

## 用 HPLC 测定津巴布韦烟叶和浸膏里的氨基酸

黄健 朱桂飞 李德俊

上海爱普香料有限公司

**摘要** : 本文研究了用 Waters 柱前衍生试剂 AQC , 即 6- 氨基喹啉基 -N- 羟基琥珀酰亚氨基酸甲酸来测定津巴布韦烟叶和浸膏里的氨基酸的组成和含量, 流动相由磷酸盐缓冲液、乙腈和纯水构成, 梯度洗脱, 利用光电二极管紫外检测器 248nm 下检测。

**关键词**: 津巴布韦烟叶 浸膏 高效液相色谱 氨基酸 Accq.tag 柱前衍生

### 1 前言

我国虽是一个生产卷烟和烟叶的大国, 但是由于受所产烟叶的品种、质量, 以及卷烟产品的风格(烤烟型)、消费者的消费习惯等等诸多方面因素的影响, 部分名优卷烟产品对进口烟叶的依赖性很大, 尤其是对津巴布韦烟叶的需求很高。作为传统的调味型烟叶, 津巴布韦烟叶在我国大量优秀品牌的卷烟配方中起相当重要的作用。从九十年代起, 我国每年进口津巴布韦烟叶就已超过三千万公斤, 但是随着去年津巴布韦烟叶欠收, 我国进口量只有五百万公斤, 并且质量下降, 各卷烟企业均受到不同程度的影响。如何避免过多的依赖进口烟叶, 已经成为中式卷烟发展一个不可忽略的课题。

随着卷烟配方以及调香技术的深入研究, 合理的使用津巴布韦烟叶提取物已成为共识。进一步分析津巴布韦烟叶以及烟叶提取物的化学成分, 以及两者之间的关系, 其意义尤为重要 [1-5]。

烟叶中含有微量的氨基酸。氨基酸含有羧基、羟基、氨基和硫基等极性基团, 但大多数氨基酸不含有紫外生色团, 而无法用紫外法检测, 其结构决定了它的仪器分析方法, 需要先将氨基酸衍生化为易挥发的非极性衍生物或者衍生为有较强紫外或荧光吸收的衍生物。氨基酸经过用短链脂肪醇酯化后, 再乙酰化, 再进气相分离定性和定量 [6-10]。如用液相色谱测定氨基酸, 可有柱前衍生和柱后衍生两种 [11-16]。氨基酸自动分析仪就是用柱后茚三酮衍生化检测的。本文是用柱前衍生, 使用 Waters 柱前衍生试剂 AQC, 即 6-氨基喹啉基 -N-羟基琥珀酰亚氨基酸甲酸衍生, 再经柱分离测定 [17-25]。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器和条件

仪器条件: Waters 600 泵系统, 2996PDA 检测器, 717 自动进样器,

光电二极管检测器 (PDA)

仪器方法: 柱子: Accq.tag 150mm \* 3.9mm; 检测器: PDA 248nm; 柱温: 37 °C;

进样量: 10ul;

梯度设置如下:

时间 (分钟)	流速 (ml/min)	A液 (缓冲液)%	B液 (乙腈)%	C液 (纯水)%
起始	1.0	100	0	0
17	1.0	91	5.4	3.6
24	1.0	80	17	3.0
32	1.0	68	20	12
34	1.0	68	20	12
35	1.0	0	60	40
37	1.0	0	60	40
38	1.0	100	0	0
45	1.0	100	0	0

## 2.2 试剂

乙腈：色谱纯，德国默克进口分装

AQC 衍生试剂：美国 Waters 公司

氨基酸标样：美国 Waters 公司

## 2.3 测定方法

### 2.3.1 样品萃取

将津巴布韦烟叶在 60℃ 下烘干津巴布韦烟叶和津巴布韦浸膏各准确称取 1 克，加 100ml 萃取液萃取并振荡 1 小时，过滤净化后，定容于 100ml 容量瓶中，待衍生后进样。其中萃取液的配制是按照冰醋酸：甲醇：蒸馏水 =17：34：1649 的比例配的。

### 2.3.2 流动相的配制

由 Waters 公司提供的磷酸盐缓冲液 A 浓液按 1：10（V/V）用水稀释：取 30 毫升 A 浓液，置于 500 毫升瓶中，再取 300 毫升高纯水，倒入该瓶中，混合均匀，备用。

### 2.3.3 氨基酸稀释标样配制

打开一瓶氨基酸标样，用进样针移取 10 微升，放入衍生管中，加 90 微升纯水，混匀，备用。（氨基酸标样浓度为 2.5um/ml，其中胱氨酸浓度为 1.25um/ml。稀释后则为 0.25um/ml，胱氨酸浓度为 0.125um/ml）。

### 2.3.4 衍生剂 AQC 的配制

取一定量的 AQC 瓶，在打开之前，轻轻弹击，确保所有的 Accq.tag 试剂粉末全落在瓶底；移液管吸取 1 毫升的乙腈放入该瓶中，加盖密封，震荡 10 秒钟；在 55 度的加热装置上，加热至粉末全部溶解。加热时间不要超过 10 分钟。

### 2.3.5 氨基酸样品的衍生

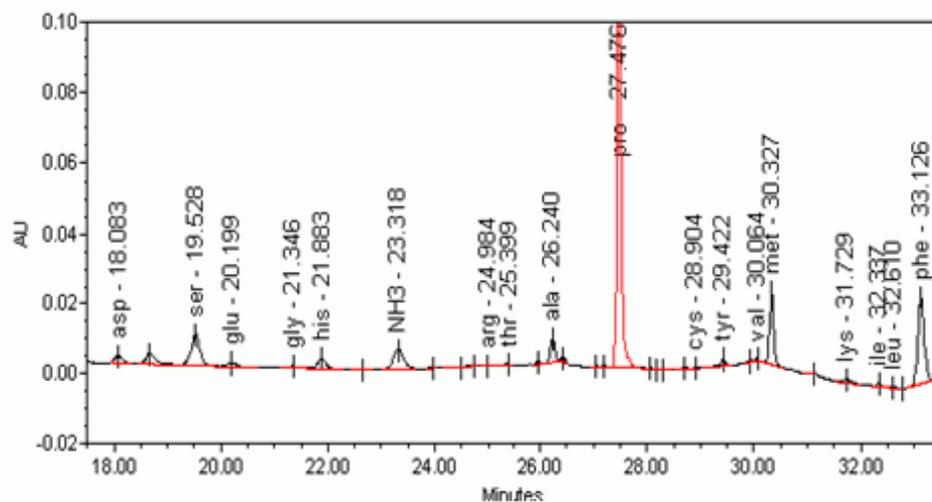
用进样针吸取 10 微升已稀释的标样于一衍生管中，加 70 微升的 accq.tag 硼酸盐缓冲液，涡旋混合；

再加 20 微升刚配制好的衍生剂。涡旋混合 10 秒。将衍生管用石蜡膜封口，放在 55 度烘箱中加热 10 分钟。取出，进样。

未知样品的衍生同上，进样前先用溶剂过滤膜过滤。

### 3 实验结果与与讨论

根据外标，保留时间定性，峰面积定量后得出实验结果，列表如下。其中氨基酸含量最多的是脯氨酸。津巴布韦烟叶里氨基酸总含量为： 12.128mg/g ，津巴布韦浸膏里氨基酸含量为： 9.912mg/g 。同时附实验谱图，见下图。



图：津巴布韦烟叶中氨基酸含量的谱图

氨基酸名称	津巴布韦烟叶 (mg/g)	津巴布韦浸膏 ( mg/g )
天门冬氨酸	0.240	0.306
丝氨酸	0.914	0.797
谷氨酸	0.235	0.074
甘氨酸	0.053	0.120
组氨酸	0.481	0.062
精氨酸	0.017	0.052
苏氨酸	0.036	0.048
丙氨酸	0.258	0.249
脯氨酸	6.390	1.738
胱氨酸	0.001	0.024
酪氨酸	0.217	0.362
缬氨酸	0.035	0.199
蛋氨酸	1.283	2.850
赖氨酸	0.073	0.336
异亮氨酸	0.065	0.315
亮氨酸	0.013	0.184
苯丙氨酸	1.817	2.197
合计	12.128	9.912

同时，为了保证实验的准确性和精确性，拿津巴布韦烟叶做了 3 次重复性实验和回收率实验，证明重复性比较好， RSD 都在 5% 左右，而回收率大于 85% 。

与此同时，为了更好的反映津巴布韦烟叶和浸膏的质量，除了利用 HPLC 测定两者的氨基酸外，我们还利用 HPLC 和烟草分析仪研究了其烟叶和浸膏的糖的含量。烟草分析仪测定出津巴布韦烟叶中还原糖含量为 20.75%，总糖含量为 23.57%；津巴布韦浸膏中还原糖含量为 5.70%，总糖含量为 6.45%。同时我们也正在研究利用 HPLC 测定其中的各种糖的含量，津巴布韦烟叶里果糖含量为 6.145%，葡萄糖含量为 4.745%，总共为 10.89%；津巴布韦浸膏里测出果糖含量为 1.299%，而葡萄糖可能因含量太小没检测到。比较这两者仪器的实验结果，相差还是比较大的。造成这结果差异的各种因素，我们还将进一步的探讨研究。

#### 4 参考文献

- [1] 朱大恒，韩锦峰．烤烟自然醇化和人工发酵过程中香气成分变化的研究．中国烟草学报 1999.(04)
- [2] 王能如 李桐 烟叶复烤发酵与养护．安徽科技出版社。
- [3] 顾中铸，肖厚荣，郭俊成，许萍．卷烟工艺学．合肥经济技术学院，1995
- [4] 金闻博，戴亚等编著．烟草化学．清华大学出版社 1992
- [5] 汤朝起，许建铭等．烟叶自然陈化研究进展及设想．中国烟草科学．1999(03)
- [6] Lohson S K, Meat Sci, 1988, 22: 221
- [7] Bruckner H, Hausch M. J Chromatographia, 1989, 28: 487
- [8] Bruckner H, Hausch M. J High Resolut Chromatographia, 1989, 12: 680
- [9] Golan-Goldhirsch A, Hogg A M, Wolfe F H. J Agric acid Food Chem, 1982, 30: 320
- [10] Husek P. J chromatogr, 1991, 552: 289
- [11] Jones B N, Paabo S, Stein S. J Liq Chromatogr, 1981, 4: 565
- [12] Lai F, Sheehan T. Biotechniques, 1993, 14: 642
- [13] Einarsson S, Josefsson B, Lagerkvist S. J Chromatog, 1983, 282: 609
- [14] Stocchi V, Piccoli G, Magnani M. Anal Biochem, 1989, 178: 107
- [15] Cohen S A, Michaud D P. Anal Biochem, 1993, 211: 279
- [16] Shang zhenhua, Yu yinian, Guo Wei. Chinese Journal of chemistry, 1995, 13(2): 163
- [17] 常碧影 闫惠文等 AccQ.Tag TM 法测定玉米水解液中的氨基酸．Waters 液相色谱通讯增刊——AccQ.Tag 专刊
- [18] 朱署东等．氨基酸的高效液相色谱分析．色谱 1999(1)
- [19] 徐康生等．高效液相— Pico-Tag 微量快速分析氨基酸．药物分析杂志．1988.8(5)
- [20] 朱彭龄 云自厚 谢光华 现代液相色谱．兰州大学出版社。

[21] Waters 液相色谱通讯增刊—— AccQ.Tag 专集 .Waters 中国有限公司 .1997.8

[22] 陈永波, 饶斌等 .AccQ.Tag 法应用技巧 . 氨基酸和生物资源, 2001, 23 ( 4 ) :

47 ~ 49

[23] 朱彭龄, 云自厚, 谢光华 . 现代液相色谱 . 兰州大学出版社, 1994, 9

[24] Waters AccQ-Tag Chemistry Package Instruction Manual, Millipore Waters Chromatography, April 1993

[25] 王贵珍, 廖斌 .AccQ.Tag 法测定复方氨基酸注射液中氨基酸的含量 . 中国药科大学报 .1996, 27 ( 1 ) : 29 ~ 31

## **A HPLC Method for the determination of amino acids in Zimbabwe tobacco and extract**

Shanghai Apple Flavor and Fragrance Co,LTD

Huang Jian, Zhu Guifei, Li Dejun

**Abstract:** using Waters Accq.fluor Derivatizing Reagent (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, or AQC) to detect the composition and content of amino acids in zimbabwe tobacco and extract by high performance liquid chromatography(HPLC) 。 The mobile phase is made of phosphate buffer solution , acetonitrile and water , eluted by certain gradient, detected by photodiode array detector (PDA) at 248nm.

**Key words:** zimbabwe tobacco HPLC Accq.tag amino acid

---

www.tobacco.org.cn All Rights Reserved.

版权所有 中国烟草学会

本网站由中国烟草物资电子商务网提供技术支持