

## 6 种葡萄籽中水解氨基酸和游离氨基酸 含量测定及比较

Determination and comparison of hydrolyzed amino acids and  
free amino acids in six kinds of grape seeds

卫阳飞<sup>1</sup> 宋海<sup>1</sup> 岳国仁<sup>1</sup> 张宏曦<sup>2</sup> 李彩霞<sup>1,3</sup>

WEI Yang-fei<sup>1</sup> SONG Hai<sup>1</sup> YUE Guo-ren<sup>1</sup> ZHANG Hong-xi<sup>2</sup> LI Cai-xia<sup>1,3</sup>

(1. 河西学院甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘州区食品药品监督管理局,  
甘肃 张掖 734000; 3. 河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000)

(1. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of Gansu, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China;  
2. Food and Drug Administration of Ganzhou District, Zhangye, Gansu 734000, China;  
3. College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China)

**摘要:**以异硫氰酸苯酯为柱前衍生试剂, 采用 Thermo Acclaim™ 120 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 pH 6.5 的乙酸钠缓冲溶液, 流动相 B 为甲醇—乙腈—水(体积比 20:60:20), 在流速 1.0 mL/min, 梯度洗脱, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm 的条件下, 建立了高效液相色谱法测定葡萄籽中水解氨基酸和游离氨基酸的含量。结果表明, 在试验浓度范围内, 17 种氨基酸的 R<sup>2</sup> 均 > 0.999 0; 水解氨基酸的加样回收率为 92.0%~104.6%, RSD 为 0.83%~4.07%; 游离氨基酸的加样回收率为 95.2%~102.4%, RSD 为 1.06%~3.98%。同时, 6 种葡萄籽中水解氨基酸的含量为 130.46~163.24 mg/g, 游离氨基酸的含量为 2.04~5.13 mg/g; 用于酿造白葡萄酒的雷司令、赛美容和贵人香 3 种葡萄籽中游离氨基酸含量较高, 用于酿造红葡萄酒的黑皮诺、蛇龙珠和赤霞珠 3 种葡萄籽中水解氨基酸含量较高。该方法稳定可靠, 可用于葡萄籽中水解氨基酸和游离氨基酸的含量测定。

**关键词:**葡萄籽; 水解氨基酸; 游离氨基酸; 高效液相色谱法; 柱前衍生; 异硫氰酸苯酯

**Abstract:** High performance liquid chromatography(HPLC) was developed to detect the hydrolyzed amino acids and free amino acids in grape seeds with phenyl isothiocyanate(PITC) as the derivative reagent.

For chromatographic analysis, a Thermo Acclaim™ 120 C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of solvent A and B with the flow rate of 1.0 mL/min by gradient elution. Solvent A was sodium acetate buffer solution (pH 6.5) and solvent B was methanol-acetonitrile-water (20:60:20, v/v/v). The temperature of column was maintained at 30 °C. The wavelength was set at 254 nm. The results showed that the R<sup>2</sup> of 17 kinds of amino acids were more than 0.999 0 in the range of experimental concentration. The average recoveries of hydrolyzed amino acids were 92.0%~104.6%, and RSDs were 0.83%~4.07%. The average recoveries of free amino acids were 95.2%~102.4%, and RSDs were 1.06%~3.98%. The contents of hydrolyzed amino acids in 6 kinds of grape seeds were 130.46~163.24 mg/g. The contents of free amino acids were 2.04~5.13 mg/g. More free amino acids were contained in the grape seeds from Leisiling, Saimeirong and Guirenxiang which three kinds of grape seeds were usually used to brew the white wine. The contents of hydrolyzed amino acids were higher in the grape seeds from Heipinuo, Shelongzhu and Chixiazhu which were always used for the red wine brewing. The method was stable and reliable, can be used for the determination of hydrolyzed amino acids and free amino acids in grape seeds.

**Keywords:** grape seeds; hydrolyzed amino acid; free amino acid; HPLC; precolumn derivatization; PITC

**基金项目:** 国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: 201510740009)

**作者简介:** 卫阳飞, 女, 河西学院助理研究员, 硕士。

**通信作者:** 李彩霞(1967—), 女, 河西学院高级实验师, 学士。

E-mail: 20953434@qq.com

**收稿日期:** 2018-05-07

葡萄籽是葡萄酒生产过程中的副产物。随着中国葡萄酒行业的发展, 每年产生的葡萄籽下脚料达数万吨<sup>[1]</sup>。研究表明, 葡萄籽含有丰富的蛋白质、葡萄籽油、原花青素和多种维生素<sup>[2]</sup>, 除了具有一定的营养价值, 还具有抗氧化<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗辐射<sup>[5]</sup>、保护心肌<sup>[6]</sup>等药理活性。因此, 近年来如何

就葡萄籽这种资源性副产物进行开发利用引起了广泛关注。目前有关葡萄籽油和原花青素的研究较为常见,而葡萄籽蛋白质虽营养和生物活性价值已为人们所认识,但对其化学组成研究却相对较少,缺乏相应的质量控制指标。

氨基酸是组成蛋白质的基本单位,在葡萄籽内以结合态和游离态 2 种形式存在。由于大多数氨基酸的极性高、挥发性低、无强发色基团,造成其分离和检测比较困难<sup>[7]</sup>。目前常用的检测方法为氨基酸分析仪<sup>[8-9]</sup>和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[10-11]</sup>。前者操作简单、分析速度快、灵敏度高,而 HPLC 因其仪器较为常见、衍生试剂多样等特点,近年来亦得到广泛应用。现有文献<sup>[12-14]</sup>多采用氨基酸分析仪对葡萄籽蛋白质中水解氨基酸的含量进行测定,而采用 HPLC 同时分析葡萄籽中水解氨基酸和游离氨基酸组成的研究还未见报道。

故为了更好地利用葡萄籽资源,充分实现资源的循环再利用,本研究拟以 6 种常见酿酒葡萄籽为原料,采用衍生化高效液相色谱法对其所含水解氨基酸和游离氨基酸成分进行分析,为葡萄籽的开发利用提供一定的科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

葡萄籽:黑皮诺、雷司令购自甘肃皇台酒业股份有限公司(武威),蛇龙珠、赛美容购自甘肃祁连葡萄酒有限责任公司(兰州),赤霞珠、贵人香购自甘肃紫轩酒业有限公司(嘉峪关),其中黑皮诺、蛇龙珠和赤霞珠为红葡萄酒酿酒品种(红籽),而雷司令、赛美容和贵人香为白葡萄酒酿酒品种(白籽),粉碎后过 60 目筛备用;

17 种氨基酸混合对照溶液:包括天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、胱氨酸,浓度均为 2.5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ,日本和光纯药工业有限公司;

17 种氨基酸的单体对照品:中国食品药品检定研究院;异硫氰酸苯酯:纯度 $\geq 98\%$ ,阿拉丁试剂有限公司;乙腈、甲醇:色谱纯,天津市兴复精细化工研究所;超纯水:自制。

#### 1.1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪:Agilent 1260 型,美国安捷伦公司;  
超声波清洗仪:KQ250B 型,昆山市超声仪器有限公司;  
电子分析天平:AUW120D 型,日本岛津公司;  
旋转蒸发器:RE-2000A 型,上海亚荣生化仪器厂;  
超纯水仪:Nex Power 1000 型,韩国 HUMAN 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 溶液的制备

(1) 水解氨基酸样品溶液:取不同葡萄籽样品 0.1 g,精密称定,置于水解管中,加入 6.0 mol/L 盐酸 15 mL,密封后于 110  $^{\circ}\text{C}$  水解 24 h,抽滤,取滤液于旋转蒸发器中浓缩挥发去盐酸,用 0.02 mol/L 盐酸定容至 100 mL。以不加样品

的溶液为空白对照。

(2) 游离氨基酸样品溶液:取不同葡萄籽样品 1.0 g,精密称定,加入 20 mL 水,浸泡 2 h,60  $^{\circ}\text{C}$ 、250 W 超声提取 1 h,抽滤,取滤液冷冻干燥成粉,加水定容至 10 mL 备用。以不加样品的溶液为空白对照。

(3) 混合对照溶液:将浓度为 2.5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  的氨基酸混合对照溶液用 0.02 mol/L 盐酸依次稀释,制备成各氨基酸浓度均为 1.250 0,0.625 0,0.125 0,0.062 5,0.012 5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  的系列标准溶液。

1.2.2 衍生化方法的优化 取混合对照溶液和供试品溶液各 200  $\mu\text{L}$ ,分别加入 0.1 mol/L 异硫氰酸苯酯乙腈溶液 100  $\mu\text{L}$ 、1.0 mol/L 三乙胺乙腈溶液 100  $\mu\text{L}$ ,混匀,室温反应一定时间(0.5,1.0,1.5 h),再分别加入正己烷 400  $\mu\text{L}$ ,剧烈振摇以除去多余的衍生试剂及副产物,重复此步骤(1,2,3 次),合并下层溶液,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,备用。考察衍生反应时间和正己烷加入次数对氨基酸测定结果的影响。

1.2.3 高效液相色谱条件的优化 Thermo Acclaim<sup>TM</sup> 120 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm $\times$  4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ );流动相 A:称取 15.2 g 无水乙酸钠,加水 1 850 mL,溶解后用冰醋酸调 pH(5.5,6.0,6.5,7.0),再加乙腈 140 mL,混匀,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤;流动相 B:甲醇-乙腈-水(体积比 20:60:20),梯度洗脱(0~5 min,100% A~98% A;5~6 min,98% A~95% A;6~14 min,95% A~91% A;14~18 min,91% A~79% A;18~32 min,79% A~55% A;32~34 min,55% A~45% A;34~38 min,45% A~0% A;38~42 min,0% A~0% A;42~45 min,0% A~100% A;45~50 min,100% A~100% A);流速为 1.0 mL/min;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长 254 nm;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。考察色谱流动相缓冲液 pH 对分离效果的影响。

#### 1.2.4 方法学验证

(1) 专属性考察:在“1.2.3”优化好的色谱条件下进样分析水解氨基酸和游离氨基酸样品溶液(均以雷司令为例)、空白溶液和 17 种氨基酸的混合对照品溶液的衍生化产物。

(2) 线性关系考察:分别精密吸取衍生化后的不同浓度混标溶液 10  $\mu\text{L}$ ,按“1.2.3”优化好的色谱条件测定不同浓度下各氨基酸的峰面积,以摩尔浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归。

(3) 重复性考察:按照“1.2.1”和“1.2.2”项下优化后的方法,制备 5 份雷司令水解氨基酸和 5 份游离氨基酸供试品溶液,按“1.2.3”项下优化后色谱条件测定,分别计算不同样品中氨基酸峰面积的 RSD。

(4) 稳定性考察:分别取制备好的同一份雷司令水解氨基酸和游离氨基酸供试品溶液,按“1.2.3”项下优化后色谱条件,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进行测定,计算不同时间测定氨基酸峰面积的 RSD。

(5) 加标回收试验:取 5 份已知含量的同一份雷司令样品 0.1 g,精密称定,分别加入浓度为 2.5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  的氨基酸混合对照品溶液 1.0 mL;取 5 份已知含量的同一份雷司令样品 1.0 g,精密称定,分别加入浓度为 2.5  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  的氨基酸混合对照品溶液 0.5 mL;均按照“1.2.1”和“1.2.2”项下优化

后方法制备供试液,按照“1.2.3”项下优化后色谱条件进行分析,根据测得量与加入量计算各水解氨基酸和游离氨基酸的回收率及 RSD。

## 2 结果与分析

### 2.1 衍生化及色谱条件的优化

目前氨基酸的柱前衍生检测常用的衍生试剂包括邻苯二甲醛 (*O*-Phthaldialdehyde, OPA)、异硫氰酸苯酯 (Phenyl isothiocyanate, PITC)、丹磺酰氯 (1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulphonylchloride, Dansyl-Cl) 等,其中 PITC 能够与一级和二级氨基酸同时反应生成苯氨基硫甲酰衍生物,具有衍生反应速度快<sup>[15]</sup>,灵敏度较高,衍生物单一、稳定等优点,故本研究采用 PITC 作为氨基酸的柱前衍生试剂。如图 1、2 所示,当衍生反应时间超过 1.0 h 时,HPLC 检测氨基酸峰面积无明显增加,而正己烷加入 2 次后再增加次数色谱图中衍生物试剂杂峰未见减少。故最终选择衍生化反应时间为 1.0 h,正己烷加入次数为 2 次。该结果与郭俊国等<sup>[16]</sup>关于氨基酸衍生化反应时间的优化结论吻合。

如图 3 所示,结果发现氨基酸的测定受 pH 影响较大,保持其他条件不变,只有当 pH 为 6.5 时才能实现 17 种氨基酸的分离。pH 会直接影响氨基酸衍生物的保留时间和峰形<sup>[17]</sup>,导致分离困难,推测可能与 pH 会影响氨基酸与 PITC 反应生成的苯氨基硫甲酰衍生物存在形式及其与色谱柱之间相互作用有关。

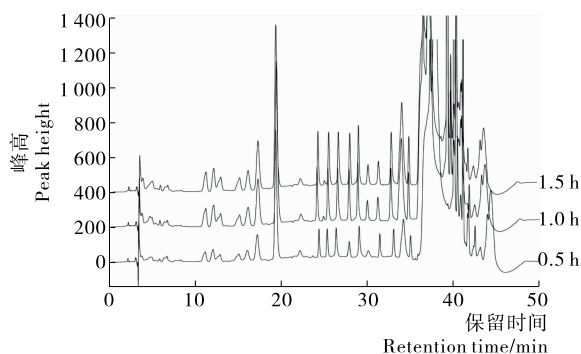


图 1 衍生反应时间对氨基酸衍生物测定的影响

Figure 1 Effect of the reaction time on the determination of derivatives of amino acids by HPLC

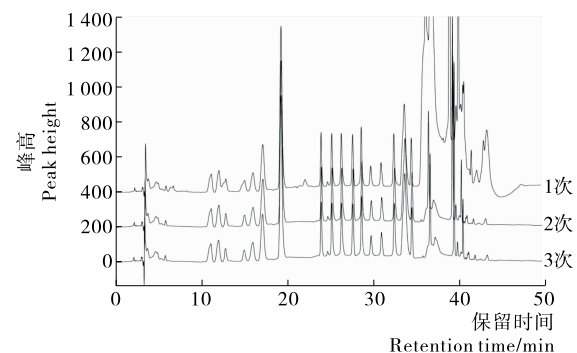


图 2 正己烷加入次数对氨基酸衍生物测定的影响

Figure 2 Effect of n-hexane addition times on the determination of derivatives of amino acids by HPLC

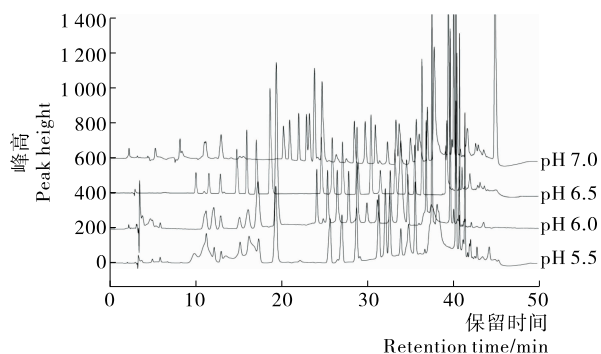


图 3 pH 对氨基酸衍生物测定的影响

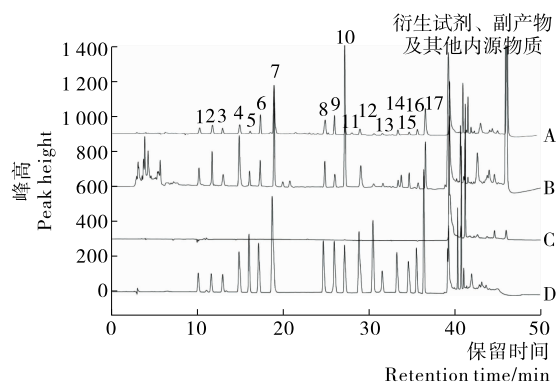
Figure 3 Effect of pH on the determination of derivatives of amino acids by HPLC

### 2.2 方法的专属性和线性关系考察

由图 4 可知,17 种氨基酸在 37 min 内达到完全分离,内源性物质和衍生化试剂不干扰氨基酸的测定。线性考察结果见表 1,相关系数  $R^2$  为 0.999 0~0.999 8。该结果与黄蕴芝等<sup>[18]</sup>将氨基酸经阳离子交换树脂富集后,采用 Waters Symmetry  $C_{18}$  (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱,以乙腈-水 (体积比 4:1) 为流动相 A,30 mmol/L 乙酸钠-乙腈 (体积比 355:15) 为流动相 B 的色谱条件取得的分离效果近似。王菲菲等<sup>[19]</sup>选用 Waters ACQUITY UPLC H-Class-PDA 超高效液相色谱系统以及 AccQ-Tag<sup>TM</sup> Ultra (100 mm×2.1 mm, 1.7  $\mu$ m) 色谱柱,在衍生化试剂相同情况下,将色谱分析时间缩短至 10 min,提高了分析效率,值得在以后的研究中借鉴。

### 2.3 重复性、稳定性和加标回收试验

结果表明,同法处理的 5 份样品中不同水解氨基酸峰面积的 RSD 为 0.67%~3.15%,不同游离氨基酸峰面积的 RSD 为 0.93%~4.43%,表明该方法的重复性良好。同一个样品不同时间测定的水解氨基酸峰面积的 RSD 为 0.54%~2.44%,游离氨基酸峰面积的 RSD 为 0.76%~3.45%,表明该法处理所得供试品溶液在 24 h 内保持稳定。加标回收试



1. 天冬氨酸 2. 谷氨酸 3. 丝氨酸 4. 甘氨酸 5. 组氨酸 6. 精氨酸 7. 苏氨酸 8. 丙氨酸 9. 脯氨酸 10. 酪氨酸 11. 缬氨酸 12. 甲硫氨酸 13. 赖氨酸 14. 异亮氨酸 15. 亮氨酸 16. 苯丙氨酸 17. 胱氨酸 A. 雷司令游离氨基酸样品 B. 雷司令水解氨基酸样品 C. 空白对照 D. 17 种氨基酸混合对照品

图 4 各样品色谱图

Figure 4 HPLC chromatograms of different samples

表 1 不同氨基酸的线性方程、检测限和定量限

Table 1 Linear regression, LODs and LOQs of different references

化合物	线性方程	相关系数 $R^2$	线性范围/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$
天冬氨酸	$Y=164.1X+0.955$	0.999 4	0.062 5~2.500 0	0.025 0	0.062 5
谷氨酸	$Y=172.0X-5.667$	0.999 3	0.062 5~2.500 0	0.025 0	0.062 5
丝氨酸	$Y=127.4X-5.255$	0.999 1	0.062 5~2.500 0	0.050 0	0.062 5
甘氨酸	$Y=413.2X-17.13$	0.999 3	0.062 5~2.500 0	0.025 0	0.050 0
组氨酸	$Y=517.8X-26.77$	0.999 4	0.062 5~2.500 0	0.025 0	0.062 5
精氨酸	$Y=421.2X+95.07$	0.999 2	0.062 5~2.500 0	0.006 5	0.025 0
苏氨酸	$Y=811.6X+477.9$	0.999 0	0.012 5~2.500 0	0.002 5	0.005 0
丙氨酸	$Y=469.9X-23.03$	0.999 2	0.062 5~2.500 0	0.006 5	0.025 0
脯氨酸	$Y=484.2X-22.44$	0.999 5	0.062 5~2.500 0	0.006 5	0.025 0
酪氨酸	$Y=474.1X-36.41$	0.999 0	0.062 5~2.500 0	0.006 5	0.025 0
缬氨酸	$Y=519.8X-46.76$	0.999 1	0.062 5~2.500 0	0.025 0	0.062 5
甲硫氨酸	$Y=565.7X-25.35$	0.999 8	0.062 5~2.500 0	0.006 5	0.025 0
胱氨酸	$Y=165.4X-2.143$	0.999 2	0.062 5~2.500 0	0.025 0	0.062 5
异亮氨酸	$Y=412.2X+7.573$	0.999 8	0.012 5~2.500 0	0.002 5	0.005 0
亮氨酸	$Y=202.9X-12.98$	0.999 5	0.062 5~2.500 0	0.025 0	0.062 5
苯丙氨酸	$Y=485.1X-39.52$	0.999 2	0.062 5~2.500 0	0.002 5	0.005 0
赖氨酸	$Y=1\ 067X+96.20$	0.999 3	0.012 5~2.500 0	0.002 5	0.005 0

验结果见表 2,水解氨基酸的平均回收率为 92.0%~104.6%, RSD 为 0.83%~4.07%,游离氨基酸的平均回收率为 95.2%~102.4%,RSD 为 1.06%~3.98%。水解氨基酸的平

均回收率范围略大于游离氨基酸的,可能与水解氨基酸的酸水解步骤相关。

表 2 加标回收试验结果

Table 2 Results of recovery tests ( $n=5$ ) %

化合物	水解氨基酸		游离氨基酸	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
天冬氨酸	97.8	2.69	95.2	3.98
谷氨酸	95.5	3.82	97.5	3.81
丝氨酸	100.2	3.04	95.5	3.92
甘氨酸	99.6	4.07	102.3	2.46
组氨酸	101.3	2.54	100.0	1.71
精氨酸	96.0	2.93	99.3	2.55
苏氨酸	99.7	0.97	98.9	3.42
丙氨酸	103.6	3.75	96.4	3.22
脯氨酸	100.5	3.21	100.1	2.27
酪氨酸	104.6	3.76	97.4	2.45
缬氨酸	98.4	0.83	97.6	1.94
甲硫氨酸	95.1	2.45	102.4	1.06
胱氨酸	97.1	3.31	97.6	3.88
异亮氨酸	97.6	3.80	95.7	3.52
亮氨酸	92.0	2.07	95.3	3.19
苯丙氨酸	99.6	1.79	97.9	1.73
赖氨酸	94.1	2.58	97.3	2.18

2.4 样品测定结果与分析

取衍生好的不同葡萄籽样品溶液,按照“1.2.3”优化后色谱条件进行测定,结果见表 3 和图 5。结果表明,不同品种葡萄籽中水解氨基酸均以谷氨酸、脯氨酸为主,其次是甘氨酸、天冬氨酸、精氨酸和亮氨酸。游离氨基酸以精氨酸、脯氨酸和谷氨酸为主。6 种葡萄籽中水解氨基酸的总含量为 130.46~163.24 mg/g,游离氨基酸的总含量为 2.04~5.13 mg/g,白籽中游离氨基酸含量普遍高于红籽,而红籽中水解氨基酸含量普遍高于白籽。

不同葡萄籽水解氨基酸样品中必需氨基酸含量占总氨基酸含量的 22.37%~25.16%,必需氨基酸/非必需氨基酸为 33.09%~38.41%,红籽和白籽差别不大。而游离氨基酸样品中必需氨基酸含量占总氨基酸含量的 9.28%~39.95%,必需氨基酸/非必需氨基酸为 15.31%~92.12%,白籽所含游离氨基酸中必需氨基酸比例明显高于红籽。

FAO/WHO 提出的理想蛋白质的标准为:人体必需氨基酸含量/氨基酸总含量在 40%左右,人体必需氨基酸含量/非必需氨基酸含量在 60%左右<sup>[20]</sup>。从这一角度分析,葡萄籽蛋白质具有一定的蛋白补充功能。

2.5 葡萄籽中人体必须氨基酸比例与 FAO/WHO 理想氨基酸构成模式的比较

如表 4 所示,不同葡萄籽中苏氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸+酪氨酸基本符合 FAO/WHO 理想氨基酸构成比例。

表 3 不同葡萄籽中水解和游离氨基酸的含量<sup>†</sup>  
Table 3 The contents of hydrolyzed and free amino acids in different grape seeds (*n*=3) mg/g

化合物	雷司令		黑皮诺		赛美容		蛇龙珠		贵人香		赤霞珠	
	水解	游离	水解	游离	水解	游离	水解	游离	水解	游离	水解	游离
天冬氨酸	10.438	0.201	9.256	—	9.784	0.069	10.142	—	10.392	0.103	10.379	—
谷氨酸	28.575	0.449	30.316	0.363	31.533	0.521	31.260	0.391	32.213	0.524	36.251	0.532
丝氨酸	5.904	0.214	6.512	—	6.447	—	6.344	—	6.442	0.168	7.343	—
甘氨酸	11.956	0.143	11.355	0.026	12.542	0.187	11.484	0.031	12.597	0.136	14.316	0.026
组氨酸**	3.589	0.112	3.643	0.123	3.451	0.121	3.575	0.227	3.828	0.065	3.791	0.209
精氨酸**	9.236	0.597	9.387	0.301	10.647	0.735	9.493	0.415	10.401	0.515	12.056	0.490
苏氨酸*	4.320	0.303	5.522	0.160	5.028	0.540	4.632	—	4.929	0.335	6.178	—
丙氨酸	6.601	0.396	7.294	0.089	7.372	0.459	6.762	0.128	7.194	0.307	8.383	0.129
脯氨酸	21.285	0.608	23.319	0.604	17.207	0.699	22.907	0.631	23.461	0.665	27.371	0.648
酪氨酸	1.904	0.198	1.937	0.121	2.128	0.234	1.705	0.111	2.162	0.205	2.948	0.111
缬氨酸*	4.100	0.267	5.190	0.061	4.622	0.308	4.503	0.015	4.369	0.242	5.332	0.073
甲硫氨酸*	1.259	0.040	1.577	—	0.935	0.078	1.693	—	1.189	0.037	1.122	—
胱氨酸	1.514	0.061	1.640	—	1.612	0.058	1.737	—	1.542	—	1.995	—
异亮氨酸*	3.081	0.134	4.067	—	3.521	0.169	3.354	—	3.322	0.102	3.952	—
亮氨酸*	7.638	0.235	8.767	0.016	8.553	0.340	8.063	—	8.337	0.226	10.003	0.022
苯丙氨酸*	4.369	0.271	4.458	0.136	4.916	0.350	4.175	0.143	4.740	0.272	5.751	0.143
赖氨酸*	4.690	0.221	5.613	0.042	5.391	0.266	4.611	0.040	4.879	0.207	6.068	0.046
氨基酸总含量	130.459	4.449	139.850	2.041	135.688	5.133	136.440	2.130	141.997	4.108	163.238	2.429
人体必需氨基酸	29.456	1.471	35.192	0.416	32.964	2.051	31.030	0.198	31.766	1.420	38.407	0.284
非必需氨基酸	88.177	2.270	91.628	1.201	88.625	2.226	92.342	1.291	96.003	2.108	108.984	1.446
儿童成长必需氨基酸	12.825	0.708	13.030	0.424	14.098	0.856	13.068	0.642	14.228	0.580	15.847	0.698
必需氨基酸/氨基酸总量	22.58%	33.06%	25.16%	20.39%	24.29%	39.95%	22.74%	9.28%	22.37%	34.58%	23.53%	11.71%
必需氨基酸/非必需氨基酸	33.41%	64.80%	38.41%	34.64%	37.20%	92.12%	33.60%	15.31%	33.09%	67.38%	35.24%	19.67%

† \* 为必须氨基酸; \*\* 为儿童成长必须氨基酸。

表 4 不同葡萄籽中必须氨基酸模式比例比较表  
Table 4 The comparative table of pattern scales of hydrolyzed amino acids in different grape seeds %

化合物	WHO/FAO 模式 <sup>[20]</sup>	雷司令	黑皮诺	赛美容	蛇龙珠	贵人香	赤霞珠
苏氨酸	4.00	3.31	3.95	3.71	3.39	3.78	3.47
缬氨酸	5.00	3.14	3.71	3.41	3.30	3.27	3.08
甲硫氨酸+胱氨酸	3.50	2.13	2.30	1.88	2.51	1.91	1.92
异亮氨酸	4.00	2.36	2.91	2.59	2.46	2.42	2.34
亮氨酸	7.00	5.85	6.27	6.30	5.91	6.13	5.87
赖氨酸	5.50	3.60	4.01	3.97	3.38	3.72	3.44
苯丙氨酸+酪氨酸	6.00	4.81	4.57	5.19	4.31	5.33	4.86

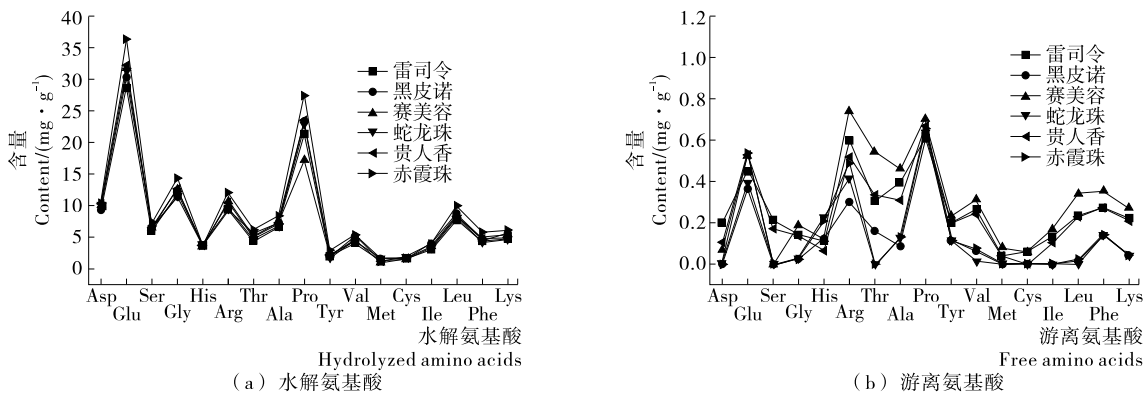


图 5 不同葡萄籽中各氨基酸含量分布图  
Figure 5 The content distribution of amino acids in different grape seeds

### 3 结论

本研究建立了柱前衍生结合高效液相色谱测定葡萄籽中17种水解氨基酸和游离氨基酸含量的方法,该方法稳定,重复性好,结果可靠。葡萄籽中氨基酸含量丰富,6种葡萄籽中水解氨基酸的总含量为130.46~163.24 mg/g,游离氨基酸的总含量为2.04~5.13 mg/g。不同葡萄籽水解氨基酸样品中必需氨基酸含量占氨基酸总量的22.37%~25.16%,必需氨基酸/非必需氨基酸为33.09%~38.41%,苏氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸+酪氨酸基本符合FAO/WHO理想氨基酸构成比例,表明葡萄籽蛋白质具有一定的蛋白补充功能。白籽中所含游离氨基酸含量普遍高于红籽,而红籽中水解氨基酸含量普遍高于白籽,推测从氨基酸角度出发,如果葡萄籽食用方法为打粉服食应选择红籽,而如果泡水饮用最好选择白籽类产品。本试验只选择了17种氨基酸作为研究对象,但在实际测定葡萄籽中水解和游离氨基酸的过程中,发现还有一些其他的氨基酸成分未得到检测,需要后续进行HPLC-MS鉴定或更多的标准品比对才能够得以证实。

#### 参考文献

- [1] 任继波,李彦奎,张晶莹,等.葡萄籽油的热榨法制备工艺研究与脂肪酸GC-MS分析[J].中外葡萄与葡萄酒,2017,41(1):27-30.
- [2] 王伏超,任育萱,张磊.葡萄籽的成分开发利用与研究进展[J].中国食品添加剂,2015,22(7):151-155.
- [3] 郑亚蕾,刘叶,隋银强,等.4个葡萄品种葡萄籽冷榨油的性质与体外抗氧化活性[J].食品科学,2016,36(3):27-32.
- [4] 李保应,高海青.葡萄多酚的抗肿瘤作用[J].中华老年病研究电子杂志,2015,2(2):28-31.
- [5] 吴涛,张倩,刘锐,等.儿茶素、槲皮素和葡萄籽原花青素的协同抗辐射作用[J].天津科技大学学报,2018,33(1):9-13.
- [6] 王红珊,曹毅敏,杨晋,等.葡萄籽原花青素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国生化药物杂志,2012,33(2):161-162.
- [7] 赫欣睿,武中庸,叶永丽,等.高效液相色谱法测定氨基酸的研

究进展[J].分析测试学报,2016,35(7):922-928.

- [8] 张苏平,邱伟强,卢祺,等.全自动氨基酸分析仪法测定4种贝类肌肉中谷胱甘肽和游离氨基酸含量[J].食品科学,2017,38(4):170-176.
- [9] 刘李婷,葛武鹏,杨丽娜,等.牛乳粉中掺入大豆蛋白的特异氨基酸分析研究[J].食品工业,2018,39(3):215-217.
- [10] 缪潇瑶,于静,安敏,等.不同品种沙蚕中氨基酸含量的HPLC测定及多元统计分析[J].药物分析杂志,2016,36(1):53-58.
- [11] 陈蓉,张超,顾倩,等.柱前衍生-HPLC法同时测定不同产地茯苓中18种氨基酸含量[J].药物分析杂志,2017,37(2):297-303.
- [12] 许申鸿,杭瑚,郝晓丽.葡萄籽化学成分分析及其抗氧化性质的研究[J].食品工业科技,2000,21(2):18-20.
- [13] 周建华.葡萄籽中提取油和蛋白质的研究[J].粮食与饲料工业,2000,23(10):48-49.
- [14] 李想.纳豆葡萄籽胶囊中氨基酸组成及含量的测定[J].中国食物与营养,2009,15(5):57-58.
- [15] FERNÁNDEZFIGARES I, RODRÍGUEZ L C, GONZÁLEZ-ASADO A. Effect of different matrices on physiological amino acids analysis by liquid chromatography: evaluation and correction of the matrix effect[J]. Journal of Chromatography B, 2004, 799(1): 73-79.
- [16] 郭俊国,解孝锋,毕宏生,等.PITC柱前衍生HPLC法测定茺蔚子中游离和水解氨基酸的含量[J].中华中医药杂志,2015,30(1):91-94.
- [17] 全红娜,金松子,雷勇胜,等.反相高效液相色谱中流动相选择与优化的研究进展[J].现代药物与临床,2014,29(10):1190-1194.
- [18] 黄蕴芝,祁龙凯,林励,等.蜂蜜中氨基酸类成分高效液相指纹图谱研究[J].广州中医药大学学报,2015,32(4):745-750.
- [19] 王菲菲,张聿梅,马双成,等.高效薄层色谱、柱前衍生-超高效液相色谱和离子色谱分析疏血通注射液中游离子氨基酸的比较[J].药学报,2016,51(3):439-443.
- [20] FAO/WHO. Energy and protein requirements[R]. Geneva: World Health Organization, 1973: 63.

(上接第61页)

#### 参考文献

- [1] BOZINKII M, DOLBERG U, LIPP G. The Determination of menthol in tobacco, in filters and in the smoke of mentholated cigarettes[J]. Biter Rorschach Int, 1972, 6(3): 124-130.
- [2] 宋瑜冰,谢剑平,宗永立,等.薄荷醇在卷烟中转移行为的控制及检测研究综述[J].香料香精化妆品,2005,6(3):25-28.
- [3] 申玉军,邓国栋,陈良,等.一种烟草感官评价分析方法的建立及应用[J].烟草科技,2011(5):15-18.
- [4] 陈芝飞,杨靖,马宇平,等.烟用香料作用阈值感官评价方法的建立及应用[J].烟草科技,2016,49(4):30-35.
- [5] 刘熙.消费者吸烟行为的卷烟感官质量评价研究[J].安徽农业科学,2011,39(18):10995-10997.
- [6] 龙章德,林顺顺,田兆福,等.基于电子鼻分析的原料烟叶鉴别[J].食品与机械,2013,29(4):35-39.
- [7] 田书霞,白若石,杨振民,等.薄荷-茶香型卷烟香气风格的应用研究[J].香精香料化妆品,2015(1):23-27.
- [8] 国家烟草专卖局.YC/T 416—2011 醋酸纤维滤棒中薄荷醇的测

定气相色谱法[S].北京:中国标准出版社,2012:1-3.

- [9] 林文强,欧亚非,王瑞玲,等.薄荷型卷烟和主流烟气中薄荷醇分析及其转移的研究[J].化学研究与应用,2010,22(9):1122-1125.
- [10] 蔡卫兵.缓释薄荷香精在滤棒中的应用及释放机理的研究[D].上海:华东理工大学,2006.
- [11] 谢剑平,宗永立,屈展,等.单体香料在卷烟中作用评价方法的建立及应用[J].烟草科技,2008(4):5-8.
- [12] 武怡,廖头根,王明锋,等.中式卷烟消费体验感官评价方法的建立及应用[J].烟草科技,2015,48(5):80-84.
- [13] 林翔云.调香术[M].北京:化学工业出版社,2007.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB 5606.4—2005 卷烟 感官技术要求[S].北京:中国标准出版社,2005:1-2.
- [15] 国家烟草专卖局.YC/T 138—1998 烟草及烟草制品 感官评价方法[S].北京:中国标准出版社,1998:175-185.
- [16] 国家烟草专卖局.YC/T 415—2011 烟草在制品 感官评价方法[S].北京:中国标准出版社,2012:1-6.
- [17] 郝春莉.气相离子迁移谱在食品风味分析中的应用[J].化学工程与装备,2015(10):201-205.