

氨基酸自动分析仪对乳制品中羟脯氨酸的测定方法研究

曾暖茜¹, 王洪健¹, 周兴起², 冯志强¹

(1. 广东省食品质量监督检验站, 广东 广州 510308) (2. 广东省食品工业公共实验室, 广东 广州 510308)

摘要: 本文用氨基酸自动分析仪测定乳制品中羟脯氨酸的含量, 研究了样品预处理方法和仪器色谱分离条件, 测得样品中羟脯氨酸的含量, 可作为乳粉中是否添加动物胶原水解蛋白的依据, 此方法灵敏度高, 具有较好的准确度和重现性, 添加标准的回收率为94.9%~105%。

关键词: 羟脯氨酸; 氨基酸自动分析仪; 动物胶原水解蛋白

中图分类号: TS207.3; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)07-0719-03

Determination of Hydroxyproline in Dairy Products by Amino Acid Autoanalyzer

ZENG Nuan-xi¹, WANG Hong-jian¹, ZHOU Xing-qi², FENG Zhi-qiang¹

(1. Guangdong Food Quality Supervision and Inspection Station, Guangzhou 510308, China)

(2. Guangdong Provincial Public Laboratory of Food Industry, Guangzhou 510308, China)

Abstract: The separation and analysis of hydroxyproline in milk powder and hydrolyzed animal protein were researched by amino-acid analyzer. The method was convenient, accurate and practical, with the recovery rate being 94.9%~105%.

Key words: Hydroxyproline; amino-acid autoanalyzer; hydrolyzed animal collagen proteins

羟脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp) 又名反式-4-羟基-L-脯氨酸, 分子式为 $C_5H_9NO_3$, 分子量 131.13, 是胶原蛋白所特有的氨基酸, 在正常胶原蛋白中含量约 13.4%^[1], 在弹性蛋白中含量极少, 而在其他蛋白中则不存在。胶原蛋白中含有大量的羟脯氨酸是这类蛋白特有的性质, 由测定羟脯氨酸的质量浓度再乘以相应的系数就可以得到胶原蛋白的含量^[2]。

动物胶原水解蛋白是一种廉价蛋白原料, 是将牛皮及其制品下脚料等成分粗加工后制成的水解蛋白质, 某些非法厂家在乳粉中掺入廉价的水解动物蛋白来冒充或替代乳蛋白质, 提高乳中蛋白的质量分数, 降低成本。掺加动物胶原水解蛋白不但会影响乳的口感和风味, 改变牛乳的溶解度, 因其氨基酸的组成不合理, 且不易消化, 所以营养价值低下, 导致人体吸收利用率降低, 会严重影响消费者的健康状况^[3]。

羟脯氨酸的测定方法包括比色法^[4]、氨基酸自动分析仪法^[5]、HPLC法^[6]、电泳法等, 比色法特异性、灵敏度、准确性都较差, 测量结果也容易受多种因素

影响, HPLC法需要柱前衍生, 反应操作复杂, 而氨基酸分析仪法中羟脯氨酸与茚三酮反应后生成黄色产物, 在仪器的第二通道波长440 nm有最大吸收, 且保留时间不与其他氨基酸重迭, 氨基酸自动分析仪法更加快速、准确、自动化程度和灵敏度高, 本文利用日立835-50型氨基酸自动分析仪, 对氨基酸直接进行分析, 研究了各种样品中羟脯氨酸含量的测定分析, 并对方法进行了验证, 获得了满意的分析结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

氨基酸自动分析仪: 日立 835-50 型高效氨基酸自动分析仪, 连有自动数据处理机和记录仪、自动进样装置、梯度洗脱系统等; 电热恒温干燥箱

1 mg/ml 羟脯氨酸标准溶液; 6 mol/L 盐酸; 茚三酮显色剂: 将 26.67 g 茚三酮溶于 1000 mL 乙二醇甲醚中, 加入 333.33 mL 醋酸缓冲液, 再加入 2.3 mL 三氯化钛, 低温保存。

1.2 色谱条件

分离柱: 26 mm i.d.×150 mm 不锈钢柱; 交换树脂

收稿日期: 2008-06-16

作者简介: 曾暖茜 (1981-), 硕士, 研究方向为食品检验

型号: No.2619 (日本公司生产的氨基酸分析专用树脂); 柱温: 53 °C; 泵流速: 0.225 mL/min; 泵压力: 8.8 MPa; 进样体积: 50 μL。

1.3 样品的处理

取含蛋白 20 mg 的各种样品于水解管中, 加 12 mL 的 6 mol/L 盐酸, 滴入几滴苯酚, 充氮后封管, 置于 110 °C 烘箱中保持 22 h, 冷却后经滤纸过滤到 50 mL 容量瓶中, 用超纯水反复冲洗水解管及滤纸, 最后定容至刻度。取 1 mL 的样液于蒸发皿中在蒸气浴上蒸干, 加超纯水重复三次, 残留物用 0.02 mol/L HCl 定容至 10 mL, 0.45 μm 滤膜过滤, 备用上机^[7]。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线绘制

精确吸取羟脯氨酸标准溶液 0 mL、0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL、2.0 mL、2.5 mL、3.0 mL 分别加入到 100 mL 容量瓶中, 用水稀释到刻度, 进氨基酸分析仪分析, 以峰面积和浓度绘制标准曲线如图 1。由图 1 可知: 线性回归方程 $y=39583x+61633$; 相关系数: $R^2=0.9993$ 。在羟脯氨酸质量浓度为 5~30 mg/L 范围内, 羟脯氨酸的质量浓度与峰面积之间具有良好的线性关系。

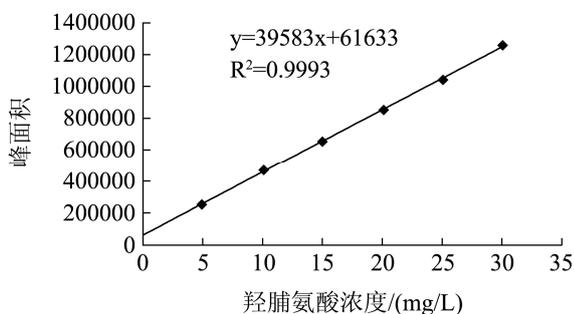


图 1 羟脯氨酸标准曲线

Fig.1 Calibration curve of hydroxyproline

2.2 精密度

表1 精密度实验

Table 1 Precision test of the method

测量次数	峰面积	平均值	标准偏差	RSD/%
1	736780			
2	745200			
3	753116			
4	749381	756943	16648	2.2
5	757052			
6	770978			
7	786092			

配制混合氨基酸溶液 6 nmol/50 μL, 连续进样 7

次, 由表 1 可知, 峰面积相对标准偏差为 2.2%。

2.3 加标回收率

分别取 3 种样品, 按 1.3 的方法处理, 分别测定其羟脯氨酸含量, 再在各样品中分别加入标准羟脯氨酸, 进行测定, 每一样品做 2 次平行试验。实验结果见表 2。由表 2 可以看出, 回收率为 94.9%~105%, 平均回收率为 98.4%。

表2 回收率测定结果

Table 2 Recovery of the determination method

	本底值 /mg	加入量 /mg	加标测得值 /mg	回收率 /%
样品 1	4.783	5.00	9.703	98.4
			10.049	105
样品 2	5.209	5.00	10.141	98.6
			10.109	98.0
样品 3	4.127	5.00	8.902	95.6
			8.872	94.9

2.4 样品的检测与分析

分别取市售不同的胶原蛋白粉、明胶、奶粉等样品, 按上述样品处理方法进行处理后进样, 测定不同样品中 17 种水解氨基酸和羟脯氨酸的含量, 结果见表 3。

表3 样品测试分析结果

Table 3 Results of hydroxyproline content determination

样品名称	17 种水解氨基酸 总量 (g/100 g)	羟脯氨酸含量 (g/100 g)
胶原蛋白粉 1	95.5	8.94
胶原蛋白粉 2	94.9	9.19
明胶	83.4	8.24
花生蛋白粉	49.0	0.26
大豆分离蛋白	79.4	未检出
奶粉 1	24.3	未检出
奶粉 2	19.1	未检出
奶粉 3	30.8	未检出
奶粉 4	34.8	未检出
奶粉 5	24.1	未检出
奶粉 6	30.3	未检出

结果表明, 胶原蛋白粉, 明胶 (色谱图见图 2, 图 3) 都含有羟脯氨酸, 花生蛋白粉中羟脯氨酸含量极少, 其他样品则不含羟脯氨酸, 羟脯氨酸是胶原蛋白一类物质的特征氨基酸, 若样品中检出有羟脯氨酸, 则说明有胶原蛋白的存在, 可作为乳粉中是否添加动物胶原水解蛋白的依据。

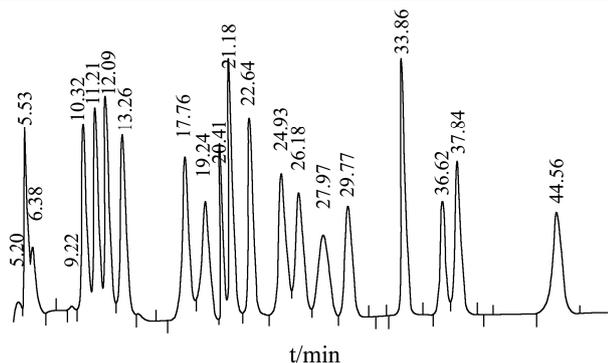


图2 混合氨基酸标准品色谱图

Fig.2 Chromatogram of mixed amino acid standards

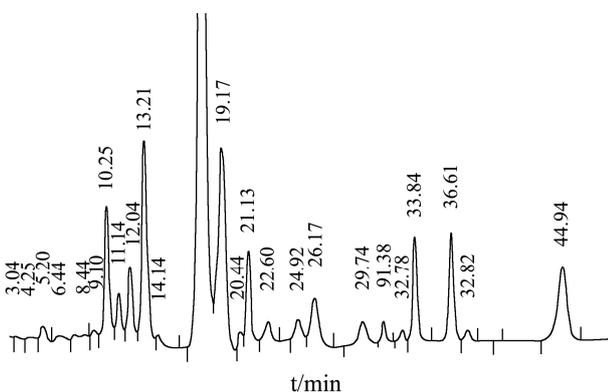


图3 样品水解氨基酸分离图谱

Fig.3 Chromatogram of samples containing hydrolyzed animal protein

3 结论

利用氨基酸自动分析仪法能准确地测定乳制品中羟脯氨酸的含量,该方法样品处理简便易操作,可以对羟脯氨酸直接进行分析,避免了衍生产物的多样性,也不涉及样品中氨基酸衍生不彻底等问题,能快速、准确地判断乳制品中是否添加了动物胶原水解蛋白。

参考文献

- [1] 刘芳,李德富,林炜.羟脯氨酸含量的测定方法与应用.中国皮革[J].2007,36(15):51-54
- [2] 沈同,王镜岩.生物化学(上册)[M].北京:高等教育出版社,1980
- [3] 刘婷,姜金斗,刘宁.HPLC-OPA 柱后衍生离子交换法对奶粉中掺水解动物蛋白检测方法的研究.食品工业科技[J].2007, (7):207-209
- [4] 李景红,杨再山,孟祥晨.比色法检测乳中掺加的动物胶原水解蛋白.中国乳品工业[J].2007,35(9):50-52
- [5] 陈雄伟,王桂芬.用 835-50 型氨基酸自动分析仪对羟脯氨酸的测定方法.氨基酸杂志[J].1985,4:5-6
- [6] 高建华,宁正祥.禽畜皮和鱼鳞的基本成分及氨基酸组成分析.现代食品科技[J].2007,23(12):77-79
- [7] 中华人民共和国国家标准.食品卫生检验方法:理化部分(二)GB/T 5009.124-2003,食品中氨基酸的测定

(上接第648页)

脂肪酶具有对油-水界面的亲和力,还能在油-水界面上以高催化速率水解的油脂^[1]。当油水乳化时,提供的相界面比较大,酶表现出较高的活力。因此我们还可以进一步研究乳化时间和酶的用量等因素对油脂水解的影响,为酶法富集多不饱和脂肪酸工艺奠定基础。

参考文献

- [1] 宋欣.微生物酶转化技术[M].北京:化学工业出版社,2004
- [2] 郑毅,施巧琴,黄建中,等.由扩展青霉(*Penicillium expansum*) PF868 产生脂肪酶催化油脂水解的研究[J].工业微生物,1999,29(1):17-20
- [3] 龚福生,施巧琴,吴松刚.不同微生物碱性脂肪酶对底物水解能力的比较[J].福建轻纺,2000,128(1):1-4
- [4] 田永全.脂肪酸的营养功能[J].中国食物与营养,2007,8:51-52

- [5] Frank D Gunstone. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids [J].J.Sci.Food Agric.,1999,79(7): 1535-1549
- [6] 高贵,韩四平,王智,等.脂肪酶活力检测方法的比较[J].药物生物技术,2002,9(5):281-284
- [7] 刘志国.生物化学实验[M].武汉:华中科技大学出版社,2007
- [8] 魏决,罗雯,陈玲.酶法从紫苏子油中制取 α -亚麻酸工艺研究[J].食品科学,2005,26(1):131-133
- [9] 雷炳福,孙登文,刘福祯,等.脂肪酶催化油脂水解反应的应用研究[J].中国油脂,1996,21(4): 10-12
- [10] 陈小泉,古国榜.洗涤剂用碱性脂肪酶稳定剂研究[J].南华大学学报(理工版),2001,15(2):17-19
- [11] 陈少欣,林文鑫,黄惠莉.脂肪酶水解植物油及动力学参数的测定[J].福建化工,1995,4:17-19