

高效液相色谱法测定乳与乳制品中 *L*-羟脯氨酸的含量

赵一暉, 刘思洁*, 张培军, 战英, 陈俊竹

(吉林省疾病预防控制中心, 长春 130062)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定乳与乳制品中 *L*-羟脯氨酸的含量。**方法** 样品水解衍生后采用 C_{18} 色谱柱, 以乙腈和 10 mmol/L 乙酸钠(pH=5.0)为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 荧光检测器进行检测。**结果** *L*-羟脯氨酸检出限为 0.5 mg/kg, 线性范围为 1.0~100.0 μ g/mL, 加标回收率在 95.3%~102.7% 之间, 相对标准偏差在 1.46%~7.56% 之间。**结论** 该方法操作简便、准确、快速, 提高了样品检出灵敏度, 适用于测定乳与乳制品中 *L*-羟脯氨酸的含量。

关键词: *L*-羟脯氨酸; 乳与乳制品; 高效液相色谱法

Detection of *L*-hydroxyproline in the milk and dairy products by high performance liquid chromatography

ZHAO Yi-Hui, LIU Si-Jie*, ZHANG Pei-Jun, ZHAN Ying, CHEN Jun-Zhu

(Jilin Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changchun 130062, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the detection of *L*-hydroxyproline in milk and dairy products by high performance liquid chromatography. **Methods** *L*-hydroxyproline in samples was extracted by derivation and separated on a C_{18} column using acetonitrile and 10 mmol/L sodium acetate(pH=5.0) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min with the column temperature of 35 °C, and then determined by fluorescence detector. **Results** The detection limit of *L*-hydroxyproline was 0.5 mg/kg. There was a good linearity in the range of 1.0~100.0 μ g/mL, the recovery of standard addition was 95.3%~102.7%, and the relative standard deviation was 1.46%~7.56%. **Conclusion** This method is simple, accurate, rapid, and can improve the detection sensitivity, which is suitable for the determination of *L*-hydroxyproline in milk and dairy products.

KEY WORDS: *L*-hydroxyproline; milk and dairy products; high performance liquid chromatography

1 引言

近年来, 我国乳品企业不断爆出食品安全问题, 一些不法奶农以及部分奶粉生产商为了降低生产成本, 获取最大经济效益, 在乳与乳制品中掺假, 不仅

影响了产品的质量, 而且严重损害广大消费者的身体健康。在各种掺假方法中, 添加皮革水解物是比较常见的一类, 水解动物蛋白(水解明胶)是以动物皮革中的胶原蛋白为原料, 进行水解、精制而成的水解产物。2009 年全国打击违法添加非食用物质和滥用食

*通讯作者: 刘思洁, 主任技师, 主要研究方向健康相关产品卫生检验。E-mail: 0928lsj@163.com

*Corresponding author: LIU Si-Jie, Chief Technician, Jilin Provincial for Disease Control and Prevention, No. 3145, Jingyang Road, Luyuan District, Changchun 130062, China. E-mail: 0928lsj@163.com

品添加剂专项整治领导小组将皮革水解物列入《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》中,明确规定乳与乳制品、含乳饮料中不得添加皮革水解蛋白以增加蛋白质含量。然而皮革水解物是一个混合体,想对其直接评价难度很大,但是 *L*-羟脯氨酸是皮革水解物原料水解蛋白的特征性氨基酸,约占胶原蛋白氨基酸总量的 10%,而乳蛋白质中不含 *L*-羟脯氨酸,如果乳与乳制品蛋白水解氨基酸中检出 *L*-羟脯氨酸,则可证明乳与乳制品中掺假。

目前对乳制品中 *L*-羟脯氨酸的检测方法主要有分光光度法^[1-5]、液相色谱法^[6-9]、氨基酸分析仪法^[10-12]、液相色谱质谱法^[13,14]等,还有一些检测生物样品中 *L*-羟脯氨酸的检测方法^[15]。由于这些方法存在灵敏度低,样品水解时间很长(通常需要 6~24 h),实验操作繁琐,存在难以实现快速测定或所需仪器设备昂贵等缺陷,没有被广泛的应用。本研究在已有方法基础上,将 *L*-羟脯氨酸经丹磺酰氯衍生后用荧光检测器进行检测,操作简单,水解时间短,通过优化流动相中有机相的比例,将 *L*-羟脯氨酸与其他氨基酸很好地分离,消除了检测干扰。同时对方法的检出限、回收率、精密度进行了系统研究,建立了一种操作简便、灵敏度高、选择性好、能为大多数检测机构所使用的方法。该方法灵敏度高,准确度高,实用性强,*L*-羟脯氨酸检出限可达到 0.5 mg/kg,可用于乳及乳制品中羟脯氨酸的检测。

2 材料与试剂

2.1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪,配备荧光检测器(日本岛津公司);酸度计(SA-720,美国 ORION 公司);恒温干燥箱(DHP60,上海实验仪器总厂);超声波振荡器(KQ-500E,昆山市超声仪器有限公司);涡旋混合器(MS2,美国 IKA 公司)。

L-羟脯氨酸标准品,纯度为 99%(上海安普);乙腈、丹磺酰氯均为色谱纯(色谱纯,美国 Fisher 公司),盐酸甲胺、无水乙酸钠、苯酚、盐酸、冰乙酸、无水碳酸钠、氢氧化钠均为分析纯(国药集团)。0.45 μm 微孔滤膜,水相(北京鸿海天科技有限公司)。

2.2 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相组成为:乙腈-10 mmol/L 乙酸钠

(pH=5.0);梯度洗脱:0~2 min, 5%乙腈;2.01~30.0 min, 5%乙腈~35%乙腈;30.01~35.0 min, 35%乙腈~5%乙腈,总运行时间 35 min;柱温 35 °C,进样量 10 μL;流速:1.0 mL/min;荧光检测波长为 $E_x=330$ nm, $E_m=530$ nm。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

准确称取固体乳粉 0.1 g(液态乳 0.5 g)于安瓿瓶中,加入 3 mL 蛋白水解剂,充分混匀,用酒精喷灯封口,置于恒温干燥箱中,110 °C 水解 24 h。水解液冷却后过滤,用氢氧化钠溶液中和并定容至 10 mL,作为样液。吸取 1.00 mL 样液至 10 mL 具塞玻璃试管中,加入 1.00 mL 碳酸钠缓冲液,1.00 mL 丹磺酰氯溶液,充分混合,室温避光衍生反应 90 min,加入 0.10 mL 盐酸甲胺溶液涡旋混合,以终止反应,避光静置至沉淀完全。取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液备用。衍生物在 4 °C 可避光保存 48 h。

2.3.2 标准储备溶液的配制

准确称取 50 mg *L*-羟脯氨酸标准品,用水溶解并定容至 50 mL,配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。

2.3.3 标准曲线的配制

用水将 *L*-羟脯氨酸标准储备液分别稀释成 1.0、2.0、5.0、10.0、50.0 μg/mL,按 2.3.1 对标准品进行衍生反应,得到标准工作液。依次进行色谱测定,记录色谱峰高(或峰面积)。以峰高(或峰面积)为纵坐标,以标准工作液浓度为横坐标绘制标准曲线。

3 结果与分析

3.1 线性范围、回归方程及检出限

以空白基质溶液配制不同浓度的 *L*-羟脯氨酸标准系列,采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行分析,得出线性范围、回归方程和相关系数(r)。在 1.0~100.0 μg/mL 范围内呈现良好的线性关系,回归方程为 $Y=2935.18X-312.61$,线性相关系数为 0.9991。该方法 *L*-羟脯氨酸检出限为 0.5 mg/kg。

3.2 精密度和准确度试验

在酸奶样品和奶粉样品中添加不同含量的 3 个水平 *L*-羟脯氨酸标准溶液,每个添加浓度平行测定 6 次,测定精密度及准确度,结果见表 1。*L*-羟脯氨酸

表 1 *L*-羟脯氨酸准确度与精密度试验($n=6$)
Table 1 Accuracy and precision test *L*-hydroxyproline($n=6$)

样品	本底值(μg)	添加量(μg)	平均测定值(μg)	平均回收率 %	RSD (%)
酸奶	0	20.0	20.5	102.7	7.56
	0	160.0	160.4	100.3	1.46
	0	320.0	316.3	98.8	1.64
奶粉	0	20.0	19.1	95.3	7.54
	0	160.0	154.3	96.4	4.65
	0	320.0	316.5	98.9	2.34

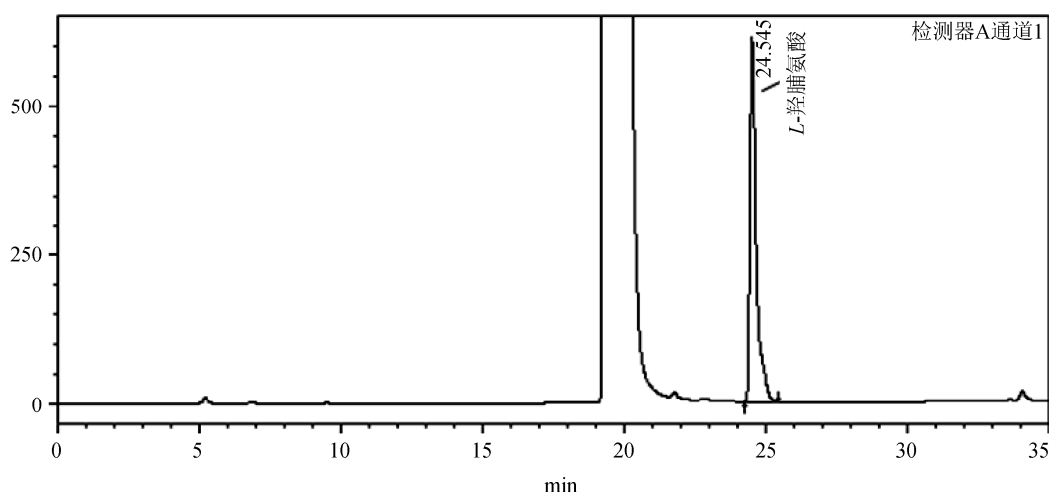


图 1 *L*-羟脯氨酸标准样品丹磺酰氯衍生物的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of dansyl chloride derivative of *L*-hydroxyproline standard sample

加标回收率在 95.3%~102.7%，所测定的相对标准偏差(RSD)在 1.46%~7.56%之间。方法的准确度和精密度均符合检测分析的要求。

3.3 色谱条件的优化

由于 *L*-羟脯氨酸属于极性大、分子质量小的一种化合物，没有紫外吸收，但是与丹磺酰氯反应后能生成具有强烈荧光的物质，在激发波长(E_x)=330 nm，发射波长(E_m)=530 nm 下有强烈的荧光吸收。因此本方法采用将 *L*-羟脯氨酸衍生后用荧光检测器进行检测，并且通过优化流动相中有机相的比例，将 *L*-羟脯氨酸与其他氨基酸很好的分离，消除了检测干扰。

同时发现流动相中水相的浓度和 pH 值对样品分析产生很大的影响，pH 值越低，样品出峰的时间越晚；浓度越低，样品峰的峰形越宽。最终根据实验结果选择了 10 mmol/L 的乙酸钠(pH=5.0)作为流动相的水相，可以得到很好的分离效果，详见图 1。

4 结论

本研究通过对实验条件的优化，建立了乳与乳制品中 *L*-羟脯氨酸的检测分析方法。该方法样品处理简单，衍生效率比较高，分离效果好，方法的灵敏度和检出限均能满足检测分析的要求，且易于推广使用，可以作为乳与乳制品中是否存在违法添加皮革水解蛋白的筛选方法，为监督执法提供了强有力的技术支持。

参考文献

- [1] 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, 19(3): 145-147.
Tian YL. Appraisal method of animal protein hydrolysate in milk and dairy products [J]. China Food Addit, 2008, 19(3): 145-147.
- [2] 戴绚丽, 范立英, 任艳. 对二甲氨基苯甲醛分光光度法测定奶粉中 *L*-羟脯氨酸测定含量[J]. 食品工业科技, 2009, 3(3):

- 313-318.
Dai XL, Fan LY, Ren Y. Detection of *L*-hydroxyproline in milk powder by dimethyl amino benzene formaldehyde spectrophotometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, 3(3): 313-318.
- [3] 赵娟, 夏淑鸿, 张向荣, 等. 生鲜乳中 *L*-羟脯氨酸测定方法的研究[J]. *中国奶牛*, 2011, 11: 55-57.
Zhao J, Xia SH, Zhang XR, *et al.* Research of determination method for *L*-hydroxyproline in fresh milk [J]. *China Dairy Cattle*, 2011, 11: 55-57.
- [4] 陈裕华, 廖仕成, 李瑞园, 等. 乳及乳制品中羟脯氨酸测定方法的研究[J]. *职业与健康*, 2010, 26(3): 283-285.
Chen YH, Liao SC, Li RY, *et al.* Determination of hydroxyproline in the milk and dairy products [J]. *Occup Health*, 2010, 26(3):283-285.
- [5] 杨志琼. 比色法测定乳与乳制品中 *L*(-)-羟脯氨酸的探讨[J]. *预防医学情报杂志*, 2013, 29(7): 615-617.
Yang ZQ. Determination of *L*-hydroxyproline in milk and dairy products with colorimetric method [J]. *J Prev Med Inf*, 2013, 29(7): 615-617.
- [6] 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]. *检测与分析*, 2009, 12(7): 28-30.
Jin SY, Lin XR, Zhao ZH, *et al.* Determination of *L*-hydroxyproline in milk powder and other dairy products by HPLC [J]. *Detect Anal*, 2009, 12(7): 28-30.
- [7] 肖雪花, 陶保华, 任一平. 超高效液相色谱柱前衍生法测定奶粉及其他乳制品中 *L*-羟脯氨酸[J]. *中国职业医学*, 2011, 38(8): 66-67.
Xiao XH, Tao BH, Ren YP. Detection of *L*-hydroxyproline in milk powder and other dairy products by first derivative method of ultra high performance liquid chromatographic column [J]. *China Occup Med*, 2011, 38(8): 66-67.
- [8] 刘婷, 姜金斗, 刘宁. HPLC-OPA 柱后衍生离子交换法对奶粉中掺水解动物蛋白检测方法的的研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 2(7): 207-209.
Liu T, Jiang JD, Liu N. Detection of the mixing hydrolyzed animal protein in milk powder by HPLC-OPA column after derivative ion exchange method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2007, 2(7): 207-209.
- [9] 姜维, 吴平谷, 韩见龙. 高效液相色谱法检测乳及乳制品中羟脯氨酸[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(7): 1514-1517.
Jiang W, Wu PG, Han JL. Determination of hydroxyproline in milk and milk products by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2012, 22(7): 1514-1517.
- [10] 曾暖茜, 王洪健, 周兴起, 等. 氨基酸自动分析仪对乳制品中羟脯氨酸的测定方法研究[J]. *现代食品科技*, 2008, 24 (7): 719-7211.
Zeng NQ, Wang HJ, Zhou XQ, *et al.* Determination of hydroxyproline in dairy products by automatic amino acid analyzer [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2008, 24 (7): 719-7211.
- [11] 蔡梅, 吉文亮, 刘华良, 等. 氨基酸自动分析仪对牛乳中羟脯氨酸快速测定方法研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2012, 24(6): 542-545.
Cai M, Ji WL, Liu HL, *et al.* Determination of hydroxyproline in milk by automatic amino acid analyzer [J]. *Chin J Food Hyg*, 2012, 24(6): 542-545.
- [12] 张秀尧, 梁晓蓉, 蔡欣欣, 等. 氨基酸自动分析仪检测乳及乳制品中羟脯氨酸[J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(10): 2305-2306.
Zhang XR, Liang XR, Cai XX, *et al.* Determination of hydroxyproline in dairy products using amino acid analyzer [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 19(10): 2305-2306.
- [13] 王一红, 冯加力, 潘振球, 等. 液相色谱-质谱/质谱联用技术分析 18 种游离氨基酸[J]. *中国卫生检验杂志*, 2006, 16(2): 161-163.
Wang YH, Feng JL, Pan ZQ, *et al.* Analysis of 18 kinds of free amino acids by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2006, 16(2): 161-163.
- [14] 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.
Xia JG, Chen B, Yao SZ. Determination of hydroxyproline in collagen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2008, 26(5): 595-598.
- [15] 刘思洁, 郭良友, 李青, 等. 乳与乳制品中 *L*-羟脯氨酸检测技术的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(9): 2629-2633.
Liu SJ, Guo LY, Li Q, *et al.* Research progress of the detection technology of *L*-hydroxyproline in milk and dairy products [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(9): 2629-2633.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



赵一晖, 副主任技师, 主要研究方向为健康相关产品卫生检验。
E-mail: 645211646@qq.com



刘思洁, 主任技师, 主要研究方向为健康相关产品卫生检验。
E-mail: 09281sj@163.com