

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250429006

引用格式: 李兵, 戚燕, 李丽萍, 等. 柱前衍生-超高效液相色谱法测定 3 种动物血豆腐中 17 种氨基酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(14): 230–236.

LI B, QI Y, LI LP, *et al.* Determination of 17 kinds of amino acids in 3 kinds of animal blood tofu products by ultra performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(14): 230–236. (in Chinese with English abstract).

# 柱前衍生-超高效液相色谱法测定 3 种动物血豆腐 中 17 种氨基酸

李兵, 戚燕, 李丽萍, 赵海燕, 陈东\*, 范赛

(北京市疾病预防控制中心, 北京 100013)

**摘要:** **目的** 建立柱前衍生-超高效液相色谱法检测鸭、猪、羊 3 种动物血豆腐中的 17 种氨基酸的含量的方法。**方法** 试样中使用 6 mol/L 盐酸在 110 °C 下水解 24 h。以正缬氨酸为内标, 以 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯为衍生剂。衍生产物采用 Acquity UPLC™BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm)分离, 流速为 0.4 mL/min, 柱温采用程序升温模式, 检测波长为 260 nm。内标法定量测定。**结果** 17 种氨基酸在各自线性范围内均呈现良好的线性关系, 相关系数大于 0.999, 检出限为 0.06~0.14 mg/g, 定量限为 0.19~0.45 mg/g。回收率为 85.1%~108.8%, 相对标准偏差为 0.3%~6.7%。采用建立的方法分别对网售的 3 种动物血豆腐进行测定, 3 种动物血豆腐中均含有 17 种氨基酸, 鸭血豆腐、猪血豆腐、羊血豆腐氨基酸总量为 63.82、95.61、93.52 mg/g。**结论** 本方法能够在 22 min 内实现 17 种氨基酸的分离, 具有良好的准确性和重复性, 适用于动物血豆腐中的 17 种氨基酸含量测定。

**关键词:** 动物血豆腐; 氨基酸; 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯; 超高效液相色谱法

## Determination of 17 kinds of amino acids in 3 kinds of animal blood tofu products by ultra performance liquid chromatography with pre-column derivatization

LI Bing, QI Yan, LI Li-Ping, ZHAO Hai-Yan, CHEN Dong\*, FAN Sai

(Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of 17 kinds of amino acids in 3 kinds of animal blood tofu products (duck, pig, sheep) by ultra performance liquid chromatography with pre-column derivatization. **Methods** The samples were hydrolyzed in 6 mol/L HCl for 24 h at 110 °C. Norvaline was used as the internal standard and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate was used as the derivatizing agent. The derivative products were separated using an Acquity UPLC™BEH C<sub>18</sub> chromatographic column (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm), with a flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature adopted the programmed temperature rise mode, and the

收稿日期: 2025-04-29

第一作者: 李兵(1983—), 女, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食物成分检测与评价。E-mail: libingcr@163.com

\*通信作者: 陈东(1981—), 男, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品卫生检验。E-mail: 120884767@qq.com

detection wavelength was 260 nm. The quantification of amino acids was performed using an internal standard method. **Results** The calibration curves of 17 kinds of amino acids showed good linearity with correlation coefficients greater than 0.999. The limits of detection were 0.06–0.14 mg/g, the limits of quantitation were 0.19–0.45 mg/g. Recoveries were in range of 85.1%–108.8%, and the relative standard deviations were within 0.3%–6.7%. The established method was adopted to determine the 3 kinds of animal blood tofu sold online respectively. The 17 kinds of amino acids were found in all products. The content of total amino acids in duck, pig, sheep blood tofu was 63.82, 95.61, 93.52 mg/g. **Conclusion** The 17 kinds of amino acids can be separated completely within 22 min by use of this method. The established method has good repeatability and high accuracy, and is suitable for the 17 kinds of amino acids determination in animal blood tofu.

**KEY WORDS:** animal blood tofu; amino acids; 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate; ultra performance liquid chromatography

## 0 引言

血豆腐是以动物血液为主要原料加工制成的传统食品。鸭血、猪血和羊血豆腐因其独特的口感、营养价值和烹饪适应性,成为血豆腐中最具代表性的 3 大种类,具有地域饮食文化特色。研究表明血豆腐中脂肪含量较低,蛋白含量较高,富含维生素、矿物质等多种营养成分<sup>[1-3]</sup>。氨基酸是组成蛋白质的物质,是蛋白质营养与代谢的基本单位。蛋白质所含氨基酸的品种、数量和比例,决定蛋白质的营养价值<sup>[4]</sup>。食物中氨基酸的构成对于食物营养评价具有重要意义。目前动物血豆腐中氨基酸含量的报道较少,难以满足膳食营养评价等相关研究的需要。

常规的氨基酸测定方法有氨基酸分析仪<sup>[5-8]</sup>、液相色谱法<sup>[9]</sup>、气相色谱法<sup>[10-11]</sup>、超高效液相色谱-三重四极杆质谱法<sup>[12-13]</sup>等。氨基酸分析仪是专门用来测定氨基酸的分析仪器,广泛用于食物中氨基酸的测定,采用柱后衍生的方法测定氨基酸,需要购置单独的仪器。近年来许多研究采用液相色谱法测定氨基酸,由于大部分氨基酸缺少发色团,不能发射荧光,因此使用液相色谱法进行测定时常需要使用不同的衍生剂将氨基酸衍生后,再使用紫外检测器或者荧光检测器进行检测<sup>[14-15]</sup>。常用的衍生剂有邻苯二甲醛和 9-苄甲基氯甲酸酯<sup>[16]</sup>、丹磺酰氯<sup>[17]</sup>、异硫氰酸苯酯<sup>[18-20]</sup>、2,4-二硝基氟苯<sup>[21]</sup>、6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺氨基甲酸酯 (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC)<sup>[22-26]</sup>等。AQC 能够跟伯胺和仲胺进行反应,具有衍生速度快、灵敏度高、干扰少的优点<sup>[27]</sup>。

GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》可同时测定食物中的 16 种氨基酸,但不包含半胱氨酸。因为半胱氨酸在酸水解过程中不稳定,测定时需要单独使用过甲酸将其氧化为磺基丙氨酸,进行测定<sup>[28-29]</sup>。而过甲酸是强氧化剂,具有一定的危险性。BARKHOLT 等<sup>[30]</sup>报道了在蛋白质酸水解过程中加入 3,3'-二硫代二丙酸,使其与胱氨酸和半胱氨酸反应生成稳定的

衍生物,通过离子色谱结合柱后衍生化检测,显著提高了半胱氨酸的测定准确度。AOAC Official Method 2018.06 在盐酸水解过程中同步使用 3,3'-二硫代二丙酸将胱氨酸和半胱氨酸转化为稳定的 S-2-羧乙基硫代半胱氨酸,随后经 AQC 柱前衍生,采用超高效液相色谱法实现了奶粉、谷物等食品中 17 种氨基酸的同时测定<sup>[31-32]</sup>。

动物血豆腐通常由动物血液、食用胶、抗凝剂等成分制作而成。基质比较复杂对于样品制备和检测方法都有较高的要求。目前, AOAC Official Method 2018.06 在动物血豆腐中氨基酸测定的应用报道较少。本研究采用该方法测定了 3 种动物血豆腐中的 17 种氨基酸,采用 AQC 衍生,超高效液相色谱法测定,并考察了柱温、进样体积、衍生剂浓度及 3,3'-二硫代二丙酸含量对于 17 种氨基酸测定的影响,以满足动物血豆腐中 17 种氨基酸快速高通量检测的需求。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本研究测定的鸭血、猪血、羊血豆腐均购自网络销售平台。

乙腈(色谱纯,北京迪马科技有限公司);甲酸(色谱纯,上海安谱科技实验有限公司);甲酸铵(纯度 99%,上海麦克林生化科技股份有限公司);苯酚(纯度≥99%)、3,3'-二硫代二丙酸(纯度 99%)、L-胱氨酸(cystine, Cys)、L-正缬氨酸(norvaline, Nva)(纯度≥99%)、17 种氨基酸混合标准溶液[包括:L-丙氨酸(alanine, Ala)、L-精氨酸(arginine, Arg)、L-天冬氨酸(aspartic acid, Asp)、L-谷氨酸(glutamic acid, Glu)、L-甘氨酸(glycine, Gly)、L-组氨酸(histidine, His)、L-亮氨酸(leucine, Leu)、L-异亮氨酸(isoleucine, Ile)、L-赖氨酸(lysine, Lys)、L-蛋氨酸(methionine, Met)、L-苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)、L-脯氨酸(proline, Pro)、L-丝氨酸(serine, Ser)、L-苏氨酸(threonine, Thr)、L-酪氨酸(tyrosine, Tyr)、L-缬氨酸(valine, Val)和 L-胱氨酸(cystine, Cys);其中, Cys 浓度为 1.25 mmol/L,其余氨基酸浓度均为 2.5 mmol/L](美国

Sigma 公司); 盐酸、氢氧化钠(优级纯, 国药集团化学试剂公司); AccQ-Tag Ultra 衍生试剂包(包括硼酸缓冲液、AQC 衍生剂粉、乙腈稀释液, 美国 Waters 公司); 超纯水(milliq 超纯水系统)。

## 1.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC H-class 超高效液相色谱-二极管阵列检测器、0.22  $\mu\text{m}$  PTFE 滤膜、Acquity UPLC™BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )(美国 Waters 公司); Allegra X-22R 离心机(美国 Beckman 公司); FA2004 电子天平(感量 0.0001 g, 上海天平仪器厂); B-400 均质仪(美国 BUCHI 公司); OV120 鼓风干燥箱(苏州环美生物医疗科技有限公司)。

## 1.3 标准曲线溶液的配制

内标溶液的配制: 称取正缬氨酸 0.0586 g, 使用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解, 转移至 50.0 mL 容量瓶, 定容。配制成 10 mmol/L 的正缬氨酸内标溶液。

3,3'-二硫代二丙酸溶液的配制: 称取 0.5000 g 3,3'-二硫代二丙酸, 使用 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液溶解, 转移至 50.0 mL 容量瓶, 定容。配制成 1% (m:V) 的 3,3'-二硫代二丙酸溶液。

胱氨酸标准储备液的配制: 称取胱氨酸 0.0600 g, 使用 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液溶解, 转移至 25.0 mL 容量瓶, 定容。配制成 10 mmol/L 的胱氨酸标准储备液。

胱氨酸标准曲线溶液的配制: 分别取 10 mmol/L 胱氨酸标准储备液 0、20、40、100、200、400  $\mu\text{L}$ , 于 10 mL 容量瓶, 加入 400  $\mu\text{L}$  正缬氨酸内标溶液, 再加入 1.2 mL 1% (m:V) 3,3'-二硫代二丙酸溶液, 1.2 mL 0.2 mol/L 盐酸, 5 mL 含 0.1% (m:V) 苯酚的 12 mol/L 盐酸溶液, 用水定容至 10 mL。取 5 mL 标准溶液至水解瓶中, 充氮后, 水解、中和、衍生后测定。配制成上机浓度为 0、0.50、1.00、2.50、5.00、10.00 nmol/mL 的胱氨酸标准曲线溶液。

16 种氨基酸标准曲线溶液的配制: 在 10 mL 容量瓶中, 加入 2.5 mmol/L 氨基酸混合标准溶液 0、20、40、200、400、1000  $\mu\text{L}$ , 加入 100  $\mu\text{L}$  正缬氨酸内标溶液, 用 0.1 mol/L 盐酸定容, 衍生后测定。配制成上机浓度为 0、0.50、1.00、5.00、10.00、25.00 nmol/mL 的氨基酸标准曲线溶液。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 色谱条件

色谱柱: Acquity UPLC™BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A: 200 mmol/L 甲酸铵水溶液:乙腈:甲酸:水=252:33:15:1700 (V:V:V:V); 流动相 B: 甲酸:乙腈=33:2500 (V:V); 梯度洗脱程序: 0~5.50 min, 99.9% A; 5.50~15.22 min, 99.9%~90.9% A; 15.22~20.74 min, 90.9%~78.8% A; 20.74~21.26 min, 78.8%~40.4% A; 21.26~21.29 min, 40.4%~10.0% A; 21.29~22.84 min, 10% A; 22.84~26.00 min, 10.0%~99.9% A; 26~35 min, 99.9% A。流

速: 0.4 mL/min。进样量为 1  $\mu\text{L}$ ; 检测波长为 260 nm。色谱柱升温程序: 0~10.0 min, 50 °C; 10~11 min, 50~55 °C; 11~24 min, 55 °C; 24~25 min, 55~50 °C, 25~35 min, 50 °C。

### 1.4.2 检测方法

称取混合均匀的样品 20 mg 置于棕色水解瓶中, 依次加入 200  $\mu\text{L}$  内标、1 mL 水、600  $\mu\text{L}$  含 1% (m:V) 3,3'-二硫代二丙酸溶液、600  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L 盐酸、2.5 mL 含 0.1% (m:V) 苯酚的 12 mol/L 盐酸溶液。水解: 混匀后充氮, 110 °C 水解 24 h。中和: 将水解物冷却至室温, 取 0.2 mL 样品, 依次加入 0.2 mL 6 mol/L 的氢氧化钠溶液, 加 0.4 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液, 充分混合, 10000 r/min 条件下离心 10 min。衍生: 在 1.5 mL 离心管中加入 70  $\mu\text{L}$  AccQ-Tag Ultra 衍生试剂包中的缓冲液 5% 四硼酸钠水溶液(m:V), 加入 10  $\mu\text{L}$  样液, 涡旋后加入 20  $\mu\text{L}$  AccQ-Tag Ultra 衍生试剂包中的临用现配的衍生剂(取 1 mL 乙腈加入 AQC 粉末, 55 °C 加热 10 min 溶解), 迅速混匀后, 常温放置 1 min, 55 °C 加热 10 min 后, 上机测定。

## 1.5 数据处理

样品采用 3 次平行测定, 采用 WPS Office 2017 软件整理实验数据和绘图, 采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析, 结果以平均值±标准偏差表示,  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱方法的优化

使用超高效液相色谱法进行分析时发现 Met 和胱氨酸这两个氨基酸出峰时间比较接近, 并且对温度比较敏感, 柱温 55 °C 时分离度优于 50 °C, 分离度能够从 1.25 增加到 1.58。但是柱温为 55 °C 时 His 会出峰较快, 与其前面的色谱峰分离度为 1.23, 因此选择柱程序升温模式。前 10 min 柱温保持 50 °C, 从 10 min 升高至 55 °C, 保持至 25 min, 从 25 min 到 35 min 柱温保持 50 °C, 可以使两对色谱峰都达到基线分离。His 和其前面的色谱峰、Met 和胱氨酸两对色谱峰的分离度分别提高至 3.22 和 1.70。因此选择了柱程序升温模式。样品中氨基酸含量较高时, 增大进样体积会出现柱子超载的情况, 导致峰形变宽, 无法定性定量测定, 因此进样体积选择 1  $\mu\text{L}$ 。16 种氨基酸标准衍生物、胱氨酸标准衍生物以及血豆腐样品中 17 种氨基酸衍生物的色谱图见图 1~3。

### 2.2 衍生剂浓度的选择

使用乙腈配制成浓度分别为 1、2、4、8、10、12 mmol/L 的 AQC 衍生剂。配制衍生后浓度分别为 25 nmol/mL 和 10 nmol/mL 的 16 种氨基酸混合标准溶液和胱氨酸标准溶液, 考察了不同浓度衍生剂对于衍生效果的影响, 结果见图 4。从图 4 中可以明显看出各氨基酸衍生物的峰面积随衍生剂浓度的增高而增大, 说明衍生剂浓度对于衍生效果具有重要影响。衍生剂浓度为 8~12 mmol/L 时各氨基酸衍生物的峰面积相差不多, 10 mmol/L 时略高。衍生剂浓度越大, 溶解时所需时间增长, 因此本研究选择了衍生剂浓度为 10 mmol/L。

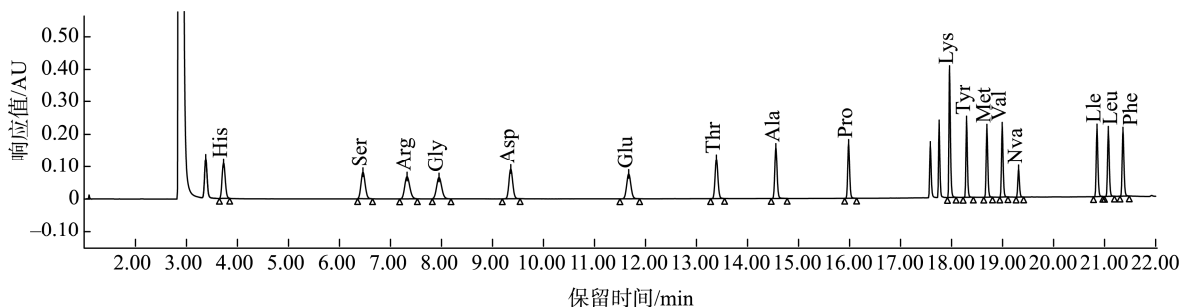


图 1 16 种氨基酸标准衍生生物色谱图  
Fig.1 Chromatogram of 16 kinds of derivatized amino acid standards

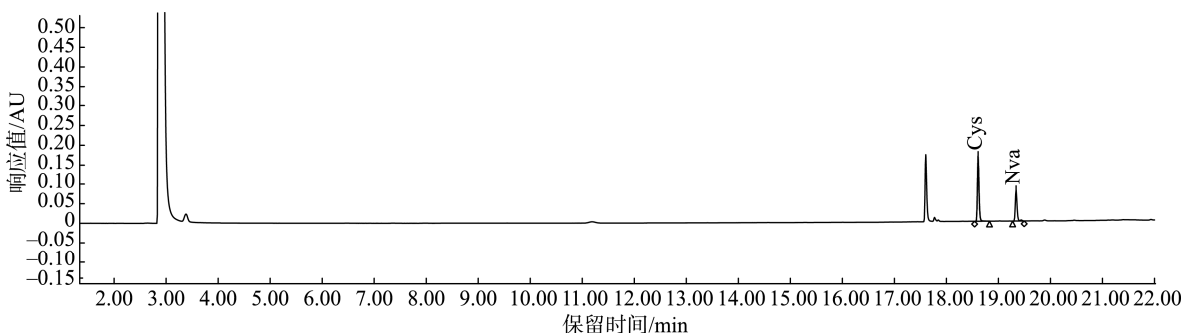


图 2 Cys 标准衍生生物色谱图  
Fig.2 Chromatogram of derivatized Cys standard

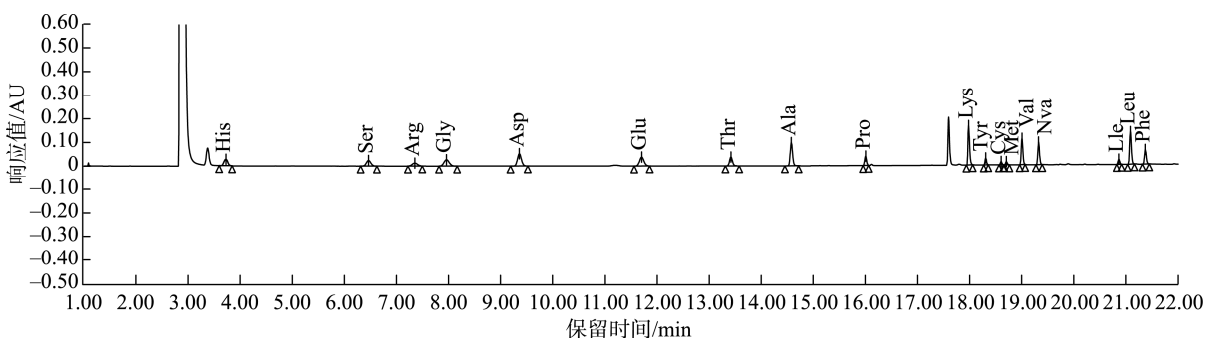


图 3 羊血豆腐中 17 种氨基酸衍生生物的色谱图  
Fig.3 Chromatogram of 17 kinds of derivatized amino acids in sheep blood tofu

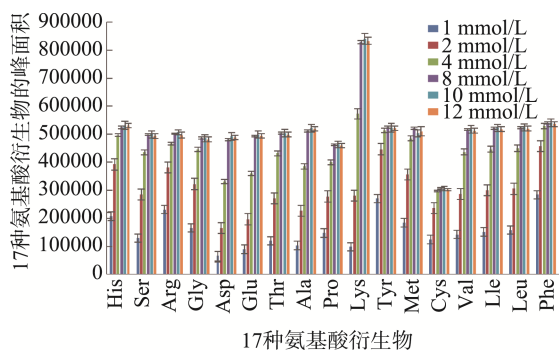


图 4 衍生剂浓度对氨基酸衍生物峰面积的影响  
Fig.4 Effects of derivatizing agent concentration on amino acid derivatives' peak areas

### 2.3 3,3'-二硫代二丙酸浓度选择

在盐酸水解前加入 3,3'-二硫代二丙酸, 在水解的同时会将胱氨酸和半胱氨酸转化为 S-2-羧乙基硫代半胱氨酸, 测定的胱氨酸值代表半胱氨酸和胱氨酸的总量。水解液中胱氨酸浓度为 0.4  $\mu\text{mol/mL}$  时, 考察了 3,3'-二硫代二丙酸加入量对于胱氨酸衍生物峰面积的影响。如图 5 结果表明, 胱氨酸衍生物峰面积随 3,3'-二硫代二丙酸在水解液中的浓度的增大而增高, 说明 3,3'-二硫代二丙酸加入量对于胱氨酸衍生物峰面积具有重要影响。3,3'-二硫代二丙酸在水解液中含有量为 0.8、1.2、1.6  $\text{mg/mL}$  时衍生物峰面积相差不多。为保证水解完全, 本研究选择了 3,3'-二硫代二丙酸在水解液中的质量浓度为 1.2  $\text{mg/mL}$ 。

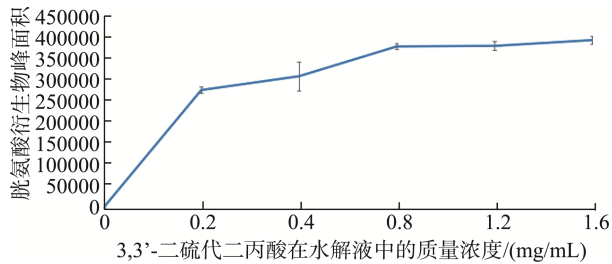


图 5 3,3'-二硫代二丙酸质量浓度对胱氨酸衍生物峰面积的影响  
Fig.5 Effects of 3,3'-dithiodipropionic acid mass concentration on cystine derivatives' peak areas

## 2.4 方法学验证

### 2.4.1 标准曲线、线性范围和检出限

以 17 种氨基酸质量浓度为横坐标(X, nmol/mL), 以峰面积/内标面积(Y), 绘制标准曲线。以 3 倍和 10 倍信噪比确定方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)。17 种氨基酸的线性方程、相关系数(correlation coefficient,  $r^2$ )、LODs、LOQs 见表 1。结果表明, 16 种氨基酸和胱氨酸在 0~25 nmol/mL 和 0~10 nmol/mL 范围内具有良好的线性关系, 相关系数为 0.9991~0.9999, LODs 为 0.06~0.14 mg/g, LOQs 为 0.19~0.45 mg/g, 能够满足实际检测的需要。

### 2.4.2 准确度和精密度

按照测定 1.4 方法进行 3 个浓度水平的加标回收试验, 每个浓度水平平行测定 6 次, 计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 见表 2。结果表明 17 种氨基酸的回收率为 85.1%~108.8%, 测定值的 RSDs 为 0.3%~6.7%, 说明方法具有良好的准确度和精密度。

表 1 17 种氨基酸的线性方程、相关系数、LODs 和 LOQs  
Table 1 Linear equations, correlation coefficients, LODs and LOQs of the 17 kinds of amino acids

化合物	线性方程	$r^2$	LODs/(mg/g)	LOQs/(mg/g)
His	$Y=3.11 \times 10^{-2}X+4.11 \times 10^{-1}$	0.9996	0.12	0.39
Ser	$Y=4.63 \times 10^{-2}X+8.64 \times 10^{-1}$	0.9994	0.09	0.31
Arg	$Y=2.85 \times 10^{-2}X+2.44 \times 10^{-1}$	0.9999	0.08	0.26
Gly	$Y=6.40 \times 10^{-2}X+8.32 \times 10^{-1}$	0.9998	0.13	0.44
Asp	$Y=3.60 \times 10^{-2}X+5.66 \times 10^{-1}$	0.9997	0.06	0.19
Glu	$Y=3.21 \times 10^{-2}X+8.19 \times 10^{-1}$	0.9997	0.10	0.33
Thr	$Y=4.17 \times 10^{-2}X+3.91 \times 10^{-1}$	0.9998	0.11	0.37
Ala	$Y=5.46 \times 10^{-2}X+4.68 \times 10^{-1}$	0.9997	0.09	0.30
Pro	$Y=3.95 \times 10^{-2}X+6.95 \times 10^{-1}$	0.9999	0.07	0.22
Lys	$Y=5.49 \times 10^{-2}X+5.32 \times 10^{-1}$	0.9998	0.09	0.29
Tyr	$Y=2.76 \times 10^{-2}X+2.14 \times 10^{-1}$	0.9998	0.11	0.37
Met	$Y=3.31 \times 10^{-2}X+4.87 \times 10^{-1}$	0.9996	0.14	0.45
Val	$Y=4.25 \times 10^{-2}X+3.28 \times 10^{-1}$	0.9998	0.11	0.37
Lle	$Y=3.92 \times 10^{-2}X+1.78$	0.9994	0.09	0.29
Leu	$Y=3.94 \times 10^{-2}X+1.75$	0.9991	0.10	0.33
Phe	$Y=3.07 \times 10^{-2}X+3.93 \times 10^{-1}$	0.9996	0.10	0.33
Xcys	$Y=3.58 \times 10^{-2}X+1.16 \times 10^{-1}$	0.9992	0.12	0.41

## 2.5 实际样品测定

按照建立的检测方法对 3 种动物血豆腐进行了测定, 结果见表 3。在 3 种动物血豆腐中均检测出 17 种氨基酸。猪、羊血豆腐的 TAA 相近( $P>0.05$ )含量分别为 95.61 mg/g、93.52 mg/g, 显著高于鸭血豆腐( $P<0.05$ )的 TAA 63.82 mg/g。猪、羊血豆腐中含量最高的氨基酸是 Leu, 含量分别为 12.32 mg/g、11.78 mg/g, 其次是 Glu, 含量分别为 11.22 mg/g、10.55 mg/g, 还有 Asp, 含量分别为 10.98 mg/g、10.23 mg/g。鸭血豆腐中含量最高的氨基酸依次为 Glu, Leu 和 Lys, 含量分别为 8.41、6.78、5.88 mg/g。

表 2 17 种氨基酸的精密度和回收试验结果( $n=6$ )  
Table 2 Results of tests for precision and recovery of 17 kinds of amino acids ( $n=6$ )

名称	本底值/(mg/g)	低浓度水平加标			中浓度水平加标			高浓度水平加标		
		加标量/(mg/g)	回收率/%	RSDs/%	加标量/(mg/g)	回收率/%	RSDs/%	加标量/(mg/g)	回收率/%	RSDs/%
His	3.54	1.94	102.2	2.1	3.88	96.7	1.8	7.76	96.0	1.3
Ser	2.55	1.31	90.9	2.4	2.63	85.1	1.6	5.25	85.7	3.0
Arg	3.44	2.18	98.7	1.8	4.36	95.1	1.1	8.71	94.8	1.3
Gly	2.66	0.94	105.6	3.8	1.88	98.2	2.1	3.75	97.1	2.1
Asp	5.87	1.66	100.2	2.8	3.33	93.8	4.0	6.66	95.6	5.0
Glu	7.31	1.84	108.8	2.5	3.68	100.8	2.8	7.36	102.2	4.5
Thr	2.93	1.49	96.6	1.6	2.98	91.3	1.3	5.96	91.5	2.4
Ala	5.15	1.11	106.9	2.7	2.23	95.6	2.5	4.46	95.9	4.9
Pro	2.55	1.44	101.6	1.9	2.88	96.0	1.5	5.76	95.5	1.5
Lys	6.03	1.83	99.9	3.5	3.65	97.7	2.3	7.31	96.8	3.9
Tyr	2.46	2.26	91.8	6.4	4.53	95.6	0.8	9.06	94.6	1.2
Met	1.08	1.87	88.4	5.0	3.73	91.6	0.3	7.46	90.3	1.1
Val	4.59	1.46	105.1	3.5	2.93	100.4	2.5	5.86	97.6	2.2
Lle	2.52	1.64	103.3	1.3	3.28	98.0	1.6	6.56	95.5	0.9
Leu	6.74	1.64	107.7	6.7	3.28	97.8	5.1	6.56	95.8	3.9
Phe	4.04	2.06	98.5	5.2	4.13	94.7	5.6	8.26	95.3	1.8
Cys	1.01	1.50	100.7	3.3	3.00	96.5	1.1	6.01	95.0	1.4

表 3 3 种动物血豆腐的氨基酸含量组成  
Table 3 Amino acid composition and content of 3 kinds of animal blood tofu products

氨基酸种类	氨基酸含量及组成/(mg/g)		
	鸭血豆腐 (n=9)	猪血豆腐 (n=6)	羊血豆腐 (n=6)
His	3.06±0.90 <sup>b</sup>	5.71±1.50 <sup>a</sup>	5.36±1.21 <sup>a</sup>
Ser	2.45±0.54 <sup>b</sup>	4.34±0.97 <sup>a</sup>	4.06±0.55 <sup>a</sup>
Arg	3.28±0.73 <sup>a</sup>	4.05±0.92 <sup>a</sup>	3.74±0.48 <sup>a</sup>
Gly	2.54±0.51 <sup>b</sup>	4.41±0.98 <sup>a</sup>	3.96±0.56 <sup>a</sup>
Asp	5.87±1.15 <sup>b</sup>	10.98±2.33 <sup>a</sup>	10.23±1.41 <sup>a</sup>
Glu	8.41±2.21 <sup>b</sup>	11.22±2.44 <sup>a</sup>	10.55±1.14 <sup>ab</sup>
Thr	2.82±0.67 <sup>b</sup>	3.28±0.76 <sup>b</sup>	4.57±0.64 <sup>a</sup>
Ala	5.39±1.04 <sup>b</sup>	7.33±1.58 <sup>a</sup>	7.12±0.92 <sup>a</sup>
Pro	2.34±0.53 <sup>b</sup>	3.71±0.83 <sup>a</sup>	3.35±0.43 <sup>a</sup>
Lys	5.88±1.17 <sup>b</sup>	8.46±1.82 <sup>a</sup>	8.48±1.11 <sup>a</sup>
Tyr	2.06±0.63 <sup>a</sup>	2.31±0.53 <sup>a</sup>	2.69±0.61 <sup>a</sup>
Met	0.84±0.29 <sup>ab</sup>	0.63±0.19 <sup>b</sup>	1.08±0.34 <sup>a</sup>
Cys	0.95±0.29 <sup>a</sup>	0.92±0.28 <sup>a</sup>	0.90±0.12 <sup>a</sup>
Val	4.77±0.92 <sup>b</sup>	8.73±1.88 <sup>a</sup>	8.42±1.15 <sup>a</sup>
Lle	2.30±0.55 <sup>a</sup>	0.97±0.26 <sup>b</sup>	0.77±0.32 <sup>b</sup>
Leu	6.78±1.46 <sup>b</sup>	12.32±2.71 <sup>a</sup>	11.78±1.68 <sup>a</sup>
Phe	4.06±0.85 <sup>b</sup>	6.24±1.38 <sup>a</sup>	6.46±0.89 <sup>a</sup>
EAA	27.45±5.87 <sup>b</sup>	40.64±8.93 <sup>a</sup>	41.56±5.75 <sup>a</sup>
TAA	63.82±14.24 <sup>b</sup>	95.61±21.10 <sup>a</sup>	93.52±12.88 <sup>a</sup>
NEAA	36.37±8.39 <sup>b</sup>	54.97±12.17 <sup>a</sup>	51.96±7.13 <sup>a</sup>
EAA/TAA/%	43.11±0.80 <sup>b</sup>	42.51±0.17 <sup>c</sup>	44.43±0.13 <sup>a</sup>
EAA/NEAA/%	75.82±2.50 <sup>b</sup>	73.93±0.52 <sup>b</sup>	79.96±0.43 <sup>a</sup>

注: EAA 为必需氨基酸(essential amino acid); TAA 为氨基酸总量(total amino acids); NEAA 为非必需氨基酸(non-essential amino acid); 数据采用字母标记法表示差异显著性: 同一行中相同的字母表示不同动物血豆腐间氨基酸含量差异不显著( $P>0.05$ ); 不同字母则表示含量差异显著( $P<0.05$ )。

EAA 是指在体内不能合成或合成速度不能满足机体需要, 必须由食物供给的氨基酸。EAA 有 Lle、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、色氨酸、Nva<sup>[33]</sup>。猪、羊血豆腐的 EAA 总量相近( $P>0.05$ ), 分别为 40.64 mg/g、41.56 mg/g, 且均显著高于鸭血豆腐( $P<0.05$ )的 27.45 mg/g。鸭、猪、羊血豆腐中含量最高的 EAA 均为 Leu, 分别为 6.78、12.32、11.78 mg/g。鸭、猪血豆腐中含量最低的 EAA 为 Met, 分别为 0.84 mg/g、0.63 mg/g。羊血豆腐中含量最低的 EAA 为 Lle, 含量为 0.77 mg/g。

NEAA 是指人体自身能够合成, 不一定需要通过食物获得的氨基酸。NEAA 并非无用, 在营养和代谢上与 EAA 具有相同的重要性<sup>[33]</sup>。NEAA 有 Ala、Arg、天门冬氨酸、Glu、Gly、Pro、Ser、半胱氨酸、Tyr、His。猪、羊血豆腐的 NEAA 总量相近( $P>0.05$ ), 分别为 54.97、51.96 mg/g, 且均显著高于鸭血豆腐( $P<0.05$ )的 36.37 mg/g。鸭、猪、羊血豆腐中含量最高的 NEAA 均为 Glu, 分别为 8.41、11.22、10.55 mg/g。鸭、猪、羊血豆腐中含量最低的非必需氨基酸为均半胱氨酸, 分别为 0.95、0.92、0.90 mg/g。半胱氨酸和 Tyr 也称为条件必需氨基酸。条件 EAA 是指本可自身合成, 但在某些特定条件下, 不能满足机体需要, 必须从食物中获得的氨基酸<sup>[33]</sup>。鸭、猪、羊血豆腐中的 Tyr 含

量相近( $P>0.05$ ), 分别为 2.06、2.31、2.69 mg/g。目前 His 被认为是婴儿的 EAA。猪、羊血豆腐的 His 含量相近( $P>0.05$ ), 分别为 5.71 mg/g、5.36 mg/g, 均显著高于鸭血豆腐( $P<0.05$ )的 His 含量 3.06 mg/g。鸭、猪、羊血豆腐的 EAA/TAA 分别为 43.11%、42.51%、44.43%, EAA/NEAA 分别为 75.82%、73.93%、79.96%。

### 3 结 论

动物血豆腐是一些地区饮食中常见的传统食材, 具有高蛋白低脂肪的特点。动物血豆腐中氨基酸含量的研究鲜有报道。AOAC Official Method 2018.06 方法多应用于奶粉、谷物等食物中氨基酸的测定。本研究采用此方法测定了鸭、猪、羊 3 种动物血豆腐中的 17 种氨基酸, 进行了方法学验证。通过优化色谱条件, 采用柱程序升温的方法, 提高了 Met 和胱氨酸的分离度, 同时确保了 His 的分离效果不受影响。考察了衍生剂浓度和 3,3'-二硫代二丙酸在水解时的浓度对结果的影响, 结果表明衍生剂浓度为 1、2、4 mmol/L 时, 部分氨基酸结果明显降低, 3,3'-二硫代二丙酸在水解液中的质量浓度为 0、0.2、0.4 mg/mL 时, 胱氨酸的结果也明显较低。方法验证结果表明衍生剂浓度为 10 mmol/L 和 3,3'-二硫代二丙酸在水解液中的质量浓度为 1.2 mg/mL 时, 17 种氨基酸具有良好的准确度和精密度, 本方法能够在 22 min 内实现 17 种氨基酸的分离, 能够满足动物血豆腐中 17 种氨基酸检测的要求。本研究获得了鸭、猪、羊 3 种动物血豆腐的含量数据, 能够为动物血豆腐营养评价等相关研究提供基础数据。

### 参考文献

- [1] 徐荣鹭, 麦籍文, 石雨薇, 等. 畜禽血液外泌体功能及其资源开发研究进展[J]. 肉类研究, 2024, 38(3): 70-77.  
XU RL, MAI JW, SHI YW, et al. Progress on the function and resource development of livestock and poultry blood exosomes [J]. Meat Research, 2024, 38(3): 70-77.
- [2] 张莺莺, 涂尾龙, 王洪洋, 等. 10 种市售畜血豆腐产品食品安全指标的测定[J]. 上海农业学报, 2021, 37(4): 108-116.  
ZHANG YY, TU WL, WANG HY, et al. Food safety index of ten kinds of commercial edible domesticated animal blood tofu products [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2021, 37(4): 108-116.
- [3] 张莺莺, 王洪洋, 涂尾龙, 等. 9 种畜禽血液的氨基酸组成和蛋白质营养分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(5): 150-158.  
ZHANG YY, WANG HY, TU WL, et al. Amino acid composition and protein nutrition analysis of 9 types of animal blood [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(5): 150-158.
- [4] 薛建平, 盛玮. 食物营养与健康[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 2002.  
XUE JP, SHENG W. Food nutrition and health [M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 2002.
- [5] 胡杨, 朱教胜, 杨强, 等. 基于热图和聚类分析新疆 7 个产地荒漠肉苁蓉中氨基酸含量及其营养价值评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(11): 310-318.  
HU Y, ZHU JS, YANG Q, et al. Determination of amino acids content in *Cistanche deserticola* from 7 habitats of Xinjiang based on heatmap and cluster analysis and their nutrition value evaluation [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(11): 310-318.
- [6] 李晖, 吴西梅, 邵义娟. 广东省代表性水产品氨基酸成分分析与营养价值评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(11): 254-261.  
LI H, WU XM, SHAO YJ. Analysis of amino acid composition and nutritional value evaluation of aquatic products in Guangdong Province [J].

- Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(11): 254–261.
- [7] 马洁, 刘佳琳, 赵帅, 等. 某沿海城市常见热加工菜品氨基酸营养评价[J]. 中国慢性病预防与控制, 2024, 32(9): 670–675.  
MA J, LIU JL, ZHAO S, *et al.* Nutrition evaluation of amino acid of common hot-processed dishes in a coastal city [J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Diseases, 2024, 32(9): 670–675.
- [8] 左家信, 陈东洋, 曾栋, 等. 湖南产地9种禽肉类及制品中氨基酸组成及营养评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(17): 238–245.  
ZUO JX, CHEN DY, ZENG D, *et al.* Amino acid composition and nutritional value evaluation of 9 kinds of poultry meats and products in Hunan Province [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(17): 238–245.
- [9] 徐依琳, 黄冬梅, 汤瑜, 等. 食品中氨基酸的检测方法研究进展[J]. 农产品质量与安全, 2024(3): 55–62.  
XU YL, HUANG DM, TANG YY, *et al.* Research progress on the detection technology of amino acids in food [J]. Quality and Safety of Agro-products, 2024(3): 55–62.
- [10] 李莹杰, 张贞伟, 脱佳琪, 等. 2种厚皮甜瓜果实不同部位氨基酸组成分析[J]. 中国瓜菜, 2024, 11: 1–14.  
LI YJ, ZHANG ZW, TUO JQ, *et al.* Analysis of amino acids composition in different fruit parts of two muskmelon varieties [J]. China Cucurbits and Vegetables, 2024, 11: 1–14.
- [11] 张浩, 易宇文, 朱开究, 等. 牦牛肉烤制过程中游离氨基酸对风味物质的影响[J]. 中国食品学报, 2024, 24(9): 457–472.  
ZHANG H, YI YW, ZHU KX, *et al.* Effect of free amino acid changes on flavor substances of yak meat during roasting [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(9): 457–472.
- [12] 孙海达, 马凯, 申鹰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定刺梨原汁中27种游离营养成分[J]. 食品科技, 2024, 49(2): 294–301.  
SUN HD, MA K, SHEN Y, *et al.* Simultaneous determination of 27 free nutrients in *Rosa roxburghii* juice by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science and Technology, 2024, 24(9): 457–472.
- [13] 余欢欢, 周凌聿, 郑金明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定番石榴中21种游离氨基酸含量[J]. 中国食物与营养, 2024, 11: 1–7.  
YU HH, ZHOU LY, ZHENG JM, *et al.* Simultaneous determination of 27 free nutrients in *Rosa roxburghii* juice by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food and Nutrition in China, 2024, 11: 1–7.
- [14] XU W, ZHONG C, ZOU C, *et al.* Analytical methods for amino acid determination in organisms [J]. Amino Acids, 2020, 52(8): 1071–1088.
- [15] SABRINA F, VICTOR GR, DAVY G, *et al.* Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends [J]. Journal of Chromatography B, 2019, 1132: 1154.
- [16] 申兆栋, 黄冬梅, 孔聪, 等. HPLC法在线衍生测定中华绒螯蟹中17种氨基酸含量[J]. 分析实验室, 2021, 40(5): 552–557.  
SHEN ZD, HUANG DM, KONG C, *et al.* Determination of 17 amino acids in *eriocheir sinensis* by HPLC on line derivatization [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2021, 40(5): 552–557.
- [17] 康绍英, 刘宇星, 赵红清, 等. 两种柱前衍生法测定奶粉中牛磺酸的比较研究[J]. 食品安全导刊, 2023(27): 80–83.  
KANG SY, LIU YX, ZHAO HQ, *et al.* Comparison of two pre-column derivatization methods for the determination of taurine in milk powder [J]. China Food Safety Magazine, 2023(27): 80–83.
- [18] 黄莹, 黄晶, 杨晓, 等. PITC柱前衍生-高效液相色谱法测大米肽中的16种氨基酸含量[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 279–285.  
HUANG Y, HUANG J, YANG X, *et al.* Determination of 16 amino acids in rice peptides by PITC pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 279–285.
- [19] 伍清芳, 王敏, 陈鸿平, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生高效液相色谱法测定薏苡仁中17种氨基酸的含量[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(13): 274–279.  
WU QF, WANG M, CHEN HP, *et al.* Determination of 17 amino acids in *Coix lacryma-jobi* seed by HPLC with pre-column derivatization of PITC [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(13): 274–279.
- [20] 张瑞虎, 李瑞, 张潇予, 等. 基于异硫氰酸苯酯柱前衍生-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.
- [21] 王丁林, 张娜娜, 周耀斌. 柱前衍生-高效液相色谱法测定化妆品中16种氨基酸的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2024, 60(7): 674–681.  
WANG DL, ZHANG NN, ZHOU YB. Determination of 16 amino acids in cosmetics by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2024, 60(7): 674–681.
- [22] 辛晓晨, 卫瑾瑾, 张正亮, 等. 柱前衍生-超高效液相色谱法测定河南地方特色食品中的17种氨基酸[J]. 现代疾病预防控制, 2023, 34(8): 608–613.  
XIN XC, WEI JJ, ZHANG ZR, *et al.* Determination of 17 amino acids in local characteristic foods in Henan by RP-UPLC with precolumn derivatization [J]. Modern Disease Control and Prevention, 2023, 34(8): 608–613.
- [23] 卢兰香, 薛霞, 张艳侠, 等. 酸水解-酶水解-UPLC-MS/MS测定特殊医学用途配方食品中多种氨基酸和牛磺酸[J]. 分析实验室, 2023, 42(12): 1622–1630.  
LU XL, XUE X, ZHANG YX, *et al.* Determination of amino acids and taurine in formula foods for special medical by UPLC-MS/MS with acidic hydrolysis and enzymatic hydrolysis [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2023, 42(12): 1622–1630.
- [24] 张嫒, 崔晓灿. HPLC柱前衍生法测定速溶型水解乳清蛋白粉中18种游离氨基酸含量[J]. 食品安全导刊, 2024(14): 101–105.  
ZHANG H, CUI XC. Determination of 18 free amino acids in instant hydrolyzed whey protein powder by pre-column derivatization coupled with high performance liquid chromatography [J]. China Food Safety Magazine, 2024(14): 101–105.
- [25] 尹丽丽, 郑红, 程志, 等. 超高效液相色谱法检测特殊医学用途配方食品中22种游离氨基酸[J]. 食品工业科技, 2023, 44(14): 264–271.  
YIN LL, ZHENG H, CHENG Z, *et al.* Determination of 22 free amino acids in food for special medical purposes by ultra-performance liquid chromatography [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(14): 264–271.
- [26] 李娜, 田芳, 曲粟, 等. 柱前衍生-超高效液相色谱法测定母乳中16种氨基酸的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(11): 1328–1334.  
LI N, TIAN F, QU L, *et al.* Determination of 16 amino acids in breast milk by ultra-high performance liquid chromatography with pre-column derivatization [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2022, 58(11): 1328–1334.
- [27] LI LQ, ZHANG XT, WANG X, *et al.* Quality control of pollen products in the market by quantitative analysis of total amino acids with liquid chromatography [J]. Heliyon, 2024, 10: e35833.
- [28] 戴承兵, 冯蓓健, 姜觅, 等. 乳粉中胱氨酸含量测定的前处理方法优化研究[J]. 卫生研究, 2023, 52(6): 896–899.  
DAI CB, FENG BJ, JIANG M, *et al.* Research on pretreatment methods for cystine determination in milk powder [J]. Journal of Hygiene Research, 2023, 52(6): 896–899.
- [29] 叶颖慧, 郑致, 唐凌轩, 等. 食品中含硫氨基酸含量测定前处理条件的研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 236–242.  
YE YH, BIE Z, TANG LX, *et al.* Pretreatment conditions on the determination of sulfur-containing amino acid in food [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(8): 236–242.
- [30] BARKHOLT V, JENSEN AL. Amino acid analysis: Determination of cysteine plus half-cysteine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive [J]. Analytical Biochemistry, 1989, 177: 318–322.
- [31] JAUDZEMS G, FUERER C. Determination of total amino acids in infant formulas, adult nutritionals, dairy, and cereal matrixes by UHPLC–UV: Interlaboratory validation study [J]. Journal of Aoac International, 2022, 105(6): 1625–1639.
- [32] JAUDZEMS G, GUTHRIE G, LAHRICHI S, *et al.* Total amino acids by UHPLC–UV in infant formulas and adult nutritionals, first action 2018.06 [J]. Journal of Aoac International, 2019, 102(5): 1574–1588.
- [33] 杨月欣, 葛可佑. 中国营养科学全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.  
YANG YX, GE KY. Encyclopedia of nutrition science [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)