

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240904004

引用格式: 李艳明, 王坤, 李敏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中氨基酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(9): 277-288.

LI YM, WANG K, LI M, *et al.* Determination of amino acids content in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(9): 277-288. (in Chinese with English abstract).

高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中氨基酸含量

李艳明¹, 王坤^{2*}, 李敏¹, 王小利¹, 曹娟³

(1. 滨州市检验检测中心, 滨州 256600; 2. 滨州职业学院健康学院, 滨州 256603;
3. 滨州中裕食品有限公司, 滨州 256600)

摘要: 目的 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)同时检测猪肉各部位中多种氨基酸的方法。**方法** 样品以酸化高温水解、酸化微波水解、碱化高温水解方式分别进行提取, 采用 HPLC-MS/MS 进行分析, 电喷雾离子源正离子模式, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式采集, 以甲酸水溶液-甲酸的甲醇乙腈(1:4, V:V)溶液作为流动相进行梯度洗脱。**结果** 以酸化微波水解方式提取, 时间短、效率高。该检测方法在线性范围内关系良好, 相关系数 r^2 在 0.9905~0.9956 之间, 检出限为 0.012~0.133 ng/mL, 定量限为 0.038~0.444 ng/mL, 回收率为 85.58%~98.84%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)在 0.68%~6.71%之间。**结论** 该方法过程简单, 具有良好的重复性和稳定性, 不仅可用于猪肉各部位中多种氨基酸的同时检测, 达到高通量快速检测的目的, 而且还能够有效监测猪肉产品的掺假行为。

关键词: 猪肉; 氨基酸; 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of amino acids content in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Yan-Ming¹, WANG Kun^{2*}, LI Min¹, WANG Xiao-Li¹, CAO Juan³

(1. Binzhou Inspection and Testing Center, Binzhou 256600, China; 2. School of Health, Binzhou Polytechnic, Binzhou 256603, China; 3. Binzhou Zhongyu Food Industry Co., Ltd., Binzhou 256600, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous detection of multiple amino acids in each part of pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by acidizing high-temperature hydrolysis, acidizing microwave hydrolysis and alkalization high-temperature hydrolysis, determined by HPLC-MS/MS, electrospray ionization in positive ion mode, multiple reaction monitoring (MRM), used formic acid solution-methanol acetonitrile (1:4, V:V) solution of formic acid as mobile phase with gradient elution. **Results** It was extracted by acidizing microwave hydrolysis with short time and high efficiency. The detection method had a good relationship in the linear range, r^2 was between 0.9905 and 0.9956, the limits of detection were 0.012-0.133 ng/mL, the limits of quantitation were 0.038-0.444 ng/mL, the average

收稿日期: 2024-09-04

第一作者: 李艳明(1988—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: 1334876467@qq.com

*通信作者: 王坤(1985—), 男, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: sqqdwk709938688@126.com

recoveries were in the range 85.58% and 98.84%, the relative standard deviations (RSDs) were 0.68%–6.71%.

Conclusion The method has simple process, good repeatability and stability, and can not only be used for simultaneous detection of multiple amino acids in each part of pork to achieve the purpose of high-throughput and rapid detection, but also can effectively monitor the adulteration behavior of pork products.

KEY WORDS: pork; amino acid; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

猪是人类最早驯化的家畜之一,猪肉可为人类提供高蛋白质而广受欢迎,我国猪肉年消费量占全球前列^[1]。随着居民消费水平的不断提高,人们对猪肉品质也有更高要求,滨州当地中裕猪肉因其独特的饲养方式和场所,在风味层面重现了 30 年前猪肉的香味特征。^[2]猪肉中的香味来自于多种化学成分,其中氨基酸的种类和含量是影响猪肉风味和品质的重要因素之一^[3]。

氨基酸作为构成蛋白质的基本单位^[4],目前其检测方法多种多样,主要有毛细管电泳法^[5]、氨基酸分析法^[6-8]、气相色谱法^[9-10]、气相色谱-串联质谱法^[11]、离子交换色谱法^[12]、高效液相色谱法^[13-15]、液相色谱-串联质谱法^[16-18]、超临界流体色谱法^[19]、近红外光谱法^[20]。其中,最常用的方法有氨基酸分析法、高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。氨基酸具有难挥发、无紫外吸收等自身性质^[21-22],使得在采用液相色谱仪对氨基酸进行检测时,往往需要衍生处理,常用的衍生试剂包括异硫氰酸苯酯^[23]、6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚氨基氨基甲酸酯(6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC)^[24-25]、邻苯二甲醛^[26-28]等。而氨基酸分析法作为国标方法,采用的是茚三酮柱后衍生。柱前或柱后衍生,均存在衍生过程复杂,衍生试剂消耗量大,重现性差等缺点,这些不足以使得检验周期拉长,实验效率大大降低。相比于柱前或柱后衍生,高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)具有显著优势,它能够直接对样品提取液直接分析检测,无需复杂烦琐的衍生步骤,极大地提高了检测效率,同时也减少了试剂的消耗,为氨基酸的准确快速检测提供了一种新的可靠途径^[29-30]。另外,与 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》相比,前处理方法创新采用酸化微波水解的方式,时间由原来的 22 h 缩短至 3 h,为实际样品检测节省了宝贵的时间成本。因此,本研究在系统优化色谱条件、质谱条件和前处理方法的基础上,测定猪肉各个部位的氨基酸含量,以达到建立一种快速高通量的 HPLC-MS/MS 检测方法。该方法不仅可用于猪肉中氨基酸的质量控制,确保猪肉的品质符合相关标准,还能够有效监测猪肉产品的掺假行为,为保护当地产品品牌提供坚实的技术保障,维护市场秩序和消费者权益。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Agilent1290-6460QQQ 高效液相色谱串联质谱仪[配有电喷雾模式(electro spray ionization, ESI)离子源并装有 MassHunter B.08.00 数据处理软件]、ZORBAX Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm)(美国 Agilent 公司); ME204T 电子天平(精度 0.0001 g, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司); MILLI-Q ADWANTAGE A10 超纯水机(美国密理博公司); 14165 全自动氮吹仪(美国 Organomation 公司); Mars6 微波消解仪[培安 CEM 微波化学(中国)技术中心]; 水相针式滤器(0.22 μm, 上海安谱实验科技股份有限公司); 800A 多功能粉碎机(东莞市房太电器有限公司)。

1.2 材料与试剂

猪肉,中裕食品有限公司样品。

乙腈、甲醇、盐酸(优级纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);氨基酸标准品:天冬氨酸(aspartic acid, Asp, CAS 号 6899-03-2)、苏氨酸(threonine, Thr, CAS 号 72-19-5)、丝氨酸(serine, Ser, CAS 号 56-45-1)、谷氨酸(glutamic acid, Glu, CAS 号 56-86-0)、脯氨酸(proline, Pro, CAS 号 147-85-3)、甘氨酸(glycine, Gly, CAS 号 56-40-6)、丙氨酸(alanine, Ala, CAS 号 56-41-7)、半胱氨酸(cysteine, Cys, CAS 号 56-89-3)、缬氨酸(valine, Val, CAS 号 72-18-4)、甲硫氨酸(methionine, Met, CAS 号 63-68-3)、异亮氨酸(isoleucine, Ile, CAS 号 73-32-5)、亮氨酸(leucine, Leu, CAS 号 3303-31-9)、酪氨酸(tyrosine, Tyr, CAS 号 60-18-4)、苯丙氨酸(phenylalanine, Phe, CAS 号 63-91-2)、赖氨酸(lysine, Lys, CAS 号 56-87-1)、组氨酸(histidine, His, CAS 号 71-00-1)、精氨酸(arginine, Arg, CAS 号 74-79-3)(浓度均为 1 mmol/L, 坛墨质检科技股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

猪肉不同部位(里脊肉、梅花肉、前腿肉、后腿肉、五花肉)分别取 2 kg 瘦肉部分,用粉碎机充分粉碎混匀,准确称取 0.5000 g 样品于 50 mL 消解管中,加入 6 mol/L 盐酸溶液 15 mL,抽真空下充入氮气 5 min, 130 °C、1000 W 微波水解 3 h,冷却,转移定容至 50 mL 离心管中,涡旋振荡 5 min, 3000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 1 mL 氮吹至干,流动相复溶并转移定容至 20 mL 容量瓶中,0.22 μm 水相针式滤膜过滤, HPLC-MS/MS 检测。

1.3.2 标准溶液的配制

准确量取标准品各 1 mL 于 20 mL 容量瓶中,用 0.02 mol/L 盐酸定容后,配制成浓度为 0.05 $\mu\text{mol/mL}$ 的标准储备液,使用前,用流动相稀释标准储备液,配制成浓度为 1~50 nmol/mL 的标准系列工作溶液。

1.3.3 高效液相色谱条件

色谱柱: ZORBAX Extend-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5.0 μm); 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL ; 流动相: A: 0.1%甲酸水溶液, B: 0.1%甲酸的甲醇乙腈(1:4, V:V)溶液, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Condition of gradient elution

时间/min	A/%	B/%	流速/(mL/min)
0.00	95.00	5.00	0.4
6.00	5.00	95.00	0.4
8.00	5.00	95.00	0.4
8.01	95.00	5.00	0.4
10.00	95.00	5.00	0.4

1.3.4 质谱条件

电离模式: ESI⁺; 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)模式; 毛细管电压 3500 V; 喷嘴电压 500 V; 干燥气温度 300 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流量 5 L/min; 雾化气压力 45 psi; 鞘气温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气流量 11 L/min; 17 种氨基酸的色谱-质谱参数见表 2。

1.4 定性、定量方法

定性方法: 在 HPLC-MS/MS 检测时, 定性方式有两种, 一个是保留时间, 另一个是离子丰度比, 标准物质与样品中的各个氨基酸, 保留时间需一致, 之后再考虑离子丰度比, 并且与标准品进行比较时, 选择与样品中氨基酸浓度相近的标准品进行丰度比比较, 需满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中所规定的偏差范围, 保留时间与离子丰度比均一一对应, 方可判定样品中含有该物质。

定量方法: 各个氨基酸的浓度点与其响应值作回归方程, 回归方程的形式通常为 $Y=mX+b$, 其中 Y 代表测得的面积, X 代表浓度, m 和 b 分别是回归方程的斜率和截距, 样品中的氨基酸对应的响应值, 根据回归方程即可得出其摩尔浓度, 进而得出百分含量。

1.5 数据处理

实验重复测定 3 次, HPLC-MS/MS 配有 MassHunter B.08.00 数据处理软件, 应用 Origin 61 软件绘制谱图。

2 结果与分析

2.1 色谱质谱参数的优化

每个氨基酸的响应值各不相同, 为了使其较好的分离, 选择合适的色谱柱、流动相以及洗脱程序对色谱参数

表 2 17 种物质色谱-质谱参数

Table 2 Chromatography-mass spectrometry parameters of 17 kinds of substances

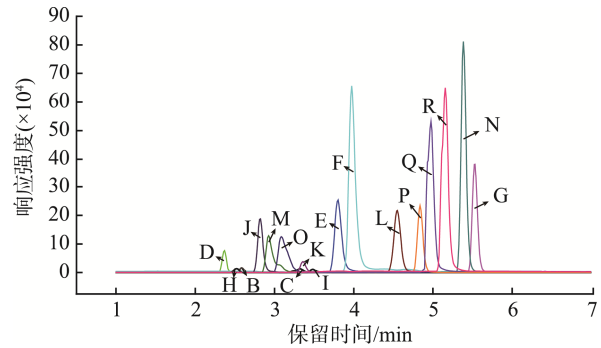
化合物名称	母离子	碰撞电压 /V	子离子	碰撞能量 /V
Asp	134.1	72	74.1*	13
	134.1	72	88.1	9
Thr	120.1	139	77.1*	29
	120.1	139	51.1	49
Ser	106.1	60	60.1*	9
	106.1	60	88.0	9
Glu	148.1	77	84.1*	17
	148.1	77	56.1	33
Gly	76.0	45	58.0	10
	76.0	45	30.0*	10
Ala	90.1	45	44.0*	10
	90.1	45	22.0	10
Cys	122.0	141	59.1*	25
	122.0	141	90.8	29
Val	118.1	72	72.1*	9
	118.1	72	55.1	25
Met	150.1	77	56.1*	17
	150.1	77	61.1	25
Ile	132.1	72	86.1*	9
	132.1	72	69.1	17
Leu	132.1	77	86.1*	9
	132.1	77	69.1	17
Tyr	182.1	82	136.1*	9
	182.1	82	91.1	33
Phe	166.1	77	120.1*	13
	166.1	77	77.1	49
Lys	147.1	77	84.1*	17
	147.1	77	130.1	9
His	156.1	92	110.1*	13
	156.1	92	83.1	25
Arg	175.1	97	70.1*	25
	175.1	97	60.1	13
Pro	116.1	87	70.1*	17
	116.1	87	68.2	37

注: *为定量离子。

进行了优化。C₁₈ 柱是常用的 HPLC 色谱柱, 能够有效分离氨基酸, 并且分离效果稳定, 重现性好。考察了不同流动相对氨基酸保留时间、峰面积及分离效果的影响。配制 20 nmol/L 的混合标准溶液, 流动相条件分别为(1) A: 0.1%甲酸水, B: 乙腈; (2) A: 0.1%甲酸水溶液, B: 0.1%甲酸乙腈溶液; (3) A: 0.1%甲酸水溶液, B: 0.1%甲酸甲醇乙腈(1:4, V:V)溶液; (4) A: 0.1%甲酸 20 mmol/L 乙酸铵水溶液, B: 0.1%甲酸甲醇乙腈(1:4, V:V)溶液。酸化后的水和乙腈比单独水相中加甲酸响应值高; 乙腈中加入甲醇后可以明显提高分离度, 这是

因为加入甲醇后改变了溶剂的极性和洗脱能力, 从而影响分离效果; 水相中加入乙酸铵大大降低了氨基酸的峰面积, 因此选择(3) A: 0.1%甲酸水溶液, B: 0.1%甲酸的甲醇乙腈(1:4, V:V)溶液作为流动相最佳。不同梯度模式对色谱峰分离效果也同样有影响, 流动相 B 的起始浓度为 5%时峰面积最高, 并且 B 达到 95%的时间为 6 min 时分离效果最佳。梯度洗脱程序见表 1。

配制 20 nmol/mL 的各种氨基酸标准品, 选择 ESI+模式, 对 17 种物质进行参数优化。采用标准样品直接连接质谱的方式, MRM 采集模式, 优化 Precursor Ion、Product Ion、Fragmentor、Collision Energy 等参数, 优化结果见表 2。17 种物质标准溶液的总离子流图(total ion chromatography, TIC)和提取离子流图 MRM 见图 1 和 2。



注: B: Gly; C: Ala; D: Ser; E: Pro; F: Val; G: Thr; H: Cys; I: Asp; J: Lys; K: Glu; L: Met; M: His; N: Phe; O: Arg; P: Tyr; Q: Ile; R: Leu。

图1 17种物质标准溶液的TICs (20 nmol/L)

Fig.1 TICs of standard solution of 17 kinds of substances (20 nmol/L)

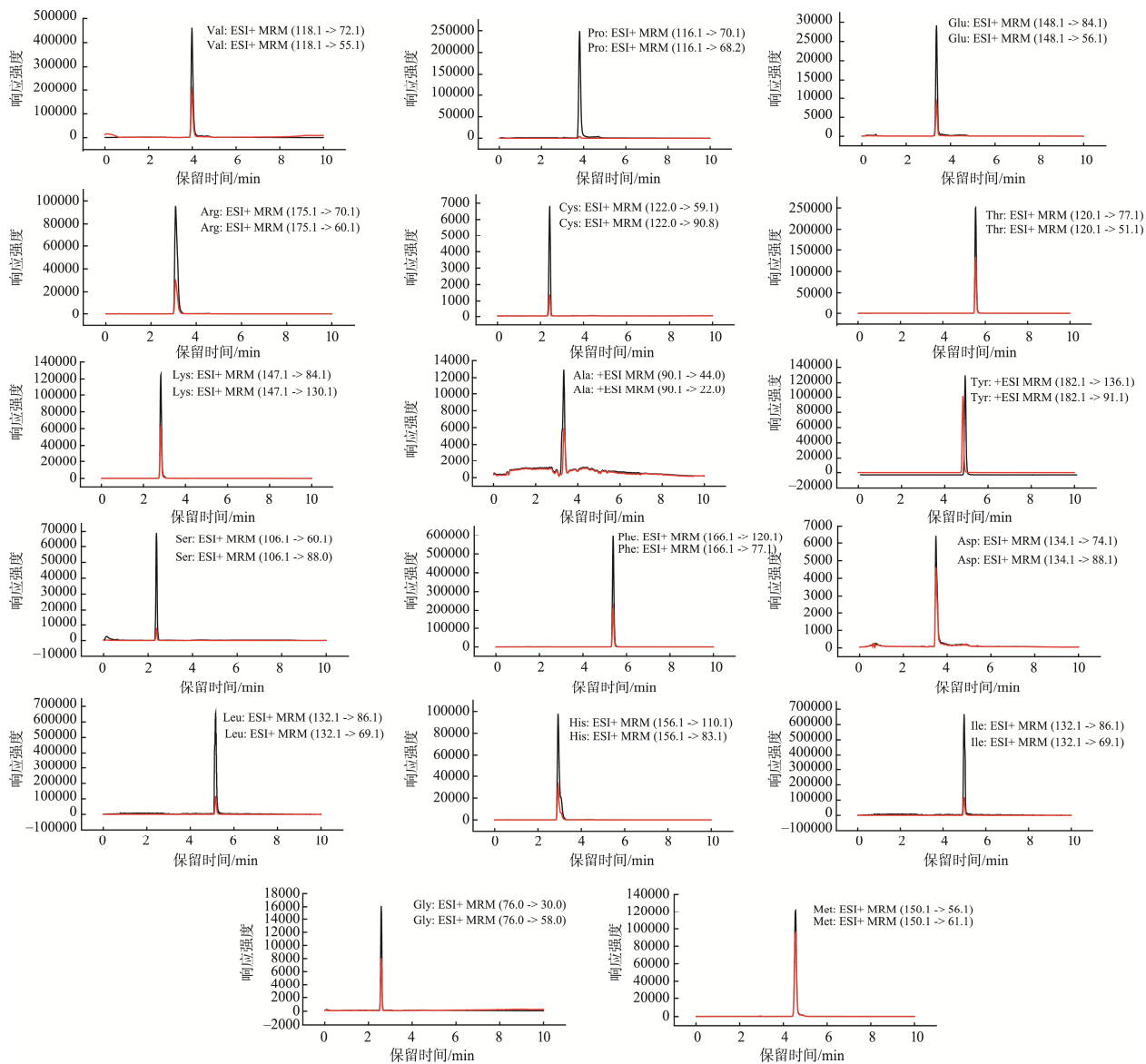


图2 17种物质标准溶液的MRM图(20 nmol/mL)

Fig.2 MRM chromatograms of standard solution of 17 kinds of substances (20 nmol/mL)

2.2 前处理条件的选取

2.2.1 提取方式的选择

样品提取方式, 采用酸化高温水解、酸化微波水解、碱化高温水解方式分别对里脊肉、梅花肉、前腿肉、后腿肉、五花肉进行水解, 酸化高温水解方式是 GB 5009.124—2016 里的试样水解方法, 其水解时间需要 22 h; 酸化微波水解方式提取猪肉中氨基酸, 是利用微波辐射对物质进行加热的方法, 它能够显著加速酸水解过程, 水解时间控制在 3 h 以内; 碱化高温水解方式是样品用 6 mol/L 的氢氧化钠溶液提取, 110 °C 恒温干燥箱水解 20 h, 具体结果见图 3。图 3 显示, 酸化高温水解和酸化微波水解的氨基酸含量相当, 而酸化高温水解时间较长; 碱化高温水解中, Lys、Cys、Ser、Thr 含量很低, 说明碱法高温水解会破坏部分氨基酸, 因此本研究采用酸化微波水解方式进行提取。

2.2.2 提取条件的优化

水解用到的酸包括盐酸、硫酸、硝酸、甲基磺酸等, 其中盐酸在水解过程中不引起氨基酸的消旋作用, 对氨基酸的影响较小, 并且盐酸水解方法在后续质谱分析中具有很好的兼容性, 因此选择盐酸作为提取溶剂。固定提取时间 3 h、提取温度 130 °C, 样品分别用 4 mol/L 盐酸溶液 15 mL,

6 mol/L 盐酸溶液 15 mL, 8 mol/L 盐酸溶液 15 mL 进行提取, 见表 3。对比 5 个部位的氨基酸含量, 6 mol/L 盐酸溶液 15 mL 即 90 mmol 的提取浓度时, 含量较高的 Lys、Asp、Leu 均比 60 mmol 和 120 mmol 时含量高, 而 Met、Tyr 则基本相同, 原因是 60 mmol 的提取溶剂, 浓度较低, 并没有完全提取出氨基酸, 120 mmol 的浓度又会破坏掉部分已生成的氨基酸。选择 90 mmol 的盐酸作为提取溶剂对 17 种化合物的提取效果最佳。

同时又对微波水解的温度和时间进行了相关实验, 固定提取时间 3 h, 分别选择 110、130、150 °C 作为水解温度。130 °C 时的含量整体上明显优于其他两个温度点, 因此选择 130 °C 作为提取温度。固定水解温度 130 °C, 对提取时间进行进一步考察, 分别设置 1、3 和 5 h 作为提取时间。3 h 与 5 h 含量相当, 均大于 1 h 时的含量, 从实验角度考虑, 选择 3 h 更节省时间。具体结果见表 4 和表 5。

2.3 基质效应与溶剂效应

运用质谱检测时, 基质效应是仪器不可避免的一个问题, 基质效应的存在会影响目标物的检出, 另一方面则是溶剂效应的影响, 溶剂效应的存在会导致峰型不规范, 影响目标物的定量检测。

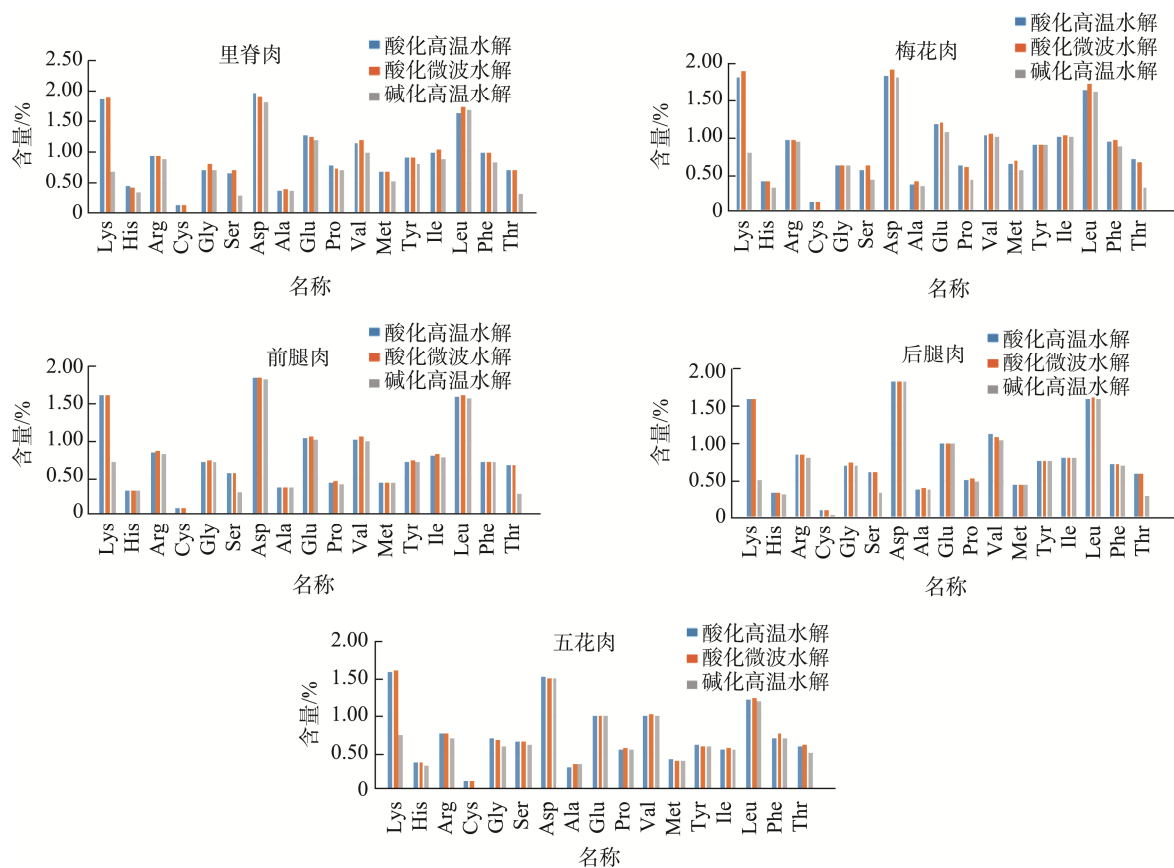


图3 不同提取条件下各化合物含量对比

Fig.3 Comparison of the content of each compound using different extraction conditions

表 3 不同提取液浓度下各化合物含量对比(%)
Table 3 Comparison of the content of each compound in different extraction solution concentrations (%)

化合物	里脊肉			梅花肉			前腿肉			后腿肉			五花肉		
	60 mmol	90 mmol	120 mmol	60 mmol	90 mmol	120 mmol	60 mmol	90 mmol	120 mmol	60 mmol	90 mmol	120 mmol	60 mmol	90 mmol	120 mmol
Lys	1.718	1.907	1.795	1.660	1.882	1.652	1.308	1.604	1.506	1.319	1.610	1.552	1.605	1.635	1.502
His	0.487	0.439	0.528	0.449	0.396	0.403	0.309	0.331	0.283	0.332	0.338	0.288	0.341	0.394	0.388
Arg	0.904	0.950	0.904	0.907	0.942	0.933	0.868	0.856	0.784	0.861	0.847	0.757	0.711	0.779	0.702
Cys	0.155	0.141	0.166	0.103	0.133	0.138	0.113	0.102	0.092	0.104	0.098	0.108	0.087	0.124	0.102
Gly	0.700	0.806	0.703	0.523	0.602	0.519	0.697	0.725	0.478	0.708	0.736	0.414	0.662	0.679	0.604
Ser	0.614	0.712	0.636	0.542	0.606	0.551	0.468	0.568	0.412	0.532	0.605	0.457	0.624	0.662	0.589
Asp	1.708	1.943	1.499	1.709	1.889	1.509	1.646	1.832	1.446	1.774	1.848	1.687	1.342	1.532	1.547
Ala	0.431	0.391	0.379	0.398	0.401	0.336	0.403	0.382	0.302	0.433	0.396	0.332	0.403	0.362	0.390
Glu	1.213	1.265	1.209	1.003	1.179	1.108	0.976	1.045	0.832	0.869	1.009	0.864	0.879	1.016	0.955
Pro	0.693	0.749	0.713	0.432	0.588	0.598	0.389	0.455	0.487	0.402	0.517	0.408	0.550	0.578	0.442
Val	1.082	1.208	1.152	1.002	1.030	1.028	0.893	1.045	1.009	0.835	1.082	0.947	0.877	1.036	0.998
Met	0.661	0.688	0.690	0.589	0.666	0.653	0.335	0.442	0.408	0.357	0.439	0.436	0.400	0.408	0.416
Tyr	0.847	0.910	0.902	0.764	0.889	0.823	0.711	0.726	0.732	0.706	0.768	0.711	0.619	0.602	0.554
Ile	0.898	1.042	0.947	0.832	1.009	0.965	0.776	0.823	0.836	0.714	0.806	0.796	0.324	0.587	0.566
Leu	1.433	1.741	1.489	1.369	1.702	1.392	1.105	1.602	1.507	1.063	1.618	1.524	1.165	1.245	1.208
Phe	0.929	1.005	0.973	0.865	0.953	0.857	0.465	0.723	0.708	0.574	0.711	0.741	0.624	0.776	0.792
Thr	0.664	0.726	0.702	0.542	0.662	0.556	0.411	0.672	0.652	0.635	0.601	0.621	0.594	0.614	0.497
TAA	15.14	16.62	15.39	13.69	15.53	14.02	11.87	13.93	12.47	12.22	14.03	12.64	11.81	13.03	12.25

注: TAA: 氨基酸总量(total amino acids), 下表同。

表 4 不同提取温度下各化合物含量对比(%)
Table 4 Comparison of the content of each compound in different extraction temperature (%)

化合物	里脊肉			梅花肉			前腿肉			后腿肉			五花肉		
	110 °C	130 °C	150 °C	110 °C	130 °C	150 °C	110 °C	130 °C	150 °C	110 °C	130 °C	150 °C	110 °C	130 °C	150 °C
Lys	1.564	1.907	1.912	1.602	1.882	1.885	1.402	1.604	1.594	1.579	1.610	1.592	1.584	1.635	1.642
His	0.332	0.439	0.430	0.328	0.396	0.388	0.323	0.331	0.303	0.345	0.338	0.319	0.382	0.394	0.389
Arg	0.884	0.950	0.955	0.911	0.942	0.937	0.842	0.856	0.849	0.808	0.847	0.840	0.761	0.779	0.763
Cys	0.102	0.141	0.122	0.135	0.133	0.140	0.110	0.102	0.097	0.079	0.098	0.083	0.120	0.124	0.105
Gly	0.653	0.806	0.744	0.513	0.602	0.610	0.697	0.725	0.574	0.732	0.736	0.742	0.632	0.679	0.608
Ser	0.547	0.712	0.709	0.558	0.606	0.549	0.514	0.568	0.538	0.535	0.605	0.594	0.577	0.662	0.595
Asp	1.894	1.943	1.622	1.733	1.889	1.774	1.728	1.832	1.837	1.709	1.848	1.692	1.403	1.532	1.333
Ala	0.332	0.391	0.338	0.410	0.401	0.367	0.391	0.382	0.335	0.378	0.396	0.391	0.338	0.362	0.324
Glu	1.209	1.265	1.223	1.132	1.179	1.164	1.005	1.045	0.958	0.916	1.009	0.945	0.984	1.016	1.005
Pro	0.714	0.749	0.733	0.449	0.588	0.574	0.406	0.455	0.463	0.484	0.517	0.502	0.517	0.578	0.557
Val	1.215	1.208	1.220	0.985	1.030	1.040	0.906	1.045	1.021	0.983	1.082	1.055	0.679	1.036	1.011
Met	0.661	0.688	0.551	0.502	0.666	0.651	0.308	0.442	0.435	0.332	0.439	0.441	0.410	0.408	0.391
Tyr	0.348	0.910	0.844	0.379	0.889	0.874	0.421	0.726	0.514	0.412	0.768	0.733	0.336	0.602	0.591
Ile	0.664	1.042	0.847	0.741	1.009	0.978	0.674	0.823	0.814	0.778	0.806	0.684	0.548	0.587	0.344
Leu	0.878	1.741	1.738	0.917	1.702	1.648	1.008	1.602	1.571	0.790	1.618	1.609	1.022	1.245	1.218
Phe	0.994	1.005	1.010	0.879	0.953	0.772	0.384	0.723	0.700	0.595	0.711	0.703	0.698	0.776	0.729
Thr	0.584	0.726	0.552	0.597	0.662	0.671	0.309	0.672	0.622	0.593	0.601	0.607	0.611	0.614	0.407
TAA	13.58	16.62	15.55	12.77	15.53	15.02	11.43	13.93	13.23	12.05	14.03	13.53	11.60	13.03	12.01

猪肉中的空白氨基酸基质很难获取, 因此用基质配制标准曲线的方式来减弱基质的影响在本研究中做不到。基质效应的消除方法包括内标法、净化柱法、稀释法, 内标法因其内标物价格昂贵不能广泛应用; 水解液通过净化柱后, 不仅去除基质, 也会吸附氨基酸, 导致氨基酸检测结果不准确; 样品稀释法是目前解决氨基酸基质效应的一个简单快速的方法, 本研究将提取液稀释 20 倍, 即样品稀释 1000 倍后上机, 减弱了基质效应的影响, Cys 是猪肉中含量较少的物质, 如稀释过多, 则会影响 Cys 的检出。

溶剂效应的产生是因为定容液与初始流动相有差异, 为了减弱溶剂效应的影响, 本研究在提取液氮吹之后, 用初始流动相定容, 即可解决溶剂效应带来的影响。

2.4 线性范围、回归方程、检出限和定量限

标准工作溶液浓度范围为 1~50 nmol/mL, 以浓度(X, nmol/mL)为横坐标, 各氨基酸响应值(Y)为纵坐标, 进行线性拟合, 绘制标准溶液曲线, 在此范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)为 0.9905~0.9956。通过系列低浓度的氨基酸标准样品的检测结果, 按信噪比 $S/N=3$ 计算各氨基酸的检出限(limit of detection, LOD), 以信噪比 $S/N=10$ 计算各氨基酸的定量限(limit of quantification, LOQ), 检出限为 0.012~0.133 ng/mL, 定量限为 0.039~0.444 ng/mL。17 种氨基酸的线性范围、回归方程、相关系数(r^2)、LODs 和 LOQs 见表 6。结果表明, 17 种氨基酸在 1~50 nmol/mL 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99。

表 5 不同提取时间下各化合物含量对比(%)
Table 5 Comparison of the content of each compound in different extraction time (%)

化合物	里脊肉			梅花肉			前腿肉			后腿肉			五花肉		
	1 h	3 h	5 h	1 h	3 h	5 h	1 h	3 h	5 h	1 h	3 h	5 h	1 h	3 h	5 h
Lys	1.426	1.907	1.910	1.309	1.882	1.894	1.384	1.604	1.598	1.177	1.610	1.621	1.163	1.635	1.629
His	0.429	0.439	0.442	0.384	0.396	0.405	0.337	0.331	0.335	0.307	0.338	0.331	0.396	0.394	0.399
Arg	0.945	0.950	0.952	0.951	0.942	0.955	0.862	0.856	0.860	0.815	0.847	0.826	0.758	0.779	0.758
Cys	0.112	0.141	0.144	0.135	0.133	0.138	0.094	0.102	0.110	0.100	0.098	0.075	0.128	0.124	0.130
Gly	0.746	0.806	0.795	0.594	0.602	0.610	0.728	0.725	0.730	0.728	0.736	0.718	0.690	0.679	0.709
Ser	0.645	0.712	0.715	0.611	0.606	0.603	0.537	0.568	0.571	0.593	0.605	0.618	0.546	0.662	0.628
Asp	1.215	1.943	1.952	1.194	1.889	1.894	1.177	1.832	1.820	1.142	1.848	1.832	1.038	1.532	1.516
Ala	0.331	0.391	0.402	0.387	0.401	0.388	0.374	0.382	0.379	0.335	0.396	0.401	0.308	0.362	0.371
Glu	1.108	1.265	1.258	1.184	1.179	1.169	1.025	1.045	1.029	0.925	1.009	0.992	0.879	1.016	1.023
Pro	0.415	0.749	0.743	0.321	0.588	0.594	0.308	0.455	0.450	0.284	0.517	0.507	0.179	0.578	0.594
Val	1.006	1.208	1.211	0.996	1.030	1.008	1.023	1.045	1.008	0.896	1.082	1.088	1.008	1.036	1.045
Met	0.645	0.688	0.693	0.648	0.666	0.656	0.434	0.442	0.420	0.348	0.439	0.446	0.395	0.408	0.413
Tyr	0.908	0.910	0.921	0.846	0.889	0.902	0.720	0.726	0.717	0.776	0.768	0.782	0.549	0.602	0.573
Ile	1.032	1.042	1.055	0.986	1.009	1.015	0.794	0.823	0.829	0.811	0.806	0.811	0.533	0.587	0.591
Leu	1.732	1.741	1.705	1.684	1.702	1.694	1.548	1.602	1.596	1.559	1.618	1.600	1.208	1.245	1.127
Phe	0.548	1.005	0.984	0.540	0.953	0.937	0.376	0.723	0.725	0.423	0.711	0.723	0.287	0.776	0.733
Thr	0.708	0.726	0.703	0.638	0.662	0.608	0.587	0.672	0.657	0.613	0.601	0.591	0.569	0.614	0.640
TAA	13.95	16.62	16.59	13.41	15.53	15.47	12.31	13.93	13.83	11.83	14.03	13.96	10.63	13.03	12.88

表 6 17 种氨基酸的线性范围、回归方程、LODs 和 LOQs
Table 6 Linear ranges, regression equation, LODs and LOQs of 17 kinds of amino acids

氨基酸	线性范围/(nmol/mL)	回归方程	r^2	LODs/(ng/mL)	LOQs/(ng/mL)
Asp	1~50	$Y=1270.2085X+15009.0932$	0.9939	0.133	0.444
Thr	1~50	$Y=41896.2122X+388575.4467$	0.9907	0.012	0.040
Ser	1~50	$Y=7532.8180X+125730.7607$	0.9907	0.053	0.175
Glu	1~50	$Y=3836.1398X+70732.0802$	0.9911	0.015	0.049
Gly	1~50	$Y=1905.6437X+23811.2146$	0.9956	0.075	0.250
Ala	1~50	$Y=2264.3048X+39765.7404$	0.9913	0.089	0.297
Cys	1~50	$Y=1567.2507X+1341.4238$	0.9934	0.121	0.404
Val	1~50	$Y=85850.3196X+1140930.2698$	0.9913	0.012	0.039
Met	1~50	$Y=27602.1832X+265455.0692$	0.9931	0.015	0.050
Ile	1~50	$Y=81062.8312X+1170914.4118$	0.9931	0.066	0.219
Leu	1~50	$Y=101708.1443X+1931733.7864$	0.9925	0.013	0.044
Tyr	1~50	$Y=25222.1989X+188040.4639$	0.9932	0.018	0.060
Phe	1~50	$Y=100769.9935X+880221.1550$	0.9915	0.017	0.055
Lys	1~50	$Y=21305.4818X+205539.2838$	0.9927	0.073	0.244
His	1~50	$Y=18896.9002X+287194.4947$	0.9905	0.016	0.052
Arg	1~50	$Y=19753.8248X+378280.6618$	0.9911	0.087	0.290
Pro	1~50	$Y=45612.7899X+742202.9810$	0.9929	0.012	0.038

2.5 方法的回收率和精密度

以猪肉 5 个部位样品为基质, 按照 1.3.1 进行样品处理并用 HPLC-MS/MS 检测, 所得结果即为本底值含量。再称取样品, 分别精密加入低(50%)、中(100%)、高(150%) 3 个水平的标准品, 再按照 1.3.1 进行后续样品处理, 进行 3

水平 6 平行的加标回收实验, 所得结果的平均回收率在 85.58%~98.84% 之间, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)在 0.68%~6.71% 之间, 具体数值见表 7。结果表明, 该方法具有较高的准确性、稳定性和重现性, 适用于猪肉中氨基酸高通量快速的检测。

表 7 17 种氨基酸的加标回收率及精密度(% , n=6)
Table 7 Recoveries and precisions of 17 kinds of amino acids (% , n=6)

氨基酸	里脊肉			梅花肉			前腿肉			后腿肉			五花肉		
	加标量	回收率	RSDs	加标量	回收率	RSDs	加标量	回收率	RSDs	加标量	回收率	RSDs	加标量	回收率	RSDs
Lys	1.00	94.16	1.71	1.00	94.50	2.04	0.80	91.25	1.94	0.80	93.33	2.14	0.80	89.58	3.17
	2.00	93.25	2.51	2.00	94.58	2.51	1.50	92.22	1.77	1.50	93.78	1.72	1.50	94.00	2.11
	3.00	87.89	4.29	3.00	88.78	4.29	2.50	85.73	5.21	2.00	94.67	2.13	2.00	95.17	2.55
His	0.25	86.91	2.67	0.20	91.67	3.00	0.15	90.00	2.96	0.20	89.17	5.38	0.20	90.83	1.72
	0.50	87.79	6.69	0.40	88.33	2.74	0.30	87.22	4.59	0.40	95.00	2.91	0.40	92.92	2.81
	0.75	93.64	3.65	0.60	87.22	3.04	0.45	90.74	5.31	0.60	93.61	4.05	0.60	94.44	4.93
Arg	0.50	85.98	3.34	0.50	88.00	3.34	0.50	89.67	4.20	0.50	92.00	4.15	0.40	89.17	5.61
	1.00	88.66	3.54	1.00	89.67	3.54	1.00	94.17	3.39	1.00	92.83	2.94	0.80	90.83	3.60
	1.50	92.44	4.28	1.50	93.11	4.28	1.50	93.33	3.92	1.50	95.33	3.28	1.20	92.64	2.62
Cys	0.10	87.73	2.43	0.10	95.00	2.43	0.05	90.00	5.77	0.05	93.33	5.57	0.05	90.00	3.32
	0.15	92.93	6.39	0.15	87.78	4.47	0.10	88.33	5.22	0.10	86.67	4.37	0.10	95.00	5.70
	0.20	92.20	6.67	0.20	90.83	5.14	0.20	94.17	2.61	0.15	90.00	4.46	0.15	93.33	5.44
Gly	0.40	96.86	3.58	0.30	92.22	2.76	0.40	95.42	0.68	0.40	89.58	4.66	0.30	88.33	2.82
	0.80	94.26	3.24	0.60	88.89	1.74	0.80	95.00	1.04	0.80	93.75	2.65	0.60	90.00	5.13
	1.20	97.29	6.04	0.90	93.89	0.73	1.20	95.14	1.92	1.20	93.75	2.03	0.90	95.19	3.44
Ser	0.40	86.09	6.69	0.30	87.78	3.13	0.30	90.56	1.75	0.30	86.67	3.91	0.30	88.33	2.88
	0.80	94.92	5.88	0.60	89.44	2.85	0.60	95.56	1.06	0.60	87.22	2.14	0.60	88.33	5.10
	1.20	98.84	3.96	0.90	93.89	2.33	0.90	94.07	1.31	0.90	91.30	3.43	0.90	92.96	4.11
Asp	1.00	85.67	3.76	1.00	91.00	3.76	1.00	93.00	1.79	1.00	95.00	3.76	0.80	90.63	3.78
	2.00	85.92	5.87	2.00	89.42	5.31	2.00	91.58	5.87	2.00	90.58	5.87	1.50	90.44	1.38
	3.00	88.00	6.01	3.00	89.06	5.28	3.00	93.44	5.03	3.00	90.39	5.28	2.00	95.33	1.90
Ala	0.20	87.88	4.95	0.20	88.33	3.90	0.20	93.33	4.95	0.20	88.33	3.90	0.20	90.83	2.72
	0.40	88.94	6.71	0.40	94.17	4.72	0.40	93.75	5.28	0.40	90.83	5.09	0.40	91.67	3.22
	0.60	95.13	2.58	0.60	93.61	2.58	0.60	95.00	2.66	0.60	93.61	2.58	0.60	93.89	3.60
Glu	0.60	86.09	6.48	0.60	90.28	4.40	0.50	88.00	1.59	0.50	89.67	2.43	0.50	88.33	4.02
	1.20	92.49	3.90	1.20	92.50	2.10	1.00	93.50	1.98	1.00	92.67	3.85	1.00	90.50	4.70
	1.80	90.09	5.30	1.80	94.81	5.30	1.50	94.22	2.40	1.50	94.89	1.42	1.50	93.89	3.27
Pro	0.40	92.43	4.91	0.40	88.33	3.53	0.25	86.67	3.93	0.25	87.33	3.14	0.30	88.33	4.78
	0.80	90.38	4.66	0.80	94.17	2.43	0.50	92.00	2.48	0.50	86.33	3.84	0.60	90.56	5.76
	1.20	95.12	3.64	1.20	94.72	4.19	0.75	93.33	3.13	0.75	88.67	5.54	0.90	92.22	4.64
Val	0.60	90.06	4.60	0.50	87.67	2.77	0.50	87.67	2.49	0.50	89.67	4.04	0.50	89.33	3.70
	1.20	85.58	4.19	1.00	92.17	1.50	1.00	93.33	2.27	1.00	91.33	3.26	1.00	90.33	3.22
	1.80	95.67	4.72	1.50	93.67	2.30	2.00	94.00	4.72	1.50	94.89	2.50	1.50	94.56	3.18
Met	0.40	85.87	5.22	0.30	86.11	3.00	0.20	87.50	2.47	0.20	91.67	2.99	0.20	86.67	4.93
	0.80	89.39	4.99	0.60	93.89	2.49	0.40	89.58	3.91	0.40	94.17	3.16	0.40	90.83	4.45
	1.20	93.62	3.99	0.90	91.11	2.62	0.60	88.89	4.85	0.60	90.83	2.92	0.60	88.06	5.20

表 7(续)

氨基酸	里脊肉			梅花肉			前腿肉			后腿肉			五花肉		
	加标量	回收率	RSDs	加标量	回收率	RSDs	加标量	回收率	RSDs	加标量	回收率	RSDs	加标量	回收率	RSDs
Tyr	0.50	89.33	3.18	0.50	93.33	3.18	0.40	86.25	5.19	0.40	90.42	4.23	0.30	87.78	5.21
	1.00	91.00	4.89	1.00	93.00	4.89	0.80	89.38	1.79	0.80	93.13	3.75	0.60	88.89	4.72
	1.50	93.44	5.14	1.50	94.78	5.14	1.20	94.17	2.43	1.20	95.83	2.13	0.90	92.78	3.49
Ile	0.50	95.60	6.38	0.50	87.67	2.81	0.40	88.75	1.85	0.40	88.33	4.09	0.30	89.44	4.86
	1.00	90.47	6.10	1.00	90.17	4.34	0.80	92.71	2.34	0.80	90.83	4.11	0.60	86.67	5.16
	1.50	96.53	4.65	1.50	95.11	2.59	1.20	89.31	2.90	1.20	95.42	4.44	0.90	90.74	2.72
Leu	0.80	88.69	4.78	0.80	93.75	4.78	0.80	90.63	4.56	0.80	94.79	2.37	0.60	91.94	3.60
	1.50	90.41	6.34	1.50	90.44	4.16	1.50	94.44	3.77	1.50	93.11	3.77	1.20	95.00	0.84
	2.50	92.65	4.47	2.50	94.27	4.47	2.50	95.20	3.69	2.50	95.40	3.30	1.80	91.94	1.87
Phe	0.50	91.10	3.33	0.50	91.67	3.49	0.40	90.00	4.79	0.40	91.25	5.76	0.40	87.50	5.48
	1.00	96.38	4.95	1.00	92.17	2.90	0.80	89.58	1.90	0.80	92.50	2.47	0.80	90.21	3.14
	1.50	90.03	6.40	1.50	95.00	4.37	1.20	95.00	2.01	1.20	95.14	2.43	1.20	91.94	2.17
Thr	0.40	88.75	4.83	0.30	86.11	3.33	0.30	86.67	3.33	0.30	89.44	4.08	0.30	86.11	5.89
	0.80	92.29	3.18	0.60	86.94	4.71	0.60	86.67	4.48	0.60	89.81	3.95	0.60	93.89	2.73
	1.20	90.47	6.47	0.90	90.37	3.37	0.90	91.48	3.35	0.90	94.63	4.52	0.90	93.89	3.42

2.6 HPLC-MS/MS 与氨基酸分析仪检测含量比较

为了验证 HPLC-MS/MS 测定猪肉各个部位的氨基酸含量是否可行, 与国家标准方法中氨基酸分析仪进行检测

含量的比较, 结果见图 4。结果显示, 采用 HPLC-MS/MS 与氨基酸分析仪对猪肉各个部位进行检测, 结果无明显差异, 因此可以说明 HPLC-MS/MS 法可以用于猪肉各部位氨基酸的高通量快速测定。

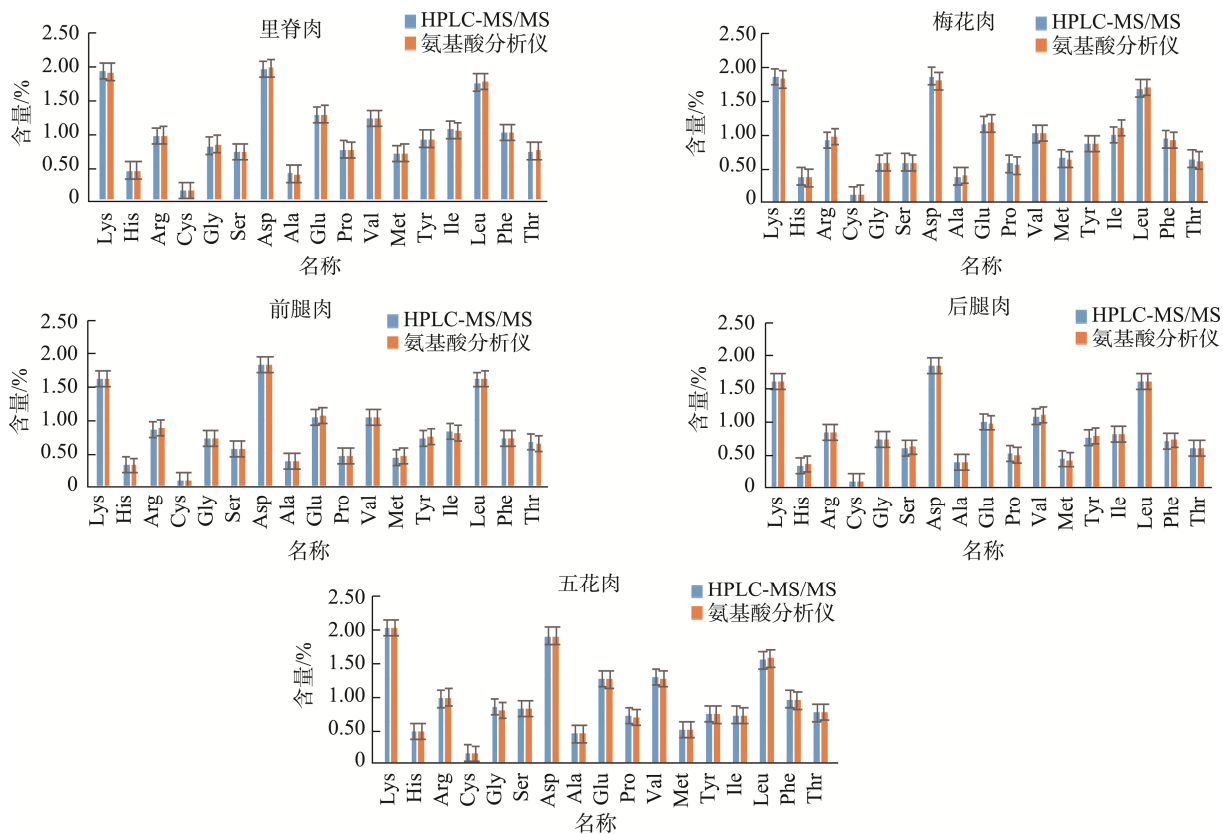


图4 HPLC-MS/MS与氨基酸分析仪比较
Fig.4 Comparison of HPLC-MS/MS and amino acid analyzer

2.7 实际样品测定

猪肉不同部位(里脊肉、梅花肉、前腿肉、后腿肉、五花肉)样品猪绞肉,按照 1:1 的比例,人为掺入当地其他猪肉

或者价格较低的鸡肉样品,按照本研究进行样品前处理并上机检验,具体结果见表 8。结果显示,掺入当地其他猪肉或者价格较低的鸡肉样品后,氨基酸总量均低于猪肉本身含量。

表 8 不同部位掺假前后含量对比(%)
Table 8 Comparison of contents of different parts before and after adulteration (%)

氨基酸	里脊肉	加入其他猪肉	加入鸡肉	梅花肉	加入其他猪肉	加入鸡肉	前腿肉	加入其他猪肉	加入鸡肉	后腿肉	加入其他猪肉	加入鸡肉	五花肉	加入其他猪肉	加入鸡肉
Lys	1.907	1.842	1.345	1.882	1.847	1.411	1.604	1.436	1.230	1.610	1.548	1.217	1.635	1.489	1.236
His	0.439	0.402	0.287	0.396	0.384	0.297	0.331	0.297	0.259	0.338	0.316	0.256	0.394	0.367	0.305
Arg	0.950	0.905	0.678	0.942	0.864	0.707	0.856	0.772	0.662	0.847	0.762	0.645	0.779	0.710	0.593
Cys	0.141	0.110	0.102	0.133	0.125	0.097	0.102	0.092	0.076	0.098	0.088	0.078	0.124	0.116	0.093
Gly	0.806	0.761	0.615	0.602	0.605	0.452	0.725	0.624	0.435	0.736	0.662	0.546	0.679	0.625	0.505
Ser	0.712	0.651	0.378	0.606	0.568	0.424	0.568	0.516	0.422	0.605	0.548	0.459	0.662	0.598	0.496
Asp	1.943	1.916	1.121	1.889	1.814	1.412	1.832	1.658	1.376	1.848	1.677	1.387	1.532	1.478	1.149
Ala	0.391	0.381	0.269	0.401	0.384	0.307	0.382	0.380	0.298	0.396	0.356	0.299	0.362	0.335	0.271
Glu	1.265	1.278	1.202	1.179	1.049	0.884	1.045	0.944	0.764	1.009	0.909	0.736	1.016	0.914	0.763
Pro	0.749	0.716	0.615	0.588	0.511	0.443	0.455	0.425	0.357	0.517	0.468	0.374	0.578	0.536	0.436
Val	1.208	1.061	0.951	1.030	1.006	0.775	1.045	0.946	0.814	1.082	0.984	0.819	1.036	0.937	0.771
Met	0.688	0.605	0.389	0.666	0.567	0.504	0.442	0.406	0.338	0.439	0.394	0.338	0.408	0.409	0.302
Tyr	0.910	0.881	0.715	0.889	0.816	0.667	0.726	0.718	0.542	0.768	0.694	0.564	0.602	0.548	0.450
Ile	1.042	1.009	0.648	1.009	0.942	0.759	0.823	0.798	0.617	0.806	0.738	0.618	0.587	0.528	0.446
Leu	1.741	1.732	1.241	1.702	1.648	1.275	1.602	1.569	1.206	1.618	1.487	1.225	1.245	1.137	0.937
Phe	1.005	0.981	0.684	0.953	0.832	0.711	0.723	0.658	0.542	0.711	0.647	0.538	0.776	0.688	0.549
Thr	0.726	0.720	0.548	0.662	0.646	0.796	0.672	0.625	0.502	0.601	0.542	0.468	0.614	0.562	0.461
TAA	16.62	15.95	11.79	15.53	14.61	11.92	13.93	12.86	10.44	14.03	12.82	10.57	13.03	11.98	9.76

3 结论

本研究采用酸化微波水解方式提取猪肉各部位的氨基酸,电喷雾离子源正离子模式,MRM 模式采集,以甲酸水溶液-甲酸的甲醇乙腈(1:4, V:V)溶液作为流动相进行梯度洗脱,HPLC-MS/MS 检测,建立了猪肉各部位多种氨基酸同时测定的方法。结合样品稀释及流动相定容的方式,消除基质效应与溶剂效应,LODs 与 LOQs 符合方法要求,回收率与精密度满足实验要求。该方法大大缩短了检验时间,并具有良好的重复性和稳定性,可应用于实际猪肉样品中氨基酸的质量控制,确保其品质符合标准要求。中裕猪肉中如果加入其他肉充当猪肉销售,利用该方法可以迅速排查,监测猪肉产品的掺假行为,保护当地农产品品牌,维护市场秩序和消费者权益。

参考文献

- [1] 郭惠武. 中国猪肉消费现状和趋势分析[J]. 今日养猪业, 2018(4): 60-67.
GUO HW. Analysis of current situation and trend of pork consumption in China [J]. Pigs Today, 2018(4): 60-67.
- [2] 葛肇敏, 张涛, 张子强, 等. 中裕“年猪肉”: 天下最幸福的猪[N]. 滨州日报, [2024-08-16](004).
GE ZM, ZHANG T, ZHANG ZQ, *et al.* Zhongyu's "New Year Pork": The happiest pig in the world [N]. Binzhou Daily, [2022-08-16](004).
- [3] 席斌, 郭天芬, 杨晓玲, 等. 对不同品种猪肉中脂肪酸、氨基酸及肌苷酸的比较研究[J]. 饲料研究, 2019, 42(7): 31-34.
XI B, GUO TF, YANG XL, *et al.* Comparative research on fatty acid, amino acid and IMP of pork from different breeds [J]. Feed Research, 2019, 42(7): 31-34.

- [4] 黄元河, 潘乔丹, 黎惠琴, 等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定野芭蕉不同部位的 18 种氨基酸含量[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(9): 158-162.
HUANG YH, PAN QD, LI HQ, *et al.* Determination of the amino acids in the flowers and stem of *Musa balbisiana* by precolumn derivatization-high performance liquid chromatography [J]. Food Research and Development, 2020, 41(9): 158-162.
- [5] YU YL, SHI MZ, ZHU SC, *et al.* Rapid stacking of amino acids in soybean and *Dendrobium officinale* by on-capillary sandwich derivatization in capillary electrophoresis [J]. Food Research International, 2022, 162: 112071.
- [6] 张航, 宋卿, 林佳, 等. 氨基酸自动分析仪法测定云南新鲜羊肚菌中 16 种氨基酸的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(22): 7564-7569.
ZHANG H, SONG Q, LIN J, *et al.* Determination of 16 amino acids in fresh *Morchella esculenta* of Yunnan Province by amino acid automatic analyzer [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(22): 7564-7569.
- [7] 张琪, 张庆, 张树敏, 等. 三个猪种氨基酸组成对比分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(6): 60-64, 69.
ZHANG Q, ZHANG Q, ZHANG SM, *et al.* Effects of concentrate supplementation during pregnancy on daily weight gain and quality of meat and cashmere in Shanbei white cashmere goats [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2023(6): 60-64, 69.
- [8] 王选飞, 刘俊荣, 衣鸿莉, 等. 红鳍东方鲀肌肉组织及生化组成特性研究[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(6): 93-102.
WANG XF, LIU JR, YI HL, *et al.* Study on muscle texture and biochemical properties of farmed *Takifugu rubripes* [J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(6): 93-102.
- [9] HU EP, SWEELEY CC. Gas chromatographic separation of protein amino acids in four minutes [J]. Journal of High Resolution Chromatography, 1991, 14(11): 751-753.
- [10] 李晓庆, 蔡颖, 潘思轶, 等. 氯甲酸异丁酯二次衍生-气相色谱法检测柑橘中游离氨基酸[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 122-132.
LI XQ, CAI Y, PAN SY, *et al.* Determination of free amino acids in citrus by gas chromatography with secondary derivatization of isobutyl chloroformate [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(2): 122-132.
- [11] 陈昌毅, 郑钧文, 熊陈勇, 等. 巴马香猪和德保黑猪肌肉氨基酸差异分析[J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(1): 198-202, 210.
CHEN CY, ZHENG JW, XIONG CY, *et al.* Difference analysis of amino acids in muscle of Bama pig and Debao black pig [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2024, 60(1): 198-202, 210.
- [12] 茹元朴, 陈君, 张明辉, 等. 高效阴离子交换色谱-脉冲安培法测定母乳及婴儿配方粉中的唾液酸[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 221-226.
RU YP, CHEN J, ZHANG MH, *et al.* Determination of sialic acids in human milk and infant formulas by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(11): 221-226.
- [13] 黎琪, 李晓敏, 姜德铭, 等. 高效液相色谱法检测熟制猪肉中呈味核苷酸[J]. 肉类研究, 2022, 36(3): 26-31.
LI Q, LI XM, JIANG DM, *et al.* Determination of flavor-active nucleotides in cooked pork by high performance liquid chromatography [J]. Meat Research, 2022, 36(3): 26-31.
- [14] 王梦阁, 何业春, 李进, 等. 湖南石门县地方品种鸡肉氨基酸组成分析及蛋白质营养价值评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(1): 264-273.
WANG MG, HE YC, LI J, *et al.* Analysis of amino acid composition and evaluation of protein nutritional value of chicken of local breeds in Shimen County, Hunan Province [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(1): 264-273.
- [15] GVV L, KRR M, HPPS S, *et al.* Analysis of total amino acids in rice using a validated reversed-phase high performance liquid chromatographic method with diode array detection (RP-HPLC-DAD) [J]. International Journal of Analytical and Bioanalytical Methods Methods, 2020. DOI: 10.35840/IJABM/2408
- [16] NAKAYAMA A, IMAIZUMI A, YOSHIDA H. Methods for absolute quantification of human plasma free amino acids by high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry using precolumn derivatization [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 2030: 207-218.
- [17] GIORDANO G, GUCCIARDI A, PIRILLOP P, *et al.* Quantification of underivatized amino acids on dry blood spot, plasma, and urine by HPLC-ESI-MS/MS [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 2030: 153-172.
- [18] 彭真汾, 王威, 叶清华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法定量分析橄榄果实氨基酸组分[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 231-238.
PENG ZF, WANG W, YE QH, *et al.* Quantitative analysis of amino acids in Chinese olive using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 2018, 39(24): 231-238.
- [19] 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.
- [20] ALAMU EO, MENKIR A, ADESOKAN M, *et al.* Near-infrared reflectance spectrophotometry (NIRS) application in the amino acid profiling of quality protein maize (QPM) [J]. Foods, 2022, 11(18): 2779.
- [21] 孙宝山, 孙玲玲, 张冰莹, 等. 山西老陈醋难挥发性成分及研究进展[J]. 中国调味品, 2024, 49(3): 193-196, 220.
SUN BS, SUN LL, ZHANG BY, *et al.* Non-volatile components and research progress of Shanxi aged vinegar [J]. China Condiment, 2024,

- 49(3): 193–196, 220.
- [22] 臧彬如, 周改莲, 单国顺, 等. 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法测定梅花鹿茸中总游离氨基酸与游离氨基酸含量[J]. 医药导报, 2020, 39(11): 1520–1527.
- ZANG BR, ZHOU GL, SHAN GS, *et al.* Determination of total free amino acids and free amino acids in sika deer velvet antler by UPLC-QqQ-MS/MS [J]. Herald of Medicine, 2020, 39(11): 1520–1527.
- [23] 张瑞虎, 李瑞, 张潇予, 等. 基于异硫氰酸苯酯柱前衍生化-超高效液相色谱法检测大鼠血清中氨基酸含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2024, 37(6): 723–730.
- ZHANG RH, LI R, ZHANG XY, *et al.* Determination of amino acids in rat serum based on an UPLC method with pre-column derivatization of PITC [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2024, 37(6): 723–730.
- [24] 曲栗, 古淑青, 张嘉麒, 等. 柱前衍生-超高效液相色谱法测定 3 种奶粉中 18 种氨基酸[J]. 色谱, 2021, 39(5): 472–477.
- QU L, GU SQ, ZHANG JL, *et al.* Determination of 18 amino acids in three different kinds of milk powder by ultra performance liquid chromatography coupled with pre-column derivatization [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(5): 472–477.
- [25] 于荣贤, 刘兵, 孙政, 等. AQC 衍生法测定洋槐蜜中游离氨基酸含量[J]. 中国蜂业, 2017, 68(12): 45–48.
- YU RX, LIU B, SUN Z, *et al.* Determination amino acid contents in acacia honey using AQC derivatization [J]. Apiculture of China, 2017, 68(12): 45–48.
- [26] 杨卫, 鲜殊, 李大祥, 等. 邻苯二甲醛柱前衍生反相高效液相色谱法测定茶叶中 17 种游离氨基酸[J]. 茶叶科学, 2011, 31(3): 211–217.
- YANG W, XIAN S, LI DX, *et al.* RP-HPLC determination of seventeen free amino acids in tea with O-phthalaldehyde precolumn derivation [J]. Journal of Tea Science, 2011, 31(3): 211–217.
- [27] 邵天舒, 郭雷, 周长明. 邻苯二甲醛柱前衍生化-HPLC 测定复方氨基酸注射液中亚氨酸亚砷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(4): 497–500.
- SHAO TS, GUO L, ZHOU CM. Determination of methionine sulfoxide in compound amino acid injection by HPLC with OPA pre-column derivatization [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2018, 35(4): 497–500.
- [28] 秦慧彬, 田翔, 王海岗, 等. 超高效液相色谱法测定传统发酵酸粥的游离氨基酸含量[J]. 食品科技, 2021, 46(4): 273–280.
- QIN HB, TIAN X, WANG HG, *et al.* Determination of free amino acids in traditional fermented acidic gruel by ultra-high performance liquid chromatography [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(4): 273–280.
- [29] 杨帅, 郑林, 迟明艳, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定阿胶中 18 种核苷、游离氨基酸的含量[J]. 中成药, 2024, 46(7): 2140–2146.
- YANG S, ZHENG L, CHI MY, *et al.* Simultaneous content determination of eighteen nucleosides and free amino acids in *Colla corii asini* by UPLC-MS/MS [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2024, 46(7): 2140–2146.
- [30] 何佳珂, 陈志青, 万蓉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆利伐沙班浓度[J]. 医药导报, 2019, 38(3): 384–387.
- HE JK, CHEN ZQ, WAN R, *et al.* Determination of rivaroxaban in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Herald of Medicine, 2019, 38(3): 384–387.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)