

HPLC – MS/MS 检测含蛋白质辐照食品中的邻酪氨酸

王敏^{1*}, 张秀芹¹, 杨振宇¹, 仲维科², 陆地³, 郑文杰⁴

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100022; 3. 烟台出入境检验检疫局, 山东 烟台 264000; 4. 天津出入境检验检疫局, 天津 300457)

摘要: 应用液相色谱 – 串联质谱 (HPLC – MS/MS) 技术建立了含蛋白质辐照食品中邻酪氨酸的检测方法。样品经胰蛋白酶于 37 °C 水解过夜, 正己烷去脂, 乙酸锌沉淀蛋白净化后, HPLC – MS/MS 检测。方法的定量下限为 0.1 mg/kg, 邻酪氨酸在 0.1、0.5、1.0 mg/kg 加标水平的回收率为 80%~97%, 相对标准偏差 (RSD, $n=6$) 为 6.3%~12.9%。在 2.0、5.0、10 kGy 3 个辐照剂量水平下, 鸡肉、猪肉、牛肉、鱼肉和虾肉中的邻酪氨酸含量为 0.095~0.677 mg/kg, 邻酪氨酸含量与辐照剂量呈线性相关, 相关系数 (r) 大于 0.98。该方法灵敏、实用性强。

关键词: 邻酪氨酸; 含蛋白质辐照食品; 液相色谱 – 串联质谱

中图分类号: O657.63; O629.73 文献标识码: A 文章编号: 1004 – 4957(2011)10 – 1187 – 04

doi: 10.3969/j.issn.1004 – 4957.2011.10.022

Determination of *o*-Tyrosine in γ -Ray Irradiated Protein-rich Food by HPLC – MS/MS

WANG Min^{1*}, ZHANG Xiu-qin¹, YANG Zhen-yu¹, ZHONG Wei-ke², LU Di³, ZHENG Wen-jie⁴
(1. Shanghai Entry – Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China; 2. Inspection and Quarantine Research Academy of China, Beijing 100022, China; 3. Yantai Entry – Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, China; 4. Tianjin Entry – Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300457, China)

Abstract: A liquid chromatography – tandem mass spectrometric method was developed for the determination of *o*-tyrosine in γ -ray irradiated protein-rich food. The sample was homogenized and hydrolyzed with pepsin at 37 °C for 24 h. The digestion solution was purified with *n*-hexane eliminating fat, deproteinated with zinc acetic acid solution, and then determined by HPLC – MS/MS. The quantitation limit was 0.1 mg/kg. The recoveries of *o*-tyrosine at three spiked levels of 0.1, 0.5 and 1.0 mg/kg were in the range of 80% – 97%, with RSDs ($n=6$) of 6.3% – 12.9%. The *o*-tyrosine contents in chicken, pork, beef, fish and shrimp irradiated with 2, 5, 10 kGy of γ -ray ranged from 0.095 mg/kg to 0.677 mg/kg, which were obviously higher than those in the unirradiated meat samples, and presented linear relationships with the irradiance dose. The method showed good reproducibility and sensitivity.

Key words: *o*-tyrosine; γ -ray irradiated protein-rich food; HPLC – MS/MS

食品辐照技术是采用辐射源产生的 γ 射线以及加速器产生的高能电子束 (EB) 辐照农产品和食品, 利用电离辐射在食品中产生的辐射化学和辐射生物学效益, 达到抑制发芽、推迟成熟、杀虫杀菌和改进品质等目的的新型食品保鲜加工技术^[1-2]。我国卫生部于 1984~1994 年先后颁布了马铃薯、大蒜、大米、蘑菇、苹果、香肠、猪肉、熟肉制品等 18 种辐照食品的卫生标准。1996 和 1997 年又分别颁布了“辐照食品卫生管理办法”和“辐照食品类别卫生标准”。近 20 年来, 我国食品辐照保藏技术应用的商业化进程较快, 但检测方法却较滞后^[3-5]。尽管食品辐照技术在国际上逐渐被认可, 但美国、加拿大、欧盟等发达国家陆续出台法规, 要求辐照食品标识国际食品辐照标志, 以给予消费者知情权。我国出口食品中曾发生辐照食品未进行辐照标识而被退货的事件, 因此我国急需建立针对不同辐照食品的检测方法。

收稿日期: 2011 – 07 – 06; 修回日期: 2011 – 07 – 21

基金项目: 质检公益性行业科研专项项目 (200910142)

* 通讯作者: 王敏, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 营养与食品卫生, Tel: 021 – 38620529, E – mail: wangm@shciq.gov.cn

含苯丙氨酸的蛋白质食品经辐照产生羟基化产物——邻酪氨酸和间酪氨酸，其中邻酪氨酸的含量最大，这些产物的存在是食品已被辐照的标志^[4]。通过检测辐解产物邻酪氨酸含量判断蛋白质食品是否经过辐照，国外已有相关研究^[6-8]，但国内尚未见相关报道。本课题组曾应用柱前衍生/高效液相色谱(HPLC)对邻酪氨酸含量进行了检测^[9]。本研究采用胰蛋白酶水解辐照样品，代替传统的酸水解蛋白的方式，减少了基质干扰，并采用 HPLC-MS/MS 技术对邻酪氨酸含量进行检测，较之 HPLC 法，方法的灵敏度明显提高。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

标准物质：*DL* 邻酪氨酸(TRC，纯度大于98%)；甲醇(HPLC级)；猪胰蛋白酶、正己烷、乙酸锌(分析纯)；实验用水为二次蒸馏水。

邻酪氨酸标准溶液：准确称取100 mg 邻酪氨酸标准品，用水配成1 g/L的邻酪氨酸标准储备液，4℃保存，根据需要用水将邻酪氨酸标准储备液稀释至适当浓度，作为邻酪氨酸标准工作液，4℃冰箱保存。

0.5 g/L 猪胰蛋白酶溶液：准确称取5 mg 猪胰蛋白酶，用水溶解并定容至10 mL。

5%的乙酸锌溶液：准确称取5.00 g 乙酸锌，用水溶解并定容至100 mL。

1.2 仪器与设备

液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源、分析天平、Millipore 纯水制备系统、自动加液器、旋涡混合器、恒温箱、离心机、50 mL 带刻度离心管、0.2 μm 水相滤膜。

1.3 样品处理

称取1.0 g 均质样品(精确至0.01 g)置于50 mL 具塞离心管中，加入0.5 g/L 猪胰蛋白酶溶液200 μL，加水至10 mL，于37℃恒温水解24 h。向水解液中加入20 mL 正己烷，涡旋混匀，4 000 r/min 离心5 min，弃正己烷层后，再加入5%的乙酸锌200 μL，涡旋混匀，取1.5 mL 水解液至离心管中，14 000 r/min 离心15 min，过0.2 μm 水相滤膜，供 HPLC-MS/MS 测定。

1.4 色谱质谱条件及参数

色谱柱：*C*₁₈柱(100 mm × 2.1 mm，粒径1.9 μm)；流动相：甲醇(A)-水(B)，梯度洗脱程序：0~3 min，93% B；3~4 min，93%~90% B；4~5 min，90% B；5~7 min，90%~93% B；流速：0.18 mL/min；进样量：10 μL；柱温：30℃。

Thermo TSQ HPLC-MS/MS 仪器参数：离子源：电喷雾 ESI，负离子；MRM 模式检测：选择离子对 *m/z* 180.0→107.1、*m/z* 180.0→119.2 和 *m/z* 180.0→136.2 作为定性离子，其中 *m/z* 180.0→119.2 作为定量离子；喷雾器电压：2 500 V；雾化器温度：250℃；鞘气电压：35 V；辅助气电压：5 V；毛细管温度：250℃；碰撞能量：23 V；管透镜偏移：117。

2 结果与讨论

2.1 样品水解方式的选择

分别考察了两种不同的样品水解方式对测定结果的影响。①盐酸水解^[9]：称取样品0.2 g，加入1 mL 2 mol/L 盐酸(含0.1%苯酚)，110℃水解24 h，水解液冷却至室温后，待盐酸挥发，调节pH至中性，用水定容至1 mL。14 000 r/min 离心15 min，过水相滤膜后上机测定。②酶水解：具体见“1.3”样品处理步骤。

选择未辐照鸡肉作为阴性基质，添加邻酪氨酸1.0 mg/kg，考察两种不同水解方式下的回收率(结果见表1)。结果显示，样品酶水解方式的回收率优于盐酸水解，因此本实验选择酶水解方式进行样品水解。

表1 酶水解与盐酸水解回收率的比较

Table 1 Comparison of recovery of *o*-tyrosine by means of hydrolysis with parenzyme and hydrochloric acid

Hydrolysis	Recovery <i>R</i> /%	Average recovery \bar{R} /%	RSD <i>s_r</i> /%
Hydrochloric acid hydrolysis(盐酸水解)	44, 51, 59, 49, 66, 63	55	15.9
Parenzyme hydrolysis(酶水解)	100, 96, 73, 84, 99, 87	90	11.6

2.2 离子源方式的选择

实验采用电喷雾 ESI 正负离子模式分别检测邻酪氨酸, 结果发现在正离子模式下有酪氨酸干扰峰, 而负离子模式下无此干扰峰, 因此实验选择负离子模式检测。

2.3 线性范围、回收率与精密度

在优化条件下, 分别对质量浓度为 10、20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 的邻酪氨酸标准溶液进行检测, 考察方法的线性范围。结果表明, 在 10~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 邻酪氨酸的峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, 相关系数大于 0.99。

以 5 种含蛋白质未辐照样品种(鸡肉、猪肉、牛肉、鱼肉、虾肉)作为阴性样品, 取适量标准品加至 1.0 g 样品中, 使加标量相当于 0.1、0.5、1.0 mg/kg, 按照本方法进行实验, 测得方法的回收率和相对标准偏差见表 2。结果显示, 样品在 0.1、0.5、1.0 mg/kg 加标水平的回收率为 80%~97%, 相对标准偏差(RSD, $n=6$)为 6.3%~12.9%。根据 $S/N \geq 10$ 计算定量下限(LOQ)为 0.1 mg/kg。

表 2 邻酪氨酸的回收率和相对标准偏差($n=6$)

Table 2 Recoveries and RSDs of *o*-tyrosine from five matrices at three spiked levels($n=6$)

Matrix	Added $w/(mg \cdot kg^{-1})$	Average recovery $\bar{R}/\%$	RSD $s_r/\%$
Chicken	0.1, 0.5, 1.0	81, 88, 90	8.3, 8.5, 11.6
Pork	0.1, 0.5, 1.0	83, 90, 97	8.8, 11.4, 11.2
Beef	0.1, 0.5, 1.0	81, 85, 92	7.8, 10.6, 12.9
Fish	0.1, 0.5, 1.0	81, 90, 93	8.1, 10.3, 12.7
Shrimp	0.1, 0.5, 1.0	80, 85, 91	8.2, 6.3, 8.7

2.4 含蛋白质辐照食品中邻酪氨酸的含量

采用本方法检测 2.0、5.0、10 kGy 3 个辐照剂量水平下辐照鸡肉、猪肉、牛肉、鱼肉和虾肉 5 种样品中的邻酪氨酸含量(见表 3)。结果表明, 辐照剂量在 2.0 kGy 及以上的 5 种样品中均可检出邻酪氨酸(含量为 0.095~0.677 mg/kg), 其含量明显高于未辐照样品种。未辐照样品种与辐照样品种的 MRM 图和二级质谱图见图 1 和图 2, 辐照样品种中邻酪氨酸的色谱出峰时间为 3.55 min, 二级质谱中特征离子 m/z 119.20 强度最大, 而未辐照样品种中未检测到邻酪氨酸色谱峰。邻酪氨酸含量随着辐照剂量增加而增加, 两者呈线性相关, 相关系数(r)大于 0.98。实验发现, 辐照剂量在 2.0 kGy 及以上的样品在 -20°C 保存 6 个月后可仍检出邻酪氨酸。

表 3 辐照剂量与邻酪氨酸含量的剂量反应关系

Table 3 Dose response relationship between irradiance dose and *o*-tyrosine content

Sample	Irradiance dose (kGy)	<i>o</i> -Tyrosine content		Average value $\bar{w}/(mg \cdot kg^{-1})$	RSD $s_r/\%$	r
		$w/(mg \cdot kg^{-1})$				
Chicken	2.0	0.105, 0.097, 0.112, 0.107, 0.095, 0.118		0.106	8.3	0.998
	5.0	0.229, 0.233, 0.251, 0.248, 0.259, 0.241		0.244	4.7	
	10	0.561, 0.521, 0.475, 0.504, 0.607, 0.565		0.539	8.9	
Pork	2.0	0.108, 0.126, 0.137, 0.106, 0.118, 0.124		0.120	9.8	0.986
	5.0	0.224, 0.209, 0.215, 0.206, 0.232, 0.228		0.226	5.8	
	10	0.629, 0.615, 0.575, 0.586, 0.608, 0.577		0.598	3.7	
Beef	2.0	0.108, 0.099, 0.122, 0.117, 0.106, 0.128		0.113	9.6	0.996
	5.0	0.219, 0.237, 0.252, 0.237, 0.253, 0.228		0.238	5.6	
	10	0.558, 0.526, 0.485, 0.506, 0.602, 0.545		0.537	7.7	
Fish	2.0	0.144, 0.122, 0.135, 0.107, 0.112, 0.131		0.125	11.3	0.989
	5.0	0.228, 0.257, 0.236, 0.248, 0.267, 0.228		0.224	6.6	
	10	0.667, 0.648, 0.596, 0.578, 0.605, 0.618		0.619	5.4	
Shrimp	2.0	0.154, 0.132, 0.142, 0.128, 0.119, 0.134		0.135	8.9	0.993
	5.0	0.254, 0.259, 0.234, 0.246, 0.262, 0.248		0.262	4.0	
	10	0.677, 0.655, 0.585, 0.566, 0.601, 0.597		0.614	7.0	

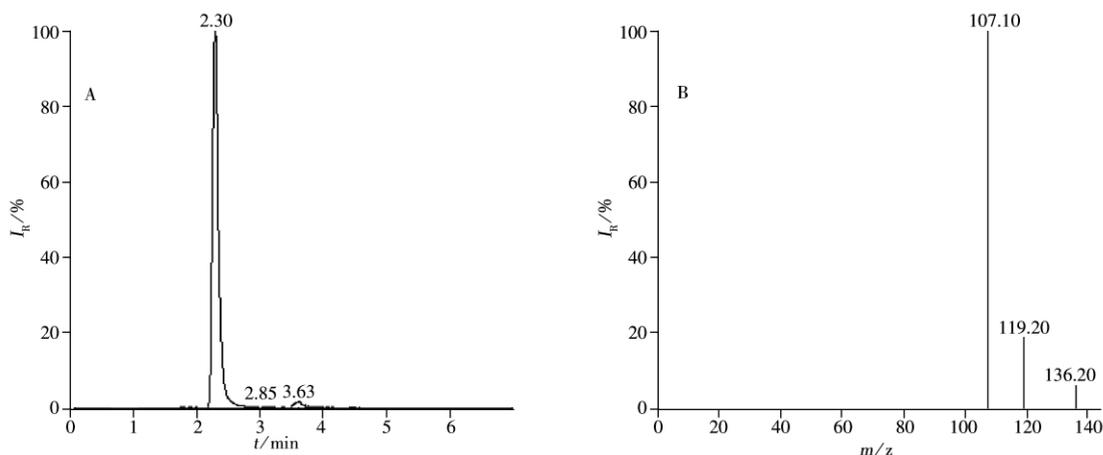


图1 未辐照牛肉的MRM图(A)和二级质谱图(B)

Fig.1 MRM chromatogram(A) and MS/MS spectrum(B) of unirradiated beef

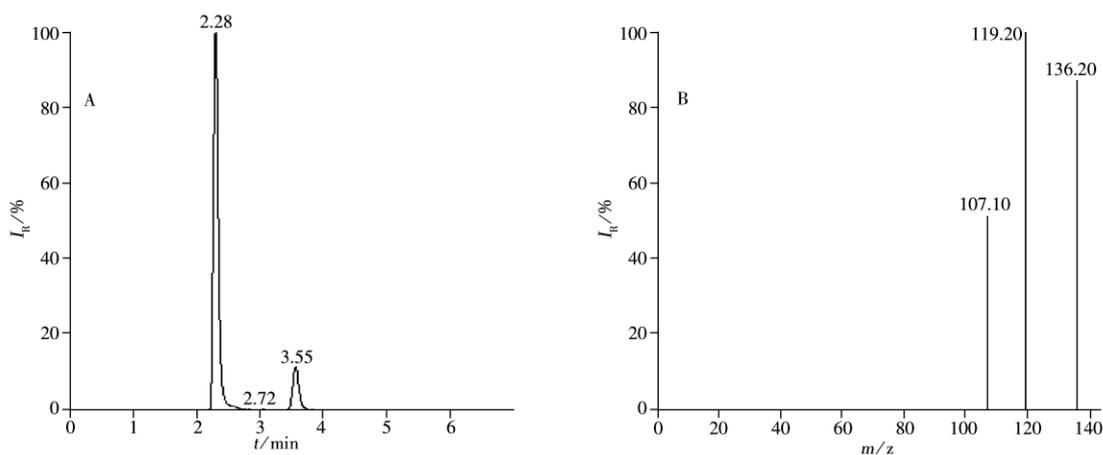


图2 辐照牛肉(2.0 kGy)的MRM图(A)和二级质谱图(B)

Fig.2 MRM chromatogram(A) and MS/MS spectrum(B) of γ -ray irradiated beef at 2.0 kGy

3 结论

本文建立的胰蛋白酶水解辐照样品的HPLC-MS/MS检测邻酪氨酸的技术,较之前研究的盐酸水解样品,柱前衍生/HPLC检测邻酪氨酸技术^[9]的灵敏度有了明显提高(定量下限由5 mg/kg降至0.1 mg/kg),且基质干扰减少。该方法对于检测含蛋白质辐照食品具有较好的应用价值。

参考文献:

- [1] Qin Z R, Gao D W, Yu S J. *Food Ind.* (秦志荣, 高大维, 于淑娟. 食品工业), **2001**, 7(5): 45-46.
- [2] Liang H B. *J. Harbin Univ. Commerce* (梁宏斌. 哈尔滨商业大学学报), **2002**, 18(3): 346-349.
- [3] Wu J L. *J. Radiat. Res. Radiat. Process* (吴季兰. 辐射研究与辐射工艺学报), **1993**, 11(3): 164-166.
- [4] Ha Y M, Zhou H J. *Food Sci.* (哈益明, 周洪杰. 食品科学), **2005**, 26(6): 260-265.
- [5] Wang H Y, Xu X J, Ye Q F. *J. Nucl. Agric. Sci.* (汪海燕, 徐晓洁, 叶庆富. 核农学报), **2004**, 18(2): 137-142.
- [6] Miyahara M, Ito H, Saito A. *J. Health Sci.* **2000**, 46(4): 304-309.
- [7] Chuaqui - Offermanns N, McDougall T. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39: 300-302.
- [8] Hein W G, Simat T J, Steinhart H. *Eur. Food Res. Technol.*, **2000**, 210: 299-304.
- [9] Wang D H, Wang M, Han L, Deng X J, Sheng Y G. *Food Sci.* (王东辉, 王敏, 韩丽, 邓晓军, 盛永刚. 食品科学), **2009**, 30(10): 236-238.