

游离氨基酸检测方法及其应用

陈雪, 梁克红*, 朱宏, 王靖

(农业农村部食物与营养发展研究所, 北京 100081)

摘要: 游离氨基酸是动植物体中重要的活性成分和风味物质, 随着现代科学技术的进步, 游离氨基酸的检测方法多样且应用研究进展迅速, 汇总整理各类检测方法及其相关应用不可或缺。本文综述了常用于检测分析游离氨基酸的分光光度法、离子色谱-积分脉冲安培法、氨基酸分析仪法、高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法 5 种方法, 以及超临界流体色谱法和近红外光谱法 2 种新技术, 分析了各检测方法的原理及优缺点, 并对各检测方法列举了相关应用研究。现代新型技术的发展和推广, 多元化离子化方式、高分辨质谱、多级串联质谱等技术将会使游离氨基酸分析的灵敏度、准确度、分析速度及自动化程度提高到一个崭新的水平, 选择性好、准确度高、前处理简便的检测手段将是游离氨基酸检测分析技术的未来发展趋势。

关键词: 游离氨基酸; 分光光度法; 离子色谱-积分脉冲安培法; 氨基酸分析仪法; 高效液相色谱法; 液相色谱-串联质谱法

Analysis method and application of free amino acids

CHEN Xue, LIANG Ke-Hong*, ZHU Hong, WANG Jing

(Institute of Food and Nutrition Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Free amino acids are important active components and flavor compounds in plants and animals. With the progress of modern science and technology, the detection methods of free amino acids are diverse and the application research progress is rapid. This paper reviewed 5 kinds of methods, including spectrophotometry, ion exchange chromatography integrated pulsed amperometric detection, amino acid analyzer, high performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and 2 kinds of new technologies (supercritical fluid chromatography and near infrared spectroscopy). Then this paper analyzed the principle, advantages and disadvantages of each detection method, and listed the related application research of each detection method. With the development and popularization of modern new technologies, diversified ionization methods, high resolution mass spectrometry, multi-stage tandem mass spectrometry and other technologies, the sensitivity, accuracy, analysis speed and automation of free amino acid analysis would be improved to a new level. The detection methods with good selectivity, high accuracy and simple pretreatment would be the future development trend of free amino acid detection and analysis technology.

KEY WORDS: free amino acids; spectrophotometry; ion exchange chromatography integrated pulsed amperometric detection; amino acid analyzer method; high performance liquid chromatography; liquid chromatography-tandem

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801605)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31801605)

*通信作者: 梁克红, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食物营养与安全。E-mail: liangkehong@caas.cn

*Corresponding author: LIANG Ke-Hong, Ph.D, Associate Professor, School of Food Science and Technology, Institute of Food and Nutrition Development, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China. E-mail: liangkehong@caas.cn

mass spectrometry

0 引 言

游离氨基酸是天然结构的氨基酸^[1], 广泛存在于动植物中。作为植物的一个重要氮源, 游离氨基酸可以调节植物的代谢平衡, 保证植物在逆境下的生存^[2]。同时, 游离氨基酸也是衡量动植物及食品品质的一个重要指标, 其含量与动植物、食品的香气、风味等品质相关^[3-4], 也可以作为筛查与诊断遗传代谢病的评价指标^[5]。因此, 分析研究游离氨基酸对动植物和食品品质评价具有十分重要的意义。目前, 提取游离氨基酸最常用的方法是磺基水杨酸沉淀法。游离氨基酸具有 2 种电离功能, 一种是酸性的, 一种是碱性的, 因此在中性液体流动相中, 它们可以是两性离子(脱质子化酸功能、质子化碱性功能), 但在反相高效液相色谱中, 由于同时存在正负电荷, 使得它们很难保留^[6-7]。游离氨基酸是极性很高的分析物, 因此不适合常规的反相高效液相色谱^[8]或气相色谱分析。游离氨基酸的常用检测方法如表 1 所示, 主要有分光光度法、离子色谱-积分脉冲安培法、氨基酸分析仪法、高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法等, 同时研究人员开发出了一些新技术方法,

如超临界流体色谱法、近红外光谱法等。本文对目前用于分析游离氨基酸的方法进行了综述, 旨在为不同物质的游离氨基酸检测提供科学完善的应用方法。

1 分光光度法

常用的分光光度法有紫外分光光度法和荧光分光光度法。紫外分光光度法的原理是游离氨基酸在特定 pH 条件下与茚三酮共热, 形成紫色络合物, 用分光光度仪在特定的波长下测定其含量(GB/T 8314—2013《茶 游离氨基酸总量的测定》)^[16-18]。紫外分光光度法简单易行, 但线性范围稍小, 仅有一个数量级^[9]。涂云飞^[16]利用紫外分光光度法测定茶叶中游离氨基酸含量, 对显色反应时间与氨基酸浓度因素进行了条件优化, 获得适宜作为茶叶中游离氨基酸总量的测定条件。胡京枝等^[17]对含乳饮料中游离氨基酸的含量的实验条件进行了优化, 建立了紫外分光光度法测定游离氨基酸含量的测定方法。谭建宁等^[18]采用紫外分光光度法测定龙俐叶总游离氨基酸含量, 该法操作简便、结果准确, 可作为龙俐叶总游离氨基酸的质量控制方法。

表 1 游离氨基酸的检测方法及优缺点
Table 1 Analysis methods and advantages and disadvantages of free amino acids

方法	适用范围	优点	缺点	参考文献
分光光度法	茶叶、药材、果汁、蜂蜜、牛乳等, 适用于芳香族游离氨基酸的检测	操作简单易行	线性范围稍小、衍生化时间长、衍生化产物组分复杂、稳定性差	[9]
离子色谱-积分脉冲安培法	蛋白质和肽的水解产物、食品和饮料等常规样品	无需柱前柱后衍生、准确可靠、重现性好	专属性强、价格昂贵、推广与应用受限	
氨基酸分析仪法	食品、医学、农业、微生物等领域的各类样品	准确可靠、重现性好、适用范围广、样品用量小	测定时间相对较长、柱后扩散较大导致分辨率下降、价格相对昂贵	[10]
高效液相色谱法	蛋白质水解液、生物体液、农产品、药材等	分离效能高、速度快、操作简便、检测灵敏度好、对样品适用范围广	仪器价格高、衍生副产物以及衍生物水解会造成干扰	[11]
液相色谱-串联质谱法	食品、医学、农业、微生物等领域的各类样品, 尤其适用于复杂体系小分子化合物	分析通量高、易于自动化、分析复杂样品时干扰小、数据准确度高, 特别适于低含量样品的检测分析	仪器价格昂贵	[12]
超临界流体色谱法	生物分析、天然产物复杂样品等	样品处理简单、有机溶剂消耗少、分析速度快、测定游离氨基酸种类全	适用样品有局限性、仪器价格高	[7,13]
近红外光谱法	近红外波段内的各领域常规样品	高效、无污染、无破坏性、可同时检测多组分	不适用在近红外波段不具有光谱响应的样品、数据高维复杂、无法直接进行定量分析	[14-15]

荧光分光光度法的原理是游离氨基酸分子中的氨基羧基或其他活性基团,可与衍生化试剂发生化学反应,采用荧光分光光度计,可测定衍生化产物含量,进而可计算出原始样品中的游离氨基酸含量^[19,19-21]。荧光分光光度法存在衍生化时间长、衍生化产物组分复杂和稳定性差等问题,通过对衍生化试剂的仔细挑选,可部分解决上述问题。陈悦娇等^[19]采用邻苯二甲醛在 β -巯基乙醇存在下与第一级游离氨基酸反应生成具有荧光的1-硫代-2-烷基异吲哚,利用荧光光度法测定茶叶中的游离氨基酸含量。童蕾等^[20]用荧光光谱法测定不同饮料中游离氨基酸,游离氨基酸总量回收率达95%以上,该法适合于果汁、蜂蜜等饮品中游离氨基酸的测定要求。马应丹等^[21]以邻苯二甲醛和 β -巯基乙醇为衍生化试剂,用荧光分光光度计测定莲子中游离氨基酸总量,该方法操作简便、重现性好。

分光光度法在现有的研究中多应用于农产品、食品、药材等常规样品,尤其适用于含芳香族游离氨基酸样品的检测。由于该方法简单易行,仪器操作方便,可以在一般的实验室使用。

2 离子色谱-积分脉冲安培法

1989年WELCH等^[22]首次提出一种新形式的脉冲安培检测法—积分脉冲安培检测法,其原理是强碱性条件下游离氨基酸中的羧基能够形成阴离子,而游离氨基酸中的氨基被施加一定电位时能在金电极表面发生氧化反应,从而实现游离氨基酸的分离检测。用盐酸溶液萃取试样中的游离氨基酸,过阳离子固相萃取小柱纯化,离子色谱-积分脉冲安培仪测定,外标法定量(YC/T 448—2012《烟草及烟草制品 游离氨基酸测定 离子色谱-积分脉冲安培法》)。离子色谱-积分脉冲安培法准确可靠、重现性好,能测定大多数种类的氨基酸及其同系物,但灵敏度不高、仪器价格较贵^[9]。

离子色谱-积分脉冲安培法在分析植物中游离氨基酸的含量时,结果良好。DING等^[23]在阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法优化条件下,在流速为0.25 mL/min的阴离子交换柱上,绿茶中的茶氨酸从谷氨酰胺中分离出来,该方法用于绿茶中游离氨基酸的测定,结果令人满意。钟添华等^[24]将高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法应用于珍稀药材金线莲游离氨基酸的分析测定,检测出17种游离氨基酸。于宏晓等^[25]采用离子色谱-积分脉冲安培法测定烟草中的游离氨基酸含量,该方法成功对比分析测定了烤烟、白肋烟和香料烟3种不同类型单料烟以及国内外不同风格卷烟中18种游离氨基酸的含量。孙洁等^[26]用离子色谱-积分脉冲安培检测器分离并测定芝麻香白酒酒醅中常见游离氨基酸,该方法无需衍生,简便、快速、灵敏度高,适用于酒醅中游离氨基酸的测定。刘颖慧等^[27]建立了一种测定海带中游离氨基酸的阀切换高效阴离子交换色谱耦合脉冲安培检测法,检测出海带中20种游离氨基酸,

该方法样品前处理简单,无基底杂质干扰。

离子色谱-积分脉冲安培法还可用于人血清中游离氨基酸的研究。周政华等^[28]在对人血清中游离氨基酸进行研究时,用阳离子交换树脂固相萃取法和离子色谱仪分析,排除了蛋白质和糖类对测定的干扰,检测了人血清中谷氨酰胺等14种游离氨基酸。

离子色谱-积分脉冲安培法无需衍生处理,只需将样品稀释至适当浓度即可直接进行分离检测。但此类氨基酸分析仪器专属性强、价格昂贵、对实验人员的操作要求较高,大大限制其推广与应用。对于条件允许且常规样本量较大的实验室使用时,可简便高效、准确地进行研究。

3 氨基酸分析法

氨基酸分析法原理是样品中游离氨基酸经沸水提取或酸溶液萃取后,经氨基酸分析仪的磺酰型阴离子交换柱分离后,在135℃下加热,氨基酸与茚三酮混合反应,伯胺与茚三酮生成蓝紫色化合物,仲胺与茚三酮生成黄色化合物,分别在570 nm和440 nm波长下通过可见光分光光度检测器检测2种衍生产物,保留时间定性,外标工作曲线法定量(GB/T 30987—2020《植物中游离氨基酸的测定》)。氨基酸分析仪分为普通氨基酸分析仪和全自动氨基酸分析仪,后者更为方便。氨基酸分析法准确可靠、重现性好、能测定大多数种类的游离氨基酸,但其测定时间相对较长、柱后扩散较大导致分辨率下降、仪器结构复杂、价格相对昂贵^[10]。

氨基酸分析法多用于植物中游离氨基酸与品质关系研究。LI等^[29]用全自动氨基酸分析仪研究游离氨基酸与黄连草药种类之间的关系,测定味连、云南黄连和雅连中20种游离氨基酸的含量,研究结果表明可用游离氨基酸作为活性成分来鉴别黄连属植物。LU等^[30]用氨基酸分析仪测定茶树白化叶片中的游离氨基酸,与对照相比,纯白化叶片积累了较高的氨基酸,尤其是茶氨酸,白化叶片叶绿体缺失可能破坏了碳氮代谢的平衡,导致游离氨基酸的高积累和多酚的低浓度。BISHNU等^[31]使用全自动氨基酸分析仪测量花生壳样品中的游离氨基酸组成,其游离氨基酸含量对花生壳的品质和价值起着重要的决定作用。YOUNG等^[32]采用高速氨基酸分析仪测定了露地菠菜和温室菠菜在冷胁迫下游离氨基酸(34种必需和非必需成分)的含量,温室栽培在较短的生长期生产营养价值较高的菠菜,其总游离氨基酸(包括必需氨基酸)的含量高于露地栽培的菠菜,此外在较短的生长期,菠菜的低温暴露导致菠菜产生高脯氨酸、 γ -氨基丁酸、缬氨酸和亮氨酸含量,这些是最重要的营养来源,可生产出高质量食用产品。

氨基酸分析法也用于动物中游离氨基酸与品质关系,以及生物医学研究。ZHOU等^[33]用氨基酸分析仪检测上海熏鱼不同加工阶段(首次浸泡、首次浸泡后油炸、二次

浸泡)游离氨基酸的含量,研究不同加工阶段对其非挥发性风味物质的影响。KSENOFONTOV 等^[34]使用氨基酸分析仪对大鼠脑提取物中的游离氨基酸进行分析,证明通过分析脑匀浆中的所有其他氨基酸同时定量测定还原型谷胱甘肽的可能性。

氨基酸分析法是近年来测定游离氨基酸应用最为普遍的方法,其操作方法相对于液相更方便、仪器价格相对于液相色谱-串联质谱法更便宜,可遵循完善配套的国家标准方法进行,但其方法适配的仪器只能测定氨基酸相关的物质含量。氨基酸分析法适用于食品、医学、农业、微生物等领域的各类样品,且样品分析用量小,分析游离氨基酸种类广,适用于大多数有条件的实验室,尤其适用于认证实验室。

4 高效液相色谱法

高效液相色谱法原理是样品中游离氨基酸在经液相色谱分离前或后,经衍生剂衍生,使之生成具有荧光或紫外吸收的衍生物,再用检测器测定。高效液相色谱法分离效能高、操作简便、检测灵敏度好、对样品适用范围广,但仪器价格高、衍生副产物以及衍生物水解会造成干扰等不足限制了其使用^[11]。

高效液相色谱系统连接二级阵列检测器常用于研究游离氨基酸相关的风味化合物。WANG 等^[35]采用高效液相色谱系统连接二级阵列检测器,研究炖、烤 2 种烹调方法对三黄鸡和乌鸡风味的影响,结果表明烘烤产生的鲜味氨基酸含量高于炖煮,炖煮样中苦味氨基酸的含量远低于烘烤样。DUAN 等^[36]为了系统地总结和探讨香料的风味成分,采用高效液相色谱系统连接二级阵列检测器,测定了 29 种香料中的游离氨基酸,结果表明淡香型香料中的总游离氨基酸差异较大,味觉化合物是淡香型香料的重要组成部分。KONG 等^[37]用高效液相色谱系统配备二级阵列检测器,比较了 10 个品牌醋中 17 种游离氨基酸的含量,结果表明,谷氨酰胺和丙氨酸具有较高的味觉活性值,谷氨酰胺和丙氨酸对醋的风味起着鲜味和甜味的贡献。

反相高效液相色谱法配备紫外检测器、荧光检测器可用于动物体相关游离氨基酸研究。ANNI 等^[38]采用反相高效液相色谱法配备紫外检测器和荧光检测器,对母乳中的游离氨基酸进行分析,研究母亲人体测量学与母乳中游离氨基酸谷氨酸或谷氨酰胺的含量相关性,以及游离氨基酸与母乳喂养婴儿的当前体型或早期婴儿生长相关性,结果显示母亲之间的游离氨基酸浓度差异很大,然而母乳中高含量的谷氨酸和谷氨酰胺可以在一定程度上降低母乳摄入量,从而影响早期生长的假设无法得到证实,需进一步调查与母乳中游离氨基酸水平相关的母亲因素以及对婴儿的潜在影响。PEREZ 等^[39]研究不同温度下高压处理对干腌火腿的

影响,通过反相高效液相色谱法配备多荧光检测器,测定 4 种不同处理的干腌火腿真空包装切片中游离氨基酸的含量,结果表明,35 °C 高压处理显著提高了总游离氨基酸含量,各处理间 13 种游离氨基酸的含量也存在显著差异,其中 12 种以 35 °C 高压处理含量最高。

高效液相色谱法适用于蛋白质水解液、生物体液、农产品、药材等样品,适用范围广、灵敏度、检测限高,但相较于氨基酸分析仪来说,需要进行手动衍生操作,样品的前处理更复杂。对于有条件的实验室,可根据实验需要选择实验仪器及方法。

5 液相色谱-串联质谱法

液相色谱-质谱联用结合了液相色谱的强大分离功能和质谱分析的高选择性、高特异性、高灵敏度、高稳定性;样品处理简单、分析通量高、易于自动化;分析复杂样品时干扰小、数据准确度高、可信度高,特别适于低含量样品的检测分析^[12,24]。

ZHOU 等^[40]用超高效液相色谱-质谱/质谱联用法应用于 28 个不同发酵程度的商品茶样品游离氨基酸的分析,结果表明茶氨酸、精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸可以作为茶叶发酵程度的有效判别因子。优化后的液相色谱-串联质谱法无需对茶叶衍生处理,且分析时间短。杜颖颖等^[12]等利用超高效液相色谱-串联质谱技术,在电喷雾离子源正离子扫描模式下所测游离氨基酸线性关系良好,这一方法无需衍生即可有效检测出茶叶中的 20 种游离氨基酸及氨基类成分。GAO 等^[41]开发了一种不用衍生化即从土壤水提取物中定量分析游离氨基酸的方法,该方法采用液相色谱-串联质谱技术结合阳离子交换固相萃取,在 12 min 内,20 种未活化游离氨基酸得到良好分离。XIAO 等^[42]利用液相色谱-串联质谱法对 2 个实验田种植的 5 个商品甘薯品种的游离氨基酸组成进行了分析,该方法高效、可靠、灵敏,可用于类似甘薯的食品基质中氨基酸的定量分析。

液相色谱-串联质谱法还可用于复杂生物基质中游离氨基酸的研究。YIN 等^[43]优化预处理条件及超高效液相色谱-四极轨道高分辨质谱条件,15 min 内分离出 33 个原子吸收光谱,比氨基酸分析仪快 6 倍以上,该方法可用于血清、牛奶和肌肉样品中游离氨基酸的测定。CHIHARU 等^[44]利用现有的二维高效液相色谱-串联质谱联用分析系统,在不受干扰的情况下测定了复杂生物基质中 α -氨基酸的含量,并成功应用于人体临床样品(血浆和尿液)的分析。

液相色谱-串联质谱法的检测限相较于现有的各类方法,能提供最低的检测限,可对复杂样本进行实时分析。对于具备条件,以精确研究复杂、低含量样品为主的实验室,液相色谱-串联质谱法是最优的选择。

6 新技术方法

超临界流体色谱法正在发展成为手性分离的首选技术^[45-47]。与液相色谱法相比,超临界流体色谱法具有许多优点,如减少有机溶剂消耗和缩短分析时间^[13]。只有少量的文献报道了超临界流体色谱分析游离氨基酸的方法,因为游离氨基酸的两性离子特性使得它们很难用超临界流体色谱流动相洗脱。CAMEL 等^[48]在 1992 年第一次利用超临界流体色谱法在不需要对映体拆分情况下,实现了几种蛋白源性氨基酸的洗脱,然而该方法使用的流动相与质谱检测不兼容。近期,RAIMBAULT 等^[7]利用甲磺酸作为流动相添加剂,从两性离子柱上洗脱出 20 种游离氨基酸,建立了一种总循环时间为 10 min 的快速方法。MILLER 等^[13]对未衍生氨基酸的超临界流体色谱分离进行了研究,对 18 种游离氨基酸的对映体分离均实现,保留时间小于 3 min。

近红外光谱与化学计量学相结合是近年来在食品工业和农业领域得到广泛接受的一种方法,主要是因为它是一种低成本、非破坏性的方法,并且通常需要最少的样品处理^[49]。近红外光谱可以记录官能团(如 O-H、C-H 和 N-H 带)中化学键对近红外光谱的响应,这与有机分子的主要结构成分有关^[50]。近红外光谱的吸收峰宽且重叠,由于近红外光谱数据的高维性和复杂性,无法进行直接的定量分析^[51]。目前,已有一些研究利用近红外光谱技术来测定样品中游离氨基酸的含量。SHEN 等^[14]采用透射近红外光谱法对 98 个不同陈化时间的 2007 年份黄酒样品中的 16 种游离氨基酸进行了分析,此研究首次采用傅立叶变换近红外光谱法对黄酒中的精氨酸进行了分析。GUO 等^[15]采用近红外光谱和多元校正相结合的方法对绿茶中游离氨基酸总量进行了无损检测。

上述 2 种新技术方法都是基于快速、高效检测技术而建立。超临界流体色谱法检测灵敏度更高,近红外光谱法成本低、可无损检测,但 2 种新技术方法的应用研究还不够完善,需要根据研究需求不断优化,以适用于更多的样品检测。

7 讨 论

随着现代科学技术的进步,游离氨基酸的检测方法也在不断发展,分析检测游离氨基酸的技术方法也从分光光度法、离子色谱-积分脉冲安培法、氨基酸分析仪法、高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法进行了优化和创新。同时,为适应研究需求,超临界流体色谱法以及近红外光谱法等新技术也被研发并逐渐推广。各类检测方法各具特色,但对于方法的选择,还需根据实验条件、样品性质种类、检测灵敏度需求、分析时间长短、干扰因素等具体选择适宜的检测方法。由于越来越多的复杂样品也有了检测分析游离氨基酸的需求,所以选择性好、准确度高、前

处理简便的检测手段将是游离氨基酸检测分析技术的未来发展趋势。而现代新型技术的发展和推广,多元化离子化方式、高分辨质谱、多级串联质谱等技术将会使游离氨基酸分析的灵敏度、准确度、分析速度及自动化程度均提高到一个崭新的水平,其在游离氨基酸检测分析中有更广泛的应用前景。

参考文献

- [1] VIOLI JP, BISHOP DP, PADULA MP, *et al.* Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2020; 116018. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116018
- [2] 高肖飞. 植物叶片中游离氨基酸的测定及其对大气氮沉降的响应[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
GAO XF. Determination of free amino acids in plant leaves and their responses to atmospheric nitrogen deposition [D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.
- [3] 姬厚伟, 张丽, 王芳, 等. 植物中游离氨基酸的分析方法[J]. *理化检验-化学分册*, 2016, (52): 119-124.
JI HW, ZHANG L, WANG F, *et al.* Analysis methods of free amino acids in plant [J]. *Phys Test Chem Anal Part B*, 2016, (52): 119-124.
- [4] MINARI Y, PING Y, KIMURA H, *et al.* Effect of the heating method on the taste components of chicken soup [J]. *J Cook Sci Jpn*, 2016, 49: 154-160.
- [5] 徐慧, 陈秋虹, 黄岛平, 等. 人血清中游离氨基酸指纹图谱的初步研究[J]. *分析化学进展*, 2017, 7(1): 1-8.
XU H, CHEN QH, HUANG DP, *et al.* A preliminary study on free amino acid fingerprint of human serum [J]. *Adv Anal Chem*, 2017, 7(1): 1-8.
- [6] GALI Q, ARASHEED Q. Determination of free amino acids in biological samples: Problems of quantitation [J]. *J Chromatogr B*, 1989, 491: 281-289.
- [7] RAIMBAULT A, NOIREAU A, WEST C. Analysis of free amino acids with unified chromatography-mass spectrometry-application to food supplements [J]. *J Chromatogr A*, 2020. DOI:10.1016/j.chroma. 2019. 460772.
- [8] ARMSTRONG M, JONSCHER K, REISDORPH NA. Analysis of 25 underivatized amino acids in human plasma using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(16): 2717-2726.
- [9] 范婉萍, 吴婕. 用分光光度法测定含氨基酸类制品中的氨基酸含量[J]. *中国测试技术*, 2007, (3): 117-119.
FAN WP, WU J. The content of amino acids in products containing amino acids was determined by spectrophotometry [J]. *China Meas Test Technol*, 2007, (3): 117-119.
- [10] 邵瑞琪, 陈双玲. 氨基酸分析仪在医学中的应用[J]. *分析仪器*, 2019, 223(2): 133-137.
SHAO RQ, CHEN SL. Application of amino acid analyzer in medicine [J]. *Anal Instrum*, 2019, 223(2): 133-137.
- [11] 胡雪潇. 高效液相色谱法检测食品中氨基酸的方法分析[J]. *食品安全导刊*, 2020, (15): 118.
HU XX. Analysis of amino acids in food by high performance liquid

- chromatography [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2020, (15): 118.
- [12] 杜颖颖, 刘相真, 叶美君, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中游离氨基酸成分[J]. *色谱*, 2019, 37(6): 597-604.
- DU YY, LIU XZ, YE MJ, *et al.* Detection of free amino acids in tea using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(6): 597-604.
- [13] MILLER L, LEI Y. Chiral separation of underivatized amino acids in supercritical fluid chromatography with chiral crown ether derived column [J]. *Chirality*, 2020, 32(7): 981-989.
- [14] SHEN F, NIU XY, YANG DT, *et al.* Determination of amino acids in chinese rice wine by fourier transform near-infrared spectroscopy [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(17): 9809-9816.
- [15] GUO Z, CHEN L, ZHAO C, *et al.* Nondestructive estimation of total free amino acid in green tea by near infrared spectroscopy and artificial neural networks [C]. *International Conference on Computer & Computing Technologies in Agriculture*, 2011.
- [16] 涂云飞. 茚三酮法测定茶叶游离氨基酸总量研究[J]. *现代农业科技*, 2018, 725(14): 235, 238.
- TU YF. Determination of total free amino acid in tea by ninhydrin [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2018, 725(14): 235, 238.
- [17] 胡京枝, 董小海, 余大杰. 紫外分光光度法测定含乳饮料中游离氨基酸含量[J]. *中国食品添加剂*, 2007, 64(6): 164-166.
- HU JZ, DONG XH, YU DJ. Determination method of free amino acid content in drink milk by UV-spectrometer [J]. *China Food Addit*, 2007, 64(6): 164-166.
- [18] 谭建宁, 杜成智, 梁臣艳, 等. 龙俐叶总游离氨基酸含量测定[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(4): 645-649.
- TAN JN, DU CZ, LIANG CY, *et al.* Determination of total free amino acid content in *Sauropus spatulifolius* Beille [J]. *J South Agric*, 2016, 47(4): 645-649.
- [19] 陈悦娇, 马应丹, 何志峰. 茶叶中游离氨基酸含量的荧光光度法测定[J]. *食品研究与开发*, 2003, 24(3): 80-82.
- CHEN YJ, MA YD, HE ZF. Determination of the free amino acid in tea by fluorophotometry [J]. *Food Res Dev*, 2003, 24(3): 80-82.
- [20] 童蕾, 赵中一, 肖芬, 等. 荧光光谱法测定饮料中氨基酸的含量[J]. *化学分析计量*, 2006, 15(2): 18-20.
- TONG L, ZHAO ZY, XIAO F, *et al.* Determination of free amino acid by fluorescence spectrophotometry [J]. *Chem Anal Meterage*, 2006, 15(2): 18-20.
- [21] 马应丹, 刘文根. 邻苯二甲醛衍生荧光光度法测定莲子中游离氨基酸总量[J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2004, 17(1): 40-44.
- MA YD, LIU WG. Determination of the total content of free amino acids in lotus seed by fluorescence spectrophotometry with o-phthaldialdehyde derivatization [J]. *J Zhongkai Agric Coll*, 2004, 17(1): 40-44.
- [22] WELCH LE, LACOURSE WR, MEAD DA, *et al.* Comparison of pulsed coulometric detection and potential-sweep-pulsed coulometric detection for underivatized amino acids in liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 1989, 61(6): 555-559.
- [23] DING Y, YU H, MOU S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 982(2): 237-244.
- [24] 钟添华, 黄丽英, 房静. 阴离子色谱-积分脉冲安培法测定珍稀药材金线莲中游离氨基酸[J]. *分析测试技术与仪器*, 2011, 17(2): 74-78.
- ZHONG TH, HUANG LY, FANG J. Determination of free amino acids in precious substances of *Anoectochilus roxburghii* by anion chromatography-integral pulse ampere [J]. *Anal Test Technol Instrum*, 2011, 17(2): 74-78.
- [25] 于宏晓, 徐海涛, 马强, 等. 离子色谱-积分脉冲安培法测定烟草中 18 种游离氨基酸[J]. *中国烟草科学*, 2012, 33(4): 51-54.
- YU HX, XU HT, MA Q, *et al.* Determination of 18 free amino acids in tobacco with high performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric method [J]. *Chin Tob Sci*, 2012, 33(4): 51-54.
- [26] 孙洁, 李好转, 孙立臻, 等. 芝麻香型白酒酒醅中游离氨基酸分析方法探讨[J]. *酿酒科技*, 2014, (4): 93-95.
- SUN J, LI HZ, SUN LZ, *et al.* Exploration on the analytical method of free amino acids in the fermented grains of sesame-flavor liquor [J]. *Liquor Mak Sci Technol*, 2014, (4): 93-95.
- [27] 刘颖慧, 张经华, 王明林, 等. 二阀阀切换离子色谱法测定海带中游离氨基酸[J]. *化学分析计量*, 2016, 25(4): 23-26.
- LIU YH, ZHANG JH, WANG ML, *et al.* Determination of free amino acids of kelp by 2D valve-switching ion chromatography [J]. *Chem Anal Meterage*, 2016, 25(4): 23-26.
- [28] 周政华, 杨元, 洪君蓉, 等. 固相萃取-离子色谱-积分脉冲安培法测定人血清中游离氨基酸[J]. *分析化学*, 2007, 35(7): 1063-1066.
- ZHOU ZH, YANG Y, HONG JR, *et al.* Determination of free amino acids in human serum using solid phase extraction followed by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection [J]. *Chin J Anal Chem*, 2007, 35(7): 1063-1066.
- [29] LI JJ, ZHAO AP, LI DM, *et al.* Comparative study of the free amino acid compositions and contents in three different botanical origins of coptis herb [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2019, 83: 117-120.
- [30] LU MQ, HAN JY, ZHU BY, *et al.* Significantly increased amino acid accumulation in a novel albino branch of the tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Planta*, 2019, 249: 363-376.
- [31] BISHNU A, SANJEEV KD, MUHAMMAD WA, *et al.* Antioxidant activities, polyphenol, flavonoid, and amino acid contents in peanut shell [J]. *J Saudi Soc Agric Sci*, 2019, 18(4): 437-442.
- [32] YOUNG EY, SARANYA K, KYE MC, *et al.* Influence of cold stress on contents of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including gamma-aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*) [J]. *Food Chem*, 2017, 215: 185-192.
- [33] ZHOU Y, CHEN SS, WANG XC, *et al.* Nonvolatile taste compounds of Shanghai smoked fish: A novel three stages control techniques [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9: 87-98.
- [34] KSENOFONTOV AL, BOYKO AI, MKRTCHYAN GV, *et al.* Analysis of free amino acids in mammalian brain extracts [J]. *Biochem Moscow*, 2017, 82: 1183-1192.
- [35] WANG LH, QIAO KN, DING Q, *et al.* Effects of two cooking methods on the taste components of Sanhuang chicken and Black - bone silky fowl meat [J]. *J Food Process Preserv*, 2018. DOI: 10.1111/jfpp.13772
- [36] DUAN W, HUANG Y, XIAO JF, *et al.* Determination of free amino acids, organic acids, and nucleotides in 29 elegant spices [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8: 3777-3792.
- [37] KONG Y, ZHANG LL, SUN Y, *et al.* Determination of the free amino acid, organic acid, and nucleotide in commercial vinegars [J]. *J Food Sci*, 2017,

- 82(5): 1116–1123.
- [38] ANNI L, SIGNE B, DORTHE P, *et al.* Free amino acids in human milk and associations with maternal anthropometry and infant growth [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2016, 63(3): 374–378.
- [39] PEREZ S, CARBALLO J, FULLADOSA E, *et al.* Influence of high-pressure processing at different temperatures on free amino acid and volatile compound profiles of dry-cured ham [J]. *Food Res Int*, 2019, 116: 49–56.
- [40] ZHOU P, ZHAO F, CHEN MJ, *et al.* Determination of 21 free amino acids in 5 types of tea by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a modified 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method [J]. *J Food Comp Anal*, 2019, 81: 46–54.
- [41] GAO JJ, RICK H, CHIARA C, *et al.* Robust analysis of underivatized free amino acids in soil by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1449: 78–88.
- [42] XIAO Q, RONG R, SUZANNE J, *et al.* Determination of free amino acids in five commercial sweetpotato cultivars by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Food Comp Anal*, 2020, 92: 103522.
- [43] YIN BJ, LI TT, ZHANG SR, *et al.* Sensitive analysis of 33 free amino acids in serum, milk, and muscle by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Food Anal Method*, 2016, 9: 2814–2823.
- [44] CHIHARU I, TAKEYUKI A, MASASHI M, *et al.* Development of an online two-dimensional high-performance liquid chromatographic system in combination with tandem mass spectrometric detection for enantiomeric analysis of free amino acids in human physiological fluid [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1570: 91–98.
- [45] WEST C. Recent trends in chiral supercritical fluid chromatography [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2019, 120: 1–9, 115648.
- [46] FELLETTI S, ISMAIL OH, LUCA CD, *et al.* Recent achievements and future challenges in supercritical fluid chromatography for the enantioselective separation of chiral pharmaceuticals [J]. *Chromatographia*, 2018, 82(1): 65–75.
- [47] BARHATE CL, JOYCE LA, MAKAROV AA, *et al.* Ultrafast chiral separations for high throughput enantiopurity analysis [J]. *Chem Commun*, 2017, 53(3): 509–512.
- [48] CAMEL V, THIÉBAUT D, CAUDE M, *et al.* Packed column subcritical fluid chromatography of underivatized amino acids [J]. *J Chromatogr A*, 1992, 605(1): 95–101.
- [49] STUBBS TL, KENNEDY AC, FORTUNA AM. Using NIRS to predict fiber and nutrient content of dryland cereal cultivars [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(1): 398.
- [50] YU H, YING Y, FU X, *et al.* Quality determination of Chinese rice wine based on Fourier transform near infrared spectroscopy [J]. *J Near Infrared Spectrosc*, 2006, 14(1): 37–44.
- [51] HACISALIHOGU G, LARBI B, SETTLES AM. Near-infrared reflectance spectroscopy predicts protein, starch, and seed weight in intact seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(2): 702–706.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



陈雪, 实验员, 主要研究方向为食物营养与安全。

E-mail: chenxue01@caas.com



梁克红, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食物营养与安全。

E-mail: liangkehong@caas.cn