

赵悦, 李林强, 牛鹏飞. 牛奶中 5-HMF 的 RP-HPLC 测定方法优化[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3): 798-800.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.03.036

牛奶中 5-HMF 的 RP-HPLC 测定方法优化

赵悦, 李林强, 牛鹏飞

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710100)

关键词: 牛奶; 5-羟甲基糠醛(5-HMF); 反相高效液相色谱

中图分类号: TS252 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2020)03-0798-03

Optimization of reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for determination of 5-hydroxymethylfurfural in milk

ZHAO Yue, LI Lin-qiang, NIU Peng-fei

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710100, China)

Key words: milk; 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF); reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

在人类生命的各个阶段,乳制品均是饮食的重要组成部分,对骨骼和牙齿的生长发育具有重要作用。牛奶中的营养成分极为丰富^[1],但在热处理过程中,因热诱导而产生的化学反应可能会影响其品质。美拉德反应就是牛奶加热过程中常见的一种化合反应^[2]。5-羟甲基糠醛(5-HMF)是含有碳水化合物食物在热处理期间发生美拉德反应形成的 Amadori 化合物之一^[3]。影响 5-HMF 在食品中生成的因素有碳水化合物含量、热处理、水分活度、贮藏时间和包装等^[4-5]。目前的研究大多集中于将 5-HMF 作为筛选低乳糖牛奶褐变抑制剂的标示物。Durling 等^[6]指出 HMF 是一种 DNA 损伤剂。5-HMF 还可以代谢成 5-磺基甲基糠醛(5-SMF),这是一种可以与 DNA 结合并引起诱变效应的活性中间体。由此可见,5-HMF 和 5-SMF 都是小鼠肠道的致癌物质^[7]。通常认为,5-HMF 对神经系统有害^[8],它与蛋白质结合,从而导致体内毒物的积累,并具有强大的生殖毒性^[9],同时也会损伤横纹肌和内脏^[10]。许多国家已经开始严格限制蜂蜜、啤酒和葡萄糖注射液中的 5-

HMF 的质量浓度^[11]。检测牛奶中 5-HMF 质量浓度也十分重要。有学者开发了一种比色法,用于测定乳制品中 5-HMF 的质量浓度^[12]。目前常用的 5-HMF 检测方法有分光光度法^[13]、毛细管电泳法^[14]、胶束电动毛细管色谱法^[15]和高效液相色谱(HPLC)法^[16]等,其中最为常用的是高效液相色谱法。虽然中华人民共和国农业农村部对奶制品中 5-HMF 质量浓度的 HPLC 检测法(标准方法)^[17]有所规定,但在试验过程中需添加较多的化学试剂,前处理步骤较为繁琐,而且复杂的基质也会造成目标物与牛奶成分的共洗脱以及保留时间的变化,导致检测结果不稳定,因此有必要从方法学上对其样品前处理方法进行优化。5-HMF 的 HPLC 检测常用的样品前处理方法有草酸法^[18]、三氯乙酸法^[19]、冰乙酸法^[20]和乙腈法^[21]等。本研究拟基于反相高效液相色谱(RP-HPLC)法建立一种可以对牛奶中 5-HMF 进行定量分析的方法,以期对牛奶中 5-HMF 质量浓度的检测提供简便、快速、准确的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用液态牛奶购于当地超市,纯度为 99% 的 5-HMF 标准品购自上海北诺生物科技有限公司,甲醇和乙腈(色谱纯),购自 Fisher 公司,三氯乙酸、乙酸锌、亚铁氰化钾、草酸和冰乙酸均为国产分析纯。

1.2 仪器

本研究所用主要仪器有:U-3000 型高效液相色谱系统(热电公司产品)、Diamonsil™ 型二代 C₁₈ 色谱分析柱(DIK-

收稿日期:2019-10-31

基金项目:陕西省重点研发计划项目(2016NY-212、2017NY-060、2018ZDXM-NY-094)

作者简介:赵悦(1995-),女,山西运城人,硕士研究生,主要从事植物活性物质研究。(Tel) 19829247192; (E-mail) 315329044@qq.com

通讯作者:牛鹏飞, (Tel) 029-85310598; (E-mail) 125328636@qq.com

MA 有限公司产品)、SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂产品)、AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品]、MX-F 型旋涡混匀器(上海圣科仪器设备有限公司产品)、TG16-WS 型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品)。

1.3 方法

1.3.1 RP-HPLC 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil™ 型二代 C₁₈ 色谱分析柱,进样量 10 μ l,流速 1 ml/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,洗脱时间 30 min,检测波长 280 nm。流动相 A 为 5% 甲醇+95% 超纯水,流动相 B 为 100% 甲醇。洗脱梯度:流动相 A:流动相 B=96:4(体积比)。

1.3.2 标准曲线

1.3.2.1 标准储备溶液的制备 准确称取 10 mg 5-HMF 标准品,加入甲醇溶解后,转移至 100 ml 容量瓶中,用甲醇定容,混合均匀后配制成 100 mg/L 的 5-HMF 标准储备溶液,并将其存储在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3.2.2 标准曲线的建立 取 5-HMF 标准储备溶液,将其配制成质量浓度分别为 0 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L 和 100 mg/L 的 5-HMF 标准溶液,采用外标法,按 1.3.1 中的色谱条件进样分析。以峰面积为 Y 轴,以 5-HMF 的质量浓度为 X 轴绘制标准曲线。

1.3.3 精密度测试 对质量浓度为 20 mg/L 的 5-HMF 标准溶液分 2 批次进样,每批 3 针,共计 6 针。第一批进样结束后,标准溶液在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置过夜后再进行第 2 批进样。统计 6 针进样的保留时间、峰高和峰面积,分别计算其相对标准偏差(RSD)。

1.3.4 牛奶前处理 准确量取 197 ml 牛奶置于烧杯中,加入 3 ml 100 mg/L 5-HMF 标准溶液,配制成 5-HMF 质量浓度为 1.5 μ g/ml 的牛奶。用三氯乙酸法、冰乙酸法、乙腈法和标准方法进行牛奶前处理,每种方法重复 3 次。

1.3.4.1 三氯乙酸法 取 10 ml 牛奶样品置于 25 ml 试管中,加入 1 ml 50% 三氯乙酸溶液,旋涡 1 min 混匀,静置 10 min,转移至离心管,6 000 r/min 离心 10 min。取上清液,用 0.45 μ m 滤膜过滤,按方法 1.3.1 中的色谱条件进样分析。

1.3.4.2 冰乙酸法 取 10 ml 牛奶样品置于 25 ml 试管中,加入 1 ml 冰乙酸后,旋涡 1 min 混匀,静置 10 min,转移至离心管,6 000 r/min 离心 10 min。取上清液,用 0.45 μ m 滤膜过滤,按方法 1.3.1 中的色谱条件进样分析。

1.3.4.3 乙腈法 取 10 ml 牛奶样品置于烧杯中,加入 20 ml 乙腈,剧烈振荡 20 min,取上清液,用 0.45 μ m 滤膜过滤,按方法 1.3.1 中的色谱条件进样分析。

1.3.4.4 标准方法 取 10 ml 牛奶样品置于 25 ml 试管中,加入 5 ml 0.15 mol/L 草酸,旋涡混匀,转移至 50 ml 容量瓶中,用约 10 ml 甲醇分次淋洗试管,使样品完全转移。然后加入 3 ml 92 g/L 亚铁氰化钾溶液、3 ml 183 g/L 乙酸锌溶液,剧烈振荡后静置 15 min,加甲醇定容至 50 ml,旋涡 1 min 混匀,静置 10 min,转移至离心管,6 000 r/min 离心 10 min。取上清液,用

0.45 μ m 滤膜过滤,按方法 1.3.1 中的色谱条件进样分析。

1.3.5 加标回收率 准确量取 10 ml 牛奶置于 25 ml 试管中,分别添加 0.10 mg、0.20 mg 和 0.40 mg 5-HMF(每个水平重复 6 次),按方法 1.3.4.1 中的方法处理样品,按方法 1.3.1 中的色谱条件进样分析,以衡量不同水平下目标组分的加标回收率。

1.3.6 灵敏度 以 3 倍信噪比测试 5-HMF 的检出限(LOD),以 10 倍信噪比测试 5-HMF 的定量限(LOQ)。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

对标准样品进行 RP-HPLC 测定,结果表明,5-HMF 标准溶液在 280 nm 处有响应,分离效果明显。以峰面积为 Y 轴,5-HMF 的质量浓度为 X 轴,绘制标准曲线。5-HMF 质量浓度为 0~100 mg/L 时,线性关系良好($R^2 = 0.998$)。回归方程: $Y = 1.312x + 0.083$ 。可以看出,5-HMF 质量浓度与峰面积呈现良好的线性关系。因此,采用峰面积定量法对 5-HMF 进行定量分析是可行的。

2.2 精密度

按照方法 1.3.1 中的方法对质量浓度为 20 mg/L 的 5-HMF 标准溶液连续进样 6 次,记录保留时间、峰高和峰面积数据。对数据进行分析可知,保留时间、峰高和峰面积的 RSD 均小于 2%。因此,RP-HPLC 法对 5-HMF 的检测结果符合要求,U-3000 型高效液相色谱系统的精密度良好,适用于定量分析。

2.3 牛奶前处理方法的优化

采用 4 种不同的样品前处理方法对牛奶进行前处理,其中三氯乙酸法、冰乙酸法和标准方法均是通过加酸改变蛋白质构象,使蛋白质变性沉淀,再离心除去沉淀,取上清液用于 5-HMF 质量浓度的检测。乙腈法是通过有机溶剂破坏蛋白质自身的氢键从而使蛋白质变性沉淀,再对 5-HMF 的质量浓度进行检测。

除乙腈法外,其他 3 种方法分离出的目标峰均能与干扰峰达到基线分离。三氯乙酸法处理后,样品的色谱峰较理想。牛奶通过不同前处理后检测到的 5-HMF 质量浓度由高到低为:三氯乙酸法>乙腈法>冰乙酸法>标准方法,其中标准方法的 RSD 为 5%,其他 3 种方法的 RSD 均小于 4%。三氯乙酸法处理的样品中检测到的 5-HMF 质量浓度最高,标准方法处理的样品中检测到的 5-HMF 质量浓度最低,分别为 1.36 μ g/ml 和 0.57 μ g/ml。三氯乙酸法、冰乙酸法、乙腈法、标准方法处理 1 个样品所需的时间分别为 25 min、25 min、30 min 和 45 min,三氯乙酸法和冰乙酸法用时最短,标准方法用时最长。在试剂用量上,三氯乙酸法和冰乙酸法的试剂用量最少,只需 1 ml,标准方法试剂用量最大,需要 40 ml。总之,三氯乙酸法相较于标准方法更加快速、准确,并且试剂用量少,因此采用三氯乙酸法对样品进行前处理。

2.4 加标回收率

按方法 1.3.5 中的方法进行加标回收率测试。在 10 ml 牛奶中添加 5-HMF 后,样品中的目标峰明显增大。随着 5-

HMF添加量的增加,其加标回收率增加,添加 0.10 mg、0.20 mg 和 0.40 mg 5-HMF 的加标回收率分别为 85.65%、93.34% 和 100.95%,其 RSD 分别为 1.62%、1.31% 和 0.66%。说明,RP-HPLC 法的准确性好,稳定性高,可行性强,适用于牛奶中 5-HMF 的定量分析。

2.5 灵敏度

按方法 1.3.6 中的方法进行灵敏度检测,结果表明,RP-HPLC 法测定牛奶中 5-HMF 的 LOD 为 0.037 5 mg/L, LOQ 为 0.069 5 mg/L。

3 结论

牛奶在加工处理过程中容易发生美拉德反应从而产生 5-HMF, 5-HMF 具有一定毒性,因此建立一种可以快速、准确检测牛奶中 5-HMF 的方法至关重要。本试验采用 RP-HPLC 法对牛奶中 5-HMF 的质量浓度进行测定,并在前人研究的基础上对牛奶前处理的方法进行了优化。其中,三氯乙酸法处理后样品的目标峰出峰明显,峰型理想,检测到的 5-HMF 质量浓度最高,并且样品前处理时间最短,试剂用量最少。采用三氯乙酸法对样品进行前处理,然后用 RP-HPLC 法定量检测牛奶中 5-HMF 的质量浓度,不仅避免了其他方法因试验步骤复杂导致的结果不稳定等问题,还有效缩短了样品处理时间,减少了试剂用量,对奶源的质量控制起到很好的监控作用。

参考文献:

- [1] MIGURR. Milk products: contribution to nutrition and health[J]. International Journal of Dairy Technology, 1992, 45(3): 61-67.
- [2] HILLER B, LORENZEN P C. Functional properties of milk proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation[J]. Food Research International, 2010, 43(4): 1155-1166.
- [3] BURDURLU H S, KARADENIZ F. Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates[J]. Food Chemistry, 2003, 80(1): 91-97.
- [4] KOWALSKI S, LUKASIEWICZ M, DUDA-CHODAK A, et al. 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF)-heat-induced formation, occurrence in food and biotransformation-a review[J]. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2013, 63(4): 207-225.
- [5] BILUCA F C, DELLA BETTA F, DE OLIVEIRA G P, et al. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment[J]. Food Chemistry, 2014, 159: 244-249.
- [6] DURLING L J K, BUSK L, HELLMAN B E. Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(4): 880-884.
- [7] SVENDSEN C, HUSØY T, GLATT H, et al. 5-Hydroxymethylfurfural and 5-sulfooxymethylfurfural increase adenoma and flat ACF number in the intestine of Min/+ mice[J]. Anticancer Research, 2009, 29(6): 1921-1926.
- [8] CHI W, ZHANG C B, CAO Y H, et al. Investigation of the restriction on the formation of 5-HMF[J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 1998, 14(2): 101-104.
- [9] LI Y H, LYU X Y. Investigation on the origin of 5-HMF in Sheng-maiyin decoction by RP-HPLC method[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2005, 6(10): 1015-1021.
- [10] PAMPLONA R, BELLMUNT M J, PORTERO M, et al. Chromatographic evidence for Amadori product formation in rat liver aminophospholipids[J]. Life Sciences, 1995, 57(9): 873-879.
- [11] LI W, ZHANG X, LU Y, et al. Browning-inhibition technology for low-lactose milk[J]. China Dairy Industry, 2004, 32(6): 20-26.
- [12] KEENEY M, BASSETTE R. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reaction in milk products[J]. Journal of Dairy Science, 1959, 42(6): 945-960.
- [13] GÜRKAN R, ALTUNAY N. Quantification of 5-hydroxymethylfurfural in honey samples and acidic beverages using spectrophotometry coupled with ultrasonic-assisted cloud point extraction [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2015, 42: 141-151.
- [14] CHEN Z, YAN X. Simultaneous determination of melamine and 5-hydroxymethylfurfural in milk by capillary electrophoresis with diode array detection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(19): 8742-8747.
- [15] MORALES F J, JIMÉNEZ-PÉREZ S. Hydroxymethylfurfural determination in infant milk-based formulas by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Food Chemistry, 2001, 72(4): 525-531.
- [16] WOOLLARD D C, INDYK H E, CHRISTIANSEN S K. The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC[J]. Food Chemistry, 2000, 69(2): 201-208.
- [17] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业行业标准——乳与乳制品中 5-羟甲基糠醛含量的测定高效液相色谱法: NY/T 1332-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 4.
- [18] JIMENEZ-PEREZ S, CORZO N, MORALES F J, et al. Effect of storage temperature on lactulose and 5-hydroxymethyl-furfural formation in UHT milk [J]. Journal of Food Protection, 1992, 55(4): 304-306.
- [19] NEELIMA, RAO P S, SHARMA R, et al. Direct estimation of silicic acid in milk and milk products by fluorimetry and its application in detection of sweet whey adulteration in milk[J]. Journal of Dairy Research, 2012, 79(4): 495-501.
- [20] ZULUETA A, MAURIZI A, FRIGOLA A, et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(6/7): 380-385.
- [21] LI Z, XU L, PENG C, et al. Simultaneous determination of nine types of phthalate residues in commercial milk products using HPLC-ESI-MS-MS [J]. Journal of Chromatographic Science, 2011, 49(4): 337-343.

(责任编辑:王 妮)