

柱前衍生高效液相色谱法测定水产品中羟脯氨酸含量

黄 会¹, 宫向红^{2,3}, 刘慧慧^{2,3}, 徐英江^{2,3}, 李佳蔚⁴, 张秀珍^{2,3,*}

(1.上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2.山东省海洋水产研究所, 山东 烟台 264006;

3.山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006; 4.烟台山水海产有限公司, 山东 烟台 264006)

摘 要: 建立水产品中羟脯氨酸含量的柱前衍生高效液相色谱测定方法。样品经酸水解, 丹酰氯衍生, C₁₈ 柱分离, 紫外检测器检测。结果表明, 羟脯氨酸与其他氨基酸较好分离, 在 0.5~20 µg/mL 范围内线性关系良好($r > 0.9999$), 检出限 0.5 µg/mL, 平均回收率 80.2%~103%, RSD 范围 3.2%~5.6%。该方法灵敏、准确, 适用于水产品中羟脯氨酸含量的测定。

关键词: 羟脯氨酸; 丹酰氯; 柱前衍生; 高效液相色谱法; 水产品

Determination of Hydroxyproline in Fishery Products by Pre-Column Derivatization-High Performance Liquid Chromatography

HUANG Hui¹, GONG Xiang-hong^{2,3}, LIU Hui-hui^{2,3}, XU Ying-jiang^{2,3}, LI Jia-wei⁴, ZHANG Xiu-zhen^{2,3,*}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. Marine Fisheries Research Institute of Shandong Province, Yantai 264006, China;

3. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai 264006, China;

4. Yantai Shanshui Seafood Co. Ltd., Yantai 264006, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method was established for the determination of hydroxyproline in fishery products with pre-column derivatization. Samples were hydrolyzed with hydrochloric acid before pre-column derivatization with dansyl chloride. The analyze was separated using a C₁₈ column and detected using a UV detector. Good separation was achieved for hydroxyproline and other amino acids. The linear range was 0.5—20 µg/mL ($r > 0.9999$). The detection limit was 0.5 µg/mL. The average spike recovery rates were 80.2%—103% with a RSD of 3.2%—5.6%. The method was sensitive, accurate and suitable for the determination of hydroxyproline in fishery products.

Key words: hydroxyproline; dansyl chloride; pre-column derivatization; HPLC; fishery products

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0207-04

胶原蛋白主要存在于动物的皮、骨、软骨、肌腱、韧带和血管中, 是结缔组织中极其重要的结构蛋白质, 起着支撑器官、保护肌体的重要作用。羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)是胶原蛋白的特异性氨基酸, 在其他蛋白质中很少见^[1], 而且其在胶原蛋白中含量稳定, 占总氨基酸的 10%~14%; 在胶原蛋白的生物合成过程中, 没有游离的 Hyp 参与合成, 所有的 Hyp 均

由已合成的肽链中的脯氨酸经羟化酶作用转化而来, 因而可通过测定 Hyp 计算胶原蛋白的含量。此外, 最新研究表明, 胶原蛋白水解所得的胶原肽具有很好的吸收特性^[2], 而且还具有许多生理活性^[3-4], 而这些生理活性大多与 L-Hyp 有关。因此 Hyp 测定在实际应用中非常重要。

传统的测定 Hyp 的方法是比色法^[5-8], 其操作步骤

收稿日期: 2011-04-22

基金项目: 山东省水生动物营养与饲料泰山学者岗位资助项目;

国家海洋公益性行业科研专项(200805031; 200905019; 201105013)

作者简介: 黄会(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。E-mail: hh57319@126.com

* 通信作者: 张秀珍(1964—), 女, 研究员, 本科, 研究方向为水产品质量安全。E-mail: zxz0535501@126.com

繁琐,影响因素多,样品需要量大,且特异性、灵敏度差。与比色法相比,氨基酸自动分析法^[9]是一种快速、准确、灵敏度高的测定方法,但其费用高,普通实验室很少配备。而高效液相色谱仪普及率较高,且柱效高,灵敏度和精密度良好,近年来广泛用于氨基酸的分析测定^[10-15]。本实验利用丹酰氯对 Hyp 进行柱前衍生,建立测定水产品中 Hyp 含量的反相高效液相色谱法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鱼、虾、海参样品购自当地水产品市场。鱼去头、去皮、去内脏;虾去头、去壳;海参去沙嘴、内脏;以上处理样品分别取可食部分充分匀浆, -18℃ 冷冻保存备用。

碳酸氢钠、无水乙酸钠、盐酸、丙酮为分析纯;甲醇、四氢呋喃为色谱纯;水为超纯水。

L- 羟脯氨酸(L-Hyp, 纯度 99%)标准品(中国 J&K Chemical 公司),采用超纯水配成质量浓度 1.00g/L 的标准贮备液,于 4℃ 保存,临用时,用水逐级稀释成为适当浓度的标准工作液;丹酰氯(dansyl chloride, 98%, 美国 Acros Organics 公司),称取 0.04g 丹酰氯,用丙酮溶解,并定容至 10mL, 4℃ 避光保存,有效期 3 d。

1.2 仪器与设备

2695 高效液相色谱仪(配 2996 PDA 检测器) 美国 Waters 公司; FA25 匀浆机 上海 Fluko 公司; XW-80A 漩涡混合器 上海医科大学仪器厂; 101-2A 恒温干燥箱 上海阳光实验仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 样品水解

称取适量匀浆后的样品于水解管中,使每管中含蛋白质约 20mg,加入 6mol/L 盐酸溶液 6mL,充氮气 1min,抽真空至管内盐酸轻微起泡,用火焰将管封住。于 110℃ 水解 22h,冷却后,将水解液全部转移到 50mL 容量瓶中,加水至刻度。混匀后,取 1mL 水解液于 10mL 容量瓶中,加 2mol/L 氢氧化钠溶液 400μL,加水稀释至刻度。取 1mL 稀释液用 0.45μm 滤膜过滤备用。

1.3.2 衍生

取过滤后的稀释液 500μL 于 5mL 具塞离心管中,加饱和碳酸氢钠溶液 200μL,衍生试剂 400μL,漩涡混匀 30s, 80℃ 水浴中避光反应 45min,取出迅速冷却,加入 1mol/L 盐酸 400μL 终止反应,用 0.45μm 滤膜过滤,供高效液相色谱分析。

1.3.3 液相色谱条件

MG C₁₈ 色谱柱(250mm × 4.6mm, 5μm); 柱温 40℃; 检测波长 254nm; 进样量 20μL。流动相 A 为甲醇, B 为四氢呋喃-甲醇-0.05mol/L 乙酸钠溶液(1:15:84, V/V); 梯度洗脱程序见表 1, 流速 1.0mL/min。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	0	3	20	30	35	40
流动相 A/%	20	20	50	100	20	20
流动相 B/%	80	80	50	0	80	80

2 结果与分析

2.1 衍生条件的选择

丹酰氯可以同伯胺或仲胺基上的活泼氢反应,脱掉一分子的 HCl 生成具有荧光和紫外吸收的衍生物,常用于氨基酸以及生物胺类的检测^[15]。在这一反应过程中,衍生试剂的浓度、缓冲溶液、反应温度和时间是关键影响因素。

2.1.1 衍生试剂质量浓度的选择

本研究探讨衍生试剂浓度对衍生效果的影响,分别配制质量浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10mg/mL 丹酰氯丙酮溶液,取一定量的 Hyp 标准溶液,按 1.3.2 节方法衍生,每个质量浓度点做 3 个平行,结果表明随着衍生试剂质量浓度的增加, Hyp 衍生物的生成量增加,当丹酰氯质量浓度达到 3mg/mL 时衍生产物的生成量趋于稳定,继续增加丹酰氯的浓度,衍生产物的生成量不再增加。为了保证衍生反应的顺利进行,既要使衍生试剂足量,又要减少不必要的浪费,本研究选用 4mg/mL 作为丹酰氯的衍生质量浓度。

2.1.2 衍生反应温度和时间的影响

该衍生反应在常温和加热条件下均能发生。本研究探讨温度和反应时间对实验结果的影响,结果见图 1。

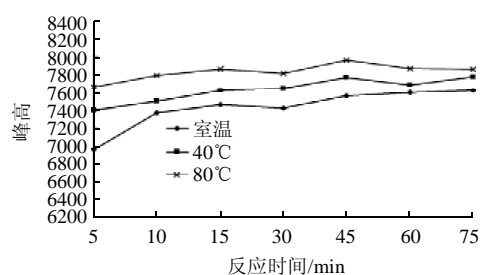


图 1 反应温度和时间对结果的影响

Fig.1 Effect of reaction temperature and time on peak height

由图1可见,随着衍生反应时间的增加,衍生产物的生成量均随之增加,反应时间超过45min时,生成量趋于稳定。随着衍生反应温度的升高,衍生化产物也呈增加的趋势,因此本研究确定衍生反应温度80℃、反应时间45min。

2.1.3 衍生反应体系的pH值

衍生反应要在碱性条件下才能发生。本实验选取饱和碳酸氢钠缓冲溶液体系,可保证衍生反应顺利进行,且饱和碳酸氢钠溶液配制也较简单,便于操作。

2.2 衍生试剂溶液及衍生产物稳定性实验

配制4mg/mL衍生试剂溶液,于4℃避光保存,每天用10μg/mL Hyp标准溶液按1.3.2节方法衍生测定,观察响应值的变化。结果表明,第4天开始响应值降低,因此衍生试剂溶液在4℃避光条件下有效期为3d。

将上述衍生好的Hyp标准溶液于室温下避光保存,每天进样分析,观察响应值的变化。结果表明,Hyp衍生产物在5d内峰形和峰面积无明显变化。

2.3 色谱分离

2.3.1 色谱柱的选择

对MG C₁₈、ODS-3和ODS-DABS三种色谱柱的分离效果进行评估,发现ODS-DABS柱不能把Hyp与杂质完全分离,而MG C₁₈柱和ODS-3柱虽然均可实现基质和分析物的分离,但是ODS-3柱保留时间延长了2min,且峰形较宽,而MG C₁₈柱的峰形尖锐,分离度良好,因此本方法采用MG C₁₈柱作为分析柱。

2.3.2 流动相的选择

水产品水解液中的氨基酸类物质是柱前衍生法测定Hyp的最大干扰,流动相的pH值和离子强度都会影响目标峰与干扰峰的分离,采用不同比例的甲醇-水、乙腈-水难以将其与样品中的杂质分离,因此必须采用缓冲溶液作为流动相。本研究采用流动相A:甲醇;流动相B:四氢呋喃-甲醇-0.05mol/L乙酸钠溶液(1:15:84),进行梯度洗脱,使目标物与基质完全分离。四氢呋喃的加入有效地改善了峰形和分离度。用乙腈代替甲醇并改变其比例进行实验,在1.0mL/min流速下洗脱,Hyp不能与杂质完全分离,且灵敏度不及甲醇,因此本实验采用甲醇做有机相。

在本研究建立的色谱条件下,羟脯氨酸峰形对称、尖锐,没有杂峰干扰。Hyp标准溶液和海参样品色谱图见图2。

2.4 标准曲线

取标准贮备液,用水逐级稀释至0.5、1.0、2.0、5.0、10、20μg/mL,分别取500μL于5mL具塞离心管中,按1.3.2节方法衍生,测定。以Hyp质量浓度为横坐标(x),对应的峰高为纵坐标(y),绘制标准曲线。回归方程: $y = 5.07 \times 10^3 x + 8.43 \times 10^2$, $r > 0.9999$,表明在0.5~20μg/mL范围内线性关系良好。

2.5 检出限、回收率和精密度

以 $R_{SN} = 3$ 计,本方法检出限0.5μg/mL。

向海参样品中添加Hyp 50、100、150mg/g,每组做6个平行样品,进行回收率和精密度实验。结果表明,Hyp的平均回收率为80.2%~103%,RSD为3.2%~5.6%,说明方法精密度良好。结果见表2。

表2 方法的加标回收率和相对标准偏差

Table 2 Spike recovery rates and relative standard deviations for Hyp determination in sea cucumber sample

添加量/(mg/g)	回收率/%						相对标准偏差/%
50	83.3	81.6	80.2	84.5	87.1	86.2	3.2
100	91.7	95.2	94.4	89.3	93.9	102	4.5
150	90.8	87.6	92.3	95.5	94.0	103	5.6

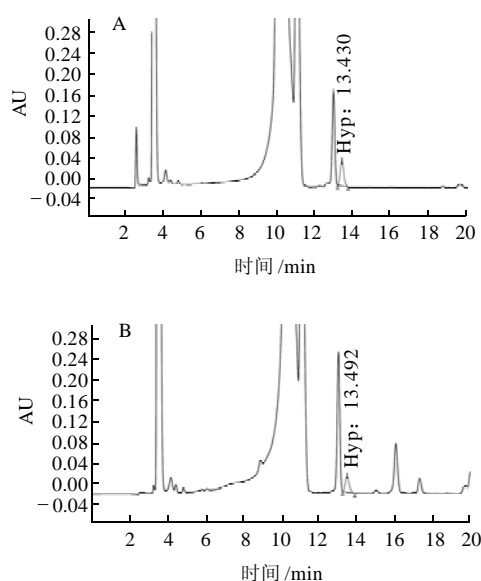


图2 Hyp标准溶液(10μg/mL)(A)和海参样品(B)色谱图

Fig.2 Chromatograms of 10 μg/mL Hyp standard solution and sea cucumber sample

3 结 论

本实验采用酸水解、丹酰氯柱前衍生法,有效将样品中羟脯氨酸解离并衍生为有紫外吸收的羟脯氨酸衍生物。采用高效液相色谱分离,紫外检测器检测,建立了水产品中羟脯氨酸的检测方法。该方法灵敏、准确,精密度高,适用于水产品中羟脯氨酸含量的分析测定。

参考文献:

[1] 沈同,王镜岩,赵邦悌,等.生物化学:上册[M].2版.北京:高等教育出

- 版社, 1991: 154-160.
- [2] 樊绘曾. 海参: 海中人参: 关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001, 20(4): 37-44.
- [3] 刘庆慧, 王彩理, 刘丛力, 等. 鱼鳞胶原蛋白研究[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(3): 57-60.
- [4] 张心如. 胶原蛋白食品倍受青睐[J]. 中国保健营养, 2003(7): 32-34.
- [5] GB/T 9695.23—2008 肉与肉制品: *L*(-)-羟脯氨酸含量测定[S].
- [6] 张俊杰, 段蕊, 曾庆孝. 鲤鱼鳞中羟脯氨酸测定的影响因素[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 191-195.
- [7] 赵天珍, 袁秀金, 谭贵良, 等. 比色法快速测定奶粉盒乳饮料中游离 *L*- 羟脯氨酸[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 111-113.
- [8] 张笑, 刘杰, 陈翠岚. 比色法测定明胶中的 *L*- 羟脯氨酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2010, 27(3): 124-127.
- [9] 郑比杏, 周云. 用氨基酸自动分析仪分析色氨酸方法研究[J]. 广西农业大学学报, 1994, 13(2): 167-172.
- [10] 田静, 吕坚. 高效液相色谱法测定大鼠纤维化肝组织中羟脯氨酸含量[J]. 中国药房, 2003, 14(3): 145-147.
- [11] 崔勇, 刘智, 张博, 等. 反相高效液相色谱柱前衍生法测定保健食品中羟脯氨酸的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(11): 2247-2248.
- [12] 胡华. 羟脯氨酸的测定及其在酱油掺假鉴定和总的应用[D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [13] 邹晓莉, 黎源倩, 曾红艳, 等. 反相高效液相色谱法测定人肌腱中的胶原蛋白[J]. 色谱, 2006, 24(3): 263-266.
- [14] 夏金根, 陈波, 姚守拙. 高效液相色谱-质谱联用测定胶原蛋白中的羟脯氨酸[J]. 色谱, 2008, 26(2): 595-598.
- [15] 董伟峰, 李宪臻, 林维宣. 丹磺酰氯作为生物胺柱前衍生试剂衍生化条件的研究[J]. 大连轻工业学院学报, 2005, 24(2): 115-118.