

奶制品中复原乳的鉴定方法： 使用超高效液相色谱法分析奶制品中的 糠氨酸

作者

李浪
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文采用 Agilent 1290-II 四元梯度液相色谱系统，结合具有表面多孔填料的 Agilent Poroshell 120 SB-C18 色谱柱，在农业部行业标准《巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定》(NY/T 939-2016) 的基础上建立了快速、高灵敏度分析奶制品中糠氨酸 (Furosine) 的超高效液相色谱 (UHPLC) 方法。

该方法可分析不同基质奶制品中的糠氨酸，分析速度快、分离效果好，且杂质对分析的影响小。

前言

糠氨酸的含量测定是奶制品的评测方法之一。大量文献表明，奶制品经高温处理后品质会受到不同程度的影响，而糠氨酸正是奶制品经高温处理后发生美拉德反应的产物，因此测定奶制品中糠氨酸的含量是衡量其经高温处理后变化程度的手段之一。通常情况下，采用巴氏灭菌法消毒的奶制品因处理温度不高且处理时间不长等因素，而与未经处理的原奶相似，其中的糠氨酸含量较低，而成品奶粉因处理方式不同等原因，糠氨酸含量高很多。因此在农业部行业标准中，将糠氨酸的含量测定作为区分巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的手段之一。^{[1]、[2]}

糠氨酸的极性很强，在普通反相 C18 色谱柱上的保留不好，不容易与经强酸处理后产生的大量极性杂质分离。因此所用色谱条件比较特殊，需要使用离子对试剂或极低比例的有机相才能勉强分离极性杂质。而使用离子对试剂又会对色谱柱造成很大伤害，导致色谱柱变性并降低方法的一致性。而有机相比例低的色谱条件则需要特殊的耐水性色谱柱及高性能色谱仪器配合。这给糠氨酸的测定带来了困难。^[3]

安捷伦标志性的 SB-C18 是业界非常广泛使用的耐酸色谱填料，而采用表面多孔填料技术的 Poroshell 120 硅胶基质是一种先进的超高效色谱基质，可在压力升高不多的同时实现柱效的极大提升。相比离子对试剂，在采用超高效液相色谱法分析糠氨酸时使用 Poroshell 120 SB-C18 色谱柱，将对行业标准的推广带来巨大利益。

实验部分

试剂和样品

甲醇、三氟乙酸为色谱纯级，购于迪马公司；实验用水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备的高纯去离子水；糠氨酸标准品由用户提供；脱脂奶粉、A2 婴儿奶粉样品及原奶分别由不同的用户提供，巴氏杀菌奶购自市场。

仪器和设备

Agilent 1290 Infinity II 四元梯度液相色谱系统，配备如下安捷伦组件：

- 1290 Infinity II 全能泵（部件号 G7104A）或 1260 Infinity II Prime 泵（部件号 G7104C）
- 带柱温箱的 1290 Infinity II 型自动样品瓶进样器（部件号 G7129B 或 G7129C）
- 1290 Infinity II 二极管阵列检测器（部件号 G7117A），配备光程 10 mm 的标准光导纤维流通池

本实验选用的安捷伦色谱柱为：Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm（部件号 685975-902）。

标准品制备

参照行业标准 (NY/T 939-2016) 的方法，用户提供已配置好的 2 mg/L 标准样品（溶于浓盐酸）。

样品前处理

参照行业标准 (NY/T 939-2016) 的样品处理方法，用浓度为 10.6 mol/L 的 HCl 水解奶制品样品并加热，24 小时后取出，冷却后用 0.45 μm 的醋酸纤维膜过滤。取 300 mL 滤液，加 1.0 mL 6 g/L 醋酸钠水溶液混合；用 0.22 μm 水相滤膜过滤后进样。

液相色谱条件

色谱柱： Poroshell 120 SB-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm

流速： 1.0 mL/min

柱温： 35 °C

流动相： A: 0.1% 三氟乙酸 (TFA)

B: 甲醇

梯度程序：

时间 (min)	0.1% TFA 水溶液	甲醇
0.0	100	0
6.0	95	5
7.0	5	95
9.0	5	95
9.5	100	0
15.0	100	0

进样量： 2 μL（用超纯水洗针 3 秒）

检测器： 280 nm, 4 nm 带宽；参比波长 360 nm, 100 nm 带宽

结果与讨论

本实验选择了糠氨酸含量差异较大的几种代表性奶制品作为样品，分别是用户提供的脱脂奶粉、普通婴儿配方奶粉、A2 婴儿配方奶粉、全脂奶粉、原奶及市场上售卖的全脂巴氏消毒鲜牛奶等六种奶制品。

图 1 是六种不同种类奶制品与标准样品的叠加色谱图，以及各样品中糠氨酸的叠加光谱图。如图所示，各样品的糠氨酸组分与各自含有的杂质实现了良好分离，样品及标准样品的糠氨酸峰保留时间重现性非常好。从小图中的叠加光谱可以看出，所有糠氨酸的紫外光谱图能很好重叠，说明色谱峰的纯度很高，基本没有杂质的干扰，即使是糠氨酸含量很低的原奶和巴氏消毒奶的糠氨酸光谱图也能很好地重叠。

很多文献中都有提及，样品中的基质经常会造成标准样品与样品的保留时间不一致。一个文献没有提到的原因是，低比例梯度对仪器的梯度性能要求较高，但并不是所有仪器都能满足要求。保留时间的不稳定也是造成测定低含量样品时糠氨酸峰位置不确定，需要通过 LC/MS 来定性与定量分析的原因之一。

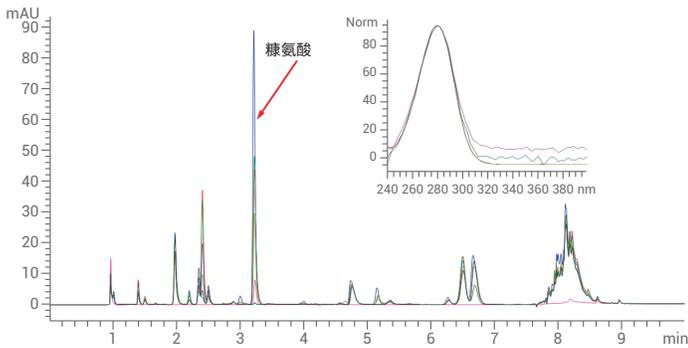


图 1. 标准样品与 6 种奶制品的色谱图（叠加图），小图为酪氨酸峰的叠加光谱图

图 2 是放大的色谱图，可看到原奶及巴氏消毒奶样品中含量很低的酪氨酸的峰都可以无干扰地清晰呈现。以标准样品浓度 2 mg/L 计算，酪氨酸含量最高的脱脂奶粉样品中酪氨酸溶液浓度约为 21 mg/L，而酪氨酸溶液浓度很低的巴氏杀菌乳中仅为 0.16 mg/L。

因本实验没有使用凯氏定氮法具体测定奶制品的蛋白含量，故根据脱脂奶粉样品包装上标称的蛋白质含量 37% 计算，酪氨酸的含量约为 600 mg/100 g。而根据市场售卖的巴氏杀菌乳包装上标称的每百克含蛋白质 3.1 g 来计算，其酪氨酸的含量约为 2.2 mg/100 g。

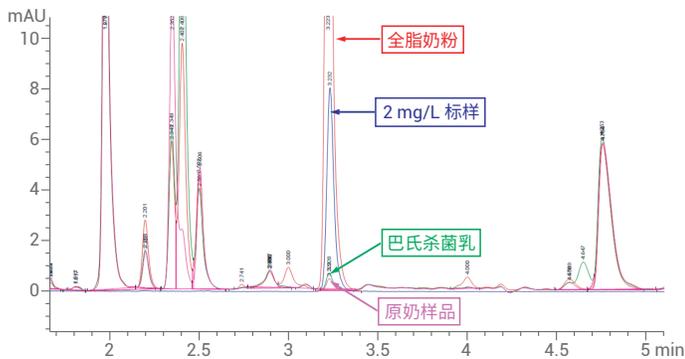


图 2. 放大的色谱图

结论

本实验使用 Poroshell 120 SB-C18 色谱柱，在农业部行业标准的基础上建立了准确、快速、重现性好的奶制品中酪氨酸分析的超高效液相色谱方法。该方法使用性能优异的 1290 Infinity II 四元梯度泵，或全新的 1260 Infinity II Prime 泵，在 0%-5% 的低比例有机相梯度条件下仍能保持很好的重现性。相比行业标准在超高效液相色谱方法中施行的等度条件，该方法具有更高的灵敏度，每次进样均采用高比例有机相冲洗杂质并进行平衡，可有效除去干扰杂质、避免杂质对分析的干扰，从而延长色谱柱的寿命，并使总分析时间缩短。使用流通式自动进样器后，无需用强有机溶剂清洗针内部，因此可以采用纯水作为针外壁及针座的清洗溶液，有效避免了样品中的高浓度盐酸对进样器针座的腐蚀。

参考文献

1. 农业部行业标准：巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定 (NY/T 939-2016)
2. Anatol Schmidt, Lisa I. Boitz, Helmut K. Mayer. A new UHPLC method for the quantitation of furosine as heat load indicator in commercial liquid milk. *Journal of Food Composition and Analysis*. 56 (2017) 104–109
3. 付洪涛、欧阳华学、雪绍芳，高效液相色谱法测定复原乳中酪氨酸的含量，*中国测试技术*，Vol. 34 No.2. 2008 年 3 月

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018年3月15日，中国印刷
5991-9017ZHCN

