

# 奶及奶制品中糠氨酸检测方法的研究进展

王峰恩<sup>1,2,3</sup>, 张养东<sup>1,4,5</sup>, 郑楠<sup>1,4,5</sup>, 王加启<sup>1,3,4,5\*</sup>

[1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室(北京), 北京 100193;  
2. 山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 济南 250100; 3. 新疆农业大学动物科学学院,  
乌鲁木齐 830091; 4. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京),  
北京 100193; 5. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193]

**摘要:** 糠氨酸源于美拉德反应的早期产物, 并最终经酸水解产生。它间接反映了美拉德反应的程度、赖氨酸营养功能的损失程度和食品受热程度等, 被广泛应用于食品的品质评价。虽然糠氨酸在酸水解时的产率仅有30%~40%, 但在相同的检测条件下, 该产率是稳定的。近40年来, 糠氨酸的检测方法研究主要集中于色谱分离系统和检测器的选择与优化, 以及酸水解条件对糠氨酸产率的影响。本文针对奶及奶制品中糠氨酸的检测方法, 从高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)与检测标准的建立、其他色谱技术或检测器的应用、酸水解条件的研究等方面进行综述, 并对目前的主要问题和研究方向进行了展望, 为进一步开发更高效、更灵敏、更准确和更稳定的新检测方法提供参考。

**关键词:** 奶及奶制品; 糠氨酸; 色谱; 酸水解

## Research progress on the determination of furosine in milk and dairy products

WANG Feng-En<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yang-Dong<sup>1,4,5</sup>, ZHENG Nan<sup>1,4,5</sup>, WANG Jia-Qi<sup>1,3,4,5\*</sup>

(1. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 3. College of Animal Science, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830091, China; 4. Ministry of Agriculture and Rural Affairs Milk and Milk Products Quality Supervision, Inspection and Testing Center, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 5. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**ABSTRACT:** Furosine originates from the early products of Maillard reaction and is finally produced through acid hydrolysis. It indirectly reflects the degree of Maillard reaction, the degree of loss of lysine nutritional function and the degree of food heating, and has been widely used in food quality evaluation. Although the yield of furosine upon acid hydrolysis is only 30% to 40%, the yield is stable under the same test conditions. In the past 40 years, the research on detection method of furosine has mainly focused on the selection and optimization of chromatographic

**基金项目:** 中国农业科学院农业科技创新工程重大产出科研选题(CAAS-ZDXT2019004)、中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IAS12)、现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-36)

**Fund:** Supported by the Scientific Research Project for Major Achievements of the Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ZDXT2019004), Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP-IAS12), and the Modern Agro-Industry Technology Research System of the PR China (CARS-36)

\*通信作者: 王加启, 博士, 研究员, 主要研究方向为反刍动物营养与牛奶质量改良。E-mail: jiaqi wang@vip.163.com

\*Corresponding author: WANG Jia-Qi, Ph.D., Professor, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, No.2, Yuanmingyuan West Road, Haidian District, Beijing 100193, China. E-mail: jiaqi wang@vip.163.com

separation system and detector, and the effect of acid hydrolysis conditions on the yield of furosine. This paper reviewed the research on the determination of furosine in milk and dairy products, including high performance liquid chromatography and the related detection standards, the application of other chromatographic system or detectors, and the conditions of acid hydrolysis, and also presented the research prospects, in response to the main challenges on such research, and to provide references for further development of more time-saving, sensitive, accurate, and stable detection technology on furosine in milk and dairy products.

**KEY WORDS:** milk and dairy products; furosine; chromatography; acid hydrolysis

## 0 引言

糠氨酸(furosine)作为反映生理代谢情况和食品质量安全的重要指标,自1966年至今被众多生物医学工作者和食品化学家所研究<sup>[1]</sup>。在美拉德反应的初级阶段,葡萄糖或乳糖和赖氨酸通过羰氨缩合形成席夫碱,进而通过 Amadori 重排形成产物 1-amino-1-deoxy-2-ketose<sup>[2-3]</sup>。Amadori 产物能够反映美拉德反应的程度,进而反映食品中氨基酸的热损伤或营养损失<sup>[4]</sup>。在测定 Amadori 产物的过程中,研究人员发现了一种更为稳定的物质能够用来间接测定 Amadori 产物,即糠氨酸<sup>[1]</sup>。糠氨酸的结构为  $\epsilon$ -N-2-呋喃甲基-L-赖氨酸( $\epsilon$ -N-2-furoylmethyl-L-lysine)<sup>[5-6]</sup>,源于美拉德反应的早期产物[ $\epsilon$ -N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-L-lysine, FL],并最终在酸水解时形成<sup>[7-9]</sup>,见图 1<sup>[7]</sup>。因此,糠氨酸间接反映了美拉德反应的程度、赖氨酸营养功能的损失程度和食品受热程度等。在科学实践中,糠氨酸作为第 II 类时间-温度指标,被广泛应用于食品的品质评价<sup>[10]</sup>;同时,糠氨酸也成为评价食品原料新鲜程度,如蜂蜜<sup>[11-12]</sup>、禽蛋<sup>[13-14]</sup>,以及奶及奶制品中是否掺入复原乳的检测依据<sup>[15-16]</sup>。

出于监管的目的,牛奶中糠氨酸限量的建议值分别为巴氏杀菌乳 8 mg/100 g 蛋白质、高温巴氏杀菌乳 20 mg/100 g 蛋白质和超高温灭菌(ultra high-temperature treatment, UHT)奶 250 mg/100 g 蛋白质<sup>[17-18]</sup>。意大利法律规定,生乳和巴氏杀菌乳中的糠氨酸限量为 8.6 mg/100 g 蛋白质,而马苏里拉奶酪和其他鲜奶凝乳中的糠氨酸限量为 10~12 mg/100 g 蛋白质<sup>[19]</sup>。中国对糠氨酸限量的建议值分别为优质巴氏杀菌乳 12 mg/100 g 蛋白质和优质 UHT 乳 190 mg/100 g 蛋白质<sup>[20]</sup>。

为了实现奶及奶制品的监管,确保质量和营养品质,建立高效、灵敏、准确和稳定的检测技术至关重要。Amadori 产物在酸水解中转化为糠氨酸的产率只有 30%~40%,但是在检测条件相同的情况下该产率是稳定的<sup>[4]</sup>。自 1966 年利用离子交换色谱法(ion exchange chromatography, IEC)首次检测到糠氨酸以来<sup>[1]</sup>,糠氨酸的检测方法研究主要集中于色谱分离系统与检测器的选择与优化,以及酸水解条件对糠氨酸产率的影响,见表 1。本文综述了近 40 年糠氨酸的检测方法研究概况,包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)与检测标准的建立、其他色谱技术或检测器的应用、酸水解条件的研究等方面,并对奶及奶制品中糠氨酸检测技术存在的主要问题和研究方向进行了展望,以期为进一步开发更高效、更灵敏、更准确和更稳定的新检测方法提供参考。

## 1 HPLC 法与检测标准的建立

采用 HPLC 分离和紫外检测器(ultraviolet detector, UV)测定,是较早用于糠氨酸的检测方法,也是最经典、最成熟的检测方法。HPLC 采用高压输液系统,将具有不同极性的溶剂、缓冲液等流动相泵入装有固定相的色谱柱,各成分在柱内实现分离后,进入 UV 或二极管阵列检测器(diode array detector, DAD; 或 photodiode array detector, PDA)扫描特定波长的吸光度,将光信号换为电信号,从而实现对待样品的分析。

1981 年, SCHLEICHER 等<sup>[21]</sup>首次采用 HPLC 法测定了人类血清蛋白的糠氨酸;1983 年, CHIANG 等<sup>[22]</sup>将 HPLC 法应用到了食品的检测;1990 年, RESMINI 等<sup>[26]</sup>在前人的

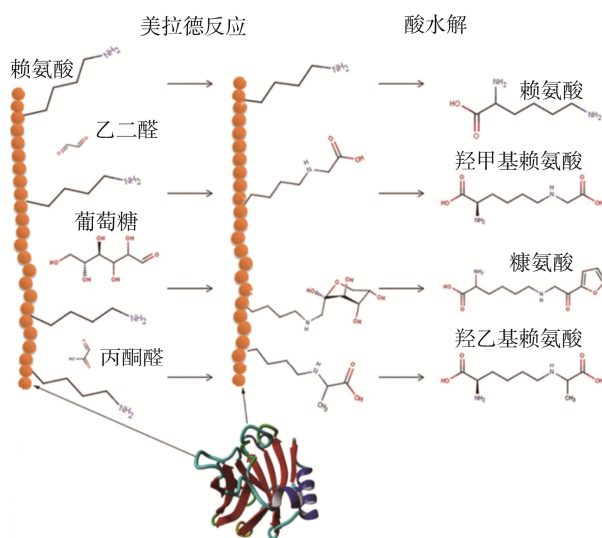


图 1 美拉德反应与糠氨酸的形成示意图

Fig.1 Schematic diagram of Maillard reaction and the formation of furosine

研究基础上<sup>[21-24]</sup>,比较气液相色谱(gas liquid chromatography, GLC)和 HPLC 的结果,利用反相离子对 HPLC 建立了奶及奶制品中糠氨酸的检测方法。取样品少量加入 8 mol/L 盐酸溶液于具塞耐热玻璃管,充入氮气保护后密封,于 110 °C 加热水解 23 h,水解液过滤稀释后经固相萃取(solid phase extraction, SPE)净化,经过装有 C<sub>8</sub> 柱的 HPLC 分离,由 DAD 在 280 nm 处扫描测得。该方法分离效果好,更加灵敏和准确,目前已成为奶及奶制品中检测糠氨酸的主流方法<sup>[16,34,46,52,56,60]</sup>,并由此衍生出适用其他食品的糠氨酸检测方法,如禽蛋<sup>[13-14]</sup>、番茄<sup>[61-62]</sup>、小麦粉<sup>[50,63]</sup>、意面<sup>[29,39,55,57]</sup>等。1992 年高纯度且稳定的糠氨酸标准品出现后,DELGADO 等<sup>[29]</sup>在此基础上进一步优化了仪器方法,使糠氨酸的分离度更好,保留时间从 17.9 min 缩短至 10.5 min,不仅很好地适用于奶及奶制品的糠氨酸检测<sup>[39,44]</sup>,也为其他食品的检测提供了更多参考,如蜂蜜<sup>[41]</sup>和谷物<sup>[45]</sup>等。2004 年,国际奶业联合会(international dairy federation, IDF)发布了奶及奶制品中糠氨酸的国际标准检测方法 ISO 18329/IDF 193<sup>[42]</sup>,该方法很快成为检测糠氨酸的权威标准,应用于奶及奶制品<sup>[48-49]</sup>和其他食品中,如小麦籽粒<sup>[53]</sup>等。2005 年,我国在国际标准 ISO 18329/IDF 193 的基础上进行了优化,发布了农业行业标准 NY/T 939—2005《巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定》。用常见的 C<sub>18</sub> 色谱柱替代难以购买的糠氨酸专用柱,并改变流动相以降低酸性,延长了仪器和色谱柱的使用寿命,大大提高了检测方法的适用性。2016 年,该标准进行了修订:取消了酸水解前的氮气保护,并将水解时间从 23~24 h 缩短为 12~23 h,取消了 SPE 净化改为水相膜直接过滤,增加超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)的系统参数,使检测时间从 25 min 缩短至 8 min,这些修改使糠氨酸的检测方法更加简单高效。

此外,还有很多研究是在 HPLC 的基础上进行的改进和优化<sup>[7,31]</sup>。虽然 HPLC 具有分离效果好、自动化程度高、可维护性强等诸多优点,但在灵敏度和检测效率等方面的表现仍有待提高。目前在我国农业行业标准 NY/T 939—2016 中,乳中糠氨酸的定量限为 3.0 mg/100 g 蛋白质,这仅仅略低于生乳中的糠氨酸含量,不能满足更多代谢组学的研究需求。而总上机时间较长,尤其在大规模样品测定时,单个样品的测定时间会大大影响总体检测效率。

## 2 其他色谱技术或检测器的应用

为了解决检测糠氨酸时灵敏度不足和检测效率较低的问题,学者们使用多种色谱技术或检测器进行了尝试,见表 2。

### 2.1 质谱的应用

质谱(mass spectrometry, MS)或串联质谱(tandem mass

spectrometry, MS/MS)的使用大大改善了检测方法的灵敏性和准确性。MS 将目标物分子离子化,离子碎片因为质荷比的不同在电磁场中偏离距离不同,从而实现碎片的筛选。通过离子碎片的组成和丰度,完成定性定量分析。MS/MS 则是在 MS 离子化基础上,设置碰撞电压进一步击碎离子碎片的方式,得到丰富的离子结构信息,以实现高特异性和高灵敏度。

TAKEMURA 等<sup>[36]</sup>利用 HPLC-MS/MS 的选择反应监测(select reaction monitoring, SRM)模式,可以在 0.1 mg 头发中检测到糠氨酸含量。TROISE 等<sup>[7]</sup>利用 HPLC-MS/MS 的多反应监测(multiplexed reaction monitoring, MRM)模式检测牛奶中的糠氨酸含量,定量限(limit of quantitation, LOQ)可达 0.009 mg/L,约为 0.03 mg/100 g 蛋白质(以牛奶中 3.2% 蛋白质含量计算),大大改善了检测方法的灵敏度。

### 2.2 超高效液相色谱法

超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)借助于 HPLC 的理论原理,因为能够承受更高的柱内极限压力和极低的系统体积,所以可以采用更小颗粒固定相的色谱柱,实现超低扩散体积,获得更好的分离度、灵敏度和分析速度。

为了提高糠氨酸的检测效率, SCHMIDT 等<sup>[54]</sup>使用 UPLC 使糠氨酸的保留时间缩短至 1.75 min,总上机时间缩短至 6 min,并且将 LOQ 从 HPLC 的 45 nmol/L 降至 0.46 nmol/L(约为 0.45 mg/100 g 蛋白质)。CHEN 等<sup>[58]</sup>使用 UPLC 检测牛奶中的糠氨酸,极大优化了样品的前处理步骤,并得到了 1.87 min 的保留时间和 6 min 的总测定时间,LOQ 达到了 0.025 mg/L(约为 0.075 mg/100 g 蛋白质)。

### 2.3 气相色谱法

气相色谱法(gas chromatography, GC)原理上与高效液相色谱法相似,但在进样时需要将样品高温瞬时气化,目标分子以气体形式在毛细管柱内通过极性不同产生分离,分别到达检测器响应。对于糠氨酸的测定来说,如果能找到合适的衍生化试剂,使糠氨酸转变为可气化的分子,将很大程度上降低噪声,提高检测的特异性和灵敏度。

BÜSER 等<sup>[24]</sup>和 KNECHT 等<sup>[28]</sup>分别提出了 GLC 方法和气质联用(gas chromatograph-mass spectrometry, GC-MS)方法检测糠氨酸,但是研究发现,在衍生化过程中糠氨酸会发生明显降解<sup>[64]</sup>。因此,气相色谱法目前尚不适用于糠氨酸的检测。

### 2.4 毛细管电泳法

毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)是一类以毛细管为分离通道和高压直流电场为驱动力的新型液相分离技术,它涉及电泳、色谱及其交叉领域,使分析化学得以从微升水平进入纳升水平。基于组分间淌度和

分配行为的差异,使游离糠氨酸与牛奶样品中的其他化合物分离,进入检测器响应,从而实现对试样的分析。

研究表明<sup>[38,43,51]</sup>,利用 CZE 连接 UV、PDA、MS/MS 可以检测食品中的糠氨酸。该方法具有速度快、成本低和自动化程度高等特点,但是其直径小导致光路短,并且电渗现象会造成测定液组成波动,因此灵敏度和分离重现性较差。

### 3 酸水解条件的研究

#### 3.1 盐酸浓度

研究表明,酸水解时的盐酸浓度对形成糠氨酸的产率有很大影响。MORENO 等<sup>[65]</sup>研究发现,当盐酸浓度  $\geq 6$  mol/L 时,才能彻底阻止美拉德反应,使糠氨酸充分游离出来。HENLE 等<sup>[30]</sup>发现水解液的盐酸浓度在 4~8 mol/L 时,糠氨酸的产率随着酸度上升,但在 8~11 mol/L 时产率相似。更多研究发现<sup>[41,35]</sup>,糠氨酸的产率随盐酸浓度持续上升,但盐酸浓度太高时则存在糠氨酸降解的可能。SERRANO 等<sup>[66]</sup>认为蛋白质与盐酸的比值可以表示盐酸的有效性,该比值越低,糠氨酸的产率越高,当比值确定时,盐酸浓度越高越好。为了减少水溶液样品由于自身稀释带来的与固体样品之间的差异,建议采用盐酸浓度为 10 mol/L。KRAUSE 等<sup>[67]</sup>认为糠氨酸前体物的比例对糠氨酸的产率有很大影响,同时随盐酸浓度上升,如 FL 生成糠氨酸的产率从 6 mol/L 盐酸时的 32% 上升到 8 mol/L 盐酸时的 46%。

综合诸多研究结果,当盐酸摩尔浓度  $>7.75$  mol/L 时,糠氨酸的产率是稳定可重复的<sup>[4]</sup>。因此,糠氨酸检测时的酸水解通常采用的方法为:取少量固体样品(约 20~100 mg)加入 8 mol/L 盐酸溶液,或者取 1~2 mL 的水溶液样品加入 3 倍体积的 10.6 mol/L 盐酸溶液,以保证水解液的实际盐酸浓度  $>7.75$  mol/L。

#### 3.2 水解温度与时间

温度决定着酸水解的反应速率,但尚无研究表明是否影响糠氨酸的最终产率。因为盐酸具有强挥发性,所以酸水解需要在密闭条件下进行,而盐酸的沸点在 110 °C 左右,如果继续升高温度,盐酸沸腾将极大提高密闭空间的气压,造成炸裂反应器的风险。因此,目前绝大多数的研究均采用 110 °C 进行酸水解 20~24 h。

#### 3.3 蒸汽水解

为了缩短酸水解的反应时间,提高糠氨酸的检测效率,研究人员做了诸多尝试。CEFALU 等<sup>[27]</sup>采用盐酸蒸汽的方式,在 90 min 内完成了酸水解过程。但该研究需要在酸水解前采集并纯化动物样本上的膜蛋白(10~50  $\mu\text{g}$ ),其操作烦琐且不稳定,并不适合食品的大量检测,并没有引

起足够的关注。

#### 3.4 微波水解

MARCONI 等<sup>[37,68]</sup>提出了使用微波水解的方案,利用微波炉的分段加热,将样品(意大利面、牛奶和奶酪)从 50 °C 加热至 150 °C,成功在 30 min 内完成了酸水解。微波加热是利用微波的穿透性对样品进行直接的热交换,通过诱导极性分子(如自由水)在相同频率下共振,造成分子间的碰撞和摩擦,使样品温度急剧升高,且不受物态变化的影响。相比传统酸水解的热传导的热交换方式,微波酸水解的热辐射更加高效与均匀,并且温度不受沸点的限制。但是盐酸在高温下迅速汽化造成密闭空间的内部高压,使反应器存在炸裂的风险,因此微波水解对反应器和微波炉有较高的要求。ACQUISTUCCI 等<sup>[33]</sup>很快对微波水解方法进行了优化,使用 CEM 微波消解仪在 30 min 内完成了谷物和奶制品的酸水解。GÖKMEN 等<sup>[47]</sup>更是在 150 °C 微波 10 min 即完成了热加工食品的水解。WANG 等<sup>[59]</sup>也使用 CEM 微波消解仪的脉冲加热在 160 °C, 40 min 完成了牛奶的水解,得到了较高且稳定的糠氨酸产率。然而,通过对比微波水解和传统水解的测定结果,发现微波水解得到的糠氨酸值略低,且在低浓度水平上误差较大,因此与传统水解方法的检测结果比较时需要进行数据校正。

### 4 展望

目前,奶及奶制品中检测糠氨酸的常见方法仍然是 HPLC-UV 方法,其存在的主要问题是方法灵敏度不足和耗时过长。针对这些问题,一些新技术的应用和新仪器的普及,使该检测技术有了更多的研究空间。首先,在 HPLC-UV 方法的基础上,UPLC 和 MS/MS 的使用将极大提高检测方法的灵敏度、准确度和效率。其次,传统的酸水解方式成为提高糠氨酸检测效率的最大瓶颈,而新的蛋白质水解技术或微波水解技术为解决这一问题提供了思路。现阶段针对奶及奶制品中糠氨酸的检测仍缺乏具有信服力的快速筛查技术,虽然已有基于表面荧光法的快速检测装置<sup>[69]</sup>,但多为糠氨酸的间接检测,不可控因素较多,适用性较差。另外,奶及奶制品中的糠氨酸含量通常以 mg/100 g 蛋白质来表示,而目前使用凯氏定氮法测定蛋白质的准确性、稳定性和效率均有待提高,因此新的蛋白质测定方法对糠氨酸检测技术的研究也至关重要。

综上所述,在 HPLC-UV 方法基础上,新的色谱系统或检测器的使用有助于提高糠氨酸检测方法的灵敏度和准确度,蛋白质的水解方法或测定方法则有助于提高检测方法的效率和稳定性。这都将成为奶及奶制品中糠氨酸检测技术的主要研究方向。

表1 糠氨酸检测方法的研究(1980—2020)  
Table 1 Research studies on determination of furosine (1980—2020)

年份	基质	样品量/(mg 或 mL)	盐酸用量/mL	盐酸摩尔浓度/(mol/L)	水解温度/°C	水解时间/h	色潜和检测器	运行时间/min	保留时间/min	参考文献
1981	血清	0.1 mL	10	6	95	18	HPLC-UV	14+	3-3.4	[21]
1983	储存食品	20 mg 蛋白质	10	6	110	20	HPLC-UV	10	5.9	[22]
1985	血液	0.5 mL	2	6	95	30	HPLC-UV	NG	4.1	[23]
1985	食品	200 mg 蛋白质	25	7.75	110	23	GLC-MS	50	39	[24]
1987	热加工牛奶	20 mL	100+30	7.8+12.5	NG	20	IEC	87	65	[25]
1987	血清	0.05 mL	0.5	6	95	18	HPLC-UV	15-20	5.1-17.5	[25]
1990	奶及奶制品	40~50 mg 蛋白质	8	8	110	23	HPLC-DAD	25	17.9	[26]
1991	医学样品	0.01~0.05 mg 蛋白质	1	6	蒸汽 110	1.5	HPLC-PAD	10	5.0	[27]
1991	尿液	1.5 mL	2.7	7.8	110	24	GC-MS	41	37.7	[28]
1992	牛奶	15~20 mg 蛋白质	3	6	110	24	HPLC-UV	14+	10.5	[29]
1995	奶及奶制品	40 mg 蛋白质	10	8	110	23	HPLC-UV	7+	5	[30]
1995	血清	0.25 mg 蛋白质	1	6	110	14	HPLC-UV	32	29	[31]
1995	禽蛋	250~400 mg	8	8	110	23	HPLC-UV	NG	NG	[14]
1995	奶制品	50 mg 蛋白质	8	8	110	23	CZE-UV	9.6+	6.5	[32]
1996	谷物和奶制品	60~140 mg 蛋白质 4 mL	16 12	8 10.6	微波 50→155	<0.5	HPLC-UV	31	NG	[33]
1996	奶酪	10 mg 蛋白质	30	6	110	23	HPLC-UV	NG	NG	[34]
1996	婴儿食用谷物	150 mg	4.5	10.6	110	24	HPLC-UV	15	8	[35]
1997	头发	0.1 mg	1	6	90	24	HPLC-MS/MS	4.3+	3.1	[36]
1997	意面、牛奶、奶酪	60~140 mg 4 mL	16 12	8 10.6	微波 50→155	<0.5	HPLC-UV	30+	22.5	[37]
1998	食品	200~300 mg 2 mL	8 6	8 10.6	110	23	CZE-UV	9	8.1	[38]
1998	番茄制品	2000 mg	6	10.6	110	23	HPLC-UV	NG	NG	[13]
2000	UHT 牛奶	1.5 mL	8	8	110	23	HPLC-DAD	20+	10.8	[39]
2000	热加工牛奶	50 mg 蛋白质	8	8	110	23	HPLC-DAD	45+	13.2	[40]
2003	蜂蜜	1000 mg	7.5	7.95	110	24	HPLC-UV	15+	7.0	[41]
2003	蜂蜜	500 mg	6	7.95	110	23	HPLC-MS	30+	22.6	[11]

表 1(续)

年份	基质	样品量/(mg 或 mL)	盐酸用量/mL	盐酸摩尔浓度/(mol/L)	水解温度/°C	水解时间/h	色谱和检测器	运行时间/min	保留时间/min	参考文献
2004	奶及奶制品	40~50 mg 2 mL	8	8	110	23	HPLC-UV	25	21.3	[42]
2005	早餐谷物	30 mg	4	7.95	110	23	CZE-PDA	3	2.6	[43]
2006	酸奶、奶酪	300 mg	8	8	110	23	HPLC-UV	7.5+	4.7	[44]
2007	早餐谷物	30 mg	4	7.95	110	23	HPLC-UV	10+	5.8	[45]
2007	运动补品	50 mg	8	7.95	110	23	HPLC-UV	10+	6.8	[46]
2009	热加工食品	1000 mg	10	8	微波 150	10 min	HPLC-UV	8	6.1	[47]
2010	ESL 牛奶	2 mL	6	10.6	110	23	HPLC-UV	22	7.5	[48]
2010	奶酪	150 mg	8	8	110	23	HPLC-UV	NG	NG	[49]
2011	饼干	400 mg	8	8	110	23	HPLC-UV	33	NG	[50]
2012	食品	100 mg	5	8	110	23	CZE-DAD CZE-MS/MS	NG	3.1	[51]
2013	人初乳	1 mL	3	10.6	110	24	HPLC-UV	30	NG	[52]
2015	食品	100 mg	4	6	110	20	HPLC-MS/MS	15+	7.9	[7]
2015	膨化小麦粒	400 mg	8	8	110	23	HPLC-DAD	NG	NG	[53]
2017	液态奶	2 mL	6	10.6	110	23	UHPLC-PDA	6	1.75	[54]
2017	意面	30~70 mg 蛋白质	8	8	110	23	HPLC-UV	NG	NG	[55]
2018	婴儿配方奶粉	0.25 mg	4	8	110	24	HPLC-UV	NG	NG	[56]
2019	意面	500 mg	8	8	110	23	HPLC-UV	25	NG	[57]
2020	牛奶	2 mL	6	10.6	110	12	UPLC-UV	6	1.87	[58]
2020	牛奶	2 mL	6	10.6	微波 160	40 min	UPLC-UV	8	1.94	[59]

注: + 至少; NG 未给出。

表2 不同仪器方法测定糠氨酸的比较  
Table 2 Comparison of different instruments for determination of furosine

仪器方法	定量限/(mg/100 g 蛋白质)	主要优点	主要缺点
1 HPLC-UV	3.0	(1)准确 (2)稳定	(1)灵敏度不足 (2)测定时间长
2 HPLC-MS HPLC-MS/MS	0.03 <sup>[7]</sup>	(1)灵敏	/
3 UHPLC-UV UPLC-UV	0.45 <sup>[54]</sup> 0.075 <sup>[58]</sup>	(1)灵敏 (2)测定时间短	/
4 GLC GC-MS	/	(1)灵敏	(1)不稳定(衍生化过程中糠氨酸降解) (2)前处理过程复杂
5 CZE	/	(1)测定时间短 (2)成本低	(1)灵敏度不足(光路短) (2)不稳定(电渗现象)

## 参考文献

- ERBERSDOBLER HF, ZUCKER H. Untersuchungen zum gehalt an lysin und verfügbarem lysin in trockenmagermilch [J]. *Milchwiss: Carl*, 1966, 21: 564–568.
- NOOSHKAM M, VARIDI M, BASHASH M. The maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems [J]. *Food Chem*, 2019, 275: 644–660.
- POOJARY MM, ZHANG W, GRECO I, *et al.* Liquid chromatography quadrupole-orbitrap mass spectrometry for the simultaneous analysis of advanced glycation end products and protein-derived cross-links in food and biological matrices [J]. *J Chromatogr*, 2020, 1615: 460767.
- ERBERSDOBLER HF, SOMOZA V. Forty years of furosine-forty years of using maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(4): 423–430.
- FINOT PA, BRICOUT J, VIANI R, *et al.* Identification of a new lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated milk [J]. *Experientia*, 1968, 24(11): 1097–1099.
- HEYNS K, HEUKESHOVEN J, BROSE KH. Der Abbau von fructose-aminosäuren zu N-(2-Furoylmethyl)aminosäuren. Zwischenprodukte von Bräunungsreaktionen [J]. *Angew Chem*, 1968, 80(15): 627–627.
- TROISE AD, FIORE A, WILTAFSKY M, *et al.* Quantification of N $\epsilon$ -(2-Furoylmethyl)-L-lysine (furosine), N $\epsilon$ -(Carboxymethyl)-L-lysine (CML), N $\epsilon$ -(Carboxyethyl)-L-lysine (CEL) and total lysine through stable isotope dilution assay and tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2015, 188: 357–364.
- TROISE AD, WILTAFSKY M, FOGLIANO V, *et al.* The quantification of free amadori compounds and amino acids allows to model the bound maillard reaction products formation in soybean products [J]. *Food Chem*, 2018, 247(MAY1): 29.
- HOFMANN T, ENGLING AC, MARTENS S, *et al.* Quantification of maillard reaction products in animal feed [J]. *Eur Food Res Technol*, 2020, 246(1): 253–256.
- CLAEYS WL, LOEY AMV, HENDRICKX M. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2002, 13(9): 293–311.
- SANZ ML, DEL CASTILLO MD, CORZO N, *et al.* 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(15): 4278–4283.
- VILLAMIEL M, CASTILLO MD, CORZO N, *et al.* Presence of furosine in honeys [J]. *J Sci Food Agric*, 2001, 81(8): 790–793.
- HIDALGO A, ROSSI M, POMPEI C. Estimation of equivalent egg age through furosine analysis [J]. *Food Chem*, 2006, 94(4): 608–612.
- HIDALGO A, ROSSI M, POMPEI C. Furosine as a freshness parameter of shell eggs [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(6): 1673–1677.
- RESMINI P, PELLEGRINO L, CATTANEO S. Furosine and other heat-treatment indicators for detecting fraud in milk and milk products [J]. *Ital J Food Sci*, 2003, 15(4): 473–484.
- PELLEGRINO L, DE NONI I, RESMINI P. Coupling of lactulose and furosine indices for quality evaluation of sterilized milk [J]. *Int Dairy J*, 1995, 5(7): 647–659.
- CLAWINRADECKER I, SCHLIMME E. Determination of furosine in pasteurised milk by use of ion-pair reversed-phase liquid chromatography [J]. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 1995, 47(2): 169–175.
- SCHLIMME E, CLAWIN-RÄUML I, DECKER, *et al.* Studies on distinguishing features for evaluating heat treatment of milk [J]. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 1996, 48(1): 5–36.
- MiRAAF [Ministro delle Politiche Agricole e Forestali]. Decreto Ministeriale DM 15, 12, 2000. Fissazione dei valori massimi di furosina nei formaggi freschi a pasta filata e nel latte (crudo e pastorizzato perossidasi-positivo). *Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana* 31, February 7, 2001 [Z].
- 王加启, 郑楠, 李松励, 等. 优质乳工程: 理论与实践[J]. *中国乳业*, 2016, (10): 2–9.  
WANG JQ, ZHENG N, LI SL, *et al.* Premium milk program in China: theory and practice [J]. *China Dairy*, 2016, (10): 2–9.
- SCHLEICHER E, WIELAND OH. Specific quantitation by HPLC of protein (lysine) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins [J]. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1981, 19(2): 81.
- CHIANG GH. A simple and rapid high-performance liquid chromatographic procedure for determination of furosine, a

- lysine-reducing sugar derivative [J]. *J Agric Food Chem*, 1983, 31(6): 1373–1374.
- [23] OIMOMI M, NISHIMOTO S, MATSUMOTO S, *et al.* A specific method of glycosylated hemoglobin using furosine measurement [J]. *Diabetes Res Clin Pr*, 1985, 1(4): 193–195.
- [24] BÜSER W, ERBERSDOBLER HF. Determination of furosine by gas-liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1985, 346: 363–368.
- [25] DREXEL H, KLOCKER H, PATSCH JR, *et al.* Measurement of glycated protein by a rapid and specific method for absolute quantification of lysine-bound glucose [J]. *Clin Chem*, 1987, (9): 9.
- [26] RESMINI P, PELLEGRINO L, BATTELLI G. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method [J]. *Ital J Food Sci*, 1990, 2(3): 173–183.
- [27] CEFALU WT, BELL-FARROW A, WANG ZQ, *et al.* Determination of furosine in biomedical samples employing an improved hydrolysis and high-performance liquid chromatographic technique [J]. *Carbohydr Res*, 1991, 215(1): 117–125.
- [28] KNECHT KJ, DUNN JA, MCFARLAND KF, *et al.* Effect of diabetes and aging on carboxy methyl lysine levels in human urine [J]. *Diabetes*, 1991, 40(2): 190–196.
- [29] DELGADO T, CORZO N, SANTA-MARÍA G, *et al.* Determination of furosine in milk samples by ion-pair reversed phase liquid chromatography [J]. *Chromatographia*, 1992, 33(7-8): 374–376.
- [30] HENLE T, ZEHETNER G, KLOSTERMEYER H. Fast and sensitive determination of furosine [J]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1995, 200(3): 235–237.
- [31] YU CW, MONNIER V, FRIEDLANDER M. Reliable determination of furosine in human serum and dialysate proteins by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 1995, 667(2): 328–332.
- [32] TIRELLI A, PELLEGRINO L. Determination of furosine in dairy products by capillary zone electrophoresis: A comparison with the HPLC method [J]. *Ital J Food Sci*, 1995, 7(4): 379–385.
- [33] ACQUISTUCCI R, PANFILI G, MARCONI E. Application of the microwave hydrolysis to furosine determination in cereal and dairy foods [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(12): 3855–3857.
- [34] PELLEGRINO L, RESMINI P, DE NI, *et al.* Sensitive determination of lysinoalanine for distinguishing natural from imitation mozzarella cheese [J]. *J Dairy Sci*, 1996, 79(5): 725–734.
- [35] GUERRAHERNANDEZ E, CORZO N. Furosine determination in baby cereals by ion-pair reversed-phased liquid chromatography [J]. *Cereal Chem*, 1996, 73(6): 729–731.
- [36] TAKEMURA A, MURAMATSU S, KOBAYASHI N, *et al.* Determination of furosine in hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 1997, 11(1): 61–62.
- [37] MARCONI E, PANFILI G, ACQUISTUCCI R. Microwave hydrolysis for the rapid analysis of furosine in foods [J]. *Ital J Food Sci*, 1997, 9(1): 47–55.
- [38] TIRELLI A. Improved method for the determination of furosine in food by capillary electrophoresis [J]. *J Food Prot*, 1998, 61(10): 1400.
- [39] FERRER E, ALEGRIA A, COURTOIS G, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of mailard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 881(1-2): 599–606.
- [40] NICOLETTI I, COGLIANDRO E, CORRADINI C, *et al.* Determination of furosine in hydrolyzate of processed milk by HPLC using a narrow bore column and diode-array detector [J]. *J Liq Chromatogr RT*, 2000, 23(5): 717–726.
- [41] CÁRDENAS-RUIZ J, GARCÍA-VILLANOVA B, GUERRA-HERNÁNDEZ E. Determination of furosine in honey [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2003, 26(2): 317–326.
- [42] ISO 18329/IDF 193. Milk and milk products-Determination of furosine content-Ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography method [S]. 2004.
- [43] DELGADO-ANDRADE C, RUFIÁN-HENARES JA, MORALES FJ. Fast method to determine furosine in breakfast cereals by capillary zone electrophoresis [J]. *Eur Food Res Technol*, 2005, 221(5): 707–711.
- [44] TOKUŞOĞLU Ö, AKALIN AS, UNAL K. Rapid high performance liquid chromatographic detection of furosine ( $\epsilon$ -N-2-Furoylmethyl-L-Lysine) in yogurt and cheese marketed in turkey [J]. *J Food Qual*, 2006, 29(1): 38–46.
- [45] DELGADO-ANDRADE C, RUFIÁN-HENARES JA, MORALES FJ. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals [J]. *Food Chem*, 2007, 100(2): 725–731.
- [46] RUFIÁN-HENARES JA, DELGADO-ANDRADE C, JIMÉNEZ-PÉREZ S, *et al.* Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine [J]. *Food Chem*, 2007, 101(2): 573–578.
- [47] GÖKMEN V, SERPEN A, MORALES F. Determination of furosine in thermally processed foods by hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 2009, 92: 1460–1463.
- [48] MAYER HK, RABA B, MEIER J, *et al.* RP-HPLC analysis of furosine and acid-soluble  $\beta$ -lactoglobulin to assess the heat load of extended shelf life milk samples in Austria [J]. *Dairy Sci Technol*, 2010, 90(4): 429–429.
- [49] PELLEGRINO L, CATTANEO S, MASOTTI F, *et al.* Detection of milk powder and caseinates in Halloumi cheese [J]. *J Dairy Sci*, 2010, 93(8): 3453–3460.
- [50] HIDALGO A, BRANDOLINI A. Evaluation of heat damage, sugars, amylases and colour in breads from einkorn, durum and bread wheat flours [J]. *J Cereal Sci*, 2011, 54(1): 90–97.
- [51] BIGNARDI C, CAVAZZA A, CORRADINI C. Determination of furosine in food products by capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(15): 2382–2389.
- [52] ESPINOSA-MARTOS I, MONTILLA A, DE SEGURA AG, *et al.* Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after holder pasteurisation [J]. *J Pediatr Gastr Nutr*, 2013, 56(5): 560–568.
- [53] CATTANEO S, HIDALGO A, MASOTTI F, *et al.* Heat damage and in vitro starch digestibility of puffed wheat kernels [J]. *Food Chem*, 2015, 188(1): 286–293.
- [54] SCHMIDT A, BOITZ LI, MAYER HK. A new UHPLC method for the quantitation of furosine as heat load indicator in commercial liquid milk [J]. *J Food Compos Anal*, 2017, 56: 104–109.
- [55] VERARDO V, RICIPUTI Y, MESSIA MC, *et al.* Influence of drying temperatures on the quality of pasta formulated with different egg products [J]. *Eur Food Res Technol*, 2017, 243(5): 817–825.
- [56] SABATER C, MONTILLA A, OVEJERO A, *et al.* Furosine and HMF determination in prebiotic-supplemented infant formula from Spanish



- market [J]. *J Food Compos Anal*, 2018, 66: 65–73.
- [57] GAGGIOTTI S, SHKEMBI B, SACCHETTI G, *et al.* Study on volatile markers of pasta quality using GC-MS and a peptide based gas sensor array [J]. *LWT*, 2019, 114: 108364.
- [58] CHEN M, CHEN C, WANG F, *et al.* A rapid UPLC method with optimized sample preparation procedures for determination of furosine in milk [J]. *J Food Compos Anal*, 2020: 103571.
- [59] WANG F, ZHANG Y, WEN F, *et al.* Rapid determination of furosine in milk using microwave-assisted HCl hydrolysis and ultra-performance liquid chromatography [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(12): 11086–11093.
- [60] ESCUDER-VIECO D, ESPINOSA-MARTOS I, RODRÍGUEZ JM, *et al.* High-temperature short-time pasteurization system for donor milk in a human milk bank setting [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 926.
- [61] HIDALGO A, POMPEI C, ZAMBUTO R. Heat damage evaluation during tomato products processing [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(10): 4387–4390.
- [62] HIDALGO A, DI PRIMA R, FONGARO L, *et al.* Tocols, carotenoids, heat damage and technological quality of diced tomatoes processed in different industrial lines [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2017, 83: 254–261.
- [63] HIDALGO A, BRANDOLINI A. Heat damage of water biscuits from einkorn, durum and bread wheat flours [J]. *Food Chem*, 2011, 128(2): 471–478.
- [64] RUTTKAT A, ERBERSDOBLER HF. Degradation of furosine during heptafluorobutyric anhydride derivatization for gas chromatographic determination [J]. *J Chromatogr A*, 1994, 678(1): 103–107.
- [65] MORENO FJ, MOLINA E, OLANO A, *et al.* High-pressure effects on maillard reaction between glucose and lysine [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(2): 394–400.
- [66] SERRANO MA, CASTILLO G, MUNOZ MM, *et al.* Influence of hydrolysis, purification, and calibration method on furosine determination using ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr Sci*, 2002, 40(2): 87–91.
- [67] KRAUSE R, KNOLL K, HENLE T. Studies on the formation of furosine and pyridosine during acid hydrolysis of different Amadori products of lysine [J]. *Eur Food Res Technol*, 2003, 216(4): 277–283.
- [68] MARCONI E, MASTROCOLA L, PANFILI G. Improvement of microwave hydrolysis for fast analysis of furosine in milk and dairy products [J]. *Scienza E Tecnica Lattiero Casearia*, 1999.
- [69] 陈冲冲, 郑楠, 文芳, 等. 牛奶中糠氨酸检测方法的研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(4): 25–29.
- CHEN CC, ZHENG N, WEN F, *et al.* Research progress on detection method of furosine in milk [J]. *China Dairy Ind*, 2017, 45(4): 25–29.

(责任编辑: 张晓寒)

### 作者简介



王峰恩, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全评价与检测技术。  
E-mail: wfe8520382@163.com



王加启, 博士, 研究员, 主要研究方向为反刍动物营养与牛奶质量改良。  
E-mail: jiaqi wang@vip.163.com