

乳饮料及乳制品中游离甘氨酸的测定

钟秋璇

(温州市质量技术监督检测院,浙江温州,325001)

摘要 利用氨基酸分析仪测定乳饮料及乳制品中游离甘氨酸含量。研究了样品前处理方法和仪器色谱分离条件对乳饮料及乳制品中甘氨酸测定的影响。该方法具有较好的重现性,加标回收率为96.4%~100.6%,方法精密密度为0.99%,标准曲线线性相关系数为0.999 9,20 μ L进样最低检出限为1.0 pmol。

关键词 乳饮料,乳制品,游离甘氨酸,氨基酸分析仪

甘氨酸(glycin, Gly)又名氨基乙酸,是氨基酸系列中结构最简单的一种氨基酸,在食品加工中常用作食品的营养增补剂、增香剂、调味剂、甜味剂、防腐剂等。此外,在甜酱、酱油、醋、果汁中添加甘氨酸可以改善食品的风味^[1]。但某些乳饮料及乳制品生产厂家为提高产品中总蛋白含量,人为加入甘氨酸。然而血中甘氨酸过多对肝脏不利,甘氨酸与胆汁酸结合生成甘氨酸,对肝脏有毒性作用,会引起胆汁淤积。

2006年8月,国家质检总局发布预警公告:部分乳饮料企业为了使蛋白质含量达标,用成本较低的甘氨酸代替乳粉。根据GB 2760《食品添加剂使用卫生标准》中的规定,我国甘氨酸允许使用的范围为调味料和豆奶,最大使用量为1 g/kg,而在乳饮料和乳制品中是不允许添加甘氨酸的^[2]。美国食品药品监督管理局(FDA)1994年规定,甘氨酸在食品中的添加限量不得超过蛋白质总量的3.5%^[3]。

由于乳饮料及乳制品中所添加的甘氨酸是以游离状态存在,在判断乳饮料及乳制品中是否添加了甘氨酸时,不宜将蛋白质水解后测定甘氨酸的含量^[4],而应检测游离甘氨酸的量。目前测定氨基酸的方法主要有纸色谱法、离子交换色谱法、反相高效液相色谱法、毛细管电泳法、薄层色谱法、气相色谱法等^[5]。本文采用氨基酸分析仪法,样品前处理简单,可对游离氨基酸直接进行分析。作者利用日立L-8900型氨基酸自动分析仪,研究了乳饮料及乳制品中的游离甘氨酸含量的测定分析,并对方法进行了验证,获得了较满意的分析结果,从而为食品安全监管部门提供技术支持。

第一作者:硕士,助理工程师。

收稿日期:2008-10-06,改回日期:2009-01-04

1 实验部分

1.1 仪器设备

氨基酸分析仪,日立L-8900型自动氨基酸分析仪;离心机,3K15型离心机,曦玛离心机(上海)有限公司。

1.2 试剂

混合氨基酸标准溶液(日立公司)、甘氨酸标准品(日立公司)、HCl、柠檬酸三钠、NaOH、NaCl、柠檬酸、乙醇、乙酸钠、冰醋酸、硼氢化钠、茚三酮、乙二醇单甲基醚、醋酸锌、亚铁氰化钾。

茚三酮显色剂:将39.00 g茚三酮溶于979 mL乙二醇单甲基醚中,用N₂鼓泡,混匀,再加入硼氢化钠81 mg,再次用N₂鼓泡,混匀,低温保存。

茚三酮缓冲液:将204.00 g乙酸钠溶于336 mL蒸馏水中,加入123 mL冰醋酸,再加入401 mL乙二醇单甲基醚中,用N₂鼓泡,混匀,低温保存。

1.3 色谱条件

分离柱:26 mm i.d×150 mm 不锈钢柱;交换树脂型号:No. 2622SC(日本公司生产的氨基酸分析专用树脂);柱温:57℃;泵1流速:0.400 mL/min,泵2流速:0.350 mL/min;进样体积:20 μ L。

1.4 样品的处理

(1)乳饮料:准确称取5.0 g液体样品于50 mL容量瓶中,加入5 mL亚铁氰化钾溶液(0.25 mol/L),摇匀,再加入5 mL醋酸锌(1 mol/L)溶液,以沉淀蛋白质。加超纯水至刻度。摇匀,静止30 min,至蛋白分层,用定量滤纸过滤除去上层脂肪,弃去前10 mL初滤液。取滤液于离心管中,至15 000 r/min高速离心机离心20 min,用0.45 μ m滤膜过滤,上机分析。

(2)乳制品:准确称取1.0 g固体样品于20 mL

温水中,放置 10 min 后,超声萃取 10 min 或至样品全部溶解,转移至 50 mL 容量瓶中后,处理方法同上。

2 结果与讨论

2.1 试样的前处理方法选择

样品的前处理方法在氨基酸分析中具有重要的地位。在 GB/T 5009.124-2003《食品中氨基酸的测定》^[6]中,现行的测定甘氨酸的方法为水解法,食品中的蛋白质经过盐酸水解成游离的甘氨酸,用氨基酸自动分析仪测定甘氨酸的含量。蛋白质水解不可避免的产生甘氨酸,如需测定人为加入的甘氨酸量时,会干扰测定,无法准确测出人为加入的甘氨酸量。

由于甘氨酸是一种非蛋白的游离氨基酸,在水中呈游离态,人为加入的甘氨酸会溶解在水中,而如果蛋白质不水解则其中的甘氨酸不会产生干扰,故可采用蛋白质沉淀法来进行样品预处理。

2.2 蛋白质沉淀剂的选择

氨基酸自动分析仪对所进样品要求很严格,需要所进样品除去有机物、大分子物质、蛋白等物质。虽然样品溶解在水中后,游离态甘氨酸可溶解在水中,但非水解样品溶液中的部分水溶性蛋白经过高速离心仍无法除去,因此需选用蛋白沉淀剂除去经高速离心后仍无法去除的水溶性蛋白。醋酸铅,醋酸锌和亚铁氰化钾,盐酸,醋酸,三氯醋酸均可以沉淀蛋白。试验证明,醋酸锌和亚铁氰化钾沉淀效果较理想,1 mol/L 醋酸锌和 0.25 mol/L 亚铁氰化钾能使蛋白沉淀的较完全。

2.3 色谱分离条件

用 1 mol/L 醋酸锌和 0.25 mol/L 亚铁氰化钾可完全沉淀样品中的蛋白质,离心过滤后,取滤液直接上机测定。经氨基酸分析仪色谱柱的分离证明,用 1 mol/L 醋酸锌和 0.25 mol/L 亚铁氰化钾沉淀蛋白后的滤液,已基本消除了蛋白质大分子的干扰。

甘氨酸与大多数蛋白质氨基酸一样,具有与茚三酮发生显色反应,生成蓝紫色化合物的化学特性。因此,采用与分析蛋白质氨基酸相似的色谱条件,对甘氨酸进行分离,并通过反复的色谱条件优化,甘氨酸与其他氨基酸达到最佳分离状态(见图 1、图 2)。

2.4 标准曲线与最低检出限

配制浓度为 0.1、1.0、10.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的甘氨酸标准溶液,用氨基酸分析仪分析,以峰面积和浓度绘制标准曲线(见图 3)。线

性回归方程: $y = 29\,205x + 4\,691.5$;相关系数: $R^2 = 0.999\,9$ 。甘氨酸标准溶液进行氨基酸分析仪分析,在所测范围内呈很好的线性关系,并按信噪比 S/N 为 3 计,20 μL 进样,最低检出限为 1.0 μmol 。

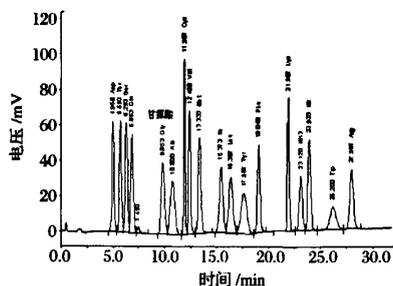


图 1 混合氨基酸标准品色谱图

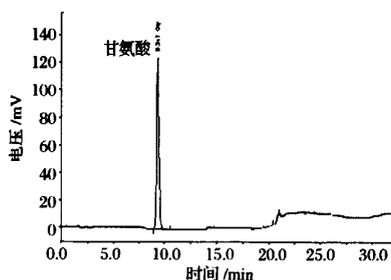


图 2 甘氨酸标准品色谱图

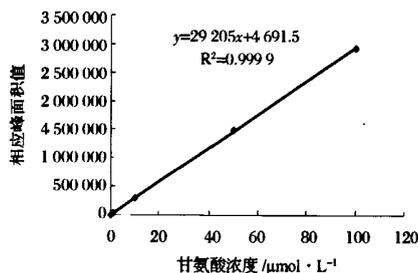


图 3 甘氨酸标准曲线

2.5 加标回收率

在样品中加一定量的甘氨酸标样,同 1.4 方法进行样品处理,通过 5 次试验(如表 1 所示),平均加标回收率为 99.0%。

表 1 回收率测定结果

编号	加入量 / μmol	检测值 / μmol	回收率 / %	平均回收率 / %
1	2.5	2.41	96.4	99.0
2	2.5	2.48	99.2	
3	5.0	4.86	97.2	
4	5.0	5.03	100.6	
5	10.0	10.05	100.5	
6	10.0	10.03	100.3	

2.6 精密度试验

在相同试验条件下,对浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的甘氨酸标样进样 6 次平行独立测定,由表 2 可知,RSD 为 0.99 %。

表 2 精密度实验

编号	测定值/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD / %
1	10.11	0.99
2	10.08	
3	10.03	
4	9.85	
5	9.93	
6	9.95	

2.7 样品的检测与分析

分别取 5 份市售不同的乳饮料样品和奶粉样品,按上述样品处理方法进行处理后进样,测定不同样品中游离甘氨酸的含量。同时按照 GB/T 5009.5—2003^[7]的方法测定每份样品中蛋白质的含量,对两者的含量进行比较,结果见表 3,表 4。

表 3 乳饮料样品测试分析结果

样品编号	蛋白质含量 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	游离甘氨酸含量 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	游离甘氨酸 与蛋白质的 比值/%
乳饮料 1	11.8	0.006	0.05
2	11.5	0.007	0.06
3	11.2	0.046	0.41
4	11.4	0.007	0.06
5	10.5	$<1 \times 10^{-4}$	0

表 4 奶粉样品测试分析结果

样品编号	蛋白质含量 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	游离甘氨酸含量 / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	游离甘氨酸 与蛋白质的 比值/%
乳制品 6	172	0.112	0.07
7	150	0.087	0.06
8	135	0.109	0.08
9	169	0.093	0.06
10	186	0.051	0.03

结果表明,乳饮料和乳制品样品中,游离甘氨酸的含量都比较低,它与蛋白质含量的比值,均小于 FDA 规定的 3.5 %;乳饮料样品 3 中的游离甘氨酸,可能是使用的原料牛乳或乳粉中带入了少量的,而不是人为的违规添加进去的。

3 结论

利用蛋白质沉淀-氨基酸分析仪法,能快速准确地测定乳饮料及乳制品中游离甘氨酸的含量,该方法样品处理简便易操作,可以对甘氨酸直接进样分析,避免了蛋白质水解、衍生产物的多样性等问题,能快速、准确地判断乳饮料及乳制品中是否违规添加了游离甘氨酸,为食品安全监管部门及时判定、保护消费者利益提供科学的判断依据和技术支持。

参 考 文 献

- 宋秀梅,尹秋响,王静康. 甘氨酸的应用及生产技术[J]. 氨基酸与生物资源,2003,25(2):55~60
- 食品添加剂使用卫生标准(1999 年增补品种)[S]. GB 2760-1996
- 21 Code of Federal Regulations, Chapter I, Part 172—Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption, Subpart D—Special Dietary and Nutritional Additives, Sec. 172.320 Amino acids.
- 宁啸骏,张燕琴. 高效液相色谱法测定含乳饮料中游离甘氨酸的方法研究[J]. 食品与发酵工业,2006,32(11):136~138
- 戴红,张宗才,张新申. 氨基酸分析的检测方法评述[J]. 皮革科学与工程,2004,14(3):39~43
- 食品中氨基酸的测定[S]. GB/T 5009.124—2003
- 食品中蛋白质的测定[S]. GB/T 5009.125—2003

Determination of Free-glycin in Milk Drinks and the Dairy Products

Zhong Qiuzan

(Wenzhou Institute of Technology Testing and Calibration, Wenzhou 325001, China)

ABSTRACT The amino acid analysis direct system was used to test the free-glycin in the milk drinks and the dairy products, and the methods for sample pretreatment and chromatographic parameters were studied. The test results were to analysis whether the milk drinks and the dairy products had free-glycine. The method was convenient, accurate and practical, the recovery rate was 96.4 % ~100.6 %, RSD was 0.99 %, the relative modulus was 0.9999, the minimum amount that can be detected was 1.0 pmol in 20 μL injection.

Key words milk drink, dairy product, free-glycin, amino-acid analyzer