

DBS22

吉 林 省 地 方 标 准

DBS22/008—2012

食品安全地方标准 乳与乳制品中 L-羟脯氨酸的测定

2012 - 12 - 10 发布

2013 - 01 - 01 实施

吉林省卫生厅 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准起草单位： 吉林省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人： 李青、方赤光、刘思洁、张冠英、王蕴馨。

食品安全标准

乳与乳制品中 L-羟脯氨酸的测定

1 范围

本标准规定了乳与乳制品中L-羟脯氨酸的分光光度、高效液相色谱、液相色谱-串联质谱测定方法。本标准适用于乳与乳制品中L-羟脯氨酸的测定。

本标准方法的检出限为：分光光度法为20mg/kg；高效液相色谱法为0.5mg/kg；液相色谱-串联质谱法为0.005mg/kg。

第一法 分光光度法

2 原理

试样用硫酸水解，L-羟脯氨酸经氯胺T氧化后，与对二甲氨基甲醛反应生成红色化合物，在波长558 nm处测定吸光度并与标准比较定量。

3 试剂和材料

除另有说明外，所有试剂均为分析纯，实验用水为 GB/T6682 规定的三级水。

3.1 硫酸溶液[$c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 3 \text{ mol/L}$]：取 375 mL 水于 1 L 量筒中，搅拌下缓慢加入 160 mL 浓硫酸，冷却至室温后用水定容。

3.2 柠檬酸缓冲液(pH = 6.8)：称取 26.0g 柠檬酸、14.0g 氢氧化钠和 78.0g 无水乙酸钠，溶于 500 mL 水，转入 1L 容量瓶中，加入 250mL 正丙醇，用水定容到刻度。

3.3 氯胺 T 溶液：称取 1.41g 氯胺 T，用 100mL 缓冲溶液(4.2)溶解。临用现配。

3.4 显色剂：称取 10.0g 二甲氨基甲醛，用 35mL 高氯酸(60%质量分数)溶液或 30mL 高氯酸(70%质量分数)溶液溶解，缓慢加入 65 mL 异丙醇。临用现配。

3.5 氢氧化钠溶液(200g/L)：称取 100g 氢氧化钠于 500mL 量筒中，搅拌下缓慢加水至 400mL，冷却至室温后用水定容到 500mL。

3.6 标准储备液：称取 50mg L-羟脯氨酸标准品于 100mL 容量瓶中，用水溶解，加 1 滴硫酸溶液(4.1)，用水定容至刻度。

3.7 标准使用液：移取 5.00 mL 标准储备液至 500 mL 容量瓶中用水定容至刻度。分别吸取该溶液 10.00mL、20.00mL、25.00mL、40.00 mL、50.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，所得标准使用液浓度依次为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.25 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

4 仪器和设备

4.1 紫外分光光度计。

4.2 分析天平：感量 1 mg。

- 4.3 酸度计。
- 4.4 恒温干燥箱。
- 4.5 恒温水浴锅。

5 分析步骤

5.1 试样制备

取液体乳样10.0g (乳粉1.0g加水至10.0g左右)至100mL具塞比色管或具塞三角烧瓶中,加入30mL硫酸溶液,盖上塞子,置于恒温干燥箱中, 105℃水解6h。

5.2 过滤

趁热将水解产物用滤纸过滤至250mL容量瓶中,用10mL硫酸溶液分3次洗涤比色管或三角烧瓶和滤纸,滤干后,用10mL水洗涤滤纸,合并上述溶液,用水定容至刻度,摇匀,所得溶液为水解液。

5.3 调 pH 值

用移液管移取10mL水解液至100mL容量瓶中,加水50 mL,用氢氧化钠溶液(4.5)将pH调至中性再用水定容至刻度,所得溶液为待测液。

5.4 测定

5.4.1 取 4.0 mL 处理好的待测液于 25 mL 比色管中,加入 2.0 mL 氯胺 T 溶液,混匀后于室温下放置 20 min。取 4.0 mL 水于 25 mL 比色管中,与待测液同步实验,可得空白管。

5.4.2 加入 2.0 mL 显色剂,充分混匀后,迅速将比色管放入 60 °C 水浴中加热 20 min 后取出比色管,用冰水浴冷却比色管 3 min,然后在室温下放置 30 min。用空白管做参比,在波长 558 nm 处以紫外分光光度计测定其吸光度值。

5.4.3 标准曲线配制 分别取 4.0 mL 标准使用液,进行 6.4.1 至 6.4.2 的操作。以空白管做参比,以标准使用液的吸光度值为纵坐标,相对应的量(μg)为横坐标,绘制标准曲线。

6 结果计算

根据标准曲线查得该吸光度值对应的L-羟脯氨酸的量(μg),再通过公式计算样品中羟脯氨酸的含量。

按式(1)计算

$$X = \frac{C \times 1000}{m \times A \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中 L-羟脯氨酸的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);
- C —— 由标准曲线得到的试样溶液中 L-羟脯氨酸的浓度, 单位为微克 (μg);
- A —— 稀释倍数;
- m —— 称样量, 单位为克 (g)。

7 准确度和精密度

7.1 准确度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

在重现性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

7.2 精密度

本方法添加浓度为0.5 mg~2.0 mg时，加标回收率为87.2%~92.7%。

第二法 高效液相色谱法

8 原理

试样经水解后，取上清液用丹磺酰氯在避光条件下衍生反应，生成具有荧光基团的稳定化合物，以乙腈和乙酸钠缓冲液为流动相，经C₁₈色谱柱分离，荧光检测器（激发波长330 nm，发射波长530 nm）检测，外标法测定试样中L-羟脯氨酸的含量。

9 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

9.1 乙腈：色谱纯。

9.2 丹磺酰氯：色谱纯。

9.3 盐酸甲胺。

9.4 无水乙酸钠。

9.5 苯酚。

9.6 盐酸（36%~38%，摩尔浓度约为12mol/L）。

9.7 冰乙酸。

9.8 无水碳酸钠。

9.9 L-羟脯氨酸标准品，纯度为99%。

9.10 碳酸钠缓冲液（80mmol/L）：称取0.424g无水碳酸钠，加40mL水溶解，用1mol/L盐酸调pH值至9.5，用水定容至50mL。

9.11 蛋白水解剂：称取0.1g苯酚置于100mL容量瓶，加入50mL盐酸，用水定容至100mL。

9.12 丹磺酰氯溶液（1.5 mg/mL）：称取0.15 g丹磺酰氯，用乙腈溶解并定容至100mL。

9.13 盐酸甲胺溶液（20mg/mL）：称取2.0g盐酸甲胺，用水溶解并定容至100mL。

9.14 乙酸钠缓冲液（10mmol/L）：称取0.820g乙酸钠，加800mL水溶解，用冰乙酸调节pH值至4.8，用水定容至1000mL，经0.45μm微孔滤膜过滤。

9.15 L-羟脯氨酸标准储备液（1 mg/mL）：准确称取50mg L-羟脯氨酸标准品，用水溶解并定容至50mL。

9.16 微孔滤膜：0.45μm，水相。

10 仪器与设备

10.1 高效液相色谱仪：配有荧光检测器。

10.2 酸度计。

- 10.3 恒温干燥箱。
 10.4 超声波振荡器。
 10.5 涡旋混合器。
 10.6 喷灯。

11 分析步骤

11.1 试样制备

准确称取固体乳粉0.1 g, 液态乳0.5 g于安瓿瓶中, 加入3 mL蛋白水解剂, 充分混匀, 用酒精喷灯封口, 置于恒温干燥箱中, 110℃水解24 h。

11.2 样品衍生

吸取1.00 mL样液到10 mL具塞玻璃试管中, 加入1.00 mL碳酸钠缓冲液(10.10), 1.00 mL丹磺酰氯溶液(10.12), 充分混合, 室温避光衍生反应90 min-120 min, 加入0.10 mL 盐酸甲胺溶液(10.13)涡旋混合, 以终止反应, 避光静置至沉淀完全。取上清液经0.45 μm微孔滤膜过滤, 取滤液备用。衍生物在4℃可避光保存48 h。

11.3 测定

11.3.1 参考色谱条件

色谱柱: C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5μm)或相当者。

流动相: 乙腈: 乙酸钠(pH=4.8, 10 mmol/L);

流速: 1.0 mL/min。

柱温: 35℃。

进样量: 10 μL。

荧光检测波长: Ex=330nm, Em=530 nm。

梯度洗脱参考条件: 见表1。

表1 (色谱分离) 梯度洗脱条件

时间 (min)	乙酸钠	乙腈	梯度变化曲线
0.0	95%	5%	0
2.0	95%	5%	1
30.0	65%	35%	6
35.5	65%	35%	1
40.0	0%	100%	6
55.0	0%	100%	1
60.0	95%	5%	6

注: 流动相比比例可根据情况适当调节。

11.3.2 标准曲线配制

用水将L-羟脯氨酸标准储备液(10.15)分别稀释成1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、50.0 μg/mL, 按衍生样品的步骤(12.2)对标准品进行衍生反应, 得到标准工作液。

将上述L-羟脯氨酸标准工作液依次进行色谱测定（其标准样品丹磺酰氯衍生物色谱图见附录A中图A.1），记录色谱峰高（或峰面积）。以峰高（或峰面积）为纵坐标，以标准工作液浓度为横坐标绘制标准曲线。

11.3.3 试样溶液的测定

吸取试样待测液（12.2）10 μL，将试样待测液进行色谱测定，从标准曲线中查得试液中L-羟脯氨酸的浓度。

12 结果计算

试样中L-羟脯氨酸的含量X，以质量分数毫克每千克（mg/kg）表示，按（2）计算：

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X——试样溶液中L-羟脯氨酸的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C——试样溶液中L-羟脯氨酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V——试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

13 准确度和精密度

13.1 准确度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

在重现性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

13.2 精密度

本方法添加浓度为0.02 mg~0.32 mg时，加标回收率为89.5%~111.0%。

第三法 液相色谱-串联质谱法

14 原理

试样经水解后，以乙腈和甲酸水溶液为流动相，经色谱柱分离，多离子反应方式（MRM）检测，外标法定量。应用子离子扫描方式对阳性样品进行定性确认。

15 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

15.1 乙腈：色谱纯。

15.2 甲酸：色谱纯。

15.3 苯酚。

15.4 盐酸（36%–38%，摩尔浓度约为 12mol/L）。

15.5 蛋白水解剂：称取 0.1g 苯酚置于 100mL 容量瓶，加入 50mL 盐酸，用水定容至 100mL。

15.6 L-羟脯氨酸标准品，纯度为 99%。

15.7 L-羟脯氨酸标准储备液（1 mg/mL）：准确称取 50mg L-羟脯氨酸标准品，用水溶解并定容至 50mL。

15.8 L-羟脯氨酸标准中间液（10 μg/mL）：用移液器精确吸取 100 μL L-羟脯氨酸标准储备液于 10 mL 容量瓶，用水定容至刻度。

16 仪器与设备

- a) 液相色谱-串联质谱联用仪。
- b) 恒温干燥箱。
- c) 超声波振荡器。
- d) 涡旋混合器。
- e) 喷灯。

17 分析步骤

17.1 试样制备

准确称取固体乳粉 0.1 g，液态乳 0.5 g 于安瓿瓶中，加入 3 mL 蛋白水解剂，充分混匀，用酒精喷灯封口，置于恒温干燥箱中，110℃ 水解 24h。

17.2 测定

17.2.1 参考色谱条件

色谱柱：BEH T3（2.1 mm×100 mm，1.8μm）或相当者。

流动相：水相：0.1%甲酸；有机相：乙腈。

流速：0.3 mL/min。

柱温：35℃。

进样量：5 μL。

梯度洗脱参考条件：见表 2

表 2（色谱分离）梯度洗脱条件

时间 (min)	水相	有机相	梯度变化曲线
0.0	90%	10%	0
1.0	90%	10%	1
3.5	40%	60%	6
3.7	0%	100%	6
4.8	0%	100%	1
5.0	90%	10%	6

注：流动相比比例可根据情况适当调节。

17.2.2 检测离子参数选择

见表 3。

表3 L-羟脯氨酸离子选择参数表

化合物	母离子	定量子离子	碰撞能量	定性子离子	碰撞能量	离子化方式
L-羟脯氨酸	365.16	170.15	24	86.04	14	ESI+

17.2.3 标准曲线绘制

用水将L-羟脯氨酸标准中间液(8.2.16)分别稀释成1ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL, 进样得到标准曲线。(其标准样品多反应监测谱图见附录A中图A.2和图A.3)

17.2.4 试样溶液的测定

吸取试样待测液(18.1) 5 μL, 将试样待测液进行质谱测定, 从标准曲线中查得试液中 L-羟脯氨酸的浓度。

要求被测试样中 L-羟脯氨酸的保留时间与标准溶液中 L-羟脯氨酸保留时间的相对偏差小于 20%; 样品特征离子的相对丰度与浓度相当混合标准溶液的相对丰度一致, 相对丰度偏差不超过表 4 的规定, 则可判断样品中存在 L-羟脯氨酸。

表4 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	20%—50%	10%—20%	<10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

18 结果计算

试样中羟脯氨酸的含量 X, 以质量分数毫克每千克 (mg/kg) 表示, 按 (3) 计算:

$$X = \frac{C \times V}{m} \times \frac{1}{1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

X——试样溶液中 L-羟脯氨酸的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

C——试样溶液中 L-羟脯氨酸的浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

V——试样溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

m——试样的质量, 单位为克 (g)。

19 准确度和精密度

19.1 准确度

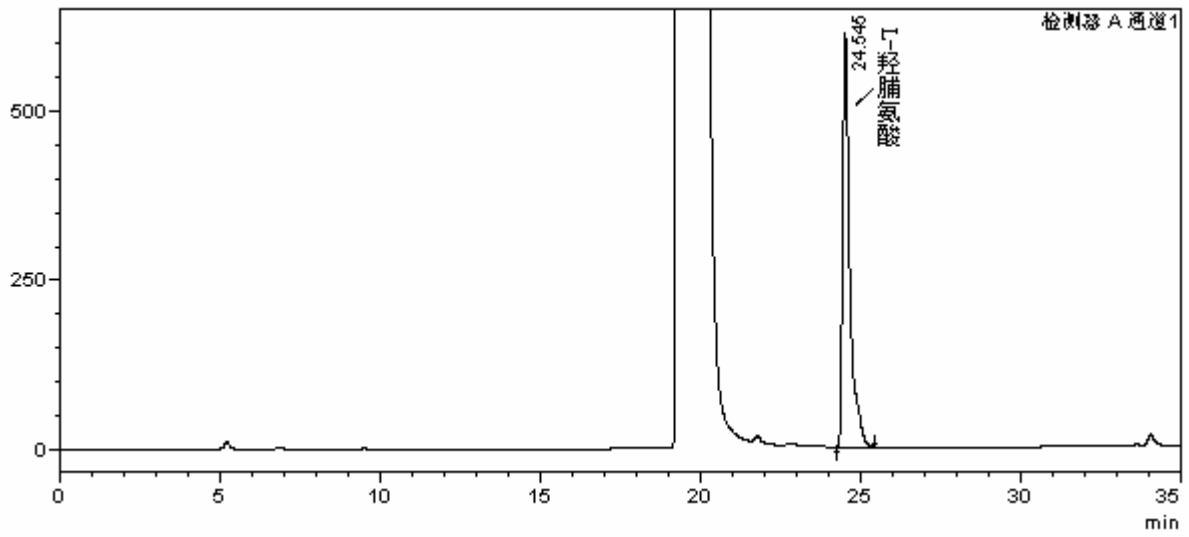
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

在重现性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

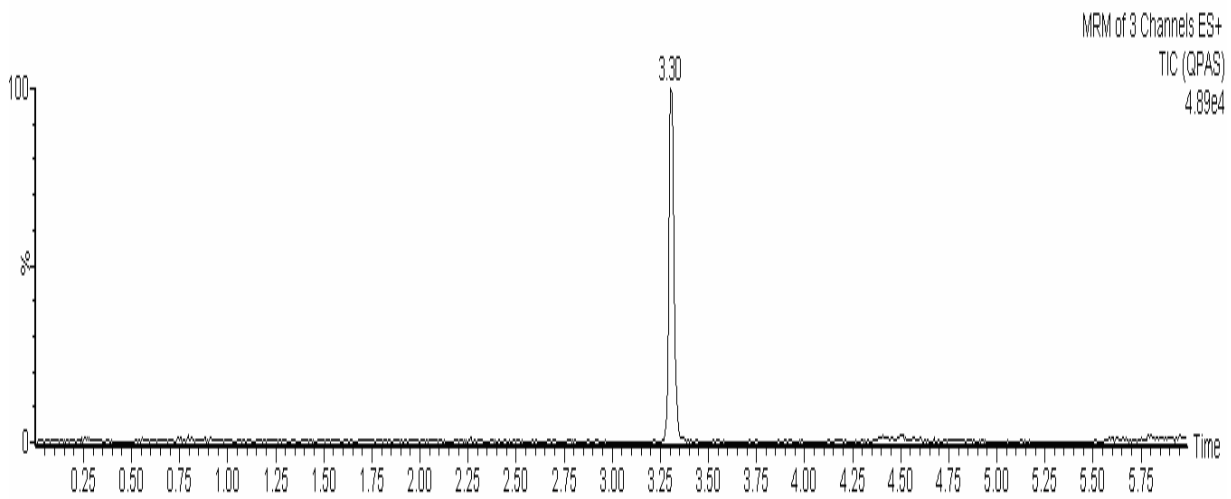
19.2 精密度

本方法添加浓度为0.02 mg~0.08 mg时, 加标回收率为88.5%~109.0%。

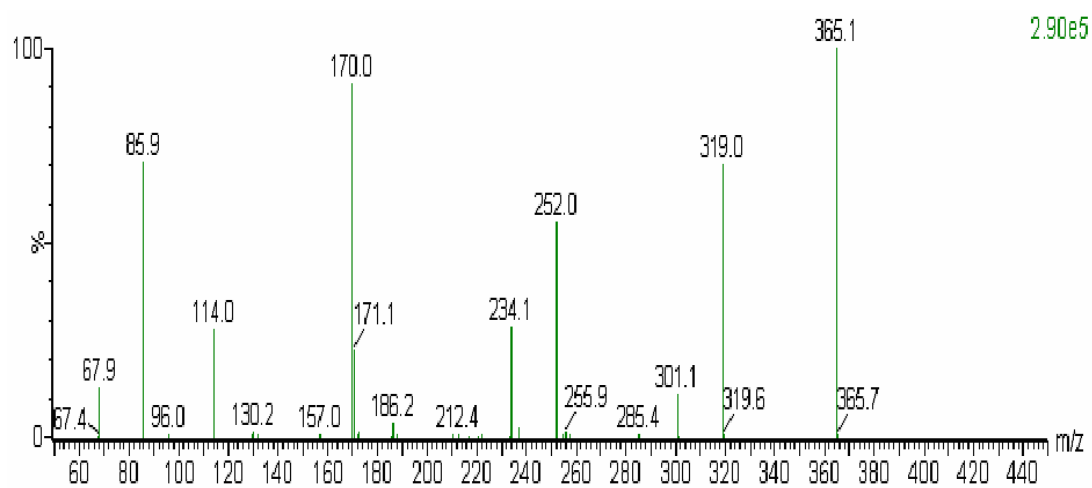
附录 A
(资料性附录)
L-羟脯氨酸标准样品色谱图



图A.1 L-羟脯氨酸标准样品丹磺酰氯衍生物的色谱图



图A.2 L-羟脯氨酸标准样品多反应监测色谱图



图A.3 L-羟脯氨酸标准样品母离子 MRM 图