

食品中特定胺基酸檢驗方法

Method of Test for Specific Amino Acids in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於雞精等液狀食品中甘胺酸(glycine)、丙胺酸(alanine)、精胺酸(arginine)、白胺酸(leucine)、異白胺酸(isoleucine)及纈胺酸(valine)等6項特定胺基酸之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經水解及線上衍生化後，以高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)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：光電二極體陣列檢出器(photodiode detector)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Poroshell HPH-C18, 2.7 μm , 內徑3.0 mm \times 10 cm, 或同級品。
 - 2.1.2. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.1.5. 乾式恆溫槽(Dry bath)
 - 2.2. 試藥：甲醇及乙腈均採用液相層析級；硼酸、磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)、甲烷磺酸(methanesulfonic acid)、鄰苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde)、3-硫醇丙酸(3-mercaptopropionic acid)、氫氧化鈉及鹽酸均採用試藥級；去離子水(比電阻於25°C可達18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ 以上)；甘胺酸、丙胺酸、精胺酸、白胺酸、異白胺酸及纈胺酸對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL及25 mL。
 - 2.3.2. 試管：15 mL，附螺蓋，玻璃材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，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硼酸緩衝溶液：

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. 鄰苯二甲醛溶液：

稱取鄰苯二甲醛100 mg，以0.4 M硼酸緩衝溶液9 mL溶解，加入3-硫醇丙酸20 µL，再加0.4 M硼酸緩衝溶液使成10 mL。

2.4.4. 1 N鹽酸溶液：

取鹽酸83.3 mL，緩緩加入去離子水900 mL中，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、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：

取甘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，冷藏儲存。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。

2.7. 檢液之調製：

將檢體混勻後，取約0.5 g，精確稱定，置於試管中，加入甲烷磺酸2.65 mL，於乾式恆溫槽中以160°C加熱45分鐘。冷卻後，移入25 mL容量瓶中，以去離子水清洗試管，洗液併入容量瓶中，再以前去離子水定容。經超音波振盪10分鐘後，以濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 鑑別試驗及含量測定：

將檢液、標準溶液、鄰苯二甲醛溶液及硼酸緩衝溶液置於高效液相層析儀之樣品槽中，依下列條件依次進行線上衍生化及液相層析。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特定胺基酸之含量(mg/100 g)：

$$\text{檢體中各特定胺基酸之含量(mg/100 g)} = \frac{C \times V}{M \times 10}$$

C：由標準曲線求得檢液中各特定胺基酸之濃度($\mu\text{g/mL}$)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

線上衍生化條件：

檢液或標準溶液之取量：2.0 μL 。

各試劑之取量如下：

試劑	取量(μL)
去離子水	0.1
鄰苯二甲醛溶液	2.0
去離子水	0.1
硼酸緩衝溶液	5.8

混合次數：10次。

高效液相層析測定條件^(註)：

光電二極體陣列檢出器：定量波長338 nm。

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

層析管溫度：40°C。

樣品槽溫度：25°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	A (%)	B (%)
0 \rightarrow 0.5	0.5 \rightarrow 0.5	93 \rightarrow 93	7 \rightarrow 7
0.5 \rightarrow 5	0.5 \rightarrow 0.45	93 \rightarrow 75	7 \rightarrow 25
5 \rightarrow 7	0.45 \rightarrow 0.3	75 \rightarrow 72	25 \rightarrow 28
7 \rightarrow 12	0.3 \rightarrow 0.4	72 \rightarrow 54	28 \rightarrow 46
12 \rightarrow 13	0.4 \rightarrow 0.45	54 \rightarrow 0	46 \rightarrow 100
13 \rightarrow 16	0.45 \rightarrow 0.5	0 \rightarrow 0	100 \rightarrow 100
16 \rightarrow 16.1	0.5 \rightarrow 0.5	0 \rightarrow 93	100 \rightarrow 7
16.1 \rightarrow 20	0.5 \rightarrow 0.5	93 \rightarrow 93	7 \rightarrow 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。

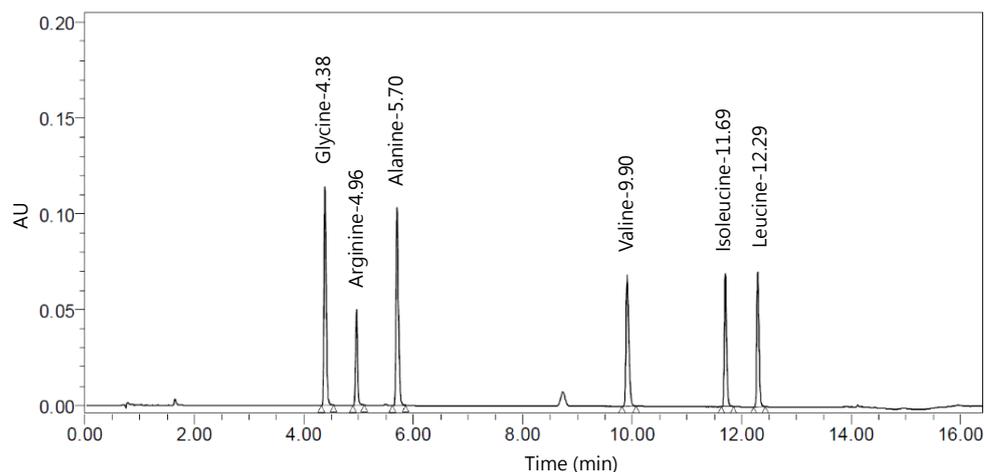
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，甘胺酸、丙胺酸、精胺酸、白胺酸、異白胺酸及纈胺酸均為7.5 mg/100 g。

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. Chiou, S. H. and Wang, K. T. 1988. Simplified protein hydrolysis with methanesulphonic acid at elevated temperature for the complete amino acid analysis of proteins. J. Chromatogr. 448: 404-410.
2. Soma, Y., Izumi, Y., Shimohira, T., Takahashi, M., Imado, Y., Tominaga, S., Tokito, K., Hata, K., Shinadama, S., Oshiro, M., Hayakawa, Y. and Bamba, T. 2022. In-needle pre-column derivatization for amino acid quantification (iPDAQ) using HPLC. Metabolites 12: 807.
3. 衛生福利部食品藥物管理署。2017。食品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之檢驗方法。106年9月7日公布。

參考層析圖譜



圖、6項特定胺基酸標準品之HPLC圖譜