

二硫苏糖醇在奶粉含硫氨基酸检测中的应用

李玉玲^{1,2}, 李卫华^{1*}

(1. 山西出入境检验检疫局, 太原 030024; 2. 山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

摘要: **目的** 建立一种在前处理过程中使用二硫苏糖醇(DTT)为还原剂, 反相高效液相色谱法检测奶粉中含硫氨基酸的方法。 **方法** 奶粉经酸法水解后, 加入二硫苏糖醇对水解液进行还原处理, 用反相高效液相色谱法检测奶粉中含硫氨基酸, 对还原条件、色谱分离条件进行优化, 确定最佳检测条件。 **结果** 蛋氨酸(Met)、胱氨酸[(Cys)₂]、半胱氨酸(Cys)检测限分别为 0.7 μmol/L、0.3 μmol/L、0.5 μmol/L, 定量检测范围均为 10~750 μmol/L, 相关系数分别为 0.9998、0.9999、0.9991。最佳 DTT 作用条件为向 1 mL 水解液中加入 100 μL 0.1 mol/L DTT 溶液, 室温反应 1 h。测得奶粉中 Met、(Cys)₂ 含量分别为 0.37 g/100 g、0.14 g/100 g, 加标回收率均在 82%~87% 之间, 相对标准偏差(RSD)≤1.5%。 **结论** 在前处理过程中使用适量 DTT 做还原剂, 用反向高效液相色谱法可准确检测奶粉中含硫氨基酸的含量。

关键词: 二硫苏糖醇(DTT); 奶粉; 含硫氨基酸; 高效液相色谱法(HPLC)

Application of dithiothreitol in the detection of sulfur amino acids in milk powder

LI Yu-Ling^{1,2}, LI Wei-Hua^{1*}

(1. Shanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Taiyuan 030024, China;
2. Bio-technology Institute, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

ABSTRACT: Objective To develop a new method to detect sulfur amino acids by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) in milk powder reacted with dithiothreitol in pretreatment. **Methods** Milk powder was hydrolyzed by acid, further reduced by dithiothreitol, and then detected by HPLC. The optimum reduction conditions and chromatographic separation conditions were investigated. **Results** Detection limits of methionine, cystine and cysteine were 0.7 μmol/L, 0.3 μmol/L and 0.5 μmol/L, respectively, and all of the quantitation range were 10~750 μmol/L with the correlation coefficients of 0.9998, 0.9999 and 0.9991, respectively. The optimum operating conditions were as follows: 100 μL dithiothreitol at the concentration of 0.1 mol/L was added in 1 mL hydrolyzate and reacted for 1h at room temperature. The contents of methionine and cystine in milk powder were 0.37 g/100 g and 0.14 g/100 g, respectively. The recoveries ranged from 82% to 87% with the relative standard deviation (RSD) of less than 1.5%. **Conclusion** Applying optimum dithiothreitol in pretreatment and using the reverse phase HPLC method could detect the content of sulfur amino acids in milk powder accurately.

KEY WORDS: dithiothreitol(DTT); milk powder; sulfur amino acids; high performance liquid chromatography

基金项目: 国家质检总局科研项目(2010IK157)。

*通讯作者: 李卫华, 男, 博士, 研究员, 研究方向为农产品安全。E-mail: aplab@163.com

1 引言

乳及乳制品是人体获取蛋白质的主要来源之一,而奶粉是我国最主要的乳制品品种。奶粉中的乳蛋白包含人体生长发育所需要的全部必需氨基酸,是一种全价蛋白质,也是人体补充热量的来源^[1]。蛋白含量的高低是评价乳品质量的指标之一,乳品中蛋白检测技术主要是凯氏定氮法和比色法^[2,3]。但这两种方法测得的是粗蛋白含量,具有局限性。近几年发生的“大头娃娃”、“三聚氰胺”毒奶粉事件给我国乳业带来一次空前沉重的打击,掺假检测技术的革新工作任重而道远。不同蛋白质中氨基酸组成不同,蛋白质具有特异性,随着检测技术的不断发展,高效液相色谱法检测氨基酸已日益成为乳品蛋白质掺假检测的普遍方法^[4,5]。蛋氨酸、半胱氨酸和胱氨酸是常见的含硫氨基酸,但在游离或肽键合状态都不稳定,易于发生氧化、烷基化等反应而影响其检测的准确性,因而准确测定含硫氨基酸的含量对乳品蛋白含量检测具有重要意义^[6]。氧化剂过甲酸和还原剂巯基化合物(巯基乙醇、巯基乙酸、二巯苏糖醇等)都可打断胱氨酸中的二硫键,分别生成磺基丙氨酸和半胱氨酸及相应的二硫化物^[7]。目前,含硫氨基酸的检测一般采用过甲酸氧化法,但此法操作繁琐,耗时间^[8-14]。国内外许多学者利用巯基化合物来保护含硫氨基酸^[15-20]。本文在前处理过程中使用二巯苏糖醇作用于奶粉中的胱氨酸和蛋氨酸,采用新型衍生剂 4-氯-3,5-二硝基三氟甲苯(4-chloro-3,5-Dinitro trifluoromethylbenzene, CNBF)柱前衍生,用反相高效液相色谱法检测奶粉中含硫氨基酸,从新的角度为奶粉中含硫氨基酸的检测提供一定数据参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

市售奶粉;婴儿奶粉标准品(美国 Fapas 公司);高纯 L-氨基酸(>98%):蛋氨酸(Met)、胱氨酸[(Cys)₂]、半胱氨酸(Cys)(北京日出生物科技有限公司);二巯苏糖醇(DTT)(北京索莱宝科技有限公司);4-氯-3,5-二硝基三氟甲苯(CNBF, 太原市瑞和丰科贸有限公司);乙腈(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);浓盐酸(优级纯,天津市北联精细化学品开发有限公司);超纯水(由 Milli-Q 纯水机制备);25 mmol/L、100 mmol/L 4-氯-3,5-二硝基三氟甲苯(CNBF)溶液;40

mmol/L 氨基酸标准溶液;其他试剂均为分析纯。

2.2 仪器与设备

Waters Alliance2690 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);资生堂 CAPCELL PAK C₁₈ 柱(北京泰克美科技有限公司);DF-15 L 型氮吹仪供氮机(杭州德克尔实验设备有限公司);101A-3 型干燥箱(上海市实验仪器总厂);Minispin 离心机(德国 Eppendorf 公司);1008 型恒温水浴锅(德国 GFL 公司);德国 Sartorius PB-10 酸度计;Vortex-Genie2-涡旋振荡器 G-560E(美国 Scientific Industries 公司);0.22 μm 针筒过滤器(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

2.3 方法

2.3.1 样品前处理

准确称取适量样品,加入 3.0 mL 6 mol/L HCl, -20 °C 冷冻, N₂ 吹,在吹 N₂ 状态下封口,110 °C 水解 24 h。水解结束后取出,冷却至室温,开封,用 pH 9.0 硼砂-硼酸缓冲液定容到 10 mL,混匀,静置,离心,取上清 1.0 mL 加入适量 DTT 反应,反应结束,40 °C N₂ 吹干,用 pH 9.0 硼砂-硼酸缓冲液溶解,混匀,振荡加入 CNBF 衍生。

2.3.2 样品衍生

准确吸取 1.0 mL 样品溶液于具塞试管中,振荡并加入 5.0 mL pH 9.0 硼砂-硼酸缓冲液及 2.0 mL CNBF 溶液,盖好盖子,封口,放入 65 °C 水浴 40 min。衍生结束后取出,放置至室温,振荡并加入 17 mL pH 7.0 磷酸缓冲液,振荡 0.5 min,静置 10 min 后,取适量液体过 0.22 μm 微孔滤膜,供 HPLC 分析。

2.3.3 反相 HPLC 法检测条件

流动相 A: 乙腈;流动相 B: pH 5.7 乙酸-乙酸钠缓冲液;检测波长: 240 nm;流速: 0.32 mL/min;色谱柱: C₁₈ MG II (5 μm, 4.6 mm i.d×250 mm);进样量: 20 μL;梯度洗脱^[21]。

3 结果与分析

3.1 色谱峰的定性及色谱图

取适量 1 mmol/L Met、(Cys)₂、Cys 标准溶液及 0.1 mol/L DTT 溶液分别按 2.3.2 方法进行衍生,取 20 μL 衍生物进样分析。再将以上三种氨基酸按一定浓度混合,衍生进样,得到色谱图如图 1, 0.1 mol/L DTT 色谱图见图 2。Met、(Cys)₂、Cys、DTT 保留时间分别为 42.83 min、44.35 min、53.97 min、55.63 min,

均可以很好地分离。但从图 1 看到, Met、(CNBF)OH 与(Cys)₂ 保留时间较接近, 三峰较拥挤, 由于 Met 与 (Cys)₂ 的色谱分离对温度要求严格, 需 19~21 ℃, 这也一定程度地影响三者的色谱分离。图 2 中只有峰 1 一个小杂峰, 基线平稳, 可见加入 DTT 对含硫氨基酸的分离无影响。

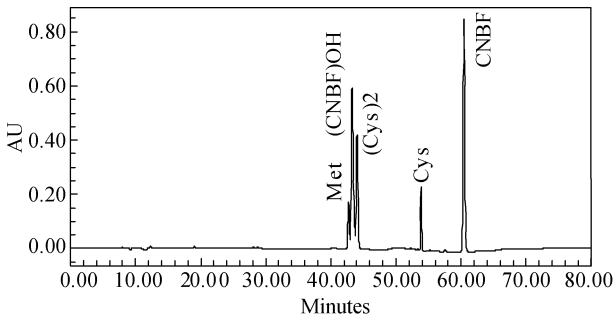


图 1 Met、(Cys)₂、(Cys)标准氨基酸色谱图
Fig. 1 Chromatogram of standard amino acids of methionine, cystine and cysteine

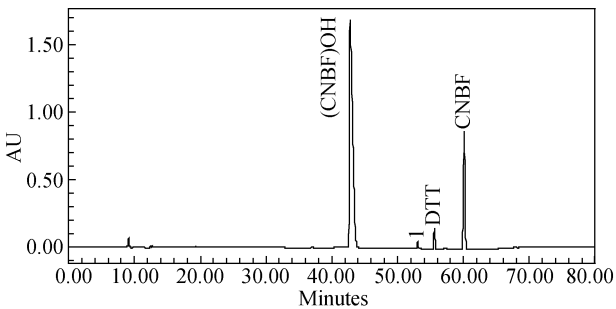


图 2 DTT 色谱图
Fig. 2 Chromatogram of dithiothreitol solution

3.2 检测限及线性范围

准确吸取适量 Met、(Cys)₂、Cys 标准溶液, 分别配成 750、500、250、100、25、10 μmol/L 六个不同浓度的混合标准溶液, 衍生后取 20 μL 连续 3 次进样, 以氨基酸浓度为横坐标, 吸收峰面积平均值为纵坐标做标准曲线, 结果见表 1。

在 10~750 μmol/L 范围内 Met、(Cys)₂、Cys 均有良好的线性。信噪比(S/N)≥3 时, 三种标准氨基酸最低检出限(LOD)在 0.5 μmol/L 左右, 检测限低, 灵敏度高; 信噪比(S/N)≥10 时, 三种标准氨基酸定量限低, 均为 10 μmol/L。

3.3 水解反应前后加入 DTT 对含硫氨基酸回收率的影响

准确吸取 40 mmol/L Met、(Cys)₂ 标准溶液各 125 μL, 每种溶液吸取六份, 分别加入 6 mol/L HCl 溶液 3 mL, 其中三份加入 0.1 mol/L DTT 溶液 100 μL, 三份不加, 按 2.3 方法处理。不加 DTT 的样品水解定容后, 取水解液 1 mL, 加入 0.1 mol/L DTT 50 μL, 室温反应 2 h, 反应结束后用 N₂ 吹干, 衍生, 检测, 结果见表 2。

由上表可见, 水解前加入 0.1 mol/L DTT 溶液, Met 回收率较高, 精密度好, 而(Cys)₂及还原成的 Cys 回收率仅 35%左右; 水解后加入 DTT, Met、Cys 均有较好回收率。这说明 DTT 还原能力受 pH 值的影响, 在碱性条件下加入能更好地发挥还原作用, 本文选择水解后添加 DTT, 其最佳条件要进一步确定。

表 1 标准氨基酸的方法检测限及线性范围(n=3)

Table 1 Method detection limits and linear ranges of standard amino acids(n=3)

氨基酸	线性范围(μmol/L)	线性方程	R ²	LOD(μmol/L, S/N≥3)	LOQ(μmol/L, S/N≥10)
Met	10~750	Y=2778000X-8372	0.9998	0.7	10
(Cys) ₂	10~750	Y=6665000X+12350	0.9999	0.3	10
Cys	10~750	Y=2292000X-18160	0.9991	0.5	10

表 2 水解前后加入 DTT 溶液对含硫氨基酸检测的影响(n=3)

Table 2 Effect of dithiothreitol's addition time on the detection of sulfur amino acids(n=3)

	水解前加入			水解后加入		
	Met	(Cys) ₂	Cys	Met	(Cys) ₂	Cys
测定值(mmol/L)	0.597	0.194	0.336	0.391	0.022	1.176
回收率(%)	119.3	38.9	33.6	78.2	4.4	117.6
RSD(%)	0.7	2.6	2.4	0.6	2.7	0.2

3.4 不同量 DTT 对 Met、(Cys)₂ 回收率的影响

准确吸取 40 mmol/L Met、(Cys)₂ 标准溶液各 125 μ L 三份,按 2.3 方法处理,水解结束后各取水解液 1.0 mL,分别加入不同量 0.1 mol/L DTT,室温下反应 2 h, Met 结果见表 3, (Cys)₂ 结果见表 4。

表 3 不同量 DTT 对 Met 的影响($n=3$)
Table 3 Effect of different contents of dithiothreitol on the detection of methionine($n=3$)

DTT(μ L)	测定值(mmol/L)	回收率(%)	RSD(%)
0	0.494	98.8	2.9
20	0.461	92.2	2.0
40	0.452	90.4	1.5
60	0.446	89.2	1.1
80	0.435	87.1	1.0
100	0.428	85.6	1.4

表 3 表明,加入 0~100 μ L 0.1 mol/L DTT 时, Met 均有很好的回收率(85%~99%),但随 DTT 用量的增加, Met 回收率逐渐降低,测定值也逐渐减小,说明 0.1 mol/L DTT 的加入对 Met 含量的测定有一定的负影响,其原因有待进一步研究。

由表 4 可以看出,在酸水解过程中(Cys)₂ 损失大,回收率仅 40%,在其水解液中加入 20~200 μ L 0.1 mol/L DTT 时,除加入量 20 μ L 回收率较低外,其余均有很好的回收率,在 90%~113%之间,说明 DTT 的加入可将(Cys)₂ 较好地还原为 Cys,当加入 DTT 量为 100 μ L 时回收率最佳,本文选择最终加入 100 μ L 0.1 mol/L DTT。

表 4 不同量 DTT 对(Cys)₂ 的影响($n=3$)
Table 4 Effect of different contents of dithiothreitol on the detection of cystine($n=3$)

DTT(μ L)	测定值(mmol/L)	回收率(%)	RSD(%)
0	0.401	40.1	1.3
20	0.753	75.3	4.0
40	1.135	113.5	3.5
60	0.960	96.0	2.5
80	1.133	113.3	3.6
100	0.997	99.7	2.1
120	1.046	104.6	2.9
140	0.925	92.5	3.0
160	1.121	112.1	3.5
180	0.954	95.4	3.7
200	1.064	106.4	2.1

3.5 DTT 不同作用时间对(Cys)₂ 的影响

准确吸取 40 mmol/L (Cys)₂ 标准溶液 125 μ L 三份,按 2.3 方法处理,取水解液 1.0 mL,分别加入 0.1 mol/L DTT 100 μ L,室温反应 1~5 h,结果见表 5。作用时间 1~5 h 时, (Cys)₂ 回收率在 95%~115%之间,均满足要求,但作用时间为 1 h 时回收率最佳,且消耗时间短,故选择 1 h。

表 5 不同反应时间对(Cys)₂ 的影响($n=3$)
Table 5 Effect of different reaction time on the detection of cystine($n=3$)

时间(h)	测定值(mmol/L)	回收率(%)	RSD(%)
1	0.962	96.2	2.4
2	1.097	109.7	3.6
3	1.141	114.1	2.7
4	1.154	115.4	2.5
5	1.133	113.3	2.1

3.6 精密度

准确吸取 40 mmol/L (Cys)₂ 标准溶液 125 μ L 六份,按 2.3 方法处理,取 1 mL 水解液,加入 0.1 mol/L DTT 100 μ L,室温下反应 1 h。所得显示(Cys)₂ 被还原为 Cys,六次平均测定值为 0.944 mmol/L,回收率为 94.4%,RSD 值为 2.6%,确定最佳 DTT 作用条件为 1 mL 水解液中加入 0.1 mol/L DTT 100 μ L,室温反应 1 h。

3.7 重复性

准确称取已知含硫氨基酸含量的奶粉标准品 0.0300 g(精确到 0.0001 g)六份,按 2.3 方法处理,使用最佳 DTT 作用条件,其含硫氨基酸检测结果为 Met 回收率为 85%,RSD 值 2.7%,(Cys)₂ 回收率为 106%,RSD 值 2.3%。其 Met 回收率较低与 3.4 结果相符。

3.8 奶粉含硫氨基酸的检测

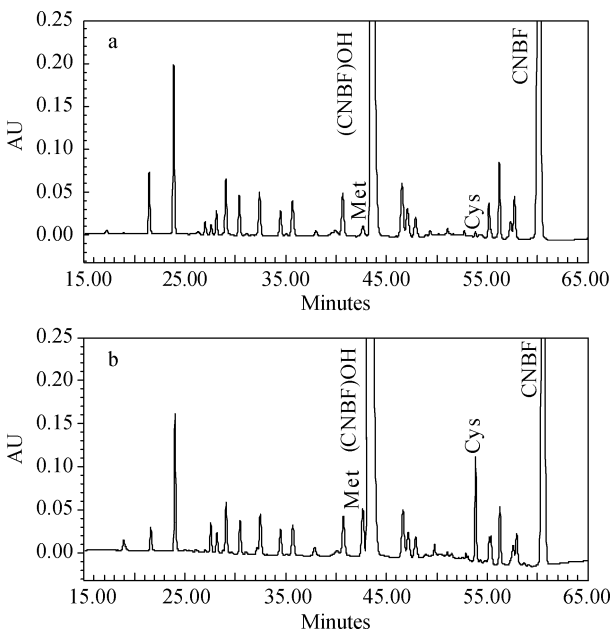
准确称取奶粉样品 0.0300 g(精确到 0.0001 g)15 份,前六份测本底值,其余分别加入 40 mmol/L Met、(Cys)₂ 标准溶液 25 μ L、50 μ L、75 μ L,三次平行,处理同 3.7,结果见表 6,色谱图见图 3。

由表 6 可知, Met 含量为 0.075 mmol/L(即 0.37 g/100 g), (Cys)₂ 含量为 0.034/2 mmol/L 即 0.017 mmol/L(即 0.14 g/100 g); 高中低三个不同浓度加标,

Met、Cys 回收率均在 80%~85%之间, 且 RSD 值 1.0%左右, 说明此法可准确检测奶粉中含硫氨基酸含量。

表 6 奶粉含硫氨基酸检测结果(n=6)
Table 6 Results of sulfur amino acids in milk powder(n=6)

	添加值(mmol/L)	测定值(mmol/L)	回收率(%)	RSD(%)
Met	0	0.075	—	1.3
	0.1	0.158	84.3	1.1
	0.2	0.237	81.6	0.8
	0.3	0.319	82.0	0.7
Cys	0	0.034	—	3.1
	0.1	0.208	86.9	1.4
	0.2	0.361	81.7	0.4
	0.3	0.532	82.9	1.3



a 最佳 DTT 作用下奶粉酸水解色谱图 b 加标回收色谱图
图 3 最佳 DTT 作用下奶粉酸水解含硫氨基酸检测色谱图
Fig. 3 Detection chromatogram of milk powder with optimum dithiothreitol followed the acid hydrolysis

由图 3 可见, 在 DTT 作用下 Met、Cys 有很好的分离, DTT 的峰在 55.63 min 处(图中未标出), 不会干扰含硫氨基酸检测, 但可能影响 Cys 后氨基酸的测定。色谱图中无杂峰, 加标后含硫氨基酸峰高明显增大, 符合要求, 其余未标的峰为奶粉中其他氨基酸。

4 结 论

本文确立了前处理过程中使用还原剂 DTT 的最佳作用条件, 即向 1.0 mL 酸水解液中加入 0.1 mol/L

DTT 100 μ L, 室温反应 1 h。采用此前处理过程, 用反相 HPLC 法可准确测定奶粉中含硫氨基酸含量。检出限低, 精密度好, 回收率高, 操作简单, 耗时少, 适用于奶粉中含硫氨基酸的定量检测。

参考文献

[1] 孔保华. 乳品科学与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 40-80.

[2] 唐佳妮, 吕元, 傅瑜, 等. 国内外乳品真蛋白检测方法的进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 119-22.

[3] GB/T 5009.5-2010, 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

[4] 杨光, 王加启. 乳及乳制品蛋白质掺假检测研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 306-312.

[5] 刘宵玲. HPLC 法测定乳制品中的氨基酸含量[J]. 乳业科学与技术, 2006, 6: 284-286.

[6] 常碧影, 阎惠文, 张明, 等. 食品饲料中含硫氨基酸测定方法的研究[J]. 中国粮油学报, 1994, 9(1): 49.

[7] 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 141-143.

[8] 张明, 常碧影. 大豆籽粒含硫氨基酸测定方法试验研究[J]. 大豆科学, 1994, 13(1): 81-82.

[9] 常碧影, 阎惠文, 张明, 等. 高盐食品饲料中蛋氨酸与胱氨酸测定方法研究[J]. 中国农业科学, 1994, 27(5): 82-88.

[10] 常碧影, 李建凡, 张明. GB/T 15399-94, 饲料中含硫氨基酸测定方法-离子交换色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.

[11] 钱爱萍, 徐洁. 饲料中含硫氨基酸测定前处理方法探讨[J]. 福建农业科技, 1999, 1: 15-17.

[12] 徐洁, 钱爱萍. 提高饲料中含硫氨基酸回收率的前处理方法[J]. 福建分析测试, 1996, 5(4): 583-587.

[13] 杨元秀, 周孝治. 氨基酸分析仪测定饲料及其原料中的含硫氨基酸[J]. 检测分析, 2009, 2: 40-42.

[14] 于淑新, 冯思, 孙元社, 等. 高效液相色谱-柱前衍生化法测定饲料中的含硫氨基酸[J]. 色谱, 2011, 29(3): 239-243.

[15] Lopez del Castillo Lozano M, Tâche R, Bonnarne P, *et al.* Evaluation of a quantitative screening method for hydrogen sulfide production by cheese-ripening microorganisms: The first step towards L-Cysteine catabolism [J]. J Microbiol Methods, 2007, 69: 70-77.

[16] Pinto JT, Khomenko T, Szabo S, *et al.* Measurement of sulfur-containing compounds involved in the metabolism and transport of cysteamine and cystamine. Regional differences in cerebral metabolism [J]. J Chromatogr B, 2009, 877: 3434-3441.

[17] Suh JH, Kim R, Yavuz B, *et al.* Clinical assay of four thiol amino acid redox couples by LC-MS/MS: Utility in thalassemia[J]. J Chromatogr B, 2009, 877: 3418-3427

- [18] 宋文婷, 李磊, 林成仁, 等. HPLC-ECD 法测定大鼠血浆中同型半胱氨酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 3: 116-118
- [19] 颜鸣, 史国兵, 隋因, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中还原型谷胱甘肽浓度[J]. 解放军药理学学报, 2008(24)3: 251-253.
- [20] 张玮, 程治平. 高效液相色谱法检测大鼠子宫内游离氨基酸[J]. 动物学杂志, 1993, 3: 29-31.
- [21] 李卫华, 傅英文, 宋欢, 等. 奶粉中18种蛋白水解氨基酸的高效液相色谱检测方法. 发明专利, 专利号: CN102323341A, 2012.

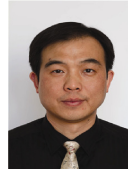
(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



李玉玲, 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。

E-mail: sxlcly1986@163.com



李卫华, 男, 博士, 研究员, 研究方向为农产品安全。

E-mail: aplab@163.com

“快速检测与无损检测技术”专题约稿函

近年来, 随着技术的发展, 食品的快速检测与无损检测技术发展也越来越快, 并越来越多地应用到具体实践中。特别是在食品的重金属、农药、兽药残留和不良添加剂的检测中应用广泛。

鉴于此, 本刊特别策划了“快速检测与无损检测技术”专题, 由中国农业大学韩东海教授担任专题主编, 围绕食品的快速检测与无损检测技术, 包括化学比色法、生物传感器技术、免疫学技术、分子生物学检测技术、生物芯片等多种方法技术展开讨论, 计划在2012年10月出版。

编辑部特向各位专家诚征惠稿, 综述、研究论文均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在8月15日前通过网站或Email投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部