

# 高效液相色谱柱后衍生方法测定 乳制品中皮革水解蛋白

No.LC-029

**摘要：** 本文使用岛津氨基酸柱后衍生系统锂型分析柱建立了24种氨基酸的高效液相色谱柱后衍生分析方法。5个不同浓度标准品进样(10, 50, 100, 250, 1000ug/L)，对于大多数目标物校准曲线相关系数可达0.9999；对于L(-)-羟脯氨酸,方法的检测限(S/N=3.3)为20 ug/L，定量限(S/N=10)为50 ug/L。连续7针进样(250ug/L, 10uL)保留时间相对标准偏差为0.01-1.38%，峰面积相对标准偏差为0.01-0.83%。市售某两种品牌牛奶样品检测结果表明均含有L-羟脯氨酸，为皮革水解蛋白阳性样品。

皮革水解蛋白是从动物皮毛中水解出的物质，能增加食品中氨基酸的含量，但皮革水解物含有危害人体健康的重金属六价铬，不能用于食品加工。如果被人体吸收的话，可能导致中毒、关节肿大、关节疏松肿大。国家卫生部最新印发了《食品中可能违法添加的非食用物质名单（第二批）》，明令禁止在乳及乳制品中添加皮革水解蛋白。皮革水解蛋白与三聚氰胺不同，是真正的蛋白质，若添加到食品当中，检测起来难度更大。因L(-)-羟脯氨酸为胶原蛋白中的特有组分，其含量占胶原蛋白10%以上；而乳蛋白中不含有此成分，如若样品中含有L(-)-羟脯氨酸，可判定添加了动物水解蛋白。本文使用岛津氨基酸柱后衍生系统锂型分析柱建立了包括L(-)-羟脯氨酸的24种氨基酸高效液相色谱柱后衍生分析方法，供相关检测人员参考。

**关键词：** 皮革水解蛋白 乳制品 高效液相色谱 柱后衍生

## 原理

柱后衍生系统是欧洲药典收录的氨基酸分析方法。与柱前衍生相比，柱后衍生方法允许样品中残留少量缓冲溶液，不易受基质干扰，适用范围更广泛，尤其适用于生物样品分析，衍生反应及色谱检测全自动完成，同时还具有定量、重现性优异等优点。目前，氨基酸柱后衍生主要有茚三酮衍生化法和邻苯二甲醛（OPA）衍生化法两种。前者用紫外检测器测定，后者用荧光检测器测定，检出限可达ppb级。邻苯二甲醛（OPA）衍生化法按照分析柱的不同分为钠型分析系统和锂型分析系统。锂型分析系统对生物样品和食品分析具有更好的选择性，常用来分析血浆、植物提取物、代谢中间体、生物碱、药物等。

氨基酸样品经锂型阳离子交换色谱柱分离后，氨基酸链端的一级氨基团与邻苯二甲醛（OPA）和N-Acetyl-L-cysteine反应生成一种带荧光基团的产物，可用荧光检测器定量。N-Acetyl-L-cysteine较以往使用的2-巯基乙醇(MERC)而言，没有恶臭，配制方便，同时提高了方法的灵敏度。

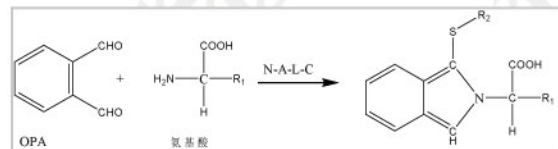


图1 氨基酸柱后衍生检测原理

## 试剂与仪器

标准品：24种氨基酸混标，购于Sigma-Aldrich公司。试剂：纯水，Milli-Q超纯水仪制备得到；柠檬酸锂、高氯酸、溴酸、氢氧化锂，AR；N-Acetyl-L-cysteine、Brij-35、邻苯二甲醛(OPA)，购自Sigma-Aldrich；流动相MA：0.15N 柠檬酸锂和7% methyl cellosolve用高氯酸调节pH到2.6；流动相MB：0.30N柠檬酸锂和0.20M 溴酸用4M氢氧化锂调节pH到10.0；流动相MC：0.20M 氢氧化锂；反应液RA：0.4 μL/mL sodium hypochlorite 用碳酸-溴酸缓冲溶液调至pH10.0；反应液RB：0.08% OPA、1.40% 乙醇、0.04% Brij-35和0.10% N-Acetyl-L-cysteine用碳酸-溴酸缓冲溶液调至pH 10.0。以上试剂使用当天配制。所有试剂和样品需用0.45 μm以下滤膜过滤。

仪器：Shimadzu 20A氨基酸柱后衍生系统。具体配置为：LC-20AD×2(衍生剂输液泵)，LC-20AB(梯度洗脱输液泵)，SIL-20AC(自动进样器)，CTO-20AC(柱温箱)，RF-10AXL(荧光检测器)，CBM-20A(控制器)，DGU-20A5(在线脱气机)，FCV-11AL(流路选择阀)。工作站LCSolution。

## ■ 色谱条件

色谱柱：锂型氨基酸专用分析柱：Shimadzu Shim-Pack AMINO-Li (6.0 mmID x 100 mmL)；锂型捕氨柱Shimadzu Shim-Pack ISC-30 Li (4.0 mmID x 50 mmL)。

流动相流速：0.6mL/min；反应液流速：0.2 mL/min；柱温：39℃；进样量：10 μL；波长：Ex=350nm, Em=450nm。

梯度洗脱程序如表1所示：

表1流动相梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Action	Value
16.00	Pumps	Pump A B.Conc	0
18.00	Pumps	Pump A B.Conc	1
22.50	Pumps	Pump A B.Conc	1
22.51	Pumps	Pump A B.Conc	4
22.51	Pumps	Pump A B.Curve	4
50.00	Pumps	Pump A B.Conc	6
50.01	Pumps	Pump A B.Conc	9
64.00	Pumps	Pump A B.Conc	9
64.00	Pumps	Pump A B.Curve	-1
79.00	Pumps	Pump A B.Conc	34
86.00	Pumps	Pump A B.Conc	34
86.01	Pumps	Pump A B.Conc	44
105.00	Pumps	Pump A B.Conc	51
105.01	Pumps	Pump A B.Conc	61
109.00	Pumps	Pump A B.Conc	68
109.01	Pumps	Pump A B.Conc	100
133.00	Pumps	SV(Pump A)	B-A-A
137.70	Pumps	Pump A B.Conc	100
137.71	Pumps	Pump A B.Conc	0
142.70	Pumps	SV(Pump A)	A-A-A
180.00	Controller	Stop	0

## ■ 实验方法

氨基酸混标用流动相MA稀释配制成10, 50, 100, 250和1000ug/L的溶液。某两种品牌牛奶样品经提取、水解、过滤后待测。

## ■ 结果与讨论

### 1. 标样色谱图

图2为10 μg/L的标样溶液10 μL进样的荧光图谱，与标准图谱相对照，可以确定24种氨基酸出峰顺序如下。

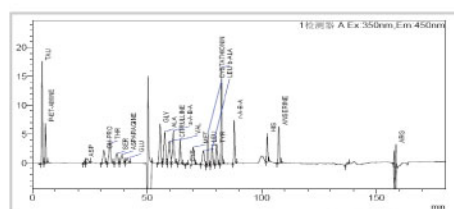


图2：24种氨基酸混标色谱图(10 μg/L)

图3为1000 μg/L的标样溶液10 μL进样的荧光图谱，与10 μg/L的标样溶液出峰时间完全一致。

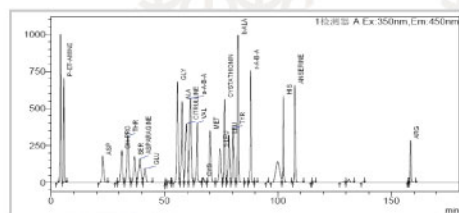


图3：24种氨基酸混标色谱图(1000 μg/L)

### 2. 校准曲线

五点外标法得到L(-)-羟脯氨酸(OH-PRO)的校准曲线如图4所示：

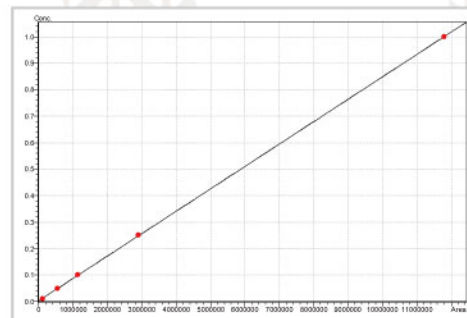


图4：L(-)-羟脯氨酸校准曲线(10, 50, 100, 250,和1000 μg/L)

L(-)-羟脯氨酸校准曲线相关系数 $R^2 = 0.99999$ ，检测限( $S/N=3.3$ )为20 μg/L，定量限( $S/N=10$ )为50 μg/L。其他样品信息参见表2。

表2氨基酸混标校准曲线及检测限

ID	氨基酸	校准曲线	R2	LOD (ug/L)
1	TAU	$Y = (2.42294e-008)X + (0.00154695)$	0.99990	10
2	P-ET-AMINE	$Y = (5.54679e-008)X + (-0.000140864)$	0.99996	10
3	ASP	$Y = (9.92064e-008)X + (0.0085046)$	0.99998	20
4	OH-PRO	$Y = (8.44876e-008)X + (0.0031468)$	0.99998	20
5	THR	$Y = (5.69129e-008)X + (0.00203987)$	0.99999	10
6	SER	$Y = (9.18671e-008)X + (0.00444937)$	0.99998	20
7	ASPARAGINE	$Y = (8.50114e-008)X + (0.00246175)$	0.99999	20
8	GLU	$Y = (1.51e-007)X + (0.00812799)$	0.99987	40
9	GLY	$Y = (3.40829e-008)X + (0.00188337)$	0.99999	10
10	ALA	$Y = (3.8559e-008)X + (0.00194875)$	0.99999	10
11	CITRULLINE	$Y = (4.3273e-008)X + (0.00463618)$	0.99996	10
12	a-A-B-A	$Y = (3.23871e-008)X + (0.00184372)$	0.99999	10
13	VAL	$Y = (6.8192e-008)X + (0.00408964)$	0.99997	10
14	CYS	$Y = (7.53967e-007)X + (0.0179881)$	0.99917	12
15	MET	$Y = (5.63628e-008)X + (0.00734179)$	0.99989	10
16	l-LEU	$Y = (6.94951e-008)X + (0.00222307)$	0.99998	20
17	CYSTATHIONIN	$Y = (5.27642e-008)X + (0.00248737)$	0.99999	10
18	LEU	$Y = (7.73811e-008)X + (0.00313457)$	0.99999	10
19	TYR	$Y = (6.62942e-008)X + (0.00285258)$	0.99999	10
20	b-ALA	$Y = (2.9632e-008)X + (-0.0233193)$	0.99584	10
21	r-A-B-A	$Y = (4.63751e-008)X + (0.00120445)$	0.99999	10
22	HIS	$Y = (5.88388e-008)X + (0.00347516)$	0.99999	10
23	ANSERINE	$Y = (4.37727e-008)X + (0.00236786)$	0.99999	10
24	ARG	$Y = (1.28958e-007)X + (-0.0175855)$	0.99966	10

### 3. 重现性

用250 µg/L标准品进样7次后，保留时间及峰面积重现性结果如表3所示：

表3 七针标准品(250 µg/L)重现性数据

氨基酸	RT (min)	RT %RSD	Area %RSD
TAU	4.2	1.08	0.06
P-ET-AMINE	5.6	0.13	0.05
ASP	23.0	1.13	0.83
OH-PRO	31.0	1.15	0.19
THR	33.7	0.18	0.18
SER	36.7	1.38	0.13
ASPARAGINE	39.0	0.09	0.09
GLU	41.3	0.06	0.06
GLY	55.7	0.11	0.09
ALA	57.7	0.11	0.08
CITRULLINE	59.6	0.11	0.10
a-A-B-A	61.4	0.09	0.07
VAL	64.4	0.02	0.01
CYS	67.1	0.03	0.02
MET	70.1	0.04	0.01
l-LEU	74.5	0.04	0.01
CYSTATHIONIN	76.5	0.02	0.01
LEU	78.3	0.04	0.01
TYR	80.3	0.02	0.01
b-ALA	82.3	0.08	0.01
r-A-B-A	88.0	0.01	0.01
HIS	102.4	0.03	0.02
ANSERINE	107.4	0.01	0.01
ARG	158.4	0.02	0.01

### 4. 实际样品分析

采用氨基酸柱后衍生系统测定了两种市售牛奶样品，对其中所含的氨基酸进行定量定性分析，两份样品均检出L(-)-羟脯氨酸。色谱图见图5和图6，样品分析数据见表4。

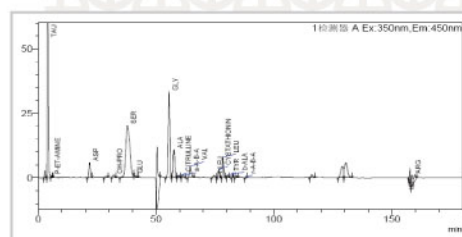


图5 一号牛奶样品色谱图

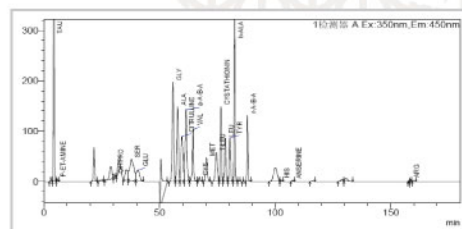


图6 二号牛奶样品色谱图

表4 市售某两种品牌牛奶中氨基酸定量分析结果

ID	缩写	名称	1号样品 ( $\mu\text{g/mL}$ )	2号样品 ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	TAU	牛黄酸	0.15	0.64
2	P-ET-AMINE	2-氨基-磷酸二氢	ND	0.013
3	ASP	天冬氨酸	0.020	ND
4	OH-PRO	L-羟脯氨酸	0.038	0.15
5	THR	苏氨酸	ND	ND
6	SER	丝氨酸	0.23	0.48
7	ASPARAGINE	天冬酰胺	ND	ND
8	GLU	谷氨酸	0.0071	0.30
9	GLY	氨基乙酸(甘氨酸)	0.069	0.40
10	ALA	丙氨酸	0.029	0.37
11	CITRULLINE	瓜氨酸	0.0072	0.27
12	$\alpha$ -A-B-A	2-氨基丁酸	0.0052	0.39
13	VAL	缬氨酸	0.0082	0.11
14	CYS	半胱氨酸	ND	0.23
15	MET	蛋氨酸(甲硫氨酸)	ND	0.13
16	I-LEU	异亮氨酸	0.0043	0.19
17	CYSTATHIONIN	胱氨酸	0.0071	0.23
18	LEU	亮氨酸	0.018	0.23
19	TYR	酪氨酸	0.0033	0.15
20	b-ALA	$\beta$ -丙氨酸	ND	0.52
21	r-A-B-A	4-氨基丁酸	0.0015	0.20
22	HIS	组氨酸	ND	0.0085
23	ANSERINE	肌肽	ND	0.0062
24	ARG	精氨酸	0.0038	0.0040

## 结论

本文采用岛津氨基酸柱后衍生系统锂型分析柱建立了牛奶制品中24种氨基酸的高效液相色谱柱后衍生分析方法，该方法柱后衍生及样品测定为全自动完成，消除了柱前衍生不同操作人员引入的人为误差，大大简化了样品前处理步骤，节约了时间，是一种可靠快速的检测方法。本方法可以直接用于检测牛奶中24种氨基酸。推荐使用岛津生产的高质量流动相及反应试剂，在降低基线波动的同时提高了灵敏度。也可以自行配制衍生试剂，要注意配制衍生试剂所用的各种试剂尽可能纯度高，否则基线波动大。本法可给从事乳制品中皮革水解蛋白非法添加检测的人员做参考。

## 参考文献：

- [1]. 国家卫生部《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》