

# 糠氨酸标准溶液的储存稳定性以及盐酸浓度对牛奶中糠氨酸检测结果的影响

陈美霞<sup>1,2,3,4</sup> 陈冲冲<sup>1,2,3,4</sup> 文芳<sup>1,2,3,4</sup> 张养东<sup>1,2,3,4</sup> 郑楠<sup>1,2,3,4</sup> 王加启<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,农业农村部奶及奶制品质量安全控制重点实验室,北京 100193;

2.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室(北京),北京 100193;

3.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京),北京

100193;4.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,动物营养学国家重点实验室,北京 100193)

**摘要:** 本试验旨在研究糠氨酸标准溶液的储存稳定性以及牛奶前处理过程中盐酸浓度对糠氨酸检测结果的影响。试验1:分别用3.0、1.0和0.1 mol/L盐酸配制不同浓度糠氨酸标准溶液(1和5 mg/L),并分别放置于-20、4℃和室温(25℃)下,于第1、3、5、8、10、12、14、15、17和21天采用超高效液相色谱法测定糠氨酸含量(每个处理设3个平行),分析糠氨酸标准溶液在不同储存条件下的稳定性。试验2:设置11种不同浓度的盐酸,水解牛奶后测定糠氨酸含量,每个浓度设4个平行,试验独立重复3次,分析盐酸浓度对牛奶中糠氨酸检测结果的影响以及结果的重复性。结果表明:1)0.1和1.0 mol/L盐酸配制的糠氨酸标准溶液不稳定,3.0 mol/L盐酸配制的糠氨酸标准溶液稳定性较好,可于-20、4℃和室温条件下保存21 d。2)盐酸浓度显著影响牛奶水解效果( $P<0.05$ ),当水解液中盐酸浓度达到9.17 mol/L时糠氨酸可以完全游离出来,检测结果重复性比较好。因此,建议用3.0 mol/L盐酸配制糠氨酸标准溶液,于4℃保存,21 d内使用;水解牛奶所用盐酸浓度应使牛奶水解液中盐酸浓度至少达到9.17 mol/L。

**关键词:** 牛奶;糠氨酸;稳定性;盐酸;水解效果;重复性

中图分类号:TS252.4

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)01-0341-09

糠氨酸,即 $\epsilon$ -N-2-咪喃甲基-L-赖氨酸,又名咪喃素,是美拉德反应的系列产物之一。糠氨酸的含量可以直接反映牛奶在加工过程中所经历的热处理强度,一般而言,牛奶所经历的热处理强度越强(加热时间越长或加热温度越高),糠氨酸含量越高;此外,储存过程中糠氨酸含量也规律性增加<sup>[1]</sup>。因此,国内外常用糠氨酸含量的变化来评价牛奶加工方式或储存方式对奶制品质量的影响<sup>[2-3]</sup>。我国已经将糠氨酸和乳果糖含量联合用于巴氏杀菌乳和超高温(UHT)灭菌乳中复原乳的鉴定<sup>[4]</sup>。一系列研究发现,糠氨酸可以抑制

HepG2和Hek293细胞体外生长活力<sup>[5-6]</sup>,小鼠体内试验证明糠氨酸具有肝脏毒性和肾脏毒性<sup>[7]</sup>,并可以影响睾丸指数、血清激素表达水平和精子质量,并对睾丸组织造成病理损害<sup>[8]</sup>。因此,准确地、定量地检测乳制品中糠氨酸含量对于科学研究和乳制品质量监管具有重要意义。

目前,糠氨酸含量的检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)法<sup>[9-10]</sup>、超高效液相色谱(UPLC)法<sup>[11]</sup>、超高效液相色谱-质谱串联(UPLC-MS/MS)法<sup>[12]</sup>、毛细管电泳-质谱串联(CE-MS/MS)法<sup>[13]</sup>、稳定同位素稀释-质谱联用法<sup>[14]</sup>和表面荧

收稿日期:2020-05-20

基金项目:中国农业科学院农业科技创新工程重大产出科研选题(CAAS-ZDXT2019004);中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS12);现代农业产业技术体系专项资金(CARS-36)

作者简介:陈美霞(1991—),女,山东潍坊人,博士研究生,动物营养与饲料科学专业。E-mail: meixialonian@163.com

\*通信作者:王加启,研究员,博士生导师,E-mail: jiaqi wang@vip.163.com

光光谱法<sup>[15]</sup>等。表面荧光光谱法因其灵敏度较低,一般用于半定量分析,因此应用范围有限。CE-MS/MS法虽然分离度较高,但前处理复杂,不适用于大批量样品检测。UPLC-MS/MS法因仪器昂贵、维护成本高,需要专门人员进行操作,也限制了其在实际中的应用。目前,对于液态奶中糠氨酸含量的检测,国际上主要参照ISO18329中的HPLC法<sup>[10]</sup>,国内主要参照农业行业标准NY/T 939—2016中的HPLC法或UPLC法<sup>[4]</sup>。尽管国内外对糠氨酸含量的检测做了大量的研究,但对该物质标准品稳定性的研究未见报道。了解标准品物质的稳定性,有助于使定量分析过程准确可靠,对样品检测具有十分重要的意义。陈永艳等<sup>[16]</sup>对抗生素类标准品稳定性进行了分析,结果显示不同溶剂和温度条件对抗生素稳定性的影响程度不同。周鑫等<sup>[17]</sup>研究了以甲醇为溶剂介质的氯氰菊酯和氟胺氰菊酯标准溶液的稳定性,结果发现长时间跨度和复杂的温度条件会增加氯氰菊酯和氟胺氰菊酯标准溶液不稳定的风险。因此,研究糠氨酸标准溶液稳定性对于乳及乳制品中糠氨酸定量检测的准确性以及乳制品质量控制具有重要意义。此外,在参照NY/T 939—2016中规定的HPLC法或UPLC法<sup>[4]</sup>对牛奶中糠氨酸含量进行检测时发现,使用不同批次或不同品牌盐酸水解相同牛奶时结果有时存在差异。Guerra-Hernandez等<sup>[18]</sup>在检测婴儿米粉中糠氨酸含量时发现,在一定范围内增加水解米粉时所用盐酸浓度会提高糠氨酸含量的检测值。而在参照NY/T 939—2016中规定的HPLC法或UPLC法<sup>[4]</sup>对牛奶中糠氨酸含量进行检测时,我们发现使用不同批次或不同品牌盐酸水解相同牛奶时结果有时存在差异,因此,推测不同浓度盐酸水解牛奶影响牛奶中糠氨酸的检测结果。因此,本试验研究了不同方式配制的糠氨酸标准溶液在不同储存环境中的稳定性,以期糠氨酸标准溶液保存和检测结果的可靠性提供一定的依据;同时,本试验还研究了使用不同浓度盐酸水解牛奶对糠氨酸检测结果的影响,以期为更准确地定量检测乳及乳制品中糠氨酸含量提供科学数据支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 糠氨酸标准溶液的配制

糠氨酸标准贮备溶液(500 mg/L)配制:将糠

氨酸标准品按标准品证书提供的肽纯度系数换算后,用3 mol/L盐酸配制成标准贮备溶液,-20℃下可贮存24个月。

糠氨酸标准中间溶液:移取2 mL糠氨酸标准贮备溶液于10 mL容量瓶中,用3 mol/L盐酸定容,此标准中间溶液浓度为100 mg/L。

糠氨酸标准工作溶液:移取100 μL糠氨酸标准贮备溶液于25 mL容量瓶中,用3 mol/L盐酸液定容,此标准工作溶液浓度为2.0 mg/L。依上述方法分别配制0.05、0.10、0.50、1.00、2.00和5.00 mg/L的糠氨酸标准工作溶液。

### 1.2 糠氨酸标准溶液储存稳定性研究

为了研究糠氨酸标准溶液在不同温度和不同盐酸浓度条件下的稳定性,本试验分别用3个浓度的盐酸(3.0、1.0和0.1 mol/L)配制不同浓度的糠氨酸标准溶液(1和5 mg/L),并保存于不同温度[-20、4℃和室温(25℃)]条件下,分别于第1、3、5、8、10、12、14、15、17和21天对保存的糠氨酸标准溶液进行糠氨酸含量检测。每个处理设3个平行。

### 1.3 不同浓度盐酸水解牛奶对糠氨酸检测结果的影响

试验设置11种不同浓度的盐酸水解牛奶,每个浓度设4个平行,分析盐酸浓度对牛奶中糠氨酸检测结果的影响。盐酸浓度用氢氧化钠标准滴定溶液进行标定,试样溶液以溴甲酚绿为指示液,用氢氧化钠标准滴定溶液滴定至溶液由黄色变为蓝色为终点<sup>[19]</sup>。选择连续的3 d重复同样试验,研究结果的可重复性。取1 mL牛奶和11 mL不同浓度的盐酸(12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2和1 mol/L)于可以密闭的水解管中,密封水解管后放于110℃的恒温干燥箱中,加热水解24 h(加热约1 h后轻轻摇动水解管);加热结束后,取出水解管,冷却后用滤纸过滤,滤液备用。

### 1.4 水解液中蛋白质含量的测定

移取2 mL水解液,参考GB 5009.5—2016<sup>[20]</sup>中规定的方法用凯氏定氮仪(Foss,丹麦)对水解液中蛋白质含量进行检测。

### 1.5 糠氨酸含量的测定

稳定性试验中的糠氨酸标准溶液可以直接上机检测。测定水解液中的糠氨酸含量时,检测前需先取1 mL水解液与5 mL 6 g/L乙酸铵溶液混合,过0.22 μm滤膜(Waters公司)后再上机测定。

水解液中糠氨酸含量参考 NY/T 939—2016<sup>[4]</sup>中规定的方法利用 Waters ACQUITY UPLC H-CLASS UPLC 仪(配有紫外检测器及 Empower 数据处理系统)进行定量检测,方法如下:使用 0.1% 三氟乙酸水溶液(含 6 g/L 乙酸铵,流动相 A)、甲醇(流动相 B)和水(流动相 C)为流动相,色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,粒径 1.8 μm),采用流动相 A 等度洗脱模式,洗脱速度为 0.4 mL/min,柱温为 35 °C,进样量为 0.5 μL。定量检测前需先用流动相 B 和 C 冲洗色谱柱,再用流动相 A 和 C 流动相平衡色谱柱,最后用 3 mol/L 盐酸检测溶剂纯度、仪器和色谱柱的状态。上述所用试剂均为色谱纯,乙酸铵购于 CNW 公司,三氟乙酸购于百灵威科技有限公司,甲醇和乙腈购于 Thermo Fisher 公司。

## 1.6 数据统计分析

试验数据用平均值±标准误表示,采用 SAS 9.1.3 统计软件中的单因子方差分析(one-way ANOVA)过程进行单因子方差分析,并采用 LSD 法进行多重比较, $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 糠氨酸标准溶液的储存稳定性

#### 2.1.1 盐酸浓度对糠氨酸标准溶液储存稳定性的影响

本试验采用 3 种不同浓度的盐酸配制糠氨酸标准溶液,由图 1 和图 2 可以看出,在相同储存条件下,用低浓度盐酸(0.1 mol/L)配制的糠氨酸溶液稳定性较差,随着储存时间的延长,糠氨酸发生明显的降解。根据糠氨酸的峰面积计算降解率,0.1 mol/L 盐酸配制的 1 mg/L 糠氨酸标准溶液在 25 °C 储存 8 d 时降解率达到 23.55%,储存 21 d 时降解率达到 84.27%,4 °C 储存 12 d 时降解率达到 21.75%,储存 21 d 时降解率达到 42.01%,−20 °C 储存 8 d 时降解率达 22.75%,储存 21 d 时降解率达 59.12%,不能够满足试验要求;0.1 mol/L 盐酸配制的 5 mg/L 糠氨酸标准溶液 25 °C 储存 14 d 时降解率达到 10.15%,储存 21 d 时降解率达到 14.18%,4 °C 储存 17 d 时降解率达到 10.89%,储存 21 d 时降解率达到 12.19%,−20 °C 储存 8 d 时

降解率达 13.10%,储存 21 d 时降解率达 49.39%,不能够满足试验要求;中浓度盐酸(1.0 mol/L)配制的 2 种浓度的糠氨酸标准溶液(1 和 5 mg/L)稳定性总体比较好,但 5 mg/L 糠氨酸标准溶液在 −20 °C 储存条件下峰面积波动比较大(18.10%~32.24%)。高浓度盐酸(3.0 mol/L)配制的糠氨酸标准溶液稳定性最好,在 −20、4 和 25 °C 储存 21 d 后仍保持稳定,满足试验要求。考虑到糠氨酸标准溶液在 3.0 mol/L 盐酸中稳定性最好,因此,建议用 3.0 mol/L 盐酸溶解糠氨酸并进行储存。

#### 2.1.2 储存温度对糠氨酸标准溶液储存稳定性的影响

由图 1 和图 2 可以看出,当糠氨酸溶解于高浓度盐酸(3 mol/L)时,糠氨酸标准溶液稳定性比较好,但温度并不影响糠氨酸标准溶液的稳定性。但是考虑到大批量检测过程中,UPLC 样品室的温度一般设定为 4 °C,同时为了尽可能减少冻融对糠氨酸的影响,因此,配制好的糠氨酸标准溶液不建议保存于室温和 −20 °C,建议于 4 °C 保存,于 21 d 内使用。

### 2.2 盐酸浓度对牛奶中糠氨酸检测结果的影响

由图 3 和表 1 可以看出,一定范围内,随着水解牛奶所用盐酸浓度的升高,糠氨酸的游离程度升高,检测到的糠氨酸含量增加。统计分析后发现,当使用的盐酸浓度达到 10 mol/L 时,检测到的糠氨酸峰面积趋于平稳,不再发生显著变化( $P > 0.05$ )。

为了进一步探究上述结果的可重复性,选择连续的 3 d 重复同样试验。由图 4 和表 2 可以看出,当水解牛奶所用的盐酸浓度达到 10 mol/L 时,牛奶中的糠氨酸可以完全水解游离出来,检测到的糠氨酸含量不再发生显著变化( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

糠氨酸是牛奶在加热过程中发生“美拉德反应”后的特征性产物之一,其含量可以反映牛奶的质量和营养价值<sup>[21]</sup>。近些年的一系列研究发现,糠氨酸具有细胞毒性,并对小鼠肝脏、肾脏和睾丸的正常功能产生负面影响<sup>[5,7,22]</sup>。因此,准确测定牛奶中糠氨酸含量对于牛奶加工过程质量控制和科学研究具有重要意义。

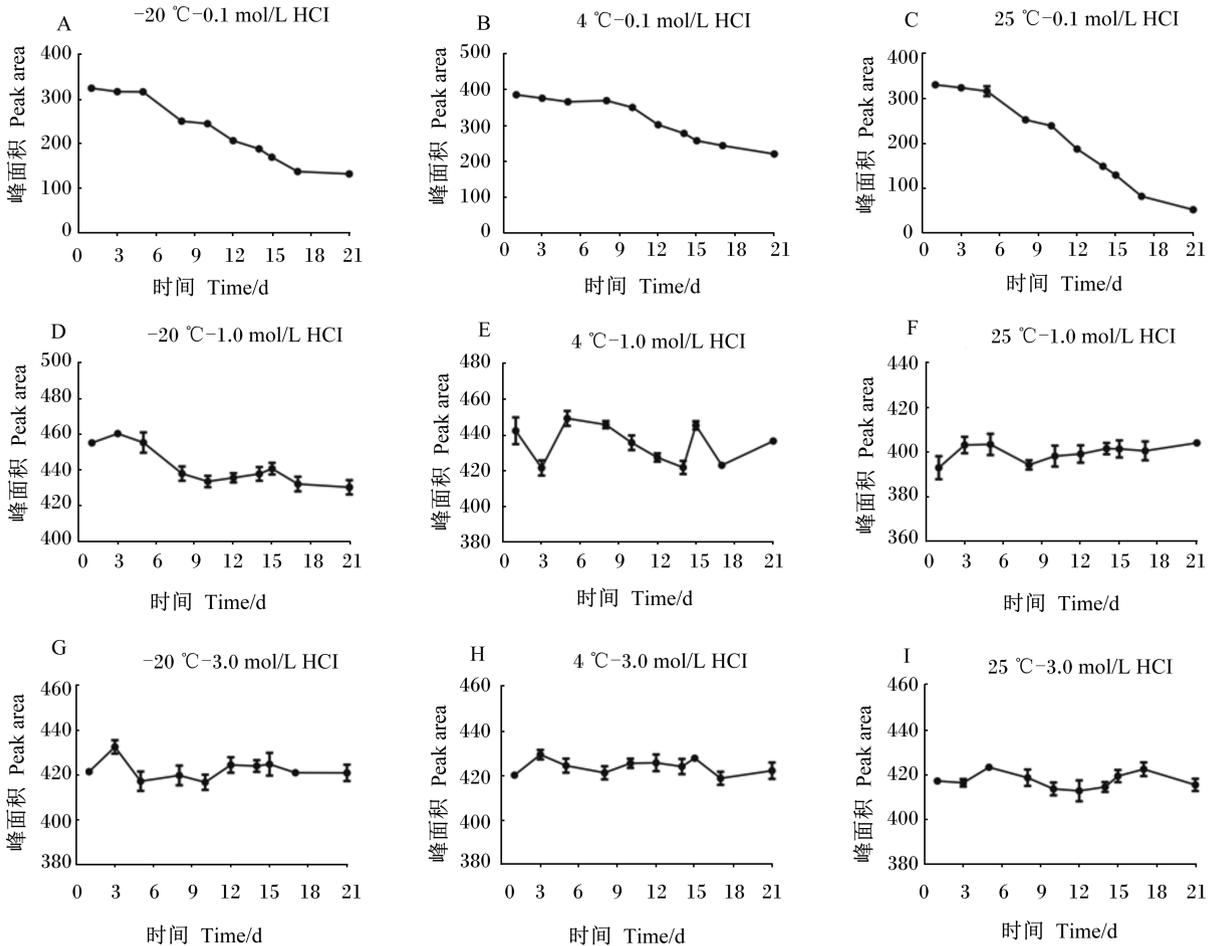


图1 不同浓度盐酸配制的1 mg/L 糠氨酸标准溶液在不同温度下的储存稳定性  
Fig.1 Storage stability of 1 mg/L furosine standard solution dissolved in different concentrations of HCl at different temperatures

目前基于糠氨酸检测的研究比较多<sup>[9,12,21,23-27]</sup>,但是尚未有研究分析糠氨酸标准溶液的稳定性。本研究考察了糠氨酸标准溶液在不同储存条件下的稳定性。试验发现,糠氨酸受所处溶液环境影响比较大,在相同的储存条件下,糠氨酸溶解在低浓度盐酸(0.1 mol/L)中稳定性较差,在中浓度盐酸(1.0 mol/L)中稳定性较好,在高浓度盐酸(3.0 mol/L)溶液中稳定性最好,这可能是因为糠氨酸本身为酸性分子,较高的酸性环境有利于其结构的稳定。与单纯的糠氨酸溶液不同,牛奶中糠氨酸则会在储存过程中会发生规律性变化,一般而言,储存时间越长,储存时温度越高,糠氨酸含量会越高,室温条件下,每10 d每100 g牛奶蛋白质中糠氨酸含量约增长7 mg,这主要是因为室温条件下牛奶中仍然可以发生缓慢的

“美拉德反应”产生新的糠氨酸<sup>[1]</sup>。而在相同的盐酸浓度(3.0 mol/L)条件下,糠氨酸对温度不敏感,在-20、4 °C和室温(25 °C)条件下储存21 d没有明显降解,满足试验需求。但是考虑到在实际样品检测过程中,UPLC样品室温度一般设定为4 °C,因此建议保存于4 °C。

此外,本试验还研究了使用不同浓度盐酸水解牛奶对糠氨酸检测结果的影响,结果发现随着水解牛奶所用盐酸浓度的升高,检测到的糠氨酸含量增加,一方面可能是因为低浓度的盐酸不能完全水解牛奶使糠氨酸完全游离出来,随着水解牛奶所用盐酸浓度的升高,糠氨酸游离程度升高;另一方面也可能是因为低浓度的盐酸并不能完全阻止新的“美拉德反应”产生新的糠氨酸。前人研究发现,当牛奶中盐酸浓度达到6 mol/L时,可以

完全阻断“美拉德反应”的进行<sup>[28-29]</sup>。本试验发现,当水解液中盐酸浓度达到 9.17 mol/L 时,再提高盐酸浓度检测到的糠氨酸含量不再发生显著变化,可能是因为这时牛奶中已经不再发生新的“美拉德反应”,同时糠氨酸已经在盐酸的作用

下完全游离出来。因此,建议水解 1 mL 牛奶所用的盐酸浓度至少为 10 mol/L,考虑到牛奶稀释倍数,即牛奶水解液中盐酸浓度应至少达到 9.17 mol/L。

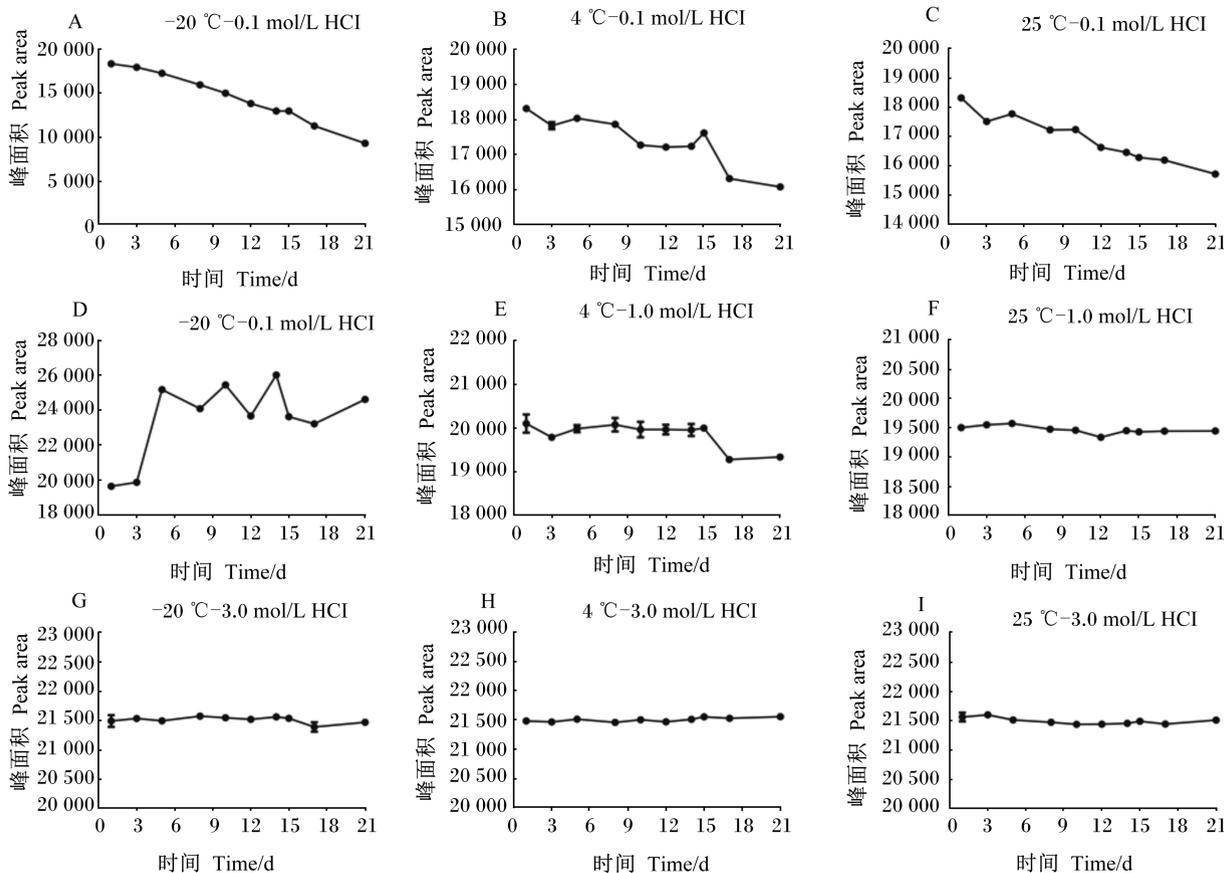


图 2 不同浓度盐酸配制的 5 mg/L 糠氨酸标准溶液在不同温度下的储存稳定性

Fig. 2 Storage stability of 5 mg/L furosine standard solution dissolved in different concentrations of HCl at different temperatures

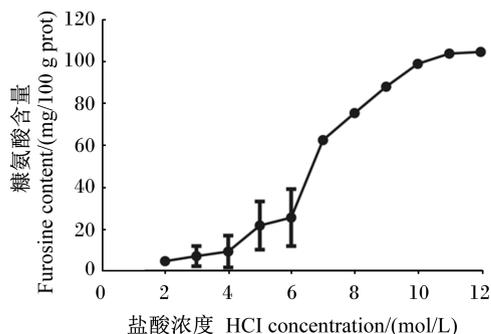


图 3 不同浓度盐酸水解牛奶对糠氨酸检测结果的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of HCl used for milk hydrolysis procedure on furosine detection result

本试验通过对糠氨酸标准溶液储存稳定性进行研究,确定了糠氨酸标准溶液的储存条件,可为实验室中糠氨酸标准溶液的配制和保存提供参考依据;同时,本试验通过对牛奶水解所用盐酸浓度进行研究,确定了牛奶水解液中的盐酸浓度,可为更加准确地定量检测牛奶中糠氨酸含量提供数据支持。

## 4 结论

① 糠氨酸标准溶液的储存稳定性受到盐酸浓度的影响,3.0 mol/L 盐酸配制的糠氨酸标准溶液稳定性最佳。

② 糠氨酸标准溶液的储存稳定性受储存温度的影响较小,建议将配制好的糠氨酸标准溶液保存于 4 ℃,于 21 d 内使用。

③ 盐酸浓度影响牛奶的水解效果,水解牛奶所用的盐酸浓度应使水解液中盐酸浓度至少达到 9.17 mol/L。

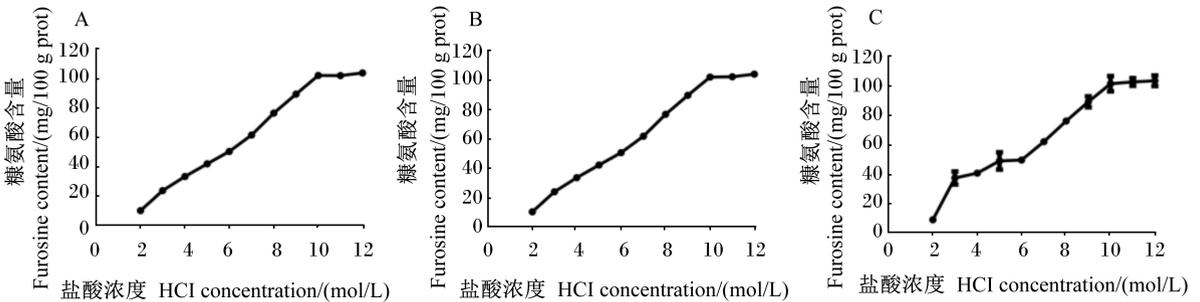
表 1 不同浓度盐酸水解牛奶对糠氨酸检测结果的影响

Table 1 Effects of different concentrations of HCl used for milk hydrolysis procedure on furosine detection result

水解牛奶所用盐酸浓度 HCl concentration used for milk hydrolysis procedure/(mol/L)	水解液中盐酸浓度 HCl concentration in hydrolysate/(mol/L)	糠氨酸含量 Furosine content/(mg/100 g prot)
2	1.83	4.72±0.36 <sup>c</sup>
3	2.75	7.17±4.85 <sup>c</sup>
4	3.67	9.38±7.65 <sup>de</sup>
5	4.58	21.75±11.47 <sup>de</sup>
6	5.50	25.57±13.58 <sup>d</sup>
7	6.42	62.58±1.08 <sup>c</sup>
8	7.33	75.43±0.52 <sup>bc</sup>
9	8.25	88.06±0.21 <sup>b</sup>
10	9.17	98.95±1.07 <sup>a</sup>
11	10.08	103.88±1.97 <sup>a</sup>
12	11.00	104.65±0.49 <sup>a</sup>

同列数据肩标无字母或相同小写字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。下表同。

In the same column, values with no letter or the same small letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ), while with different small letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below.



A、B 和 C 表示在不同的 3 d 进行的 3 次独立试验。每次试验  $n=4$ 。

A, B and C represent 3 independent trials performed in 3 separate days. In each trial,  $n=4$ .

图 4 不同浓度盐酸水解牛奶对糠氨酸检测结果影响的重复性研究

Fig.4 Repetitive study on effects of different concentrations of HCl used for milk hydrolysis procedure on furosine detection result

表 2 不同浓度盐酸水解牛奶对糠氨酸检测结果影响的可重复性研究

Table 2 Repetitive study on effects of different concentrations of HCl used for milk hydrolysis procedure on furosine detection result

水解牛奶所用盐酸浓度 HCl concentration used for milk hydrolysis procedure/(mol/L)	水解液中盐酸浓度 HCl concentration in hydrolysate/(mol/L)	糠氨酸含量 Furosine content/(mg/100 g prot) ( $n=4$ )		
		1	2	3
2	1.83	10.38±0.74 <sup>i</sup>	8.99±0.19 <sup>i</sup>	7.71±0.14 <sup>i</sup>
3	2.75	23.96±0.30 <sup>h</sup>	37.35±2.18 <sup>h</sup>	21.24±0.15 <sup>h</sup>

续表 2

水解牛奶所用盐酸浓度 HCl concentration used for milk hydrolysis procedure/(mol/L)	水解液中盐酸浓度 HCl concentration in hydrolysate/(mol/L)	糠氨酸含量 Furosine content/(mg/100 g prot) (n=4)		
		1	2	3
		4	3.67	33.55±0.11 <sup>e</sup>
5	4.58	42.16±0.53 <sup>f</sup>	48.95±3.60 <sup>f</sup>	42.25±0.57 <sup>f</sup>
6	5.50	50.52±0.54 <sup>e</sup>	49.55±0.94 <sup>c</sup>	49.07±0.16 <sup>c</sup>
7	6.42	61.78±0.63 <sup>d</sup>	62.05±1.05 <sup>d</sup>	62.58±1.08 <sup>d</sup>
8	7.33	76.68±0.26 <sup>c</sup>	76.05±0.46 <sup>c</sup>	75.43±0.52 <sup>c</sup>
9	8.25	89.56±0.65 <sup>b</sup>	89.18±1.88 <sup>b</sup>	88.06±0.21 <sup>b</sup>
10	9.17	101.98±0.34 <sup>a</sup>	101.50±2.64 <sup>a</sup>	102.23±0.32 <sup>a</sup>
11	10.08	102.13±0.57 <sup>a</sup>	102.62±1.33 <sup>a</sup>	103.88±1.97 <sup>a</sup>
12	11.00	109.96±2.70 <sup>a</sup>	103.49±1.80 <sup>a</sup>	104.70±0.40 <sup>a</sup>

## 参考文献:

- [ 1 ] 陈冲冲,文芳,陈美霞,等.影响牛奶中糠氨酸质量分数变化的因素[J].中国乳品工业,2017,45(3):26-32.  
CHEN C C, WEN F, CHEN M X, et al. Effect factors about influencing concentration of furosine in milk [J]. China Dairy Industry, 2017, 45(3): 26-32. (in Chinese)
- [ 2 ] 刘璐璐,张贵斌,徐春伟,等.不同加热条件对牛奶糠氨酸、乳果糖含量的影响[J].现代食品,2019(17):68-70.  
LIU L L, ZHANG G B, XU C W, et al. Effects of different heating conditions on the contents of milk furosine and lactulose [J]. Modern Food, 2019(17): 68-70. (in Chinese)
- [ 3 ] 白永胜,杨小剑,李梅,等.灭菌乳产品不同生产工艺及储存条件下糠氨酸的研究[J].食品安全质量检测学报,2018,9(13):3501-3504.  
BAI Y S, YANG X J, LI M, et al. Study on furosine in sterilized milk products under different production processes and storage conditions [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(13): 3501-3504. (in Chinese)
- [ 4 ] 中华人民共和国农业部.NY/T 939—2016 巴氏杀菌乳和 UHT 灭菌乳中复原乳的鉴定[S].北京:中国农业出版社,2016.  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 939—2016. Identification of reconstituted milk pasteurized and UHT milk [S]. Beijing: China Agricultural Press, 2016. (in Chinese)
- [ 5 ] LI H Y, XING L, ZHAO N, et al. Furosine induced apoptosis by the regulation of STAT1/STAT2 and UBA7/UBE2L6 genes in HepG2 cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6): 1629.
- [ 6 ] SAEED Y, WANG J Q, ZHENG N. Furosine induces DNA damage and cell death in selected human cell lines: a strong toxicant to kidney Hek-293 cells [J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26(4): 1093-1101.
- [ 7 ] LI H Y, WANG Y Z, YANG H G, et al. Furosine, a maillard reaction product, triggers necroptosis in hepatocytes by regulating the RIPK1/RIPK3/MLKL pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10): 2388.
- [ 8 ] LI H Y, WANG B Y, YANG H G, et al. Furosine posed toxic effects on primary sertoli cells through regulating Cep55/NF-κB/PI3K/Akt/FOXO1/TNF-α pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(15): 3716.
- [ 9 ] 鄂来明,王薇,宋戈,等.HPLC 法测定乳品中的糠氨酸[J].中国乳品工业,2008,36(8):51-52  
E L M, WANG W, SONG G, et al. HPLC determination of furosine in dairy products [J]. China Dairy Industry, 2008, 36(8): 51-52. (in Chinese)
- [ 10 ] International Organization for Standardization, ISO 18329:2004 milk and milk products-determination of furosine content-ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography method [S]. Brussels: International Dairy Federation, 2004.
- [ 11 ] CHMIDT A, BOITZ L I, MAYER H K. A new UHPLC method for the quantitation of furosine as heat load indicator in commercial liquid milk [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2017, 56: 104-109.
- [ 12 ] 户江涛.超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中糠氨酸[J].分析试验室,2020,39(3):346-349.  
HU J T. Determination of furosine in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2020, 39(3): 346-349. (in Chinese)

- [13] BIGNARDI C, CAVAZZA A, CORRADINI C. Determination of furosine in food products by capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry[J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(15): 2382-2389.
- [14] TROISE A D, FIORE A, WILTAFSKY M, et al. Quantification of N $\epsilon$ -(2-furoylmethyl)-L-lysine (furosine), N $\epsilon$ -(carboxymethyl)-L-lysine (CML), N $\epsilon$ -(carboxyethyl)-L-lysine (CEL) and total lysine through stable isotope dilution assay and tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2015, 188: 357-364.
- [15] KULMYRZAEV A, DUFOUR É. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy[J]. *Dairy Science and Technology*, 2002, 82(6): 725-735.
- [16] 陈永艳, 吕佳, 邢方潇, 等. 饮用水检测中抗生素类标准物质稳定性研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(6): 758-762.  
CHEN Y Y, LYU J, XING F X, et al. Study on the stability of antibiotic standard substances in drinking water[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2019, 44(6): 758-762. (in Chinese)
- [17] 周鑫, 郑百芹, 张鑫, 等. 氯氟菊酯和氟氰菊酯标准品储存稳定性研究[J]. *养殖与饲料*, 2019(9): 23-26.  
ZHOU X, ZHENG B Q, ZHANG X, et al. Study on storage stability of cypermethrin and fluvalinate standard products[J]. *Animals Breeding and Feed*, 2019(9): 23-26. (in Chinese)
- [18] GUERRA-HERNANDEZ E, CORZO N. Furosine determination in baby cereals by ion-pair reversed-phase liquid chromatography[J]. *Cereal Chemistry*, 1996, 73(6): 729-731.
- [19] 国家卫生和计划生育委员会. GB 1886.9—2016 食品安全国家标准 食品添加剂 盐酸[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.  
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 1886.9—2016 National food safety standard food additives-hydrochloric acid[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. (in Chinese)
- [20] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.5—2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.  
National Health and Family Planning Commission of the Peoples Republic of China, Food and Drug Administration of the Peoples Republic of China. GB 5009.5—2016 National food safety-standard determination of protein in food[S]. Beijing: China Standards Press, 2016. (in Chinese)
- [21] 冯婉莹, 刘结容, 郑学股, 等. UPLC-Q-TOF/MS法测定液态乳中的糠氨酸[J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(6): 48-50.  
FENG W Y, LIU J R, ZHENG X Y, et al. Determination of furosine in the liquid milk by ultra performance liquid chromatography with ultra resolution quadrupole time of flight mass spectrometer[J]. *China Dairy Industry*, 2019, 47(6): 48-50. (in Chinese)
- [22] LI H Y, XING L, WANG J Q, et al. Toxicology studies of furosine *in vitro/in vivo* and exploration of the related mechanism[J]. *Toxicology Letters*, 2018, 291: 101-111.
- [23] 陈冲冲, 郑楠, 文芳, 等. 牛奶中糠氨酸检测方法的研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(4): 25-29.  
CHEN C C, ZHENG N, WEN F, et al. Research progress on detection method of furosine in milk[J]. *China Dairy Industry*, 2017, 45(4): 25-29. (in Chinese)
- [24] 巩军, 孙英鸿, 王琛琛, 等. 关于复原乳中康氨酸检测方法改进的探讨[J]. *生命科学仪器*, 2007, 5(1): 38-42.  
GONG J, SUN Y H, WANG C C, et al. Development an improved method of determining furosine in reconstituted milk[J]. *Life Science Instruments*, 2007, 5(1): 38-42. (in Chinese)
- [25] 李广, 段辉, 张楠. 反相离子对色谱法测定牛奶与奶粉中糠氨酸的含量[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(11): 1207-1210.  
LI G, DUAN H, ZHANG N. Determination of furosine in milk and milk powder by ion-pair reversed phase liquid chromatography[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2010, 29(11): 1207-1210. (in Chinese)
- [26] 王凤芹, 程远之, 肖肖, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法测定富硒蛋白多糖中纳米单质硒含量[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(3): 1155-1161.  
WANG F Q, CHENG Y Z, XIAO X, et al. Measurement of nano elemental selenium in selenium-enriched polysaccharides using high performance liquid chromatography coupled with inductivity coupled plasma mass spectrometry method[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(3): 1155-1161. (in Chinese)
- [27] 许国庆, 赵慧芬, 李克杰, 等. 乳与乳制品中糠氨酸含量的测定方法[J]. *中国奶牛*, 2006(7): 44-46.  
XU G Q, ZHAO H F, LI K J, et al. Study on content and analytical methods of furosine in raw milk and dairy food[J]. *China Dairy Cattle*, 2006(7): 44-46. (in Chinese)
- [28] AJANDOUZ E H, TCHIAKPE L S, ORE F D, et al. Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(7): 926-931.
- [29] MORENO F J, MOLINA E, OLANO A, et al. High-pressure effects on Maillard reaction between glucose and lysine[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(2): 394-400.

# Storage Stability of Furosine Standard Solution and Effects of Hydrochloric Acid Concentration Used for Milk Hydrolysis Procedure on Furosine Detection Result

CHEN Meixia<sup>1,2,3,4</sup> CHEN Chongchong<sup>1,2,3,4</sup> WEN Fang<sup>1,2,3,4</sup> ZHANG Yangdong<sup>1,2,3,4</sup>  
ZHENG Nan<sup>1,2,3,4</sup> WANG Jiaqi<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. Key Laboratory of Quality & Safety Control for Milk and Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Beijing), Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Milk and Milk Products Inspection Center of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Beijing), Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 4. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** This experiment was to investigate the storage stability of furosine and the effects of hydrochloric acid (HCl) concentration used for milk hydrolysis procedure on furosine detection result. In experiment 1, in order to investigate the stability of furosine standard solution under different storage conditions, different concentrations of furosine standard solutions (1 and 5 mg/L) were prepared with different HCl solutions (3.0, 1.0 and 0.1 mol/L), and kept at different temperatures [ $-20, 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and indoor temperature ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ )] for different time (1, 3, 5, 8, 10, 12, 12, 15, 17 and 21 days,  $n=3$  for each treatment), and then determined the furosine content using ultra performance liquid chromatography (UPLC) method. In experiment 2, in order to investigate the effects of HCl concentration used for milk hydrolysis procedure on furosine detection result and the repeatability of detection result, eleven different concentrations of HCl were used to hydrolyze the milk for furosine content determination. Four samples were used in each concentration, and three independent experiments were conducted separately. The results showed as follows: 1) furosine standard solutions prepared with 0.1 and 1.0 mol/L HCl degraded easily, but the furosine standard solutions prepared with 3.0 mol/L HCl exhibited good stability when they were stored at  $-20, 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  or room temperature ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) within 21 days. 2) HCl concentration significantly affected the hydrolysis effect of milk ( $P<0.05$ ), and the milk could be completely hydrolyzed to release the furosine in milk and presented good repeatability when the concentration of HCl in the hydrolysate was up to 9.17 mol/L. Therefore, it is suggested that furosine standard solution should be prepared with 3 mol/L HCl and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  within 21 days. In addition, the concentration of HCl used in milk hydrolysis procedure should be such that can make the concentration of HCl in the hydrolysate reaches at least 9.17 mol/L. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(1):341-349]

**Key words:** milk; furosine; stability; hydrochloric acid; hydrolysis effect; repeatability