

国家标准《蜂蜜中脯氨酸的测定-液相色谱法》标准编制说明（征求意见稿）

1 工作简况

1.1 标准制定背景

蜂蜜是蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露，与自身分泌物混合后，经充分酿造而成的天然甜味物质。已有研究表明，蜂蜜中含有以脯氨酸为主的多种游离氨基酸（White & Doner, 1980），其中，脯氨酸是一种独特的氨基酸，授粉昆虫具有品尝这种氨基酸的能力（Gardener and Gillman, 2002），蜂蜜中的脯氨酸含量与其抗氧化能力有关。蜂蜜中的脯氨酸主要来源于蜜源植物和蜜蜂自身的分泌物（陈杰等，2010）。研究表明，蜂蜜中脯氨酸的含量不仅被作为衡量蜂蜜中游离氨基酸含量的标准，也被作为蜂蜜成熟度和糖掺假的判定标准，纯正蜂蜜脯氨酸含量不应低于 180 mg/kg（Bogdanov et al., 1999）。Czipa N（2012）的最近研究进一步证实，脯氨酸含量，同电导率、总酚含量和黄酮含量，总糖及水分含量等参数同样重要，可作为蜂蜜质量和掺假的指示因子。

鉴于蜂蜜中脯氨酸含量在其理化指标中占有重要的位置，德国已经建立了蜂蜜中脯氨酸含量的测定标准（DIN 10754-2002），我国也于 2000 年建立了进出口蜂蜜中脯氨酸分光光度测定方法（SN/T 0850-2000），但是目前该标准已经被废止。由于采用分光光度计测定蜂蜜中脯氨酸含量，会有一些相同吸收波长的其它物质，也被当做脯氨酸，导致结果偏高。而采用液相色谱仪测定，具有灵敏度高、结果准确等特点。因此，该标准的制定，即弥补了分光光度法测定脯氨酸含量的不足，也为蜂蜜的质量评价增添依据。

1.2 任务来源

根据中华全国供销合作总社下达的 2011 年第一批国家标准制定计划项目，《蜂蜜中脯氨酸的测定-液相色谱法》列入 2011 年国家标准制定计划，计划编号为 20110434-T-422。农业部蜂产品质量监督检验测试中心（北京）负责组织调研、试验并起草制定标准，全国蜂产品标准化工作组为技术归口单位。

1.3 主要工作过程

1.3.1 成立标准编制小组

自接到标准起草任务后，项目负责人组织了相关人员成立了标准编制小组。

1.3.2 调研与资料收集

为全面了解国内外有关脯氨酸测定的具体方法、测试条件以及标准制定等情况，标准编制小组查阅了国内外相关参考文献，对脯氨酸测定方法进行了具体分析研究。

2 标准编制的原则和确定标准主要技术内容的论据

2.1 标准制定的原则

本标准的编写制定过程中以普遍适用为基础，以提高测试方法选择性、精密度、灵敏度、准确度和分析效率为总原则。经查阅大量国内外文献，在参考和比较不同基质中脯氨酸含量测定方法的基础上，

采用4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole,NBD-F)作为柱前衍生剂,液相色谱,荧光检测法测定蜂蜜中的脯氨酸含量。该方法具有操作简便、灵敏度高、稳定性、适用性强等特点。

在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章,严格执行国家标准。与同体系标准及相关的各种基础标准以及配套使用的取样、试剂规格等标准相衔接,遵循了政策协调统一性原则。

在标准制定过程中力求做到:技术内容的叙述正确无误;文字表达准确、简明、易懂;标准的构成严谨合理;内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

2.2 标准的技术内容及确定依据

目前,脯氨酸的测定方法主要有氨基酸分析仪测定法、分光光度法、气相色谱法和液相色谱法等,由于氨基酸没有紫外或荧光吸收,在测定时均需要衍生。氨基酸分析仪测定法虽然是氨基酸测定的经典方法,但是,该分析方法不仅对仪器设备要求高,需要价格昂贵的专门的氨基酸分析仪,而且脯氨酸的峰度相对其它氨基酸低。分光光度法测定脯氨酸,虽然不需要昂贵的仪器,但在脯氨酸测定波长下,会有一些相同吸收波长的其它物质,也被当做脯氨酸,导致结果偏高。气相色谱法测定脯氨酸也有报道,但需要严格控制衍生条件,容易导致异构化。采用液相色谱法测定脯氨酸相对来讲,不需要特别昂贵的仪器,易于操作。液相色谱测定脯氨酸同样需要衍生,常用的氨基酸衍生剂,如荧光胺(Fluorescamine)和邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde,OPA),能与 α -氨基酸反应,生成强荧光化合物,但是不能与脯氨酸等二氨基化合物反应。异硫氰酸苯酯(phenyl isothiocyanate, PITC)、9-氯甲酸苄基酯(9-fluorenylmethyl chloroformate, Fmoc-Cl)、4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, NBD-F),与 α -氨基酸和二氨基等化合物均能发生反应。其中,NBD-F作为氨基酸和胺类化合物的荧光标记物,具有反应快速,荧光强度高、反应产物稳定等特点,已经被广泛应用于低水平胺类化合物的测定,故本研究采用NBD-F作为液相色谱测定的柱前衍生试剂。

本标准采用柱前衍生,液相色谱法测定蜂蜜中脯氨酸(化学性质见表1)含量,主要原理为没有荧光的脯氨酸的氨基与衍生化试剂NBD-F反应(见图1),生成强荧光物质,用带有荧光检测器的液相色谱在发射波长为530 nm,吸收波长为470 nm下测定,根据色谱峰的保留时间定性,外标法定量。

根据GB/T5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部份 总则》的规定和参考相关文献,由我所和多家兄弟实验室对方法的技术参数进行了相关试验,验证和评价。

表1 脯氨酸化学性质

化合物名称	分子式	分子量	等电点	CAS
脯氨酸 (Pro; Proline)	C ₅ H ₉ N O ₂	115.13	pK _{a1} = 1.95 (-COOH) pK _{a2} = 10.64 (-NH ₃ ⁺)	147-85-3
4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑 (NBD-F;4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole)	C ₆ H ₂ F N ₃ O ₃	183.10	/	29270-56-2

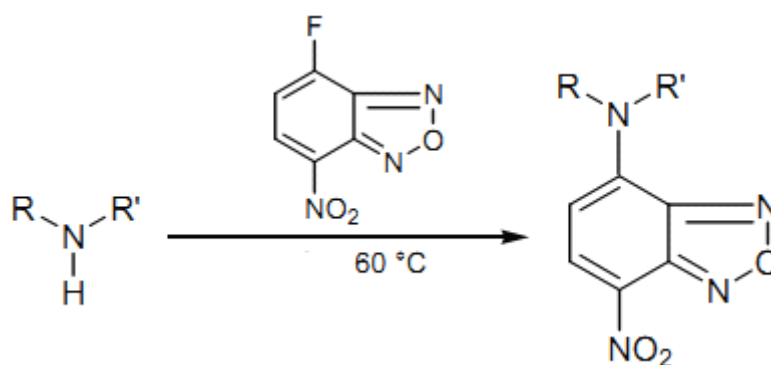


图 1 氨基与 NBD-F 衍生反应

3 方法研究报告

3.1 实验材料与方法

见标准文本。

3.2 结果与讨论

3.2.1 提取条件和衍生方法的确定

由于蜂蜜样品和脯氨酸都能溶于水，所以，采用硼酸缓冲液（pH 8.0）作为提取试剂提取蜂蜜中的脯氨酸，在直接提取时，蜂蜜中的脯氨酸回收率为 60%，后采用超声提取 10 min，回收率良好，达到 80%以上。

参考 Zhang J Z(2011)测定蜂蜜金刚烷胺的 NBD-F 衍生条件，在此基础上进行了一定的修改和优化。保持衍生剂浓度、衍生时间和衍生温度不变，由于提取液未经净化，直接衍生，故为提高衍生效率，衍生时将标准溶液和样品溶液、终止液加入量减半，并优化样品称样量和衍生剂加入量。

3.2.2 称样量的确定

分别称取不同重量的蜂蜜样品于 100 mL 烧杯中，加入 20.0 mL 硼酸缓冲液，用玻璃棒轻轻搅拌均匀，使试样完全溶解。转移至 50 mL 容量瓶中，超声提取 10 min，用硼酸缓冲液定容至刻度，充分混匀后，0.22 μm 滤膜过滤，滤液待衍生。

衍生方法同 Zhang J Z(2011)，取 400 μL 标准溶液或样品溶液于棕色液相色谱进样瓶中，分别加入乙腈 80 μL，100 mmol/L NBD-F 溶液 20 μL，涡旋混匀，盖好密封盖，置于 60°C 恒温水浴锅中避光衍生 10 min，取出立即放入冰水中冷却，加入 0.1 mol /L HCL 溶液 200 μL 终止反应，混匀，待测，结果见表 2 和图 2。

表 2 蜂蜜样品不同称样量对衍生结果的影响

称样量 (/g)	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0
峰面积	72.2±1	150.6±	302.7±	311.8±	180.5±	139.0±	97.2±1	77.1±0	94.4±0
峰面积	.2	1.3	3.0	1.9	1.2	1.2	.65	.9	.9
峰面积	288.8	301.2	302.7	155.9	45.1	23.2	12.2	7.7	7.9

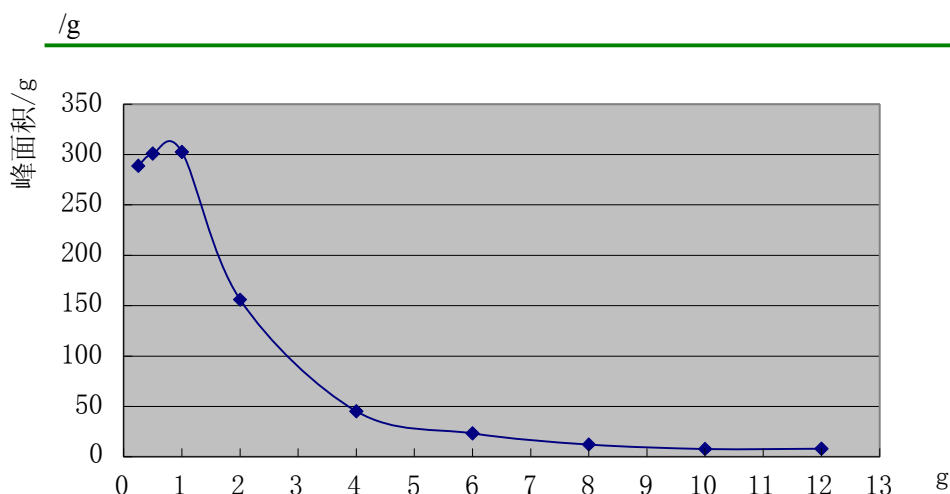


图2 不同称样量与峰面积关系

从表2和图2中可以看出,当称样量在0.25~0.5 g之间时,随着称样量的增加,衍生后测定的每克蜂蜜样品中脯氨酸的峰面积也随之增大,在0.5 g~1.0 g之间,每克蜂蜜样品的脯氨酸峰面积基本相同,但是,当称样量大于等于2.0 g时,随着称样量的增加,每克蜂蜜样品的峰面积呈下降趋势。这可能是由于随着称样量的增加,样品中的脯氨酸及其它能与衍生剂发生反应的物质也随之增多,与衍生剂发生竞争反应,使得衍生剂不能与样品中的脯氨酸反应完全,从而导致每克样品中脯氨酸峰面积呈下降趋势。为确保能够反应完全,蜂蜜样品的称样量应小于等于1.0 g。

3.2.3 衍生剂加入量的确定

由于称样量对蜂蜜样品中脯氨酸的峰面积影响较大,可能与衍生不完全有关,因此,为确保衍生完全,将标准溶液和样品溶液、终止液加入量减半,保持衍生剂浓度不变的条件下,比较了不同衍生剂加入量对相同浓度标准溶液和相同质量蜂蜜样品的衍生情况。配置100 mmol/L的NBD-F衍生剂溶液,加入量分别为20 μ L, 30 μ L, 40 μ L,按标准文本方法分别衍生20 mg/L的标准工作溶液和蜂蜜样品溶液(称样量均为1 g),结果见表3。

表3 衍生剂加入量对标准溶液和样品溶液峰面积的影响

衍生剂加入量	20 μ L	30 μ L	40 μ L
标准溶液峰面积 (LU*s)	384.23 \pm 7.7 1	389.50 \pm 4.0 0	389.34 \pm 4.5 4
蜂蜜样品峰面积 (LU*s)	141.80 \pm 5.7 9	167.99 \pm 3.2 0	172.22 \pm 4.2 8

从表3中可以看出,标准溶液的衍生峰面积随着衍生剂加入量的增加,变化不大;而对于蜂蜜样品,峰面积随着衍生剂加入量的增加而增加;由于40 μ L衍生剂加入量的峰面积仅比30 μ L的略高,考虑到衍生成本,故将衍生剂加入量定为30 μ L。

3.2.4 液相色谱条件的确定

本研究首先参考 Zhang J Z(2011)和 Watanable Y and Imai K (1981, 1982, 1983)文献确定荧光检测器的波长、色谱柱、柱温及流动相,并在 Watanable Y and Imai K (1982)基础上,对流动相进行优化,使之能够与目标物和杂质峰完全分离,采用的液相色谱条件为:色谱柱为 C18, 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm;柱温为 30 $^{\circ}$ C;荧光检测器波长为激发波长 470 nm,发射波长 530 nm;进样量为 40 μ L;流动相组成:A, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0); B, 四氢呋喃+甲醇 (v/v, 50+50), 梯度洗脱程序见表 4,但是由于色谱软件自动计算出的对称因子仅有 0.75,为了提高对称因子,参考 Vázquez-Ortíz F.A et al (2005)的文献报道,改变了流动相组成和色谱柱,并在此基础上进行了优化,目标物在 5.6 min 出峰,不仅能与杂质完全分开,而且色谱峰的对称因子提高到 0.90 以上。因此,最后确定优化的色谱条件为:色谱柱, C18, 5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm (i.d);流动相, A, 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液 (pH 7.2) + 甲醇 + 四氢呋喃 (v/v/v, 900:95:5); B, 甲醇;梯度洗脱程序见表 5, 色谱图见图 3 (空白), 图 4 (标准溶液), 图 5 (样品), 图 6 (添加)。

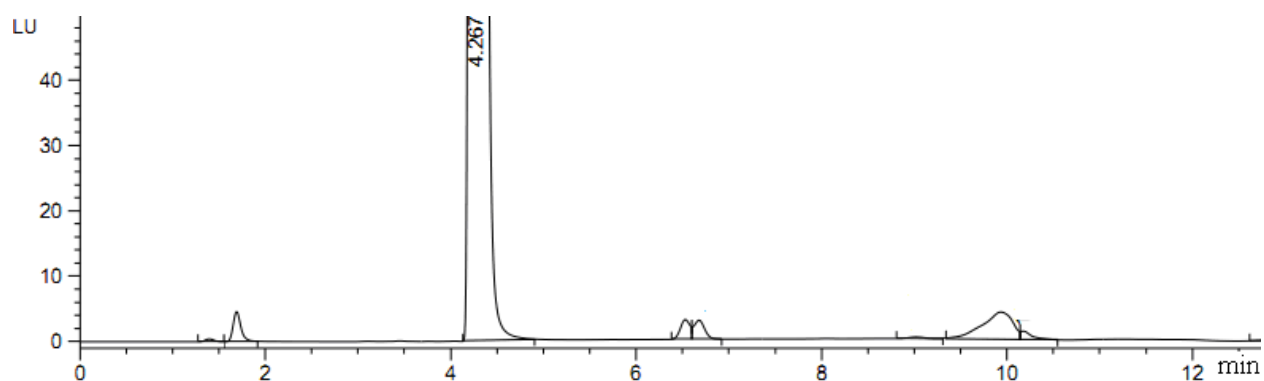


图3 空白溶液色谱图

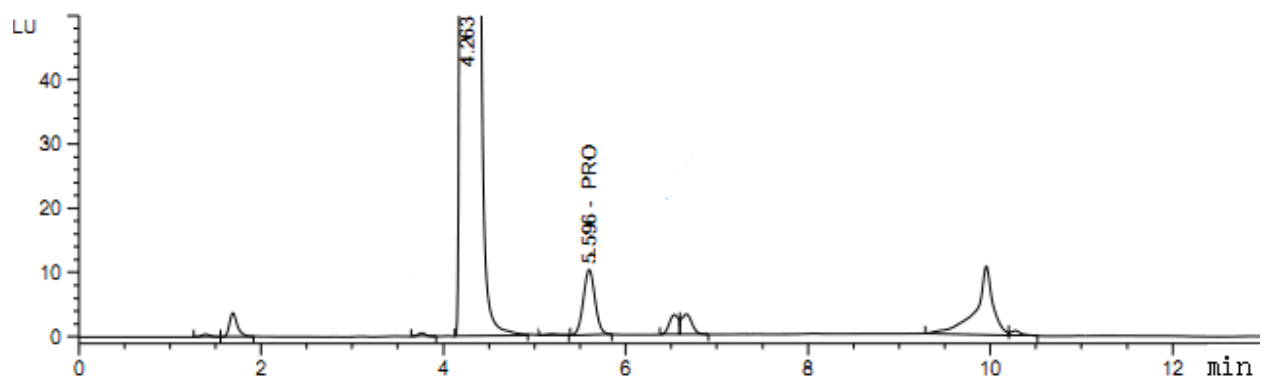


图4 脯氨酸标准溶液色谱图 (5.00 mg/L)

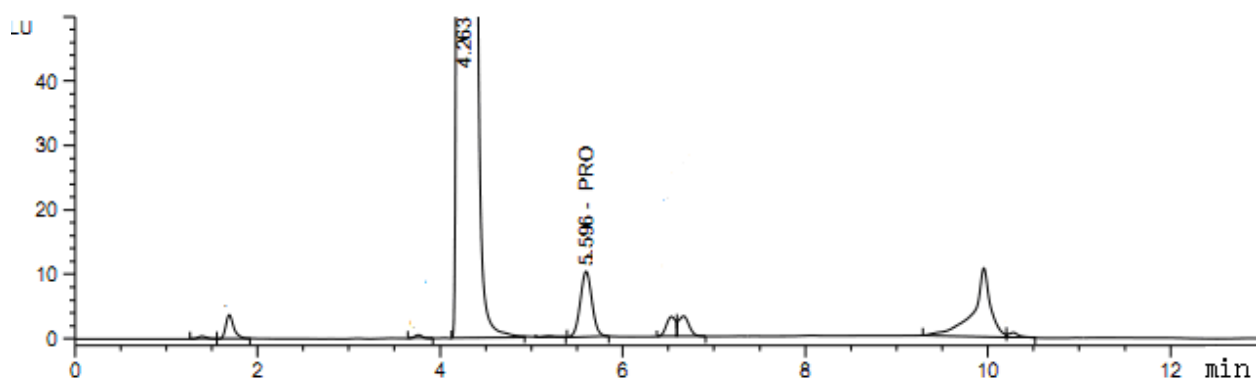


图 5 蜂蜜样品色谱图

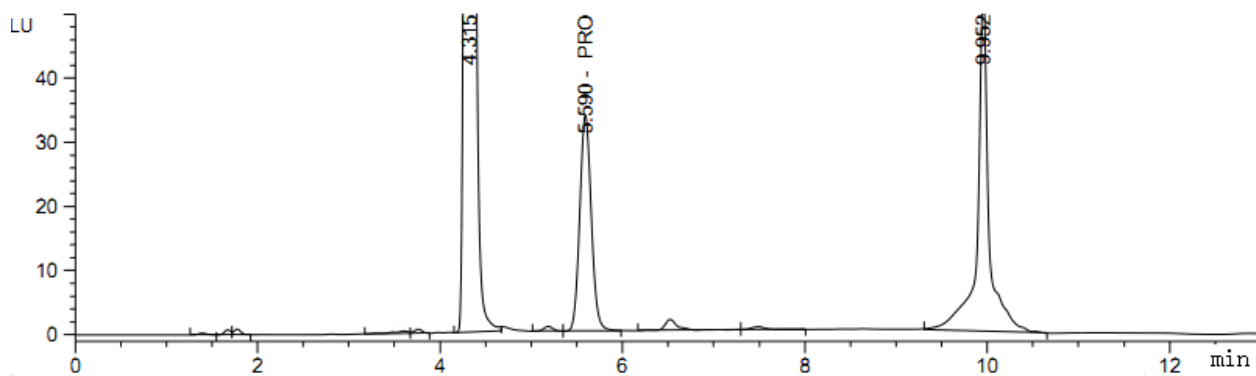


图 6 蜂蜜样品添加色谱图 (500 mg/Kg)

表 4 梯度洗脱程序

时间	A(%)	B(%)	流 速 (mL/min)
0.00	16.00	84.00	0.8
8.00	16.00	84.00	0.8
13.00	40.00	60.00	0.8
18.00	60.00	40.00	0.8
25.00	60.00	40.00	0.8

26.0 0	16.00	84.00	0.8
40.0 0	16.00	84.00	0.8

表 5 梯度洗脱程序

时间	A(%)	B(%)	流 速 (mL/min)
0.00	100	0	1.0
0.5	75	25	1.0
7.00	75	25	1.0
8.00	0	100	1.0
10.0 0	0	100	1.0
12.0 0	100	0	1.0
15.0 0	100	0	1.0

3.2.5 线性关系和检出限

用硼酸缓冲液配制系列浓度的标准工作溶液，分别为 200.00 mg/L，100.00 mg/L，40.00 mg/L，20.00 mg/L，10.00 mg/L，5.00 mg/L，2.50 mg/L，1.25 mg/L，0.625 mg/L，依据标准文本提供的方法衍生，根据峰面积和标准溶液的浓度建立标准曲线（见图 7），在 0.625 mg/L~ 200.00 mg/L 浓度范围内，线性方程为 $y=19.287x-9.1325$ ，其中 x 为脯氨酸浓度 (mg/L)， y 为峰面积，相关系数为 0.9999。

将标准溶液进行系列稀释，根据 3 倍和 10 倍性噪比确定方法检出限和定量限分别为 3.00 mg/kg 和 10.00 mg/kg。

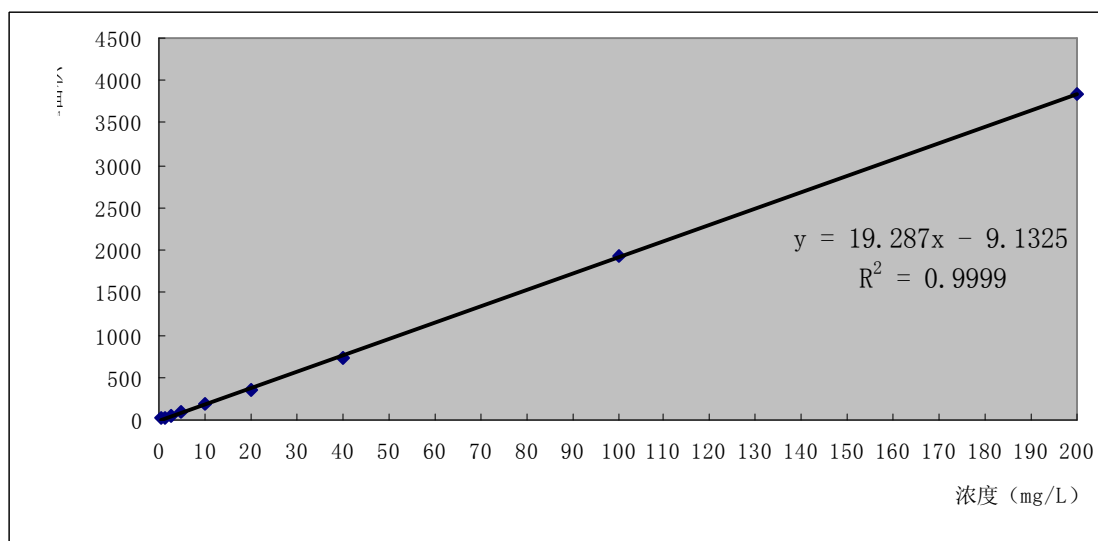


图 7 标准曲线

3.2.6 衍生产物的稳定性

由 Zhang J Z (2011) 报道可知, NBD-F 衍生金刚烷胺, 在室温保存 12 h, 衍生产物仍然稳定, 本研究也分别于衍生后 0.25 h 及衍生后 24 h 测定了标准溶液和蜂蜜样品溶液的脯氨酸衍生物, 两者峰面积均未见明显变化, 这表明脯氨酸的衍生产物在 24 h 内是稳定的。

表 6 衍生后不同时间峰面积

时间 (h)	0.25	24
标准溶液峰面积 (LU*s)	3012.3 2	3015.8 6
样品溶液峰面积 (LU*s)	341.66	347.31

3.2.7 方法的准确度

称取 1 g 蜂蜜样品, 添加一定浓度的脯氨酸, 使其添加量分别为 500.00 mg/kg、250.00 mg/kg、125.00 mg/kg, 混合均匀, 静置 30 min 后, 按标准文本提供的方法进行测定, 每个添加水平重复测定 5 次, 结果见表 2, 回收率为 87.40%~94.72%, 变异系数为 2.09%~3.10%。

表 7 方法的准确性测定结果 (n=5)

样品中脯氨酸含量±SD (mg/kg)	添加量 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率±SD (%)	变异系数 (%)

	500.00	92.9	90.2		88.0			
		1	7	89.4	5	91.6	90.45±1.89	2.09
370.63 ± 4.62	250.00	87.7	89.9		90.6	93.3	90.70±2.07	2.28
		8	5	91.7	9	6		
	125.00	88.5	90.0	87.4	90.5	94.7	90.23±2.80	3.10
		0	2	0	2	2		

3.2.8 衍生产物扫描光谱图

在优化的色谱条件下，将荧光检测器换为二极管阵列检测器，在 200-600 nm 下，分别扫描脯氨酸标准品衍生产物光谱图和蜂蜜样品的脯氨酸衍生产物光谱，在 5.6 min 处出峰的光谱图见图 8 和图 9，标准品和蜂蜜样品的光谱图结果一致，这说明在 5.6 min 的色谱图为蜂蜜中脯氨酸的衍生产物，未受其它杂质的干扰。

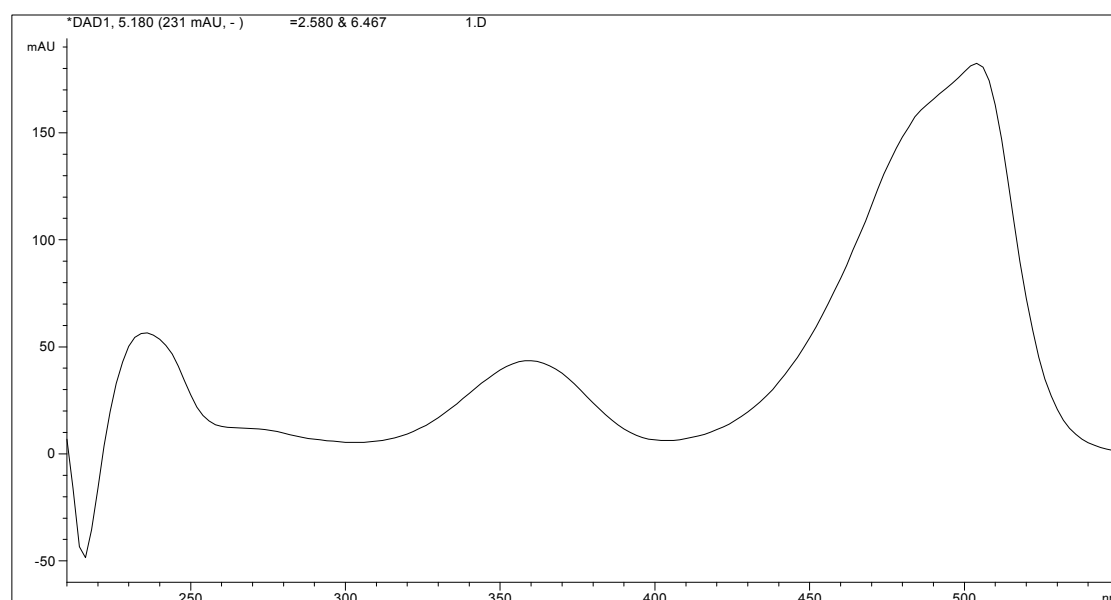


图 8 脯氨酸标准品衍生产物光谱图 (20 μg/mL)

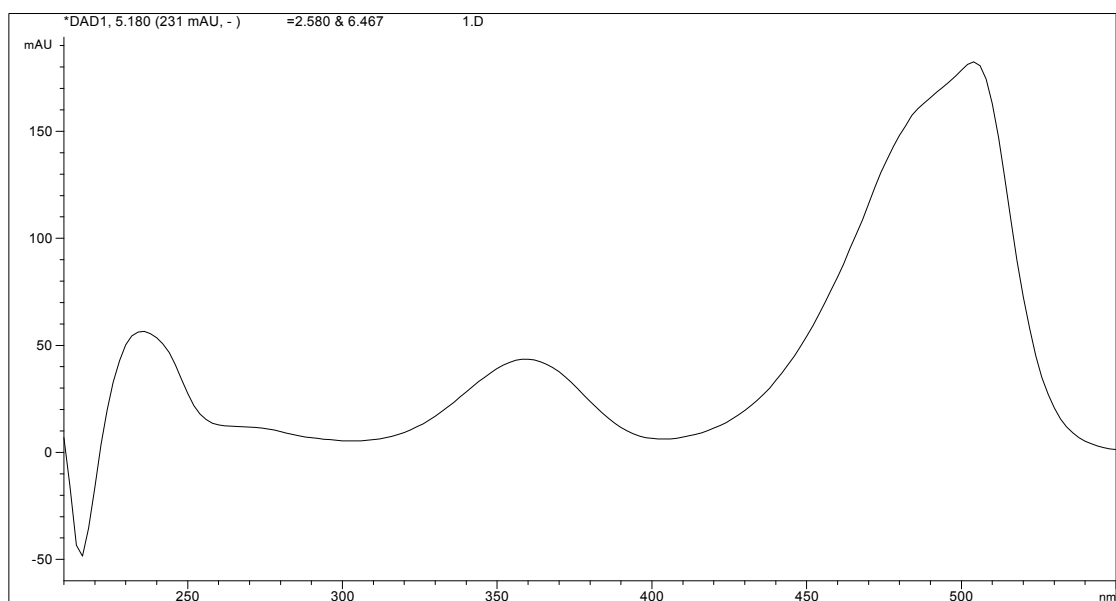


图 9 蜂蜜样品衍生产物光谱图

3.2.8 方法的精密度

3.2.9 方法的重复性

取 3 种不同植物源的蜂蜜样品，按标准文本操作条件提取、衍生测定其脯氨酸含量，每个样品重复检测 5 次，结果见表 8。

表 8 方法的重复性测定结果 (n=5)

样品	脯氨酸含量 $\bar{X} \pm SD$ (mg/Kg)	变异系数 CV (%)
枣花	370.63 ± 4.62	1.25
荆条	279.16 ± 5.31	1.90
荔枝	148.40 ± 4.07	2.81

从表 8 结果可知，该方法变异系数为 1.25~2.81%。

3.2.10 方法的再现性

3.2.11 实验室内方法的再现性

取 3 种不同品种的蜂蜜样品，按照给出的操作条件由相同人员在连续 3 天进行检测，每次每个样品重复测定 3 次，结果见表 9。

表 9 方法的再现性试验结果 (n=9)

样品	脯氨酸含量 $\bar{X} \pm SD$ (mg/Kg)	变异系数 CV (%)
枣花	372.77 ± 6.29	1.69
荆条	277.58 ± 5.74	2.08
荔枝	151.75 ± 5.04	3.32

从表 9 可知，该方法的实验室内组间变异系数为 1.69~3.32%。

3.2.11.1 实验室间方法的再现性

参照 GB/T 6379.2-2004 测试方法与结果的准确度（正确度与精密度）第 2 部分和 GB/T 6379.6-2009 《测试方法与结果的准确度（正确度与精密度）第 6 部分》，由本单位及 3 家协作试验室对蜂蜜样品中的脯氨酸进行方法的再现性试验，比对原始数据和试验室间方法的再现性，数据统计结果分别见表 10 和表 11。对表 10 和表 11 的数据进行检查分析，结论如下：

重复性标准差：Sr=4.64

再现性标准差：SR=5.69

重复性限：r=12.99

再现性限：R=15.93

表 10 方法再现性实验室间比对原始数据

实验室名称	脯氨酸含量 (mg/Kg)				
	1	2	3	4	5
1	373.35	364.80	369.33	368.82	376.87
2	387.94	373.69	376.74	375.22	379.80
3	363.85	364.37	369.56	374.75	361.77
4	371.50	368.40	374.59	369.44	364.80
5	365.15	362.07	371.03	372.54	365.96
6	371.24	370.55	368.21	375.07	364.21

表 11 蜂蜜样品试验室间方法的再现性数据统计结果

实验室	实验室名称		平均值 X		重复 n		方差 s ²
1			370.63		5		21.32
2			378.67		5		31.91
3			366.86		5		27.65
4			369.74		5		13.23
5			367.35		5		18.78
6			369.85		5		16.04
检验单元方差 (科克伦检验)	最大方差		科克伦统计量		科克伦检验临界值		判定
	实验室 3		0.248		0.480(5%); 0.564(1%)		正常
检验单元平均值 (格拉布斯检验)	单个 低值	单个 高值	两个 低值	两个 高值	格拉布斯检验临界值		判定
					单值检验 临界值	两个值检验 临界值	
	0.686	1.703	0.543	0.0629	1.715(5%) 1.764(1%)	0.0090(5%) 0.0018(1%)	正常
比对试验 数据统计结果	参加实验室的数目 (m)						6
	可接受结果的数目						4

平均值 (%),	$\bar{X}_m = \frac{\sum n_i x_i}{\sum n_i}$	370.47
重复性标准差 (S _r)	$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m s_i^2}{m}}$	4.64
重复性变异系数(%)		1.25
重复性限 (r),	$r = 2.8 \times S_r$	12.99
组间变动性方差(S _L ²)	$S_L^2 = \frac{m \sum_{i=1}^m \bar{x}_i^2 - (\sum_{i=1}^m \bar{x}_i)^2}{m(m-1)} - \frac{s_r^2}{n}$	10.81
再现性标准差 S _R	$S_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}$	5.69
再现性变异系数 (%)		1.54
再现性限 (R)	$R = 2.8 \times S_R$	15.93

3.3 实际样品的检测

用本研究方法对不同蜜源品种的脯氨酸含量进行分析,共检测6个蜜源品种25个蜂蜜样品,均未有杂质干扰,结果见表11。由表11可以看出,由于椴树蜜、油菜蜜和荔枝蜜水分含量较高,测定的16个蜂蜜样品中仅有1个样品的脯氨酸含量大于180 mg/kg;而荆条蜜、枣花蜜和多花种蜂蜜中水分含量相对较低,所有样品的脯氨酸含量均大于180 mg/kg,但枣花蜜的脯氨酸含量高于荆条蜜。这说明蜂蜜中的脯氨酸含量不仅与成熟度有关,还受蜜源品种的影响。

表 11 蜂蜜中脯氨酸含量测定结果

蜜源品种 Flora	脯氨酸含量 (mg/Kg) Content of proline				水分含量 (%) Moisture content
	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值±SD Mean±SD	< 180 mg/kg 样品数 Number	
椴树蜜 (n=6)	80.5	241.7	136.1±62.3	5	20.1~25.6
油菜蜜 (n=6)	37.3	149.6	88.3±52.9	6	21.8~25.6
荔枝蜜 (n=4)	137.3	206.6	164.7±30.5	3	22.9~23.7
荆条蜜 (n=5)	180.9	269.8	235.1±36.4	0	19.8~22.2
枣花蜜 (n=4)	295.1	354.3	319.9±25.2	0	19.5~20.5
多花种蜂蜜 (n=3)	256.8	426.4	322.7±90.9	0	18.3~19.4

3.4 结论

建立了蜂蜜中脯氨酸含量的液相色谱检测方法,具有检测时间短、前处理简单,灵敏度高和准确度高的特点,是一种有效的蜂蜜中脯氨酸检测方法。

4 采用国际标准和国外先进标准情况

无。

5 与有关的现行标准、法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。标准的名称、内容及指标与现行的国家标准之间不存在包含、重复、交叉问题。

6 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

7 作为强制性标准或推荐性标准的建议

建议作为推荐性标准颁布实施。

8 贯彻标准的要求和措施建议

无。

9 废止现行有关标准的建议

无。

参 考 文 献

- [1]GB 14963-2003 食品安全国家标准 蜂蜜.
- [2]Nikolett Czipa. Comparative study of honeys with different origin, the effect of production-forming on the quality. PhD Thesis, University Of Debrecen, 2012:17.
- [3]陈杰, 杨玉彬, 胡月婷等. 油菜蜜和枣花蜜中脯氨酸含量的测定. 中国养蜂, 2010,31 (10): 11-13.
- [4]Gardener MC, Gillman MP. The taste of nectar-a neglected area of pollination. *Oikos*, 2002,98: 552-557.
- [5]Bogdanov S, Lüllmann C, Martin P, Von der Ohe W, Russmann H, Vorwohl G, et al. Honey quality and international regulatory standards: Review by the International Honey Commission.*Bee World*, 1999,80(2): 61-69.
- [6]Analysis of honey - Determination of proline content DIN 10754-2002.
- [7]SN/T 0850-2000 进出口蜂蜜中脯氨酸的测定方法 分光光度法 (已废止) .
- [8]Watanabe Y and Imai K. Fluorometric Assay of Amino Acids and Amines by Use of 7-Fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole(NBD-F) in High-Performance Liquid Chromatography. *J.Chromatogr*,1982,239: 723.
- [9]Watanabe Y and Imai K. "High-Performance Liquid Chromatography and Sensitive Detection of Amino Acids Derivatized with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole", *Anal. Biochem*, 1981, 116: 471-472.
- [10] Watanabe Y and Imai K. "Liquid Chromatographic Determination of Amino and Imino Acids and Thiols by Postcolumn Derivatization with 4-Fluoro-7-nitrobenzo-2, 1, 3-oxadiazole", *Anal. Chem*, 1983, 55 : 1786-1791.
- [11]Zhang JZ, Zhao J, Zhou JH, Xue XF, Wu LM, Chen F. Determination of Amantadine Residue in honey by Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography with Pre-column Derivation and Fluorometric Detection. *Chinese Journal of Chemistry*;2011,29: 1764-1768.
- [12]Vázquez-Ortíz F.A,Morón-Fuenmayor O.E and González-Méndez N.F. Hydroxyproline Measurement by HPLC:Improved Method of Total Collagen Determination in Meat Samples.*Chromatography and Related Technologies*, 2005, 27 (17): 2771-2780.
- [13]GB/T 6397. 1-2004 测定方法与结果的准确度 (正确度与精密度) 第 1 部分: 总则与定义
- [14]GB/T 6397. 2-2004 测定方法与结果的准确度 (正确度与精密度) 第 2 部分: 确定标准测定方法重复性与再现性的基本方法.
- [15]GB/T 6397. 2-2009测定方法与结果的准确度 (正确度与精密度) 第6部分: 准确度值的实际应用.