

食品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸同步分析方法 之建立暨市售產品小型抽測結果

侯嘉華 吳白玟 廖家鼎 高雅敏 王德原 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

胺基酸是構成蛋白質的基本單位，依結合基團差異約有20種常見胺基酸。凱氏氮粗蛋白檢測儀可檢測總含氮量並推估總蛋白質含量，惟現行產品種類及型態眾多，胺基酸種類及含量差異大，致含氮係數判斷困難，又機能性食品常添加葡萄糖胺及牛磺酸，易造成分析干擾，各界使用分析方法立論基礎時有差異，爰擬建立食品中胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之同步分析方法，以利各界參考使用。本研究顯示檢液經柱前衍生化後，以Agilent Poroshell HPH-C18 (3.0 × 100 mm, 2.7 μm)管柱搭配光二極體陣列檢出器進行分析，可於15分鐘內分離20種胺基酸及葡萄糖胺與牛磺酸等化合物。以所建立之檢驗方法抽測市售產品共計16件，產品基質囊括液狀(含乳水)、粉狀(含乳粉)、膠囊狀(含油狀基質軟膠囊)及錠狀(含發泡錠)，檢驗結果顯示有2件產品未達標示值之80%，檢測項目分別為精胺酸及葡萄糖胺，其餘產品檢測值均達標示值80%以上，本次市售產品抽測標示符合程度達87.5%，顯示此批食品之製造業者於此類產品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之自願性標示成分管措施良好。

關鍵詞：胺基酸、葡萄糖胺、牛磺酸、光二極體陣列檢出器

前言

胺基酸是構成蛋白質的基本單位，其構造依結合基團有所差異，常見的胺基酸有20種，一般申請為健康食品功效成分之胺基酸為丙胺酸(Alanine)、精胺酸(Arginine)、胺基乙酸(Glycine)、異白胺酸(Isoleucine)、白胺酸(Leucine)及α胺基異戊酸(Valine)等6種，保健功效有抗疲勞及護肝功能等2種。凱氏氮粗蛋白檢測儀可檢測總含氮量並推估總蛋白質含量，惟現行產品種類及型態眾多，胺基酸種類及含量差異大，致含氮係數判斷困難，又機能性食品常添加葡萄糖胺及牛磺酸，易造成分析

干擾。依衛生福利部食品藥物管理署「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」⁽¹⁾現行規範，胺基酸屬於營養補充劑之食品添加物，可用於補充食品中營養素不足而額外適量添加之物質。

牛磺酸(Taurine，又稱2-氨基乙磺酸)廣泛分布於動物組織中，是哺乳類動物中含硫胺基酸的最終代謝物，且帶有胺基的磺酸，而哺乳類動物體內的含硫物質在研究中被認為是具有許多生理功能，例如：保護細胞膜(Membrane protection)、排毒(Detoxification)及抗氧化等功能⁽²⁾。Corte等人(1990)指出牛磺酸可能藉由抑制興奮性神經傳導物質產生，如抑制天冬胺酸

(Aspartate)或麩胺酸(Glutamate)等胺基酸引起產生 γ -胺基丁酸(γ -Aminobutyric acid, GABA)等神經傳導物質之功能⁽³⁾。依衛生福利部食品藥物管理署「食品添加物使用範圍及限量暨規格標準」⁽¹⁾現行規範，牛磺酸屬於營養補充劑之食品添加物，可用於補充食品中營養素不足而額外適量添加之物質。

葡萄糖胺(Glucosamine, 又稱胺基葡萄糖)是一種單醣胺類物質(Aminomonosaccharide), 可在人體或動物體內以胺化葡萄糖之內生性生物合成(Biosynthesized endogenously)方式產生, 其聚合結構可依連結狀況不同而為幾丁聚醣(Chitosan)、黏多醣(Mucopolysaccharides)、蛋白聚醣(Proteoglycans)及醣蛋白(Glycoproteins)等物質。葡萄糖胺是合成關節軟骨(Articular cartilage)及關節液(Synovial fluid)之中間物質(Intermediate substrate), 亦具有抗關節炎(Anti-arthritis)及抗發炎(Anti-inflammatory)等作用⁽⁴⁾。依現行衛生福利部食品藥物管理署之管理方式, 不含鹽類之葡萄糖胺或葡萄糖胺鹽酸鹽均以食品管理。經「可供食品使用原料彙整一覽表」⁽⁵⁾表列者屬非傳統食品原料, 故其來源僅限於表列中所述「微生物及其來源製取之原料(由*Aspergillus niger*來源之幾丁質製成)」或「海洋動物、水產類、爬蟲類及其來源製取之原料」。

國人健康意識普及, 食品業者投入相關資源於發展保健食品或健康食品中, 以提升自身產品價值並提供消費者更多元化的選擇, 游離胺基酸(Amino acids)、葡萄糖胺及牛磺酸均屬常見添加於部分液態及固態產品之機能性成分。

材料與方法

一、檢驗方法

採用食品藥物管理署「食品中游離

胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之檢驗方法(TFDAA0060.00)」建議檢驗方法。

二、檢體來源及項目

106年間購買自臺北市之超市及藥粧店之市售包裝食品, 包含粉狀檢體6件、液態檢體3件、錠狀檢體3件及膠囊狀檢體4件, 共計檢體16件, 檢測26項。

三、儀器設備

使用高效液相層析儀含光二極體陣列檢出器, 層析管柱使用Agilent Poroshell HPH-C18, 2.7 μm , 內徑3.0 mm \times 10 cm (Acquity UPLC, Waters Co., Milford, MA, USA)。

四、試藥、試劑及對照用標準品

(一)試藥

硼酸(Boric acid)、鄰苯二甲醛(*o*-Phthalaldehyde, OPA)、磷酸二氫鈉(Sodium dihydrogen phosphate monohydrate)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide, NaOH)及9-芴基甲基氯甲酸酯(9-Fluorenylmethyl chloroformate, FMOC-Cl)均採用試藥級(Sigma-Aldrich, USA)。

(二)試劑

甲醇(Methanol, MeOH)及乙腈(Acetonitrile, ACN)均採用HPLC級(J. T. Backer, USA); 鹽酸(Hydrochloric acid, HCl)及3-巯基丙酸(3-Mercaptopropionic acid, 3-MPA)均採用試藥級(Sigma-Aldrich, USA)。

(三)對照用標準品

丙胺酸(Alanine, 98.5%)、精胺酸(Arginine, 98.5%)、天冬胺酸(Aspartic acid, 98.0%)、天冬醯胺酸(Asparagine, 100.0%)、胱胺酸(Cystine, 100.0%)、麩胺酸(Glutamic acid, 100.0%)、麩醯胺酸(Glutamine, 99.0%)、

胺基乙酸(Glycine, 99.0%)、組胺酸(Histidine, 99.6%)、異白胺酸(Isoleucine, 98.0%)、白胺酸(Leucine, 98.0%)、二胺基乙酸(Lysine, 98.0%)、蛋胺酸(Methionine, 100.0%)、苯丙胺酸(Phenylalanine, 98.0%)、脯胺酸(Proline, 99.0%)、絲胺酸(Serine, 99.0%)、羥丁胺酸(Threonine, 98.0%)、色胺酸(Tryptophan, 100.2%)、酪胺酸(Tyrosine, 99.8%)、 α 胺基異戊酸(Valine, 98.0%) (Sigma-Aldrich, USA)；葡萄糖胺鹽酸鹽(Glucosamine hydrochloride, 99.7%)及牛磺酸(Taurine, 100.0%)等對照用標準品(USP)。

五、實驗步驟

(一)移動相溶液之調製

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. 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。

3. 移動相溶液及流速

如表一所示。

(二)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^(註1)。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 μ g/mL，供作標準溶液。

(三)衍生化標準溶液之配製

取標準溶液各20 μ L，加入0.4 M硼酸緩衝液100 μ L，混合均勻，加入鄰苯二甲醯溶液20 μ L，旋渦混合60秒，加入9-芴甲基氯甲酸酯溶液20 μ L，旋渦混合30秒，加

表一、移動相溶液及流速

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

入去離子水1280 μ L，混合均勻，供作衍生化標準溶液，衍生化反應後，應儘快進行儀器分析。

(四)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^(註2)，經濾膜過濾後，取濾液20 μ L，加入0.4 M硼酸緩衝液100 μ L，混合均勻，以下步驟同第五、(三)節，供作檢液。

註1：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。

註2：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。

六、檢驗結果標示符合性之評估

16件產品之標示濃度範圍廣泛，可簡單區分為小於或等於0.075 mg/g者1件、大於0.075 - 7.5 mg/g者11件、大於7.5 - 100 mg/g者10件及大於100 mg/g者4件(表二)。

結果與討論

依據衛生福利部公告之「包裝食品營養標示應遵行事項」⁽⁶⁾之附表四-營養標示值誤差允

表二、市售產品小型抽測結果

編號	產品型態	標示項目	檢測值	標示值	符合率(%) ^(a)
1	液態	葡萄糖胺鹽酸鹽	1846 mg/30 mL	2000 mg/30 mL	92
		牛磺酸	356 mg/30 mL	350 mg/30 mL	102
2	液態	牛磺酸	19.9 mg/237 mL	17.1 mg/237 mL	117
3	液態	精胺酸	10.5 mg/75 mL	450 mg/75 mL	2.3 ^(b)
		葡萄糖胺	64.5 mg/75 mL	60 mg/75 mL	107
4	粉狀	α 胺基異戊酸	54.0 mg/24 g	45 mg/24 g	120
		異白胺酸	49.3 mg/24 g	45 mg/24 g	110
		白胺酸	98.3 mg/24 g	90 mg/24 g	109
5	粉狀	麩醯胺酸	1317 mg/20 g	1420 mg/20 g	93
		α 胺基異戊酸	627 mg/20 g	720 mg/20 g	87
		異白胺酸	576 mg/20 g	700 mg/20 g	82
		白胺酸	1155 mg/20 g	1395 mg/20 g	83
6	乳粉	牛磺酸	50 mg/100 g	27.8 mg/100 g	180
7	乳粉	葡萄糖胺	967 mg/100 g	840 mg/100 g	115
8	乳粉	葡萄糖胺	1875 mg/100 g	1600 mg/100 g	117
9	乳粉	素葡萄糖胺	17.4 mg/100 g	30 mg/100 g	58
		牛磺酸	40.7 mg/100 g	45 mg/100 g	90
10	膠囊	精胺酸	418 mg/粒	435 mg/粒	96
11	膠囊	牛磺酸	9.8 mg/0.285 g	10 mg/0.285 g	98
12	膠囊	牛磺酸	7.2 mg/粒	2.5 mg/粒	289
13	膠囊	色胺酸	293 mg/0.54 g	250 mg/0.54 g	117
14	錠狀	α 胺基異戊酸	12.2 mg/2 g	15 mg/2 g	82
		異白胺酸	12.6 mg/2 g	15 mg/2 g	84
		白胺酸	32.3 mg/2 g	30 mg/2 g	108
15	錠狀	葡萄糖胺鹽酸鹽	303 mg/1.2 g	375 mg/1.2 g	81
16	錠狀	牛磺酸	464 mg/2.8 g	500 mg/2.8 g	93

^a符合率=檢測值÷標示值×100%

^b經酸水解條件處理後，標示符合率為110%

許範圍，胺基酸及其他自願標示之營養素誤差允許範圍應大於或等於標示值之80%，本次抽測檢驗結果顯示有2件產品未達80%標示值，檢測項目為精胺酸及葡萄糖胺，前者檢測值僅為標示值之2.3%，後者為58%，其餘產品標示值符合程度介於81 - 289% (表二)。標示值符合程度達289%產品中牛磺酸含量偏高情形，推

測其貢獻源除添加的牛磺酸外，可能包括該產品使用的內臟萃取物所致。以此法檢測16件市售包裝食品，其標示符合率達87.5%，顯示此批食品之製造業者於此類產品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之自願性標示成分管控良好。

在本研究中曾提及胺基酸是構成蛋白質

之基本單位，為釐清本次檢測中2件產品之標示值符合程度僅為2.3及58%狀況，嘗試將蛋白質水解成胺基酸型態後再進行檢測。以奶粉基質之標準參考物質(standard reference material, SRM) 1849a及該市售產品進行微波消化試驗，使蛋白質分解為胺基酸後再進行檢測。微波消化試驗係檢體經均質混勻後，取約0.5 g，精確稱定，加入含0.2%色胺之4 M 甲磺酸溶液10 mL，充氮氣10秒，以全自動超高壓微波反應釜進行微波消化，於功率900 W下10分鐘內升溫至155°C再維持30分鐘。消化完成並冷卻後，加入0.1 N鹽酸溶液10 mL，以超音波振盪10分鐘，再以0.1 N鹽酸溶液定容至25 mL，經濾膜過濾後，後續衍生化步驟同第五、(三)節。結果顯示，以此條件酸水解蛋白質後，SRM 1849a之精胺酸標示符合程度為102.8%，而抽測樣品之精胺酸標示值符合程度達110%，亦顯示部分產品標示含量係加總蛋白質中胺基酸。所以，即使產品標示顯見添加游離胺基酸，當產品檢測後未達80%標示值時，可進一步探討水解胺基酸之貢獻可能性，其他機能性成分亦可考量其聚合型態物質之影響，如甲殼素等物質。本次市售調查其中一產品之自願性標示名稱為素葡萄糖胺，臆測業者意指其來源為素食原料，例如以玉米為原料，經發酵及萃取製得該等成分。而幾丁質(Chitin)為幾丁聚醣之衍生物，亦為葡萄糖胺之乙醯化聚合體，其分子為N-乙醯基葡萄糖胺(N-acetylglucosamine)與葡萄糖胺不盡相同，必須經去乙醯化(Deacetylation)才得以使N-乙醯基葡萄糖胺轉變為葡萄糖胺。惟食品包裝標示應以所用原料名稱作為標示品項較妥，以避免混淆消費者，故將本次檢測中標示值符合程度僅為2.3及58%之產品均先視為未符合標示值。

傳統水解蛋白質檢測有分為酸水解法及鹼水解法，以因應特定胺基酸於鹽酸加熱下易裂解情形，而酸水解加熱時間長達24小時，未來期能開發僅以酸水解法即可完成蛋白質分解作

用，降低水解流程所需時間，以縮減耗費之人力及時間。

參考文獻

1. 衛生福利部。2017。食品添加物使用範圍及限量暨規格標準。107.06.19衛授食字第1071301483號令修正。[<http://consumer.fda.gov.tw/Law/FoodAdditivesList.aspx?nodeID=521#>]。
2. Goto, T., Tiba, K., Sakurada, Y. and Takagi, S. 2001. Determination of hepatic cysteinesulfinate decarboxylase activity in fish by means of OPA-prelabeling and reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation. *Fish. Sci.* 67: 553-555.
3. Corte, L.D., Bolam, J.P., Clarke, D.J., Parry, D.M. and *et al.* 1990. Sites of [³H] taurine uptake in the rat substantia nigra in relation to the release of taurine from the striatonigral pathway. *Eur. J. Neurosci.* 2: 50-61.
4. Huang, T.M., Cai, L., Yang, B., Zhou, M.X. and *et al.* 2006. Liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry method for the assay of glucosamine sulfate in human plasma: validation and application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 20: 251-256.
5. 食品藥物管理署。2017。可供食品使用原料彙整一覽表。[<http://consumer.fda.gov.tw/Food/Material.aspx?nodeID=160>]。
6. 衛生福利部。2014。包裝食品營養標示應遵行事項。107.03.31衛授食字第1071300530號公告修訂。[<http://consumer.fda.gov.tw/Law/Detail.aspx?nodeID=518&lawid=587&k=%u5305%u88DD%u98DF%u54C1%u71DF%u990A%u6A19%u793A%u61C9%u9075%u884C%u4E8B%u9805>]。

Simultaneously Determination of Glucosamine, Taurine, and 20 Amino Acids in Foods and the Surveillance Report

JIA-HUA HOU, PAI-WEN WU, CHIA-DING LIAO, YA-MIN KAO,
DER-YUAN WANG AND HWEI-FANG CHEN

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Amino acids are the building blocks of proteins. There are twenty amino acids occur commonly in nature. In some functional foods or dietary supplements, glucosamine and taurine are usually accompanied with amino acids. Therefore an analytical method for simultaneous detection of 20 amino acids, glucosamine, and taurine in foods is needed. Sample extract was analyzed by high performance liquid chromatography after extraction and derivation. The analytical time was in 15 minutes achieved by using Waters ACQUITY UPLC system with an Agilent Poroshell HPH-C18 column (3.0×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$) and a photodiode array detector. A surveillance of 16 commercial samples with different matrices such as milk, milk powder, oil capsules, and effervescent tablets was conducted. The results showed the detected values in 14 samples were higher than 80% of the labeled values in their packages, which were in compliance with the regulation. However, 2 samples were found containing lower arginine and glucosamine, respectively, to their 80% of labeled values failed to meet the regulation. The pass rate was 87.5% that seemed the self-management of most manufacturing companies performed well.

Key words: amino acids, glucosamine, taurine, photodiode array