

# 团 体 标 准

T/GDAQ 00002. X—2022

## 食品中含硫氨基酸的测定

Determination of sulfur amino acids in foods

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2022 - XX - XX 发布

2022 - XX - XX 实施

广东省质量协会 发布



# 目 次

|                |    |
|----------------|----|
| 前言.....        | II |
| 1 范围.....      | 3  |
| 2 规范性引用文件..... | 3  |
| 3 原理.....      | 3  |
| 4 仪器和设备.....   | 3  |
| 5 试剂和材料.....   | 3  |
| 6 样品处理.....    | 5  |
| 7 分析步骤.....    | 5  |
| 8 试验数据处理.....  | 6  |
| 9 精密度.....     | 6  |
| 10 色谱图.....    | 7  |
| 参考文献.....      | 8  |

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国科学院广州化学研究所中科检测有限公司提出。

本文件由广东省质量协会归口。

本文件起草单位：中国科学院广州化学研究所中科检测有限公司、广东省质量协会、XXX。

本文件主要起草人：

# 食品中含硫氨基酸的测定

## 1 范围

本文件规定了用氨基酸自动分析仪测定食品中含硫氨基酸的方法。

本文件适用于食品中含硫氨基酸的测定，包括胱氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸共3种氨基酸。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 原理

食品中的含硫氨基酸经氧化和水解生成游离氨基酸，经离子交换色谱法分离，与茚三酮溶液产生颜色反应，再通过可见分光光度检测，外标法定量。

## 4 仪器和设备

4.1 氨基酸自动分析仪：具备阳离子交换柱、茚三酮柱后衍生装置及570nm和440nm光度检测器。

4.2 电子天平：感量0.1 mg和0.01 mg。

4.3 旋转蒸发器：可在室温至65℃间调温，调控温度±1℃，真空度可低至 $3.3 \times 10^3$  Pa(25 mm Hg)。

4.4 恒温干燥箱：温度可达110℃±2℃。

4.5 氮吹仪。

## 5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682中规定的一级水。

### 5.1 试剂

5.1.1 盐酸：浓度≥36%。

5.1.2 甲酸：浓度为88%。

5.1.3 苯酚（C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH）。

5.1.4 氢氧化钠：优级纯。

5.1.5 过氧化氢：浓度为30%。

5.1.6 柠檬酸钠。

5.1.7 偏重亚硫酸钠。

5.1.8 柠檬酸三钠。

5.1.9 无水乙醇：色谱纯。

5.1.10 茚三酮。

5.1.11 氢溴酸：48%。

5.1.12 硫二甘醇。

## 5.2 试剂配制

5.2.1 盐酸溶液（6 mol/L）：量取盐酸（5.1.1）500 mL，用水稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.2 盐酸溶液（6.8 mol/L）：量取盐酸（5.1.1）1133 mL，用水稀释至 2000 mL，混匀。

5.2.3 过甲酸溶液 I：将过氧化氢+甲酸=1+9，混合，并按每毫升添加 5 mg 比例加入苯酚，于室温下放置 1 h，置冰水浴中冷却 30 min。临用现配。

5.2.4 过甲酸溶液 II：过甲酸溶液 I（5.2.3）中按每毫升 3 mg 比例加入硝酸银。

5.2.5 过甲酸溶液 III：过甲酸溶液 I（5.2.3）中加入适量硝酸银，每毫升添加量按式(1)计算：

$$m_r \geq 1.454 \times m \times C_N \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$m_r$  ——每毫升过甲酸中硝酸银的量，单位为毫克（mg）；

$C_N$  ——样品中氯化钠含量，%；

$m$  ——样品质量，单位为毫克（mg）。

5.2.6 氢氧化钠溶液（7.5 mol/L）：取氢氧化钠（5.1.4）30 g，加水溶解并定容至 100 mL。

5.2.7 柠檬酸钠缓冲液：称取柠檬酸三钠（5.1.8）19.6 g，用水溶解后加入盐酸（5.1.1）16.5 mL，硫二甘醇（5.1.12）5.0 mL，苯酚（5.1.3）1 g，用水定容至 1000 mL，过滤。

5.2.8 偏重亚硫酸钠溶液：量取偏重亚硫酸钠（5.1.7）33.6 g，加水溶解并定容至 100 mL。

5.2.9 洗脱用柠檬酸钠缓冲溶液：按仪器说明书配制或购买。

5.2.10 茚三酮溶液：取茚三酮（5.1.10）适量，按仪器说明书配制或购买。

5.2.11 磺基丙氨酸-蛋氨酸标准贮备液：精确称取磺基丙氨酸（纯度 $\geq$ 99.0 %）105.7 mg 和蛋氨酸（纯度 $\geq$ 99.0 %）113.3 mg，加水溶解并定容至 250 mL，浓度均为 2.50  $\mu$ mol/mL，2  $^{\circ}$ C~8  $^{\circ}$ C 保存，有效期 1 年。

5.2.12 氨基酸标准贮备液：含3种蛋白水解液分析用氨基酸（胱氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸）各组分浓度均为  $2.50 \mu\text{mol/mL}$ ，应使用有证标准溶液。

5.2.13 混合氨基酸标准工作液：吸取磺基丙氨酸-蛋氨酸标准贮备液（5.2.11）和氨基酸标准贮备液（5.2.12）各1 mL，置于50 mL的容量瓶中，加柠檬酸钠缓冲液（5.2.7）定容，混匀。有关各组分浓度均为  $50 \text{ nmol/mL}$ ， $2 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期3个月。

## 6 样品处理

平行做两份试验，称取试样  $50 \text{ mg} \sim 75 \text{ mg}$ （约含蛋白质  $7.5 \text{ mg} \sim 25 \text{ mg}$ ，精确至  $0.1 \text{ mg}$ ），置于20 mL试管中，于冰水浴中冷却30 min后加入已冷却的过甲酸溶液 I（5.2.3），如样品是浓缩液，视其氯化钠含量加过甲酸溶液 [氯化钠含量小于等于3%的加入过甲酸溶液 II（5.2.4），氯化钠含量大于3%加入过甲酸溶液 III（5.2.5）] 2 mL，加液时需将样品全部润湿，但不要摇动，盖好瓶塞，连同冰浴一道置于  $0 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，反应16 h。

以下步骤依使用不同的氧化终止剂而不同：

a) 若以氢溴酸为终止剂：于各管中加入氢溴酸0.3 mL振摇，放回冰浴，静置30 min，然后移到旋转蒸发器（4.3）上，在  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、低于  $3.3 \times 10^3 \text{ Pa}$ （25 mm Hg）下浓缩至干。用盐酸溶液（5.2.1）约15 mL将残渣定量转移到20 mL安瓿瓶或水解管中，封口或旋紧管盖，置恒温箱中， $110 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下水解22 h~24 h。取出安瓿瓶或水解管，冷却，用水将内容物定量地转移至50 mL容量瓶中，定容。充分混匀，过滤，取1 mL~2 mL滤液，置于旋转蒸发器或浓缩器中，在低于  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下，减压蒸发至干。加少许水重复蒸干2次~3次。准确加入一定体积（2 mL~5 mL）的柠檬酸钠缓冲液（5.2.7）振摇，充分溶解后离心，取上清液供仪器测定用。

b) 若以偏重亚硫酸钠为终止剂：则于样品氧化液中加入偏重亚硫酸钠溶液（5.2.8）0.5 mL，充分摇匀后，直接加入盐酸溶液（5.2.1）17.5 mL置  $110 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中水解22 h~24 h。

**警示——在水解开始时，不要封安瓿瓶瓶口，或旋动水解管的管帽，待水解1 h后再封口或旋紧管帽，否则容易引起水解管爆裂。**

取出安瓿瓶或水解管，冷却，用水将内容物转移到50 mL容量瓶中，用氢氧化钠溶液（5.2.6）中和至pH值约2.2，并用稀释上机用柠檬酸钠缓冲液（5.2.7）定容，离心，取上清液供仪器测定用。

## 7 分析步骤

使用混合氨基酸标准工作液（5.2.13）注入氨基酸自动分析仪，适当调整仪器操作程序及参数和洗脱用缓冲溶液试剂配比，应符合JJG 1084氨基酸分析仪检定规程的要求并保证蛋氨酸与天门冬氨酸的分辨率大于85%，其标准溶液色谱图参照附录A的图A.1，测定中每5个样品（即10个单样）为一组，组间插入混合氨基酸标准工作液（5.2.13）进行校准。以保留时间定性，单点外标法定量。试样中氨基酸

的峰面积应在相应标准工作液该峰面积的30%~200%之间，否则应用柠檬酸钠缓冲液（5.2.7）稀释后重测。

## 8 试验数据处理

试样中胱氨酸（蛋氨酸）含量以其质量分数 $\omega$ 表示，数值以克每100克表示，按式（2）计算：

$$\omega = \frac{n \times A_i \times V \times c \times M \times V_{st}}{A_{st} \times m \times V_i \times 10^6} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- $A_i$  —— 试样溶液中磺基丙氨酸（蛋氨酸砒）的峰面积；
- $V$  —— 试样水解液体积，单位为毫升（mL）；
- $c$  —— 标准工作液中磺基丙氨酸（蛋氨酸砒）的浓度，单位为纳摩尔每毫升（nmol/mL）；
- $V_i$  —— 试样溶液进样体积，单位为微升（ $\mu$ L）；
- $n$  —— 试样水解液稀释倍数；
- $V_{st}$  —— 氨基酸标准溶液进样体积，单位为微升（ $\mu$ L）；
- $A_{st}$  —— 氨基酸标准溶液中磺基丙氨酸（蛋氨酸砒）的峰面积；
- $m$  —— 试样质量，单位为毫克（mg）；
- $M$  —— 胱氨酸（蛋氨酸）的摩尔质量，单位为克/摩尔（g/mol）。（胱氨酸实为胱氨酸与半胱氨酸之和，以胱氨酸计；其 $M_{\text{胱氨酸}}=240.3$ ；其 $M_{\text{蛋氨酸}}=149.2$ ）。

以两个平行样品测定结果的算术平均值报告结果，保留两位小数。

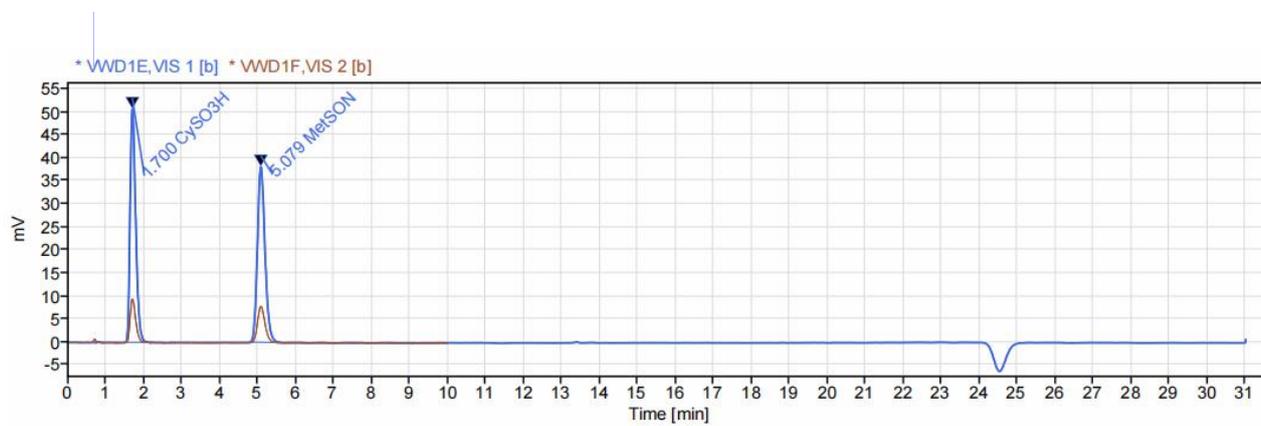
## 9 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果与其他算术平均值的差值，当含量不大于0.5%时，不超过这两个测定值算术平均值的5%；含量大于0.5%，不超过4%。

附录 A

(资料性)

混合氨基酸标准工作液的色谱图



### 参考文献

- [1] GB 5009.124 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定
  - [2] GB/T 15399 饲料中含硫氨基酸的测定 离子交换色谱法
-