 212-218.
- [13] S.Q. LIU, G. G. PRITCHARD, M. J. HARDMAN, G. J. PILONE. Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(1): 310-316.
- [14] Ough C S, Crowell E A, Gutlove B R. carbamyl compound reactions with ethanol[J]. Am. J. Enol. Vitic. 1988a, 39(3): 239-242.
- [15] Liu S Q, Pilone G J. A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84: 315-327.
- [16] Fujinawa S, Burns G, Teja P. Application of acid urease to reduction of urea in commercial wines[J]. Am. J. Enol. Vitic. 1990, 41(4): 350-354.