

氨基酸分析仪测定食品中 17 种氨基酸的含量作业指导书 (SOP)

标准号：GB 5009.124-2016

■ 参考标准

GB 5009.124-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

2016 年 12 月 23 日，国家食品药品监督管理总局发布《GB 5009.124-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》，2017 年 6 月 23 日正式实施。本 SOP 参考该标准，利用岛津氨基酸分析仪建立食品中 17 种氨基酸的含量检测方法并进行方法学验证。

2.2 方法使用范围

本方法适用于食品中酸水解氨基酸的测定，包括天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、胱氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸和精氨酸共 17 种氨基酸。

2.3 方法技术指标

当试样为固体或半固体时，最大试样量为 2 g，干燥后溶解体积为 1 mL，各氨基酸的检出限如下表所示。

序号	化合物名称	检出限 (g/100 g)
1	L- 天冬氨酸	0.000110
2	L- 苏氨酸	0.000089
3	L- 丝氨酸	0.000079
4	L- 谷氨酸	0.000151
5	L- 脯氨酸	0.001318
6	甘氨酸	0.000062
7	L- 丙氨酸	0.000120
8	L- 胱氨酸	0.000318
9	L- 缬氨酸	0.000064
10	L- 蛋氨酸	0.000082
11	L- 异亮氨酸	0.000121
12	L- 亮氨酸	0.000082
13	L- 酪氨酸	0.000177
14	L- 苯丙氨酸	0.000107
15	L- 组氨酸	0.000058
16	L- 赖氨酸	0.000099
17	L- 精氨酸	0.000327

■ 方法原理

食品中的蛋白质经盐酸水解成为游离氨基酸，经离子交换柱分离后，与茚三酮溶液产生颜色反应，再通过可见光分光光度检测器测定氨基酸含量。根据保留时间定性，外标法定量。

■ 仪器设备及辅助设备

4.1 仪器设备

岛津氨基酸分析仪

4.2 辅助设备

分析天平

电热鼓风恒温箱

氮气吹干仪

涡旋仪

移液枪：1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L

■ 标准品、试剂、耗材

17 种氨基酸混合标准品溶液 2.5 μ mol/mL (岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 208-09625) (详细信息见附录) ;

盐酸 (HCl): 浓度 \geq 36%, 分析纯级;

钠型氨基酸流动相试剂包流动相 A,B,C (岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 228-21195-94) ;

茚三酮溶液 (岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 208-09626) ;

微孔过滤膜: 水相尼龙针式滤器, 0.22 μ m

■ 操作步骤

6.1 标准工作曲线制作

移取适量 2.5 μ mol/mL 17 种氨基酸混合标准品, 用流动相 A 逐级稀释为 10、20、50、100、200 和 500 nmol/mL 的标准溶液。

6.2 仪器条件

分析柱: Shimadzu Shim-pack Amino-Na (100 mm \times 6.0 mm I.D., 5 μ m)

(岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 228-18837-91)

捕氨柱: Shimadzu Shim-pack ISC-30/S0504 Na (50 mm \times 4.0 mm I.D., 5 μ m)

(岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 228-14206-91)

流动相: 钠型氨基酸流动相试剂包流动相 A,B,C

(岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 228-21195-94)

衍生试剂: 茚三酮溶液 (岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 208-09626)

流动相流速: 0.6 mL/min

反应液流速: 0.2 mL/min

衍生温度: 130 $^{\circ}$ C

柱温: 60 $^{\circ}$ C

进样量: 20 μ L

检测波长: 570 nm/440 nm

洗脱方式: 梯度洗脱, A 相起始浓度为 100%, 时间程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
9.00	泵	B Conc	0
13.00	泵	B Conc	7
17.20	泵	B Conc	8
17.21	泵	B Conc	11
20.80	泵	B Conc	11
20.81	泵	B Conc	50
22.00	泵	B Conc	58

22.01	泵	B Conc	100
28.80	泵	SV(Pump A)	B-A-A
29.30	泵	B Conc	100
29.31	泵	B Conc	0
33.00	泵	SV(Pump A)	A-A-A
35.00	泵	T.Flow	0.6
36.50	泵	T.Flow	0.7
43.30	泵	T.Flow	0.7
44.00	泵	T.Flow	0.6
45.00	控制器	Stop	

6.3 样品前处理

1) 固体或半固体试样使用组织粉碎机或研磨机粉碎，液体试样用匀浆机打成匀浆密封冷冻保存，分析用时将其解冻后使用。

2) 均匀性好的样品，如奶粉等，准确称取一定量试样（精确至 0.0001g），使试样中蛋白质含量在 10 mg~20 mg 范围内。对于蛋白质含量未知的样品，可先测定样品中蛋白质含量。将称量好的样品置于水解管中。很难获得高均匀性的试样，如鲜肉等，为减少误差可适当增大称样量，测定前再做稀释。对于蛋白质含量低的样品，如蔬菜、水果、饮料和淀粉类食品等，固体或半固体试样称样量不大于 2 g，液体试样称样量不大于 5 g。

3) 根据试样的蛋白质含量，在水解管内加 10~15 mL 6 mol/L 盐酸溶液。对于含水量高、蛋白质含量低的试样，如饮料、水果、蔬菜等，可先加入约相同体积的盐酸混匀后，再用 6 mol/L 盐酸溶液补充至大约 10 mL。用氮吹仪将玻璃瓶充入氮气，置换出瓶内空气，在充氮气状态下拧紧瓶盖。放入 111℃ 的电热鼓风恒温箱内，水解 22 h 后，取出，冷却至室温。打开玻璃瓶盖，将溶液过滤入 50 mL 容量瓶中，多次用纯水冲洗玻璃瓶，移入同一容量瓶中，用纯水定容至刻度，振荡混匀。

4) 移取 1 mL 滤液到 5 mL 玻璃小瓶中，用氮吹浓缩仪在 50~60℃ 加热环境下干燥，干燥后残留物用 1 mL 纯水溶解，再蒸干。用 1 mL pH 2.2 柠檬酸钠缓冲溶液（或者流动相 A 液）加入小瓶内溶解，振荡混匀后，吸取溶液通过 0.22 μm 水系过滤器后，转移至仪器进样瓶中，供测定用。

6.4 加标试样

取空白水样品进行加标，按照 6.3 步骤制备加标样品，加标浓度为 10 nmol/mL 和 50 nmol/mL。

6.5 测定

按照 6.2 的仪器分析条件进行分析，进样量为 20.0 μL，若检测溶液中的含量超过本方法的标准曲线范围，则需要稀释检测溶液后进样分析。

6.6 计算和报告

精密吸取供试品溶液 20.0 μL，注入氨基酸分析仪，测定峰面积，外标法计算氨基酸的量。

供试品中各氨基酸的含量按下式计算：

$$X = C_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{F \times V \times M}{m \times 10^9} \times 100$$

X — 供试品中氨基酸的含量，g/100 g；

C_s — 混合对照品溶液中被测氨基酸的浓度，nmol/mL；

A — 供试品溶液中被测氨基酸的色谱峰面积；

A_s — 混合对照品溶液中被测氨基酸的色谱峰面积；

F — 稀释倍数；

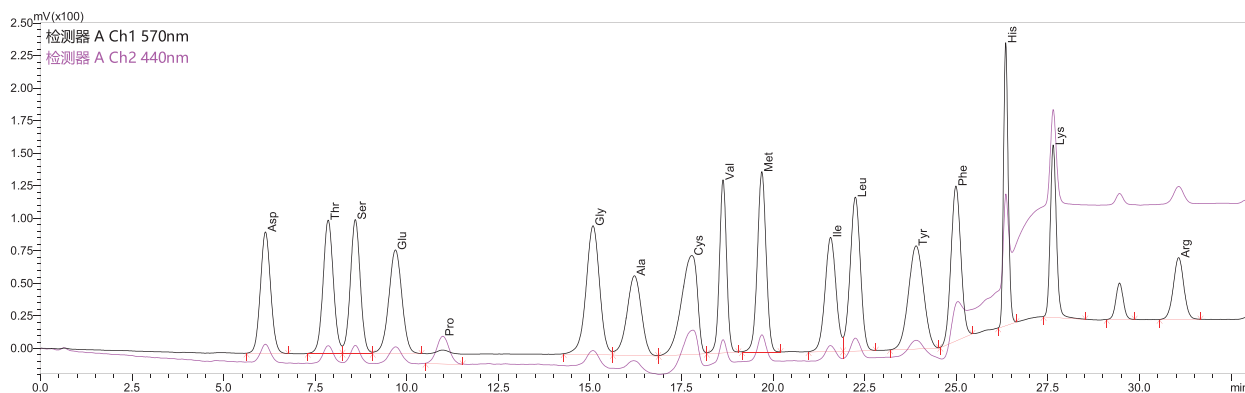
V — 供试品水解液转移定容的体积，mL；

M — 被测氨基酸的摩尔质量，g/mol；
 m — 称样量，g；
 10^9 — 将供试品含量由纳克折算成克的系数；
 100 — 换算系数。

附录

表 各氨基酸化合物信息

No.	化合物名称	英文名称	CAS 号	摩尔质量 /(g/mol)	保留时间 (min)
1	L-天冬氨酸	Asp	56-84-8	133.1	6.118
2	L-苏氨酸	Thr	72-19-5	119.1	7.844
3	L-丝氨酸	Ser	56-45-1	105.1	8.584
4	L-谷氨酸	Glu	56-86-0	147.1	9.688
5	L-脯氨酸	Pro	147-85-3	115.1	11.015
6	甘氨酸	Gly	56-40-6	75.1	15.077
7	L-丙氨酸	Ala	56-41-7	89.1	16.204
8	L-胱氨酸	Cys	56-89-3	240.3	17.79
9	L-缬氨酸	Val	72-18-4	117.2	18.611
10	L-蛋氨酸	Met	63-68-3	149.2	19.675
11	L-异亮氨酸	Ile	73-32-5	131.2	21.551
12	L-亮氨酸	Leu	61-90-5	131.2	22.238
13	L-酪氨酸	Tyr	60-18-4	181.2	23.903
14	L-苯丙氨酸	Phe	63-91-2	165.2	25.018
15	L-组氨酸	His	71-00-1	155.2	26.358
16	L-赖氨酸	Lys	56-87-1	146.2	27.651
17	L-精氨酸	Arg	74-79-3	174.2	31.086



17 种氨基酸标准溶液图谱 (100 nmol/mL)

岛津应用云

