

文章编号:1004-7271(2003)03-0282-03

·研究简报·

# 高效液相色谱法分析霉菌干酪中游离氨基酸含量

## Determination of free amino acids released from mould-ripened cheese

### by reversed-phase high performance liquid chromatography

郑小平<sup>1</sup>, 陈有容<sup>1</sup>, 郭本恒<sup>2</sup>

(1. 上海水产大学食品学院, 上海 200090; 2. 上海光明乳业股份公司技术中心, 上海 200072)

ZHENG Xiao-ping, CHEN You-rong, GUO Ben-heng

(1. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090;

2. Technical Center, Shanghai Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200072)

关键词: 高效液相色谱法; 游离氨基酸; 柱前衍生; 霉菌干酪

Key words: high performance liquid chromatography; free amino acid; pre-column derivatization; mould-ripened cheese

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A

近年来, 国内外对干酪的研究工作在不断深入开展。霉菌干酪在干酪研究中具有非常重要地位。霉菌干酪在成熟过程中产生一定量氨基酸, 它对干酪的风味产生重要影响。因此, 对霉菌干酪中的游离氨基酸的组成和含量进行监测, 以获得霉菌干酪过程中氨基酸变化模式具有非常重要的意义, 目前国内尚未有对霉菌干酪中游离氨基酸进行检测的报道。目前柱前衍生反相高效液相色谱测定氨基酸技术取得很大进展<sup>[1-2]</sup>。邻苯二甲醛(OPA)衍生步骤简单、反应速度快, 剩余试剂不干扰测定, 因此在柱前衍生试剂中以 OPA 的应用最为广泛。本文采用 HP 1100 系列高效液相色谱, 以 OPA 和 9-苄基氯甲酸酐(FMOC)为衍生试剂, 测定了霉菌干酪的游离氨基酸组成和含量。

## 1 实验方法

### 1.1 仪器及其工作条件

超滤仪: Master Flex<sup>®</sup> L/S<sup>TM</sup>(配有分子量为 5000Da 膜);

匀浆机: Ultra Turrax

高效液相色谱仪: HP 1100 系列, HP 1046A 荧光检测器;

色谱条件:

色谱柱: Hypsil ODS 柱 125 × 4mm (5 $\mu$ m);

流动相: A 0.02mol/L pH = 7.20 的 NaAC 缓冲液, 内含 0.018%(V/V)三乙胺和 0.3%(V/V)四氢呋喃;

B 0.02mol/L NaAc(pH = 7.20)缓冲液:乙腈:甲醇 = 1:2:2

洗脱条件 0~15min B 从 1% 到 60% ,15~18min B 从 60% 上升到 100% ,18~19min B 为 100% ;

流速 :1.0mL/min ;

柱温 :40℃ ;

检测波长 0~14.6min 338nm ;14.6~20.0min 262nm ;20.0min~338nm。

## 1.2 试剂

17 种氨基酸混合标准溶液 :Agilent Technologies ,含量为 1mmol/ $\mu$ L ,衍生试剂是 Hewlett Packard 提供的试剂盒。

## 1.3 样品处理

取 15g 霉菌干酪样品 ,研磨后加 80ml 超纯水 ,匀浆( 11000r/min ,2min ) ,离心( 5000g ,15min ) ,除去上层脂肪和底层沉淀 ,中间层的清液经超滤( 5000Da )后 ,滤液备用。

## 1.4 衍生及其分析

样品的衍生按照 Hewlett Packard 提供的试剂盒方法进行 ,衍生后进行色谱分析。以保留时间定性 ,峰面积用外标法定量。

## 2 结果与讨论

17 种氨基酸标准品的图谱见图 1 ,成熟 0 周和 2 周的霉菌干酪样品中游离氨基酸图谱见图 2 和图 3。从图 1 可以看出 ,17 种氨基酸中 15 种氨基酸均得到了很好地分离 ,仅丙氨酸和精氨酸未能很好分离 ,这与色谱柱效下降有关。图 2 和图 3 形成鲜明对比 ,图 2 代表的是未成熟干酪即凝乳后凝块氨基酸含量 ,其含量甚微。而成熟 2 周后样品中游离氨基酸含量明显增高 ,这说明霉菌干酪在成熟过程中产生了大量氨基酸。通过计算( 结果见表 1 ) ,其中谷氨酸含量最高达到 40.69mg/100g ,比未成熟干酪高 10 倍。另外亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、缬氨酸、赖氨酸和脯氨酸含量也较高 ,是未成熟干酪的 6~11 倍 ,其它氨基酸也有一定程度的增加。必须指出由于精氨酸和丙氨酸未能完全分离 ,所以图 1C 中的精氨酸含量没有计算。而样品中胱氨酸的量未检出。

## 3 结论

( 1 )采用 OPA 和 FMOC 为衍生试剂 , ODS 柱分离 ,338nm 检测可以较好分离 17 种氨基酸中的 15 种 ,另两种氨基酸分离效果欠佳。

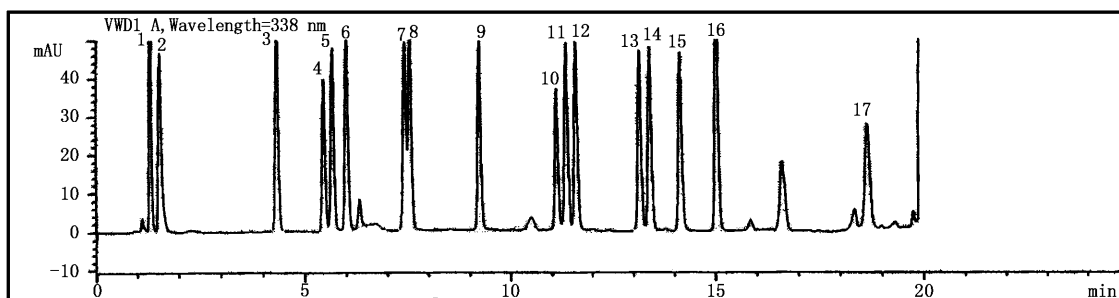
( 2 )霉菌成熟 2 周后样品中游离氨基酸含量明显增高 ,这说明霉菌干酪在成熟过程中产生了大量氨基酸。其中谷氨酸含量最高达到 40.69mg/100g ,比未成熟干酪高 10 倍。

( 3 )霉菌成熟 2 周的干酪中亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、缬氨酸、赖氨酸和脯氨酸含量也较

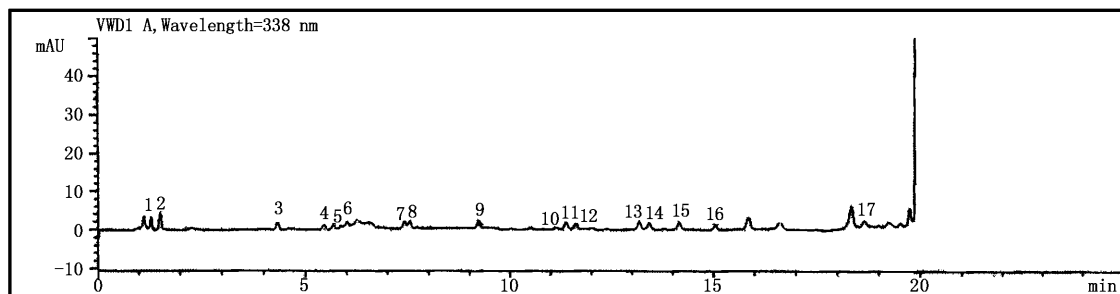
表 1 成熟 0 周和 2 周的霉菌干酪的游离氨基酸组成和含量测定结果

Tab.1 Analytical results of composition and amount of free amino acids in cheese curd and mold-ripened cheese ripening for 2 weeks

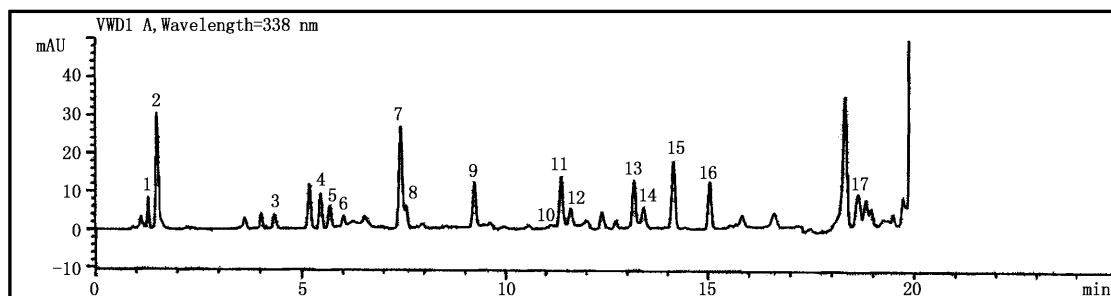
氨基酸	成熟 0 周霉菌干酪 (mg/100g)	成熟 2 周霉菌干酪 (mg/100g)	RSD ,%
天冬氨酸	2.48	6.37	2.90
谷氨酸	4.11	40.69	2.30
丝氨酸	1.41	3.34	0.92
组氨酸	2.27	18.11	2.00
甘氨酸	*	0.90	0.88
苏氨酸	1.35	2.39	2.10
丙氨酸	1.42	6.22	3.10
精氨酸	3.60	*	*
酪氨酸	2.98	20.88	1.00
胱氨酸	*	*	*
缬氨酸	1.93	16.47	1.20
甲硫氨酸	2.22	6.72	2.40
苯丙氨酸	2.82	20.16	2.40
异亮氨酸	1.99	6.45	1.00
亮氨酸	2.54	25.89	1.10
赖氨酸	1.20	11.85	2.70
脯氨酸	2.75	12.35	1.20



(A) 氨基酸标准图谱



(B) 成熟 0 周霉菌干酪样品氨基酸图谱



(C) 成熟 2 周霉菌干酪样品氨基酸图谱

图 1 图中(A)(B)和(C)分别是氨基酸标准品、未成熟干酪和霉菌成熟 2 周干酪样品中氨基酸图谱

Fig.1 Chromatograms of 17 amino acid standards (A), free amino acids in cheese curd (B) and free amino acids in mold-ripened cheese ripening for 2 week (C)

1 :Asp ; 2 :Glu ; 3 Ser ; 4 :His ; 5 :Gly ; 6 :Thr ; 7 :Ala ; 8 :Arg ; 9 :Tyr ; 10 :Cys-Cys ;  
11 :Val ; 12 :Met ; 13 :Phe ; 14 :Ile ; 15 :Leu ; 16 :Lys ; 17 :Pro

高,是未成熟干酪的 6-11 倍,其它氨基酸也有一定程度的增加。

(4)本次实验中胱氨酸未检出,这说明霉菌成熟 2 周的干酪中胱氨酸含量甚微或不含胱氨酸。

#### 参考文献:

- [1] Worthen H G, Liu H. Automatic pre-column derivatization and reversed-phase high performance liquid chromatography of primary and secondary amino acids in plasma with photo-diode array and fluorescence detection[J]. J Liq Chromatogr, 1992, 15(18):323.
- [2] Gupta M Amma, M K P. High performance liquid chromatographic determination of brain free amino acids from carbaryl- and thiram- intoxicated mice by pre-column derivatization with o-phthalaldehyde[J]. J Liq Chromatogr, 1992, 15(12):2153-2163.