

## 食品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之檢驗方法

### Method of Test for Free Amino Acids, Glucosamine and Taurine in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中丙胺酸(Alanine)等20品項游離胺基酸、葡萄糖胺(Glucosamine)及牛磺酸(Taurine)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph)分析之方法。
  - 2.1. 裝置：
    - 2.1.1. 高效液相層析儀：
      - 2.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(Photodiode array detector)。
      - 2.1.1.2. 層析管：Poroshell HPH-C18，2.7  $\mu\text{m}$ ，內徑3.0 mm  $\times$  10 cm，或同級品。
    - 2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
    - 2.1.3. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
    - 2.1.4. 酸鹼度計(pH meter)。
  - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；硼酸、磷酸二氫鈉( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、鄰苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde)、3-硫醇丙酸(3-mercaptopropionic acid)、9-芴甲基氯甲酸酯(9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride)、氫氧化鈉、鹽酸均採用試藥級；去離子水(比電阻於25 $^{\circ}\text{C}$ 可達18  $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$  以上)；丙胺酸等對照用標準品共22項(品項見附表)。
  - 2.3. 器具及材料：
    - 2.3.1. 容量瓶：10 mL、25 mL及100 mL。
    - 2.3.2. 離心管：50 mL，PP材質。
    - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22  $\mu\text{m}$ ，PVDF材質。
  - 2.4. 試劑之調製：
    - 2.4.1. 50%氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉50 g，以去離子水溶解使成100 mL。
    - 2.4.2. 0.4 M硼酸緩衝液：

稱取硼酸2.47 g，以去離子水溶解使成100 mL，再以50%氫氧化鈉溶液調整pH值至10.2。
    - 2.4.3. 衍生化試劑：
      - 2.4.3.1. 鄰苯二甲醛溶液：

稱取鄰苯二甲醛100 mg，以0.4 M硼酸緩衝液9 mL溶解，加入3-硫醇丙酸20  $\mu\text{L}$ ，再加0.4 M硼酸緩衝液使成10 mL<sup>(註)</sup>。

2.4.3.2. 9-芴甲基氯甲酸酯溶液：

稱取9-芴甲基氯甲酸酯25 mg，以乙腈溶解使成10 mL<sup>(註)</sup>。

註：衍生化試劑充填氮氣，可冷藏儲存2週。

2.4.4. 1 N鹽酸溶液：

取去離子水900 mL，緩緩加入鹽酸83.3 mL，再加去離子水使成1000 mL。

2.4.5. 0.1 N鹽酸溶液：

取1 N鹽酸溶液100 mL，加去離子水使成1000 mL。

2.5. 移動相溶液之調製：

2.5.1. 移動相溶液A：

稱取磷酸二氫鈉5.5 g，以去離子水溶解使成1000 mL，再以50%氫氧化鈉溶液調整pH值至7.8，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

2.5.2. 移動相溶液B：

取乙腈450 mL，加入甲醇450 mL及去離子水100 mL，混合均勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2.6. 標準溶液之配製：

取丙胺酸等對照用標準品各約37.5 mg，精確稱定，分別以1 N鹽酸溶液溶解並定容至10 mL，作為標準原液<sup>(註)</sup>。臨用時取適量各標準原液混合，以0.1 N鹽酸溶液稀釋至1.5~150 µg/mL，供作標準溶液。

註：天冬醯胺酸、麩醯胺酸及二胺基己酸標準原液均應新鮮配製。

2.7. 衍生化標準溶液之配製：

取標準溶液各20 µL，加入0.4 M硼酸緩衝液100 µL，混合均勻，加入鄰苯二甲醛溶液20 µL，旋渦混合60秒，加入9-芴甲基氯甲酸酯溶液20 µL，旋渦混合30秒，加入去離子水1280 µL，混合均勻，供作衍生化標準溶液<sup>(註)</sup>。

註：衍生化反應後，應儘快進行儀器分析。

2.8. 檢液之調製：

檢體經均質混勻後，取約0.5 g，精確稱定，加入0.1 N鹽酸溶液20 mL，以超音波振盪10分鐘，再以0.1 N鹽酸溶液定容至25 mL<sup>(註)</sup>，經濾膜過濾後，取濾液20 µL，加入0.4 M硼酸緩衝液100 µL，混合均勻，以下步驟同2.7.節，供作檢液。

註：檢體中待測物質濃度較高時，應以1 N鹽酸溶液定容，再以0.1 N鹽酸溶液稀釋。

## 2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及衍生化標準溶液各10 μL，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各游離胺基酸、葡萄糖胺或牛磺酸之含量(mg/100 g)：

$$\text{檢體中各游離胺基酸、葡萄糖胺或牛磺酸之含量(mg/100 g)} = \frac{C \times V}{M \times 10}$$

C：由標準曲線求得檢液中各游離胺基酸、葡萄糖胺或牛磺酸之濃度(μg/mL)

V：檢體最後定容之體積(25 mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

高效液相層析測定條件<sup>(註)</sup>：

檢出器：光二極體陣列檢出器。

定量波長：如附表。

層析管：Poroshell HPH-C18，2.7 μm，內徑3.0 mm × 10 cm。

層析管溫度：40°C。

樣品槽溫度：10°C。

注入量：10 μL。

移動相溶液及流速：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	流速(mL/min)	A (%)	B (%)
0 → 0.5	0.5 → 0.5	93 → 93	7 → 7
0.5 → 5	0.5 → 0.45	93 → 75	7 → 25
5 → 7	0.45 → 0.3	75 → 72	25 → 28
7 → 12	0.3 → 0.4	72 → 54	28 → 46
12 → 13	0.4 → 0.45	54 → 0	46 → 100
13 → 16	0.45 → 0.5	0 → 0	100 → 100
16 → 16.1	0.5 → 0.5	0 → 93	100 → 7
16.1 → 20	0.5 → 0.5	93 → 93	7 → 7

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

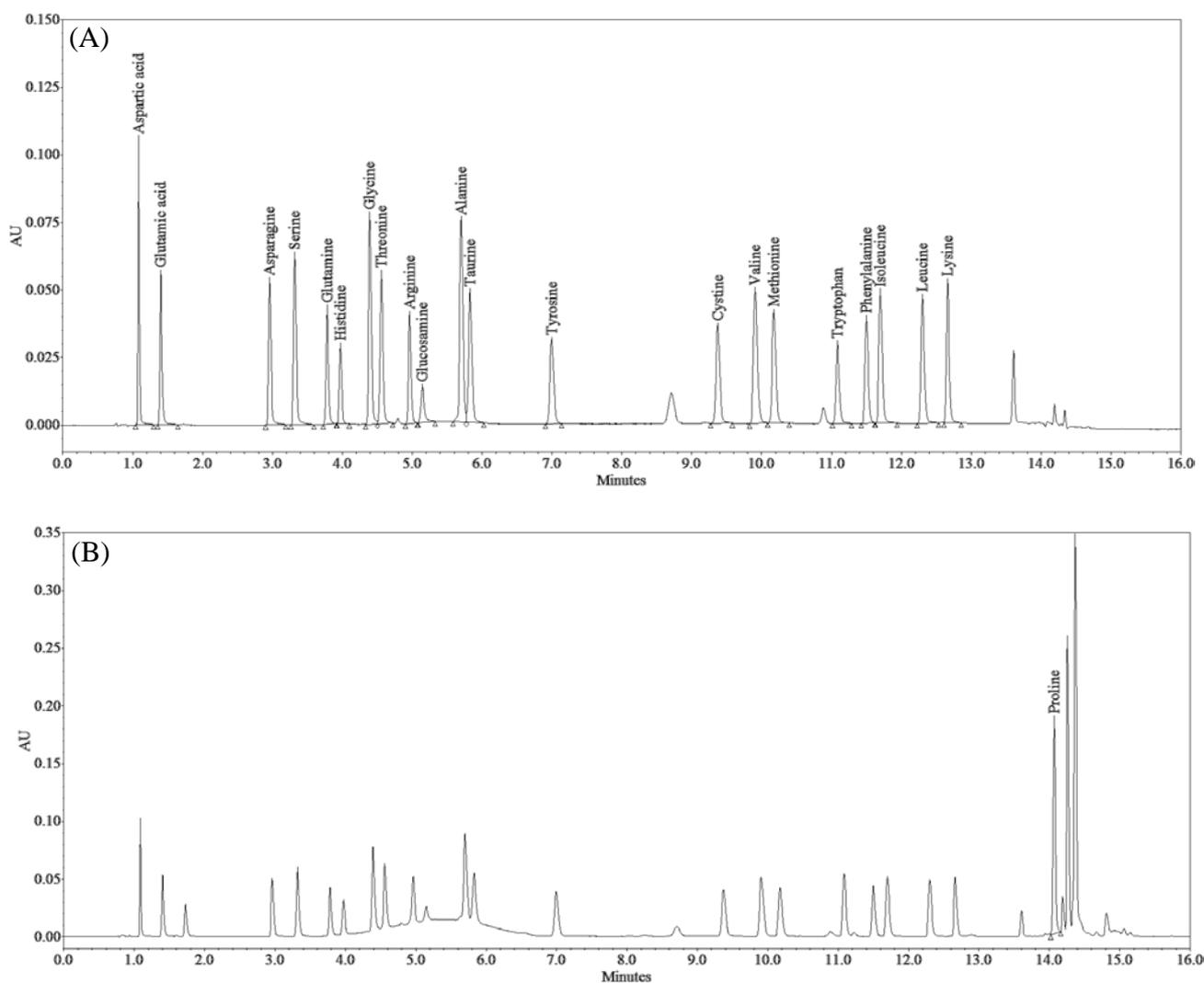
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，各游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸均為7.5 mg/100 g。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

1. Bartolomeo, M. P. and Maisano, F. 2006. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *J. Biomol. Tech.* 17: 131-137.
2. Molnár-Perl, I. 2001. Derivation and chromatographic behavior of the *o*-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *J. Chromatogr. A* 913: 283-302.

參考層析圖譜



圖、丙胺酸等20品項游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸標準品於波長338 nm (A) 及波長262 nm (B)之HPLC圖譜

附表、丙胺酸等20項游離胺基酸、牛磺酸或葡萄糖胺之定量波長

項次	分析物		定量波長 (nm)
	中文名	英文名	
1	丙胺酸	Alanine	338
2	精胺酸	Arginine	338
3	天冬醯胺酸	Asparagine	338
4	天冬胺酸	Aspartic acid	338
5	胱胺酸	Cystine	338
6	麩醯胺酸	Glutamine	338
7	麩酸	Glutamic acid	338
8	胺基乙酸	Glycine	338
9	組胺酸	Histidine	338
10	異白胺酸	Isoleucine	338
11	白胺酸	Leucine	338
12	二胺基己酸	Lysine	338
13	蛋胺酸	Methionine	338
14	苯丙胺酸	Phenylalanine	338
15	脯胺酸	Proline	262
16	絲胺酸	Serine	338
17	羥丁胺酸	Threonine	338
18	色胺酸	Tryptophan	338
19	酪胺酸	Tyrosine	338
20	$\alpha$ 胺基異戊酸	Valine	338
21	葡萄糖胺	Glucosamine	338
22	牛磺酸	Taurine	338