

# 超高效液相色谱检测乳粉复原乳中的氨基酸

## Determination of amino acids in spray-dried milk by UPLC

钱 宇 汪慧超 吴林昊 薛秀恒

QIAN Yu WANG Hui-chao WU Lin-hao XUE Xiu-heng

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036)

(College of Tea and Food Technology of Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

**摘要:**建立超高效液相色谱法(UPLC)测定乳制品中多种氨基酸,并对不同温度喷雾干燥的乳粉再制复原乳中氨基酸含量进行检测,以期通过乳中氨基酸含量和组成的变化鉴别复原乳。结果表明:17种氨基酸在0.0037~0.0522 mg/mL内有良好的线性关系,回收率为97.45%~105.65%。该检测方法灵敏度高,准确性好;不同温度喷雾干燥乳粉中各氨基酸含量不同,其中谷氨酸、亮氨酸、半胱氨酸的变化最为明显。该检测可作为复原乳的鉴别方法。

**关键词:**超高效液相色谱(UPLC);乳粉;氨基酸;检测方法

**Abstract:** Established an UPLC method in determination the amino acids of dairy products, and detected the amino acid content of dairy products processed in different temperature, to identify the spray dried milk through the changes of amino acids contents and composition. The results showed that the calibration curve was linear in the range of 0.0037~0.0522 mg/mL of amino acids, the average recovery range of amino acid was from 97.45%~105.65%. It has the advantage of simple, rapid and accuracy in the determination amino acids. With the spray temperature changing, the content of amino acids were different. And the change of Glu, Leu, Cys were the most obvious. It can serve as the distinguish method of reconstituted milk.

**Keywords:** ultra high performance liquid chromatography (UPLC); emulsifiable powder; amino acids; detection methods

中国乳业发展十分迅速,而乳品蛋白质含有众多生物活性肽,具有良好的加工特性,普遍应用于多种食品加工中<sup>[1]</sup>。乳蛋白质中含有人体需要的各种必需氨基酸,氨基酸是乳制品中重要的组成成分,与奶粉滋味、营养价值等关系十分密切。有报告<sup>[2]</sup>指出氨基酸与乳制品品质呈显著正相关。

复原乳又称还原乳,是指把牛奶浓缩、干燥成为浓缩乳或乳粉,再添加适量水,制成与原乳中水、固形物含量相当的

乳液,其营养价值一般低于鲜乳<sup>[3-5]</sup>。然而一些企业以还原乳冒充鲜奶却未作标识而出售,损害了消费者的知情权。因此需要选择适宜的鉴别指标,确定并完善复原乳的鉴定方法。

目前,复原乳的检测方法主要有荧光分光光度法、高效液相色谱(HPLC)、近红外光谱法、紫外分光光度法等<sup>[6]</sup>,其中HPLC检测氨基酸含量是鉴别复原乳的主要手段,付洪涛等<sup>[7]</sup>曾采用高效液相色谱法测定复原乳中糠氨酸的含量。近几年分离科学体系有一个全新的方向,即为超高效液相色谱法(UPLC)。UPLC在HPLC的基础上进行改进优化,具备分析速度快,分离度好,灵敏度高的优点<sup>[8]</sup>。杨俊等<sup>[9]</sup>利用柱前衍生超高效液相色谱法测定核桃仁中的氨基酸含量,但乳制品中氨基酸的含量测定方法尚未有人提出。本研究拟利用UPLC建立乳制品中氨基酸检测方法,并对不同温度喷雾干燥乳粉再制复原乳中氨基酸组成和含量进行检测,以期从氨基酸角度鉴定复原乳。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

纯牛奶:市售;

不同温度喷雾干燥的乳粉:安徽农业大学畜产品加工实验室自制;

AccQ-Tag Ultra Eluent A(pH 5.2 醋酸盐缓冲溶液):美国 Fisher 公司;

纯乙腈、纯甲醇、磷酸、异丙醇:色谱纯,美国 Fisher 公司;

17种氨基酸混合标准品:纯度 $\geq 99\%$ ,美国 Waters 公司;

氨基酸衍生试剂盒:美国 Waters 公司;

蒸馏水:屈臣氏公司;

盐酸、苯酚:分析纯,上海振兴化工一厂。

### 1.2 主要仪器与设备

超高效液相色谱系统:H Class型,美国 Waters 公司;

**作者简介:**钱宇,女,安徽农业大学在读硕士研究生。

**通讯作者:**薛秀恒(1971—),男,安徽农业大学副教授,博士。

E-mail: xuexiuheng@126.com

**收稿日期:**2015-12-17

紫外检测器:Ultra TUV型,美国 Waters 公司;

荧光检测器:Ultra FLR型,美国 Waters 公司;

数显鼓风干燥箱:GZX-9070MBE型,北京赛多利斯天平有限公司;

电子天平:BS210S型,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;

数控超声清洗机:KQ-5000型,海门市其林贝尔仪器厂;

漩涡振荡器:Vortex2型,美国 SI 公司;

Empower 3 色谱数据工作站:美国 Waters 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 样品处理 吸取 100  $\mu\text{L}$  的纯牛奶样品于水解管中,滴入 3 滴苯酚溶液、5 mol/L HCl 4 mL 溶解,通入氮气 2 min,后密封,置于 110  $^{\circ}\text{C}$  24 h(加热 1 h 后,轻摇水解管把壁上的残渣混匀)。取水解液于蒸发皿中 40  $^{\circ}\text{C}$  烘干,残渣用蒸馏水复溶、洗涤,后过滤,定容至 10 mL,作为氨基酸供试溶液。

1.3.2 AccQ-Tag Ultra 衍生试剂配制 参照试剂盒说明,将 1 mL AccQ-Tag Ultra 稀释剂置于装有 AccQ-Tag Ultra 衍生剂粉末的 2A 瓶中,加盖密封短暂涡旋震荡静置 1 min,加热 2A 瓶至 AccQ-Tag Ultra 衍生剂粉末全部溶解<sup>[9]</sup>。

1.3.3 空白样品的制备 参照试剂盒说明,分别吸取 80  $\mu\text{L}$

Borate Buffer (1)和 20  $\mu\text{L}$  AccQ-Tag Ultra 衍生剂至 6 mm $\times$ 50 mm 衍生管中短暂涡旋震荡,即空白 AQC 衍生剂,备用。

1.3.4 氨基酸标准品的制备 取 40  $\mu\text{L}$  水解氨基酸标样置于进样瓶中,加入 960  $\mu\text{L}$  超纯水,混匀。标准品浓度为 250 pmol/ $\mu\text{L}$ ,具体含量见表 1。

1.3.5 标准品的衍生 吸取 10  $\mu\text{L}$  氨基酸标准溶液、70  $\mu\text{L}$  硼酸缓冲液、20  $\mu\text{L}$  衍生试剂至样品管中,室温静置 1 min,55  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min<sup>[10]</sup>。

1.3.6 样品的衍生 吸取 10  $\mu\text{L}$  经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤的样品溶液、70  $\mu\text{L}$  硼酸缓冲液至样品管中,加入 20  $\mu\text{L}$  衍生试剂至样品管中,室温放置 1 min,55  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min<sup>[10]</sup>。

1.3.7 色谱条件 色谱柱选用 Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.7  $\mu\text{m}$ );TUV 检测器波长 248 nm;FLR 检测器激发波长 266 nm,发射波长 473 nm;柱温 55  $^{\circ}\text{C}$ ;梯度洗脱见表 2<sup>[9]</sup>。

A 相为 100% AccQ-Tag Ultra Eluent A,B 相为 90% 乙腈,C 相为纯水,D 相为 100% 乙腈。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测器的选择

通过 TUV、FLR 检测器分别测定氨基酸标准使用液,可以得到 2 种检测器对于 17 种氨基酸均有好的响应值,并

表 1 氨基酸标准物质浓度

Table 1 The concentration of amino acid standard material

名称	相对分子质量	浓度/ (mg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	名称	相对分子质量	浓度/ (mg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )
组氨酸(His)	155.15	0.038 79	胱氨酸(Cys)	240.30	0.060 08
丝氨酸(Ser)	105.09	0.026 27	赖氨酸(Lys)	146.19	0.036 55
精氨酸(Arg)	174.20	0.043 55	酪氨酸(Tyr)	181.19	0.045 30
甘氨酸(Gly)	75.07	0.018 77	蛋氨酸(Met)	149.21	0.037 03
天门冬氨酸(Asp)	133.10	0.033 28	缬氨酸(Val)	117.15	0.029 29
谷氨酸(Glu)	147.13	0.036 78	异亮氨酸(Ile)	131.17	0.032 79
苏氨酸(Thr)	119.12	0.029 78	亮氨酸(Leu)	131.17	0.032 79
丙氨酸(Ala)	89.09	0.022 27	苯丙氨酸(Phe)	165.19	0.041 30
脯氨酸(Pro)	115.13	0.028 78			

表 2 梯度洗脱表

Table 2 Gradient elution table

时间/min	流速/(mL $\cdot$ min <sup>-1</sup> )	A 体积分数/%	B 体积分数/%	C 体积分数/%	D 体积分数/%	曲线
0.00	0.7	2.0	0.0	98.0	0.0	—
0.29	0.7	2.0	0.0	98.0	0.0	11
5.49	0.7	9.0	80.0	11.0	0.0	7
7.10	0.7	8.0	15.6	57.9	18.5	6
7.30	0.7	8.0	15.6	57.9	18.5	6
7.69	0.7	7.8	0.0	70.9	21.3	6
7.99	0.7	4.0	0.0	36.3	59.7	6
8.59	0.7	4.0	0.0	36.3	59.7	6
8.68	0.7	2.0	0.0	98.0	0.0	6
10.20	0.7	2.0	0.0	98.0	0.0	5

得到有效分离。重复 3 组平行样,其结果重现性好,说明两种检测器均可对氨基酸进行检测。

在相同条件的情况下使用两种检测器对纯牛奶样品进行氨基酸检测,可以看出 TUV 检测器出峰情况良好,无杂峰干扰,但是有部分氨基酸并未检出;而 FLR 检测器,由于其灵敏度高,所有氨基酸均被检出,但是有少量杂峰干扰。由于本试验采取外标法定量,且杂峰未影响氨基酸的峰图谱,所以采用 FLR 检测器作为检测手段。

图 1 为纯牛奶样品通过 TUV 检测器和 FLR 检测器的氨基酸色谱图。

## 2.2 线性关系考察

精密吸取标准品溶液 0.4,0.6,0.8,1.0,1.2  $\mu\text{L}$  按相同色谱条件进样,测定,以标准品溶液质量浓度为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ )绘制标准曲线,线性范围及检出限见表 3。

由表 3 可知,在 0.003 7~0.052 2 mg/mL 时,15 种氨基

酸线性均达到了 0.999 以上,而 Thr 和 Pro 的线性也达到 0.99 以上,相比其他氨基酸在线性上存在差异,其原因可能是在保留时间上流动相存在梯度变化,而流动相 B 又是一种复配混合溶液,对整个体系的 pH 影响很小,对应的检测结果可能会造成一点轻微误差。

## 2.3 稳定性试验

取所制备的 17 种氨基酸溶液,于室温放置,分别在 0,6,12,24,36 h 测定各氨基酸的峰面积,结果见表 4。

由表 4 可知,17 种氨基酸在经历衍生后 36 h 内,峰面积的 RSD 为 0.91~1.29,表明这种衍生后的氨基酸溶液,在 36 h 内能够保持稳定性。

## 2.4 重复性试验

取同一样品按照相同的方法制备 5 份样品溶液,重复进样,测定 17 种氨基酸峰面积,计算含量,RSD 为 1.0%~1.2%。

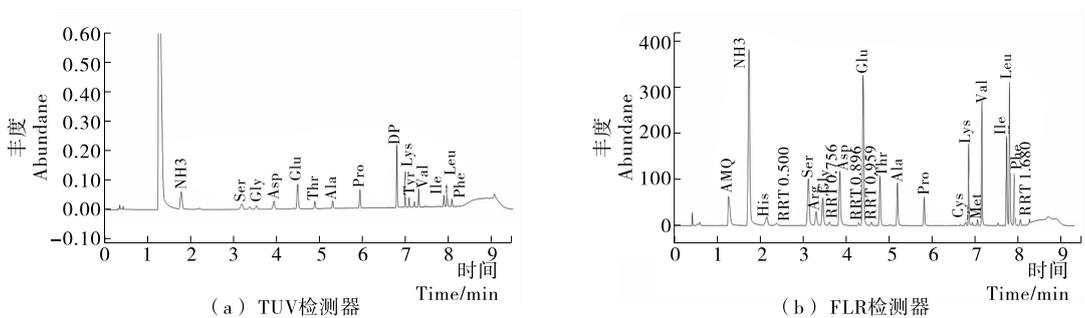


图 1 纯牛奶样品的氨基酸色谱图

Figure 1 The amino acid content of milk in the UPLC chromatogram

表 3 氨基酸的检出限及线性范围

Table 3 The detection limit and linear range of amino acid

氨基酸	线性方程	相关系数	线性范围/ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	检出限/ mg
His	$Y=107\ 484X-2\ 034.5$	1.000 0	0.007 7~0.046 5	0.02
Ser	$Y=106\ 027X-1\ 408.9$	1.000 0	0.005 2~0.031 5	0.02
Arg	$Y=106\ 361X-2\ 092.7$	1.000 0	0.008 7~0.052 2	0.05
Gly	$Y=108\ 862X-1\ 492$	0.999 9	0.003 7~0.022 5	0.06
Asp	$Y=97\ 470X-1\ 796.6$	0.999 9	0.006 6~0.039 9	0.21
Glu	$Y=101\ 710X-10\ 603$	0.999 7	0.007 3~0.044 1	0.36
Thr	$Y=100\ 654X-4\ 483.6$	0.997 4	0.005 9~0.035 7	0.03
Ala	$Y=93\ 903X-1\ 361$	1.000 0	0.004 4~0.026 7	0.03
Pro	$Y=82\ 151X+5\ 947.6$	0.996 7	0.005 7~0.034 5	0.03
Cys	$Y=83\ 800X-708.1$	0.999 1	0.072 0~0.120 1	0.27
Lys	$Y=149\ 079X-2\ 599.7$	0.999 9	0.007 3~0.043 8	0.21
Tyr	$Y=98\ 104X-885.56$	1.000 0	0.009 0~0.054 3	0.09
Met	$Y=95\ 364X-513.15$	1.000 0	0.007 4~0.044 7	0.06
Val	$Y=96\ 301X-364.66$	1.000 0	0.005 8~0.035 1	0.12
Ile	$Y=93\ 240X-858$	1.000 0	0.006 5~0.039 3	0.15
Leu	$Y=95\ 797X-878.25$	1.000 0	0.006 5~0.039 3	0.15
Phe	$Y=93\ 939X-1\ 466.2$	1.000 0	0.008 2~0.049 5	0.03

表4 不同时间氨基酸标准物质的检测峰面积

Table 4 The detection of peak area of amino acid standard material in different time

氨基酸	氨基酸峰面积					RSD/ %
	0 h	6 h	12 h	24 h	36 h	
His	3 991 200	3 901 430	3 885 426	3 868 432	3 872 591	1.29
Ser	89 156	88 250	87 534	87 721	87 034	0.92
Arg	105 145	105 876	105 783	106 987	108 342	1.18
Gry	104 400	104 398	104 726	105 545	106 749	0.95
Asp	104 177	106 752	103 572	104 953	105 312	1.15
Glu	107 166	109 142	108 324	106 503	108 783	1.03
Thr	95 013	94 327	96 274	96 721	95 493	1.00
Ala	85 166	86 435	85 026	84 893	84 031	1.01
Pro	94 927	94 258	92 579	93 368	92 986	1.02
Cys	92 316	91 214	92 979	93 959	93 897	1.24
Lys	88 280	87 253	88 146	87 534	86 253	0.93
Tyr	81 865	81 088	80 532	80 142	80 036	0.94
Met	145 914	146 793	150 426	148 729	147 258	1.20
Val	97 005	97 926	96 376	96 014	95 721	0.91
Ile	95 264	94 008	93 584	92 994	92 840	1.04
Leu	95 870	93 279	94 658	94 276	95 031	1.01

## 2.5 回收率试验

精密称取已知含量的 50  $\mu$ L 牛奶样品 6 份,分别精准加入 17 种氨基酸水解标准溶液 2 mL,按相同水解衍生方法制备供试液并测定,计算平均回收率以及平均 RSD。氨基酸加标回收率见表 5。

表5 氨基酸加标回收率及 RSD

Table 5 The recovery and RSD of amino acid

氨基酸	原始含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
His	0.044	0.077	0.120	98.77	1.21
Ser	0.084	0.052	0.140	102.71	0.97
Arg	0.059	0.087	0.144	98.97	1.09
Gry	0.033	0.037	0.068	97.45	0.97
Asp	0.114	0.066	0.190	105.65	1.10
Glu	0.317	0.073	0.412	105.56	0.99
Thr	0.079	0.059	0.140	101.37	1.00
Ala	0.047	0.044	0.089	98.03	1.03
Pro	0.126	0.057	0.179	97.98	1.05
Cys	0.005	0.120	0.128	102.96	1.21
Lys	0.116	0.073	0.198	104.76	0.95
Tyr	0.210	0.090	0.297	98.97	0.94
Met	0.073	0.074	0.143	97.49	1.24
Val	0.034	0.058	0.094	101.84	0.97
Ile	0.101	0.065	0.172	103.54	1.02
Leu	0.068	0.065	0.131	98.43	1.01
His	0.171	0.082	0.248	98.15	1.18

由表 5 可知,17 种氨基酸回收率为 97.45%~105.65%,每组平行样品的 RSD 为 0.94~1.24,说明预处理方法和检测方法对氨基酸定量检测影响控制在一定范围内。存在部分的误差经过后续试验分析后发现主要来源于水解制样部分,由于乳制品中含一定量的乳脂,所以本试验采用的是先脱水后酸水解的方法进行蛋白质水解,但水解后的水解液 pH 过低,不能直接衍生,需要烘干再复溶的步骤,在这一步中可能会有外源性氨基酸的引入或氨基酸丢失,造成误差。

## 2.6 不同温度喷雾干燥的乳粉再制复原乳中氨基酸测定结果

采用上述方法对不同温度喷雾干燥处理的乳粉再制复原乳中氨基酸进行检测,得不同样品的氨基酸色谱图见图 2,氨基酸含量测定结果见表 6。

表6 不同温度喷雾干燥处理的乳粉再制复原乳中氨基酸含量测定结果<sup>†</sup>

Table 6 The result of the amino acid content of spray-dried milk in different temperature

氨基酸	未处理	100 $^{\circ}$ C	110 $^{\circ}$ C	120 $^{\circ}$ C	130 $^{\circ}$ C
Ser	1.509 6	1.322 7	1.551 1	1.035 4	0.836 0
Arg	0.934 6	0.914 6	1.020 5	0.710 2	0.755 4
Gly	0.486 6	0.549 0	0.563 4	0.376 5	0.324 6
Asp	2.195 8	1.561 7	2.002 9	1.353 6	1.303 8
Glu	5.771 4	3.859 9	4.910 0	3.566 4	3.058 0
Thr*	1.183 2	1.093 5	1.313 7	0.778 6	1.217 9
Ala	0.882 5	0.693 6	0.876 5	0.579 4	0.446 0
Pro	2.634 2	2.423 7	2.858 2	1.778 2	1.636 2
Cys	1.412 3	0.258 1	0.239 6	0.226 5	0.258 2
Lys*	2.443 1	1.586 4	2.136 1	1.453 9	1.300 4
Tyr	1.836 4	2.972 1	4.007 3	2.722 5	1.940 0
Met*	0.662 3	1.586 4	2.136 1	1.453 9	1.100 4
Val*	1.605 3	0.526 1	0.573 0	0.552 3	0.546 2
Ile*	1.363 2	1.544 8	1.891 5	1.255 2	1.278 4
Leu*	2.623 1	1.111 9	1.347 9	0.868 5	0.857 7
Phe*	1.183 2	2.842 9	3.419 5	2.150 8	1.519 0
必需氨基酸之和	11.063 5	10.291 9	12.817 8	8.513 3	7.820 0
总和	28.726 8	24.847 4	30.847 4	20.862 0	18.378 4

<sup>†</sup> \* 表示必需氨基酸。

由表 6 可知,不同温度喷雾干燥处理的乳粉再制复原乳中均含有 16 种氨基酸成分(即天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸)。随温度升高,各氨基酸含量的变化呈先升高,后下降趋势,其中谷氨酸、亮氨酸、半胱氨酸的变化最为明显。因此可以通过本研究建立的超高效液相色谱的方法,从氨基酸角度检测复原乳。

## 3 结论

本试验建立柱前衍生超高效液相色谱法(UPLC)测定乳

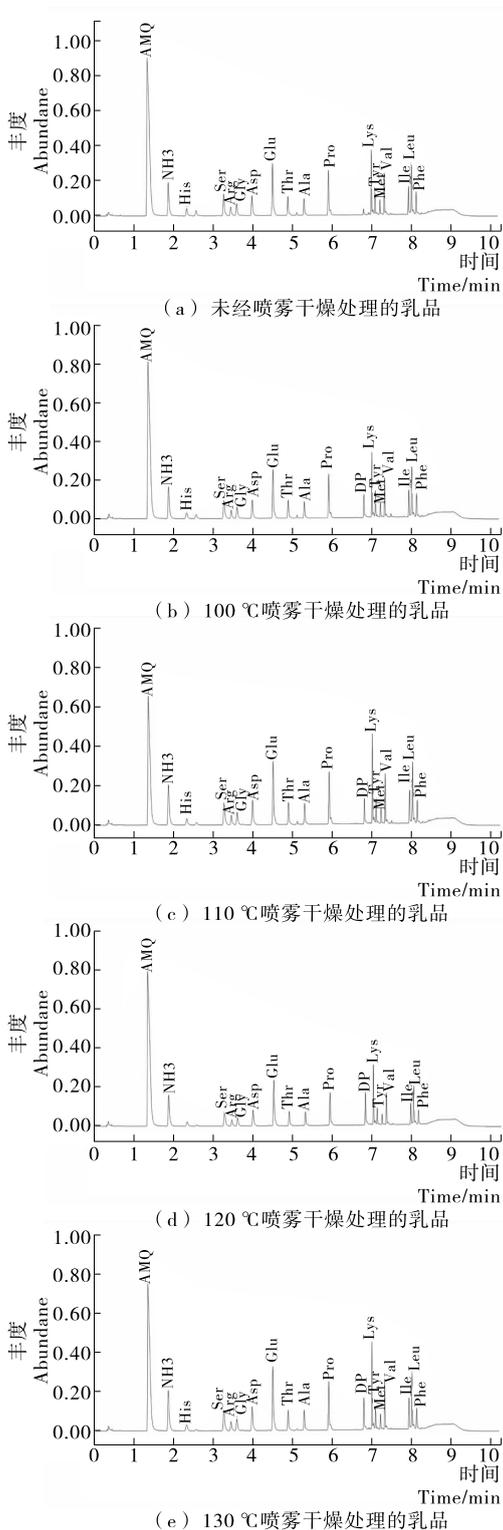


图 2 不同温度喷雾干燥处理乳品的液相色谱图

Figure 2 The amino acid content of different temperature spray drying processing of milk in the UPLC chromatogram

制品中氨基酸含量。检测条件采用 Waters ACQUITY UPLC FLR 系统, Waters Acquity UPLC BEH  $C_{18}$  色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu$ m), 100% AccQ-Tag Ultra Eluent A, 90% 乙腈, 纯水, 100% 乙腈梯度洗脱, 流速 0.7 mL/min,

柱温 55  $^{\circ}$ C。在本试验建立的检测方法下, 所检测的氨基酸在 10 min 内能够完全分离, 比以往的 HPLC 法缩短了 30~40 min, 方法的准确度和精密度均较高。且将该方法应用于不同喷雾干燥温度下乳粉中氨基酸的检测, 发现各氨基酸含量不同, 其中谷氨酸、亮氨酸、半胱氨酸的变化最为明显。其检测可作为复原乳的鉴别方法。

### 参考文献

- [1] HAENLEIN G F W. Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk[J]. International Dairy Federation Special Issue, 2001: 159-178.
- [2] LINDMARK-MÅNSSON H, SVENSSON U, PAULSSON M, et al. Influence of milk components, somatic cells and supplemental zinc on milk processability[J]. International Dairy Journal, 2000, 10(7): 411-424.
- [3] ATHANASIA M Goula, KONSTANTINOS G Adamopoulos. Spray drying performance of a laboratory spray dryer for tomato powder preparation[J]. Drying Technology, 2003, 7(7): 1 273-1 289.
- [4] 宋贤聚. 低吸湿性杨梅粉喷雾干燥工艺的优化[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 226-229.
- [5] 张景亮, 胡少新, 孙莹, 等. 复原乳检测方法的研究进展[J]. 食品科技, 2008, 12(4): 77-79.
- [6] 迟晓玮, 陈志伟. 乳制品中复原乳检测方法的研究进展[J]. 中国酿造, 2011, 16(9): 4-7.
- [7] 付洪涛, 欧阳华学, 雷绍荣. 高效液相色谱法测定复原乳中糠氨酸的含量[J]. 中国测试技术, 2008, 8(2): 103-104.
- [8] SCHWARZ E L, ROBERTS W L, PASQUALI M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection[J]. Clinica Chimica Acta, 2005, 354(1/2): 83-90.
- [9] 杨俊, 王文辉, 李翼, 等. 柱前衍生超高效液相色谱法测定核桃仁中的氨基酸含量[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(2): 182-185.
- [10] Waters 公司北京实验室. Waters ACQUITY UPLCTM 介绍[J]. 环境化学, 2004, 14(5): 605-611.