

## 综述

## 食品及生物样品中 L-羟脯氨酸检测技术研究进展

朱爱玲<sup>1,2</sup>,彭涛<sup>2</sup>,邹大维<sup>3</sup>,胡婷<sup>1</sup>,周玥宁<sup>4</sup>,江海洋<sup>1</sup>,王金花<sup>5</sup>

(1. 中国农业大学动物医学院,北京 100193; 2. 中国检验检疫科学研究院,北京 100123;  
3. 贵州省黔东南州质量技术监督检测所,贵州 凯里 556000; 4. 山西大学化学化工学院,  
山西 太原 030006; 5. 北京市检验检疫科学技术研究院,北京 100026)

**摘要:** L-羟脯氨酸(L-hydroxyproline, Hyp)是动物水解蛋白的特征物质,而动物水解蛋白是可能被违法添加于食品中尤其是乳与乳制品中的非食用物质之一,Hyp可作为判定食品中是否掺入动物水解蛋白的重要指标。建立快速、高效地Hyp检测方法,提高其检测灵敏度和回收率,是食品质量安全监控的重要任务。本文就食品及生物样品中L-羟脯氨酸的提取净化、衍生化及测定方法研究进展进行了综述。

**关键词:** L-羟脯氨酸; 动物水解蛋白; 检测; 食品安全; 生物样品

**中图分类号:** Q517 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2012)05-0493-07

### Development of analytical methods for L-hydroxyproline in foods and biological samples

Zhu Ailing, Peng Tao, Zou Dawei, Hu Ting, Zhou Yuening, Jiang Haiyang, Wang Jinhua  
(College of Veterinary Medicine of China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** L-Hydroxyproline (Hyp) is a typical amino acid in hydrolyzed animal protein, which is a non-edible substance illegally added in food especially in milk and milk products. Therefore, Hyp could be used as an important indicator for food adulteration of animal protein hydrolysates. It is important for food safety and quality monitoring to develop a fast, efficient and sensitive method for hydroxyproline detection. This article reviewed the extraction, cleanup, derivation and determination methods of L-hydroxyproline in foods and biological samples.

**Key words:** L-Hydroxyproline; hydrolyzed animal protein; determination; food safety; biological samples

近年来,一些不法商家利用鱼皮、鱼鳞、猪皮、牛皮及骨头等生产水解蛋白,添加到乳及乳制品中,以增加蛋白质含量。在用皮革下脚料生产水解蛋白时,重铬酸钾等有毒物质会被带入产品中,长期食用将严重影响消费者健康。2009年我国卫生部公布了《食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)》<sup>[1]</sup>,明令禁止在乳与乳制品及含乳饮料中添加皮革水解物;2011年,农业部下发的《2011年全国生鲜乳质量安全监测计划》和《农业部生鲜乳质量安全监测工作规范》两个文件中,也将皮革水解蛋白列为监控项目<sup>[2]</sup>。L-羟脯氨酸(L-hydroxyproline, Hyp)不属于常见的20种氨基酸,多

存在于动物胶和骨胶原中,是动物水解蛋白的特征物质,可以作为判断乳及乳制品是否含有动物水解蛋白的依据。

目前,国内外关于食品及生物样品中Hyp的检测方法报道较多,主要有分光光度分析法<sup>[3-5]</sup>、氨基酸自动分析仪测定法<sup>[6-9]</sup>、高效液相色谱法<sup>[10-13]</sup>、高效液相色谱-质谱联用法<sup>[14-20]</sup>、毛细管电泳法<sup>[21-23]</sup>、气相色谱及气相色谱-质谱联用法<sup>[24-26]</sup>等。本文主要从Hyp的提取净化、衍生化和测定三个方面对Hyp的分析技术进行综述,为食品中Hyp的检测提供技术参考。

## 1 提取与净化方法

### 1.1 水解和提取

Hyp通常以蛋白的形式存在于样品中,首先需要进行水解,解离为游离态Hyp后才能测定。Hyp属于两性物质,在酸、碱性环境下性质均较稳定,酸解法、碱解法和酶解法均可用于蛋白中Hyp的水解,而酸解法最为常用。

酸解法是在氮气和高温下,用强酸水解待测样

收稿日期:2012-05-31

基金项目:国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD23B05, 2012BAD33B02);国家质检公益性行业科研(201210016)

作者简介:朱爱玲 女 研究生 研究方向为兽药残留分析

E-mail:lsalzhu@163.com

通信作者:彭涛 男 博士 副研究员 研究方向为食品安全

E-mail:caiq\_pengtao@126.com

江海洋 男 博士 副教授 研究方向为兽医药理学与毒理学研究 E-mail:haiyang@cau.edu.cn

品,经 NaOH 中和或用水稀释后,再进行检测。常用的酸有 6 mol/L 的盐酸溶液(含 0.5% 的苯酚)和 3 mol/L 的硫酸。周彦刚等<sup>[3]</sup>采用 6 mol/L 盐酸在真空、115 °C 条件下水解鱼皮胶原蛋白 24 h,调 pH 至 8.0 后检测,加标回收率在 93% ~ 103% 之间。结果表明,真空密闭下,水解温度和时间容易掌控,水解液不会蒸发损失,水解彻底,重复性好。赵燕燕等<sup>[27]</sup>将 6 mol/L 盐酸加入装有液态奶的水解管,充氮、110 °C 下水解 6 h,经高效液相色谱分析,平均回收率为 99.83%。陈楠瑜等<sup>[4]</sup>采用 3 mol/L 硫酸于 105 °C 下水解乳制品 16 h,用水稀释后分析,Hyp 的平均回收率为 88.9%。丁毅等<sup>[28]</sup>将 3 mol/L 硫酸与奶粉混匀,放入微波炉中反应 4 ~ 8 min,趁热过滤并用水稀释定容,比色法测定,Hyp 加标回收率在 90% ~ 105% 之间。这种微波辅助水解快速测定方法大幅缩短了样品前处理时间。

碱解法一般采用 2 mol/L NaOH 在 120 °C 水解 20 min 到 3.5 h。Hofman 等<sup>[5]</sup>对碱解法水解胶原蛋白的时间进行了研究。结果表明,水解 3 h 时,游离 Hyp 的含量最高。水解时间对 Hyp 的回收率影响较大,时间短,水解不完全;过长则易使 Hyp 分解。碱解法虽不如酸解法彻底,但是用时短,无需中和,操作较易控制。

酶解法条件较易控制,水解时间适中,且不会造成 Hyp 分解,其关键是选择合适的酶、pH 值和温度。赵善贞等<sup>[20]</sup>在 100 mmol/L 甲酸铵缓冲液中,用猪胰蛋白酶在 50 °C 下水解乳及乳制品 3 h,采用 LC-MS/MS 测定 Hyp,方法回收率为 73.4% ~ 114.2%,相对标准偏差(RSD)为 2.5% ~ 14.4%,结果表明,酶解产物对质谱信号抑制作用小。徐铮等<sup>[29]</sup>报道了用 0.5% 胃蛋白酶和 6 mol/L 盐酸依次水解鼠肝组织中 Hyp 的方法,分别测得 Hyp 的含量为(3.927 ± 0.394)和(0.778 ± 0.474) mg/L。结果表明,在酸性条件下,胃蛋白酶活性增强,水解速率加快。

## 1.2 净化

分析样品的组成通常较为复杂,为减少杂质影响,增加定性定量的准确度,常需要进一步净化。目前,Hyp 分析中的净化手段主要有溶液沉淀、冷冻干燥和固相萃取等。

食品及生物样品中常含有大量的蛋白质、色素等生物大分子,而 Hyp 属于强极性水溶性氨基酸,可用乙腈、乙醇、醋酸锌等生物大分子变性溶液进行沉降处理,达到提取净化目的。卞婧<sup>[30]</sup>、夏莉<sup>[31]</sup>等直接用乙腈提取净化血清和尿液中的游离 Hyp,避免了蛋白质等生物大分子不可逆地吸附在色谱

柱上,干扰 Hyp 分离,其回收率分别为 100.46% ~ 106.08% 和 96.5% ~ 99.0%。胡华等<sup>[10]</sup>对掺假酱油采用不经水解直接用乙醇提取,去除样品中的色素等干扰物质,Hyp 加标回收率为 97.19% ~ 110.18%。赵天珍等<sup>[32]</sup>以 219 g/L 醋酸锌溶液和 106 g/L 亚铁氰化钾溶液为蛋白沉淀剂处理样品,建立了奶粉和含乳饮料中游离 Hyp 的快速比色测定方法,回收率为 91% ~ 96%,RSD 为 2.6% ~ 4.9%。Sormiachi 等<sup>[33]</sup>用 6 mol/L 盐酸溶液酸解鼠肝细胞,邻苯二甲醛衍生处理后,用乙酸乙酯去除样品中的影响 Hyp 分离的干扰物质,提高 HPLC 检测 Hyp 的灵敏度,缩短分析时间,并减少了杂峰的干扰。

冷冻干燥技术也开始应用于 Hyp 的净化。基本操作为:低温下冻干样品水解液至粉末,再用溶剂复溶后检测。该方法操作简单,损失较小,特别有利于水解液的浓缩和溶剂体系的转换,目前常用于微量样品的处理。Colgravae 等<sup>[14]</sup>用 6 mol/L 盐酸在 110 °C 下充氮水解绵羊半膜肌去脂样品,水解液加入 0.1% 甲酸,冻干至粉末,再用 1 ml 0.1% 甲酸溶解,液相色谱-质谱(LC-MS)检测,Hyp 的回收率为 90% ~ 108%。

固相萃取是化学分析中常用的净化手段,选择性高,重复性好。但目前,应用于 Hyp 检测的报道很少。赵善贞等<sup>[20]</sup>在比较石墨化炭黑、氨基、C<sub>18</sub> 和 HLB 固相萃取柱对乳及乳制品中 Hyp 净化效果时发现,石墨化炭黑柱和氨基柱对 Hyp 具有较强的吸附作用,难以洗脱;而 HLB 可较好地去除脂溶性干扰物,净化效果好。在工业生产中,D61<sup>[34]</sup>、732 型<sup>[35]</sup>、HD-8<sup>[36]</sup> 等阳离子交换树脂常用于动物水解蛋白样品中 Hyp 的提纯制备。

## 2 化学衍生方法

Hyp 结构中无生色基团,需用带有生色基团的试剂衍生,改变其结构可测性,提高紫外-可见光、荧光检测的灵敏度和选择性。按照测定方法的不同,衍生方法可归纳为比色衍生法、液相色谱及毛细管电泳衍生法、氨基酸分析仪衍生法和气相色谱衍生法。

### 2.1 比色衍生法

比色衍生法是一种氧化衍生法,即游离 Hyp 氧化脱羧生成吡咯类化合物,然后与对二甲氨基苯甲醛反应,使其在可见光 560 nm 处可被检测。常用的氧化剂为氯胺 T。戴绚丽等<sup>[37]</sup>在柠檬酸缓冲液(pH 6.8)中用氯胺 T 在室温下与乳粉酸解液中的 Hyp 氧化反应 20 min,高氯酸中和过量氧化剂,对二氨基

苯甲醛显色 20 min 561 nm 处比色测定,样品加标回收率在 90.6% ~ 94.1% 之间,检测限(LOD)为 0.002 mg/L。氯胺 T 氧化法应用较多,但也存在操作繁琐、氯胺 T 不稳定等弱点。刘芳等<sup>[38]</sup>用 3.6% 过氧化氢替代氯胺 T 作为氧化剂,5% 对二氨基苯甲醛在 1.5 mol/L 硫酸溶液中显色 20 min,比色测定。此法解决了氯胺 T 易失效的问题,更为简便。

## 2.2 液相色谱及毛细管电泳衍生法

用于 Hyp 液相色谱及毛细管电泳检测的衍生试剂主要有邻苯二甲醛(OPA)、2,4-二硝基氟苯(DNFB)、磺酰氯(DNS-Cl)、9-芴基甲氧基羰酰氯(FMOC)、异硫氰酸苯酯(PITC)和 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯(AQC 试剂)等,其中 DNFB、PITC 和 AQC 试剂用于紫外-可见光检测的衍生,DNS-Cl 用于荧光检测的衍生,而 FMOC 既可用于紫外-可见光,也可用于荧光检测的衍生。

DNFB 衍生周期短、重现性好,且过量的 DNFB 对分析没有影响,是常用的柱前衍生试剂之一。李东等<sup>[39]</sup>将动物蛋白水解液与 DNFB-乙腈混匀,以 0.5 mol/L 碳酸氢钠为缓冲液,60 °C 水浴 1 h,360 nm 处检测,其 LOD 为 0.225 mg/L,平均回收率为 98.2%,RSD 为 3.03%。

金苏英等<sup>[40]</sup>以 AQC 试剂为衍生剂,硼酸为缓冲液,55 °C 烘箱内加热 10 min 衍生乳品中的 Hyp,紫外检测器在 248 nm 波长下检测。测定结果显示,在 0 ~ 2.05 mmol/L 范围内,标准曲线呈良好的线性关系,加标回收率为 95.1% ~ 101%,RSD 为 1.3%。AQC 试剂衍生物稳定,准确度高,适用于复杂样品中的氨基酸分析。

魏秀莲等<sup>[41]</sup>采用三乙胺乙腈和 PITC 溶液室温下衍生蛋白水解液 1h,正己烷去除过量 PITC,氨基酸分析专用色谱柱分析测定乳及乳制品中 Hyp,回收率为 98.2% ~ 99.0%,LOD 为 0.014 mg/L,LOQ 为 0.046 mg/L。郑家概等<sup>[42]</sup>建立了 OPA 和 FMOC 双衍生法测定组织中 Hyp。以硼酸盐(pH 9.5)为缓冲液,先用 OPA 屏蔽一级氨基酸的干扰,再用 FMOC 衍生 Hyp。衍生产物在 C<sub>18</sub>柱上分离良好,干扰峰少,定量限(LOQ)为 0.01 mg/L。肖雪花等<sup>[43]</sup>将乳及乳制品水解液与碳酸钠溶液(pH 9.0)和 DNS-Cl 混匀,室温避光 1.5 ~ 2.0 h 衍生。Hyp 的回收率为 83.0% ~ 97.2%,LOD 为 0.5 mg/kg。由于 DNS-Cl 反应活性较差,目前应用不多。

毛细管电泳测定的衍生化方法与液相色谱相似。Chu 等<sup>[44]</sup>用 OPA 及 PITC 先后对骨骼肌水解得到的 Hyp 分别衍生 15 和 10 min,采用胶束电动毛细管色谱法(MEKC)分离衍生产物,558 nm 检测,在

1.0 ~ 21.0 μg/L 范围内有良好的线性关系,LOD 为 1.3 μg/L,方法准确可靠。

## 2.3 气相色谱衍生法

气相色谱检测 Hyp 的衍生化方法经历了由酯化和酰化双衍生到硅烷化衍生的发展历程。硅烷化衍生是用甲硅烷取代-OH、-NH 和-SH 的氢原子,降低目标分子的极性,增强热稳定性,并提高气相色谱-质谱(GC-MS)的分辨率。常用 N-(特丁基二甲基硅烷)-N-甲基三氟乙酰胺(MTBSTFA)对 Hyp 进行衍生。Jiménez-Martín 等<sup>[25]</sup>用酸解处理猪肉、乳酪和沙丁鱼,MTBSTFA-乙腈在 100 °C 密闭衍生 60 min,冷却至室温后,GC-MS 分析样品中 22 种氨基酸,方法 LOD 为 0.1 ~ 4.6 mg/kg。MTBSTFA 可将 Hyp 的三个质子同时衍生化,增强功能基团的反应,缩短反应时间并增强水解强度,其衍生产物叔丁基二甲基氯硅烷(TBDMS)较稳定,柱上保留时间长,适用于 GC-MS 分析。

## 2.4 氨基酸分析仪衍生法

氨基酸分析仪测定 Hyp 一般采用茚三酮柱后衍生。张秀尧等<sup>[6]</sup>用 L-8900 氨基酸自动分析仪测定乳及乳制品中 Hyp,经阳离子交换树脂分离后,与茚三酮反应生成黄色产物,在波长 440 nm 处检测。Hyp 在 1.3 ~ 131 mg/L 范围内线性良好,LOD 为 0.3 mg/L,加标回收率在 96.8% ~ 107% 之间,RSD 为 0.4% ~ 4.9%。采用该方法,Hyp 与其他氨基酸保留时间不重叠,具有反应速度快、稳定、重现性好等特点。

## 3 测定方法

### 3.1 分光光度法

分光光度分析法(chemical colorimetry)是氨基酸检测的常用方法,设备简单、操作简便、便于推广。分光光度检测法是肉与肉制品中 Hyp 检测的国家标准方法<sup>[45]</sup>,也可用于乳与乳制品中 Hyp 的检测。该法可以快速检测乳品中的 Hyp,但灵敏度、准确性与其他方法相比较差,只适用于样品的初步分析。刘学琴等<sup>[46]</sup>用浓盐酸在充氮状态下水解生鲜乳,110 °C 水解 6 h 后,NaOH 调节至 pH 8.0,再用氯胺 T 氧化,对二甲氨基苯甲醛显色,分光光度计在(560 ± 2) nm 处测定。该法在 0 ~ 2.0 mg/L 范围线性良好,平均回收率为 100.2%。

### 3.2 氨基酸自动分析测定法

氨基酸自动分析测定法(amino acid analyzer)是一种离子交换色谱法。该法可实现 Hyp 与其他氨基酸的完全分离,能快速、准确检测 Hyp,灵敏度和自动化程度高,并且有效地避免了衍生产物的多样

性和衍生不彻底等问题,适合于动物水解蛋白的监测。曾暖茜等<sup>[7]</sup>用日立 835-50 型高效氨基酸自动分析仪、不锈钢分离柱、NO. 2619 交换树脂,分离测定奶粉、胶原蛋白粉中 Hyp,其线性范围为 5 ~ 30 mg/L,回收率为 94.9% ~ 105%,RSD 为 2.2%。

阴离子交换色谱-脉冲安培检测法 (HPAEC-IPAD) 是一种新型的氨基酸自动分析测定技术,无需衍生即可直接进样分析,主要检测氨基在金电极表面反应电流的变化。该法用电化学检测代替氨基酸衍生系统,操作简便,专属性与灵敏度较高。Messia 等<sup>[8]</sup>报道了采用 HPAEC-IPAD 对猪肉及猪肉制品中 Hyp 定量的方法。样品用 6 mol/L 盐酸微波辅助水解,初始流动相为超纯水 - 250 mmol/L NaOH (80 + 20, V/V),以 0.25 ml/min 的流速在 AminoPac PA10 分析柱上对 Hyp 进行分离。方法回收率为 97% ~ 104%,RSD 小于 6.4%。该法也可用于乳粉及乳制品中 Hyp 的检测,郑君等<sup>[9]</sup>以 AminoPac PA10 为分析柱,PH/Ag/AgCl 参比电极模式下,对乳粉中的 Hyp 进行分析,在 0.01 ~ 1.3 mg/L 范围内具有良好的线性,LOD 为 5 μg/L。

### 3.3 毛细管电泳法

毛细管电泳法 (capillary electrophoresis, CE) 是一种可对多肽和蛋白进行分析的液相分离技术,用于氨基酸检测报道较多,主要配备紫外检测器 (UVD)、激光诱导荧光检测器 (LIF)、电化学发光检测器 (ECL) 和无接触电导检测器 (CCD) 等。

邹晓莉等<sup>[47]</sup>碱水解 Hyp 后,用异硫氰酸荧光素 (FITC) 衍生肌腱和肌腱细胞中的 Hyp,建立了 CE-LIF 测定方法,并考察了缓冲液 pH 对衍生物分离的影响。结果表明, FITC 与 Hyp 衍生反应适宜的 pH 范围为 8.5 ~ 10.0。电泳缓冲液 pH 10.0 时,分离度最大; pH 过高,衍生产物将分解。该方法 LOD 为 0.5 μg/L,加标回收率为 95% ~ 110%。

ECL 法可直接利用 Hyp 的化学发光特性,无需衍生化,具有速度快、分离效率高、进样量少等特点。常用的电化学发光体系有 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 发光体系和鲁米诺体系等。Liang 等<sup>[21]</sup>采用 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 发光体系,以磷酸盐作缓冲液,CE-ECL 对人尿液中的脯氨酸和 Hyp 进行分离检测。在 1.3 ~ 262.0 mg/L 浓度范围内线性良好, Hyp 的 LOD 为 0.5 mg/L,回收率为 96.4% ~ 101.2%。邓薇等<sup>[48]</sup>利用鲁米诺发光特性,以 NaBrO 作为发光剂,0.05 mol/L 硼砂为缓冲液,建立了 7 种氨基酸的 CE-ECL 检测技术, Hyp 的 LOD 为 0.47 mg/L。Tuma 等<sup>[22]</sup>以 pH 2.15 的 1.7 mol/L 乙酸 (含 0.1% 羟乙基纤维素) 溶液为电解液,采用 CE-CCD 法对羊膜液中的

Hyp 进行分离检测,其 LOD 为 1.1 mg/L。

### 3.4 高效液相色谱法

高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 是目前测定氨基酸比较常用的方法之一,常用的检测器有 UVD 或二极管阵列检测器 (PDA)、荧光检测器 (FLD)、蒸发光散射检测器 (ELSD) 和 ECL 等。HPLC 法测定 Hyp 时,多在反相-液相色谱 (RP-LC) 体系进行分离。

UVD、PDA 和 FLD 检测时, Hyp 一般需要经衍生后再进样分析。蔡欣欣等<sup>[49]</sup>将乳品用酸水解后, PITC 衍生 Hyp, 以 XBridge C<sub>18</sub> 为色谱柱, 甲醇 - 20 mmol/L 乙酸铵 (8 + 92, V/V) 为流动相, 1.0 ml/min 洗脱分离, PDA 检测器在 254 nm 处测定。结果在 5.0 ~ 1000 mg/L 的浓度范围内, 线性良好, Hyp 的 LOD 为 1 mg/L, 回收率在 93.3% ~ 104.6% 之间, RSD 为 0.97% ~ 4.3%。郑家概等<sup>[42]</sup>用 HPLC-FLD 法检测动物组织中的胶原蛋白时, 流动相 A 和 B 分别为 10 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.2) 和 PBS-甲醇-乙腈 (50 + 35 + 15, V/V/V), 流速为 1.0 ml/min, 在 Hypersil ODS 色谱柱上梯度洗脱分离 Hyp, 在激发波长 260 nm, 发射波长 305 nm 处检测。在 0.01 ~ 50 mg/L 内, Hyp 的峰面积和质量浓度呈良好的线性关系, 保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0.30% 和 2.9%, 重复性好。

ELSD 和 ECL 法检测 Hyp 时, 则无需衍生化, 避免了衍生物的多样性及样品中 Hyp 衍生不完全等问题。赵燕燕等<sup>[27]</sup>建立了 HPLC-ELSD 测定奶制品中 Hyp 含量的方法, 用酸水解奶制品后, 以 3.8 mmol/L 七氟丁酸溶液-甲醇 (8 + 2, V/V) 为流动相, 在 Shim-pack C<sub>18</sub> 色谱柱上梯度洗脱, ELSD 测定。Hyp 的线性范围为 10 ~ 1000 mg/L, LOD 为 5 mg/L, 平均回收率为 99.83%。Ikehara 等<sup>[11]</sup>利用 Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> 发光体系, 用 100 mmol/L 醋酸盐缓冲液 (含 6 mmol/L 辛烷磺酸钠 (SOS) 和 1.2 mmol/L 硫酸铜, pH 5.2) 为流动相, 在 Develosil C<sub>30</sub>-UG 色谱柱上梯度洗脱, ECL 测定。Hyp 在 4 ~ 197 μg/L 范围内线性良好, 回收率在 96% 以上。

### 3.5 液相色谱-质谱联用法

液相色谱-质谱联用法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 利用质谱可提供相对分子量和结构信息的特点, 显著提高了 Hyp 检测的准确度和灵敏度。由于 Hyp 为强极性氨基酸, 在 LC-MS 分析中多选用电喷雾电离 (ESI) 方式, 流动相中常加入甲酸/乙酸-甲酸铵/乙酸铵提高分离和离子化效率。同时, Hyp 无需进行衍生化, 可直接检测, 选择离子对一般为 132 > 86。

Colgravea 等<sup>[14]</sup>用多反应监测模式(MRM),LC-MS 法测定绵羊半膜肌中的 Hyp 含量。流动相 A 为 0.1% 甲酸,流动相 B 为乙腈-0.1% 甲酸(90+10, V/V),80% 的流动相 A 以 700  $\mu$ l/min 等度洗脱 Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱,DL-脯氨酸为内标,在 ESI+ 模式下,对 132.1/86.0 和 132.1/68.0 进行多反应监测。Hyp 在 4.88~5000 nmol/L 浓度范围内有良好的线性关系,其 LOD 为 640 mg/L,回收率在 90%~108% 之间。Conventz 等<sup>[15]</sup>建立了呼气浓缩物中 4 种氨基酸含量的 HILIC-MS/MS 测定方法。以 ZIC-HILIC 为色谱柱,流动相为 5 mmol/L 乙酸铵-乙腈(含 0.0025% 甲酸)(20+80, V/V),流速 0.5 ml/min,在 ESI+ 电离模式下,对母离子及子离子进行多反应监测, Hyp 的平均回收率为 115.8%, LOD 为 5 ng/L。Kindt 等<sup>[18]</sup>报道了采用液相色谱-飞行时间质谱(LC-TOF/MS)检测组织和血浆中 Hyp 的定性定量分析方法。流动相 0.1% 甲酸-乙腈(90+10, V/V)以 0.2 ml/min 的速度洗脱 Meta Sil Aq C<sub>18</sub> 柱,TOF/MS 采用 MRM 模式监测。Hyp 的 LOD 为 2.5  $\mu$ g/L。

### 3.6 气相色谱及气相色谱-质谱联用法

Hyp 也可采用气相色谱(gas chromatography, GC)方法分析,但需要用双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)或 MTBSTFA 衍生化,与 LC 方法相比采用较少。Kataoka 等<sup>[50]</sup>开发了用火焰光度检测器气相色谱法测定尿中总脯氨酸和 Hyp 的方法。OPA 和二甲基氯代硫赶磷酸酯(DMCTP)衍生尿样水解物后,使用交联 DB-5 熔融二氧化硅毛细管柱,以 5  $^{\circ}$ C/min 升温至 230  $^{\circ}$ C,250  $^{\circ}$ C 时检测。Hyp 的 LOD 为 0.2 pmol,加标回收率为 93%~103%。Delpont 等<sup>[26]</sup>建立了鼠大腿骨中 Hyp 的气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)分析方法。首先以阴离子交换柱提取酸水解液中 Hyp,采用 MTBSTFA 进行衍生化,DB-5MS 毛细管柱分离,在选择离子模式(SIM)下监测 m/z 314。以 3,4-脱羟脯氨酸为内标定量,方法 LOD 为 30  $\mu$ g/L。

### 3.7 其他方法

除了化学比色、色谱测定等常规检测方法外,一些新兴技术特别是快速测定技术也逐渐用于 Hyp 的测定。González-Martín 等<sup>[51]</sup>开展了使用遥控纤维光探头的近红外光谱技术对香肠制品及干腌制牛肉中 Hyp 进行分析的研究。结果表明,Hyp 的测定范围为 0~0.74%,多重相关系数及标准误差分别为 0.772% 和 0.05%。Lin 等<sup>[52]</sup>设计了一种从胶原蛋白中定量分析 Hyp 的试剂盒。样品在 120  $^{\circ}$ C 水解 40 min,氯胺 T 氧化,Ehrlich 试剂显色后,利用

ELISA 酶标仪在 550 nm 处检测,LOD 为 1 mg/L。魏战峰等<sup>[53]</sup>建立了一种乳制品中掺加明胶的快速定性方法。采用硝酸汞溶液沉淀蛋白,进一步用苦味酸溶液检测明胶,通过敏感度测定试剂用量,定性检测乳中是否存在水解蛋白。该方法进行一次乳品检测只需 4 min 左右,检测明胶的下限不高于 300 mg/L,可满足实际样品检测要求。

## 4 小结

Hyp 分析方法发展迅猛,新型技术不断涌现。目前,HPLC 法已经逐渐取代了传统的分光光度法,成为 Hyp 检测最为常用的分析技术。但由于 Hyp 易于氧化,需要衍生后检测,操作较为繁琐。而随着 LC-MS 技术的发展,不需衍生化,大大简化了操作步骤,并且可以提供结构信息,便于确证,逐渐成为食品及生物样品中 Hyp 检测方法开发的热点。但如何扩展检测基质范围,提高水解效率,提高检测灵敏度和回收率,还有待进一步的研究。

## 参考文献

- [1] 卫生部. 卫生部公布食品中可能违法添加的非食用物质名单(第二批)[EB/OL]. [2012-03-31]. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohwsjdj/s3594/200902/38987.htm>.
- [2] 农业部. 农业部关于开展 2011 年生鲜乳质量安全监测的通知[EB/OL]. [2012-03-31]. [http://www.china.com.cn/policy/txt/2011-02/12/content\\_21907041.htm](http://www.china.com.cn/policy/txt/2011-02/12/content_21907041.htm).
- [3] 周彦刚,贾建萍,鲁健章,等. 真空水解测定鱼皮胶原蛋白制品中的羟脯氨酸[J]. 现代食品科技,2009,25(11):1290,1366-1368.
- [4] 陈楠瑜,余洁芝. 乳与乳制品中羟脯氨酸的检测[J]. 农业研究与应用,2011(4):20-22.
- [5] HOFMAN K, HALL B, CLEAVER H, et al. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen[J]. Anal Biochem, 2011(417):289-291.
- [6] 张秀尧,梁晓蓉,蔡欣欣. 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.
- [7] 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):719-721.
- [8] MESSIA M C, DIFALCO T, PANFILI G, et al. Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC-PAD analysis of 4-hydroxyproline[J]. Meat Sci, 2008(80):401-409.
- [9] 郑君,赵秀苔,李仁勇,等. 阴离子交换色谱-脉冲安培检测法测定奶粉中羟脯氨酸[C]//第 13 届离子色谱学术报告会,青岛,2010. 中国仪器仪表学会分析仪器分会.
- [10] 胡华,吕定,杜青,等. 高效液相色谱法检测酱油中羟脯氨酸的含量[J]. 中国调味品,2010,35(4):106-109.
- [11] IKEHARA T, HABU N, NISHINO I, et al. Determination of

- hydroxyproline in rat urine by high-performance liquid chromatography with electrogenerated chemiluminescence detection using tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 536:129-133.
- [12] INOUE H, KOHASHI K, TSURUTA Y. Simultaneous determination of serum and urinary hydroxyproline and proline by liquid chromatography using two fluorescent labeling reagents [J]. *Anal Chim Acta*, 1998, 365:219-226.
- [13] HUTSON P R, CRAWFORD M E, SORKNESS R L. Liquid chromatographic determination of hydroxyproline in tissue [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 791:427-430.
- [14] COLGRAVEA M L, ALLINGHAM P G, JONESC A. Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1212(1-2):150-153.
- [15] CONVENTZ A, MUSIOL A, BRODOWSKY C, et al. Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 860(1):78-85.
- [16] SUN Y, LU K, MA L. Isolation and identification of the mixture of L-hydroxyproline oligo-peptides by reversed-phase high performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Se Pu*, 2007, 25(4):524-527.
- [17] ZANGRANDO R, PIAZZAA R, CAIRNS W R L, et al. Quantitative determination of un-derivatised amino acids in artistic mural paintings using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 675:1-7.
- [18] KINDT E, GUENEVA-BOUCHEVA K, REKHTER M D, et al. Determination of hydroxyproline in plasma and tissue using electrospray mass spectrometry [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2003, 33:1081-1092.
- [19] LANGROCK T, CZIHAL P, HOFFMANN R. Amino acid analysis by hydrophilic interaction chromatography coupled on-line to electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Amino Acids*, 2006, 30:291-297.
- [20] 赵善贞, 邓晓军, 彭涛, 等. 亲水性相互作用色谱-四极杆串联线性离子阱质谱测定蛋白食品中 L-羟脯氨酸残留 [J]. *分析化学*, 2011, 39(9):1373-1379.
- [21] LIANG H, XUE J, LI T, et al. A rapid capillary electrophoresis with electrochemiluminescence method for the assay of human urinary proline and hydroxyproline [J]. *Luminescence*, 2005, 20:287-291.
- [22] TUMA P, SAMCOVÁ E, ANDĚLOVÁ K. Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 839:12-18.
- [23] CHEN S, XU Y, XU F, et al. Separation and determination of amino acids by micellar electrokinetic chromatography coupling with novel multiphoton excited fluorescence detection [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1162:149-153.
- [24] TREDGET E E, FALK N, SCOTT P G, et al. Determination of 4-hydroxyproline in collagen by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 1990, 190(2):259-265.
- [25] JIMÉNEZ-MARTÍN E, RUIZ J, PEREZ-PALACIOS T, et al. A gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of free amino acids as their dimethyl-tert-butylsilyl (TBDMS) derivatives in animal source food [J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60(10):2456-2463.
- [26] DELPORT M, MAAS S, van der MERWE S W, et al. Quantitation of hydroxyproline in bone by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 804:345-351.
- [27] 赵燕燕, 刘丽艳, 杜光玲, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定奶制品中动物水解蛋白 [J]. *食品科学*, 2010, 31(20):282-285.
- [28] 丁毅, 王兴华, 郭蔷薇, 等. 农产品质量安全快速检测技术-微波辅助水解比色法快速测定动物水解蛋白中羟脯氨酸的研 [J]. *现代科学仪器*, 2011, 73-77(1).
- [29] 徐铮, 白云, 修贺明. 胃酶酸解法测定肝组织羟脯氨酸含量 [J]. *华北国防医药*, 2010, 22(3):235-236.
- [30] 卞婧, 周业平, 陈志刚, 等. 高效液相色谱法测定人血清游离羟脯氨酸的含量 [J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(4):271-273.
- [31] 夏莉, 梁逸曾, 王平. 柱前衍生高效液相色谱法测定肝纤维化兔给药后尿羟脯氨酸含量 [J]. *分析化学*, 2008, 36(6):811-814.
- [32] 赵天珍, 袁秀金, 谭贵良, 等. 比色法快速测定奶粉和含乳饮料中游离 L-羟脯氨酸 [J]. *食品研究与开发*, 2008, 29(12):111-113.
- [33] SORMIACHI K, IKEDA M, AKIMOTO K, et al. Rapid determination of dabsylated hydroxyproline from cultured cells by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 1995, 664:435-439.
- [34] 高焕春, 李文英. 从骨胶水解液中分离 L-羟脯氨酸和 L-脯氨酸 [J]. *天津轻工业学院学报*, 1997(2):33-37.
- [35] 李娟, 陈舜胜. 从明胶水解液中分离制备 L-羟脯氨酸和 L-脯氨酸 [J]. *现代食品科技*, 2006, 22(4):141, 151-152.
- [36] 刘坐镇, 倪海, 姚光辉, 等. HD-8 大孔强酸性阳离子交换树脂的研制 [J]. *上海化工*, 1997, 22(1):8-11.
- [37] 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-羟脯氨酸含量 [J]. *食品工业科技*, 2009, 30(3):313-314, 318.
- [38] 刘芳, 穆畅道. 过氧化氢化法测定羟脯氨酸含量的研究 [J]. *西部皮革*, 2008, 30(10,11):43-46.
- [39] 李东, 孙家义. 2,4-二硝基氟苯柱前衍生高效液相色谱法测定 18 种氨基酸 [J]. *化学分析计量*, 2004, 13(1):18-20.
- [40] 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.
- [41] 魏秀莲, 丁美方, 董颖超, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定乳与乳制品中羟脯氨酸的含量 [J]. *中国饲料*, 2011(18):41-43.
- [42] 郑家概, 飞王, 农云军, 等. 柱前衍生高效液相色谱法对动物组织中胶原蛋白的测定 [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(12):1383-1385.
- [43] 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(增刊):66-67.

- [44] CHU Q, EVANS B T, ZEECE M G. Quantitative separation of 4-hydroxyproline from skeletal muscle collagen by micellar electrokinetic capillary electrophoresis [J]. J Chromatogr B, 1997, 692:293-301.
- [45] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GBT 9695.23—2008 肉与肉制品羟脯氨酸含量测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [46] 刘学琴, 徐栓朝, 高建龙, 等. 生鲜乳中添加皮革水解蛋白的测定方法研究[J]. 乳业科学与技术, 2010(4):188-192.
- [47] 邹晓莉, 周春艳, 黎源倩, 等. 毛细管电泳-激光诱导荧光检测肌腱和肌腱细胞中的羟脯氨酸[J]. 分析化学研究简报, 2006, 34(10):1441-1444.
- [48] 邓薇. 毛细管电泳化学发光检测[D]. 陕西: 陕西师范大学, 2003.
- [49] 蔡欣欣, 张秀尧. 液相色谱柱前衍生法测定乳及乳制品中羟脯氨酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(9):2147-2148.
- [50] KATAOKA H, NABESHIMA N, NAGAO K, et al. Selective and sensitive determination of urinary total proline and hydroxyproline by gas chromatography with flame photometric detection [J]. Clinica Chimica Acta, 1993, 214(1):13-20.
- [51] GONZALEZ-MARTIN M I, FERNANDEZ-BERMEJO C, HERNANDEZ-HIERRO J M. Determination of hydroxyproline in cured pork sausages and dry cured beef products by NIRS technology employing a fibre-optic probe [J]. Food Control, 2009, 20(8):752-755.
- [52] LIN Y, KUAN C. Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification [J]. Food Chem, 2010, 119:1271-1277.
- [53] 魏战峰, 田忙雀, 王玥, 等. 明胶掺假乳制品快速检测方法的建立[J]. 食品科学, 2011, 32(4):220-222.

## 综述

# 反式脂肪酸的国内外管理措施现状

陈月晓<sup>1,2</sup>, 马玉霞<sup>1</sup>, 何梅<sup>2</sup>, 杨月欣<sup>2</sup>

(1. 河北医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 河北 石家庄 050017;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050)

**摘要:**反式脂肪酸(trans fatty acids, TFAs)的过量摄入会增加心血管疾病等的发病危险, 本文主要就国内外政府机构对TFAs的监管现状及其在食品中的限量标准进行综述, 为我国食品中TFAs的风险评估及相关监管措施的制定提供参考。

**关键词:**反式脂肪酸; 限量; 法规; 监督管理; 食品

**中图分类号:**TQ641 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2012)05-0499-06

## Current management situation of trans fatty acids at domestic and abroad

Chen Yuexiao, Ma Yuxia, He Mei, Yang Yuexin

(Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Public Health,

Hebei Medical University, Hebei Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract:** Many studies indicated that excessive intake of trans fatty acids will increase the risk of cardiovascular disease and other chronic diseases. This review mainly aims to analyze the management and food standards of trans fatty acids at domestic and abroad, and provide references for trans fatty acids management and risk assessment in China.

**Key words:** Trans fatty acids; limit; regulation; management; food

近年来,反式脂肪酸(trans fatty acids, TFAs)引起人们广泛的关注。众多研究表明,TFAs的过量摄入影响人类的健康(如冠心病、心肌梗塞,大脑功能

衰退等均与TFAs有关),也影响婴儿的生长发育<sup>[1]</sup>。很多国家都对本国的食品进行了相关的专项监测,并发布了关于TFAs的监管措施<sup>[2-3]</sup>。我国明确规定婴幼儿食品中禁止使用氢化油脂<sup>[4-8]</sup>,新的食品营养标签通则中要求对使用了氢化植物油食品进行强制标识<sup>[9]</sup>。但是,目前我国相关食品中的TFAs含量不清,因此在一定程度上影响了对TFAs的风险管理和交流。本文就国内外政府机构关于TFAs的监管措施进行综述。

收稿日期:2012-03-19

基金项目:功能食品资源优化及评价共性技术研究(2012BAD33B01)

作者简介:陈月晓 女 硕士 研究方向为食物营养分析与评价

E-mail: chenyuexiaocyx@163.com

通信作者:马玉霞 女 博士 教授 E-mail: mayuxia2000@

sina.com