

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2025.80236

赖丙氨酸检测方法及其研究进展

夏义苗^{1,2} 陈区妹¹ 陈复生^{1,3} 罗双群⁴

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 河南 郑州 450001; 2. 小麦和玉米深加工国家工程研究中心, 河南 郑州 450001; 3. 中原食品实验室, 河南 漯河 462001; 4. 漯河食品工程职业大学, 河南 漯河 462001)

摘要: 赖丙氨酸是一种由赖氨酸和脱氢丙氨酸加成生成的交联氨基酸。高蛋白食品在加工过程(如碱处理、热处理)中易形成赖丙氨酸, 该赖丙氨酸对人体具有一定的肾毒性, 亦会影响人体消化功能, 其形成过程还会消耗必需氨基酸降低食品营养价值。目前, 赖丙氨酸定量检测主要采用液相色谱法和液质联用法。文章分别从前处理、衍生化和仪器检测 3 个维度, 对已报道的赖丙氨酸检测方法进行综述和讨论, 旨在为开发高灵敏度、高精度稳定的赖丙氨酸检测方法提供参考。

关键词: 赖丙氨酸; 食品检测; 定量; 液相色谱法; 液质联用法

Research progress in detection methods of lysinoalanine

XIA Yimiao^{1,2} CHEN Qumei¹ CHEN Fusheng^{1,3} LUO Shuangqun⁴

(1. College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450001, China; 2. National Engineering Research Center of Wheat and Corn Further Processing, Zhengzhou, Henan 450001, China; 3. Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe, Henan 462001, China; 4. Luohe Food Engineering Vocational University, Luohe, Henan 462001, China)

Abstract: Lysinoalanine (LAL) is a cross-linked amino acid formed through the addition of lysine and dehydroalanine. High-protein foods are prone to forming LAL during food processing (such as alkaline treatment, heat treatment). LAL may induce nephrotoxicity, affect human digestive function, and can also reduce the content of essential amino acids in food, reducing the nutritional value of food. Currently, LAL quantification primarily relies on liquid chromatography (LC) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods. This study reviews and discusses the detection methods of LAL from three aspects: pretreatment, derivatization, and instrumental detection, aiming to provide insights for developing high-sensitivity, more accurate, and stable LAL detection methods.

Keywords: lysinoalanine; food detection; quantification; liquid chromatography (LC) method; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method

在食品加工过程中, 蛋白质可发生非共价交联和共价交联, 脱氢蛋白质衍生物是一种常见的共价交联产物, 而赖丙氨酸(lysinoalanine, LAL)是一种典型的脱氢蛋白质衍生物^[1-2]。LAL 结构如图 1 所示, 其形成可分为两个阶段^[3]: ① 蛋白质中胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸残基等通过 β -消除反应生成脱氢丙氨酸残基; ② 其他肽链或同肽链其他位置上的赖氨酸残基与脱氢丙氨酸残基通过迈克尔

加成反应生成 LAL。LAL 常存在于超高温瞬时杀菌(143 °C、6 s)婴幼儿配方乳粉(198 $\mu\text{g/g}$)^[4]、常压腌制皮蛋蛋清(1 725 $\mu\text{g/g}$)^[5]、碱提米渣分离蛋白(256~13 079 $\mu\text{g/g}$)^[6]等 高 蛋 白 食 品 中。LAL 的 生 成 过 程 会 消 耗 赖 氨 酸 等 必 需 氨 基 酸, 从 而 降 低 蛋 白 质 的 营 养 价 值^[7]; 能 够 改 变 蛋 白 质 结 构, 影 响 蛋 白 水 解 酶 的 作 用 位 点, 进 而 干 扰 人 体 的 消 化 功 能^[8]; 可 导 致 小 鼠 肾 脏 肥 大^[9]; 并 能 够 螯 合 Cu^{2+} 离 子, 干

基金项目:“十四五”国家重点研发项目(编号:2022YFD2101403);小麦和玉米深加工国家工程研究中心开放课题(编号:NL2024002);河南工业大学高层次人才科研启动基金项目(编号:2024BS027)

通信作者:陈复生(1963—),男,河南工业大学教授,博士。E-mail:fushengc@haut.edu.cn

收稿日期:2025-03-16 改回日期:2025-11-12

引用格式:夏义苗,陈区妹,陈复生,等. 赖丙氨酸检测方法及其研究进展[J]. 食品与机械, 2026, 42(2): 66-73.

Citation: XIA Yimiao, CHEN Qumei, CHEN Fusheng, et al. Research progress in detection methods of lysinoalanine[J]. Food & Machinery, 2026, 42(2): 66-73.

抗金属酶的活性,进而影响相关代谢过程^[10]。LAL对人体健康的潜在风险不容忽视,建立一种高效、准确的LAL定量方法对于保障高蛋白食品的安全性具有重要意义。

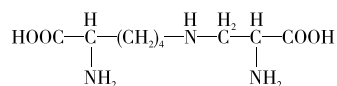


图1 LAL结构式

Figure 1 Structural formula of LAL

常见的LAL定量检测方法包括氨基酸分析法、气相色谱法、气质联用法、液相色谱法和液质联用法(见表1),以液相色谱法和液质联用法为主。文章拟对液相色谱法和液质联用法进行综述讨论。液相色谱法和液质联用法均可细分为前处理、衍生化和仪器检测三大步骤,文章围绕这三大步骤进行综述和深入讨论,以期高效的LAL检测方法开发提供思路参考,为食品中LAL的准确定量提供依据。

1 LAL前处理

食品中LAL以结合态存在于蛋白质分子内或分子间,为对其进行准确定量,需先进行样品前处理,通过水解作用破坏肽链的肽键,使LAL从结合态转变为游离态从蛋白质中释放出来,LAL释放原理与氨基酸残基释放原理具有一致性。样品前处理方法包括酸水解法、碱水解法、酶水解法等,其中酸水解法效率高且对大多数氨基酸无破坏,因此其应用最广泛。GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》采用的便是盐酸(6 mol/L)水解法。

如表1所示,在测定LAL时需利用6 mol/L盐酸对样品进行水解,在该阶段不同文献报道的差异主要体现在以下3个方面。

(1) 原料在酸水解前是否利用硼氢化钠进行还原。酸水解过程中,果糖基-赖氨酸会转化为美拉德反应高级阶段代表性产物——羧甲基赖氨酸,因此需在盐酸水解前加入硼氢化钠还原蛋白质,将果糖基-赖氨酸转变为稳定性较好的己糖醇-赖氨酸,以提高羧甲基赖氨酸的检测准确性^[16,33,46-47]。因此,在进行美拉德反应产物定量时需要进行硼氢化钠还原处理,而测定LAL则无需该还原处理。

(2) 加热前惰封气体种类不同。LAL在高温酸水解过程中可能发生氧化降解,因此加热前进行惰性气体封管非常重要,空气的平均相对分子质量约为29,氮气为4,氦气为28,氩气为39.95,在常温常压下氩气密度最大,所以向加完盐酸溶液的水解管中充入氩气最易充满,其次是氮气和氦气,考虑到氦气成本最高(40 L 2 000元),氮气(40 L 200元)和氩气(40 L 200元)成本相对较低,因此

氩气封管适用性可能较好;需进一步通过对比LAL的检测限和回收率等指标来科学评估氮气或氩气封管的适用性。当采用氮封和氩封时,所用的盐酸浓度、色谱柱种类和质谱仪器均不同,因此尚无法依据检出限高低来评估氮封和氩封的优劣,后续可在保障其他变量相同的前提下,控制惰封气体种类来明确氮封和氩封对LAL存在稳定性的影响规律,弥补该部分研究空白。

(3) 加热方式不同。在蛋白质酸水解过程中,可采用常规烘箱(110℃、23 h/24 h)和微波(150℃ 1 min+165℃ 10 min)加热,如在β-乳球蛋白酸水解过程中,以游离态赖氨酸和精氨酸含量来评估酸水解效率,发现常规烘箱和微波加热具有等效性^[43];向LAL梯度标准溶液中加入6 mol/L盐酸,分别进行常规加热和微波加热,计算加热前后LAL标曲斜率的比值,并依据该比值评估LAL的酸稳定性,发现LAL在常规加热和微波加热过程中具有相同的酸稳定性^[43,48];对蛋白质酸水解来说,微波加热与常规加热酸水解效率相当,且不会降解LAL,但微波加热时间(11 min)大大低于常规加热(23 h/24 h),采用微波加热可将前处理时间缩短1 d,这对于提升LAL的检测效率极具意义;目前,在测定LAL时蛋白质酸水解过程主要采用常规加热(表1),微波加热有被应用于牛奶、奶粉、玉米片、饼干等原料的LAL含量测定^[43],但缺乏与常规加热对比的数据,因此微波加热在不同原料中的适用性仍待探明,其应用广泛性尚待加强。

2 LAL衍生化

通过酸水解将LAL从蛋白质中释放出来后,需借助液相色谱仪或液质联用仪对LAL进行检测。对于液相色谱仪来说,LAL自身的紫外和荧光吸收性较弱,不适宜直接检测,需先进行衍生化处理,引入强紫外或荧光吸收基团,进而通过测定LAL衍生物含量来进行定量。对于液质联用仪来说,由于质谱检测的是带电荷的分子离子或碎片离子^[34,40,49-50],LAL分子具有一定极性可直接被离子化,LAL衍生物亦可被离子化,因此LAL及其衍生物均可直接采用液质联用仪进行测定。

LAL属于交联氨基酸,其衍生化试剂选择可参考其他种氨基酸。由表2可知,对于氨基酸的柱前衍生化来说,可用试剂包括邻苯二醛(OPA)、氯甲酸-9-苄基甲酯(FMOC)、异硫氰酸苯酯(PITC)、单酰氯(DNS-Cl)、6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚胺基氨基酸酯(AQC)等。

OPA衍生反应受基质影响较大,OPA与丝氨酸、赖氨酸、丙氨酸、苏氨酸、胱氨酸和缬氨酸的衍生物稳定性较差^[51]。当前尚无使用OPA试剂衍生LAL的报道。

利用FMOC、PITC和DNS-Cl衍生化时,过量的衍生化试剂会与衍生物反应,干扰氨基酸衍生物的测定,进而影响氨基酸的准确定量;如DNS-Cl会与DNS-LAL

表 1 赖丙氨酸检测方法汇总[†]
Table 1 Detection methods for LAL

原料	前处理		内标	仪器	检出限	参考文献
	酸水解	衍生化方法				
皮蛋、煮鸡蛋	6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 23 h/24 h	MTBSTFA	DPA	GC-FID GC-Q	32 mg/kg 蛋白质	[5, 11–15]
煮鸡蛋	硼氢化钠还原 6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 24 h	MTBSTFA	DPA	GC-FID	50 mg/kg 蛋白质	[16]
奶酪、牛奶、婴儿配方奶粉、乳清蛋白粉	6 mol/L 盐酸、真空、110 °C 加热 23 h/24 h	FMOC	/	RP-HPLC-FD	0.4 mg/kg 蛋白质	[17–21]
米糠分离蛋白、蚕蛹蛋白、黑水虻幼虫蛋白、白、牛奶、茶渣蛋白	6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 24 h	DNS-Cl	/	RP-HPLC-UD	/	[6, 22–32]
牛奶、婴儿配方奶粉	6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 24 h	正丁醇	d4-CML	RP-UPLC-QQQ	<5.1 mg/kg 蛋白质	[33]
牛奶、奶酪、酪蛋白钙	6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 24 h	FMOC	N-e-methyl-lysine	RP-UPLC-QQQ	/	[34]
牛奶、乳粉、脱脂奶、牛奶沉积物	10 mol/L 盐酸、氟封、110 °C 加热 24 h	/	4,4,5,5-d ₄ -lysine	Hilic-UPLC-QQQ	125 ng/mL	[35–37]
α-乳清蛋白、β-乳球蛋白、β-酪蛋白	6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 23 h	/	¹³ C ₆ - ¹⁵ N ₂ -lysine	Hilic-UPLC-LIT	/	[38]
猫粮、狗粮	6 mol/L 盐酸、真空、110 °C 加热 23 h	/	/	RP-UPLC-LIT	/	[39]
大麻仁分离蛋白	6 mol/L 盐酸、氮封、120 °C 加热 22 h	PITC	/	RP-UPLC-qTOF	<5 mg/kg 蛋白质	[40]
蛋清蛋白	6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 24 h	/	/	Hilic-UPLC-qTOF	/	[41–42]
牛奶、婴儿配方奶粉、玉米片、曲奇饼、肉干等	6 mol/L 盐酸、氮封、微波加热 (150 °C 1 min+165 °C 10 min)	/	d4-CML	Hilic-UPLC-QE	15.23 ng/mL	[4, 43]
牛奶	硼酸缓冲液 (0.5 mol/L, pH 9.5)+硼氢化钠(1.0, 0.2 mol/L NaOH) 还原 6 h、6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 24 h	/	/	RP(C ₈)-UPLC-QE	0.01 mg/kg 蛋白质	[44]
婴儿配方奶粉	6 mol/L 盐酸、氮封、110 °C 加热 24 h	/	4,4,5,5-d ₄ -lysine	RP-UPLC-QE	/	[45]

† MTBSTFA 为 N-(特丁基二甲基硅烷基)-N-甲基三氟乙酰胺; DPA 为 2,6-二氨基庚二酸; GC-FID 为气相色谱—氢火焰离子化检测器; GC-Q 为气相色谱—单四级杆质谱; FMOC 为氯甲酸-9-芴基甲酯; RP-HPLC-FD 为反相—高效液相色谱—荧光检测器; DNS-Cl 为丹酰氯; RP-HPLC-UD 为反相—高效液相色谱—紫外检测器; d4-CML 为 d4-N-ε-羧甲基—赖氨酸; RP-UPLC-QQQ 为反相—超高效液相色谱—三重四级杆质谱; Hilic-UPLC-QQQ 为亲水作用—超高效液相色谱—三重四级杆质谱; Hilic-UPLC-LIT 为亲水作用—超高效液相色谱—线性离子阱质谱; RP-UPLC-LIT 为反相—超高效液相色谱—线性离子阱质谱; PITC 为异硫氰酸苯酯; RP-UPLC-QTOF 为反相—超高效液相色谱—四级杆飞行时间质谱; Hilic-UPLC-QTOF 为亲水作用—超高效液相色谱—四级杆飞行时间质谱; Hilic-UPLC-QE 为亲水作用—超高效液相色谱—四级杆静电场轨道阱质谱; RP-UPLC-QE 为反相—超高效液相色谱—四级杆静电场轨道阱质谱。

反应生成 DNS-NH₂, 造成部分 DNS-LAL 无法被识别, 进而导致 LAL 定量结果不准确^[54]。因此, 过量的 FMOC、PITC 和 DNS-Cl 试剂需及时去除; 但为了氨基酸衍生化反

应进行充分, 加入的衍生化试剂又必需过量; 如何既保证氨基酸衍生化反应进行充分又避免衍生化试剂过量是个难题。由表 1 可知, FMOC^[17–21, 34]、PITC^[40] 和 DNS-

表2 氨基酸衍生化试剂应用对比

Table 2 Comparative analysis of amino acid derivatization reagents

衍生化试剂	衍生反应时间/min	多余衍生试剂	衍生产物稳定性	液相检测器
OPA ^[51]	1	不干扰	不稳定	紫外/荧光
FMOC ^[52]	1	需去除	稳定	紫外/荧光
PITC ^[53]	约60	需去除	稳定	紫外
DNS-Cl ^[22]	约60	需去除	不稳定	紫外
AQC ^[52]	1	不干扰	稳定	紫外/荧光

Cl^[6, 22-32]试剂均被用于LAL的衍生化,未关注和讨论衍生化试剂过量问题,但其衍生化操作却存在较大差异,如Pellegrino等^[17, 21]使用200 μ L FMOC (5 mg/mL)与约0.4 mg蛋白质水解物进行衍生化反应30 min,而Calabrese等^[34]使用200 μ L FMOC (5 mg/mL)与约0.3 mg蛋白质水解物进行衍生化反应60 min。LAL衍生物含量直接决定了LAL的定量结果,但衍生化反应操作对LAL衍生物含量的影响规律尚不明晰。

相较之下,AQC是一种具有高反应活性的杂环氨基甲酸酯,可与伯胺和仲胺反应生成稳定的喹啉基团化合物,而LAL既是伯胺类化合物,又是仲胺类化合物,因此AQC可与LAL反应生成存在稳定的衍生化产物。过量的AQC会水解,水解产物有6-氨基喹啉、*N*-羟基丁二酰亚胺和二氧化碳,其中6-氨基喹啉易与氨基酸衍生物分离,*N*-羟基丁二酰亚胺和二氧化碳不会干扰分析,由此可知AQC过量不会影响衍生化产物的准确定量。因此,AQC在LAL的衍生化反应中具有较好的应用潜力。结合表1可知,当前尚无利用AQC衍生化LAL的相关报道,后续可尝试利用液相色谱仪对LAL的AQC衍生物进行分析,建立基于液相色谱仪的LAL检测方法;对比LAL与LAL的AQC衍生物的离子化效率,建立一种基于液质联用仪的LAL检测方法;以LAL的AQC衍生物为研究对象,对比和明确液相色谱法和液质联用法的检测灵敏度、准确性和稳定性差异,开发高效、可靠的LAL定量方法。

3 LAL及其衍生物的检测

色谱柱种类与LAL的检测灵敏度密切相关。Hilic色谱柱(表面修饰基团—NH₂、—OH等)^[35-37, 41, 42]、C₈反相色谱柱^[44]、C₁₈反相色谱柱^[39, 45]均被用于未衍生化LAL的定量分析。对于Hilic色谱柱来说,LAL在Kinetex HILIC和Poroshell 120 HILIC-Z色谱柱上保留过强,会造成LAL峰形较差,无法用于定量分析^[55];LAL在Intrada amino acid色谱柱上峰形较好^[35]。类似的,对于C₁₈色谱柱来说,部分研究利用C₁₈色谱柱进行LAL的定量检测^[39, 45];但Nielsen等^[35]发现LAL在C₁₈色谱柱上几乎无保留,在死时

间内出峰,且C₁₈色谱柱无法分离LAL和羊毛硫氨酸(LAN);此外,LAL在酸水解前处理过程中使用了大量盐酸,后续通过反复氮吹和纯水复溶去除盐酸,但盐酸往往无法去除完全,在进样液质联用仪后,低浓度的盐酸在C₁₈色谱柱上无保留,与LAL出峰时间相近,大大抑制了LAL的离子化和信号强度,造成LAL检测灵敏度降低^[55]。因此,Hilic色谱柱和C₁₈色谱柱对LAL检测的适用性结论报道不一。这是由于Hilic和C₁₈色谱柱因填料种类、键合基团种类和密度等不同,对未衍生化LAL的保留能力亦不同,表现为LAL的保留时间和峰形差异较大。色谱柱表面修饰基团(CSM)与吸附物的相互作用包括疏水作用、氢键、偶极作用和 π - π 作用等,鲜有报道从CSM与LAL相互作用的角度探讨色谱柱选择问题,不同种CSM与LAL的相互作用机理尚不明晰。色谱柱在使用过程中会老化,LAL峰形还受色谱柱老化程度的影响。因此,在选取色谱柱测定LAL时,应重点关注CSM具体种类,综合考虑色谱柱的老化程度,在保障LAL峰形完好的前提下,避免LAL与盐酸共流出。衍生化的LAL极性较弱,与C₁₈色谱柱的固定相保留较强,因此多选用C₁₈反相色谱柱进行LAL衍生物的检测^[6, 17-32, 40]。

关于流动相和缓冲盐的选取,在测定LAL时,流动相多采用乙腈和水二元混合体系。对于液相色谱仪来说,缓冲盐多采用磷酸盐和甲酸等^[17, 22]。对于液质联用仪来说,缓冲盐均采用可挥发性盐,如甲酸、甲酸铵、三氟乙酸、九氟乙酸等^[34, 38-39, 45];当使用Hilic色谱柱测定未衍生化的LAL时,为改善LAL峰形,缓冲盐多选取甲酸铵和甲酸混合体系,但相较于甲酸铵,甲酸更利于LAL的离子化效率和检测灵敏度的提升^[55],因此在保障LAL峰形完好的前提下,应优先选取甲酸作为缓冲盐。

除了液相色谱仪,多种质谱仪器如三重四级杆质谱^[34-37]、线性离子阱质谱^[38-39]、飞行时间质谱^[40-42]和静电场轨道阱质谱^[4, 43-45]均被用于LAL及其衍生物的定量。如表3所示,未衍生化LAL的母离子 m/z 为234.1,定量离子 m/z 为84.1,LAL衍生物的母离子和子离子 m/z 与衍生试剂种类密切相关。

液相色谱法和液质联用法常被用于LAL的定量分析,但各有优劣(见表4)。Pellegrino等^[17, 21]利用FMOC对LAL进行衍生化后,设置荧光激发和发射波长分别为266, 310 nm,借助于UPLC可实现对LAL-FMOC衍生物的认识和定量。LAL的紫外和荧光吸收性较弱,无法直接用于检测,引入FMOC后,LAL-FMOC衍生物的荧光吸收强度大大增强,可被荧光检测器识别和定量。因此,液相色谱法需衍生化前处理,操作较繁琐,但因仪器成本低,在实际应用中使用较广泛;该方法的测定准确性与LAL的衍生化效率密切相关,而衍生化效率又受衍生试剂种类(如OPA、FMOC、PITC、DNS-Cl和AQC等)和衍生

表 3 质谱法测定赖丙氨酸所用母离子和子离子质荷比信息汇总[†]Table 3 m/z of parent ion and daughter ion during detection of LAL based on mass spectrometry

母离子 m/z	子离子 m/z	衍生化方法	仪器	参考文献
632	387	MTBSTFA	GC-FID GC-Q	[11—14]
364	84*, 186	正丁醇	RP-UPLC-QQQ	[33]
900.3	678.3*, 456.2	FMOC	RP-UPLC-QQQ	[34]
234.1	84.0	/	Hilic-UPLC-QQQ	[35—37]
234	198	/	RP-UPLC-LIT	[39]
639	/	PITC	RP-UPLC-qTOF	[40]
234.145 4	130.086 5*, 84.081 5	/	Hilic-UPLC-QE	[4, 43]
234.144 83	84.061 5*, 130.086 3	/	RP(C ₈)-UPLC-QE	[44]
234.14	84.08	/	RP-UPLC-QE	[45]

† *为定量离子。

表 4 液相色谱法和液质联用法测定赖丙氨酸优劣对比

Table 4 Comparative evaluation of LC and LC-MS methods for LAL determination

方法	是否需要衍生化	能否识别共流出物	基质效应影响	仪器成本	检测灵敏度
液相色谱法	是	否	弱	低	高
液质联用法	否	是	强	高	高

化反应条件直接影响。相较之下,液质联用法无需衍生化处理,但需注意基质干扰。如Nielsen等^[35]利用UPLC-QQQ对LAL进行直接定量,数据采集使用多反应监测模式(母离子 m/z - 234.1,子离子 m/z - 84.0),将LAL标准品加入牛奶酸水解基质后发现LAL的离子强度被抑制了62%~71%,将牛奶酸水解基质稀释5倍后,LAL的离子强度被抑制了13%。基质效应可被内标校正,但基质效应过强仍会影响LAL的检测灵敏度和准确性。此外,液相色谱法需使用标准品辅助,依据保留时间对待测物进行定性;而液质联用法可借助母离子和子离子信息直接识别待测物,亦可借助 m/z 信息识别共流出物,提高LAL检测的准确性。液相色谱法和液质联用法对LAL的检出限相当(表1)。

在实际应用中,高蛋白食品基质往往较复杂,如样品中LAL含量较低,在不进行衍生化的情况下,稀释样品酸水解液虽可降低基质效应,但亦会影响LAL的检测灵敏度和准确性,因此不建议使用液质联用法;在衍生化后,液相色谱法^[6, 17]和液质联用法^[34, 40]可能均适用。对于LAL含量较高的样品,建议采用液质联用法,这是由于可通过稀释样品酸水解液以降低基质效应,同时借助内标校正提高检测准确性,且该法无需衍生化可缩短前处理时间,使操作更简便。LAL可作为反映乳制品贮藏条件和加工程度较灵敏的标志物^[18-19, 34],当前LAL检测在乳

制品中应用最广泛(表1)。Cattaneo等^[18]利用液相色谱法(FMOC衍生化、荧光检测)定量发现,相较于乳果糖、糠酸和半乳糖基- β -吡喃酮,LAL可作为反映超高温灭菌乳贮藏条件最灵敏的指标。考虑到LAL的潜在危害,聂雪梅等^[44]利用液质联用法(无衍生化、QE检测)测定了市场不同品牌12种液态奶的LAL含量,以了解中国市场上牛奶中LAL的含量水平。天然牛奶和马苏里拉奶酪中几乎不含LAL,然而酪蛋白和奶粉中LAL含量较高,因此利用添加了酪蛋白或乳清蛋白粉的牛奶生产奶酪,可测得奶酪中LAL含量较高,并可依此原理鉴别马苏里拉奶酪真伪,在该过程中LAL的准确定量至关重要,使用到的定量方法为液质联用法(FMOC衍生化、QQQ检测)^[34]和液相色谱法(FMOC衍生化、荧光检测)^[17]。

LAL作为一种蛋白质共价交联产物,亦被应用于蛋白质的结构和功能性研究中^[29, 36, 38, 40-41]。Al-Saadi等^[29]研究了经95℃加热的牛奶蛋白质的共价交联类型,利用液相色谱法(DNS-Cl衍生化、紫外检测)对LAL进行定量,发现不添加乳糖时共价交联以LAL为主,添加乳糖后共价交联以美拉德反应产物为主。Wang等^[40]利用加热结合pH偏移技术改性大麻仁分离蛋白结构以提高其溶解性和乳化性过程中,采用液质联用法(PITC衍生化、qTOF检测)测定LAL,以控制加热条件,限制LAL的生成量(<1 mg/g)。Koyama等^[41]采用液质联用法(无衍生化、qTOF检测)对LAL进行定量,探究了加热过程中蛋清蛋白的聚集行为和凝胶强度与LAL、LAN和二硫键的相关性。

4 结论与展望

赖丙氨酸为高蛋白食品在常规加工过程中(如加热、碱处理等)易形成的一种交联氨基酸,鉴于其对人体健康带来的安全威胁,建立一种高效的赖丙氨酸定量方法对

于绿色、安全高蛋白食品的开发具有重要意义。但目前研究仍存在以下问题:①酸水解耗时较长,氮封水解效率存在提升空间;②衍生试剂过量会干扰赖丙氨酸的测定准确性,衍生化反应条件对赖丙氨酸衍生效率影响不明确;③利用质谱法测定未衍生化的赖丙氨酸时,适用的色谱柱表面修饰基团类型仍待探明,基质效应问题仍待解决。

未来研究可聚焦于:①考察微波加热、氮封等技术对不同种高蛋白食品酸水解效率的影响;②开发新型衍生化试剂,明晰衍生化反应条件对赖丙氨酸衍生效率的影响规律;③明确适用的色谱柱表面修饰基团类型,最大限度降低赖丙氨酸检测基质效应,提升赖丙氨酸检测灵敏度,保障赖丙氨酸检测准确性。

参考文献

- [1] MCKERCHAR H J, CLERENS S, DOBSON R C J, et al. Protein-protein crosslinking in food: proteomic characterisation methods, consequences and applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 86: 217-229.
- [2] RENZONE G, ARENA S, SCALONI A. Cross-linking reactions in food proteins and proteomic approaches for their detection[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2022, 41(5): 861-898.
- [3] ROMBOUITS I, LAMBRECHT M A, CARPENTIER S C, et al. Identification of lanthionine and lysinoalanine in heat-treated wheat gliadin and bovine serum albumin using tandem mass spectrometry with higher-energy collisional dissociation[J]. Amino Acids, 2016, 48(4): 959-971.
- [4] AKILLIOĞLU H G, CHATTERTON D E W, LUND M N. Maillard reaction products and amino acid cross-links in liquid infant formula: effects of UHT treatment and storage[J]. Food Chemistry, 2022, 396: 133687.
- [5] 刘旭辉. 减压法对皮蛋 LAL 产生的影响及蛋清凝胶机理的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2019: 30-31.
LIU X. Effect of vacuum decompression technology on LAL production of preserved eggs and research on mechanism of egg white gel[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019: 30-31.
- [6] HOU F R, DING W H, QU W J, et al. Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 207-215.
- [7] HELLWIG M, MATTHES R, PETO A, et al. *N*- ϵ -fructosyllysine and *N*- ϵ -carboxymethyllysine, but not lysinoalanine, are available for absorption after simulated gastrointestinal digestion[J]. Amino Acids, 2014, 46(2): 289-299.
- [8] BOSCHIN G, D'AGOSTINA A, RINALDI A, et al. Lysinoalanine content of formulas for enteral nutrition[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(7): 2 283-2 287.
- [9] FRIEDMAN M. Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(4): 1 295-1 319.
- [10] FRIEDMAN M, LEVIN C E. Nutritional and medicinal aspects of *D*-amino acids[J]. Amino Acids, 2012, 42(5): 1 553-1 582.
- [11] 罗序英. 禽蛋碱加工过程中赖丙氨酸的形成与控制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014: 19-25.
LUO X. Study on lysinoalanine formation and control in alkali-pickled eggs[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014: 19-25.
- [12] LUO X Y, TU Y G, ZHAO Y, et al. Effects of sulfhydryl compounds, carbohydrates, organic acids, and sodium sulfite on the formation of lysinoalanine in preserved egg[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(8): T1 621-T1 628.
- [13] ZHAO Y, LUO X Y, LI J K, et al. Formation of lysinoalanine in egg white under alkali treatment[J]. Poultry Science, 2016, 95(3): 660-667.
- [14] MONTILLA A, GÓMEZ-RUIZ J Á, OLANO A, et al. A GC-FID method for analysis of Lysinoalanine[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(4): 415-422.
- [15] ZHAO Y, LUO X Y, LI J K, et al. Effect of basic alkali-pickling conditions on the production of lysinoalanine in preserved eggs[J]. Poultry Science, 2015, 94(9): 2 272-2 279.
- [16] BOSCH L, SANZ M L, MONTILLA A, et al. Simultaneous analysis of lysine, *N*- ϵ -carboxymethyllysine and lysinoalanine from proteins[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 860(1): 69-77.
- [17] PELLEGRINO L, RESMINI P, DE NONI I, et al. Sensitive determination of lysinoalanine for distinguishing natural from imitation mozzarella cheese 1[J]. Journal of Dairy Science, 1996, 79(5): 725-734.
- [18] CATTANEO S, MASOTTI F, PELLEGRINO L. Effects of overprocessing on heat damage of UHT milk[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(5): 1 099-1 106.
- [19] CATTANEO S, MASOTTI F, PELLEGRINO L. Liquid infant formulas: technological tools for limiting heat damage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(22): 10 689-10 694.
- [20] LIU D R, ZHAO C H, GUO M R. Sodium tripolyphosphate inhibits the formation of lysinoalanine in heat-treated whey protein[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(6): e13501.
- [21] PELLEGRINO L, CATTANEO S, MASOTTI F, et al. Detection of milk powder and caseinates in Halloumi cheese [J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(8): 3 453-3 460.
- [22] 张兆丽. 碱提米渣分离蛋白过程中赖丙氨酸的生成及超声波技术控制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020: 36-37.
ZHANG Z. Study on lysinoalanine generation and inhibition of ultrasound technology in alkali extraction of rice residue

- protein isolates[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020: 36-37.
- [23] XU H N, PAN J Y, HAO J, et al. Inhibition of cross-linked lysinoalanine formation in pH12.5-shifted silkworm pupa protein, and functionality thereof: effect of ultrasonication and glycation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 256: 128120.
- [24] XU H N, PAN J Y, MA C F, et al. Effect of carbonyl-amino condensation, non-covalent cross-linking and conformational changes induced by ultrasound-assisted Maillard reaction on lysinoalanine formation in silkworm pupa protein[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 263: 130480.
- [25] XU H N, PAN J Y, DABBOUR M, et al. Synergistic effects of pH shift and heat treatment on solubility, physicochemical and structural properties, and lysinoalanine formation in silkworm pupa protein isolates[J]. Food Research International, 2023, 165: 112554.
- [26] ZHANG Z L, WANG Y, DAI C H, et al. Alkali extraction of rice residue protein isolates: effects of alkali treatment conditions on lysinoalanine formation and structural characterization of lysinoalanine-containing protein[J]. Food Chemistry, 2018, 261: 176-183.
- [27] LI Y H, ZHANG Z L, REN W B, et al. Inhibition effect of ultrasound on the formation of lysinoalanine in rapeseed protein isolates during pH shift treatment[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(30): 8 536-8 545.
- [28] PAN J Y, XU H N, DABBOUR M, et al. Changes in physicochemical, structural and functional properties, and lysinoalanine formation during the unfolding and refolding of pH-shifted black soldier fly larvae albumin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 272(Pt 1): 132801.
- [29] AL-SAAADI J M S, EASA A M, DEETH H C. Effect of lactose on cross-linking of milk proteins during heat treatments[J]. International Journal of Dairy Technology, 2013, 66(1): 1-6.
- [30] ZHANG Z L, WANG Y, JIANG H, et al. Effect of dual-frequency ultrasound on the formation of lysinoalanine and structural characterization of rice dreg protein isolates[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 67: 105124.
- [31] WANG Y, ZHANG Z L, LI Y H, et al. Lysinoalanine formation and conformational characteristics of rice dreg protein isolates by multi-frequency countercurrent S-type sonochemical action [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 69: 105257.
- [32] AYIM I, MA H L, ALENYOREGE E A, et al. Effect of alkali concentration on functionality, lysinoalanine formation, and structural characteristics of tea residue proteins[J]. Journal of Food Process Engineering, 2018, 41(8): e12877.
- [33] FENAILLE F, PARISOD V, VISANI P, et al. Modifications of milk constituents during processing: a preliminary benchmarking study[J]. International Dairy Journal, 2006, 16 (7): 728-739.
- [34] CALABRESE M G, MAMONE G, CAIRA S, et al. Quantitation of lysinoalanine in dairy products by liquid chromatography - mass spectrometry with selective ion monitoring[J]. Food Chemistry, 2009, 116(3): 799-805.
- [35] NIELSEN S D, LE T T, KNUDSEN L J, et al. Development and application of a multiple reaction monitoring mass spectrometry method for absolute quantification of lysinoalanine and lanthionine in dairy products[J]. International Dairy Journal, 2020, 105: 104693.
- [36] NIELSEN S D, KNUDSEN L J, BÆKGAARD L T, et al. Influence of lactose on the maillard reaction and dehydroalanine-mediated protein cross-linking in casein and whey[J]. Foods, 2022, 11(7): 897.
- [37] AGUILERA-TORO M, POULSEN N A, AKKERMAN M, et al. Development in maillard reaction and dehydroalanine pathway markers during storage of UHT milk representing differences in casein micelle size and sedimentation[J]. Foods, 2022, 11(10): 1 525.
- [38] CARDOSO H B, WIERENGA P A, GRUPPEN H, et al. Maillard induced aggregation of individual milk proteins and interactions involved[J]. Food Chemistry, 2019, 276: 652-661.
- [39] VAN ROOIJEN C, BOSCH G, VAN DER POEL A F B, et al. Quantitation of maillard reaction products in commercially available pet foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(35): 8 883-8 891.
- [40] WANG Q L, JIN Y, XIONG Y L. Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(41): 10 827-10 834.
- [41] KOYAMA S, NEMOTO Y, ICHIKAWA M, et al. Effects of suppressing protein structural changes on the excellent gelling properties of dried egg white *via* dry-heat treatment[J]. Food Science and Technology Research, 2021, 27(2): 293-300.
- [42] KOYAMA S, OKA D, TSUJII Y, et al. Effects of lanthionine and lysinoalanine on heat-induced gelation of egg white[J]. Food Science and Technology Research, 2020, 26(6): 789-795.
- [43] AKILLIOĞLU H G, LUND M N. Quantification of advanced glycation end products and amino acid cross-links in foods by high-resolution mass spectrometry: applicability of acid hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130601.
- [44] 聂雪梅, 王茜, 许秀丽, 等. Q-Orbitrap 高分辨质谱法测定牛奶中赖丙氨酸及其含量随温度变化的规律[J]. 食品科学, 2020, 41(4): 280-286.
- NIE X M, WANG H, XU X L, et al. Determination of lysinoalanine in milk products by Q-Orbitrap high resolution mass spectrometry and variation in its content with temperature

- [J]. Food Science, 2020, 41(4): 280-286.
- [45] CHEN Z F, LEINISCH F, GRECO I, et al. Characterisation and quantification of protein oxidative modifications and amino acid racemisation in powdered infant milk formula[J]. Free Radical Research, 2019, 53(1): 68-81.
- [46] DELATOUR T, HEGELE J, PARISOD V, et al. Analysis of advanced glycation endproducts in dairy products by isotope dilution liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. The particular case of carboxymethyllysine[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1 216(12): 2 371-2 381.
- [47] 陈铭, 吴帅, 黄轶群, 等. 山奈、白芷和香叶对猪肉加热过程中晚期糖化终末产物含量的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(4): 1-6, 13.
- CHEN M, WU S, HUANG Y Q, et al. Effects of *galangal*, *angelica root* and *bay leaves* on the formation of advanced glycation end-products in pork during heating[J]. Food & Machinery, 2019, 35(4): 1-6, 13.
- [48] SCHEIJEN J L J M, CLEVERS E, ENGELEN L, et al. Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: presentation of a dietary AGE database[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 1 145-1 150.
- [49] 蔡雯雯, 张根生, 山永凯, 等. 枸杞果汁中多酚类化合物鉴定[J]. 食品与机械, 2024, 40(12): 129-136.
- CAI W W, ZHANG G S, SHAN Y K, et al. Identification of polyphenolic compounds in wolfberry juice[J]. Food & Machinery, 2024, 40(12): 129-136.
- [50] 袁江月, 何佳, 孙军杰, 等. UPLC-MS/MS分析紫薯酒发酵前后花色苷种类和含量变化[J]. 食品与机械, 2021, 37(6): 56-61, 68.
- YUAN J Y, HE J, SUN J J, et al. Analysis of anthocyanins in purple sweet potato wine before and after fermentation by UPLC-MS/MS[J]. Food & Machinery, 2021, 37(6): 56-61, 68.
- [51] 齐麟, 张长波, 刘仲齐. 邻苯二甲醛柱前衍生化时间对反相高效液相色谱法测定稻米氨基酸含量的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 449-456.
- QI L, ZHANG C B, LIU Z Q. Effects of pre-column derivatization time of O-phthalaldehyde on determination of amino acids content in rice by reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(2): 449-456.
- [52] 卢兰香, 郑红, 武传香, 等. AQC柱前衍生/UPLC-MS/MS测定蜂蜜中的内源性氨基酸和牛磺酸成分[J]. 分析测试学报, 2022, 41(12): 1 738-1 745.
- LU L X, ZHENG H, WU C X, et al. Determination of endogenous amino acids and taurine in honey by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with AQC pre-column derivation[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2022, 41(12): 1 738-1 745.
- [53] 黄莹, 黄晶, 杨晓, 等. PITC柱前衍生-高效液相色谱法测定大米肽中的16种氨基酸含量[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 279-285.
- HUANG Y, HUANG J, YANG X, et al. Determination of 16 amino acids in rice peptides by PITC pre-column derivatization high performance liquid chromatography[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 279-285.
- [54] BADOUD R, PRATZ G. Simple and rapid quantitative determination of lysinoalanine and protein hydrolysate amino acids by high-performance liquid chromatography after derivatization with dansyl chloride[J]. Chromatographia, 1984, 19(1): 155-164.
- [55] ZHOU S K, XIA Y M, HAO L H, et al. Optimization of liquid chromatography and mass spectrometry parameters based on LC-QQQ: a case study on lysinoalanine[J]. Journal of Chromatography B, 2025, 1 251: 124427.