

离子色谱-积分脉冲安培法测定烟草中 18 种游离氨基酸

于宏晓, 徐海涛, 马强, 吕健, 张晋, 岳勇, 赵曰利, 肖协忠

(山东中烟工业有限责任公司技术中心, 青岛 266101)

摘要: 采用离子色谱-积分脉冲安培法同时测定了烟草中 18 种游离氨基酸的含量。结果表明, 该方法同时检测烟草中 18 种游离氨基酸的平均回收率为 80%~115%, 最低检出限为 0.03~0.75 $\mu\text{g/mL}$, 线性相关系数为 0.9900~0.9992。该方法成功对比分析测定了烤烟、白肋烟和香料烟 3 种不同类型单料烟以及国内外不同风格卷烟中 18 种游离氨基酸的含量。

关键词: 离子色谱-积分脉冲安培法; 游离氨基酸; 卷烟

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119(2012)04-0051-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.04.011

Determination of 18 Free Amino Acids in Tobacco with High Performance Anion-exchange Chromatography with Integrated Pulsed Amperometric Method

YU Hongxiao, XU Haitao, MA Qiang, LV Jian, ZHANG Jin, YUE Yong, ZHAO Yueli, XIAO Xiezhong
(Technology center, China Tobacco Shandong Industrial Corporation, Qingdao 266101, China)

Abstract: 18 of free amino acids in tobacco were simultaneously determined by high performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection method. The results showed that the recoveries for 18 amino acids were in the range of 80%-115%, the detection limits for 18 amino acids were 0.03-0.75 $\mu\text{g/mL}$ and the calibration graphs of peak area for the analyses were linear over about three orders of magnitude with a correlation coefficient of 0.9900-0.9992. The method was applied to determine 18 free amino acids in tobacco with satisfactory results. The method was employed to determine 18 free amino acids in flue-cured tobacco, burley tobacco and oriental tobacco. The method was also employed to determine successfully 18 free amino acids of different brands of domestic cigarettes and overseas cigarettes.

Keywords: ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection method; free amino acid; cigarette

烟草中的含氮化合物对烟草的感官评吸质量和吸者健康有重要的影响, 历来受到人们的普遍关注。氨基酸是烟草和烟气的香味成分之一, 也是烟草中一类重要的致香前体物质。氨基酸的含量与烟草的品质有着密切的关系, 其含量的高低直接影响到烟草的味道和烟气的丰满度^[1-2]。适量的氨基酸对形成优美的烟草香气和吸味有重要贡献。在烟草调制、醇化和加工直至燃烧过程中, 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化反应, 生成多种具有烤香、爆米花香味的吡喃、吡嗪、吡咯、吡啶类等杂环化合物, 某些氨基酸如苯丙氨

酸还可自身分解成香味化合物, 如苯甲醇、苯乙醇等。因此, 准确测定烟草中的游离氨基酸含量对于烟草加工过程中香味物质损失的控制与补偿具有重要的意义。1958年, Moore和Stein等^[3-5]首先提出了用阳离子交换色谱与柱后茚三酮衍生结合的方法分析蛋白质水解生成的氨基酸, 实现了氨基酸分析的自动化。其后, 氨基酸分析技术随着衍生方法、载体体化学和自动化技术发展而不断提高。

近年来, 人们越来越重视氨基酸分析方法的研究与改进, 高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法是最近发展起来的无需柱前和柱后衍生的氨基

基金项目: 山东中烟工业公司资助项目(110000038)

作者简介: 于宏晓, 男, 博士, 主要从事烟草化学及香精香料分析。E-mail: rodyu@163.com

收稿日期: 2010-11-01

修回日期: 2011-03-30

酸直接分析方法,该方法具有快速、灵敏、准确的优点。本试验优化了离子色谱-积分脉冲安培法检测烟草中游离氨基酸方法,采用该方法成功检测了烟草中 18 种游离氨基酸。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ICS3000 多功能离子色谱仪(美国 Dionex 公司),电子天平(梅特勒,瑞士),ZP-200 振荡器(江苏太仓实验设备厂),Milli-Q®型超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

17 种氨基酸混合标准溶液(waters 公司),色氨酸(>99%,生化试剂,Sigma 公司),无水醋酸钠(>99.9%,Dionex 公司),50%(w/w) NaOH 溶液(Fisher 公司),28%~30%氨水(Merck 公司),37%HCl(Merck 公司)。其他试剂均为分析纯。4 mL SCX 固相萃取小柱(Alltech 公司)。试验用水均为电阻率 18.2 MΩ·cm 的超纯水。

1.2 淋洗液配制

分离氨基酸的 3 种淋洗液(A:超纯水,B:250 mmol/L NaOH,C:1 mol/L NaAc)为了避免 NaOH 溶液吸收空气中 CO₂ 生成 Na₂CO₃ 降低淋洗液的洗脱效率,应迅速移取 13.1 mL 50%NaOH 溶液用超纯水稀释至 1 L,得到 250 mmol/LNaOH 淋洗液;称取 82.0 g 固体 NaAc 用超纯水溶解并稀释为 1 L,得到 1 mol/L NaAc 淋洗液。试验时应该在淋洗液上施加氮气保护。

1.3 色谱条件

AminoPac PA10 阴离子交换柱,包括分析柱(250 mm×2 mm)和保护柱(50 mm×2 mm)。采用梯度洗脱方法(表 1),积分安培检测电化学波形(表 2)。柱温为 32 °C,流速 0.25 mL/min,进样体积 25 μL。18 种氨基酸标准溶液分离色谱图见图 1。

1.4 样品处理和分析

烟叶中含有大量的糖类和色素等物质,这些物质会干扰烟叶中游离氨基酸定量分析,Jandik 等^[6]采用在线除糖的方法实现了样品中氨基酸的测定。牟世芬和周政华分别采用 DVB 强酸性阳离子交换树脂^[7]和国产 732 型阳离子交换树脂^[8]离线除糖的方法测定了游离氨基酸。本研究采用商品化 SCX 固相萃取小柱离线除去烟叶中的糖类和色素物质,取烟叶在 40~50 °C 条件恒温 2 h,粉碎后过 80 目筛,筛下物为实验用烟样粉末。称取烟样粉末 1.0 g,精确至 0.001 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加 0.06 mol/L HCl 溶液 20 mL,振摇提取 30 min,过滤,取滤液 1 mL 稀释至 10 mL,混合均匀,20 000 r/min 高速离心 30 min,再取上清液 1 mL 通过 SCX 固相萃取小柱除去溶液中的干扰游离氨基酸定量分析的糖类和色素等物质,将从 SCX 固相萃取小柱洗脱下来的氨基酸洗脱液在 65 °C 水浴下氮气吹干,2 mL 0.06 mol/L 的 HCl 溶液定容,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为待测溶液,过 SCX 固相萃取小柱后烟叶提取液中 18 种游离氨基酸的色谱图见图 2。

表 1 分离 18 种游离氨基酸的淋洗梯度条件

时间/min	H ₂ O/%	(250 mmol/L NaOH)/%	(1 mol/L NaAc)/%
0	76	24	0
2	76	24	0
8	64	36	0
11	64	36	0
18	40	20	40
21	44	16	40
23	14	16	70
42	14	16	70
42.1	20	80	0
44.1	20	80	0
44.2	76	24	0
75	76	24	0

表 2 18 种游离氨基酸的积分安培检测电化学波形

时间/s	电位/V(vs. pH-Ag/AgCl 参比电极)	积分
0	0.13	
0.04	0.13	
0.05	0.33	
0.21	0.33	开始
0.22	0.6	
0.46	0.6	
0.47	0.33	
0.56	0.33	结束
0.57	-1.67	
0.58	-1.67	
0.59	0.93	
0.6	0.13	

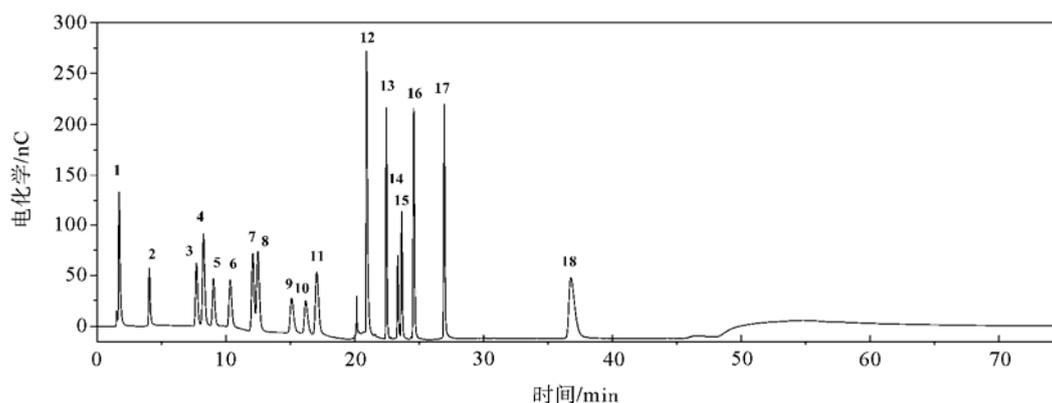


图 1 8 种游离氨基酸标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of 18 standard amino acids

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

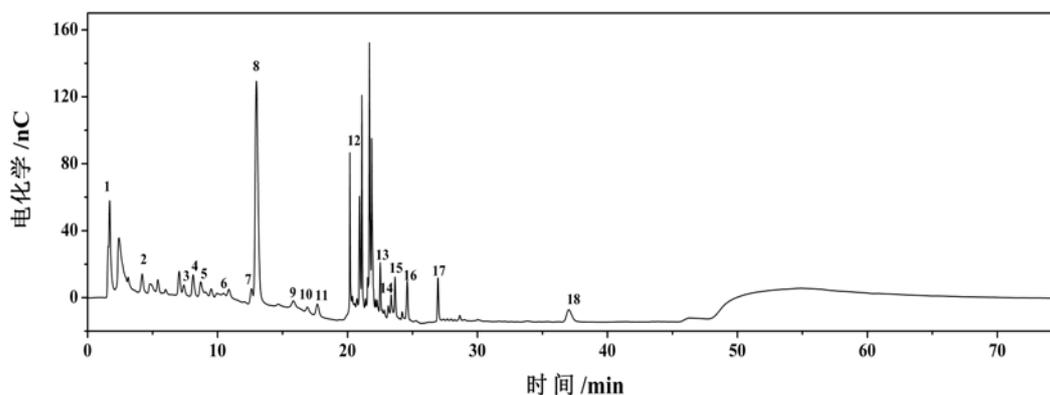


图 2 烟叶提取液中 18 种游离氨基酸的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of 18 free amino acids in the tobacco extraction solution

2 结果

2.1 线性范围与回收率

该方法用于氨基酸的检测，灵敏度高，检出限在 $0.03 \sim 0.75 \mu\text{g/mL}$ ($25 \mu\text{L}$ 进样)，线性范围较宽，达到 2~3 个数量级，相关系数在 $0.9900 \sim 0.9992$ ，离线除去糖类和色素等干扰物质后，18 种氨基酸的回收率都在 $80\% \sim 115\%$ ，因此该方法可用于烟草中 18 种游离氨基酸的分析检测。

2.2 烤烟、白肋烟和香料烟不同类型单料烟中游离氨基酸的对比分析

对比烤烟、白肋烟和香料烟不同类型单料烟中游离氨基酸的含量(表 3)，这 3 种不同类型的单料烟中游离氨基酸的含量存在着很大差别，白肋烟的游离氨基酸的总量最高，同时白肋烟的精氨酸、赖氨酸、丙氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丝氨酸、异亮氨

表 3 烤烟、白肋烟和香料烟中 18 种氨基酸的含量 mg/g

Table 3 The contents of 18 free amino acids in flue-cured tobacco, burley tobacco and oriental tobacco

氨基酸	烤烟	白肋烟	香料烟
精氨酸	0.006	0.481	0.045
赖氨酸	0.068	0.391	0.009
丙氨酸	0.501	0.802	0.352
苏氨酸	0.089	0.38	0.076
甘氨酸	0.032	0.196	0.036
缬氨酸	0.769	0.079	1.658
丝氨酸	0.377	0.653	0.382
脯氨酸	8.135	4.31	4.662
异亮氨酸	0.026	0.072	0.019
亮氨酸	0.091	0.156	0.043
蛋氨酸	0.601	0.072	0.447
组氨酸	0.222	0.569	0.089
苯丙氨酸	0.184	1.089	0.224
谷氨酸	0.142	1.099	0.189
天冬氨酸	0.432	6.17	0.345
胱氨酸	0.068	0.166	0.071
酪氨酸	0.233	0.13	0.243
色氨酸	0.267	0.37	0.029
游离氨基酸总量	12.242	17.185	8.919

酸、亮氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、胱氨酸、色氨酸的含量远远高于烤烟和香料烟的含量。烤烟的脯氨酸和蛋氨酸的含量高于白肋烟和香料烟的含量。香料烟的缬氨酸和酪氨酸的含量高于烤烟和白肋烟的含量。

2.3 国内外烤烟型和混合型卷烟中游离氨基酸对比分析

对比国内外烤烟型和混合型卷烟游离氨基酸的含量(表4)看出,混合型卷烟的精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、色氨酸的含量明显高于烤烟型卷烟的含量,同时混合型卷烟的总游离氨基酸的含量也明显高于烤烟型卷烟的含量。主要是由于混合型卷烟配方中含有白肋烟,而白肋烟中精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、色氨酸的含量和游离氨基酸总量明显高于烤烟。烤烟型卷烟的蛋氨酸和脯氨酸的含量明显高于混合型卷烟的含量,是因为烤烟的脯氨酸和蛋氨酸的含量高于白肋烟的含量。国内外烤烟型和混合型卷烟游离氨基酸的差异

性规律进一步佐证了烤烟和白肋烟游离氨基酸的差异性规律。

3 结论

离子色谱-积分脉冲安培法具有快速、灵敏和准确的优点,与已有的其他分析烟草中游离氨基酸的方法相比,具有所需试剂简单、无需柱前或柱后衍生的特点。利用该方法测定了不同类型单料烟和国内外不同风格卷烟中18种游离氨基酸的含量。结果表明,白肋烟的游离氨基酸的总量最高,混合型卷烟的总游离氨基酸的含量明显高于烤烟型卷烟的含量,其他游离氨基酸的含量随着烟草的类型和风格的不同也存在着明显的差异。

参考文献

- [1] 刘百战,孙哲建,徐玉田. 毛细管气相色谱法测定卷烟中的游离氨基酸[J]. 中国烟草学报, 1999, 5(2): 1-5.
- [2] 李丹,黄龙,朱巍,等. 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.
- [3] Moore S, Spackman D H, Stein W H. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System[J]. Anal. Chem., 1958, 30(7): 1185-1190.
- [4] Spackman D H, Stein W H, Moore S. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids[J]. Anal. Chem., 1958, 30(7): 1190-1206.
- [5] Moore S, Stein W H. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment[J]. Methods Enzymol., 1958, 6: 819-831.
- [6] Jandik P, Cheng J, Jenson D, et al. Simplified in-line sample preparation for amino acid analysis in carbohydrate containing samples[J]. J. Chromatogr. B, 2001, 758(2): 189-196.
- [7] Ding Y S, Yu H, Mou S F. Off-line elimination of carbohydrates for amino acid analysis of samples with high carbohydrate content by ion-exchange chromatography [J]. J. Chromatogr. A, 2003, 997(1/2): 155-160.
- [8] 周政华,杨元,洪君蓉,等. 固相萃取-离子色谱-积分脉冲安培法测定人血清中游离氨基酸[J]. 分析化学, 2007, 35(7): 1063-1066.

表4 国内外烤烟型和混合型卷烟

18种游离氨基酸的含量 mg/g

Table 4 The contents of 18 free amino acids in flue-cured cigarettes and blended cigarettes

氨基酸	国内混合型卷烟	国内烤烟型卷烟	国外混合型卷烟	国外烤烟型卷烟
精氨酸	0.051	0.019	0.051	0.034
赖氨酸	0.042	0.016	0.033	0.021
丙氨酸	0.543	0.287	0.392	0.409
苏氨酸	0.124	0.021	0.05	0.042
甘氨酸	0.058	0.022	0.069	0.041
缬氨酸	0.121	0.034	0.059	0.102
丝氨酸	0.992	0.561	0.986	1.241
脯氨酸	3.152	4.162	2.506	3.987
异亮氨酸	0.031	0.012	0.018	0.019
亮氨酸	0.035	0.004	0.021	0.01
蛋氨酸	0.091	0.125	0.086	0.205
组氨酸	0.168	0.076	0.091	0.121
苯丙氨酸	0.752	0.487	0.568	0.369
谷氨酸	0.218	0.081	0.317	0.151
天冬氨酸	2.206	0.232	2.823	0.491
胱氨酸	0.039	0.024	0.029	0.038
酪氨酸	0.113	0.061	0.048	0.068
色氨酸	0.356	0.212	0.349	0.188
游离氨基酸总量	9.092	6.436	8.505	7.528