

T/ CPPC

中国生产力促进中心协会团体标准

T/ CPPC XXXX—XXXX

特殊医学用途配方食品中氨基酸的测定 高 效液相色谱法

Determination of amino acids in formulated foods for special medical purposes high-
performance liquid chromatography

(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。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国生产力促进中心协会 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 原理.....	1
5 检验方法.....	1
6 仪器与设备.....	1
7 检验步骤.....	1
8 分析结果.....	3
9 精密度.....	3
10 其他.....	3

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。

本文件由中国生产力促进中心协会特医食品与生物活性肽工作委员会提出。

本文件由中国生产力促进中心协会标准化工作委员会归口。

本文件起草单位：XXX，XXX，XXX

本文件主要起草人：XXX，XXX

声明：本文件的知识产权归属于中国生产力促进中心协会特医食品与生物活性肽工作委员会，未经中国生产力促进中心协会特医食品与生物活性肽工作委员会同意，不得印刷、销售。任何组织、个人使用本文件开展认证、检测等活动应经中国生产力促进中心协会特医食品与生物活性肽工作委员会批准授权

特殊医学用途配方食品中氨基酸的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了特殊医学用途配方食品中氨基酸的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于特殊医学用途配方食品蛋白质组件中的16种氨基酸（天冬氨酸，丝氨酸，谷氨酸，脯氨酸，羟脯氨酸，甘氨酸，丙氨酸，缬氨酸，甲硫氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，酪氨酸，苯丙氨酸，赖氨酸，组氨酸，色氨酸）的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用规格验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的氨基酸经氢氧化锂溶液水解，一级氨基酸用邻苯二甲醛（OPA）、二级氨基酸用 9-芴甲基氯甲酸酯（FMOC）进行衍生，用具有紫外检测器/二极管阵列检测器的高效液相色谱检测。

5 检验方法

外标法定量。

6 仪器与设备

- 6.1 天平：感量 0.0001g、感量 0.001g。
- 6.2 聚四氟乙烯水解管：配衬管和密封垫。
- 6.3 恒温干燥箱：可达到 $110^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.4 离心机：转速不低于 4000r/min。
- 6.5 高效液相色谱仪：配自动进样器及紫外检测器或二极管阵列检测器。

7 检验步骤

7.1 样品准备

平行做两份试验，称取样品50–100mg（精确至0.0001g），置于聚四氟乙烯水解管衬管中，加1.5mL 氢氧化锂溶液，充氮1min，旋紧密封盖后放入 $110^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱中，水解20h，取出水解管，冷却至室温，用乙酸钠缓冲溶液将水解液定量转移至25mL容量瓶中，并用上述缓冲溶液定容，离心或过0.45 μm滤膜过滤，液相色谱测定。

7.2 试剂准备

除特殊注明外，本标准所用试剂均为分析纯。

7.2.1 水:符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

7.2.2 甲醇:色谱纯。

7.2.3 乙腈:色谱纯。

7.2.4 氢氧化钾溶液(0.1mol/L):称取 0.56 g 氢氧化钾,溶解于 100mL 水中,即得。

7.2.5 氢氧化锂溶液(4mol/L):称取 83.9 g 氢氧化锂,溶解于 500mL 水中,即得。

7.2.6 乙酸钠缓冲溶液(0.0085 mol/L Na⁺, pH=4.5):称取 0.70g 无水乙酸钠,溶解于 1000mL 水中,用冰乙酸调节 pH 为 4.5。

7.2.7 流动相溶液 A:含 10mM 磷酸氢二钠, 10mM 硼酸钠的缓冲溶液,用盐酸调 pH 至 8.2。

7.2.8 流动相溶液 B:甲醇:乙腈:水(45:45:10, 体积比)。

7.3 氨基酸标准溶液

分别称取所需测定的氨基酸标准品,用 0.1N 盐酸溶液配制成浓度为 1000nmol/mL 溶液,并逐级稀释为 50, 100, 250, 500nmol/mL 的工作溶液。

7.4 衍生化试剂

7.4.1 硼酸盐缓冲试剂:0.4M 浓度 pH10.2 的硼酸盐水溶液。

7.4.2 FMOc 试剂:FMOc 溶解于 0.4M 硼酸盐缓冲溶液和 3-巯基丙酸中,配成 2.5mg/mL 浓度。

7.4.3 OPA 试剂:OPA 溶解于 0.4M 硼酸盐缓冲溶液和 3-巯基丙酸中,配成 10mg/mL 浓度。

7.4.4 样稀释剂:100mL 流动相 A 中加入 1.2mL 浓磷酸。

7.5 液相色谱条件

7.5.1 液相色谱仪:Infinity LC 1260。

7.5.2 液相色谱柱:Poroshell HPH-C18, 4.6×100mm, 2.7 μm。

7.5.3 柱温:40℃。

7.5.4 流速:1.5mL/min。

7.5.5 流动相 A:含 10mM 磷酸氢二钠, 10mM 四硼酸钠的缓冲溶液,用盐酸调 pH 至 8.2。

7.5.6 流动相 B:甲醇:乙腈:水(45:45:10);梯度洗脱。

7.5.7 检测器 338nm, 10nm 带宽;参比 390nm, 20nm 带宽(一级氨基酸)。

7.5.8 262nm, 16nm 带宽;参比 324nm, 8nm 带宽(二级氨基酸)。

7.5.9 样品衍生:按如下样品衍生程序使用自动进样器编程衍生。

7.5.10 吸取缓冲溶剂->吸取 OPA 衍生试剂->吸取样品->吸取 FMOc 衍生试剂->混合衍生->进样。

7.5.11 按如下梯度表运行色谱梯度

时间[min]	A[%]	B[%]	C[%]	D[%]	流量[mL/min]	最大压力限值[bar]
0.00	98.0	2.0	0.0	0.0	1.500	600.00
0.35	98.0	2.0	0.0	0.0	-	-
13.40	43.0	57.0	0.0	0.0	-	-
13.50	0.0	100.0	0.0	0.0	-	-
15.70	0.0	100.0	0.0	0.0	-	-
15.80	98.0	2.0	0.0	0.0	-	-
18.00	98.0	2.0	0.0	0.0	-	-

8 分析结果

试样中氨基酸的含量按公式(1)计算。

$$W = \frac{p \times V \times M_w}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

W——试样中氨基酸的含量的数值，单位为微克每百克(mg/100g)；

p——根据标准曲线计算得到的氨基酸的质量浓度的数值，单位为纳摩尔每毫升(nmol/mL)

V——试样溶液定容体积的数值，单位为毫升(mL)；

M_w——被测氨基酸摩尔质量，单位为g/mol

M——测试样品称样量的数值，单位为克(g)；

1000——浓度换算系数

以2次测定结果的算术平均值表示，计算结果保留3位有效数字。

9 精密度

9.1 重复性

在重复性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

9.2 再现性

在再现性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

10 其他

本文件的检出限：当样品取样量为100mg、定容体积为25mL时，脯氨酸的检出限为44.8mg/100g。

本文件的定量限：当样品取样量为100mg、定容体积为25mL时，脯氨酸的定量限为149.5mg/100g。