

高效液相色谱法同时测定新鲜烟叶中 17 种氨基酸含量

黄丽佳, 吴双凤, 邓 亮, 梁梦洁, 罗 娜, 王 雪, 郭亚东, 林彦君*
(昆明医科大学药学院 暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: 采用高效液相色谱法测定新鲜烟叶中 17 种氨基酸的含量, 色谱柱为 SunFire C18 (4.6 mm I. D. × 250 mm, 5 μm), 柱温 40 ℃, 二极管阵列检测器, 检测波长 254 nm, 流动相流速 1.0 ~ 1.5 mL/min, 梯度洗脱. 结果表明, 17 种氨基酸在 2.5 ~ 50.0 μg/mL 范围内具有良好的线性关系 ($r > 0.995$), 加标回收率在 88.0% ~ 99.6% 之间, RSD 为 0.6% ~ 3.5%; 新鲜烟叶中含量较高的是丙氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸和脯氨酸等, 17 种氨基酸的总含量达到 8.87 mg/g.

关键词: 高效液相色谱; 新鲜烟叶; 氨基酸; 含量测定

中图分类号: R2841; S527 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2020) 06 - 0026 - 04

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2020.06.006

Contents Determination of 17 Amino Acids in Fresh Tobacco Leaves by High Performance Liquid Chromatography

HUANG Lijia, WU Shuangfeng, DENG Liang, LIANG Mengjie, LUO Na, WANG Xue, GUO Yadong, LIN Yanjun*
(School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Nature Products,
Kunming Medical University, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: The contents of seventeen amino acids in fresh tobacco leaves are determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The chromatographic column is SunFire C18 (4.6 mm I. D. × 250 mm, 5 μm); column temperature is 40 ℃; the detection wavelength of DAD detector is 254 nm; mobile phase flow rate is 1.0 ~ 1.5 mL/min, gradient elution. The results show that seventeen amino acids have good linearity ($r > 0.995$) in the range of 2.5 ~ 50.0 μg/mL, and the spiked recoveries are between 88.0% ~ 99.6%, RSD : 0.6% ~ 3.5%. The higher contents of the amino acids in fresh tobacco leaves were ala, phe, glu and pro etc. The total contents of 17 kinds amino acids are 8.87 mg/g.

Key words: HPLC; fresh tobacco leaves; amino acid; content determination

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 是茄科 (Solanaceae) 烟草属 (*Nicotiana*) 植物, 其在我国种植广泛. 在烟叶成熟和烘烤过程中, 烟草中含有的丰富的氨基酸会发生美拉德反应, 生成一系列对烤烟品质、香味和颜色有显著影响的物质^[1]. 因此, 在烤烟栽培、烘烤、加工等过程中, 测定其游离氨基酸的含量是一项很有意义的工作.

目前, 烟草中氨基酸的测定一般采用液相色谱法^[2-3]、氨基酸分析仪法^[4]、液相色谱-串联质谱联用 (LC-MS/MS)^[5-6]、离子色谱法^[7] 等, 由于液相色谱-串联质谱仪器昂贵, 而氨基酸本身没有紫外吸收, 所以本文采用柱前衍生化法, 通过衍生化反应后, 使用普通的紫外检测器检测, 测定了烟草中 17 种氨基酸的含量.

收稿日期: 2020 - 09 - 22

基金项目: 云南省科技厅科学研究基金资助项目 (2018FB150); 云南中烟工业有限责任公司资助项目 (2018539200370184).

作者简介: 黄丽佳 (199—), 女, 云南文山人, 在读硕士研究生, 主要从事烟草化学研究.

* 通讯作者: 林彦君 (1996—), 女, 云南昆明人, 在读研究生, 主要从事药物化学研究, E-mail: 1302122448@qq.com.

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 材料

乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙酸钠(分析纯, 四川西陇科学有限公司); 17 个氨基酸对照品(购于美国 AccuStandard 公司, 纯度 > 98%); 实验用水为超纯水。

1.1.2 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪(配置有二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和色谱工作站, 美国 Agilent 公司); AE240 电子天平(精度 0.000 1 g, 瑞士 Mettler Toledo 公司); 超纯水纯化系统(Milli-Q50 纯水仪, 美国 Millipore 公司)。

1.1.3 色谱条件

色谱柱为 SunFire C18 (4.6 mm I.D. × 250 mm, 5 μm); 柱温 40 ℃; 流动相流速 1.0 ~ 1.5 mL/min; 流动相 A: 100 mmol/L 乙酸钠; 流动相 B: 80% 乙腈; 梯度洗脱程序见表 1; 进样量 10 μL; 检测波长 254 nm。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	流动相流速/ (mL · min ⁻¹)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	1.0	100	0
5.0	1.0	100	0
13.5	1.0	94	6
18.0	1.0	84	16
25.0	1.5	72	28
28.0	1.5	0	100
30.0	1.5	0	100
32.0	1.5	100	0
35.0	1.0	100	0

1.1.4 实验样品

采自云南省石林县耀奇香草谷的红花大金元新鲜烟叶。

1.2 对照品溶液的制备

1) 对照品储备液的配制: 精密称定 0.010 0 g 天冬氨酸对照品, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入一定量 (0.1 mol/L) 盐酸水溶液, 溶解后定容至 10 mL, 得到 1 mg/mL 天冬氨酸标准品溶液, 并装入棕色瓶中, 塞盖密封, 4 ℃ 条件下保存, 备用。其余 16 种氨基酸(谷氨酸、丝氨酸、丙氨酸、精氨酸、苏氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸)对

照品储备液用上述方法制备。

2) 对照品的衍生化过程: 将对照品储备液各取 1 mL 混匀后, 准确吸取 0.5 mL 混合对照品溶液, 加入 0.5 mL 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液(美国 SIGMA-ALDRICH 公司), 并加入 0.5 mL 0.1 mol/L 苯基异硫氰酸酯乙腈溶液(北京百灵威科技公司), 涡旋混匀 1 min, 35 ℃ 水浴加热反应 0.5 h, 待反应完全后加入 1 mL 正己烷溶液, 涡旋 1 min, 静置沉淀 15 min, 取下层清液 200 μL 置于样品瓶加入 800 μL 超纯水, 混匀 10 s, 用 0.45 μm 有机相微孔滤膜过滤后, 供液相色谱分析用。

1.3 样品前处理及衍生

称取烟叶粉末约 0.2 g, 精密称定, 置于 15 mL 离心管, 加入 5 mL 0.1 mol/L 盐酸水溶液, 超声提取 40 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过滤以供备用。准确移取 1 mL 过滤好的上清液, 加入 1 mL 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液, 并加入 1 mL 0.1 mol/L 苯基异硫氰酸酯乙腈溶液, 涡旋混匀 1 min, 35 ℃ 水浴加热反应 0.5 h, 待反应完全后加入 2 mL 正己烷溶液, 涡旋 1 min, 静置沉淀 15 min, 取下层清液 200 μL 加入 800 μL 超纯水, 混匀 10 s, 0.45 μm 有机相微孔滤膜过滤后置于样品瓶, 供液相色谱分析用。

2 结果与分析

将衍生化后的氨基酸对照品溶液和样品溶液进样后在 1.1.3 色谱条件下分析, 其 HPLC 色谱图见图 1 和图 2, 17 个氨基酸分离良好, 峰型对称。

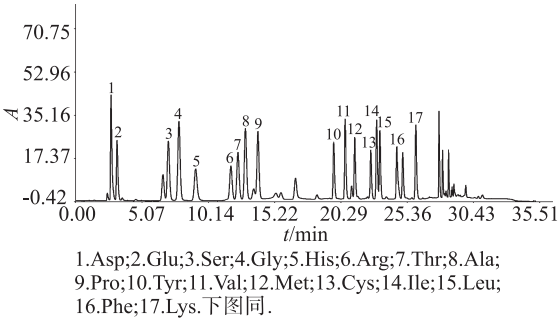


图 1 17 种氨基酸对照品色谱图

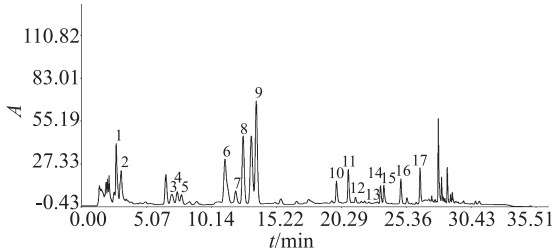


图 2 17 种氨基酸样品色谱图

2.1 线性关系考察

通过对标准储备液逐级稀释，配制一系列标准工作溶液，采用选定色谱条件对 17 种氨基酸的系列对照品溶液进行测定，以氨基酸的峰面积 A 为

纵坐标 (Y)，氨基酸的质量浓度 C 为横坐标 (X)，制作工作曲线，得到线性回归方程和相关系数，计算当信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 时所对应的检测限和定量限，结果见表 2。

表 2 17 种氨基酸的回归方程、相关系数、检出限和定量限

氨基酸	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性方程	相关系数 (r)	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Asp	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0638X - 0.2396$	0.998	0.017	0.058
Glu	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0538X + 0.0018$	0.999	0.013	0.043
Ser	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0602X + 0.1716$	0.999	0.011	0.037
Gly	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0389X + 0.2442$	0.999	0.012	0.043
His	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0572X + 0.2111$	0.997	0.011	0.037
Arg	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0575X + 0.0985$	0.996	0.012	0.042
Thr	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0561X + 0.2847$	0.997	0.011	0.036
Ala	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0603X + 0.0328$	0.999	0.010	0.034
Pro	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.2414X + 0.7411$	0.999	0.011	0.036
Tyr	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0948X - 0.1154$	0.999	0.012	0.040
Val	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0559X + 0.0353$	0.996	0.011	0.036
Met	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0607X - 0.1193$	0.996	0.013	0.044
Cys	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0544X + 0.2414$	0.999	0.011	0.036
Ile	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0582X + 0.1308$	0.998	0.014	0.054
Leu	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0599X + 0.0352$	0.998	0.011	0.036
Phe	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0862X + 0.0383$	0.999	0.012	0.043
Lys	2.5 ~ 50.0	$Y = 0.0561X - 0.0835$	0.995	0.012	0.042

由表 2 可见，17 种氨基酸在 2.5 ~ 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内具有较好的线性关系 ($r > 0.995$)，检出限在 0.010 ~ 0.017 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间，定量限在 0.036 ~ 0.058 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间。

2.2 重复性实验

取同一批次样品 6 个，按 1.3 项下方法制备和衍生化反应后，在 1.1.3 色谱条件下，准确吸取混合对照品溶液 10 μL ，连续进样 6 次，并记录色谱峰面积，计算平均质量分数，其 RSD 值分别为：2.9% (Asp)，1.2% (Glu)，1.4% (Ser)，1.0% (Gly)，3.8% (His)，0.4% (Arg)，1.1% (Thr)，1.5% (Ala)，0.8% (Pro)，2.7% (Tyr)，2.3% (Val)，2.5% (Met)，1.8% (Cys)，1.7% (Ile)，0.7% (Leu)，2.0% (Phe)，2.9% (Lys)。结果显示，所用测定方法的重复性良好。

2.3 稳定性实验

取同一批次样品 6 个，按 1.3 项下方法制备后，在 1.1.3 色谱条件下于 48 h 内进样 6 次，测定

对应的峰面积，计算平均质量分数，其 RSD 值分别为 1.5% (Asp)，0.7% (Glu)，0.6% (Ser)，1.0% (Gly)，1.2% (His)，0.8% (Arg)，0.8% (Thr)，0.8% (Ala)，2.3% (Pro)，0.7% (Tyr)，0.7% (Val)，0.8% (Met)，1.1% (Cys)，0.6% (Ile)，2.7% (Leu)，0.8% (Phe)，1.2% (Lys)，表明该实验方法在 48 h 内稳定性良好。

2.4 加标回收率

在已经测定了 17 种氨基酸含量的新鲜烟叶样品中，按高、中、低 3 个质量浓度水平添加一定量的氨基酸混合标准溶液，分别测定 9 次，计算氨基酸的回收率。结果见表 3。由表 3 可见，氨基酸在新鲜烟叶中的平均加标回收率为：88.0% ~ 99.6%， RSD 为 0.6% ~ 3.5%。

2.5 样品含量测定

取新鲜烟叶冻干粉，按 1.3 项下方法进行样品前处理，在 1.1.3 色谱条件下进样分析，按回归方程计算样品中氨基酸的含量，其平均含量见表 4。

表3 17种氨基酸的加标回收率

氨基酸	平均加标回收率/%	RSD/%	氨基酸	平均加标回收率/%	RSD/%
Asp	90.7	3.3	Tyr	96.6	3.0
Glu	94.0	1.9	Val	89.5	1.7
Ser	97.3	3.3	Met	91.0	1.4
Gly	94.9	1.0	Cys	96.1	2.1
His	94.4	3.5	Ile	92.4	3.3
Arg	89.8	1.3	Leu	89.0	1.9
Thr	94.8	3.4	Phe	91.2	1.3
Ala	91.2	0.6	Lys	99.6	1.8
Pro	88.0	0.6			

表4 17种氨基酸的含量

氨基酸	含量/(mg·g ⁻¹)	氨基酸	含量/(mg·g ⁻¹)
Asp	0.39	Tyr	0.37
Glu	0.71	Val	0.03
Ser	0.41	Met	0.31
Gly	0.10	Cys	0.09
His	0.33	Ile	0.38
Arg	0.43	Leu	0.33
Thr	0.30	Phe	0.98
Ala	2.89	Lys	0.34
Pro	0.48		

3 讨论

氨基酸是影响烟叶质量和吸味的一类重要物质, 本文采用柱前衍生化后 HPLC 法同时测定新鲜烟叶中 17 种氨基酸的含量, 该方法的重复性和稳定性都很好, 在设定的范围内, 线性关系良好, *r* 值大于 0.995. 回收率测定结果显示, 可以满足实验需要, 17 种氨基酸的总含量为 8.87 mg/g.

[参考文献]

[1] 闫克玉. 烟草化学 [M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002: 57-67.

[2] 景延秋, 高玉珍, 鲁平, 等. 反相高效液相色谱法在测定白肋烟烟叶游离氨基酸含量中的应用 [J]. 河南农业大学学报, 2007 (5): 502-505.

[3] 杨金英, 牟定荣, 梅勇, 等. HPLC-ELSD 法测定烟草中的脯氨酸 Amadori 化合物 [J]. 分析试验室, 2010 (8): 97-100.

[4] 张峻松, 贾春晓, 李炎强, 等. 烟草中游离氨基酸的自动分析仪测定 [J]. 烟草科技, 2004 (8): 26-32.

[5] 张婕, 葛永辉, 杨慧, 等. LC-MS/MS 法同时测定烟草中的 16 种游离氨基酸和 6 种 Amadori 化合物 [J]. 烟草科技, 2017, 50 (11): 58-65.

[6] 邓其馨, 苏明亮, 黄朝章, 等. 液相色谱-串联质谱快速测定烟草中 18 种氨基酸 [J]. 分析科学学报, 2014 (2): 263-265.

[7] 李辉, 岳先领, 李皓, 等. 离子色谱法测定烟叶中游离氨基酸 [J]. 湖南农业科学, 2015, 54 (23): 6023-6029.

