

液相色谱法与氨基酸分析法测定食品中甘氨酸的比较研究

刘小力

(国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

摘 要: 建立对食品中游离甘氨酸经提取、净化等处理后, 邻苯二甲醛衍生, 经高效液相色谱测定分析, 并将该方法与氨基酸分析仪测定甘氨酸的方法进行比较研究。通过对市售的液体乳、含乳饮料(品)类和植物蛋白饮料(品)类中游离甘氨酸分别应用两种方法进行测定, 结果表明, 氨基酸分析仪法测定甘氨酸具有测定结果稳定准确、检出限低和操作简单的特点, 而液相色谱法(荧光检测器)测定甘氨酸检测时间快, 检出限也能满足常规检测的需要, 因此, 在实际应用中, 两种方法均可采用, 可作为互相验证的方法。

关键词: 甘氨酸; 液相色谱; 氨基酸分析

Comparative Study of Determination Methods for Glycine in Foods

LIU Xiao-li

(National Food Quality & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

Abstract: Glycine, as a non-essential amino acid in the human body, has the simplest structure among amino acid series. Glycine is widely used as a food additive with the maximum level of 1.0 g/kg in the food industry. Recent years, industrial grade glycine is illegally used in food products to substitute milk or improve protein content. In this paper, an HPLC method was established for the determination of glycine and compared with the amino acid analyzer method. Meanwhile, glycine contents in commercial milk, milk drink and plant protein products were determined by the HPLC method and the amino acid analyzer method. The results indicated that the amino acid analyzer method had advantages of stable and accurate results, low detection limit and simple operation procedures, while the HPLC method had the advantages of time saving and enough low detection limit compared with the routine fluorescence detection. Therefore, both methods can be applied for practical determination of glycine in food products as mutual authentication methods.

Key words: glycine; HPLC; amino acid analysis

中图分类号: TS252.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)18-0254-04

近年来, 我国相继出现了奶粉中添加乳清粉、添加动物水解蛋白、三聚氰胺的恶性食品安全事件。甘氨酸是氨基酸系列中结构最为简单, 人体非必需的一种氨基酸, 在国内外应用广泛^[1]。在我国的 GB 2760—2011《食品添加剂使用卫生标准》中, 甘氨酸被列为合成香料的一种, 标准中规定其使用范围为调味料及豆奶, 最大使用限量为 1.0g/kg^[2]。近年来, 我国出现一些不法企业为了提高蛋白质含量, 用成本较低的甘氨酸来代替乳粉, 甚至在生产过程中违规使用或掺杂工业级甘氨酸, 制造劣质或完全不含有乳成分的假“乳饮料”, 其添加量甚至远远超出 GB 2760—2011 中规定的 1.0g/kg, 给消

费者带来潜在的安全隐患。在我国, 根据 GB 2760—2011 规定, 含乳饮料中未将甘氨酸作为可以使用的食品添加剂^[2]。在美国, 根据食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)关于食品添加剂使用范围及限量的有关规定^[3], 甘氨酸作为特殊膳食和营养添加剂可在所有食品中添加, 但添加后食品中最终的甘氨酸总量(以游离氨基酸计)小于等于总蛋白质质量的 3.5%^[4]。在我国, 由于产品标准有关于蛋白质含量的要求, 一些不法企业为了使产品的蛋白质达标, 早期的办法是提高产品中牛奶(或奶粉)的含量, 但这样产品的成本也就会随之增高。而使用甘氨酸正好达到降低成本又使蛋白质

收稿日期: 2011-06-28

作者简介: 刘小力(1980—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全。E-mail: frida.liu@cfqs.org

含量达标这一目的,奶粉的蛋白质含量一般为25%,但甘氨酸的蛋白质含量为100%,也就是说,在产品中仅添加1份甘氨酸,便可达到使用4份奶粉的效果^[5]。这些不法企业,为牟取暴利,钻标准不完善的空子,不顾消费者的健康和利益,在生产过程中大量使用或掺杂工业级甘氨酸,制造劣质或不含乳成分的“乳饮料”,这样的“乳饮料”由于使用工业级的甘氨酸重金属溶剂残留等有害物质,危害人体健康。

因此,建立快速、易于推广的甘氨酸检测方法,将为政府监管提供有力的技术支撑。根据现有的研究基础,甘氨酸测定方法有纸色谱法、离子交换色谱法、反相高效液相色谱法、毛细管电泳法、薄层色谱法、气相色谱法等^[6]。本实验选择邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生-液相色谱和氨基酸分析仪建立甘氨酸的定性、定量测定方法,并将两种快速测定方法进行比较分析,为避免违法滥用甘氨酸情况的出现提供技术上的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

液体乳、含乳饮料(品)类和植物蛋白饮料(品)类市购。

甘氨酸标准品(纯度>99%)、邻苯二甲醛(OPA)、巯基乙醇、乙腈、乙酸铵;氨基酸分析用试剂(柠檬酸三钠、氢氧化钠、氯化钠、盐酸、柠檬酸、乙酸钠、冰醋酸、无水乙醇、乙二醇甲醚、茚三酮)均为优级纯;0.4mol/L 硼酸钠缓冲液;衍生试剂的配制:称取0.1g OPA用10mL 甲醇溶解,加0.1mL 乙硫醇,用0.4mol/L 硼酸钠缓冲液定容至100mL。

1.2 仪器与设备

1100 高效液相色谱仪(带荧光检测器) 美国安捷伦公司; L-8800 氨基酸分析仪 日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 提取和净化

准确量取液体乳、含乳饮料或植物蛋白饮料5.0mL于烧杯中,液体乳和乳饮料(品)类样品中加1倍乙腈振摇,植物蛋白饮料样品加2.5倍乙腈振摇,滤纸过滤(待样品出现絮状沉淀后过滤),滤液经0.45 μ m微孔滤膜过滤后上机测定。

如样品中游离甘氨酸的含量较高时,可将滤液用水适当稀释,使样液的质量浓度在标准曲线的范围之内。

1.3.2 液相色谱测定

1.3.2.1 测定方法

样品中游离甘氨酸经提取、净化等处理后,用邻苯二甲醛衍生,其衍生物经高效液相色谱分离,于荧光检测器检测。

1.3.2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent EclipseXDB-C₁₈(4.6mm $\times$ 250mm, 5 μ m); 流动相: A为0.02mol/L 乙酸铵溶液65%, B为25% 乙腈, C为10% 甲醇; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L; 荧光检测器: E_x = 330nm, E_m = 460nm。

1.3.2.3 定性、定量方法

采用标准物质的保留时间对样品峰进行准确性,采用外标法以峰面积计算定量,依次配制不同质量浓度的甘氨酸标准溶液进样分析,以质量浓度/(μ g/mL)为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.3 氨基酸分析仪测定

食品中游离氨基酸,经氨基酸分析仪的离子交换柱分离后,按照氨基酸分析仪设定的洗脱程序,用不同离子强度、pH值的缓冲液依次将氨基酸按吸附力的不同洗脱下来(先酸性氨基酸再中性氨基酸最后碱性氨基酸),被洗脱下来的氨基酸与茚三酮反应液在加热的条件下反应(135 $^{\circ}$ C),生成可在分光光度计中570nm和440nm检测到的蓝紫色物质(仲氨生成浅黄色物质440nm检测)外标法定量^[7]。甘氨酸为中性氨基酸,在10min左右出峰。

2 结果与分析

2.1 前处理方法的设定

比较采用1)透析袋去除大分子蛋白质^[8]; 2)采用95%乙醇除蛋白的方法^[9]; 3)采用蛋白沉降剂20%醋酸锌和15%亚铁氰化钾沉降蛋白^[10]; 4)乙腈除蛋白方法。实验结果表明,乙腈除蛋白效果较好,方法简单且回收率较高,对甘氨酸测定无干扰。因此,针对液体乳、乳饮料、植物蛋白饮料等食品,本实验采用乙腈除蛋白的净化方法。

2.2 OPA柱前衍生-液相色谱检测方法

2.2.1 衍生剂选择与衍生方法的设定

OPA衍生剂在2-巯基乙醇存在下与第一级氨基酸迅速反应生成1-硫代-2-烷基异吲唑,加成物经荧光检测器测定^[11]。苯异硫氰酸酯衍生剂与一、二级氨基酸反应,反应产物在原来氨基酸结构上引入苯环,使得能够用荧光检测器检测^[12]。但是PITC衍生时需要真空干燥以出去过量试剂,因此很难全部自动化。相比OPA衍生剂本身不干扰分离与检测,不必除去过量试剂,色谱图基线比较平稳^[13]。基于以上考虑,本方法中甘氨酸的测定采取OPA柱前衍生法。

样品自动柱前衍生程序为抽取样品5.0 μ L、冲洗进样针端口5.0s、抽取衍生液5.0 μ L、冲洗进样针端口5.0s、混合30次(混合时间为2min左右)进样(进样量为10 μ L)。

样品手动柱前衍生程序：用移液器准确移取样品滤液 0.5mL 于 2mL 的棕色自动进样瓶中，再准确加入 0.5mL OPA 衍生试剂，反应 1min 后，立即进样。

2.2.2 色谱条件的优化

流动相中乙酸铵溶液和甲醇的配制比例对甘氨酸的出峰时间和分离效果均有直接影响，这一比例的最终确定根据样品分离过程中甘氨酸与其他氨基酸峰完全分离为主要因素，其次选择适合的分离时间。根据表 1 选择乙酸铵、乙腈和甲醇的不同比例进行测定，最终选择流动相：A 为 0.02mol/L 乙酸铵溶液 65%，B 为 25% 乙腈，C 为 10% 甲醇，测定出峰时间在 7min 左右。

表 1 流动相选择

Table 1 Selection of optimal mobile phase composition

流动相	体积分数 /%		
	A	B	C
1	75	20	5
2	75	25	0
3	70	25	5
4	65	25	10

2.2.3 标准曲线

1g/L 甘氨酸标准储备液。甘氨酸标准工作液：将储备液稀释配成质量浓度为 0、1、5、10、15、20mg/L 的标准工作曲线，分别进行高效液相色谱分析。

2.2.4 方法检测限

在基质中加标，逐级稀释以 3 倍的信噪比确定检出限为 1 μg/g。

2.2.5 方法的回收率和精密度

准确称取同一种空白样品 6 份，每份 5.00mL，共 2 组，分别定量加入甘氨酸标准溶液，添加量分别为 100mg/L 和 200mg/L，按上述本方法样品处理、色谱条件及定性定量方法操作计算，回收率及精密度见表 2。从表 2 可看出，不同样品平均加标回收率 94.6%~101.4%，平均相对标准偏差为 0.94%~1.79%(n=6)。

表 2 样品加标回收率与精密度实验相对标准偏差(n=6)

Table 2 Recovery rates and RSDs for glycine determination in spiked samples (n=6)

样品	添加量/(100mg/L)		添加量/(200mg/L)	
	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
液体乳	98.3	1.02	99.3	0.94
乳饮料	95.1	1.24	101.4	1.11
植物蛋白饮料	94.6	1.79	94.9	1.53

2.3 氨基酸分析仪测定方法

氨基酸分析仪是通过离子交换色谱法分离具有共性而又有差别的各种氨基酸混合物分离进行定量。甘氨酸与

大多数蛋白质氨基酸一样，具有与水合茚三酮产生显色反应，生成蓝紫色化合物，在 570nm 处有最大吸收^[14]。

依据 GB/T 5009.124—2003《食品中氨基酸的测定》方法^[15]。采用准确吸取 0.200mL 混合氨基酸标准，用 pH2.2 的缓冲液稀释到 5mL，此标准稀释液浓度为 5.00nmol/50 μL，作为上机测定用的氨基酸标准，用氨基酸自动分析仪以外标法测定试样测定液的甘氨酸含量。方法检测限为 10pmol。

2.4 实际样品测定

2.4.1 液相色谱法测定甘氨酸

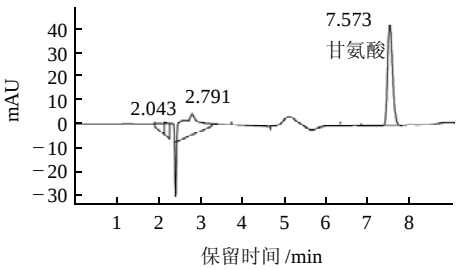


图 1 标准样品的液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatogram of standard sample

图 1 显示，甘氨酸标准样品经 OPA 衍生后测定，出峰时间再 7.573min，图 2 液体乳样品的测定显示，甘氨酸衍生物出峰时间在 7.581min，出峰前后无其他氨基酸衍生物干扰，此方法可用作甘氨酸定性及定量的测定方法。

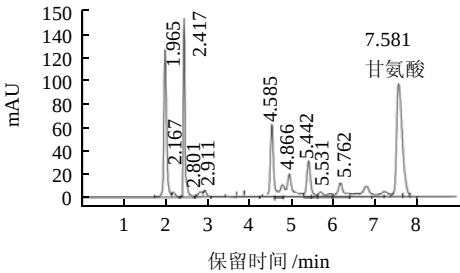


图 2 液体乳样品中甘氨酸的液相色谱图

Fig.2 Liquid chromatogram of milk sample

2.4.2 氨基酸分析仪法测定甘氨酸

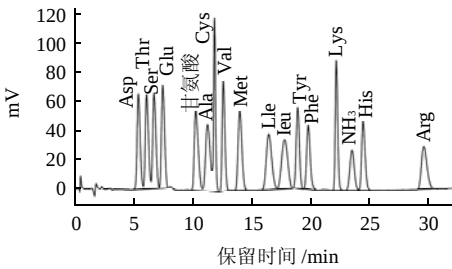


图 3 氨基酸标准混合液测定图

Fig.3 Results obtained for determination of mixed amino acid standard samples by amino acid analyzer

由图3可见,测定的是氨基酸标准混合液,甘氨酸出峰时间在10.37min,图4中,第5个峰为液体乳样品中甘氨酸峰,出峰时间在10.41min,甘氨酸后面峰为丙氨酸,分离较好,出峰无干扰。

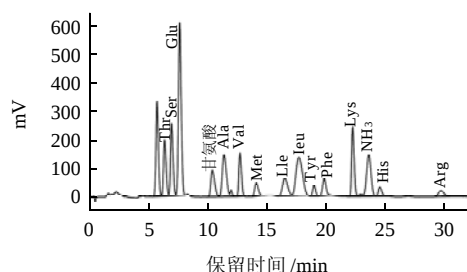


图4 液体乳样品中氨基酸测定图

Fig.4 Results obtained for determination of amino acids in liquid milk sample by amino acid analyzer

3 结 论

OPA柱前衍生-HPLC法测定液体乳、含乳饮料等产品中游离甘氨酸的含量,具有方法简单反应快、灵敏,过量试剂不干扰检测,不必除去,紫外、荧光均可检测。缺点是反应产物不稳定,需要在线分析,但是目前行业中应用的液相色谱分析仪,基本都具有在线自动衍生功能,鉴于液相色谱仪的普及面广,因此,此方法更易于推广和应用。

利用氨基酸分析仪分析法能准确地测定液体乳、含乳饮料等产品中游离甘氨酸的含量,该方法样品处理简便易操作,可以对甘氨酸直接进行分析,避免了衍生产物的多样性,而且无需判断降解物的来源,也不涉及样品中氨基酸衍生不彻底等问题,能快速、准确地判断含乳饮料中是否添加了游离甘氨酸。

因此,在液体乳、含乳饮料等产品的甘氨酸测定应用中,两种方法均可采用,并且可作为互相验证的方法。

参考文献:

- [1] 宋彦梅,尹秋响,王静康.甘氨酸的应用及生产技术[J].氨基酸与生物资源,2003,25(2):55-56
- [2] GB 2760—2011 食品添加剂使用卫生标准[S].
- [3] 丁汉东.主要贸易国家和地区食品添加剂法规标准汇编[M].广州:广东科技出版社,2006:286-287.
- [4] 冯志强,周兴起,庄俊钰,等.氨基酸分析仪测定含乳饮料中游离甘氨酸的方法研究[J].现代食品科技,2007,23(7):89-91.
- [5] 王丁棉.甘氨酸的滥用引发食品安全危机-浅谈对甘氨酸的认识[J].广东奶业,2006(4):3-5.
- [6] 戴红,张宗才,张新申.氨基酸分析的检测方法评述[J].皮革科学与工程,2004,14(3):39-43.
- [7] 吴显荣,邱开义,李建凡,等.氨基酸分析技术(上)[M].北京:北京理化分析测试技术学会,1984:21-22.
- [8] 宁啸骏,张燕琴.高效液相色谱法测定含乳饮料中游离甘氨酸的方法研究[J].食品发酵与工业,2006(11):136-139.
- [9] 金瑛,寇琳娜,张曼玲,等.含乳饮料中甘氨酸与谷氨酸及蛋白质的比例关系及其在造假乳饮料判定中的应用[J].中国乳品工业,2007,35(9):44-46.
- [10] 王洁,赵征.硬质干酪加工工艺的研究[J].食品研究与开发,2006(5):63-65.
- [11] 宋志峰,王丽.氨基酸分析中柱前衍生技术[J].吉林农业科学,2004,29(6):54-58.
- [12] JONES B N, GILLIGEN J P. Derivative method choice for determination by liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 1983, 266: 471-473.
- [13] BIDDINGMEYER A, COHENS A, TARVINT L. The advantages of phenyl isothiocyanate derivative agent for sample preparation[J]. J Chromatogr A, 1984, 336: 93-95.
- [14] 劳燕文.日立835与8800氨基酸分析仪的应用比较研究[J].现代仪器,2004(4):52-53.
- [15] GB/T 5009.124—2003 食品中氨基酸的测定[S].