

实验技术与方法

柱前衍生化 HPLC 法测定酱油中(半)胱氨酸的含量

夏苏捷^{1,2} 邵泓² 陈钢²

(1. 上海医药工业研究院,上海 200040;2. 上海市食品药品检验所,上海 201203)

摘要:目的 探讨建立柱前衍生 HPLC 法测定胱氨酸和半胱氨酸总含量的方法。方法 以二硫代二丙酸(DIDPA)及异硫氰酸苯酯(PITC)为柱前衍生剂,采用反相高效液相色谱法测定酱油中胱氨酸和半胱氨酸总含量。通过对反应温度、反应时间、衍生溶液体积及浓度等影响两步衍生反应效率的因素的研究,获得了优化的实验参数。结果 在酱油基质中进行方法认证,线性范围为 0.02 ~ 1.00 mg/ml ($R^2 = 0.9999$)。日内和日间精密度 $RSD < 8\%$;日内和日间准确度(回收率)分别在 100.1% ~ 101.3% 和 96.4% ~ 103.4% 之间。结论 本方法适用于酱油中的(半)胱氨酸检测,为鉴别“毛发水酱油”提供了有效的监测手段。

关键词:大豆食品;胱氨酸;半胱氨酸;色谱法;高压液相

Determination of Cystine (Cysteine) in Soy Sauce with Pre-column Derivation by High Performance Liquid Chromatography

XIA Su-jie, SHAO Hong, CHEN Gang

(Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China)

Abstract: **Objective** To establish a method of HPLC with pre-column derivation for determination of cystine and cysteine in soy sauce. **Method** The samples were derived with 3, 3-dithiodipropionic acid (DIDPA) and phenylisothiocyanate (PITC). The cystine and cysteine in soy sauce were determined by reverse-phase high performance liquid chromatography. The experimental parameters that control derivation reaction were studied and optimized, such as reaction temperature, reaction time, concentration and volume of the derivative solution. **Results** The linear range was 0.02 ~ 1.00 mg/ml ($R^2 = 0.9999$). The intra- and inter-day precisions (described as a percentage of relative standard deviation, RSD) were below 8%. The intra- and inter-day accuracies (described as recovery) were 100.1% ~ 101.3% and 96.4% ~ 103.4%, respectively. **Conclusion** The results showed that this method could be suitable for analysis of cystine and cysteine in soy sauce and could provide effective monitoring mersure for distinguish false soy sauce.

Key word: Soy Foods; Cystine; Cysteine; Chromatography, High Pressure Liquid

“毛发水”酱油,是指用生产胱氨酸过程中余留下的废液配兑成的假冒酱油。其中含铅、砷、4-甲基咪唑等有害物质,对人体肝、肾、血液系统、生殖系统均有危害,可致癌。由于工业上生产胱氨酸的原料均是富含胱氨酸的动物角质蛋白如人发、猪毛等,故俗称“毛发水”酱油。

酱油的主要成分是氨基酸,检测酱油的一个重要指标是氨基酸态氮的含量。使用这种胱氨酸废液配制的酱油,不但不需要用黄豆等原料来发酵,而且氮的含量完全能够达到酱油的国家标准。按照现有的国家标准的检测手段^[1,2]是无法区分出“毛发水酱油”的。为了保障人民群众的身体健康,建立辨别

“毛发水酱油”的检测手段是十分必要的。

据文献报道^[3-6],在以食用植物蛋白为原料酿造的纯酿造酱油中均未检测出胱氨酸,而胱氨酸废液中则含有一定量的胱氨酸成分。因此可认为,对标明“酿造酱油”的酱油产品来说,如在其中检测出胱氨酸成分则可判定其为“毛发水”酱油。

胱氨酸(cystine)与其还原产物半胱氨酸(cysteine)在水溶液中同时存在,且易相互转换^[7],单独定量检测胱氨酸或半胱氨酸比较困难。Barkholt^[6]最早提出用二硫代二丙酸(DIDPA)将胱氨酸/半胱氨酸转换成特定的S-2-羧甲基硫代半胱氨酸(Cys-MPA),对后者进行定量分析。本实验采用上述原理进行胱氨酸和半胱氨酸总量的定量检测,选择异硫氰酸苯酯(PITC)作为衍生剂,用HPLC-UV法测定其与Cys-MPA反应后的生成物(Cys-x)。本文对二硫代二丙酸(DIDPA)与异硫氰酸苯

基金项目:上海市科委“登山行动计划”基金资助项目(06DZ05138)

作者简介:夏苏捷 女 硕士研究生

通讯作者:陈钢 男 主任药师

酯(PITC)联用测定(半)胱氨酸方法中的两步衍生化及液相色谱分析条件进行了探讨和优化,建立了在酱油中检测(半)胱氨酸的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

“Amino Acid Standard H” (Pierce, 美国)、胱氨酸标准品(中国药品生物制品检定所, 编号:140632)、酱油样品 1~7 号(市场抽样)、胱氨酸废液 1、2(厂家提供)、二硫代二丙酸(DTDPA, Fluka, 德国)、异硫氰酸苯酯(PITC, Fluka, 德国)、乙腈(色谱纯, Merck, 德国)、正己烷(色谱纯, 上海凌峰化学试剂有限公司)、三乙胺、无水乙醇、二氯甲烷、无水醋酸钠、盐酸、乙酸(分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司)、超纯水(0.22 μm 滤膜过滤)。

PITC 衍生溶液 异硫氰酸苯酯 + 乙醇 + 三乙胺 + 水 = 1 + 7 + 1 + 1(体积分数)。

DTDPA 衍生溶液 称取 DTDPA 1 g, 溶于 10 ml 0.4 mol/L 硼酸缓冲液(pH 10.4)中, 用 40% 氢氧化钠溶液调至 pH 10.4。

胱氨酸对照系列溶液 1 精密称取胱氨酸对照品适量, 用 0.1 mol/L 盐酸溶解并逐步稀释, 得到浓度分别为 0.02、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00、2.00 mg/ml 的对照溶液。

胱氨酸对照系列溶液 2 精密称取胱氨酸对照品适量, 用稀释至 10 倍的空白酱油样品溶液(即不含胱氨酸)溶解并逐步稀释, 得到浓度分别为 0.02、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/ml 的对照溶液。

供试品溶液 将酱油样品用 0.1 mol/L 盐酸稀释 10 倍, 备用。

Waters2695 高效液相色谱仪、Waters2996 二极管阵列检测器、MILLI-Q 水净化系统(Millipore, Bedford, MA, 美国)、旋涡混合器(上海医大仪器厂)、超声仪(上海科导超声仪器有限公司)、离心机(Eppendorf, 德国)。

1.2 方 法

1.2.1 前处理方法 取 20 μl 供试品溶液置于 1.5 ml 塑料离心管中, 加入 30 μl DTDPA 衍生溶液, 旋涡混合 1 min, 于 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 20 min, 离心(5 000 r/min) 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥至干, 加入 30 μl PITC 衍生溶液, 超声溶解, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 20 min, 加入 370 μl HPLC 初始流动相, 旋涡混合 1 min, 再加入 400 μl 二氯甲烷, 旋涡混合 1 min, 离心(5 000 r/min) 1 min 使之分层。取上层溶液, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液进样分析。用胱氨酸衍生产物的峰面积评价反应结果。本方法所测得的胱氨酸加半胱氨酸含量均以

胱氨酸计, 即 2 mol 半胱氨酸相当于 1 mol 胱氨酸。

1.2.2 色谱条件 色谱柱: Dikma Platisil C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μl ; 检测波长: 247.3 nm; 流速: 1.0 ml/min; 采用 3 组分梯度洗脱, 流动相 A: 0.2 mol/L 醋酸钠 + 三乙胺 = 997.5 + 2.5(体积分数), 冰醋酸调至 pH 6.4; 流动相 B: 乙腈 + 水 = 4 + 1(体积分数); 流动相 C: 超纯水。前 25 min A + B + C 从 20 + 5 + 75 变换到 20 + 50 + 30, 然后 1 min 内变为 A + B + C(10 + 80 + 10), 保持 9 min, 最后需 10 min 平衡到初始流动相。

2 结 果

2.1 DTDPA - cystine 衍生反应影响因素考察

对影响胱氨酸与 DTDPA 反应的 4 种因素: 反应温度、反应时间、衍生溶液浓度及衍生溶液体积做了考察和优化。以产物峰面积为指标, 进行 $L_9(3^4)$ 正交实验(见表 1)。待测溶液为 0.5 mg/ml 胱氨酸对照溶液。

表 1 DTDPA 衍生反应的因素与水平设计表

水平	体积 (μl)	浓度 (g/ml)	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (min)
1	10	0.02	70	20
2	20	0.05	80	30
3	30	0.10	90	40

实验结果见表 2。由各水平的平均得率 k 值看出: 当 DTDPA 衍生溶液体积为 30 μl , 浓度为 0.1 g/ml, 反应温度 90 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间 20 min 时, 胱氨酸与 DTDPA 生成 Cys - MPA 的衍生反应能得到最佳效果。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果分析

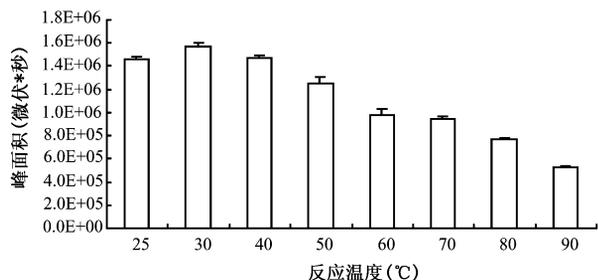
样品名 列号 因素	水平				实验结果 峰面积 ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)
	体积 (μl)	浓度 (g/ml)	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (min)	
DT1	1	1	1	1	277411
DT2	1	2	2	2	187133
DT3	1	3	3	3	324306
DT4	2	1	2	3	235152
DT5	2	2	3	1	190810
DT6	2	3	1	2	275591
DT7	3	1	3	2	250717
DT8	3	2	1	3	365245
DT9	3	3	2	1	683110
k_1	262950	254427	184334	383777	
k_2	233851	247729	140762	237814	
k_3	433024	427669	255278	308234	
R	199173	179940	114516	145963	

由各水平间均数的极差 R 看出, 各因素对衍生反应效果影响大小依次为: 衍生溶液体积 > 衍生溶液浓度 > 反应时间 > 反应温度。

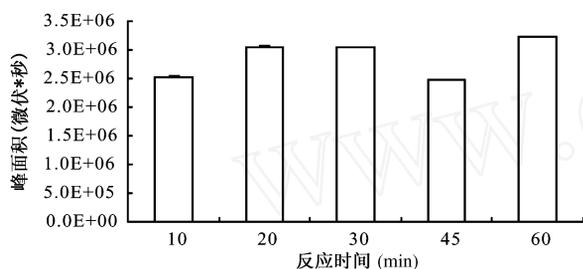
2.2 PITC - cys - MPA 衍生反应影响因素考察

对于 PITC 与 cys - MPA 的衍生反应, 考察了 3

种影响因素:反应温度、反应时间及参与反应的衍生液体积。考察反应温度、反应时间时待测溶液为0.5 mg/ml胱氨酸对照溶液;考察衍生液体积时待测溶液为“Amino Acid Standard H”(Pierce,USA)(含17种氨基酸)。实验结果见图1~3。



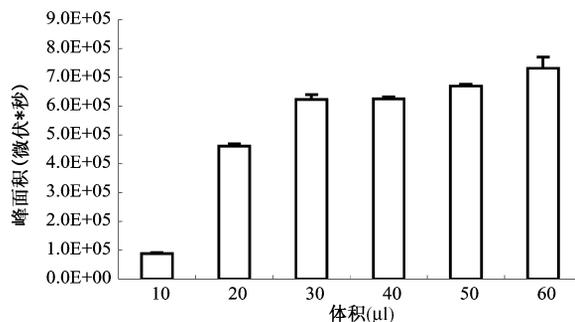
$\bar{x} \pm s$, 检测次数 = 3,
20 μ l PITC (10%, 体积分数), 反应 30 min
图1 反应温度对衍生反应产量的影响



$\bar{x} \pm s$, 检测次数 = 3,
20 μ l PITC (10%, 体积分数), 反应 30
图2 反应时间对衍生反应产量的影响

由图1看出,在考察的8个温度水平中,当反应温度为30 时衍生反应产率最高。实验中发现,从70 开始反应后混合溶液明显变黄,反应温度越高颜色越深,推测可能是由反应副产物带来的。

由图2看出,在考察的5个反应时间水平中,当



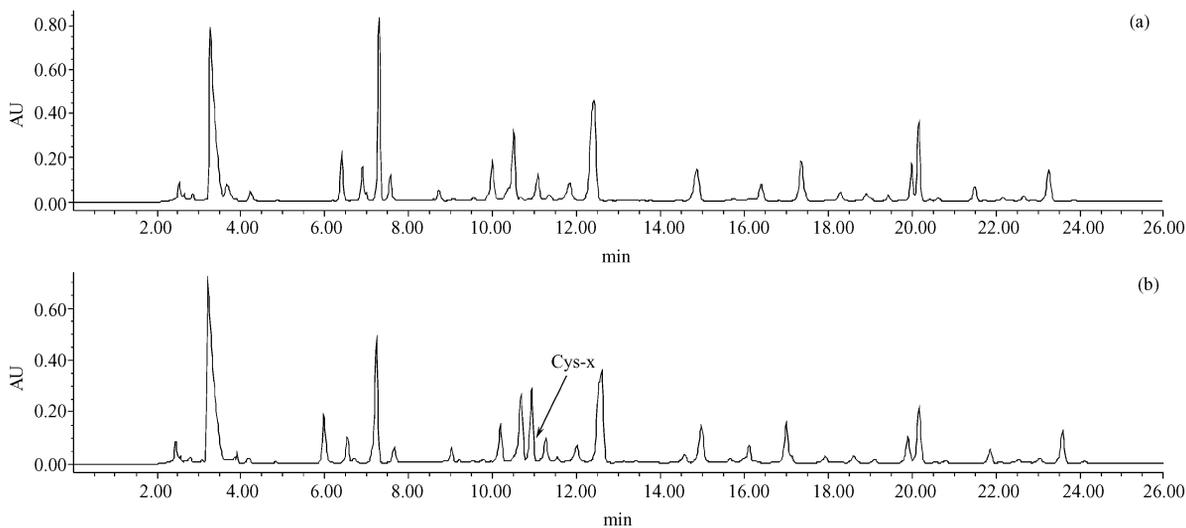
$\bar{x} \pm s$, 检测次数 = 3, PITC 衍生溶液 10% (体积分数)
图3 衍生溶液体积对衍生反应产量的影响

反应时间为60 min 时能达到最大产率,其次为30 min。60 min 所花时间太长,而反应20 min 与反应30 min 的结果相差不多,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。综合考虑各因素,最终选择的反应时间为20 min。

由图3看出,在考察的6个衍生液体积水平中,体积越大 PITC 物质的量越大,反应产率越高。反应液体积为30 μ l 时反应结果与20 μ l 时相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。40 μ l 与30 μ l 相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);而50 μ l 与40 μ l 相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但考虑到 PITC 对柱子的损伤,最终选择的反应液体积为30 μ l。此条件下, PITC 与参与反应的氨基酸物质的量之比为30 1。

2.3 方法验证

2.3.1 系统适用性 取空白酱油样品(不含胱氨酸/半胱氨酸),按1.1项下供试品溶液的配制方法配制成空白溶液。在空白溶液中加入胱氨酸标准品,配成含胱氨酸的供试品溶液。空白溶液与供试品溶液按1.2项下处理并测定。结果见图4,在当前色谱条件下,胱氨酸衍生产物峰(Cys-x)周围虽有其他峰存在,但不干扰其测定。



(a) 空白酱油样品; (b) 含胱氨酸的酱油样品

图4 样品衍生后色谱图

2.3.2 线性关系 取胱氨酸对照系列溶液 1(不含酱油基质)和 2(含酱油基质),分别按 1.2 项各平行操作 3 份。以胱氨酸衍生产物的峰面积($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)为纵坐标,胱氨酸标液的质量浓度(mg/ml)为横坐标,进行线性回归。用相关系数及缺乏检定^[8](lack-of-fit 试验)($P=0.05$)评价。

实验结果证明,在不含酱油基质的情况下,胱氨酸衍生产物峰面积与其浓度在 0.02~2.00 mg/ml 的范围里成线性关系($R^2=0.9995$)。lack-of-fit 试验也表明($F_{\text{exp}}=1518.53$)>($F_{\text{critical}}=4.38$),这再次证明了 UV 响应值与胱氨酸在上述浓度范围内存在线性关系。

对于含酱油基质的样品测定,在胱氨酸质量浓度为 0.02~1.00 mg/ml 范围内,其衍生产物峰面积与其浓度也呈良好的线性关系, R^2 为 0.9999。

2.3.3 精密度和准确度 日内精密度用一天内平行制备的 5 份样品(含酱油基质)测定结果的相对标准偏差(RSD)来评价。分别测定 3 个浓度水平(0.02、0.25、1.00 mg/ml)。日间精密度用连续 5 d 平行实验测定结果的 RSD 来评价。分别测定 3 个浓度水平(0.02、0.25、1.00 mg/ml)。

日内和日间准确度用回收率评价,同样测定 3 个浓度水平(0.02、0.25、1.00 mg/ml)。

测定结果见表 3。结果均在 ICH 指导原则规定的范围($RSD < 15\%$;回收率在 85%~115%之间)之内^[9]。

表 3 日内、日间精密度和准确度测定结果($n=5$)

样品中胱氨酸浓度 (mg/ml)	浓度测量值(mg/ml) ($\bar{x} \pm s$)	RSD (%)	回收率 (%)
日内			
0.020624	0.020854 \pm 0.001650	7.91	101.12
0.25780	0.25813 \pm 0.00939	3.64	100.13
1.0312	1.0443 \pm 0.0589	5.64	101.27
日间			
0.020624	0.019890 \pm 0.000767	3.86	96.44
0.25780	0.26517 \pm 0.00621	2.34	102.86
1.0312	1.0667 \pm 0.0510	4.78	103.44

注: n 为检测次数。

2.3.4 检测限(LOD)和定量限(LOQ) 以信噪比为 3:1 时样品中胱氨酸浓度为检测限(LOD),LOD 为 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$;以信噪比为 10:1 时样品中胱氨酸浓度为定量限(LOQ),LOQ 为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.3.5 衍生产物稳定性考察 取衍生化后供试品溶液 2 份,1 份置于 4℃ 冰箱保存,测定前取出放至室温;1 份室温闭光保存,分别于 0、24、46、72、96、120、144 h 测定。用各时间点所测得的产物峰面积与 0 h 测得的产物峰面积的比值评价,前者 3 d 内稳定(在 1~0.97 之间, $RSD=2.33\%$),后者 24 h 内稳定(在 1~0.99 之间, $RSD=0.57\%$)。

2.3.6 样品测定 因未获得市面上所售的“毛发水

酱油”,考虑到“毛发水酱油”是用胱氨酸废液配兑成的假冒酱油,故用厂方提供的两种胱氨酸废液作为“毛发水酱油”原液进行检测。

取市售酱油 7 种及 2 种“毛发水酱油”原液,分别用 0.1 mol/L 盐酸稀释 10 倍后按 1.2 项下方法检测其中(半)胱氨酸含量,结果见表 4。

表 4 样品中(半)胱氨酸含量测定结果(以胱氨酸计)

样品	测定值(mg/ml)	RSD(%) ($n=4$)
酱油 1~7 号	未检出 ^a	-
毛发水酱油原液 1	3.9267	2.50
毛发水酱油原液 2	2.7547	2.85

注: a LOD: 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, n 为检测次数。

3 讨论

胱氨酸与 DIDPA 的反应产物 Cys-MPA 与 PITC 的衍生反应需在碱性条件下进行,由于前一步 DIDPA 衍生溶液呈碱性($\text{pH} 10.4$),在起衍生剂作用的同时又可调节反应溶液 pH 值,故可省去调 pH 值这一步。

Cys-MPA 易溶于水,而 PITC 与水不能互溶。为了得到较好的衍生效果,需将胱氨酸与 DIDPA 衍生后的溶液蒸干,残渣再溶于 PITC 衍生溶液中,Cys-MPA 才能与 PITC 最大限度接触,提高衍生反应效率。

PITC 试剂进入柱子会使柱填料过早老化,柱子寿命缩短^[10]。因此衍生后的试样在进柱子分析前需要采取适当方法将过量的 PITC 除去。目前文献报道的除杂方法有 2 种:一是真空干燥或氮气吹干,使 PITC 随水蒸气蒸发除去^[11];另一种是用正己烷将 PITC 提取除去^[12]。前者所花费时间较长。后者正己烷处于上层,欲取下层水溶液容易带入正己烷,且在实际操作中发现,两者均无法将多余的 PITC 完全除去。笔者改进了除杂质方法,采用二氯甲烷提取 PITC,PITC 几乎完全被除去。此外,二氯甲烷层处于下层,欲取上层的水溶液较易操作。

本实验中胱氨酸两步衍生所得产物 Cys-x 为首次报道,其色谱行为与胱氨酸和 PITC 的衍生产物(PITC-cystine)相比有较大区别。对多种色谱条件^[11,12,14,15]进行了考察,根据分离效果最终选择 Campanella 等^[11]采用的色谱条件,在此基础上对扫描波长、柱温、流动相盐浓度、流动相梯度等进行了调整和优化,得到了较为适合 Cys-x 分离的色谱条件。

目前酱油的原料配方在不断改进和变化,因此在少数配制酱油中有可能含有胱氨酸。对于一些添加海洋生物、草本菌类等辅料的配制酱油来说,其中是否含胱氨酸、胱氨酸的平均含量在什么水平、是否能定一个限量使其与“毛发水酱油”区别开来等问题,还有待于后续工作的进一步研究。

实验技术与方法

单扫示波极谱法测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量

李彦 张文德

(唐山市疾病预防控制中心,河北 唐山 063000)

摘要:目的 研究用单扫示波极谱快速测定强化酱油中 NaFeEDTA 含量的分析方法。方法 在 0.01 mol/L 酒石酸钾钠-乙二胺底液中,NaFeEDTA 在峰电位 $E_p - 1.67$ V (vs. SCE) 处产生灵敏的二阶导数极谱还原波,波高 H ($ip/\mu A$) 与 NaFeEDTA 的浓度成正比。结果 检出限为 0.1 mg/L,NaFeEDTA 的线性范围为 0.1 ~ 5.0 mg/L,样品加标回收率为 88.8% ~ 112.0%,相对标准偏差为 1.5% ~ 4.0%,与国标方法(硫氰酸铵分光光度法)比较结果是一致的 ($P > 0.05$)。结论 本法操作简便、灵敏、准确度高,酱油本身的颜色及共存物质无干扰,每个样品测定仅需 3 ~ 5 min。适用于强化酱油中 NaFeEDTA 含量的快速测定。

关键词:大豆食品;调味品;食品,强化;NaFeEDTA;极谱法

Determination of NaFeEDTA in Iron Fortified Soy Sauce by Oscilloscopic Polarography

LI Yan, ZHANG Wen-de

(Tangshan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Hebei Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** To determine NaFeEDTA in iron fortified soy sauce by oscilloscopic polarography. **Method** In a mixed medium of 0.01 mol/L potassium sodium tartrate-ethylenediamine, the polarographic behavior of NaFeEDTA on drop mercury electrode produced the sensitive second order polarographic reduction wave at the point of -1.67 V (vs. SCE). The height of the reduction wave ($ip/\mu A$) was in direct proportion to the content of NaFeEDTA. **Results** The detection limit was 0.1 mg/L, and the linear range of NaFeEDTA content was from 0.1 mg/L to 5.0 mg/L. The recovery of NaFeEDTA in soy sauce samples was 88.8% ~ 112.0%, and the relative standard deviation (RSD) was 1.5% ~ 4.0%. Compared with standard method, the

参考文献

- [1] GB 18186—2000. 酿造酱油[S].
- [2] SB 10336—2000. 配制酱油[S].
- [3] LIOE H N, WADA K, AOKI T, et al. Chemical and sensory characteristics of low molecular weight fractions obtained from three types of Japanese soy sauce (shoyu)- Koikuchi, tamari and shiro shoyu [J]. Food Chemistry, 2007, 100 (4) :1669-1677.
- [4] CHOU C C, LING M Y. Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials [J]. Food Research International, 1998, 31 (6-7) :487-492.
- [5] SOGA T, ROSS G A. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 837 (1-2) : 231-239.
- [6] 杨月欣. 中国食物成分表 2002[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2002:276-279.
- [7] BARKHOLT V, JENSEN A L. Amino acid analysis: determination of cysteine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive[J]. Anal. Biochem, 1989, 177: 318-322.
- [8] 韩可勤, 杨静化, 刘晓东. 药学应用概率统计[M]. 南京:东南大学出版社, 2000:108-113.
- [9] International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH Q2 (R1), 2005.
- [10] 傅亮, 倪冬姣, 张水华. 氨基酸高效液相色谱分析[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1994, 7(2) :76-82.
- [11] CAMPANELLA L, CRESCENTINI G, AVINO P. Simultaneous determination of cysteine, cystine and 18 other amino acids in various matrices by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1999, 833:137-145.
- [12] 杨箫, 孙黎光, 白秀珍, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生化反相高效液相色谱法同时测定 18 种氨基酸[J]. 色谱, 2002, 20(4) : 369-371.
- [13] 金凤明, 冯学伟, 李桂贞. 珍珠角壳蛋白中氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 华东理工大学学报, 2001, 27(1) :103-105.
- [14] 马养民. Pico-Tag 方法测定油松花粉中的氨基酸含量[J]. 色谱, 1994, 12(1) :63-64.

[收稿日期:2007-12-18]

中图分类号:R15;O657.72 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2008)04-0304-05

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划项目(05276101D-6)

作者简介:李彦女 主管技师

通讯作者:张文德 男 主任技师