

- 生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [3] Zygler A, Wasik A, Namies'nik J. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs [J]. Trends Anal. Chem, 2009, 28(9): 1082-1102.
- [4] 刘婷, 吴道澄. 食品中甜味剂的检测方法[J]. 中国调味品, 2011, 36(3): 1-13.
- [5] 肖立群, 张承聪, 张承明. 人工合成甜味剂的检测技术研究进展及应用[J]. 云南化工, 2010, 37(4): 49-53.
- [6] 董桂贤, 王朝霞, 张桂芳, 等. 超高效液相色谱法同时测定酱腌菜中的 7 种防腐剂与 2 种甜味剂[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(2): 155-158.
- [7] 夏于林, 李明春, 张莹, 等. 液相色谱串联质谱法同时测定白酒中 4 种甜味剂方法研究[J]. 中国酿造, 2011, 228(3): 156-158.
- [8] 刘晓霞, 丁利, 刘锦霞, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食品中 6 种人工合成甜味剂[J]. 色谱, 2010, 28(11): 1020-1025.
- [9] 尹峰, 丁召伟, 曹雪, 等. 固相萃取-高效液相色谱/串联质谱法测定食醋中的 3 种甜味剂[J]. 色谱, 2011, 29(6): 554-557.
- [10] 稽超, 冯峰, 陈正行, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄酒中的 5 种人工合成甜味剂[J]. 色谱, 2010, 28(6): 749-753.
- [11] 吴世嘉, 王洪新, 陶冠军. 超高压液相色谱-质谱同时测定白酒中 6 种微量甜味剂的方法研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 29(5): 670-675.
- [12] YANG D J, CHEN B. Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in foods by HPLC/ESI-MS[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(8): 3022-3027.
- [13] Greulich K, Alder L. Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(1): 183-97.
- [14] Gilbert-López A, García-Reyesa J F, Lozano B, et al. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217: 6022-6035.
- [15] 国家标准化管理委员会. GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

实验技术与方法

碱解法测定动物水解蛋白中 *L*-羟脯氨酸的含量

杨清华, 史玉坤, 施逸岚

(南通市疾病预防控制中心, 江苏 南通 226000)

摘要:目的 建立了使用聚四氟乙烯带盖水解管, 以 NaOH 溶液为水解液的碱解法测定动物水解蛋白中 *L*-羟脯氨酸(*L*-Hydroxyproline, *L*-Hyp)含量。方法 将样品置于 10 ml 水解管中, 加入 6 ml 2.5 mol/L NaOH 溶液在 110 °C 烘箱中加热 2 h, 水解出的 *L*-Hyp 经氯胺 T 氧化后与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色络合物, 在 (558 ± 2) nm 处测定其吸光度。结果 在优化实验条件下, 该方法的线性范围 0 ~ 10 μg/ml ($r = 0.9993$), 检出限 1.35 μg/g, 样品测定的 RSD 在 1.0% ~ 2.3%, 加标回收率为 88.7% ~ 96% (加标量为 30 mg/kg)。结论 相对酸解法, 碱解法的水解效率和酸解法基本一致, 样品前处理操作简单, 缩短了测定时间, 灵敏度、重复性和稳定性良好。

关键词: 碱解法; *L*-羟脯氨酸; 乳与乳制品; 分光光度法; 违法添加物

中图分类号: R155.57 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)04-0335-04

Determination of *L*-hydroxyproline in hydrolyzed animal protein based on alkaline hydrolysis

YANG Qing-hua, SHI Yu-kun, SHI Yi-lan

(Nantong Center for Disease Control and Prevention Jiangsu Nantong 226000, China)

Abstract: Objective To establish a method based on alkaline hydrolysis for determination of *L*-hydroxyproline (*L*-Hyp) in hydrolyzed animal protein, in which NaOH solution and polytetrafluoroethylene (PTFE) hydrolysis tube with cover were used. **Method** The sample was hydrolysed by 6 ml 2.5 mol/L NaOH solution in 10 ml hydrolysis tube and heated in the oven at 110 °C for 2 h. The hydrolysate of *L*-Hyp was oxidized by chloramine-T and then reacted with paradime thylaminobenzaldehyde to generate red complex. The absorbency was determined at (558 ± 2) nm. **Results** Under the optimal conditions, the calibration curve was linear in the range of 0-10 μg/ml with detection limit of 1.35 μg/g,

and the relative standard deviation (RSD) was 1.0% -2.3%. It was effective in the determination of *L*-Hyp in milk and dairy products with recoveries of 88.7% -96%. **Conclusion** Compared with acidolysis, the alkaline hydrolysis had more simple experimental procedure, fewer measurement time, highly sensitive and reproducible with consistency.

Key words: Alkaline hydrolysis; *L*-hydroxyproline; hydrolyzed animal protein; spectrophotometry; adulterant

向牛奶及相关乳制品中掺入动物水解蛋白是提高乳制品蛋白含量的造假手段之一,动物水解蛋白是由动物皮革及其制品下脚料等水解得到的蛋白质,长期食用会对人体健康造成危害。*L*-Hyp 是动物水解蛋白中胶原的特征氨基酸之一,是判断乳制品中是否加入动物水解蛋白的标示物之一。近期媒体曝光一些老酸奶和果冻生产过程中加入工业明胶事件,又将乳制品质量问题推向了舆论的风口浪尖,其中工业明胶的水解液中含有大量的羟脯氨酸。因此,加强乳与乳制品中 *L*-Hyp 含量测定对保证乳制品品质非常关键。

L-Hyp 的常用测定方法有高效液相色谱法^[1-2]、氨基酸自动分析仪测定法^[3-4]、毛细管电泳-激光诱导荧光检测法^[5-6]以及分光光度法^[7-10]。无论使用哪种方法,样品水解步骤必不可少,水解的好坏直接影响测定结果的准确性。经典水解条件是 6 mol/L HCl,在 110 °C 封管条件下恒温水解 24 h。此条件下进行样品水解,蛋白质分子中的丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、蛋氨酸仍可能因氧化、降解等反应影响回收率,故要求在封管时减压或充氮以提高回收率,使用该法进行样品前处理具有盐酸易挥发、操作复杂、消耗时间长等缺点。

本试验采用 10 ml 聚四氟乙烯带盖水解管代替玻璃水解管,并使用 NaOH 溶液水解样品,所用的聚四氟乙烯水解管耐酸碱并且可以免去加热封管等步骤,减少样品损失。对样品前处理和测定过程进行优化,从而实现了乳与乳制品中 *L*-Hyp 含量的检测。该法具有操作简单、检出限低、耗时短等特点。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

紫外可见分光光度计、电热恒温干燥箱、酸度计、电子分析天平(感量 0.1 mg)、10 ml 水解管(定制,聚四氟乙烯材料)、水浴锅等实验室常规设备。

缓冲溶液:146.1 g 结晶乙酸钠,50 g 柠檬酸和 26.3 g 氢氧化钠溶于水定容至 1 L。

1.41% 氯胺 T 溶液:将 1.41 g 氯胺 T 溶于 10 ml 水,加入 10 ml 正丙醇和 80 ml 缓冲溶液混匀,现用现配。

显色剂:称取 10 g 对二甲氨基苯甲醛,用 35 ml 高氯酸溶解,缓慢加入 65 ml 异丙醇,混匀,现用

现配。

L-Hyp 标准储备液:精密称取 50 mg *L*-Hyp 用少量水溶解至 100 ml 容量瓶加入 1 滴 6 mol/L 的盐酸(浓度 500 μg/ml);5 μg/ml 的工作液由 *L*-Hyp 标准储备液稀释而得。

NaOH、HCl 以及其他试剂均为分析纯或优级纯。

1.2 测定原理

乳与乳制品中的动物水解蛋白通过 NaOH 溶液水解出 *L*-Hyp,再用氯胺 T 将 *L*-Hyp 氧化成结构类似吡咯的氧化物,该氧化物与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色络合物,在 (558 ± 2) nm 处进行比色测定。

1.3 样品前处理

准确称取 2.0 g 样品于 10 ml 水解管中,加入 6 ml 2.5 mol/L NaOH 溶液,摇匀放入 110 °C 恒温干燥箱中加热 2 h,取出后趁热过滤至 100 ml 容量瓶,并用 10 ml 2.5 mol/L NaOH 溶液润洗水解管和滤纸,最后用水定容至刻度。取 25 ml 滤液于 250 ml 容量瓶用水定容至刻度,待测,同时做样品空白。

1.4 方 法

1.4.1 绘制标准曲线

分别吸取 2、10、20、30、40、50 ml 5 μg/ml *L*-Hyp 标准溶液于 100 ml 容量瓶中,用水定容至刻度,所得标准溶液浓度分别为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μg/ml(现用现配);分别取上述溶液 4 ml 于 10 ml 比色管中加入 2.0 ml 氯胺 T 溶液,摇匀,放置 20 min,再加入 2.0 ml 显色剂,摇匀,定容至刻度,60 °C 水浴加热 20 min 后取出,迅速冷却,以空白为参比在波长 (558 ± 2) nm 处用 1 cm 的比色皿测定其吸光值,绘制标准曲线。

1.4.2 样品测定

从 1.3 制备好的待测液中取 4.0 ml 于 10 ml 比色管中,按 1.4.1 步骤进行,扣除空白的吸收,根据所得标准曲线查得水解产物中 *L*-Hyp 的浓度。样品中 *L*-Hyp 含量按式(1)计算:

$$X = 1000 C/m \quad (1)$$

式中:*X*—试样中 *L*-Hyp 的含量,mg/kg

C—由标准曲线得到的试样溶液中 *L*-Hyp 的浓度,μg/ml

m—试样质量,g

2 结果与讨论

2.1 酸解法与碱解法水解效率比较

蛋白质可以在强酸和强碱条件下水解为氨基酸,酸解法水解蛋白质比较彻底,水解的最终产物是 *L*-氨基酸,无旋光异构体产生,其中的色氨酸几乎全部被破坏,与含醛基的化合物(如:糖)作用生成一种黑色物质,水解液呈黑色,同时含羟基的丝氨酸、苏氨酸、洛氨酸也有部分被破坏;而碱解法中色氨酸不被破坏,水解液清亮,水解产生的氨基酸发生旋光异构作用。本试验考察了使用烘箱在 110 °C 下水解 16 h 后,不同浓度 HCl 和 NaOH 溶液对 1.0 g 富含动物水解蛋白的原料(绞碎均匀的猪皮)分解效率的影响,其中除水解液外其他测定条件和步骤都是一致的(参照最佳酸解条件 6 mol/L HCl 的水解效率为 100%)。由图 1 可知碱解法中最佳 NaOH 溶液浓度为 2.5 mol/L,此时样品的水解效率是相对于最佳酸解条件下水解效率的 99.8%,故两种方法的水解效率基本上无差异。

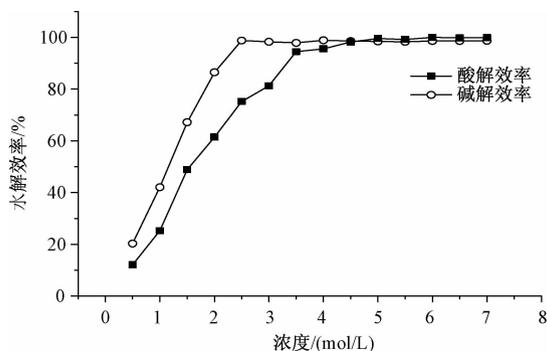


图 1 酸解法与碱解法的水解效率比较

Figure 1 Compare of acidolysis with alkaline hydrolysis efficiency

2.2 水解时间对吸光度的影响

2.5 mol/L NaOH 溶液为水解液下样品在 110 °C 烘箱中水解时间分别为 10、20、30、40、60、90、120、150 和 180 min 后, *L*-Hyp 的含量随着水解时间的增长而增加,最佳水解时间为 120 min。

2.3 缓冲溶液 pH 对测定的影响

以往的酸性条件水解容易使样品在强酸性条件下出现假阳性^[11],为此本试验考察了 pH 值在 3~10 范围内的缓冲溶液对 1.5 μg/ml *L*-Hyp 吸光度的影响。由图 2 可知 pH 为 6~7 时 *L*-Hyp 的吸光度最大,故本试验选择的最佳 pH 为 6.5。

2.4 加入氯胺 T 溶液体积

1.41% 氯胺 T 溶液加入量在 0.50~3.0 ml 范围内时,对测定 1.5 μg/ml *L*-Hyp 标准溶液的影响,发现 1.41% 氯胺 T 溶液的最佳加入量为 2.0 ml,当 < 2.0 ml 时 *L*-Hyp 不能全被氧化,从而影响测定结果。

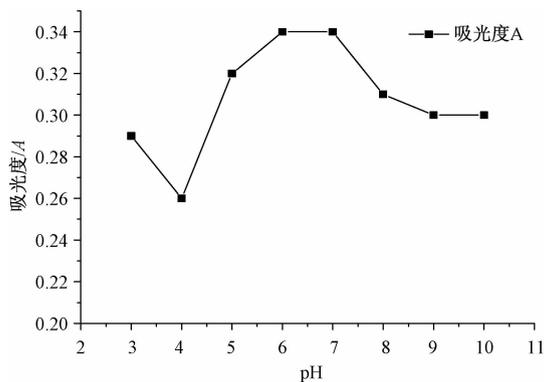


图 2 缓冲溶液 pH 对 *L*-Hyp 络合物吸光度的影响

Figure 2 Effect of pH in buffer solution

2.5 显色剂体积和显色时间的影响

在浓度为 1.5 μg/ml 的 *L*-Hyp 标准溶液中分别加入 1.1 中的显色剂(显色剂体积分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml),其他按 1.4.1 操作,吸光度随着显色剂加入量的增加而增大并趋于稳定,加入显色剂体积最佳为 2.0 ml; 1.5 μg/ml 的 *L*-Hyp 标准溶液在 60 °C 水浴中加热 5、10、15、20、25、30 min,其他按照 1.4.1 操作,当加热时间为 20~25 min 时吸光度最大且比较稳定,故最佳显色时间为 20 min。

2.6 方法的线性范围与最低检出限

按照 1.4.1 操作,得到线性回归方程: $y = 0.2213x + 0.0091$, $r = 0.9993$ 表明 *L*-Hyp 标准溶液在浓度范围 0~10 μg/ml 内具有良好的线性关系,平行测定 20 份空白,标准偏差为 0.0002,方法的检出限为 1.35 μg/ml。

2.7 精密度与回收率

分别准确称取不同种类乳与乳制品 2.0 g,对阳性样品进行精密度试验,同时对所有样品进行加标回收率测定,每份样品平行测定 6 次,样品处理按 1.4.1 进行,其中样品中 *L*-Hyp 加标量为 30 mg/kg,使用建立的碱解法测定,加标回收率在 88.7%~96%,该方法的准确性良好,见表 1。

表 1 样品中 *L*-Hyp 的精密度和加标回收率测定结果 ($n=6$)

Table 1 Results of precision and recovery of *L*-Hyp in samples

样品名称	加标前		加标后测定值/ (mg/kg)	回收率/ %
	测定值/(mg/kg)	RSD/%		
奶粉	未检出	—	27.3	91
纯牛奶	未检出	—	26.6	88.7
酸奶	30.8	2.3	59.6	96
果冻	28.7	1.0	56.9	94

3 小论

本试验采用 2.5 mol/L NaOH 溶液为水解液,在 110 °C 烘箱中加热 2 h 作为乳与乳制品前处理的方法,该方法与酸解法样品前处理的水解效率无差异

并且操作简单、耗时短、检出限低,方法准确可靠。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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]. Journal of Chromatography,2007,1162:149-153.
- [7] 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.
- [8] 孔晓峰,古丽曼,达成彪,等. 紫外分光光度法测定生鲜乳中动物水解蛋白 L-羟脯氨酸含量[J]. 饲料工业,2011,32(4):60-61.
- [9] 张强,赵福荣,邓小君. 乳与乳制品中 L(-)-羟脯氨酸测定方法的改进[J]. 现代科学仪器,2011,8(4):47-49.
- [10] 田艳玲,孙妍,陈婧,等. 乳与乳制品中动物水解蛋白 L-羟脯氨酸测定方法[J]. 中国乳品工业,2009,36(6):49-50.
- [11] 陈裕华,廖仕成,李瑞园,等. 乳与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.

实验技术与方法

固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定水产品中硝基呋喃类代谢物

陈剑刚,白艳玲,梁素丹,胡小玲,张艳

(珠海市疾病预防控制中心,广东 珠海 519000)

摘要:目的 建立水产品中呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮等硝基呋喃代谢物的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱测定方法。方法 样品中加入同位素内标,经盐酸水解及 2-硝基苯甲醛衍生,再经 Oasis HLB 固相萃取小柱净化,乙酸乙酯洗脱吹浓浓缩;采用 XTerra® MS C₁₈ 色谱分离柱,以乙腈-5 mmol/L 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液进行梯度洗脱,以正离子多反应监测模式,同位素内标法定量。结果 4 种硝基呋喃代谢物的定量限为 0.10 ~ 0.30 μg/kg;方法的线性范围为 0.5 ~ 25 μg/kg, $r > 0.995$;代谢衍生物的加标回收率分别为 81.0% ~ 104.8%、91.0% ~ 110.3%、85.0% ~ 111.4% 和 88.0% ~ 108.2%;RSD 在 2.7% ~ 14.5% 之间。应用建立的方法对 180 份淡水鱼进行测定,其中 4 份检出 3-氨基-2-噁唑烷基酮(AOZ),含量为 1.3 ~ 3.6 μg/kg。结论 方法选择性高、灵敏,能满足水产品中硝基呋喃类代谢物残留的高灵敏分析。

关键词:液相色谱-串联质谱;硝基呋喃类代谢物;固相萃取;水产品;兽药残留

中图分类号:R155;O657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)04-0338-06

Determination of nitrofurantoin metabolites in aquatic products by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with solid phase extraction

CHEN Jian-gang, BAI Yan-ling, LIANG Su-dan, HU Xiao-ling, ZHANG Yan

(Zhuhai Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhuhai 519000, China)

Abstract: Objective The method for determination of metabolites of four nitrofurantoin antibiotics, nitrofurantoin (AMOZ), furaltadone (SEM), nitrofurazone (AHD) and furazolidone (AOZ) in aquatic products was developed by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Samples with isotope internal standard solutions were hydrolyzed by HCl and derivatized with 2-nitrobenzaldehyde. The analytes were cleaned up on HLB solid-phase column and eluted with ethyl acetate, then evaporated and dried with nitrogen gas. The extract components were separated and gradient eluted on a XTerra® C₁₈ column with acetonitrile-5 mmol/L ammonium