

高效液相色谱 Pico-Tag 法测定野蕨菜氨基酸成分*

陈柏林 郭 敏

(四川农业大学动物营养研究所 四川雅安 625014)

1 前言

高效液相色谱(HPLC)Pico-Tag 法因采用柱前衍生,反相色谱分离^[1],具有分析时间短、灵敏度高、重现性好等优点,广泛地用于各种类型样品的氨基酸成分分析。

野蕨菜具有独特的野味,无农药污染,营养丰富,长期食用能延年益寿。因此广泛受到国内外人士的喜爱,尤其是东南亚各国朋友的喜爱。为此,我们用 HPLC Pico-Tag 法对四川雅安地区野蕨菜氨基酸成分进行了测定,结果令人满意。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

美国 Millipore 公司 Waters 色谱业务部生产的 HPLC 产品,包括 Pico-Tag 工作台,510型泵两台,U6k 型手动进样器,TCM 型柱温控制器,484型紫外检测器,810色谱工作站。

乙腈(色谱级),三乙胺(色谱级),异硫氰酸苯(PITC,Waters 公司提供),水解氨基酸(HAA,Waters 公司提供),6mol/L HCl (优级纯),乙醇(分析纯),三水醋酸钠(分析纯),磷酸氢二钠(分析纯)。

2.2 溶液配制

A 液 19.0g 三水醋酸钠,0.5mL 三乙胺溶解于1L 超纯水中。用冰醋酸调 pH 为 6.4,用 0.45 μ m 滤膜过滤,取此液 940mL,加入 60mL 乙腈,混匀,超声波脱气 20s(或冲氮保存)。

B 液 分别量取 600mL 乙腈,400mL 水,混匀,超声波脱气 20s 备用。

样品稀释液 取 710mg Na₂HPO₄ 加超纯水至 1000mL,用 10%磷酸-乙腈(95:5)调 pH 为 7.4 备用。

样品水解液 1g 苯酚溶解于 6mol/L HCl 100mL 中。

再干燥液 乙醇:水:三乙胺=2:2:1。

衍生液 异硫氰酸苯(PITC):乙醇:三乙胺:水

=1:7:1:1

2.3 实验方法

取整株鲜蕨菜切碎,于 105℃ 烘至恒重,用研钵磨细,精确称取 100mg 左右样品放入 180mm × 18mm 试管中,加 6mol/L HCl 10mL,巯基乙醇 20 μ L,正辛醇二滴,混匀,冲氮,封管。于 110℃ 水解 24h,定容至 50mL,混匀,用 0.45 μ m 滤膜过滤。取滤液 20 μ L,放入 6mm × 50mm 小管,装入水解台,在 60~100mT 下干燥 20~30min,加 15 μ L 再干燥液,混匀,干燥 20~30min。加 20 μ L 衍生液,混匀,室温下放置 10min。干燥之后,加入 100 μ L 样品稀释液,混匀,即可进样分析。

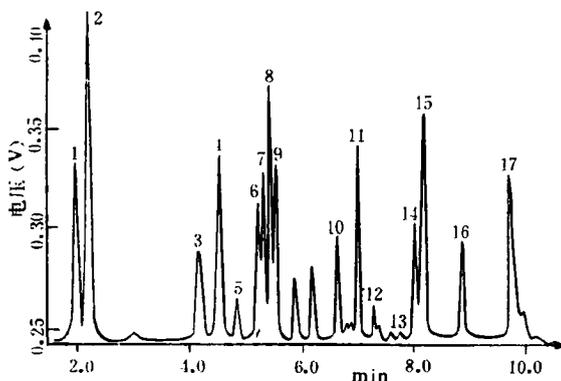


图1 野蕨菜氨基酸组分图(括号内为保留时间,单位为 min)

1. Asp(1.83), 2. Glu(2.06), 3. Ser(3.82), 4. Gly(4.08), 5. His(4.36), 6. Arg(4.73), 7. Thr(4.88), 8. Ala(4.95), 9. Pro(5.14), 10. Tyr(6.35), 11. Val(6.74), 12. Met(7.04), 13. Cys(7.48), 14. Ile(7.78), 15. Leu(8.04), 16. Phe(8.59), 17. Lys(9.43).

2.4 分析条件

柱温: 38℃; 波长: 254nm, 0.1 AUFS; 柱: Pico-Tag HAA-Column 3.9mm i. d. × 150mm; 流动相见表 1。

* 本文收稿日期:1993年8月2日,修回日期:1993年10月29日

表1 流动相梯度程序表

| 时间(min) | 流速(mL/min) | A% | B% | 曲线号 |
|---------|------------|-----|-----|-----|
| 初始 | 1.0 | 100 | 0 | |
| 10.0 | 1.0 | 54 | 46 | +5 |
| 10.5 | 1.0 | 0 | 100 | 0 |
| 11.5 | 1.0 | 0 | 100 | 0 |
| 12.0 | 1.5 | 0 | 100 | 0 |
| 12.5 | 1.5 | 100 | 0 | 0 |
| 20.0 | 1.5 | 100 | 0 | 0 |
| 20.5 | 1.0 | 100 | 0 | 0 |

3 实验结果与讨论

野蕨菜氨基酸组分的定性用保留时间,定量用

表2 野蕨菜氨基酸成分分析

| 氨基酸 | Asp | Glu | Ser | Gly | His | Arg | Thr | Ala | Pro | Tyr | Val | Met | Cys | Ile | Leu | Phe | Lys |
|-----------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-----|-------|--------|--------|--------|
| (n = 6) | 2.552 | 6.284 | 1.565 | 1.629 | 0.716 | 1.772 | 1.540 | 1.675 | 1.445 | 1.160 | 1.716 | 0.452 | — | 1.197 | 2.476 | 1.386 | 1.398 |
| 回收率(%) | 90.26 | 93.34 | 95.02 | 105.13 | 90.24 | 110.13 | 97.15 | 92.26 | 98.34 | 113.45 | 96.78 | 89.57 | — | 95.16 | 105.27 | 107.57 | 119.97 |
| 标准偏差 | 0.186 | 0.188 | 0.112 | 0.120 | 0.114 | 0.138 | 0.115 | 0.142 | 0.141 | 0.130 | 0.101 | 0.097 | — | 0.112 | 0.114 | 0.110 | 0.114 |
| S(n = 6) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 变异系数(CV%) | 7.3 | 3.0 | 7.2 | 7.3 | 15.9 | 7.8 | 7.5 | 8.5 | 9.8 | 11.2 | 5.9 | 21.5 | — | 9.4 | 4.6 | 7.9 | 8.1 |

外标法。往水解液中准确加入已知量的氨基酸混合标准液,测其含量,从中扣除水解液中原有氨基酸含量,其值与添加量之比得回收率,平行6次测定样品可算出标准差和变异系数,结果见表2。

实验结果表明用 HPLC Pico-Tag 法分析野蕨菜中氨基酸组分是可行的,方法简单,快速,灵敏度高。用此法分析,称样量大,代表性好,除色氨酸、胱氨酸被酸水解破坏外,能理想地分离16种氨基酸。野蕨菜含丰富的氨基酸,营养价值高,尤其是谷氨酸含量特别高,这可以部分解释野蕨菜的香味来源。

关键词 高效液相色谱, Pico-Tag 法, 野蕨菜, 氨基酸

参 考 文 献

Clin Lab, 1986, 8: 170

- White J A, Hart R J, Fry J C. J Automatic Chem/J

The High Performance Liquid Chromatographic Pico-Tag Analysis of Amino Acids in Pteridophyte

Chen Bolin and Guo Min

(Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Yaan, 625014)

The analysis of amino acids in pteridophyte by the HPLC Pico-Tag method is fast, sensitive, reproducible and reliable. The contents of sixteen amino acids, except tryptophan and cystine, were measured, and the amino acids separated satisfactorily in the chromatogram. The results showed that pteridophyte has high amino acid contents and thus is a good nutrient with high protein contents.

Key words high performance liquid chromatography, Pico-Tag, amino acids, pteridophyte

《第九次全国色谱报告会论文集》降价出售

国家色谱研究分析中心已把《第九次全国色谱学术报告会》会议论文编辑成书,由辽宁科技出版社出版。《论文集》共分上中下三册,收录论文三百多篇计80万字,主要内容包括液相色谱、气相色谱、色谱基础理论、薄层色谱、离子色谱、毛细管电泳和仪器装置共七大部分。该文集尚有少量剩余,欢迎大家订购。原定价:40元/套(不含包装费、邮费)。现降价出售,单位购30元/套,包装费、邮费另加5元;个人购15元/套,包装费、邮费另加5元。

欲购者,请从邮局直接汇款至:大连市中山路161号(邮编:116012)《色谱》编辑部 孙树平收,电话3631841转356。