

游离酪氨酸法鉴定高蛋白含量辐照食品

吴 敏^{1*}, 李久兴², 张志刚¹, 周 昱¹, 徐敦明¹

(1. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361026; 2. 厦门大学 化学生物系, 福建 厦门 361002)

摘 要: 建立了高效液相色谱-游离酪氨酸法鉴定高蛋白含量辐照食品的方法。向经过辐照的高蛋白含量样品中加入 0.1 mol/L HCl, 使细胞裂解并释放出游离酪氨酸, 离心除去细胞碎片后, 向上清液中加入 80% 丙酮并在 -20 °C 下冰冻沉淀除去大部分蛋白, 样品中的酪氨酸与三氟乙酸形成离子对后经 C₁₈ 色谱柱分离。在 100 ~ 1 500 µg/L 质量浓度范围内, 邻酪氨酸和间酪氨酸均具有良好线性, 方法的回收率为 61% ~ 116%, 定量下限 ($S/N \geq 10$) 为 10 µg/L。该法避免了蛋白质的水解, 具有操作简便、测定准确等优点, 能很好地区分未经辐照与经 5 kGy 以上剂量辐照的食品。

关键词: 游离酪氨酸; 辐照食品; 高效液相色谱; 鉴定

中图分类号: O657.72; TQ464.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)10-1143-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.10.012

Identification of Irradiated Protein-rich Food by Dissociative Tyrosine

WU Min^{1*}, LI Jiu-xing², ZHANG Zhi-gang¹, ZHOU Yu¹, XU Dun-ming¹

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China;

2. Department of Chemobiology, Xiamen University, Xiamen 361002, China)

Abstract: A novel method was presented for identification of irradiated protein-rich food by HPLC with dissociative tyrosine. The procedure involved the homogenization of fresh sample with 0.1 mol/L HCl, followed by centrifugation to remove the cell debris and the solvent precipitation of protein with acetone at -20 °C, then the tyrosine was separated by forming ion pair with trifluoroacetic acid on a C₁₈ column. The average recoveries of the drugs ranged from 61% to 116% at the spiked levels of 100 ~ 800 µg/L. The method is simple and double-quick, and could be efficiently identified food sample irradiated at a dose of 5 kGy or above.

Key words: dissociative tyrosine; irradiated food; HPLC; identification

食品辐照是用射线照射食品以达到杀虫、杀菌和延长保质期等目的的技术。1980年在日内瓦召开的辐射食品安全卫生性问题国际会议从辐射化学、营养学、微生物学、毒理学方面确认了辐照食品的安全性^[1]。目前辐照食品常用的检测方法有基于测量食品硬组织在辐照后形成长寿自由基的电子自旋共振法^[2]和测量食品中硅酸盐在辐照后形成高能电子的热释光法^[3-4], 以及2-烷基环丁酮法^[5]、挥发性碳氢化合物法^[6]、微生物筛选法^[7]、光释光法^[8]等, 欧盟也颁布了辐照食品的标准检测方法^[9-13]。

通过辐照, 高蛋白含量食品中的游离苯丙氨酸(图1)或蛋白质中的苯丙氨酸残基会转变为酪氨酸(包括邻酪氨酸、间酪氨酸和对酪氨酸, 结构式见图1), 且生成的酪氨酸与辐照剂量在较大的范围内成正比。由于基体本体中通常含有大量的对酪氨酸, 而间酪氨酸和对酪氨酸

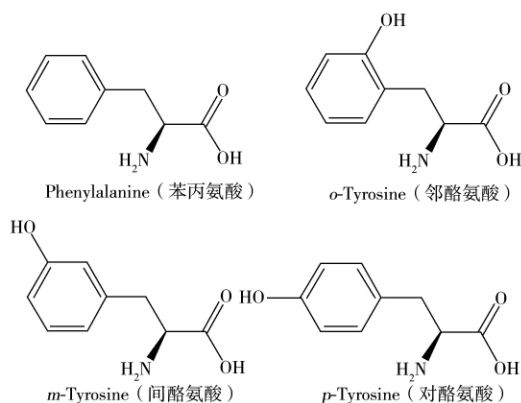


图1 苯丙氨酸与3种酪氨酸的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of phenylalanine and three tyrosines

收稿日期: 2011-05-11; 修回日期: 2011-06-29

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研计划资助项目(2009IK183)

* 通讯作者: 吴 敏, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测, Tel: 0592-3269943, E-mail: wum@xmciq.gov.cn

酸极性相似较难分离,因此通常选用邻酪氨酸作为辐照食品的标记物。传统的酪氨酸法通过用盐酸高温隔夜水解样品中的蛋白,并采用高效液相色谱法对水解释放的酪氨酸进行分离测定^[14-16]。但通常酸水解产生的基底复杂,难分离,且方法耗时长、重现性差^[17]。

本文采用0.1 mol/L的盐酸使细胞裂解,向其中加入约80%丙酮,在-20℃沉淀除去大部分蛋白,以三氟乙酸作为离子对试剂,通过C₁₈色谱柱/荧光检测分离测定游离苯丙氨酸生成的邻酪氨酸和间酪氨酸,能很好地区分高蛋白含量食品是否经过5 kGy及以上剂量的辐照,从而建立了高效液相色谱-游离酪氨酸法鉴定高蛋白含量辐照食品的分析方法。该方法避免了高温酸水解,具有快速、准确、灵敏、抗干扰能力强的特点,适用于高蛋白含量辐照食品的检测鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695-2475 高效液相色谱/荧光检测器(美国 Waters 公司), Allegra 64R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司), IKA T18 分散机, KQ3200DA 型数控超声波清洗器, 氮气浓缩仪。

邻酪氨酸、间酪氨酸、苯丙氨酸标准品(纯度大于99%, Sigma-Aldrich 公司); 乙腈、三氟乙酸均为色谱纯,其它试剂均为分析纯;超纯水由 Milli-Q 系统(美国 Millipore 公司)制得。

1.2 标准工作液的配制

准确称取适量的邻酪氨酸、间酪氨酸标准品,用0.1 mol/L HCl 溶解并定容,配成质量浓度为0.1 g/L 的标准储备液;根据需要将标准储备液逐级稀释,配成适当质量浓度的标准工作液,于4℃下保存。

1.3 样品处理

于离心管中称取1 g(精确至0.01 g)均质好的样品,加入4 mL 0.1 mol/L HCl, 20 000 r/min 均质30 s,室温下超声15 min,以16 000 r/min 离心10 min,将上清液转入另一离心管,向其中加入11 mL 丙酮,混匀,-20℃冷冻2 h。取出离心管,4℃下以16 000 r/min 离心10 min。将上清液转入20 mL 试管,50℃氮气吹干,残渣用1 mL 0.1 mol/L HCl 溶解,溶液转入4 mL 离心管,以16 000 r/min 离心10 min,上清液过0.22 μm 滤膜后待 HPLC 测定。

1.4 色谱条件及参数

X BridgeTM C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相:0.1% 三氟乙酸溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱程序:0~15 min, 95% A; 15.1 min 时降至60% A 并保持至20 min; 20.1 min 时升至95% A 并保持至26 min; 流速1 mL/min。进样量10 μL;柱温35℃;检测器激发波长275 nm,发射波长305 nm。

2 结果与讨论

2.1 方法原理初探

传统酪氨酸法测定辐照食品是将样品用丙酮和三氯甲烷混合液除脂后,以2 mol/L 的盐酸在110℃下真空隔夜水解蛋白,再采用 HPLC 测定释放出的酪氨酸,以考察样品是否经过辐照。此方法耗时长、背景杂质干扰大、重现性差^[18]。

苯丙氨酸是带有芳香环的中性氨基酸,在pH 7.0 条件下因羧基端带负电,氨基端带正电而使整个分子呈电中性,其在细胞中可以游离形式或通过肽键结合存在于蛋白质中。而水在γ射线的照射下会生成羟基自由基、氢自由基、氢离子和水合电子,其中羟基自由基会进攻苯丙氨酸的邻、间、对位,进而生成相应的酪氨酸。蛋白质中的苯丙氨酸残基受到蛋白质三维折叠构象的保护,且在不同蛋白质中受到的保护程度不同,因而受到羟基自由基进攻的概率小于游离苯丙氨酸,即蛋白质中的苯丙氨酸残基在辐照后生成酪氨酸的产率低于游离苯丙氨酸。因此用游离酪氨酸法检测辐照食品能够得到更低的检出限和更高的准确度。

2.2 样品的净化

实验采用超声提取后加入丙酮并冷冻离心除去蛋白的净化方法。在一定盐浓度的水溶液中,蛋白

质由于表面吸附离子带上相同电荷导致相互排斥而稳定存在于溶液中。当加入有机溶剂时, 有机小分子会竞争性地与蛋白质结合而使蛋白质变性, 变性的蛋白质相互团聚而发生沉淀。研究发现, 蛋白质在 80% 丙酮水溶液中的溶解度最低, 冷却能够进一步降低其溶解度^[18]。因此在超声离心后样品的上清液中加入约 11 mL 丙酮, 于 -20 ℃ 下冰冻 2 h 沉淀可除去大部分蛋白。实验对比了加标 1 mg/L 邻酪氨酸的虾肉样品和加丙酮冷冻离心除蛋白后上清液的干燥方法, 结果表明以氮气吹干方式进行干燥可得到更好的回收率。

2.3 色谱条件的优化

苯丙氨酸含有大的苯环共轭体系, 可发射荧光, 因此可通过选择性荧光检测降低非荧光物质的背景信号。而酪氨酸是在苯环的邻位、间位或对位增加了 1 个给电子羟基取代基, 从而共享了共轭 PI 电子结构, 扩大了共轭双键体系, 使酪氨酸的荧光效率相对于苯丙氨酸得到进一步增强, 因此选用荧光检测器能有效排除干扰且获得很好的灵敏度, 通过优化得出酪氨酸的最佳激发波长为 275 nm, 发射波长为 305 nm。

为了比较对酪氨酸、邻酪氨酸、间酪氨酸和苯丙氨酸对于实际样品的抗杂质干扰能力, 本实验优化了流动相体系和梯度洗脱程序, 结果表明, 在“1.4”色谱条件下, 苯丙氨酸和 3 种酪氨酸均有良好保留, 且峰形良好, 能有效避免杂质干扰, 得到良好分离。图 2 为对酪氨酸、间酪氨酸、邻酪氨酸和苯丙氨酸 4 种混合标准溶液 (0.5 mg/kg) 的液相色谱图, 其保留时间分别为 6.8、8.4、12.8、16.3 min。

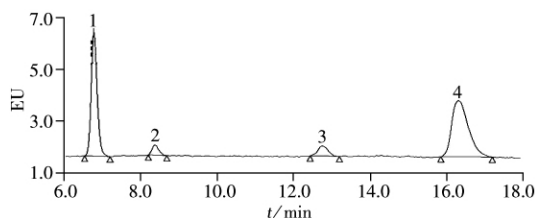


图 2 4 种氨基酸混合标准溶液 (0.5 mg/kg) 的液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of four amino acids standard mixture

1. *p*-tyrosine, 2. *m*-tyrosine, 3. *o*-tyrosine, 4. phenylalanine

2.4 方法的线性范围、定量下限与回收率

在邻酪氨酸和间酪氨酸的质量浓度为 100、200、400、800、1 000、1 500 $\mu\text{g/L}$ 时, 以峰面积 (y) 和对应酪氨酸的质量浓度 (x , $\mu\text{g/L}$) 绘制标准工作曲线。结果表明, 在 100 ~ 1 500 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内, 邻酪氨酸和间酪氨酸的线性方程分别为 $y = 1\,288x$ 和 $y = 1\,286x$, 相关系数均大于 0.999, 定量下限 ($S/N \geq 10$) 为 10 $\mu\text{g/L}$ 。

以鸡肉和虾肉样品为基质进行加标回收率实验, 选择邻酪氨酸和间酪氨酸的加标水平为 100、200、400、800 $\mu\text{g/L}$, 每个水平进行 6 次平行实验, 按本方法测定, 各加标水平的回收率和精密密度数据见表 1。结果表明, 邻、间酪氨酸的回收率为 61% ~ 116%, 相对标准偏差均不大于 12.7%。

表 1 鸡肉和虾肉样品中邻酪氨酸和间酪氨酸的加标回收率和相对标准偏差 ($n = 6$)
Table 1 Recoveries and RSDs of *o*-tyrosine and *m*-tyrosine in chicken and shrimp sample ($n = 6$)

Compound	Spiked $\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Shrimp sample		Chicken sample	
		Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
<i>o</i> -Tyrosine	100, 200, 400, 800	94, 70, 67, 79	3.9, 6.6, 10.6, 11.2	113, 116, 80, 68	7.5, 7.0, 4.3, 2.4
<i>m</i> -Tyrosine	100, 200, 400, 800	61, 73, 67, 74	12.7, 9.2, 7.1, 2.1	62, 74, 63, 75	10.2, 6.3, 6.5, 3.4

2.5 辐照标记产物比较

通过对大量未经辐照样品的检测发现, 空白样品含有大量的对酪氨酸 (见图 3), 因此对酪氨酸不适于用作辐照的标记物。由图 3 可以看出, 对于虾肉样品, 邻酪氨酸和间酪氨酸均适于用作食品辐照的标记物; 鸡肉样品中邻酪氨酸的分离受到杂质峰的干扰, 而间酪氨酸能得到很好的分离, 因此鸡肉样品可通过间酪氨酸进行定量。进一步考察了邻酪氨酸和间酪氨酸的含量与辐照剂量的关系 (见表 2), 发现未辐照的虾肉和鸡肉样品大部分含有微量的邻酪氨酸, 但基本不含间酪氨酸, 因而间酪氨酸更适合作为鉴定辐照样品的标记产物。

由于辐照剂量与邻酪氨酸和间酪氨酸的含量呈线性关系, 本实验采用国际通用的表示方法——每千克样品中含有邻酪氨酸和间酪氨酸的微克量即 $\mu\text{g/kg}$ 为标准。取鸡肉、虾肉 2 种基质各 500 g, 绞碎后各分成 4 份, 送往辐照中心分别接受 0、5、10 kGy 的辐照剂量辐照, 然后在优化条件下对邻酪氨酸和间酪氨酸的含量进行测定, 每个剂量重复 8 次, 取平均值, 结果见表 2。结果发现辐照剂量与辐照产

生的邻酪氨酸和间酪氨酸含量呈线性相关，方法可用于高蛋白含量辐照食品的检测鉴定。

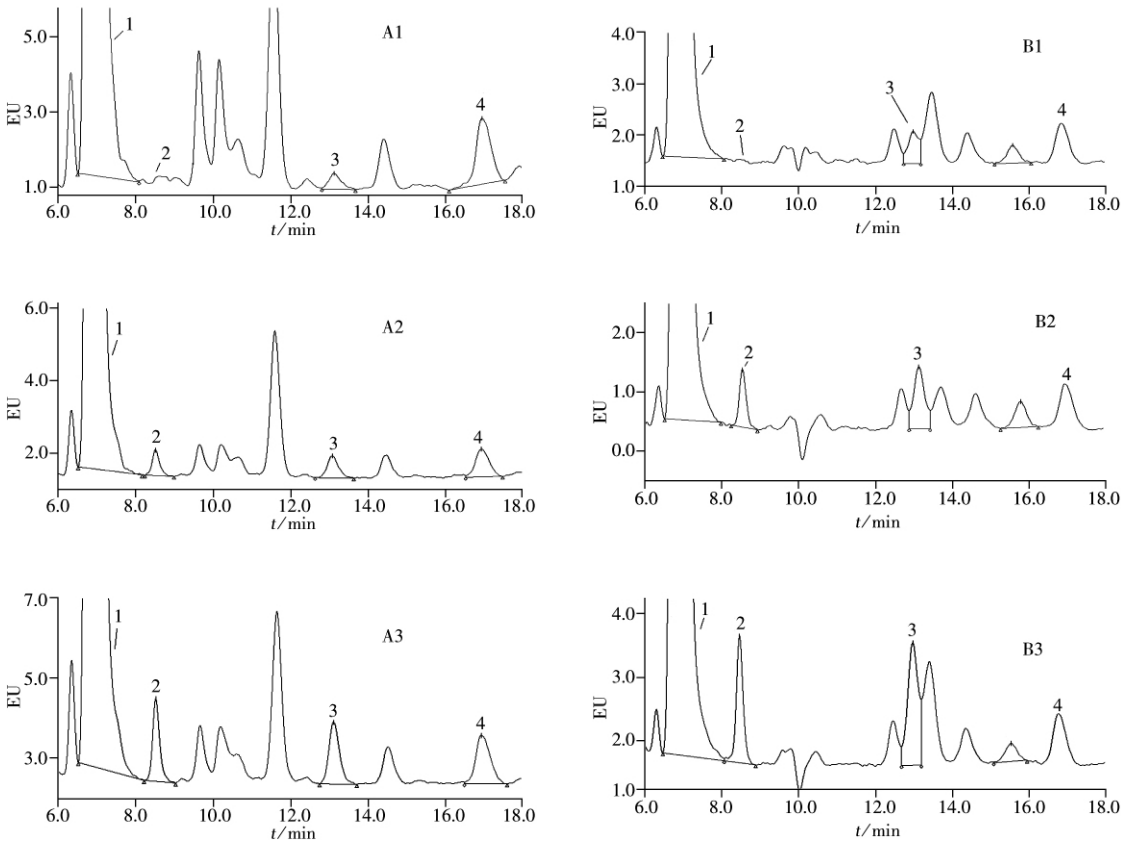


图 3 辐照虾肉(A)与鸡肉(B)样品的液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of irradiated shrimp(A) and chicken(B) sample
irradiated intensity: A1 , B1: 0 kGy , A2 , B2: 5 kGy , A3 , B3: 10 kGy; 1. *p*-tyrosine , 2. *m*-tyrosine ,
3. *o*-tyrosine , 4. phenylalanine

表 2 邻酪氨酸和间酪氨酸的含量与辐照剂量的关系($n=8$)

Table 2 Radiation-induced yield of *o*-tyrosine and *m*-tyrosine as a function of the absorbed dose($n=8$)

Matrice	Compound	Dose (kGy)	Mean $\bar{w}/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	RSD $s_r/\%$	r
Shrimp	<i>o</i> -Tyrosine	0 , 5 , 10	70.4 , 95.1 , 178.5	13.1 , 8.7 , 7.1	0.970
	<i>m</i> -Tyrosine	0 , 5 , 10	- [*] , 71.1 , 153.2	- , 8.7 , 7.6	0.998
Chicken	<i>o</i> -Tyrosine	0 , 5 , 10	92.8 , 170.4 , 288	9.1 , 4.9 , 3.6	0.986
	<i>m</i> -Tyrosine	0 , 5 , 10	- [*] , 135.3 , 233.7	- , 6.1 , 5.7	0.992

* no detected

3 结 论

本文采用高效液相色谱-游离酪氨酸法鉴定高蛋白含量的辐照食品，以超声提取，加入丙酮并冷冻离心除蛋白的方式净化，外标法定量。具有快速、准确、灵敏、抗干扰能力强的特点，定量下限为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，样品中 3 种酪氨酸异构体均能得到良好分离，受样品基质的影响较小，具有较宽的线性范围和较好的精密度。该法能很好地区分未经辐照与经 5 kGy 以上剂量辐照的食品，且检测出的邻酪氨酸和间酪氨酸的含量与辐照剂量成正比关系。

参考文献:

[1] Ha Y M. *Irradiated food and its security*. Beijing: Chemical Industry Press (哈益明. 辐照食品及其安全性. 北京: 化学工业出版社), 2006: 112-113.
[2] Zhao Y F, Ha Y M, Liu T, Wang R F, Wang C B. *J. Radiat. Res. Radiat. Process* (赵永富, 哈益明, 刘婷, 王荣富, 汪昌保. 辐射研究与辐射工艺学报), 2007, 25(5): 279-282.

- [3] Shu K F, Ha Y M, Zhou H J, Wang F. *Food Sci. Technol.* (舒昆峰, 哈益明, 周洪杰, 王锋. 食品科技), **2006**, 31(9): 256–258.
- [4] Zhou H J, Wang F, Shu K F, Zhang D Q, Ha Y M. *Food Sci.* (周洪杰, 王锋, 舒昆峰, 张德权, 哈益明. 食品科学), **2006**, 27(6): 164–167.
- [5] Han L, Wang M, Wang C X, Yang J L, Yang Z Y, Guo D H. *J. Instrum. Anal.* (韩丽, 王敏, 王传现, 杨捷琳, 杨振宇, 郭德华. 分析测试学报), **2009**, 28(1): 76–79.
- [6] Wang C B, Jin Y D, Yan D X, Wang C. *Modern Agr. Sci. Technol.* (汪昌保, 金宇东, 严登秀, 王超. 现代农业科技), **2009**, 12: 255–256.
- [7] Zhao L J, Zheng W J, Zhang H W, Li H H, Zhao H. *Food Res. Dev.* (赵良娟, 郑文杰, 张宏伟, 李宏虹, 赵宏. 食品研究与开发), **2010**, 31(9): 118–120.
- [8] Henry D. *Radiat. Phys. Chem.*, **2002**, 63: 455–458.
- [9] EN 13784–2001. Foodstuffs – DNA Comet Assay for the detection of irradiated foodstuffs – Screening method. European Standard Norme.
- [10] EN 13783–2001. Foodstuffs – Detection of irradiated food using Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count (DEFT/APC) – Screening method. European Standard Norme.
- [11] EN 14569–2004. Foodstuffs – Microbiological screening for irradiated food using LAL/GNB Procedures. European Standard Norme.
- [12] EN 1784–2003. Foodstuffs – Detection of irradiated food containing fat – gas chromatographic analysis of hydrocarbons. European Standard Norme.
- [13] EN 1785–2003. Foodstuffs – Detection of irradiated food containing fat – gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones. European Standard Norme.
- [14] Zheng R, Ding Z P, Yan L M, Ning X J, Yu C H. *Shanghai Measurement Test* (郑蓉, 丁卓平, 严罗美, 宁啸骏, 虞成华. 上海计量测试), **2011**, 1: 28–30, 32.
- [15] Noemi C, Tom M. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39: 300–302.
- [16] Makoto M, Hitoshi I, Akiko S, Taeko N, Mari K, Masatake T, Yukio S. *J. Health Sci.*, **2000**, 46(4): 304–309.
- [17] Christian K, Gerhard S, Sonja S, Tom M. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **1997**, 204: 417–419.
- [18] Wolfgang G, Thomas J, Hans S. *Eur. Food Res. Technol.*, **2000**, 210: 299–304.