

氟乙酰胺的易溶于水,遇水水解,遇热升华等性质使得回收率降低;另外其在两相中的分配比也造成液体样品的回收率偏低,所以测定酱油(见图6)等液体样品中的氟乙酰胺首先需要加入适量的钠盐,促使其在有机相与水相分离。另外由于酱油与萃取包发生固化反应,因此改用现有方法提取,此中原因有待更进一步的研究。NaCl 对于提取率结果影响见表4。

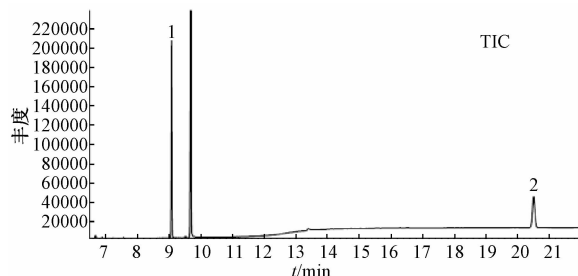


图6 酱油加标样品总离子流图
Figure 6 Selected ion monitoring chromatograms of a mixed solution of two standards in soy sauce

表4 NaCl 添加量对于氟乙酰胺回收率的影响
Table 4 The effect of sodium chloride addition amounts and fluoroacetamide recoveries

样品	添加量 $\mu\text{g/ml}$		回收率(%)	
	10% NaCl	25% NaCl	10% NaCl	25% NaCl
酱油	0.2	0.4	38.9	73.2
	1.0	1.0	34.7	77.7
醋	0.2	0.4	38.6	60.7
	1.0	1.0	37.1	60.6

3 结论

本方法采用的程序升温分离毛细管柱分离,可同时分析多种食品中两个鼠药,方法稳定,灵敏度高,精密度和准确度良好,简便易行,适于突发事件中快速检测的要求,具有实用价值。

参考文献

- [1] 叶世柏. 化学性食品中毒与检验[M]. 北京: 北京大学出版社,1989:104-109.
- [2] 谢红英. 国家禁限用高毒农药名单[J]. 湖南农业,2011,(11):27.
- [3] 荣曙. “9·14”南京汤山特大投毒案对违禁鼠药防控的启示[J]. 职业卫生与应急救援,2011,29(4):198-200.
- [4] 伍庆,张明时,蓝昭荣. 气相色谱法同时快速检测氟乙酰胺和毒鼠强[J]. 色谱,2002,20(4):381-382.
- [5] 封雷,陈卉,蒲朝文,等. GC/石英毛细管法测定食品及生物材料中氟乙酰胺、毒鼠强[J]. 预防医学情报杂志,2004,20(3):341-342.
- [6] 陈剑刚,练海泉,黄彪,等. 毛细管气相色谱法测定鼠药中毒者尿中氟乙酰胺和毒鼠强[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11(1):37-38.
- [7] 曹英,罗亦芳. 气相色谱法同时测定尿中毒鼠强和氟乙酰胺[J]. 中国职业医学,2002,29(5):47-48.
- [8] 马永建,冯芳,陈蓓. 气相色谱-质谱法同时测定氟乙酰胺及毒鼠强方法研究[J]. 卫生研究,2000,29(6):369,378.
- [9] 高玲,杨元,譙斌宗. 气相色谱-质谱联用测定中毒食物中的氟乙酰胺和毒鼠强[J]. 中国卫生检验杂志,2003,13(4):450-451.

实验技术与方法

氨基酸自动分析仪对牛乳中羟脯氨酸快速测定方法研究

蔡梅,吉文亮,刘华良,马永建
(江苏省疾病预防控制中心,江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立运用氨基酸自动分析仪快速测定牛乳中羟脯氨酸的方法。方法 牛乳经水解,羟脯氨酸与茚三酮反应,生成黄色产物,在仪器的第二通道440 nm处有最大吸收峰,且在一定的浓度范围内符合朗伯比尔定律。以柠檬酸盐缓冲溶液为流动相,将羟脯氨酸和其他17种氨基酸同时分离,440 nm定量。结果 浓度在0.05~1.0 mmol/L范围内吸收度呈良好线性关系($r=0.9999$),平均回收率为91.5%, RSD 为1.3%($n=5$),方法最低检出限0.66 mg/L。结论 该方法快速、简便、准确,可靠,适合于牛乳中羟脯氨酸的定量分析。

关键词:羟脯氨酸;氨基酸自动分析仪;牛乳;掺假;测定方法;动物水解蛋白

中图分类号:TS252.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2012)06-0542-04

收稿日期:2012-06-04

基金项目:江苏省科技支撑计划—社会发展(BE2010745);江苏省临床医学中心(高技术平台)(ZX201109)

作者简介:蔡梅 女 副主任技师 研究方向为食品理化检验 E-mail:mei_mei3721@yahoo.com.cn

通信作者:吉文亮 男 主任技师 研究方向为理化检验 E-mail:JWL320911@163.com

A study of rapid detection method for hydroxyproline in dairy using amino acid autoanalyzer

Cai Mei, Ji Wenliang, Liu Hualiang, Ma Yongjian

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Nanjing 210008, China)

Abstract: Objective To establish a rapid detection method for hydroxyproline in dairy using amino acid autoanalyzer. **Methods** Hydroxyproline in dairy hydrolyzate could react with ninhydrin and produce a yellow compound which has an absorption peak at 440 nm in the second channel of the instrument and comply with the Lambert Beer law within a certain concentration range. Citrate buffer solution as mobile phase, hydroxyproline and other 17 kinds of amino acids were separated at 440 nm quantitatively. **Results** The calibration curves showed a good linearity in the range of 0.05 – 1.0 mmol/L ($r=0.999\ 9$). The mean recovery was 91.5% with RSD 1.3% ($n=5$) and the limit of detection was 0.66 mg/L. **Conclusion** The method was rapid, convenient, accurate and reliable. It could be applied for quantitative detection of hydroxyproline in dairy.

Key words: Hydroxyproline; amino acid autoanalyzer; dairy; adulteration; method; hydrolyzed animal protein

羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)分子式: $C_5H_9NO_3$,分子量 131.13,为白色片状结晶或结晶性粉末。一般的蛋白质不存在这种氨基酸^[1],在动物的胶原蛋白中含有羟脯氨酸,含量约 13%^[2],所以羟脯氨酸是胶原蛋白(皮革)水解后的特征氨基酸。将皮革水解的氨基酸掺假加入到牛乳中可以提高牛乳蛋白质的指标,但是干扰了牛乳正常的氨基酸组分,影响人体对牛乳的正常吸收^[3]。天然牛乳中不含羟脯氨酸。可以用此指标的测定来鉴别牛乳中是否加入胶原水解蛋白。目前羟脯氨酸的测定方法有比色法^[4]、高效液相法^[5]、离子色谱法^[6]、高效液相色谱-质谱联用法^[7]。比色法和液相法操作繁琐,耗时,影响因素较多。本文运用日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪对羟脯氨酸和常规的 17 种氨基酸同时进行分析测定,分析时间仅 32 min,获得了比较满意的分析结果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

日立 L-8800 氨基酸自动分析仪;电热恒温干燥箱;羟脯氨酸标准 98% (SIGMA 109H0987);盐酸、氢氧化钠(均为优级纯),柠檬酸缓冲液,茚三酮显色液。

1.2 色谱条件

分离柱:4.6 mmID×60 mm 不锈钢柱,填充强酸性离子交换树脂#2622SC-PH(日立公司),57℃,流速 0.40 ml/min。反应柱:4.6 mmID×40 mm 不锈钢柱,填充石英沙,柱温 135℃,流速 0.35 ml/min,检测器检测波长 440。流动相:A 6.19 g/L 柠檬酸钠 5.66 g/L 柠檬酸;B 7.74 g/L 柠檬酸钠,22.00 g/L 柠檬酸;C 13.31 g/L 柠檬酸钠,12.80 g/L 柠檬酸;D 26.67 g/L 柠檬酸钠,6.10 g/L 柠檬酸;E 8.0 g/L 氢氧化钠,见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流动相(%)				
	A	B	C	D	E
0.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0
3.0	100	0.0	0.0	0.0	0.0
3.1	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
6.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
6.1	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
14.8	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0
14.9	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
29.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
29.1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
32.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0

1.3 样品处理

取市售纯牛奶样品 1.0 ml 于水解管内,加入 6 mol/L 盐酸 9.0 ml,充氮后密封,置于 130℃ 烘箱中保持 6 h,冷却后过滤,取滤液 1.0 ml,用 NaOH 溶液调 pH 至约 7.0,超纯水定容至 10.0 ml。经 0.45 μm 滤膜过滤,滤液待测。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

精密称取羟脯氨酸标准品 32.5 mg 于 25 ml 的容量瓶中,用 0.01 mol/L 盐酸定容,浓度为 1 300 mg/L。精确吸取羟脯氨酸标准溶液 0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ml 分别加入到 100 ml 容量瓶中,用水稀释到刻度,溶液浓度分别是 0、6.5、13.0、26.0、65.0、130.0 mg/L,20 μl 进样,以峰面积和浓度绘制标准曲线,线性回归方程 $y=1\ 164\ 110x+4246$;相关系数 $R^2=0.999\ 9$ 。在 6.5~130 mg/L 范围内,羟脯氨酸的摩尔浓度与峰面积之间具有良好的线性关系。方法最低检出限为 13 ng,样品最低检出浓度为 1.3 mg/L,见图 1。

2.2 精密度

配制羟脯氨酸标准溶液 13.0 mg/L,连续进样

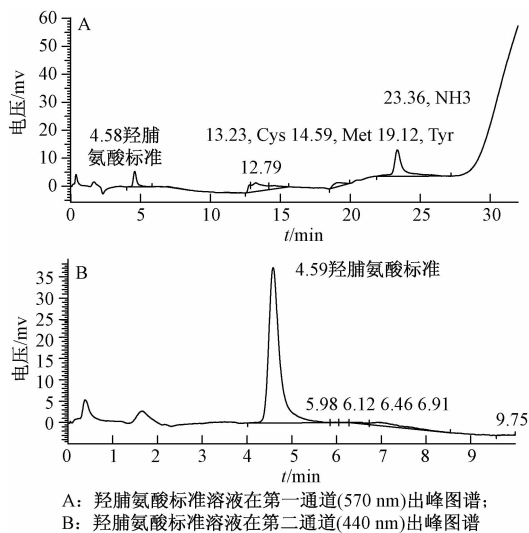


图 1 羟脯氨酸标准溶液

Figure 1 Chromatography of hydroxyproline standard

5 次,峰面积相对标准偏差为 1.3%。

2.3 加标回收率

按 1.3 的方法处理,分别测定空白样品牛奶中羟脯氨酸含量,再在 1.0 ml 牛奶空白样品分别加入 13.0、65.0、130.0 mg/L 3 个浓度添加水平的羟脯氨酸。每一水平做 5 个平行样,回收范围 90.0% ~ 92.6%,平均回收率为 91.5%。结果见表 2、图 2。

表 2 羟脯氨酸回收率测定结果($n=5$)

Table 2 The hydroxyproline recovery rate of adding standards($n=5$)

样品量 (ml)	加入量 (mg/L)	平均测得结果 (mg/L)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1.0	13.0	11.7	90.0	6.6
1.0	65.0	59.8	92.6	4.0
1.0	130.0	119.6	92.0	3.8

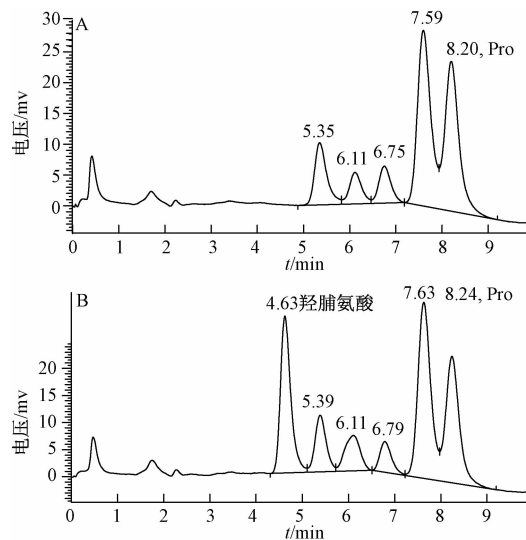
2.4 样品分析

为进一步验证方法的可行性,从市场上分别采集了 5 份牛奶、5 份明胶,按上述处理样品方法进行测定,结果见表 3。从明胶中羟脯氨酸含量的测定结果可以看出,与文献报道的含量一致^[8]。

表 3 样品测定结果

Table 3 The content of hydroxyproline in different samples

样品名称	份数	羟脯氨酸含量(g/100g)
纯牛奶 1	1	未检出
纯牛奶 2	1	未检出
纯牛奶 3	1	未检出
纯牛奶 4	1	未检出
鲜牛奶	1	未检出
食用明胶 1	1	9.8
食用明胶 2	1	10.4
食用明胶 3	1	9.4
纯鱼胶粉	1	9.9
食用凝胶粉	1	9.2



A: 空白样品图谱; B: 加标样品羟脯氨酸标准溶液图谱

图 2 第二通道(440 nm)牛奶样品加标回收图谱

Figure 2 Chromatography of hydroxyproline standard in milk of channel 2 (440 nm)

2.5 流动相的选择

氨基酸分析仪主要是通过强酸性阳离子交换树脂对氨基酸的连续吸附、洗脱来完成分离的。氨基酸结构不同,带的电荷数不同,和树脂的亲合力不同。要将羟脯氨酸与 17 种氨基酸进行分离必须采用多种不同 pH 的缓冲盐进行梯度洗脱。通过试验,选择 pH3.3、3.2、4.0、4.9 4 种柠檬酸缓冲盐进行不同时段的梯度洗脱分离,羟脯氨酸在第一、第二通道的出峰时间均是 4.5 min 左右(见图 3、图 4),脯氨酸的出峰时间是 8.5 min 左右,天冬氨酸的出峰时间是 5.3 min 左右,均互不干扰,且峰形良好,保留时间相对稳定,可以和 17 种氨基酸同时测定。

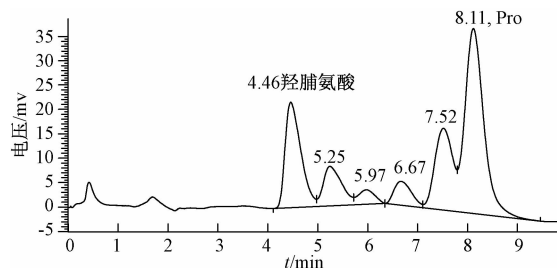


图 3 第二通道(440 nm)明胶样品图谱

Figure 3 Chromatography of hydroxyproline in gelatin in channel 2 (440 nm)

2.6 波长的选择

样品中的大部分氨基酸经分离柱分离后,与茚三酮在弱酸性溶液中与氨基酸共热,具有游离氨基的氨基酸生成蓝紫色化合物,在 570 nm 处有最大吸收,灵敏度高,特异性强,在仪器的第一通道(570 nm)有较好的检出。但羟脯氨酸因其 α -氨基

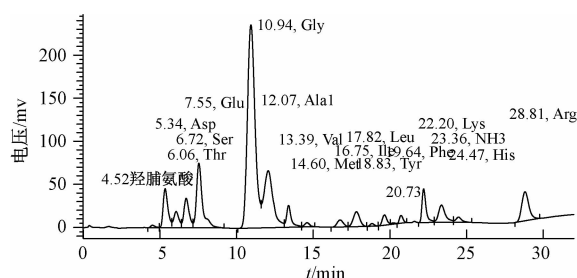


图4 第一通道(570 nm)明胶样品羟脯氨酸与17种氨基酸分离图谱

Figure 4 Chromatography of hydroxyproline and 17 kinds of amino acid in gelatin in channel 1(570 nm)

被取代,是亚氨基酸,与茚三酮反应生成黄色化合物,在仪器的第一通道(570 nm)处吸收不灵敏,无最大吸收(图1A)。为了使羟脯氨酸和其他17种氨基酸均获得最大的灵敏度和最佳的检出限,在优化流动相后,利用仪器的多波长选择功能,对羟脯氨酸的最大吸收波长进行选择。试验结果表明,羟脯氨酸在第二通道(440 nm)处具有最大吸收(图1B)。运用双波长同步检测,有效提高了本方法的灵敏性和特异性。

2.7 水解的作用

牛奶中的蛋白质、脂肪和乳糖等会干扰羟脯氨酸的分离和提取,经酸水解后将其转变为水溶性物质,利于其中羟脯氨酸的测定,提高检出率。

3 讨论

利用氨基酸自动分析仪测定牛乳中羟脯氨酸含量,该方法样品前处理简便,试剂运用少,分析步骤少,易操作。样品在仪器中经分离柱分离后,直接进入反应柱进行在线衍生比色,大大缩短了分析时间,减少了人工衍生带入的偶然性误差,能准确

地对羟脯氨酸直接进行测定。在不需同时检测17种氨基酸的情况下,可以第二通道为主,将分析时间设定为10分钟,只运行A、B、C 3种缓冲盐(表1),10分钟后用NaOH溶液清洗再生分离柱,继续进行下一个样品的分析(图3)。用此方法可进一步缩短分析时间,减少仪器试剂用量,节约成本,提高工作效率,特别适合大量牛乳中是否添加了胶原蛋白(皮革)水解蛋白粉的调查监测。

本方法运用氨基酸分析仪,采用梯度洗脱、双波长在线衍生测定牛乳中羟脯氨酸,方法分析时间短,线性范围好,精密度高,回收率和稳定性均能达到满意结果,具有实际应用价值。

参考文献

- [1] 张自强,赵东旭,杨新林.羟脯氨酸的研究与发展[J].氨基酸和生物资源,2006,28(1):55-58.
- [2] 刘芳,李德富,林炜,等.羟脯氨酸含量的测定方法与应用[J].中国皮革,2007,36(15):51-54.
- [3] 刘婷,姜金斗,刘宁. HPLC-OPA 柱后衍生离子交换法对乳粉中掺水解动物蛋白检测方法的研究[J].食品工业科技,2007,(7):207-209.
- [4] 全国肉禽蛋制品标准化技术委员会. GB/T 9695.23—2008 肉与肉制品羟脯氨酸含量测定[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [5] 金苏英,林笑容,赵志红,等.高效液相色谱法测定奶粉及其他乳制品中的L-羟脯氨酸[J].饮料工业,2009,(7):28-30.
- [6] 张怡评,易瑞灶,陈晖,等.离子色谱法测定鱼鳞胶原蛋白中羟脯氨酸含量方法的研究[J].中国海洋药物杂志,2011,30(4):45-48.
- [7] 夏金根,陈波,姚守拙.高效液相色谱-质谱联用测定胶原蛋白中的羟脯氨酸[J].色谱,2008,26(5):595-598.
- [8] 田艳玲.乳与乳制品中动物水解蛋白鉴定方法[J].中国食品添加剂,2008,(3):145-147.