

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。

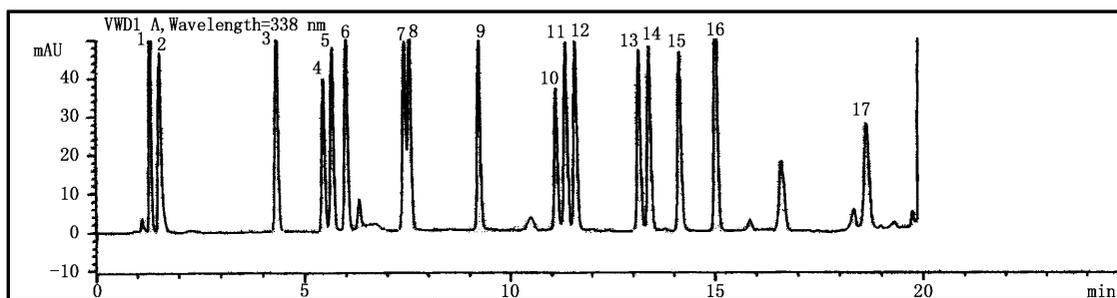
(2)霉菌成熟 2 周后样品中游离氨基酸含量明显增高 ,这说明霉菌干酪在成熟过程中产生了大量氨基酸。其中谷氨酸含量最高达到 40.69mg/100g ,比未成熟干酪高 10 倍。

(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

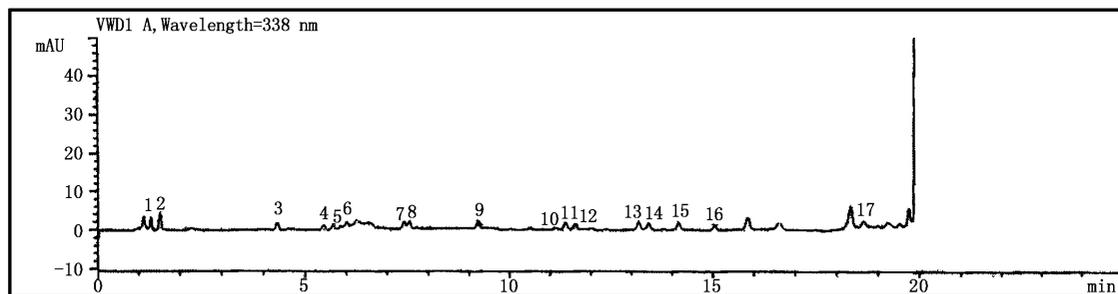
表1 成熟0周和2周的霉菌干酪的游离氨基酸组成和含量测定结果

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

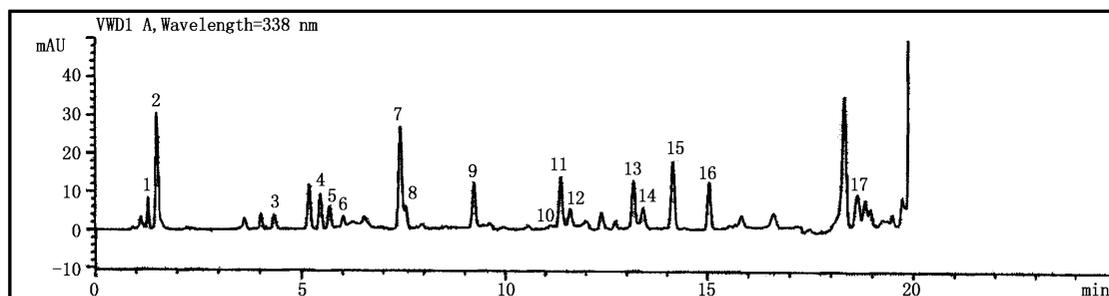
| 氨基酸  | 成熟0周霉菌干酪<br>(mg/100g) | 成熟2周霉菌干酪<br>(mg/100g) | RSD, % |
|------|-----------------------|-----------------------|--------|
| 天冬氨酸 | 2.48                  | 6.37                  | 2.90   |
| 谷氨酸  | 4.11                  | 40.69                 | 2.30   |
| 丝氨酸  | 1.41                  | 3.34                  | 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): 3323.
- [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.