

蜂花粉中糠氨酸的高效液相色谱测定方法

周晓 薛晓锋 吴黎明 赵静* 李熠*

(中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093)

摘要 建立了高效液相色谱测定蜂花粉中糠氨酸的分析方法,方法用于实际样品测定,评价蜂花粉在贮藏加工过程中营养物质的损失变化。样品经盐酸水解,C18柱净化,用高效液相色谱测定。该方法在10min内即可完成糠氨酸的分离与检测。糠氨酸在0.5~200mg/L的范围内线性关系良好,相关系数0.9987。在10~100mg/kg的添加水平上回收率在89.2%~94.3%之间,相对标准偏差为2.1%~6.5%。此方法可以作为标准方法用于评价蜂花粉产品的质量。

关键词 高效液相色谱;固相萃取;蜂花粉;糠氨酸

中图分类号 O657.7*2

Determination of Furosine in Bee Pollen by HPLC

Zhou Xiao, Xue Xiaofeng, Wu Liming, Zhao Jing*, Li Yi*

(Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science (CAAS), Beijing, 100093, China)

Abstract A simply analytical method was developed for determination of furosine in bee pollen using high-performance liquid chromatography with a UV detector. The samples was hydrolysis by 10 M HCl. The extraction and cleaning up were performed using a C18 cartridge. The separation and determination were carried out within 10 min. The concentration ranges of furosine were 0.5~200mg/mL, and the correlation coefficients of linear were 0.9987. The average recoveries of furosine in spiked samples ranged from 89.2%~94.3%, and the relative standard deviations were between 2.1%~6.5%. Satisfied results come when the developed method was applied to analysis practical samples. The method could be as a standard method for assessing quality of bee pollen.

Key words HPLC; solid-phase extraction; bee pollen; furosine

1 引言

蜂花粉是蜜蜂采集来制作蜂粮的原料,是蜜蜂蛋白质营养的主要来源。蜂花粉含有机体生存所需的各种物质,主要成份有蛋白质、碳水化合物、水分、维生素、酶类、无机盐类、微量元素等。由于蜂花粉营养丰富,在贮藏和加工过程中容易霉变和热解,在蜂花粉被收集后应该尽快干燥、避光保存,防止营养物质的损失。

“糠氨酸”是英文 furosine 的中文译名,也有人将其译为“呋喃素”,按照“国际纯粹和应用化学化合物系统命名法”,其学名是“ ϵ -N-2-呋喃甲基-L-赖氨酸”。它是蛋白质在高温条件下与糖发生“美拉德反应”所产生的系列产物之一。由于摄入过量的糠氨酸对人体健康有害,1992年欧盟各国政府将糠氨酸含量作为判断液态奶成品质量优劣的一个重要指标。由于蜂花粉也含有大量的蛋白质和糖类,在加工

贮藏的过程中也会发生“美拉德反应”,生成糠氨酸。因此,应该建立一个测定方法对蜂花粉中的糠氨酸进行测定。

关于糠氨酸的测定方法已有较多报道,主要是乳制品等食品中糠氨酸的测定方法^[1-5]。蜂产品中,Emanuele等人报道了蜂王浆中糠氨酸的测定方法^[6],目前还没有关于蜂花粉中糠氨酸的报道。随着我国近几年蜂业经济的迅速发展,蜂花粉的出口量和在加工业中的(主要是保健品和化妆品)应用不断增加,蜂花粉的质量也日益受到人们的关注。科研工作者一直在寻找一个稳定、可靠的指标来评价蜂花粉在贮藏和加工过程中营养物质的变化。糠氨酸作为“美拉德反应”的产物在许多食品中被作为一个稳定的营养损失变化的指标。本文以糠氨酸作为评价蜂花粉营养损失的指标,在报道文献的基础上优化了液相色谱测定条件,建立了蜂花粉中糠氨酸的高效液相色谱测定方法。该方法用于实际样品测定,结果满意。

收稿日期:2007-10-22

作者简介:周晓(1982-)硕士,农产品质量与食品安全专业。*通讯作者:赵静,研究员;李熠,助理研究员。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

液相色谱仪(P680, Dionex 公司);固相萃取 C18 (500mg, 6mL, Baker 公司);耐热反应管(25 mL 天津玻璃仪器厂);Turbo Vap LV 氮气吹干仪;SUPELCO VLSIPREP DL 固相萃取仪;恒温干燥箱(Sigma 公司)。

糠氨酸标准品(97% Sigma 公司);庚烷磺酸钠(液相色谱级 Sigma 公司);甲酸(96% Sigma 公司);甲醇(色谱纯);实验用水为超纯水;浓盐酸(分析纯);用纯水稀释浓盐酸得到盐酸溶液浓度分别为 10 M, 3M, 0.03 M;含有 5mM 庚烷磺酸钠的 0.2% 甲酸水溶液;标准溶液的配制:准确称取标准品,用 0.03 M 盐酸配制成 0.5mg/mL 的储备液。分析前用 0.03 M 盐酸配制成一系列不同浓度的标准工作溶液。

2.2 样品处理

2.2.1 样品的水解

称取 0.5g 试样,精确到 0.001g,置于 25mL 耐热试管中,加入 6mL 10MHCL,在氮吹仪上冲入氮气(1 分钟),旋紧盖子,将样品混合均匀放入恒温干燥箱内水解 23~24h(110℃)。水解完后用滤纸过滤样液到干净的烧杯中,用 2mL 3M 盐酸溶液清洗残渣两次,合并滤液到 10mL 刻度试管中定容,待净化。

2.2.2 样品的净化

将 C18 萃取柱固定在萃取装置上,分别加入 5mL 甲醇、10mL 纯水活化平衡,保持柱的湿润。取 3mL 滤液加入 C18 固相萃取柱中,上清液以 $\leq 3\text{mL}/\text{min}$ 流速通过固相萃取柱,待液体完全流完后,用 5mL 3M 盐酸洗脱于 10mL 刻度试管中,将洗脱液真空干燥后用 1mL 水溶解,样液经过 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后,上液相色谱仪测定。

2.2.3 蛋白质含量的分析

蜂花粉蛋白质含量按 GB/T5413.1-1997 方法测定。

2.3 液相色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry - C18 ($4.6 \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$, Waters 公司)。流动相:含 5mM 庚烷磺酸钠的 0.2% 甲酸水溶液 + 甲醇(85 + 15);流速: $0.8\text{mL}/\text{min}$;检测波长: 280nm;柱温: 30°C ;进样量: $20\mu\text{L}$ 。

3 结果与讨论

3.1 流动相与色谱柱的选择

糠氨酸属于极性很强的水溶性化合物,在以往报道的分析方法中,经常选择三氟乙酸与氯化钾或氯化钠的混合溶液与甲醇作为流动相来分离糠氨酸。三氟乙酸酸性较强,长期使用会使色谱柱柱效很快降

低,并不适用长期稳定测定糠氨酸。加入适量的盐溶液虽然可以进一步抑制糠氨酸出峰,使保留时间加长,但色谱峰变宽,不易准确定量分析。在最近报道的分离方法中均选用庚烷磺酸钠作为离子对试剂来分离测定糠氨酸。在这篇研究论文中我们使用庚烷磺酸钠作为离子对试剂,并根据蜂花粉样品水解后,其中的杂质与糠氨酸的分离情况,增加 0.2% 的甲酸到 5mM 的庚烷磺酸钠水溶液中。实验发现,我们选用的流动相适用于测定不同种类的蜂花粉中糠氨酸。

随着色谱技术的发展,出现了许多专门用于分离强极性化合物的色谱柱。主要代表是 Waters 公司生产的 Atlantic 与 Symmetry 系列色谱柱。我们对这两系列不同规格色谱柱进行比较。实验发现:含碳量小的 C18 柱很难将糠氨酸与杂质分离。Atlantic C18 ($4.6 \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$) 和 Symmetry C18 ($4.6 \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$) 这两款色谱柱均能很好的将糠氨酸与杂质分离。在使用相同的流动相条件下,Atlantic C18 将杂质与糠氨酸完全分离需要 16min, Symmetry C18 仅需要 7min。标准图谱与实际样品分离图谱见图 1。因此,本论文选择 Symmetry C18 ($4.6 \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$) 作为分析色谱柱。

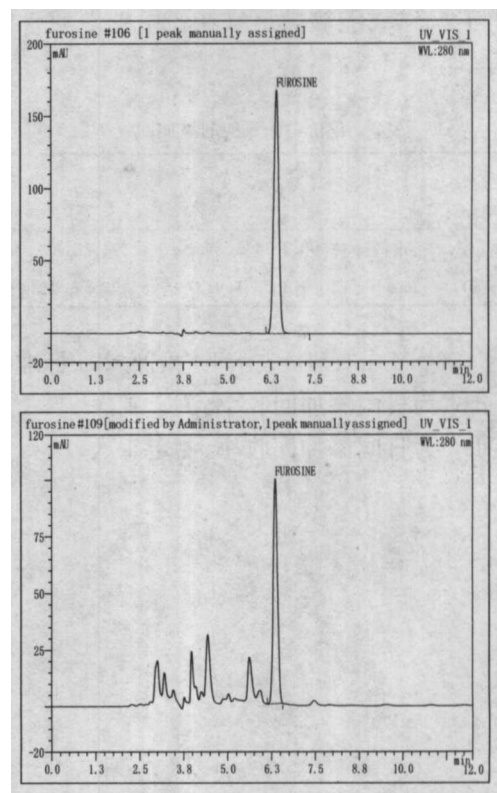


图 1 糠氨酸(FUROSINE)标样测定图谱(A)
和实际样品测定图谱(B)

3.2 线性关系和检出限

在确定的最佳分析条件下对糠氨酸在 0.5 ~

200mg/L 浓度范围内分析,以组分的峰面积(Y)对浓度(X)绘制标准曲线,线性关系、相关系数及检出限见表1。在设定的浓度范围线性关系良好,可以满足定量分析的要求。

表 1HPLC 测定糠氨酸的线性关系和检出限

分析物	线性方程	浓度范围 (mg/L)	r ²	定性检测限 (mg/kg)	定量检测限 (mg/kg)
糠氨酸	y = 0.2806x + 0.2616	0.5 ~ 200	0.9987	1.0	3.0

3.3 糠氨酸的计算公式

$$X = \frac{m}{M} \tag{1}$$

公式中,X 为样品中糠氨酸的含量 (mg/kg);m 为 HPLC 测定得到的样品水解液中糠氨酸的含量 (mg);M 为花粉样品蛋白质的含量 (kg)。

3.4 回收率和精密度

在样品上作 10,20,50,100mg/kg 4 个添加水平下进行加标回收率实验,每个浓度重复四次,测定的平均回收率及精密度见表2。在 10 ~ 100mg/kg 添加浓度范围内回收率在 89.2% ~ 94.3% 之间,相对标准偏差小于 6.5%,能够满足蜂花粉中糠氨酸含量的常规分析。

表 2 花粉中糠氨酸的添加回收率

添加浓度 (mg/kg)	10	20	50	100
Recovery(%, Intra-day ^a	90.2 ± 4.6	89.2 ± 5.4	92.2 ± 4.3	90.4 ± 2.1
Mean ± SD) Inter-day ^b	89.8 ± 5.3	91.7 ± 6.5	91.2 ± 5.2	94.3 ± 3.4

Recovery(%, Mean ± SD)表示平均回收率 ± 标准偏差。
Intra-day^a为日内添加回收率,测定 4 次。
Inter-day^b为日间添加回收率,测定 4 次。

3.5 实际样品的测定

采用本文建立的高效液相色谱方法分别对 13 个不同来源的蜂花粉样品进行分析。实际测定结果见表3。在大部分的样品中检出糠氨酸,检出样品中糠氨酸的含量在 2.1 ~ 25.7mg/kg。

表 3 实际样品分析结果

样品 编号	样品 来源	植物源 种类	每千克蛋白含有糠氨酸的毫克数 糠氨酸的毫克数 (mg/kg)
1	蜂厂	杂花	3.6
2	市场	荷花	5.3
3	蜂厂	油菜	2.1
4	蜂厂	油菜	20.2
5	蜂厂	茶花	ND
6	市场	杂花	21.3
7	超市	荷花	8.9
8	超市	茶花	7.5
9	超市	油菜	25.7
10	超市	油菜	ND
11	蜂厂	油菜	21.6
12	蜂厂	茶花	14.3
13	超市	荷花	7.8

参考文献

[1]乳制品中糠氨酸的测定方法 (ISO 2004) 标准号:18329
[2]Xu Guoqing(许国庆),Zhao Huifen(赵慧芬),Li Kejie(李克杰),Chang Shuo(常硕). 中国奶牛 2006,7:44
[3]T. Delgado, N. Corzo, G. Santa - Marfa, M. L. Jimeno, A. Olano. Chromatographia 1992, 33: 7 - 8
[4]E. Ferrer, A. Alegria, G. Courtois, R. Farre. J. Chromatogr. A 2000, 881: 599 - 606
[5]Cristina Delgado - Andrade, Jos A. Rufian - Henares, Francisco J. Morales. Eur Food Res Techno 2005,221: 707 - 711
[6]Emanuele Marconi, Maria Fiorenza, Caboni, Maria Cristina Messia, Gianfranco Panfili.
[7]J. Agric. Food Chem 2002, 50: 2825 - 2829