

上海洪纪仪器设备有限公司

食物中氨基酸的测定方法

测定食物中的胱氨酸使用过甲酸氧化-氨基酸自动分析法，测定色氨酸使用荧光分光光度法，测定其它氨基酸使用氨基酸自动分析法。

一、氨基酸自动分析法

1.原理

食物蛋白质经盐酸水解成为游离氨基酸，经氨基酸分析仪的离子交换柱分离后，与茚三酮溶液产生颜色反应，再通过分光光度计比色测定氨基酸含量。一份水解液可同时测定天冬，苏，丝，谷，脯，甘，丙，缬，蛋，异亮，亮，酪，苯丙，组，赖和精氨酸等 16 种氨基酸，其最低检出限为 10 μ mol。

2.适用范围

GB/T14965-1994 食物中氨基酸的测定方法。

本法适用于食物中的 16 种氨基酸的测定。其最低检出限为 10 μ mol。本方法不适用于蛋白质含量低的水果、蔬菜、饮料和淀粉类食物的测定

3.仪器和设备

3.1 真空泵

3.2 恒温干燥箱

3.3 水解管：耐压螺盖玻璃管或硬质玻璃管，体积 20~30ml。用去离子水冲洗干净并烘干。

3.4 真空干燥器（温度可调节）

3.5 氨基酸自动分析仪。

4.试剂

全部试剂除注明外均为分析纯，实验用水为去离子水。

4.1 浓盐酸：优级纯

4.2 6mol/L 盐酸：浓盐酸与水 1：1 混合而成。

4.3 苯酚：需重蒸馏。

4.4 混合氨基酸标准液（仪器制造公司出售）：0.0025mol/L

4.5 缓冲液：

4.5.1 pH2.2 的柠檬酸钠缓冲液：称取 19.6g 柠檬酸钠（Na₃C₆H₅O₇·2H₂O）和 16.5ml 浓盐酸加水稀释到 1000ml，用浓盐酸或 50%的氢氧化钠溶液调节 pH 至 2.2

4.5.2 pH3.3 的柠檬酸钠缓冲液：称取 19.6g 柠檬酸钠和 12ml 浓盐酸加水稀释到 1000ml，用浓盐酸或 50%的氢氧化钠溶液调节至 pH 至 3.3。

4.5.3 pH4.0 的柠檬酸钠缓冲液：称取 19.6g 柠檬酸钠和 9ml 浓盐酸加水稀释到 1000ml，用浓盐酸或 50%的氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.0。

4.5.4 pH6.4 的柠檬酸钠缓冲液：称取 19.6g 柠檬酸钠和 46.8g 氯化钠（优级纯）加水稀释到 1000ml，用浓盐酸或 50%的氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.4。

4.6 茚三酮溶液

4.6.1 pH5.2 的乙酸锂溶液：称取氢氧化锂（LiOH·H₂O）168g，加入冰乙酸（优级纯）279ml，加水稀释到 1000ml，用浓盐酸或 50%的氢氧化钠调节 pH 至 5.2。

4.6.2 茚三酮溶液：取 150ml 二甲基亚砜（C₂H₆OS）和乙酸锂溶液（2.6.1）50ml 加入 4g 水合茚三酮（C₉H₄O₃·H₂O）和 0.12g 还原茚三酮（C₁₈H₁₀O₆·2H₂O）搅拌至完全溶解。

4.7 高纯氮气：纯度 99.99%。

4.8 冷冻剂：市售食盐与冰按 1：3 混合

5.操作步骤

5.1 样品处理：样品采集后用匀浆机打成匀浆（或者将样品尽量粉碎）于低温冰箱中冷冻保存，分析用时将其解冻后使用。

上海洪纪仪器设备有限公司

5.2 称样：准确称取一定量样品，精确到 0.0001g。均匀性好的样品如奶粉等，使样品蛋白质含量在 10~20mg 范围内；均匀性差的样品如鲜肉等，为减少误差可适当增大称样量，测定前再稀释。将称好的样品防于水解管中。

5.3 水解：在水解管内加 6mol/L 盐酸 10~15ml（视样品蛋白质含量而定），含水量高的样品（如牛奶）可加入等体积的浓盐酸，加入新蒸馏的苯酚 3~4 滴，再将水解管放入冷冻剂中，冷冻 3~5min，再接到真空泵的抽气管上，抽真空（接近 0psi），然后充入高纯氮气；再抽真空充氮气，重复三次后，在充氮气状态下封口或拧紧螺丝盖将已封口的水解管放在 110±1℃ 的恒温干燥箱内，水解 22h 后，取出冷却。

打开水解管，将水解液过滤后，用去离子水多次冲洗水解管，将水解液全部转移到 50ml 容量瓶内，用去离子水定容。吸取滤液 1ml 于 5ml 容量瓶内，用真空干燥器在 40~50℃ 干燥，残留物用 1~2ml 水溶解，再干燥，反复进行两次，最后蒸干，用 1ml pH2.2 的缓冲液溶解，供仪器测定用。

5.4 测定：准确吸取 0.200ml 混合氨基酸标准，用 pH2.2 的缓冲液稀释到 5ml，此标准稀释浓度为 5.00nmol/50μL，作为上机测定用的氨基酸标准，用氨基酸自动分析仪以外标法测定样品测定液的氨基酸含量。

6. 计算

上机样品液（50mL）中氨基酸量（nmol）=

上机标准液（50mL）中氨基酸量（nmol）× 样品峰面积
氨基酸标准峰面积

所以，100g 样品中氨基酸的 mg 数=

上机样品液中氨基酸量（nmol）× f × Mr × 100
m × V × 10⁶

式中

f--样品的稀释倍数

Mr--氨基酸的相对分子量

m--样品质量（g）

V--上机时的进样量（此处为 50mL）

7. 其他

7.1 测定条件（以 Beckman-6300 型氨基酸自动分析仪为例）

缓冲液流量：20mL/h；

茚三酮流量：10mL/h；

柱温：50、60 和 70℃；

色谱柱：20cm；

分析时间：42min。

7.2 标准出峰顺序和保留时间

序号 出峰顺序 保留时间/min 序号 出峰顺序 保留时间/min

1 天冬氨酸 5.55 9 蛋氨酸 19.63

2 苏氨酸 6.60 10 异亮氨酸 21.24

3 丝氨酸 7.09 11 亮氨酸 22.06

4 谷氨酸 8.72 12 酪氨酸 24.52

5 脯氨酸 9.63 13 苯丙氨酸 25.76

6 甘氨酸 12.24 14 组氨酸 30.41

上海洪纪仪器设备有限公司

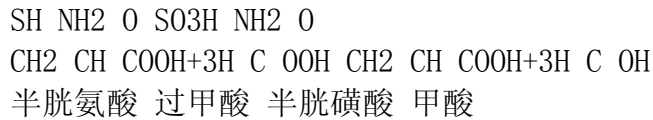
- 7 丙氨酸 13.10 15 赖氨酸 32.57
8 缬氨酸 16.65 16 精氨酸 40.75

7.3 允许差：同实验室平行测定或连续两次测定结果相对偏差绝对值 $\leq 12\%$ 。

二、食物中胱氨酸的测定方法——氨基酸自动分析仪法（过甲酸氧化）

1. 原理

在用盐酸水解蛋白质的过程中，胱氨酸易被破坏，现多采用过甲酸氧化法将蛋白质中的胱氨酸及半胱氨酸氧化成半胱磺酸，其反应如下：



生成的半胱磺酸可在氨基酸自动分析仪上进行测定，与标准半胱磺酸比较，计算其含量。

2. 适用范围

参照中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编写的食物营养成分测定法第三版。适用于食物中胱氨酸的测定。

3. 仪器

水解瓶：耐压螺盖玻璃管或硬质试管，体积 20~30mL，用去离子水冲净并烘干，电热减压蒸发器。

4. 试剂

过甲酸：取 9mL 分析纯甲酸加入 1mL 30% 过氧化氢混合，在室温放置 2 小时以上。

5. 操作步骤

5.1 过甲酸氧化：称取一定量的食物样品置于水解瓶中，使样品含蛋白质在 5~10mg，加入 1mL 过甲酸试剂，在室温放置 3 小时。加 1mL 乙醇终止氧化。将样品瓶置于电热减压器中，于 45℃ 减压蒸干，用 1mL 去离子水淋洗瓶壁，再蒸干，反复 3 次，以除去过甲酸。

5.2 盐酸水解：同食物中氨基酸（16 种）测定方法

5.3 在 Bekman6300 氨基酸自动分析仪上，在注文 50℃ 时用 pH3.25 柠檬酸缓冲液洗脱，半胱磺酸的出峰时间约在 1.78 分钟。

6. 计算

上机样品液（50 μ l）中半胱磺酸量 =
上机标准液中半胱磺酸量（nmol） \times 样品峰面积
半胱磺酸标准峰面积

100g 样品中胱氨酸 mg 数 =
上机样品中半胱磺酸量（nmol） \times D \times M \times 100
W \times E \times 106 \times 2

式中

D: 样品稀释倍数

M: 胱氨酸分子量（ng）

上海洪纪仪器设备有限公司

W: 称样量 (g)

E: 上机时的进样量 (此处为 $50 \mu\text{l}$)

三、食物中色氨酸的测定—荧光分光光度法

1. 原理

食物中蛋白质在酸水解过程中, 其色氨酸极易被分解, 本法用碱水解蛋白质, 直接测定色氨酸的天然荧光。在蛋白质水解液中, 只有色氨酸和酪氨酸可以检测到荧光。在 pH 为 11 时, 色氨酸的荧光强度比酪氨酸大 100 倍, 且两种氨基酸的荧光峰相差 40 多 nm, 利用此特点, 可在有大量酪氨酸的存在下, 检测色氨酸的含量。

2. 适用范围

参照中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编写的食物营养成分测定法第三版。适用于食物中色氨酸的测定。

3. 仪器

3.1 荧光分光光度计

3.2 减压蒸发器

3.3 螺旋盖大口瓶 (瓶盖要有橡皮垫)

3.4 聚四氟乙烯管

3.5 小玻璃球

3.6 烘箱

4. 试剂

(1) 5mol/L NaOH: 内含 0.5%可溶性淀粉, 临用前配制。

(2) 4mol/L 尿素 (pH=11)

(3) 6mol/L 盐酸

(4) 溴百里酚蓝指示剂: 称取 0.1g 溴百里酚蓝加 0.1mol/L 氢氧化钠 1.6ml, 配成 0.05%水溶液。

(5) 高纯氮 (含量 99.999%)

(6) 辛醇甲苯溶液: 内含 1%辛醇

(7) 色氨酸标准液: (1mg/ml): 称取色氨酸标准, 用 0.005mol/L 的氢氧化钠溶液溶解, 贮存于冰箱保存。

5. 操作步骤

5.1 称取含粗蛋白质约 5mg 的食物样品, 置于聚四氟乙烯管中, 加含可溶性淀粉的 5mol/L 氢氧化钠 1ml, 加入 1 滴辛醇。

5.2 将各管分别盖上小玻璃球, 放入 1 只带螺旋盖的大口玻璃瓶中, 将瓶置于减压蒸发装置中, 加冰和盐降温, 减压至真空度 1.3Kpa10mmHg 以下, 继续保持 15min, 充氮气再减压, 如此反复 3 次, 迅速旋紧大口瓶的螺旋盖。

5.3 将充氮气的大口瓶置于烤箱内, 在 110°C 水解样品 22 小时。

5.4 冷却大口瓶, 用重蒸馏水将样品分别洗至 25ml 容量瓶中, (内含 6N Hcl 0.7ml) 用溴百里酚蓝为指示剂调 pH 至中性, 用重蒸水定容至刻度。

5.5 吸取样品液 1ml, 于 10ml 带盖试管内, 用 pH11 的 4mol/L 尿素溶液稀释至刻度, 在激发波长为 280nm, 发射波长为 360nm 下测定荧光强度, 根据标准色氨酸的荧光强度曲线, 计算样品中色氨酸含量。

5.6 色氨酸标准曲线: 用前将标准贮备液稀释成每 ml 含 100, 200, 300, $400 \mu\text{g}$ 的色氨酸标准系列。取每种浓度的标准液各 1ml (双份) 与样品管同样加试剂, 同时水解, 以色氨酸标准浓度为横坐标, 荧光强度为纵坐标绘制标准曲线。

上海洪纪仪器设备有限公司

6. 计算

每 100g 样品中的色氨酸含量 (mg) =

$A \times D \times 100$

$1000 \times W$

式中

A: 根据标准曲线得到的每 ml 测定液中色氨酸的含量 (mg)

D: 稀释倍数

W: 取样量 (克)