

反相高效液相色谱法测定荔枝果实游离氨基酸

许柏球, 杨 剑

(深圳职业技术学院生物应用工程系, 广东 深圳 518055)

摘 要: 本文以邻苯二甲酰(OPA)与9-苄基羧酰氯(FMOC-Cl)作衍生剂, 正缬氨酸为内标, 利用二极管阵列(DAD)可变波长检测程序, 采用柱前衍生RP-HPLC法测定了4个荔枝品种果实的全谱游离氨基酸。结果表明: 各种氨基酸的保留时间(Rt)RSD为0.01%~3.02%、相对峰面积(A_x/A_i)RSD为1.19%~7.82%, 回收率为92.21%~114.24%; 荔枝果实中以丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)和苯丙氨酸(Phe)为主要氨基酸, 其总量超过游离氨基酸总量的60%, 4个荔枝品种的总游离氨基酸含量从大到小排序为: 淮枝、糯米糍、黑叶、桂味。
关键词: 荔枝; 全谱游离氨基酸; RP-HPLC; 可变波长检测

Study on Free Amino Acids in Litchi Varieties by RP-HPLC

XU Bai-qiu, YANG Jian

(Applied Biological Engineering Department, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 518055, China)

Abstract: This paper used RP-HPLC to assay the whole free amino acids in fruits of 4 Litchi varieties. In this method, OPA and FMOC were selected as pre-column derivatizing reagent, NVAL as Internal Standard, and DAD variable-wavelength as measure function. The results showed that the RSD% for RT and A_x/A_i of Amino Acids was from 0.01% to 3.02% and from 1.19% to 7.82% respectively. In the present study, the reclaim ratio was as high as 92.21% to 114.24%, indicating that this method was appropriate for free amino acid determination in fruits of Litchi varieties. The main free amino acids of fruits of four Litchi varieties are Ala, Glu, Arg, Asp and Phe, which occupied 60% of total free amino acids. Among four Litchi varieties, the content of total free amino acids from high to low is Huizhi, Luomizi, Heiye and Guiwei.

Key words: Litchi; total free amino acids; RP-HPLC; variable-wavelength measure

中图分类号 TS207.3

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)12-0156-04

OPA在2-巯基乙醇存在下与一级氨基酸迅速反应生成1-硫代-2-烷基异吲哚^[1], 生成的衍生物在338nm处均有较强的紫外吸收; FMOC能与带有仲胺基团的二级氨基酸如脯氨酸反应, 生成的衍生物在262nm处有较强的紫外吸收。本文采用OPA与FMOC作柱前衍生剂, 利用DAD可变波长检测程序即在同一通道用338nm和262nm双波长检测, 可同时检测样品中的一级和二级氨基酸, 操作简单, 衍生化反应迅速, 灵敏度高, 无杂质干扰。

荔枝(Litchi)是我国南方著名的特产水果, 其色、香、味俱佳, 被誉为中华之珍品。荔枝营养丰富、肉质鲜嫩但不易久存。测定荔枝果肉中的游离氨基酸含量, 对开发荔枝的营养功能具有重要的参考价值。

1 实验部分

收稿日期: 2003-11-25

作者简介: 许柏球, 男, 工程师, 讲师, 研究方向为液相和气相色谱分析。

1.1 仪器与试剂

仪器: Agilent1100高效液相色谱仪; 在线真空脱气机, 四元梯度泵, DAD二极管阵列检测器, 手动进样器(20 μ l定量环), HP-A.09.01化学工作站; Grant XB14超声波清洗器, IKA-T18 basic均质机, Centrifuge 5415D离心机, ORION-868酸度计。

试剂: 17种氨基酸标准品和混合品, OPA衍生剂, 由Agilent公司提供; 正缬氨酸(ISTD), FMOC(9-Fluorenylmethyl chloroformate), Sigma公司产品; 甲醇, 乙腈, 色谱纯, 天津协和公司; 三乙醇胺, 四氢呋喃, 乙酸钠, 分析纯, 广州化学试剂厂; 超纯水(电阻率18.2M Ω)。

1.1 材料与方法

1.2.1 试验材料

淮枝、桂味、糯米糍、黑叶四种成熟荔枝果实的果肉(−18℃冰箱保存)。

1.2.2 试剂配制

流动相A: 0.02mol/L 醋酸钠溶液1000ml, 加180μl 三乙醇胺, 用1%~2% 醋酸调pH7.20±0.05, 0.45μm 膜过滤后, 加3ml 四氢呋喃, 超声处理10min。

流动相B: 0.02mol/L 醋酸钠(pH7.2±0.025): 乙腈: 甲醇=1:2:2, 超声处理10min。

内标(ISTD)标准溶液: 称取58.6mg 正缬氨酸溶于50ml 0.1mol/L HCl 溶液中, 配成10nmol/μl 贮备液, 于0~4℃冰箱保存, 使用时用0.1mol/L HCl 稀释至1nmol/μl。

衍生剂邻苯二甲醛(OPA): Agilent 试剂盒, 浓度为10mg/ml; 衍生剂FMOC: 称取12.5mg 溶于5ml 乙腈溶液。配制的衍生剂于0~4℃冰箱保存, 备用。

氨基酸工作曲线: 将17种混合氨基酸标准品(浓度为1nmol/μl), 用0.1mol/L HCl 依次稀释成500、250、100、25nmol/μl 5个稀释度, 于0~4℃冰箱保存, 备用。

17种单氨基酸标准液: 称取25~60mg 单氨基酸溶于0.1mol/L HCl 溶液制成浓度为10nmol/μl 标准贮备液, 于0~4℃冰箱保存, 使用时用0.1mol/L HCl 稀释至2nmol/μl。

1.3 色谱分析条件

色谱柱 Hypersil-ODS C₁₈ 柱(5μm, 200mm×4.6mm, i.d.), 柱温: 40℃; DAD 可变波长检测程序和流动相梯度洗脱程序分别见表1和表2。

表1 DAD 可变波长检测程序

通道	时间(min)	样品波长	参比波长
A	0~20	338/10nm	390/20nm
A	20~25	262/16nm	324/8nm

表2 流动相梯度洗脱程序

时间t(min)	流动相B(%)	流速v(ml/min)
0	0	0.45
17.00	60	0.45
18.10	100	0.45
18.50	100	0.80
23.90	100	0.80
24.00	100	0.45
25.00	0	0.45

1.4 样品处理与衍生化

1.4.1 样品处理

取荔枝果肉用组织捣碎机捣碎成浆, 浆汁于4000r/min 离心10min, 取上清液0.45μm 膜过滤, 滤液于0~4℃冰箱保存, 备用。

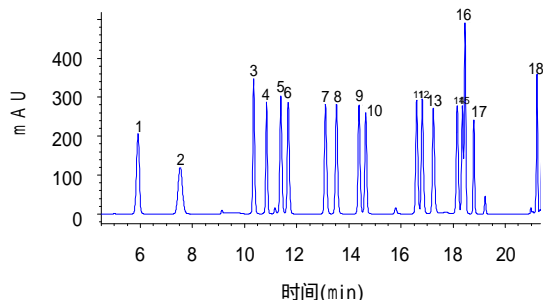
1.4.2 样品衍生化

10μl 样品滤液+10μl 内标(ISTD)+72μl 0.4mol/L 硼酸缓冲液(pH9.5)+5μl OPA+3μl FMOC, 充分混匀衍生2min 后, 取50μl 进柱分析, 以保留时间定性, 峰面积内标法定量。

2 结果与讨论

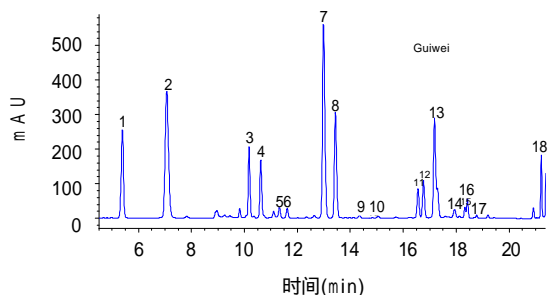
2.1 18种氨基酸标准色谱图与荔枝色谱图见图1、2。

2.2 4种荔枝品种游离氨基酸检测 结果见表3。



1. 天冬氨酸(Asp); 2. 谷氨酸(Glu); 3. 丝氨酸(Ser); 4. 组氨酸(His); 5. 甘氨酸(Gly); 6. 苏氨酸(Thr); 7. 丙氨酸(Ala); 8. 精氨酸(Arg); 9. 酪氨酸(Tyr); 10. 胱氨酸(Cys-cys); 11. 缬氨酸(Val); 12. 蛋氨酸(Met); 13. 正缬氨酸(Nval); 14. 苯丙氨酸(Phe); 15. 异亮氨酸(Ile); 16. 赖氨酸(Lys); 17. 亮氨酸(Leu); 18. 脯氨酸(Pro)。

图1 18种氨基酸标准色谱图



1. 天冬氨酸(Asp); 2. 谷氨酸(Glu); 3. 丝氨酸(Ser); 4. 组氨酸(His); 5. 甘氨酸(Gly); 6. 苏氨酸(Thr); 7. 丙氨酸(Ala); 8. 精氨酸(Arg); 9. 酪氨酸(Tyr); 10. 胱氨酸(Cys-cys); 11. 缬氨酸(Val); 12. 蛋氨酸(Met); 13. 正缬氨酸(Nval); 14. 苯丙氨酸(Phe); 15. 异亮氨酸(Ile); 16. 赖氨酸(Lys); 17. 亮氨酸(Leu); 18. 脯氨酸(Pro)。

图2 荔枝(桂味)色谱图

从表中可看中: 在4个荔枝品种的游离氨基酸中, 以丙氨酸(Ala)、谷氨酸(Glu)、精氨酸(Arg)、天冬氨酸(Asp)和苯丙氨酸(Phe)为主要氨基酸, 其总量均超过游离氨基酸总量的60%。其中: 淮枝以Ala、Arg和Phe含量较高, 占总游离氨基酸的71.0%; 桂味以Glu、Ala、Arg及Asp含量较高, 占总游离氨基酸的67.6%; 糯米糍以Glu含量最高(占总游离氨基酸的31.0%), 其次是Arg、Ala和His, 它们占总游离氨基酸的73.8%; 黑叶中以Ala、Arg、Glu及Asp含量较高, 占总游离氨基酸的78.5%。4品种荔枝的总游离氨基酸含量从大到

表3 4种荔枝品种游离氨基酸检测结果

氨基酸	淮枝		桂味		糯米糍		黑叶	
	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml
Asp	0.60	0.08	2.20	0.29	2.22	0.30	3.18	0.42
Glu	0.87	0.13	4.09	0.60	7.95	1.17	4.54	0.67
Ser	0.81	0.09	1.20	0.13	0.55	0.06	1.29	0.14
His	0.96	0.11	1.42	0.16	3.79	0.44	2.93	0.34
Gly	0.93	0.07	0.24	0.02	0.30	0.02	0.31	0.02
Thr	0.30	0.04	0.21	0.03	0.23	0.03	0.23	0.03
Ala	12.65	1.13	4.40	0.39	5.33	0.48	10.40	0.93
Arg	7.92	1.38	2.25	0.39	3.99	0.70	5.02	0.87
Tyr	0.25	0.05	0.09	0.02	0.15	0.03	0.09	0.02
Cys-cys	0.71	0.17	0.05	0.01	0.05	0.01	0.05	0.01
Val	1.39	0.16	0.60	0.07	0.61	0.07	0.58	0.07
Met	0.34	0.05	0.75	0.11	0.38	0.06	0.43	0.07
Phe	3.88	0.58	0.25	0.04	2.00	0.30	0.17	0.03
Ile	1.39	0.18	0.25	0.03	0.33	0.04	0.16	0.02
Lys	0.33	0.05	0.29	0.04	0.31	0.05	0.20	0.03
Leu	0.42	0.06	0.18	0.02	0.11	0.02	0.10	0.01
Pro	0.37	0.04	1.02	0.12	0.26	0.03	0.17	0.02
总含量	34.12	4.35	19.49	2.47	28.55	3.78	29.85	3.68

表4 18种氨基酸测定的相关系数、精密度及检测限

序号	氨基酸	工作曲线		精密度试验			
		相关系数	线性范围($\text{pmol}/\mu\text{l}$)	Rt(min)	RSD(%)	A_x/A_I ※	RSD(%)
1	Asp	0.99984	0.5~165	5.687	3.02	0.935	1.36
2	Glu	0.99992	0.5~240	7.323	2.46	1.953	1.65
3	Ser	0.99994	0.5~160	10.237	0.09	0.569	3.04
4	His	0.99944	1.0~180	10.738	0.10	0.520	1.51
5	Gly	0.99963	0.5~160	11.360	0.11	0.107	1.87
6	Thr	0.99986	0.5~160	11.647	0.14	0.095	5.14
7	Ala	0.99985	0.5~500	13.053	0.11	2.137	1.58
8	Arg	0.99983	0.5~400	13.486	0.06	1.097	2.20
9	Tyr	0.99986	0.5~160	14.371	0.13	0.035	1.71
10	Cys-cys	0.99946	1.0~160	14.643	0.71	0.011	4.78
11	Val	0.99991	0.5~160	16.587	0.10	0.285	1.19
12	Met	0.99989	0.5~180	16.814	0.78	0.361	1.39
13	Nval	1.00000	内标	17.271	0.75	1.000	0.00
14	Phe	0.99976	0.5~360	18.152	0.17	0.113	1.23
15	Ile	0.99944	1.0~160	18.354	0.05	0.154	1.89
16	Lys	0.99918	0.5~160	18.452	0.04	0.042	5.90
17	Leu	0.99991	1.0~160	18.792	0.06	0.031	4.63
18	Pro	0.99810	0.5~160	21.215	0.02	0.391	7.82

注: ※ 只对测试样品作统计分析。

小排序为: 淮枝、糯米糍、黑叶、桂味。

2.4 线性范围、精密度试验

以峰面积 / 内标面积(A_x/A_I)为纵坐标, 各个标准氨基酸浓度 / 内标物浓度(C_x/C_I)为横坐标, 制作氨基酸工作曲线, 其相关系数及线性范围见表4, 从表4可看出, 大部分氨基酸工作曲线相关系数接近0.9999, 仅脯氨酸

新型蛋氨酸测定方法的建立

孙晓东, 王雅琴*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要: 本文建立了一条快速、简便、精确度高的蛋氨酸测定方法。蛋氨酸与过量氯胺-T 反应生成蛋氨酸亚砷, 过量的氯胺-T 与 NTB 发生氧化反应生成 DTNB, 一定范围内剩余的 NTB 的量与蛋氨酸量成正比, 412nm 测定其 OD 值; 同时加入掩蔽剂 DEPC 可有效消除其他氨基酸尤其是含巯基氨基酸的干扰。该方法适用于大量的蛋氨酸菌种的筛选工作。

关键词: 蛋氨酸; 测定方法

New Determination Method of Assaying Methionine Strains

SUN Xiao-dong, WANG Ya-qin*

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: A rapid simple, convenient and highly sensitive determination method of assaying Methionine was established in this paper. Methionine might be determined colorimetrically from the conversion of nitrothiobenzoate to 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) by chloramines-T remaining after oxidation of methionine to methionine sulfoxide by a known excess of reagent. The interference of amine acid especially amine acid, containing sulphydryl groups might be effectively suppressed by reaction with DEPC. The method was applicable to large amount of methionine strains screening.

收稿日期: 2003-09-16 * 通讯作者

作者简介: 孙晓东(1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物工程。

王雅琴(1956-), 女, 副教授, 研究方向为生物化学与分子生物学。

(Pro)较差为 0.99810, 相关性较好。

为保证分析结果的准确性, 本文以同一标准氨基酸样品和同一测试样品各重复 6 次进样分析, 各种氨基酸的保留时间(R_t)、相对峰面积(A_x/A_t)及其标准偏差(RSD%)列于表 4。从表 4 可看出, 保留时间的最大标准偏差 RSD 是天冬氨酸(3.02%)和谷氨酸(2.46%), 其它氨基酸均小于 1%, 效果较满意。在相对峰面积中, 最大标准偏差为脯氨酸 Pro(7.82%), 其次为赖氨酸 Lys(5.90%), 效果较差, 这可能与其衍生化反应程度或衍生物的稳定性或含量高低有关。

2.5 回收率试验

本文采用单点和多点加入法将各种单氨基酸标准液定量加入分析试样作回收率试验, 实验结果表明: 各种氨基酸的回收率范围为 92.21%~114.24%, 结果令人满意。

2.5 讨论

2.5.1 pH 值对分析测试的影响

流动相的最佳 pH 值为 7.2 ± 0.025 , pH 值的变动范

围不应超过 ± 0.1 , 否则会导致氨基酸峰重叠、保留时间和出峰顺序发生变化; OPA 衍生化反应的 pH 值大于 8.5, 而 FMOC 衍生化反应的 pH 值必须大于 9.0。

2.5.2 本法衍生化反应 2min 内完成, 18 种氨基酸在 22min 内出峰完全且分离良好, 溶剂峰(22min 之后出峰)不影响检测, 是一种理想的全谱氨基酸分析方法。

参考文献:

- [1] 傅亮, 倪冬姣, 等. 氨基酸高效液相色谱分析[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1994, 7(2): 77.
- [2] 刘保冬, 王维, 等. 葡萄酒中游离氨基酸的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 1997, 16(6): 5-7.
- [3] 朱曙东, 赵昇皓. 氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 1994, 12(1).
- [4] 陈平, 纳鹏君, 等. 反相高效液相色谱测定敦煌壁画胶结材料中氨基酸[J]. 分析测试技术与仪器, 2002, 8(2).
- [5] 李建国. 荔枝三高栽培技术[M]. 中国农业大学出版社, 1999.