

# 液相色谱法测定核桃乳中糠氨酸含量

白 祥, 胡赠彬, 谭建林, 彭珍华, 赵秀琳, 冯 雷, 王吉祥, 牛之瑞\*

(云南省产品质量监督检验研究院, 国家热带农副产品质量监督检验中心, 昆明 650223)

**摘要: 目的** 建立液相色谱法测定核桃乳中糠氨酸含量的检测方法。**方法** 样品经酸水解、乙酸铵缓冲液定容后, 经反相 C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 以甲醇/三氟乙酸溶液为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 梯度洗脱, 在紫外检测器波长为 280 nm 下检测。**结果** 糠氨酸浓度在 2~50 μg/L 的范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999。糠氨酸在 2.00、5.00 和 10.00 mg/100 g 蛋白质添加水平的回收率为 88.82%~91.95%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 3.55% (n=6), 方法检出限为 1.0 mg/100 g 蛋白质。**结论** 该方法操作过程简单、方法准确、可靠、重现性好、回收率较高, 适合于核桃乳中糠氨酸含量的分析检测。

**关键词:** 糠氨酸; 核桃乳; 高效液相色谱

## Determination of furosine content in walnut milk by liquid chromatography

BAI Xiang, HU Zeng-Bin, TAN Jian-Lin, PENG Zhen-Hua, Zhao Xiu-Lin, FENG Lei,  
WANG Ji-Xiang, NIU Zhi-Rui\*

(National Agricultural and Sideline Products Quality Supervision and Inspection Center, Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Kunming 650223, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of furosine in walnut milk by liquid chromatography. **Methods** The sample was hydrolyzed by acid and stabilized by the buffer solution of ammonium acetate, separated by reverse phase C<sub>18</sub> column at the flow rate of 1.0 mL/min by gradient elution using methanol/trifluoroacetic acid solution as mobile phase, and detected at a UV detector wavelength of 280 nm. **Results** The furosine had a good linear relationship in concentration range of 2-50 μg/L, and the correlation coefficient was greater than 0.999. The recoveries of furoate at protein levels of 2.00, 5.00 and 10.00 mg/100 g were 88.82%-91.95%, and relative standard deviation was less than 3.55% (n=6). The detection limit of the method was 1.0 mg/100 g protein. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, it has a good reproducibility and high recovery rate, and is suitable for the analysis and detection of the content of furosine acid in walnut milk.

**KEY WORDS:** furosine; walnut milk; high performance liquid chromatography

## 1 引言

核桃乳是一种深受消费者喜爱的植物蛋白饮料, 它是以核桃仁为原料, 添加食品辅料、食品添加剂, 经加工调配后制得的植物蛋白饮料<sup>[1]</sup>。核桃乳低脂高蛋白, 适合各类人群饮用, 尤其是中老年人以及高血压高血脂患者

<sup>[1]</sup>。核桃乳等植物蛋白饮料在加工过程中多采用高温灭菌的办法, 而核桃乳又富含蛋白质和糖类物质, 这就意味着在加工过程中极易发生美拉德反应(Maillard reaction), 从而对产品中的成分产生影响<sup>[2]</sup>。糠氨酸(furosine, ε-N-2 呋喃甲基-L-赖氨酸)是美拉德反应的初期产物, 是 Amadori 分子重排化合物乳糖基赖氨酸的酸水解产物。有研究表明,

\*通讯作者: 牛之瑞, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: bullnzh@163.com

\*Corresponding author: NIU Zhi-Rui, Senior Engineer, Yunnan Institute of Product Quality Supervision & Inspection, No.23, Jiaochang Road, Wuhua District, Kunming 650223, China. E-mail: bullnzh@163.com

糠氨酸会影响肠道菌群结构, 还会对肝肾造成损伤<sup>[3]</sup>。糠氨酸常用于定量的评估美拉德反应的程度, 国家奶产品质量安全质检机构和风险评估机构已经将糠氨酸作为重点检测的副反应因子<sup>[4]</sup>。有研究发现, 糠氨酸不仅存在于乳制品中, 也存在于其他食品甚至是饲料当中<sup>[5-8]</sup>。而目前关于糠氨酸检测方法大多是针对巴氏杀菌乳和超高温处理 (ultra high temperature, UHT) 灭菌乳的方法<sup>[9-15]</sup>, 针对核桃乳等需要高温处理的植物蛋白饮料的检测方法较少。

本研究借鉴现有的乳制品中糠氨酸检测方法并加以改进, 使其适用于核桃乳中糠氨酸的检测, 以期为核桃乳中糠氨酸含量检测提供参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

核桃乳饮料购与本地超市。

甲醇(色谱纯, 德国 Meker 公司); 三氟乙酸(分析纯, 上海 Macklin Biochemical 公司); 盐酸(分析纯, 重庆万盛川东化工有限公司); 糠氨酸标准品(furosine, CAS: 19746-33-9, 肽纯度系数 72.6%, 德国 Iris Biotech GmbH 公司)。

糠氨酸标准储备液和工作液的配制: 将糠氨酸标准品按标准品证书提供的肽纯度系数换算后(标准品证书上标注肽纯度系数为 72.6%, 准确称取 6.89 mg 糠氨酸标准品), 用 3 mol/L 盐酸溶液配制成 500 mg/L 标准储备液。再移取适量 500 mg/L 标准储备液, 用 3 mol/L 盐酸溶液逐级稀释成浓度依次为 100、50、20、2、0 μg/L 的标准工作溶液。

### 2.2 仪器与设备

UFLC-20A 高效液相色谱仪(配有自动进样系统、柱温箱、紫外检测器, 日本 Shimadzu 公司); CZX-GF101-1-BS 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司); BS223S 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

### 2.3 方法

#### 2.3.1 样品前处理

称取混合均匀的试样 2 g(精确到 1 mg)于 10 mL 消化

管中, 加入 6 mL 10.6 mol/L 盐酸溶液, 加盖密封, 混匀后置于恒温鼓风干燥箱中, 在 110 °C 下加热水解 14 h。加热结束后, 将试管从干燥箱中取出, 冷却, 用滤纸过滤, 用 6 g/L 乙酸铵溶液淋洗滤纸, 滤液收集于 50 mL 容量瓶中, 以 6 g/L 乙酸铵定容至 50 mL, 混匀后, 过 0.22 μm 水系滤膜, 上机<sup>[10,11,16]</sup>。

#### 2.3.2 色谱条件

Shiseido PAK ADME C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为甲醇; 流速: 1.0 mL/min。紫外检测波长: 280 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL, 洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件  
Table 1 Conditions of gradient elution of liquid chromatography

序号	时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
1	--	100.0	0.0
2	8.00	80.0	20.0
3	12.00	20.0	80.0
4	17.00	20.0	80.0
5	18.00	100.0	0.0
6	23.00	100.0	0.0

## 3 结果与分析

### 3.1 色谱条件的优化

糠氨酸是一种氨基酸, 在色谱检测时有可能被水解过程中产生的其他氨基酸或有机酸类物质干扰, 因此优化色谱条件较为重要。以流动相为空白, 在 200~700 nm 范围内扫描, 对糠氨酸的最大吸收波长进行测定, 最大吸收峰在 245 nm 左右, 但参考了相关文献及实际检测效果比较<sup>[9-15]</sup>, 综合考虑其最大吸收波长和样品基质对基线造成的影响, 最终选择了检测波长为 280 nm。采用三氟乙酸溶液/甲醇梯度洗脱的流动相体系经反复优化, 最终确定色谱条件, 见表 1。流速 1.0 mL/min, 柱温为 40 °C 条件下, 糠氨酸的出峰时间在 7.4~7.5 min 之间(见图 1), 且能够与干扰峰完全分离。核桃乳样品的色谱图如图 2。

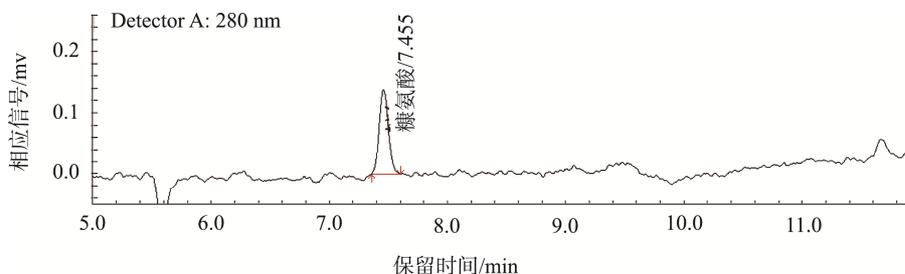


图 1 糠氨酸标准品的色谱图

Fig.1 Chromatogram of furosine standard

### 3.2 线性范围与定量限

取糠氨酸标准储备液,采用逐渐稀释法配制标准工作液。按照上述确定的方法色谱条件进样,以标准溶液的峰面积(Y)对其质量浓度(X,  $\mu\text{g/L}$ )做线性回归方程,结果表明糠氨酸在 2~50  $\mu\text{g/L}$  范围内呈良好的线性关系,线性方程为  $Y=0.02492632X+0.0998561$ , 相关系数( $r^2$ )为 0.9999。以基线 3 倍噪音( $S/N=3$ )考察了糠氨酸的检出限为 1.0  $\text{mg}/100\text{ g}$  蛋白质。

### 3.3 精密度与回收试验

在最佳液相色谱条件下,选择基质样品进行加标回收试验,以外标法定量,向基质样品中添加低(2.00  $\text{mg}/100\text{ g}$  蛋白质)、中(5.00  $\text{mg}/100\text{ g}$  蛋白质)、高(10.00  $\text{mg}/$

100  $\text{g}$  蛋白质)3 个浓度水平的糠氨酸标准溶液,每个浓度样品平行测定 6 次,计算添加平均回收率和相对标准偏差,结果见表 2,糠氨酸的平均回收率为 88.82%~91.95%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.54%~3.55%,小于 5%。该方法的准确度和精密度均符合定量分析要求,能够用于日常分析检测。

### 3.4 实际样品检测

利用上述方法检测了 4 个核桃乳样品中的糠氨酸含量(检测结果见表 3)。由表 3 可以看出,糠氨酸含量在 0~2.35 之间。糠氨酸含量的不同可能是由于产品在生产过程中热处理方式或不同的温度带来的影响。在高温条件下,有利于美拉德反应的发生,因而在弱酸性条件下产生乳糖基赖氨酸,进而水解成糠氨酸。

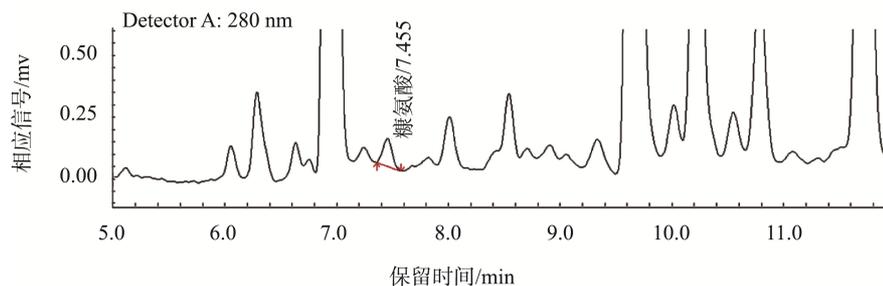


图 2 核桃乳样品的色谱图

Fig.2 Chromatogram of walnut milk

表 2 糠氨酸的回收率及稳定性( $n=6$ )

Table 2 Recovery rates and RSD% of Furosine ( $n=6$ )

添加量( $\text{mg}/100\text{ g}$ 蛋白质)	本底值( $\text{mg}/100\text{ g}$ 蛋白质)	检测值( $\text{mg}/100\text{ g}$ 蛋白质)	回收率/%	RSD/%
10.00	ND	8.88	88.82	1.60
5.00	ND	4.60	91.95	1.54
2.00	ND	1.79	89.30	3.55

注:基质蛋白质含量采用凯氏定氮法测定,含量为 0.5%,ND 为未检出。

表 3 核桃乳样品中糠氨酸含量的测定( $n=6$ )

Table 3 Determination of Furosine in walnut milk ( $n=6$ )

样品编号	1	2	3	4
糠氨酸含量( $\text{mg}/100\text{ g}$ 蛋白质)	ND	2.06	2.35	ND

注:ND 为未检出。

## 4 结论

通过改进原有的乳制品中的糠氨酸检测方法,建立了核桃乳中糠氨酸的液相色谱快速检测方法。糠氨酸在 2.00、5.00 和 10.00  $\text{mg}/100\text{ g}$  蛋白质添加水平的回收率为 88.82%~91.95%,相对标准偏差小于 3.55%,该方法均具备操作过程简单、方法准确、可靠、重现性好、回收率较

高的特点,适合核桃乳中糠氨酸的分析,具有较大实用价值。

### 参考文献

- [1] GB/T 31325-2014 植物蛋白饮料 核桃露(乳)[S].  
GB/T 31325-2014 Plant protein beverage-Walnut beverage [S].
- [2] 徐素云. 复合型核桃乳工艺及其品质特性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015  
Xu SY. Study on compound walnut milk process and quality characteristics [D]. Guiyang: Guizhou University, 2015
- [3] 赵男. 采用小鼠模型评价糠氨酸的毒性作用[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.  
Zhao N. Evaluating the toxic effects of furosine by using mouse model [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018.

- [4] 陈冲冲. 基于 UPLC 的糠氨酸快速检测方法的建立及应用[D]. 长春: 吉林大学, 2017.  
Chen CC. Establishment and application of furosine rapid detection method based on UPLC [D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [5] 黄苏红, 通晓婷, 单梦圆, 等. 不同烹饪方式对金枪鱼中美拉德反应产物的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1363-1369.  
Huang SH, Tong XT, Shan MY, *et al.* Influence of different cooking methods on Maillard reaction products in tuna fillet [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(4): 1363-1369.
- [6] 李沙, 郭栋, 王晓雯, 等. HPLC 法检测分析温度对中药口服液品质的影响[J]. 中国酿造, 2015, 34(4): 31-34.  
Li S, Guo D, Wang XW, *et al.* Effect of temperature on the quality of oral liquid of traditional Chinese medicine by HPLC [J]. *Chin Brew*, 2015, 34(4): 31-34.
- [7] 周骁, 薛晓锋, 吴黎明, 等. 蜂花粉中糠氨酸的高效液相色谱测定方法[J]. 现代科学仪器, 2008, (2): 90-92  
Zhou X, Xue XF, Wu LM, *et al.* Determination of furosine in bee pollen by HPLC [J]. *Mod Sci Instrum*, 2008, (2): 90-92.
- [8] 徐宏建, 李昕, 王玉洁, 等. 干酒糟及其可溶物中糠氨酸含量与瘤胃降解特性和瘤胃非降解蛋白质的小肠消化率的相关性研究[J]. 动物营养学报, 2018, 30(11): 4470-4481.  
Xu HJ, Li X, Wang YJ, *et al.* Correlation research between furosine content and ruminal degradation characteristics and intestinal digestibility of rumen undegraded protein in distillers dried grains with soluble [J]. *Chin J Anim Nutr*, 2018, 30(11): 4470-4481.
- [9] NY/T 939-2016 巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定[S].  
NY/T 939-2016 Identification of reconstituted milk in pasteurized and UHT milk [S].
- [10] 金瑛, 刘艳琴. 复原乳鉴别指标探讨[J]. 中国乳品工业, 2006, 34(8): 43-45.  
Jin Y, Liu YQ. Indicators for identification of reconstituted milk [J]. *Chin Dairy Ind*, 2006, 34(8): 43-45.
- [11] 白永胜, 杨小剑, 李梅, 等. 灭菌乳产品不同生产工艺及储存条件下糠氨酸的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3501-3504  
Bai YS, Yang XJ, Li M, *et al.* Study on furosine in sterilized milk products under different production processes and storage conditions [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(13): 3501-3504.
- [12] 许国庆, 赵慧芬, 李克杰, 等. 乳与乳制品中糠氨酸含量的测定方法[J]. 中国奶牛, 2006, (7): 44-46.  
Xu GQ, Zhao HF, Li KJ, *et al.* Determination of furosine in milk and dairy products [J]. *Chin Dairy Cattle*, 2006, (7): 44-46.
- [13] 韩荣伟, 王加启, 郑楠. 热处理对牛乳成分的变化影响及热损失标识物的选择[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(7): 22-29.  
Han RW, Wang JQ, Zheng N. Effect of heat treatment on milk and determination of heat indicators in milk [J]. *Food Nutr Chin*, 2011, 17(7): 22-29.
- [14] 鄂来明, 王薇, 宋戈, 等. HPLC 法测定乳品中的糠氨酸[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(8): 51-52.  
E LM, Wang W, Song G, *et al.* HPLC determination of furosine in dairy products [J]. *Chin Dairy Ind*, 2008, 36(8): 51-52.
- [15] 冯婉莹, 刘结容, 郑学殷, 等. UPLC-Q-TOF/MS 法测定液态乳中的糠氨酸[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(6): 48-50.  
Feng WY, Liu JR, Zheng XY, *et al.* Determination of furosine in the liquid milk by ultra performance liquid chromatography with ultra resolution quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. *Chin Dairy Ind*, 2019, 47(6): 48-50.
- [16] 徐宏建, 张立阳, 刘鑫, 等. 不同热处理 DDGS 中 CNCPS 组分与糠氨酸含量的相关性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(12): 3471-3478.  
Xu HJ, Zhang LY, Liu X, *et al.* Study on the correlation between the CNCPS fractions and furosine content in DDGS with different heat treatment [J]. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2018, 45(12): 3471-3478.
- [17] GB 5009.124-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定[S].  
GB 5009.124-2016 National food safety standard-Determination of amino acids in foods [S].

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



白 祥, 工程师, 主要研究方向为实验室管理。

E-mail: bull.nzr@163.com



牛之瑞, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: bullnznr@163.com