

测定食品中 16 种氨基酸国家标准方法的改进

李巧琪, 李洪燕, 卢桂锋, 周海练, 许志彬

(广州检验检测认证集团有限公司 国家加工食品质量检验中心(广东), 广州 511447)

摘要: 对国家标准 GB 5009.124—2016 测定食品中 16 种氨基酸(天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸)含量进行了方法改进。改进后的酸水解条件如下:称取样品 1 g 于聚四氟乙烯管中,加入含 0.1%(质量分数)苯酚的 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 10 mL,充氮后封口,酸水解温度为 165°C ,酸水解时间由原来的 22 h 缩短至 1 h。并提出了微波消解的前处理方法,其条件如下:称取样品约 0.1 g 于石英罐中,加入 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL,将其放进装有 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液的聚四氟乙烯罐中,充氮除氧,封盖后放入消解仪,微波消解温度为 165°C ,消解时间为 12 min。以 LCA K06/Na 色谱柱为固定相,按照优化后的柱升温程序和梯度洗脱程序对 16 种氨基酸进行分离。结果表明:16 种氨基酸的浓度在 $10 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内与其对应的峰面积呈线性关系,检出限为 $0.00011\% \sim 0.0042\%$;对猪瘦肉进行 3 个浓度水平的加标回收试验,16 种氨基酸的回收率为 $93.6\% \sim 101\%$,测定值的相对标准偏差(RSD, $n=6$)为 $1.2\% \sim 7.2\%$;两种前处理方法用于实际样品的测定,并与 GB 5009.124—2016 的测定结果进行比对, P 值分别为 0.870 和 0.643,说明这两种前处理方法的测定结果与 GB 5009.124—2016 的不存在显著性差异。

关键词: 酸水解法;微波消解法;氨基酸;方法改进

中图分类号: O657.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2022)01-0077-07

自然界存在 300 多种氨基酸,其中,构成人体蛋白质的有 20 多种,被称为基本氨基酸^[1]。从营养学角度看,由于部分氨基酸人体无法直接合成,需要从食品中摄取,并且食品中蛋白质的营养价值取决于食品中所含氨基酸的种类和含量,因此测定食品中多种氨基酸的含量对人体营养摄入评估具有一定意义^[2]。

目前,食品中氨基酸的前处理方法主要采用酸水解法^[3],但是该方法前处理时间较长(需要 22 h 左右)。测定方法主要有液相色谱-质谱法^[4-6]、液相色谱法^[7-9]、离子色谱法^[10-12]等。其中液相色谱-质谱法仪器成本较高;而液相色谱法中,样品经柱前衍生反应后,部分产物受基体以及过量试剂的影响,稳定性较差,并且衍生试剂的价格较高;阴离子交换直接检测法易受细菌干扰,进而造成测定结果重现性不理想。基于此,本工作首先对国家标准

GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》中的酸水解法进行改进,并提出了微波消解这一前处理方法,然后采用优化后的阳离子交换色谱分离-柱后茚三酮衍生法测定食品中天冬氨酸(Asp)、苏氨酸(Thr)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、脯氨酸(Pro)、甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)等 16 种氨基酸的含量。该方法分析结果稳定,重现性好,为食品中氨基酸的快速测定提供了参考。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

S433D 型氨基酸分析仪;ED53 型精密烘箱;TVE-1100 型试管浓缩仪;Ethos MHP 型微波蛋白质水解系统;ME204E 型电子天平。

17 种氨基酸的混合标准溶液:胱氨酸(Cys)的浓度为 $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Asp、Thr、Ser、Glu、Pro、Gly、Ala、Val、Met、Ile、Leu、Tyr、Phe、His、Lys、

收稿日期: 2020-08-06

作者简介: 李巧琪,工程师,本科,主要从事食品理化检验工作, 493881592@qq.com

Arg 的浓度均为 $2.50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

缓冲液 1:称取柠檬酸三钠 11.8 g、柠檬酸 6.0 g 于烧杯中,加入 65 mL 乙醇、5.6 mL 盐酸以及适量水,溶解后用水定容至 1 L,用 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液将溶液酸度调至 pH 3.42。

缓冲液 2:称取柠檬酸三钠 19.6 g、硼酸 5.0 g、氢氧化钠 3.1 g 于烧杯中,用水溶解并定容至 1 L,用 20% (质量分数) 氢氧化钠溶液将溶液酸度调至 pH 10.85。

再生液:称取氢氧化钠 20.0 g 于烧杯中,用水溶解并定容至 1 L。

显色液:称取乙酸钾 196 g、三水合乙酸钠 272 g 于烧杯中,加入乙酸 200 mL,用水溶解并定容至 1 L,配制成钾钠缓冲液,备用;称取茚三酮 20 g、苯酚 2 g 于另一烧杯中,加入甲醇 600 mL 和钾钠缓冲液 400 mL,溶解,配制成显色液,避光保存。

氮气的纯度不小于 99.999%;甲醇为色谱纯;盐酸、柠檬酸三钠、氢氧化钠、硼酸、乙醇、柠檬酸、乙酸钾、三水合乙酸钠、乙酸、苯酚、茚三酮均为分析纯;试验用水为超纯水。

1.2 仪器工作条件

LCA K06/Na 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);氮气增压 60~80 kPa。柱升温程序:初始温度 58 ℃,保持 22.0 min;22.0~27.0 min,升温至 73 ℃,保持 17.0 min;44.0~48.0 min,降温至 58 ℃。流动相 A 为缓冲液 1,B 为缓冲液 2,C 为再生液,流量 $0.45\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,压力 3~4 MPa;衍生体系为显色液,流量 $0.25\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,压力 0.7~1 MPa;检测波长为 440 nm(Pro)和 570 nm(其余 15 种氨基酸);进样量 50 μL。梯度洗脱程序见表 1。

1.3 试验方法

1.3.1 常规酸水解法

参照 GB 5009.124—2016 中的方法进行测定。

1.3.2 改进后的酸水解法

称取样品 1 g 于聚四氟乙烯管中,加入含 0.1% (质量分数) 苯酚的 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 10 mL,充氮后封口,于 165 ℃ 水解 1 h。水解结束后,取出,冷却,用水定容至 50 mL,取 1 mL 减压浓缩至近干,再用 10 mL $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液复溶,过滤,滤液按照仪器工作条件进行测定。根据样品的实际情况可进一步稀释。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间/ min	φ_A / %	φ_B / %	φ_C / %
0	100	0	0
3.5	100	0	0
12.0	85	15	0
18.0	80	20	0
24.0	67	33	0
28.0	20	80	0
30.0	20	80	0
31.0	0	100	0
42.0	0	100	0
42.1	0	0	100
45.1	0	0	100
45.2	100	0	0

1.3.3 微波消解法

称取样品约 0.1 g 于石英罐中,加入 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 1 mL,充分湿润后,将其放入装有 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液的聚四氟乙烯罐中,充氮除氧,封盖后放入微波消解仪,设置微波输出功率为 1 000 W,于 165 ℃ 消解 12 min。消解结束后,取出,冷却,将消解液转移至 50 mL 容量瓶中,用 $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,过滤,滤液按照仪器工作条件进行测定。根据样品实际情况可进一步稀释。

2 结果与讨论

2.1 酸水解条件的优化

提高水解温度可使活化分子增多,水解效率提高。为防止普通安培管在高温下难以承受盐酸蒸气压而破裂,试验采用聚四氟乙烯管进行水解。以猪瘦肉为研究对象,考察了不同酸水解条件对样品中 16 种氨基酸测定结果的影响,并与 GB 5009.124—2016 的测定结果进行比对,结果见表 2。

结果表明:随着酸水解温度的升高,水解时间逐渐缩短,酸水解效率逐渐提高;当酸水解温度为 180 ℃ 时,部分氨基酸分解,导致其测定值有所下降。因此,试验选择酸水解温度为 165 ℃,酸水解时间为 1 h,此条件下与 GB 5009.124—2016 的测定结果基本一致,且酸水解时间由 22 h 缩短至 1 h。

2.2 微波消解条件的优化

微波消解法是常见的样品前处理技术,其消解

表 2 不同酸水解条件下氨基酸的测定结果

Tab. 2 Determination results of amino acids under different acid hydrolysis conditions

%

氨基酸	本法					GB 5009.124—2016
	120 ℃,12 h	135 ℃,4 h	150 ℃,2 h	165 ℃,1 h	180 ℃,40 min	110 ℃,22 h
Asp	2.01	2.08	2.04	2.02	1.47	2.05
Thr	1.02	0.98	1.03	1.04	0.96	1.01
Ser	0.87	0.89	0.82	0.85	0.77	0.85
Glu	3.29	3.33	3.28	3.32	2.91	3.30
Pro	0.82	0.77	0.79	0.79	0.67	0.80
Gly	0.94	0.98	0.99	0.96	0.84	0.97
Ala	1.25	1.28	1.24	1.25	0.99	1.26
Val	1.09	1.04	1.07	1.05	0.91	1.06
Met	0.61	0.64	0.61	0.64	0.52	0.63
Ile	1.02	1.06	1.03	1.04	0.92	1.05
Leu	1.83	1.78	1.77	1.80	1.55	1.79
Tyr	0.78	0.80	0.76	0.80	0.66	0.79
Phe	0.91	0.90	0.87	0.88	0.82	0.89
His	1.00	1.03	1.02	1.01	0.91	1.02
Lys	1.88	1.92	1.91	1.86	1.69	1.90
Arg	1.44	1.40	1.43	1.39	1.09	1.42
总量	20.76	20.88	20.66	20.70	17.68	20.79

效率远远高于酸水解法。设置微波输出功率为1 000 W,以酸水解最佳温度165 ℃为消解温度,考察了不同消解时间(6,9,12,15,18 min)对2.1节同

一猪瘦肉样品中16种氨基酸测定结果的影响,并与GB 5009.124—2016的测定结果进行比对,结果见表3。

表 3 不同消解时间下氨基酸的测定结果

Tab. 3 Determination results of amino acids under different digestion time

%

氨基酸	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	氨基酸	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min
Asp	1.99	2.03	2.06	2.07	2.02	Ile	0.84	1.04	1.06	1.06	1.01
Thr	0.95	1.03	1.00	0.99	1.02	Leu	1.59	1.81	1.75	1.77	1.82
Ser	0.81	0.84	0.86	0.87	0.86	Tyr	0.61	0.81	0.77	0.78	0.76
Glu	2.98	3.28	3.31	3.27	3.29	Phe	0.67	0.88	0.91	0.9	0.88
Pro	0.77	0.81	0.78	0.82	0.82	His	0.91	1.01	1.03	1.04	0.99
Gly	0.86	0.98	0.96	0.99	0.95	Lys	1.74	1.89	1.92	1.91	1.87
Ala	1.13	1.27	1.23	1.23	1.28	Arg	1.26	1.41	1.39	1.44	1.43
Val	1.01	1.07	1.05	1.04	1.06	总量	18.60	20.78	20.71	20.77	20.72
Met	0.48	0.62	0.63	0.59	0.66						

由表3可知:当消解时间为6 min时,蛋白质消解不彻底,测定值比GB 5009.124—2016的测定值小;当消解时间为9~18 min时,测定值与GB 5009.124—2016的测定值基本一致。为避免因消解时间过短而出现复杂基质样品消解不彻底现象,同时提高分析效率,试验选择消解时间为12 min。

2.3 柱温的优化

参考GB 5009.124—2016,采用阳离子交换色谱分离-柱后茚三酮衍生法进行分析。试验发现,柱温过低,色谱峰峰形变宽变矮。特别是Asp对温度十分敏感,当柱温不大于30 ℃时,其色谱峰在Thr后面出峰;当柱温不小于45 ℃时,其色谱峰在Thr

前面出峰;当柱温达到 58 ℃时,Asp 和 Thr 分离更彻底。并且,随着柱温的继续升高,Thr 和 Ser 出现叠峰现象;但当柱温控制在 58 ℃时,Tyr 和 Phe 出现叠峰现象,需要进一步升温才能使两者完全分离,经试验,当柱温达 73 ℃,两者才可分离完全。因此,试验采用柱升温程序来分离各目标物,柱升温程序见 1.1 节。

2.4 洗脱程序的优化

无论是酸水解法还是微波消解法,都会将部分 Cys 转化为磺基丙氨酸,造成 Cys 的测定值偏小。并且试验过程中发现,Cys 的保留时间与 Val 相近,流动相 A 的酸度及流动相 B 的更换时间对 Cys 的保留时间影响较大。为避免 Cys 对 Val 测定结果的影响,试验将 Cys 作为杂质,考察了流动相 A 的酸

度及流动相 B 的更换时间对各目标物分离效果的影响。结果显示:当流动相 A 的 pH 小于 3.30 或流动相 B 的更换时间不小于 14.0 min 时,Cys 的保留时间较长,并且与 Val 的色谱峰黏连在一起,造成 Val 的测定值偏大;当流动相 A 的 pH 大于 3.50 或流动相 B 的更换时间不大于 10.0 min 时,各目标物的保留时间均提前,但 Thr 与 Ser、Leu 与 Ile 分离不完全;当流动相 A 的 pH 为 3.40~3.45 以及流动相 B 的更换时间为 12.0 min 时,Cys 与 Val 分离效果较好。因此,试验选择流动相 A 的酸度为 pH 3.42,流动相 B 的更换时间为 12.0 min,梯度洗脱程序见表 1。

在上述优化条件下对 17 种氨基酸的混合标准储备溶液进行测定,所得色谱图见图 1。

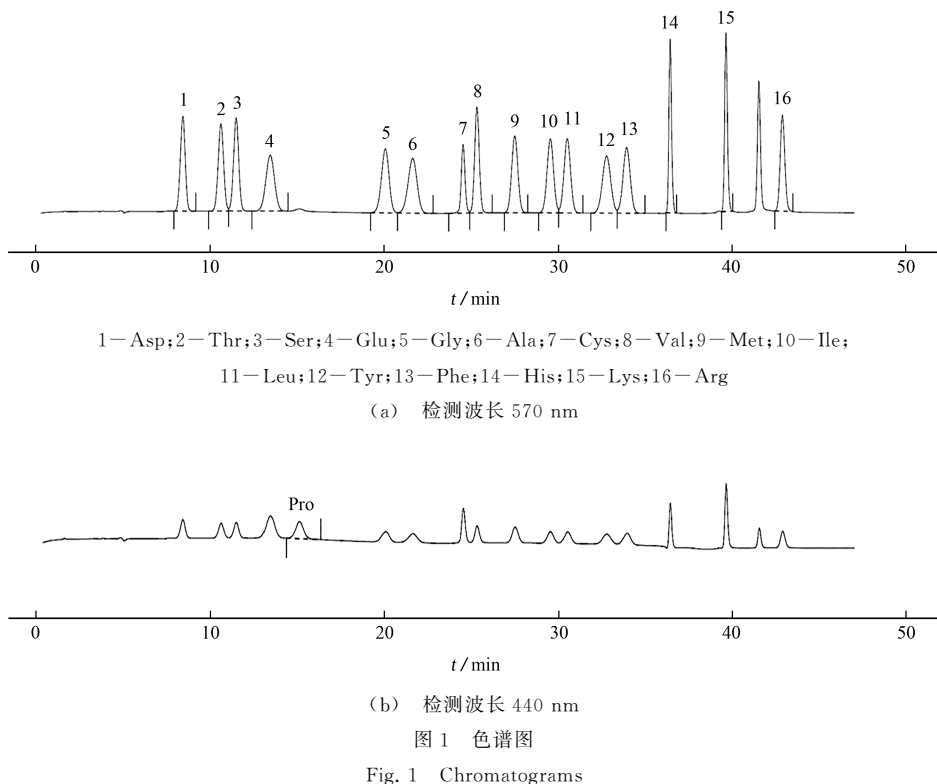


图 1 色谱图

Fig. 1 Chromatograms

2.5 标准曲线与检出限

移取适量的 17 种氨基酸的混合标准溶液,用 0.02 mol · L⁻¹ 盐酸溶液逐级稀释,配制成 16 种目标物浓度为 10, 20, 50, 100, 200 μmol · L⁻¹ 的混合标准溶液系列。按照仪器工作条件对上述混合标准溶液系列进行测定,以各目标物的浓度为横坐标,其对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果显示,16 种氨基酸的浓度在 10~200 μmol · L⁻¹ 内与其对应的峰面积呈线性关系,线性参数见表 4。

通常情况下,食品中均含有氨基酸,无法采用阴

性样品进行检出限试验。因此,本工作分别按照改进后的酸水解法和微波消解法对猪瘦肉进行处理,采用 2 倍基线噪声峰高(峰底附近 30 个数据点以内的值)乘以样品含量(浓度乘以进样量),再除以目标物峰高来计算检出限,并通过配对样本 *t* 检验法验证上述两种方法检出限与 GB 5009.124—2016 检出限的差异性,结果见表 4。

结果显示,改进后的酸水解法和微波消解法所得检出限与 GB 5009.124—2016 的检出限相当^[3],

表 4 线性参数和检出限
Tab. 4 Linearity parameters and detection limits

氨基酸	线性回归方程	相关系数	检出限 $w/\%$		
			改进后的酸水解法	微波消解法	GB 5009.124—2016
Asp	$y=74.58\ x+10.85$	0.999 9	0.000 11	0.000 12	0.000 13
Thr	$y=76.12\ x+7.705$	1.000	0.000 13	0.000 11	0.000 14
Ser	$y=78.66\ x-23.25$	1.000	0.000 19	0.000 22	0.000 18
Glu	$y=77.39\ x+4.260$	1.000	0.000 29	0.000 27	0.000 24
Pro	$y=18.81\ x+23.96$	0.999 7	0.001 9	0.002 1	0.002 6
Gly	$y=77.40\ x-34.66$	0.999 6	0.000 23	0.000 27	0.000 25
Ala	$y=79.92\ x-6.900$	1.000	0.000 37	0.000 37	0.002 9
Val	$y=80.10\ x+51.31$	0.999 8	0.000 19	0.000 22	0.000 12
Met	$y=72.69\ x-1.276$	0.999 7	0.000 24	0.000 29	0.002 3
Ile	$y=78.86\ x-31.66$	0.999 8	0.000 29	0.000 27	0.000 43
Leu	$y=79.31\ x+3.962$	0.999 8	0.000 28	0.000 31	0.001 1
Tyr	$y=77.61\ x-25.46$	0.999 7	0.000 40	0.000 38	0.002 8
Phe	$y=77.15\ x-20.10$	0.999 9	0.000 37	0.000 34	0.002 5
His	$y=75.86\ x+18.69$	0.999 8	0.002 5	0.002 4	0.000 59
Lys	$y=80.10\ x+53.38$	0.999 5	0.003 7	0.003 9	0.000 13
Arg	$y=70.41\ x+13.95$	0.999 4	0.004 2	0.004 1	0.002 0

P 值依次为 0.589,0.621,说明这两种方法与 GB 5009.124—2016 不存在显著性差异($P>0.05$),能够满足日常检测需要。

2.6 精密度和回收试验

分别按照改进后的酸水解法和微波消解法对猪

瘦肉进行低($20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、中($50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、高($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)等 3 个浓度水平的加标回收试验,每个浓度水平平行测定 6 次,计算回收率和测定值的相对标准偏差(RSD),结果见表 5。

结果显示:采用改进后的酸水解法时,16种氨

表 5 精密度和回收试验结果($n=6$)
Tab. 5 Results of tests for precision and recovery($n=6$)

氨基酸	加标量 $c/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	改进后的酸水解法		微波消解法		氨基酸	加标量 $c/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	改进后的酸水解法		微波消解法	
		回收率/ $\%$	RSD/ $\%$	回收率/ $\%$	RSD/ $\%$			回收率/ $\%$	RSD/ $\%$	回收率/ $\%$	RSD/ $\%$
Asp	20	96.4	2.7	97.3	2.2	Met	20	98.6	1.8	95.6	2.5
	50	98.6	1.3	96.6	2.7		50	97.9	2.3	97.8	3.4
	100	97.6	3.0	97.1	1.9		100	99.9	2.6	96.3	2.7
Thr	20	98.7	2.2	99.1	3.1	Ile	20	98.9	3.4	98.6	4.4
	50	95.9	1.8	96.8	2.9		50	99.3	2.4	97.8	2.8
	100	99.6	2.2	98.2	2.4		100	97.2	3.1	99.3	3.5
Ser	20	97.3	3.6	94.9	3.5	Leu	20	95.9	2.6	94.1	3.2
	50	94.9	2.0	96.3	2.8		50	98.6	1.9	98.3	2.5
	100	98.9	2.6	99.4	1.2		100	97.7	2.2	96.8	1.3
Glu	20	94.3	1.9	96.9	2.7	Tyr	20	94.5	3.0	97.9	2.6
	50	101	2.6	98.4	3.9		50	98.8	1.9	96.8	3.6
	100	98.9	1.6	94.9	3.1		100	93.9	3.6	95.3	2.0

表 5(续)

氨基酸	加标量 $c/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	改进后的酸水解法		微波消解法		氨基酸	加标量 $c/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	改进后的酸水解法		微波消解法	
		回收率/ %	RSD/ %	回收率/ %	RSD/ %			回收率/ %	RSD/ %	回收率/ %	RSD/ %
Pro	20	97.3	5.6	99.8	2.8	Phe	20	95.8	1.5	98.6	2.7
	50	93.6	2.9	96.8	5.7		50	99.7	2.3	97.3	1.3
	100	99.8	3.3	98.6	4.9		100	98.5	1.8	98.2	3.0
Gly	20	96.9	2.2	96.9	1.9	His	20	96.8	6.3	94.1	4.3
	50	98.8	1.5	97.6	2.9		50	97.3	3.6	97.8	3.3
	100	97.5	1.9	96.8	2.3		100	97.2	4.2	96.2	3.8
Ala	20	96.8	3.1	97.9	3.1	Lys	20	100	3.9	98.6	6.5
	50	98.4	2.5	98.5	2.1		50	98.9	4.9	97.9	2.9
	100	96.4	1.8	94.9	2.8		100	99.4	3.6	100	4.8
Val	20	97.9	4.0	99.4	2.7	Arg	20	96.8	7.2	97.9	4.8
	50	96.8	2.9	98.6	3.9		50	99.3	5.9	96.8	7.0
	100	99.0	3.2	98.9	2.8		100	97.6	6.0	98.9	3.8

基酸的回收率为 93.6%~101%，测定值的 RSD 为 1.3%~7.2%；采用微波消解法时，16 种氨基酸的回收率为 94.1%~100%，测定值的 RSD 为 1.2%~7.0%，两种方法的准确度和精密度均符合分析检测要求^[13]。

2.7 样品分析

按照改进后的酸水解法、微波消解法和 GB 5009.124-2016，分别对不同食品中 16 种氨基酸进行测定，计算 16 种氨基酸总量，并通过配对样本 t 检验法分析改进后的酸水解法、微波消解法与 GB 5009.124-2016 是否存在显著性差异，结果见表 6。

表 6 样品分析结果

Tab. 6 Analytical results of samples %

样品	改进后的酸水解法	微波消解法	GB 5009.124-2016
奶粉 1	11.8	11.7	11.8
奶粉 2	13.2	13.3	13.1
乳清蛋白粉 1	80.6	80.7	80.8
乳清蛋白粉 2	88.5	88.8	88.6
鸡肉 1	21.7	21.6	21.8
鸡肉 2	20.9	20.9	21.1
虾肉 1	15.2	14.8	15.0
虾肉 2	13.3	13.2	13.1
猪肉 1	21.8	22.0	21.8
猪肉 2	22.2	22.1	22.4
大豆肽粉	73.6	73.4	73.3
海参	10.6	10.5	10.5

结果显示，改进后的酸水解法、微波消解法与 GB 5009.124-2016 的测定结果基本一致，并且计算得改进后的酸水解法与 GB 5009.124-2016 的 P 值为 0.870，微波消解法与 GB 5009.124-2016 的 P 值为 0.643，均大于 0.05，说明这两种方法的测定结果与 GB 5009.124-2016 的不存在显著性差异，进一步验证了这两种方法的准确度较好。

本工作通过对 GB 5009.124-2016 中的常规酸水解法进行改进，将原来的前处理时间由 22 h 缩短至 1 h(改进后的酸水解法)或 12 min(微波消解法)，并进一步优化柱温和洗脱程序，建立了阳离子交换色谱法测定食品中 16 种氨基酸含量的方法。改进后的酸水解法和微波消解法大大提高了试验效率，并且回收率高，精密度好，适用于食品中 16 种氨基酸的快速测定。

参考文献：

[1] MAEDA H, DUDAREVA N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012,63:73-105.

[2] 何莎莎.不同类型柑橘果实氨基酸组成分析及“三度”法营养价值评价[D].重庆:西南大学, 2018.

[3] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定:GB 5009.124-2016[S].北京:中国标准出版社, 2017.

[4] 王忠合,李晓婷,胡文梅,等.超高压液相色谱-高分辨质谱法检测单丛乌龙茶中氨基酸[J].食品与发酵工业, 2020,46(21):207-214.

- [5] 王馨雨,王蓉蓉,王婷,等.不同品种百合内外鳞片游离氨基酸组成的主成分分析及聚类分析[J].食品科学, 2020,41(12):211-220.
- [6] QIU X, REYNOLDS R, JOHANNINGSMEIER S, et al. Determination of free amino acids in five commercial sweetpotato cultivars by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2020,92:103522.
- [7] 黄元河,潘乔丹,黎惠琴,等.柱前衍生-高效液相色谱法测定野芭蕉不同部位的18种氨基酸含量[J].食品研究与开发, 2020,41(9):158-162.
- [8] 唐翎,魏伟,赵勇.柱前衍生高效液相色谱测定猴头菌丝体中15种游离氨基酸的含量[J].中国药学杂志, 2017,52(21):1899-1902.
- [9] 温浩然,冀艳华,韩星,等.利用柱前在线衍生-高效液相色谱法测定培植牛黄及天然牛黄中18种氨基酸的含量[J].中国现代中药, 2020,22(2):231-236.
- [10] 宋卫得,杜利君,高尧华,等.积分脉冲安培检测-离子色谱法同时测定果汁中20种氨基酸[J].中国食品添加剂, 2019,30(8):132-138.
- [11] 严俊,徐柏杨,颜琳琦,等.L-8900氨基酸分析仪检测不同形态保健食品中牛磺酸含量[J].食品工业, 2019,40(11):341-344.
- [12] SONG W, SU Z, HUI X, et al. Simultaneous determination of twenty amino acids and six carbohydrates in soy sauce by ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019,37(9):996-1003.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.实验室质量控制规范 食品理化检测:GB/T 27404—2008[S].北京:中国标准出版社, 2008.

Improvement of National Standard Method for Determination of 16 Kinds of Amino Acids in Food

LI Qiaqi, LI Hongyan, LU Guifeng, ZHOU Hailian, XU Zhibin

(National Quality Testing Center for Processed Food (Guangdong), Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Co., Ltd., Guangzhou 511447, China)

Abstract: The national standard method GB 5009.124—2016 for determination of 16 kinds of amino acids (including of aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine, arginine) in food was improved. Improved conditions of acid hydrolysis were as following. Sample of 1 g was placed into a teflon tube, and 6 mol · L⁻¹ hydrochloric acid solution containing 0.1% (mass fraction) phenol of 10 mL was added for filling nitrogen and sealing. The acid hydrolysis temperature was 165 °C and the acid hydrolysis time was shortened to 1 h from 22 h. Microwave digestion was proposed, and the conditions were as following. Sample of 0.1 g was placed into a quartz tank, and 6 mol · L⁻¹ hydrochloric acid solution of 1 mL was added. The above solution was put into a teflon tank containing 6 mol · L⁻¹ hydrochloric acid solution and digested at 165 °C for 12 min after filling nitrogen for deoxygenation and sealing. LCA K06/Na column was used as stationary phase, and 16 kinds of amino acids were separated according to optimized column heating program and gradient elution program. It was showed that linear relationships between concentrations of 16 kinds of amino acids and their peak areas were kept in the range of 10—200 μmol · L⁻¹, with detection limits in the range of 0.000 11%—0.004 2%. Recovery test was made on pig lean meat at 3 concentration levels by standard addition method, giving results in the range of 93.6%—101%, and RSDs (*n* = 6) of the determined values were in the range of 1.2%—7.2%. The two pretreatment methods have been used for determination of substantial samples, and compared with the determination results of GB 5009.124—2016. Values of *P* were 0.870 for improved acid hydrolysis and 0.643 for microwave digestion, indicating that there was no significant difference between the determination results of these two pretreatment methods and GB 5009.124—2016.

Keywords: acid hydrolysis; microwave digestion; amino acid; method improvement