

糠氨酸含量检测分析中影响因素的研究

邓西香¹, 王满生²

¹通标标准技术服务有限公司广州分公司, 广东 广州

²中国农业科学院麻类研究所, 湖南 长沙

收稿日期: 2022年9月13日; 录用日期: 2022年11月4日; 发布日期: 2022年11月15日

摘要

以UHT灭菌乳为样品, 采用NY/T 939-2016中糠氨酸含量的测定方法, 考察了不同水解时长对糠氨酸含量的影响, 以及水解前后质量差异对蛋白质含量检测结果的影响, 同时也对样品存放天数(t)是否符合 $FT = F - 0.7 t$ 这一关系式进行了验证。结果表明: 在标准规定的水解时长12 h~23 h范围内, 水解时间对糠氨酸检测结果基本无影响; 水解前后质量差异直接影响了糠氨酸的检测浓度和蛋白质含量的计算, 需选择合适的密封水解管; UHT灭菌乳样品存放天数和糠氨酸含量变化与标准中的关系式不符。该研究分析了标准中没有提到的一些潜在的影响因素, 对实际的检测分析具有借鉴意义。

关键词

糠氨酸, UHT灭菌乳, 水解时长, 检测分析

Study on Influencing Factors of Furosine Content Detection and Analysis

Xixiang Deng¹, Mansheng Wang²

¹SGS-CSTC Standards Technical Services Co., Ltd. Guang Zhou Branch, Guangzhou Guangdong

²Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha Hunan

Received: Sep. 13th, 2022; accepted: Nov. 4th, 2022; published: Nov. 15th, 2022

Abstract

Taking UHT sterilized milk as sample, the determination method of furosine content in the NY/T 939-2016 was used to study the effect of different hydrolysis duration on furosine content, and the influence of quality difference before and after hydrolysis on protein content detection results. At the same time, the relationship between $FT = F - 0.7 t$ and the storage days (t) of samples was veri-

fied. The results showed that the hydrolysis time had no effect on the detection result of furosine in the range of 12 h~23 h; the quality difference before and after hydrolysis directly affects the detection concentration of furosine and the calculation of protein content, so it is necessary to select a suitable sealed hydrolysis tube; the storage days of UHT sterilized milk sample and the change of furosine content are inconsistent with the relational formula in the standard. This study analyzes some potential influencing factors that are not mentioned in the standard, which has reference significance for actual detection and analysis.

Keywords

Furosine, UHT Sterilized Milk, Hydrolysis Duration, Detection and Analysis

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

UHT 灭菌乳, 即超高温瞬时灭菌乳, 是以生牛乳为原料, 添加或不添加复原乳, 经超高温瞬时灭菌, 再经无菌灌装等工序制成的液体产品[1]。超高温瞬时灭菌是在加热温度至少 132℃、保持很短时间的热处理方式。复原乳又称“还原乳”或“还原奶”, 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、固体物比例相当的乳液[2]。复原乳因经过高温处理, 营养成分会有一定损失, 如蛋白质、氨基酸和维生素。鉴别 UHT 灭菌乳中是否含有灭菌乳的一个检测指标是 UHT 灭菌乳灭菌结束时糠氨酸含量, 用 FT 表示。糠氨酸是蛋白质与乳糖在热处理过程中经美拉德反应的产物, 又名 ϵ -N-2-呋喃甲基-L-赖氨酸[3]。由于摄入过量的糠氨酸对人体健康有害, 1992 年欧盟将其含量作为判断液态奶成品质量优劣的一个重要指标[4]。

目前, 我国检测糠氨酸含量的标准一般采用农业部制定的标准 NY/T 939-2016《巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定》。试样经盐酸水解后测定蛋白质含量, 同时水解液经稀释后用高效液相色谱检测。该方法前处理相对简单, 但水解的质量直接影响糠氨酸检测结果。标准中规定水解时长是 12 h~23 h, 不同的水解时长是否会影响样品结果的重现性? 在实际检测中, 可能由于检测人员的疏忽以及资源的交叉使用, 存在水解不完全, 或者同一实验室不同人员不同时间水解时长有差异的问题, 尤其是大批量检测, 确切的水解时长是有利于人员操作和减少结果不确定性的。水解需要密闭耐热管, 但实际操作中, 这种百分百密闭的水解管是比较难实现的, 由此带来水解前后的差异会不会对结果有影响, 也是需要考虑的。另外, UHT 灭菌乳中糠氨酸含量与常温储存天数是否存在线性相关性, 还有待验证, 因为这直接影响到 UHT 灭菌乳是否添加了复原乳的判断。所以, 本实验考察了实际检测中可能存在的水解时长对糠氨酸含量的影响、水解时容器密闭性对蛋白质含量的影响以及 UHT 灭菌乳糠氨酸含量变化与储存天数的关系。

2. 仪器设备与试剂

2.1. 仪器设备

Agilent HPLC1200, 配备 DAD 检测器的高效液相色谱; 色谱柱: Agilent ZORBAX 300SB-C18, 4.6 mm * 250 mm * 5 μ m; 分析天平: 精确到 0.1 mg; 电热恒温鼓风干燥箱: AHG-9203; 移液器: 20 μ L、200 μ L、

1000 μL ; 容量瓶: 10 mL、1000 mL。

2.2. 试剂

甲醇: HPLC 级; 38%浓盐酸: 优级纯; 三氯乙酸: 色谱纯; 一级水, 符合 GB/T 6682; 乙酸铵: 分析纯; 3 mol/L 盐酸溶液: 在 7.5 mL 水中加入 2.5 mL 浓盐酸, 混匀; 10.6 mol/L 盐酸溶液: 在 12 mL 水中加入 88 mL 浓盐酸, 混匀; 乙酸铵溶液(6 g/L): 准确称取 0.6 g 乙酸铵溶于水中, 定容至 100 mL; 0.1% 三氯乙酸溶液: 准确移取 1000 μL 三氯乙酸, 用水定容至 1 L; 标准物质: 糠氨酸盐酸盐, 肽纯度系数 69.9%, 品牌: Iris, CAS: 19746-33-9。

3. 试验方法

3.1. 不同水解时长对 UHT 灭菌乳中糠氨酸含量的影响

以市售的 UHT 灭菌乳为样品, 吸取 2 mL 样品, 置于密闭耐热管中, 加入 6.00 mL 10.6 mol/L 盐酸溶液, 混匀, 密闭试管, 置于干燥箱中, 在 110 $^{\circ}\text{C}$ 下分别加热 0 h (常温放置 18 h)、6 h、12 h、16 h、18 h、20 h、23 h。再继续按 NY/T 939-2016 完成水解液的制备, 用 HPLC-DAD 测试糠氨酸含量, 按 GB 5009.5 测定蛋白质含量。

3.2. 水解前后质量损失对蛋白质含量的影响

本实验选取了实验室常用的三种密闭耐热管, 分别是带螺旋盖的 15 cm 水解管、顶空瓶、防爆管, 顶空瓶水解前会将配套盖子用压盖器压紧密封, 防爆管和带螺旋盖的 15 cm 水解管可通过手动拧紧, 并用生料带密封柱瓶口。分别将样品放置在以上三种管中进行 18 h 的水解。水解前后称量管重, 记录质量。

3.3. UHT 灭菌乳糠氨酸含量变化与储存天数的关系

将同一批次的若干样品放置在室温条件下, 从 0 天开始, 每隔一段时间取其中一个样品进行糠氨酸含量的检测。

4. 结果与分析

4.1. 不同水解时长对 UHT 灭菌乳中糠氨酸含量的影响

Table 1. Furosine content in the sample with different hydrolysis duration
表 1. 不同水解时长下样品中糠氨酸含量

水解时长(h)	样品中糠氨酸浓度(mg/100g 蛋白质)
0	未检出(ND)
6	145.8
12	179.1
16	170.3
18	169.3
20	175.8
23	181.1

糠氨酸含量以 mg/100g 蛋白质含量表示, 表 1 是不同水解时长下糠氨酸的含量。从表格数据可知, 样品没有水解时, 即水解时长为 0 h, 样品中是检测不到糠氨酸的。UHT 灭菌乳在加热处理过程中虽然发生了美拉德反应, 即氨基化合物与羧基化合物在加热条件下发生的一系列化学反应[5], 但美拉德反应复杂, 分为初始、高级和最终三个阶段, 初始阶段形成席夫碱, 经环化、重排形成 Amadori 化合物[6]。Amadori 化合物比较稳定, 在酸性环境中, 才可水解生成糠氨酸[7]。所以, UHT 灭菌乳的糠氨酸只有先经过水解才能检测出来。当水解时长为 6 h 时, 样品中检测到的糠氨酸含量为 145.7 mg/100g 蛋白质, 而水解时长为 12 h, 糠氨酸含量增加, 之后随着水解时长增加, 糠氨酸含量基本稳定在 169.3~181.1 mg/100g 蛋白质之间, RSD 为 2.98%。也就是说, 在标准规定的水解时长 12 h~23 h 内, 样品中的 Amadori 化合物基本可以水解完全, 糠氨酸的含量不受水解时长的影响。

4.2. 水解前后质量损失对蛋白质含量的影响

根据标准方法中糠氨酸含量计算公式, 糠氨酸的含量等于水解液中糠氨酸的浓度除以水解液中蛋白质浓度, 所以, 糠氨酸含量不会因为水解液体积或质量变化而变化。但是样品中的蛋白质含量与水解液中蛋白质浓度相关。按照标准中水解液中蛋白质含量的测定方法, 样品中蛋白质含量的计算公式如下:

$$C(\text{g}/100\text{g}) = \frac{1}{10} C_0 \times 8(\text{样液} + \text{盐酸体积}) \div 2 \quad (1)$$

式中:

C_0 ——水解液中蛋白质含量, (g/L);

8——是 2 mL 样液和水解时加入 6 mL 10.6 mol/L 盐酸溶液的体积和, (mL);

2——测试水解液中蛋白质含量时所取的水解液体积, (mL);

10——是换算系数。

从式(1)可知, 当水解液体积发生变化, 即不再是 8 mL, 样品的蛋白质含量会随之改变。表 2 是不同水解管水解前后的质量变化。由表 2 数据可知, 这三种水解管密封性不够好, 水解过程中导致了水解液的损失。带螺旋盖的 15 cm 水解管质量有损失可能原因是盖子与管不匹配; 防爆管主要是耐高温高压, 密闭性不够好; 顶空瓶隔垫是丁腈橡胶, 在强酸高温下容易腐蚀, 所以导致密封性不足。根据以上分析, 这三种水解管都不符合标准方法的要求, 应该更换合适的密封水解管, 或者采取合理的处理方式以减少测量的不确定度, 比如水解前后进行称量, 当质量变化超过某一范围时, 补加 3 mol/L 的盐酸溶液。

Table 2. Quality change of different hydrolysis tubes before and after hydrolysis

表 2. 不同水解管水解前后质量变化

水解管名称	水解前质量(g)	水解后质量(g)	差值
带螺旋盖的 15 cm 水解管	33.9622	33.0631	0.8991
防爆管	42.7407	42.1958	0.5449
顶空瓶	32.7788	32.7607	0.0181

4.3. UHT 灭菌乳糠氨酸含量变化与储存天数的关系

NY/T 939-2016 中 4.1.6.3 UHT 灭菌乳结束时糠氨酸含量符合 $FT = F - 0.7t$ 的关系, 其中 FT 是灭菌结束时糠氨酸含量, F 是测试时的糠氨酸含量, t 表示常温存放天数。而测试结果显示(见图 1): 市售的 UHT 灭菌乳在常温(RT)放置下, 实际测试值不符合这一关系。UHT 灭菌乳一般保质期为 6 个月, 本实验

室做了近 6 个月的测试, 发现糠氨酸含量有随存放天数逐渐增加的趋势, 但变化缓慢, 且相同存放天数下, 实际测试值远低于关系中的理论值。出现这种差异的可能原因是: 这一关系最早提出时间是在二十世纪 90 年代[8], 当时的储存条件, 与现在已发生了变化, 例如包装。且在测试标准中, 只提及到这一关系中的存放温度, 其它影响因素并未有相关说明, 如湿度、UHT 灭菌乳的容器以及包装材质等[9]。

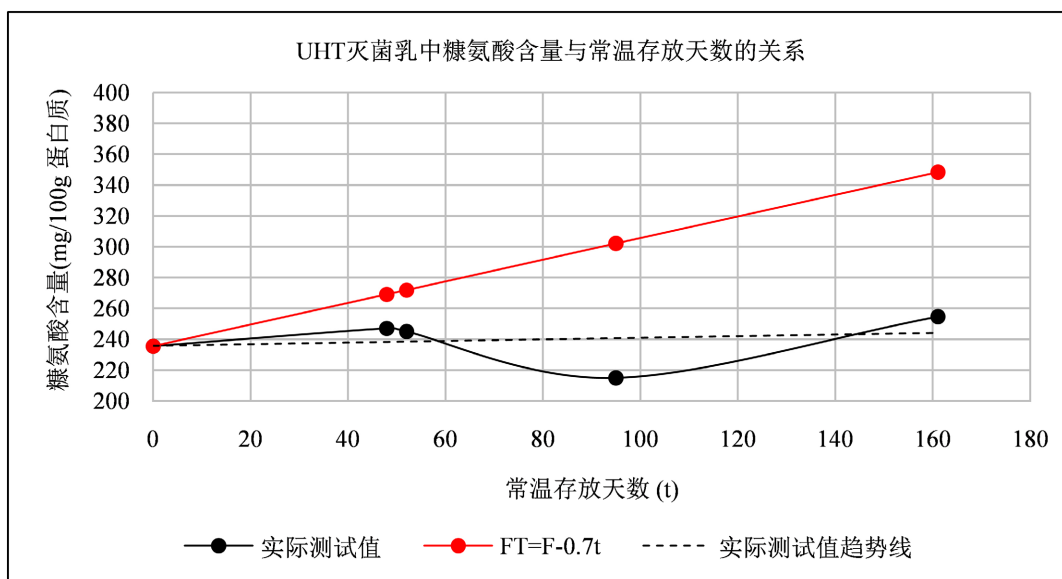


Figure 1. Relationship between furosine content in UHT sterilized milk and RT storage days

图 1. UHT 灭菌乳中糠氨酸含量与常温(RT)存放天数的关系

5. 结论

从以上结果与分析可知, 当水解时长是在 12 h~23 h 范围内, 不同水解时长带来的结果差异很小, 基本可以忽略; 而水解时长小于 12 h 或者完全没有水解时, 样品中的糠氨酸没有完全转化形成, 导致结果偏低或者假阴性; 水解管密封性不符合要求, 对直接导致水解液的挥发而影响蛋白质的测试浓度, 从而导致测试值与标签值或者理论值不符; 随着科技的进步, UHT 灭菌乳包装材料以及储存环境都已得到改善, UHT 灭菌乳中糠氨酸含量与常温存放天数不再存在严格意义上的线性关系。本实验从实际测试出发, 探讨了标准方法中几个可能被忽视的问题, 验证了水解时长、水解管密封性对测试分析的影响, 并验证了 UHT 灭菌乳糠氨酸含量与储存天数不存在线性关系, 对实际测试具有重要的借鉴意义。

参考文献

- [1] 全国畜牧业标准化技术委员会. NY/T939-2016 巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定[S]. 北京: 标准出版社, 2016.
- [2] 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, 34(2): 103-104.
- [3] 乔煦玮, 王振华, 曾里, 等. 温度与复原度对巴氏杀菌乳中糠氨酸含量影响的研究[J]. 食品工业, 2011, 32(3): 17-19.
- [4] 许国庆, 赵慧芬, 李克杰, 等. 乳和乳制品中糠氨酸含量的测定方法[J]. 中国奶牛, 2006(7): 44-46.
- [5] 张宁. 液态乳生产工艺对糠氨酸含量的影响的初步研究[J]. 山东食品发酵, 2008(3): 19-21.
- [6] Berg, H.E. and Van Boekel, M.A.J.S. (1994) Degradation of Lactose during Heating of Milk I Reaction Pathways. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **48**, 157-175.
- [7] Van Boekel, M.A.J.S. (1998) Effect of Heating on Maillard Reaction in Milk. *Food Chemistry*, **62**, 403-414.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00075-2)

- [8] Corzo, N., Lopez-Fandino, R., Delgado, T., *et al.* (1994) Changes in Furosine and Proteins of UHT-Treated Milks Stored at High Ambient Temperatures. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, **198**, 302-306.
<https://doi.org/10.1007/BF01193179>
- [9] 兰欣怡. 不同加热条件和添加复原乳对牛奶热敏感指标的影响[D]: [硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.