DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251224005
引用格式: 胡文慧, 唐烁, 岳虹, 等. 特殊医学用途配方乳粉中色氨酸测定酶解条件优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(9): 191–198.
HU WH, TANG S, YUE H, *et al*. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for determining tryptophan in special medical purpose formula milk powder [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(9): 191–198. (in Chinese with English abstract).

特殊医学用途配方乳粉中色氨酸测定酶解条件优化

胡文慧[1,2], 唐　烁[1,2*], 岳　虹[1,2], 黄晓燕[1,2], 梁建英[1,2], 刘丽君[1,2], 吴晓莉[1,2]

[1. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司, 呼和浩特　010110; 2. 国家市场监督管理总局重点实验室(牛羊乳肉制品风险防控与关键技术), 呼和浩特　010110]

摘　要: 目的　基于氨基酸分析仪建立酶解法测定特殊医学用途配方乳粉中色氨酸的方法。**方法**　在单因素试验基础上, 运用 Box-Behnken 响应面设计, 将酶加入量、酶解温度和酶解时间作为影响因子, 以色氨酸回收率为响应值, 确定酶解最佳条件, 同时对比不同净化方式对结果的影响。**结果**　酶解最佳条件为: 酶添加量 0.74 mL、酶解温度 45.2 °C, 酶解时间 12 h; 通过实验比对确定 12%三氯乙酸为最优沉淀剂。对以上优化条件进行方法学验证, 色氨酸回收率为 95.5%~101.0%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs, n=7)为 0.9%~1.6%, 检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)分别为 0.3 mg/100 g 和 1.0 mg/100 g。**结论**　该方法具有操作简便、准确度高、精密度好等优点, 适用于特殊医学用途配方乳粉中色氨酸的定量检测。

关键词: 色氨酸; 氨基酸分析仪; 酶解; 特殊医学用途配方乳粉; 响应面法

Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for determining tryptophan in special medical purpose formula milk powder

HU Wen-Hui,[1,2] TANG Shuo[1,2*], YUE Hong[1,2], HUANG Xiao-Yan[1,2], LIANG Jian-Ying[1,2], LIU Li-Jun[1,2], WU Xiao-Li[1,2]

(1. *Inner Mongolia Yili Industrial Group Co*., *Ltd*., *Hohhot* 010110, *China*; 2. *Key Laboratory of Bovine and Ovine Milk and Meat Product Risk Prevention and Key Technology*, *State Administration for Market Regulation*, *Hohhot* 010110, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method for determining tryptophan in special medical purpose formula milk powder by enzymatic hydrolysis based on amino acid analyzer. **Methods**　Based on single-factor experiments, the Box-Behnken response surface methodology was employed, with enzyme addition amount, enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis time as influencing factors, and tryptophan recovery rate as the response value. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were determined, and the effects of different purification methods on the results were also compared. **Results**　The optimal enzymatic hydrolysis conditions were: Enzyme addition

收稿日期: 2025-12-24
基金项目: 内蒙古自治区重点研发和成果转化计划项目(2023YFHH0093)
第一作者: 胡文慧(1987—), 女, 硕士, 主要研究方向为食品检测。E-mail: jthuwenhui@yili.com
***通信作者:** 唐烁(1990—), 女, 博士, 主要研究方向为乳品质检测分析。E-mail: tangshuo@yili.com

amount 0.74 mL, enzymatic hydrolysis temperature 45.2 ℃ and enzymatic hydrolysis time 12 h. Through experimental comparison, 12% trichloroacetic acid was identified as the optimal precipitant. Under the optimized conditions: Methodological validation showed a tryptophan recovery rate of 95.5%–101.0%, with relative standard deviations (RSDs, n=7) ranging from 0.9% to 1.6%, and limit of detection (LOD) andlimit of quantitation (LOQ) of 0.3 mg/100 g and 1.0 mg/100 g, respectively. **Conclusion** This method offers ease of operation, high accuracy and excellent precision, making it suitable for the quantitative determination of tryptophan in special medical purpose formula milk powder.

KEY WORDS: tryptophan; amino acid analyzer; enzymatic hydrolysis; special medical purpose formula milk powder; response surface methodology

0 引 言

色氨酸作为人体必需氨基酸, 需通过膳食摄入以满足生理需求[1]。除参与蛋白质合成外, 其代谢产物(如 5-羟色胺、犬尿氨酸等)在调节生长发育、免疫应答及神经功能中发挥重要作用[2–4]。研究表明, 色氨酸缺乏或代谢异常可能导致生长迟缓、免疫力下降及精神类疾病[5–8], 因此建立食品中色氨酸的精准检测方法对保障营养摄入和疾病预防具有重要意义。

乳与乳制品作为优质蛋白来源, 富含色氨酸, 但乳蛋白的高分子结构易导致过敏反应[9]。为降低致敏性, 特殊医学用途配方乳粉通过不同程度水解工艺将蛋白质转化为小分子肽或氨基酸[10], 同时需严格遵循国家标准对色氨酸的限量要求, 婴儿配方食品中色氨酸最低限量为 114 mg/g(以总氮计), 而氨基酸代谢障碍配方食品中其含量需低于 8 mg/g 蛋白质等同物。因此, 开发高效、精准的色氨酸检测技术对保障特殊人群食品安全及营养需求至关重要。

当前色氨酸的检测主要依赖紫外分光光度法、碱水解-高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)及液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS), 但这些方法存在灵敏度不足、前处理复杂或设备成本高等局限性[11–15]。相比之下, 氨基酸分析仪凭借其氮气保护系统、梯度洗脱程序及在线衍生技术, 在氨基酸分离与定量中展现出更高的准确性和稳定性[16]。然而, 特殊膳食用食品基质复杂, 样品中多肽与游离氨基酸共存, 易对目标物分离造成干扰[17], 这对检测方法的特异性提出更高要求。针对上述问题, 本研究以酶水解-氨基酸分析仪为核心, 通过优化蛋白酶添加浓度、酶解温度与时间等关键参数, 并筛选高效沉淀剂, 建立了适用于特殊膳食用食品中色氨酸检测的前处理优化方法。该方法为色氨酸的精准分析提供参考, 同时为相关产品的质量监管及营养评价奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳粉质控样(批号: JT2406-0314, 北京微标标物科技有限公司); 部分水解配方乳粉[圣桐特医(青岛)营养健康科技股份公司); 深度水解配方乳粉[雀巢(中国)有限公司]; 氨基酸配方乳粉[纽迪希亚贸易(上海)有限公司]。

色氨酸标准品(纯度 99.9%, 上海源叶生物科技有限公司); 蛋白酶(活力≥3.5 U/mg, XIV 型, 来源于灰色链霉菌, 德国西格玛-奥德里奇公司); Tris 碱、三氯乙酸、5-磺基水杨酸、无水乙醇(优级纯, 上海泰坦科技股份有限公司); 乙酸锌、亚铁氰化钾(分析纯, 天津市鑫铂特化工有限公司)。

1.2 仪器与设备

日立 LA8080 氨基酸分析仪(茚三酮柱后衍生离子交换色谱仪)、2622PH 阳离子交换色谱柱(4.6 mm×60 mm, 3 μm)(日本日立公司); ME204 型电子分析天平(精度 0.1 mg)、FiveEasy Plus pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); HPP260 恒温恒湿箱(德国 Memmert 公司); Biofuge Stratos 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); VXMTDG 涡旋振荡器(美国 OHAUS 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 酶 解

准确称取一定量试样, 使试样中蛋白质含量在 10~50 mg 范围内, 置于 50 mL 螺纹带盖的离心管中, 依次加入蛋白酶溶液和 3.0 mL Tris 缓冲液, 涡旋混匀, 放入恒温培养箱中进行酶解。

1.3.2 净 化

酶解后的样品分别用 12%的三氯乙酸、10%的 5-磺基水杨酸、乙酸锌(220 g/L)+亚铁氰化钾(106 g/L) 2 mL 和 5%的乙醇溶液将样品转移并定容至 50 mL 容量瓶中[18–20], 混匀, 8000 r/min, 4 ℃冷冻离心 10 min, 取上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后上机。

1.3.3 仪器条件

色谱柱: 2622PH 阳离子交换色谱柱(4.6 mm×60 mm, 3 μm); 检测波长: 570 nm ; 反应器温度: 135 ℃; 柱温: 50 ℃; 进样体积: 20 μL; 流动相流速: 0.4 mL/min; 茚三酮

流速: 0.35 mL/min；分析程序：梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1　梯度洗脱程序
Table 1　Gradient elution procedures

时间/min	流动相体积分数/%				茚三酮及其缓冲液%	
	B1	B2	B3	B4	R1	R2
0.0	100	0	0	0	50	50
2.5	100	0	0	0	50	50
2.6	0	100	0	0	50	50
4.5	0	100	0	0	50	50
4.6	0	0	100	0	50	50
12.8	0	0	100	0	50	50
12.9	0	0	0	100	50	50
27.0	0	0	0	100	50	50

注: B1~B4 为柠檬酸钠缓冲液, pH 分别为 3.3、3.2、4.0、4.9; R1 为茚三酮衍生试剂; R2 为茚三酮缓冲液。

1.3.4　结果计算

样品中色氨酸的含量按式(1)计算:

$$X=\frac{c\times V\times M}{m\times 10^6}\times 100 \quad (1)$$

式中: X 为试样中色氨酸的含量, mg/100 g; c 为试样测定液中色氨酸的含量, nmol/mL; V 为试样水解液定容的体积, mL; M 为色氨酸的摩尔质量(M=204.2), g/mol; m 为称样量, g; 10^6 和 100 单位换算系数。

1.4　单因素及响应面试验设计

基于生产工艺及配方的差异性，将样品划分为 4 类: 乳粉质控样(A 类)、部分水解配方乳粉(B 类)、深度水解配方乳粉(C 类)及氨基酸配方乳粉(D 类)，针对各类乳粉进行酶解条件的优化分析。单因素试验：在其他条件相同的情况下，分别考察酶加入量(0.1、0.2、0.4、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL)、温度(30、35、40、45、50、55 ℃)、时间(4、8、12、16、20、24 h) 3 个因素对色氨酸含量的影响，根据单因素实验结果，使用中心组合设计原理进行 3 因素 3 水平响应曲面分析，具体因素水平见表 2。

表 2　响应面优化色氨酸回收率的因素与水平
Table 2　Factors and levels of response surface optimization for the recovery rate of tryptophans

水平	A(酶加入量)/mL	B(酶解温度)/℃	C(酶解时间)/h
–1	0.50	40	8
0	0.75	45	12
1	1.00	50	16

1.5　数据处理

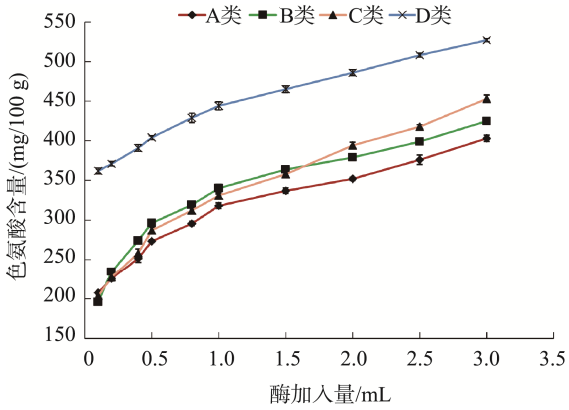
应用 WPS Office (12.8.2.18913-Release 32 位)软件进行数据处理分析和图形绘制，色氨酸含量单位为 mg/100 g，所有实验均设置 3 次独立重复，实验结果以平均值±标准偏差表示。采用 Design-Expert 10.0.4 软件进行响应面设计与等值线图、响应曲面图的绘制，通过多元回归分析评估各因素及其交互作用对响应值的影响显著性，并利用方差分析进行差异性检验(P<0.05 表示差异显著)。

2　结果与分析

2.1　单因素实验结果分析

2.1.1　酶加入量对色氨酸含量的影响

固定酶解温度 50 ℃，酶解时间 16 h，考察不同加酶量(0.1、0.2、0.4、0.5、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL)对色氨酸含量的影响。结果如图 1 所示, 4 类样品色氨酸含量均呈现随酶用量增加升高的趋势。具体而言，在 0.1~0.5 mL 加酶量范围内，色氨酸含量增幅较为明显著，0.1~0.5 mL 增长幅度较缓和，而当加酶量超过 1.0 mL 后，其增长趋势转为线性，原因可能是蛋白酶在特定条件下，比如温度较高时蛋白酶自消解导致[21–23]。因此，酶的加入量范围为 0.5~1.0 mL，需通过响应面进一步确定最适加入量。



注: A 类. 乳粉质控样; B 类. 部分水解配方乳粉; C 类. 深度水解配方乳粉; D 类. 氨基酸配方乳粉。图 2~3、5 同。

图 1　不同酶用量色氨酸含量的变化
Fig.1　Changes in tryptophan content under different enzyme dosages

2.1.2　酶解温度对色氨酸含量的影响

温度是影响酶活性的关键因素之一，温度过高或过低均会降低蛋白酶的催化效率，进而影响色氨酸检测的准确性[24]。研究表明，灰色链霉菌蛋白酶在 30~60 ℃范围内均表现出较高活性[25–26]，因此，在固定酶解时间(16 h)和加酶量(0.5 mL)的条件下，考察 30、35、40、45、50、55 ℃对 4 类样品中色氨酸含量的影响。结果如图 2 所示，40~50 ℃ 4 类样品的色氨酸含量较高，当温度超过 45 ℃时，色氨酸含量呈下降趋势。原因可能是最适温度时酶活性较高，相反，低于或高于最适温度均会影响酶的活性，导致结果偏低。因此，酶解温度范围初步确定为 40~50 ℃，需通过响应面进一步确定最佳酶解温度。

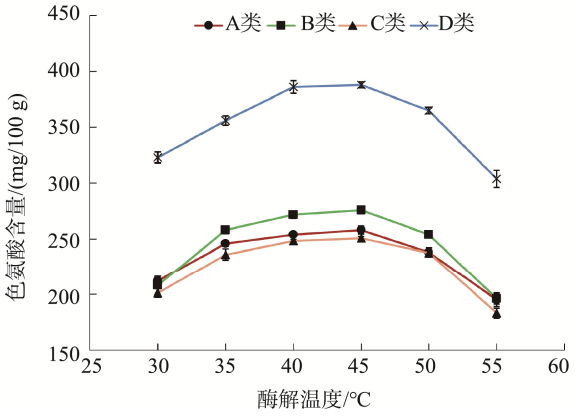


图 2 不同酶解温度色氨酸含量的变化

Fig.2 Changes in tryptophan content at different enzymatic hydrolysis temperatures

2.1.3 酶解时间对色氨酸含量的影响

酶解时间是影响色氨酸检测的关键参数之一[27]。时间不足可能导致蛋白质水解不完全，而时间过长则可能引发色氨酸降解或结构变化[28]。为确定最佳酶解时间，本研究在固定酶用量(0.5 mL)和温度(50 ℃)的条件下，对比了 4、8、12、16、20 和 24 h 对 4 类样品色氨酸含量的影响。结果如图 3 所示，不同样品基质最佳酶解时间存在差异: A 类样品的色氨酸含量与酶解时间呈显著的二次曲性关系，符合酶动力学特征; B 类样品酶解 12 h 后色氨酸含量保持稳定; C 类和 D 类样品在 8 h 时色氨酸含量已达峰值，可能原因是样品基体中蛋白质水解程度较高[29]。尽管不同样品的水解效率受工艺和配方影响，但总体而言，12 h 的酶解时间可确保多数样品水解完全，同时避免过度水解。因此，考虑样品基质差异，初步确定酶解时间为 8~16 h，需通过响应面进一步确定最佳酶解时间。

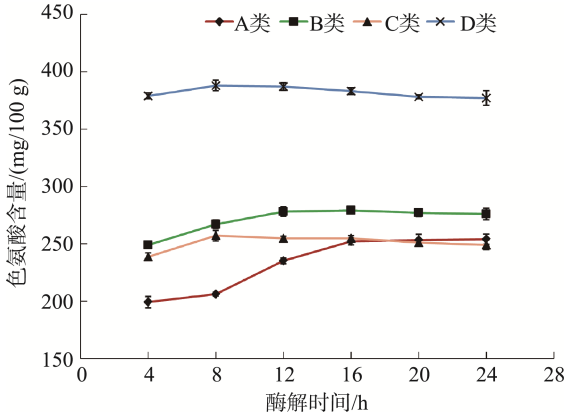


图 3 不同酶解时间色氨酸含量的变化

Fig.3 Changes in tryptophan content under different enzymatic hydrolysis times

2.2 响应面试验结果分析

2.2.1 酶解条件试验设计

在单因素实验基础上，采用 Box-Behnken 实验设计原理，对酶加入量、酶解温度和酶解时间进行进一步优化，设计方案及结果见表 3。以色氨酸回收率为响应值，对表 3 数据进行二次多元回归拟合，方差分析结果如表 4 所示，A、B、C 主效应及二次项 A^2 差异极显著(P<0.01)，二次项 B^2、C^2 差异显著(P<0.05)，AB、BC 交互作用极显著(P<0.01)，AC 差异不显著; 失拟项 0.069>0.01，说明回归模型是合适的; 模型决定系数 R^2=99.51%，调整后的系数 R^2=98.63%，说明实际值与预测值之间具有较好的拟合度，表明该数学模型对响应值 99.51%的变化规律做出解释。

表 3 响应曲面优化设计方案与结果

Table 3 Design scheme and results of response surface optimization

标准序	运行序	点类型	区组	A(酶加入量)/mL	B(酶解温度)/℃	C(酶解时间)/h	回收率/%
4	1	2	1	1.00	50	12	127.3
9	2	2	1	0.75	40	8	86.6
11	3	2	1	0.75	40	16	90.1
2	4	2	1	1.00	40	12	104.5
3	5	2	1	0.50	50	12	87.4
15	6	0	1	0.75	45	12	100.0
14	7	0	1	0.75	45	12	99.8
6	8	2	1	1.00	45	8	112.2
8	9	2	1	1.00	45	16	125.6
13	10	0	1	0.75	45	12	98.9
12	11	2	1	0.75	50	16	112.4
1	12	2	1	0.50	40	12	86.2
10	13	2	1	0.75	50	8	86.7
7	14	2	1	0.50	45	16	94.1
5	15	2	1	0.50	45	8	75.2

表 4　响应曲面回归拟合方差分析结果

Table 4　Results of variance analysis of response surface regression fitting

来源	自由度	平方和	均方	*F*	*P*	显著性
模型	9	3151.56	350.17	112.92	0.000	**
A	1	2006.61	2006.61	647.09	0.000	**
B	1	269.12	269.12	86.79	0.000	**
C	1	472.78	472.78	152.46	0.000	**
A^2	1	84.98	84.98	27.40	0.003	**
B^2	1	33.84	33.84	10.91	0.021	*
C^2	1	25.01	25.01	8.06	0.036	*
AB	1	116.64	116.64	37.61	0.002	**
AC	1	7.56	7.56	2.44	0.179	
BC	1	123.21	123.21	39.73	0.001	**
残差	5	15.50	3.10			
失拟项	3	14.78	4.93	13.64	0.069	
纯误差	2	0.72	0.36			
总和	14	3167.06				
决定系数/%	99.51					
调整系数/%	98.63					

注: *表示差异显著(P<0.05); **表示差异极显著(P<0.01)。

2.2.2　响应面分析及优化

采用固定单因素法，绘制另外两个因素的交互作用对色氨酸回收率影响的等值线图和三维立体曲面图。从图 4 等值线图和曲面图分析，随着酶加入量的增加和酶解温度

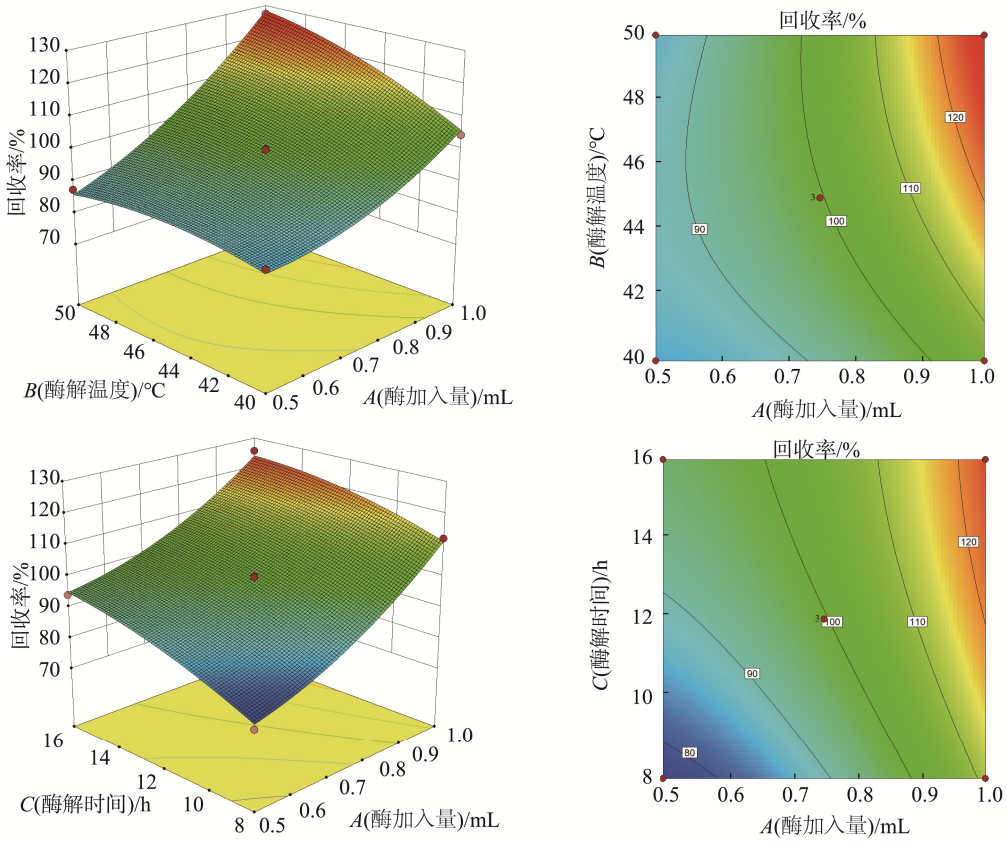


图 4　各因素等值线图和曲面图

Fig.4　Isoline maps and contour plots of each factor

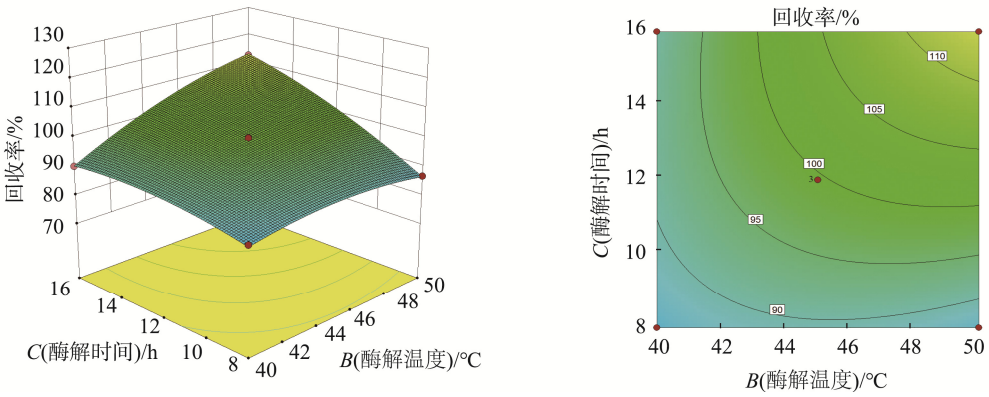


图 4(续) 各因素等值线图和曲面图

Fig.4 Isoline maps and contour plots of each factor

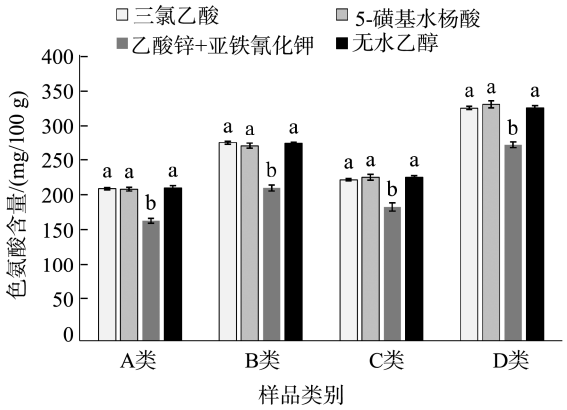
的升高，色氨酸回收率逐渐提高，酶加入量相比酶解温度对色氨酸回收率有更强的影响，且交互作用显著，当酶加入量大于 0.9 mL 时，回收率随酶解温度显著提高；酶加入量与色氨酸回收率正相关，酶解时间对色氨酸回收率的影响较小，两因素交互作用不显著，与表 4 方差分析结果一致；酶解温度和酶解时间交互作用显著，酶解温度相比酶解时间对色氨酸回收率有更强的影响，酶解温度小于 45 ℃时，随着酶解时间的延长，回收率提高较缓慢。因此，鉴于三因素交互作用复杂，需要运用响应优化器对酶解条件进一步地优化。

2.2.3 响应优化和公差设置

设置响应优化参数下限为 90%，上限为 105%，望目 100%，最优参数：酶加入量 0.74 mL、酶解温度 45.2 ℃，酶解时间为 12 h，优化后的色氨酸回收率达到目标值 100%，复合合意性 99.9%。为了提高工作效率，固定酶解时间为 12 h，同时考虑降低检测结果偏高或偏低的风险，选择回收率 95%~102%的公差范围。因此，酶的加入量设置范围为 0.70~0.75 mL，酶解温度设置范围为 43.5~47.5 ℃。

2.3 净化方式对比分析

乳与乳制品及特膳食品(尤其是水解特医食品)的复杂基质中含有大量多肽小分子，若不有效去除，不仅干扰色氨酸测定，还可能会导致色谱柱柱效下降[30]。本研究以 4 类食品为代表，基于蛋白质沉淀原理及仪器兼容性，系统比较了三氯乙酸、5-磺基水杨酸、乙酸锌+亚铁氰化钾和乙醇 4 种方法的提取效果(图 5)。三氯乙酸与 5-磺基水杨酸沉淀完全，且滤液澄清，但 5-磺基水杨酸处理液因与样品中的 Fe^{3+}形成粉红色配合物(pH 4~9)，可能干扰后续吸光度检测[31]；乙酸锌+亚铁氰化钾沉淀效果良好，但色氨酸提取效率显著低于三氯乙酸(P<0.05)，推测因氰化亚铁酸锌络合物吸附目标物[32]；乙醇沉淀后滤液浑浊，需依次通过 0.45 μm 和 0.22 μm 滤膜，处理过程烦琐，而且残留的大量小分子肽会增加色谱柱堵塞风险，减少色谱柱使用寿命。因此，三氯乙酸法在沉淀效率及操作简便性上均表现最优，且无显色干扰，作为样品净化的首选方法。



注：同一样品类别不同小写字母表示不同沉淀方式差异显著(P<0.05)。

图 5 不同沉淀方式对色氨酸含量的影响

Fig.5 Effects of different precipitation methods on the content of tryptophan

2.4 方法学验证

2.4.1 限量值

在上述优化条件下，当称样量为 0.2 g，定容体积为 50 mL，对样品处理液逐级稀释后，方法灵敏度通过信噪比(S/N)法进行评估，确定检出限(limit of detection, LOD, S/N=3)为 0.3 mg/100 g，定量限(limit of quantitation, LOQ, S/N=10)为 1.0 mg/100 g，低于 GB 5009.294—2023《食品安全国家标准 食品中色氨酸的测定》中液相色谱法检出限 1.5 mg/100 g 和定量限 5 mg/100 g，本方法灵敏度较高。

2.4.2 回收率和精密度

为评估方法的准确度和精密度，选取乳蛋白深度水解配方食品为代表样品，进行加标回收试验，结果见表 5。首先测定样品本底色氨酸含量，然后在样品中分别添加 0.5、1.0 和 2.0 倍本底值的色氨酸标准溶液(每个浓度水平 n=7)进行回收实验，结果显示 3 个加标水平的回收率在 95.5%~101.0%之间，RSDs 为 0.9%~1.6%，满足化学分析方法验证通则中回收率和重复性精密度的要求。表明本方法具有良好的准确性和重复性。

表 5　正确度和精密度结果
Table 5　Results of accuracy and precision

样品名称	平均测定结果 /(mg/100 g)	本底含量 /(mg/100 g)	加标质量分数浓度 /(mg/100 g)	平均回收率 /%	RSDs/% (n=7)
加标 1	349	225	123	101.0	1.6
加标 2	460	225	246	95.5	0.9
加标 3	709	225	493	98.2	1.1

注: 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.4.3　实际样品的检测

采用优化后的方法对市售不同品牌的 4 类特殊医学用途配方乳粉(包括乳蛋白部分水解配方、乳蛋白深度水解配方、氨基酸代谢障碍配方及早产/低出生体重配方)中的色氨酸含量进行定量分析。结果(表 6)显示, 不同品牌间色氨酸含量存在差异, 其中氨基酸代谢障碍特医粉和早产/低出生体重特医粉的色氨酸相对含量高于其他两类样品。这一现象可能与两类乳粉的特殊营养强化需求相关: 氨基酸代谢障碍配方需补充特定氨基酸以规避代谢缺陷, 而早产/低出生体重配方则需更高浓度的氨基酸支持追赶性生长。此外, 水解蛋白配方因蛋白分子结构改变, 色氨酸含量波动较大。研究提示, 特医乳粉的色氨酸含量需结合临床营养需求进行针对性调整, 以确保营养供给的精准性和有效性。

表 6　特殊医学用途配方乳粉中色氨酸含量
Table 6　Content of tryptophan in special medical purpose formula milk powder

样品名称	色氨酸含量 /(mg/100 g)	样品名称	色氨酸含量 /(mg/100 g)
乳蛋白部分水解 1	317	氨基酸代谢障碍 1	376
乳蛋白部分水解 2	276	氨基酸代谢障碍 2	348
乳蛋白部分水解 3	207	氨基酸代谢障碍 3	348
乳蛋白深度水解 1	236	早产/低出生体重 1	322
乳蛋白深度水解 2	348	早产/低出生体重 2	315
乳蛋白深度水解 3	204	早产/低出生体重 3	398

3　结　论

本研究通过 Box-Behnken 响应曲面设计优化了酶解法测定特殊医学用途配方乳粉中色氨酸的酶解条件参数, 最优酶加入量 0.74 mL、酶解温度 45.2 ℃, 酶解时间为 12 h 但是考虑实验的可操作性, 确定酶添加量的公差范围为 0.70~0.75 mL、酶解温度范围为 43.5~47.5 ℃, 并筛选出 12% 三氯乙酸作为最优沉淀剂。方法学验证显示, 该方法色氨酸回收率达 95.5%~101.0%, RSDs 为 0.9%~1.6% (n=7), LODs 和 LOQs 分别低至 0.3 mg/100 g 和 1.0 mg/100 g, 表明其具备高准确度、良好精密度及稳定重复性。该技术操作简便、抗干扰性强, 尤其适用于水解蛋白基质中色氨酸的定量检测, 可为特殊医学用途配方乳粉的营养成分分析、临床营养评估及产品质量控制提供可靠依据, 具有显著的实用价值与推广意义。

参考文献

[1] 周恩, 朱磊, 沈洪. 中医药对色氨酸代谢的研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(3): 580–585.
ZHOU EN, ZHU L, SHEN H. Research progress on the effect of traditional chinese medicine on tryptophan metabolism [J]. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 34(3): 580–585.

[2] 陈菁青, 郑建华, 董巧燕, 等. 色氨酸代谢调控肠道应激损伤作用的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 539–546.
CHEN JQ, ZHENG JH, DONG QY, *et al*. Research progress on the role of tryptophan metabolism in regulating intestinal stress injury [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2024, 32(4): 539–546.

[3] KATEWONGSA KP, MANOHONG P, TRANGAN Y, *et al*. Determination of 3-hydroxyanthranilic acid in the sweat of healthy older adults [J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 25396.

[4] 苟小军, 杨艳, 杨晓露, 等. 色氨酸代谢研究进展[J]. 医学研究杂志, 2021, 50(3): 126–128.
GOU XJ, YANG Y, YANG XL, *et al*. Advances in tryptophan metabolism research [J]. Journal of Medical Research, 2021, 50(3): 126–128.

[5] 吴怡, 朱强. 特殊医学用途配方食品产业的发展及治理[J]. 中国食物与营养, 2024, 30(5): 24–28.
WU Y, ZHU Q. The development and governance of special medical-use formula foods industry [J]. Food and Nutrition in China, 2024, 30(5): 24–28.

[6] 李琳瑶, 储小军, 华家才, 等. 婴儿配方乳粉中氨基酸的组成分析[J]. 乳业科学与技术, 2023, 46(3): 1–6.
LI LY, CHU XJ, HUA JC, *et al*. Analysis of amino acid composition in infant formula milk powder [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2023, 46(3): 1–6.

[7] PANT K, THAKUR M, CHOPRA HK, *et al*. Assessment of fatty acids, amino acids, minerals, and thermal properties of bee propolis from Northern India using a multivariate approach [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 111: 104624.

[8] 王琳琳. 特医食品中谷蛋白、氨基酸高效检测方法的建立及应用[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2022.
WANG LL. Establishment and application of efficient detection methods for gluten protein and amino acids in special medical foods [D]. Ji'nan: Qilu University of Technology, 2022.

[9] 吕浩宇. 碱水解-分光光度法测定食品中的色氨酸含量[J]. 现代食品, 2022, 28(4): 161–164.
LV HY. Determination of tryptophan content in food by alkali hydrolysis-spectrophotometry [J]. Modern Food, 2022, 28(4): 161–164.

[10] 宋晓青, 张天博, 贾云虹, 等. 婴儿配方乳粉中蛋白质的营养评价及氨基酸分析研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 292–298.
SONG XQ, ZHANG TB, JIA YH, *et al*. Research progress on nutritional

evaluation and amino acid analysis of protein in infant formula milk powder [J]. Food Science, 2016, 37(1): 292–298.

[11] 田洪芸, 王文特, 王冠群, 等. 酶解-分光光度法测定乳粉中 *L*-色氨酸含量[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(1): 42–46.
TIAN HY, WANG WT, WANG GQ, *et al*. Enzymatic digestion-spectrophotometric method for determining *L*-tryptophan content in milk powder [J]. China Dairy Industry, 2020, 48(1): 42–46.

[12] 谱尼测试科技(北京)有限公司. 一种光度法对食品中色氨酸含量的测定方法: 中国, CN201010121100.1 [P]. 2010-10-06.
SPN Testing Technology (Beijing) Co., Ltd. A spectrophotometric method for determining the content of tryptophan in food: China, CN201010121100.1 [P]. 2010-10-06.

[13] 徐礼生, 高贵珍, 曹稳根, 等. 紫外分光光度法快速测定发酵液中的*L*-色氨酸[J]. 分析试验室, 2014, 33(6): 675–677.
XU LS, GAO GZ, CAO WG, *et al*. Rapid determination of *L*-tryptophan in fermentation broth by ultraviolet spectrophotometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2014, 33(6): 675–677.

[14] 任大喜, 提伟钢, 李景红, 等. 荧光法测定婴儿奶粉中色氨酸的含量[J]. 食品工业科技, 2007(7): 203–204.
REN DX, TI WG, LI JH, *et al*. Fluorescence method for determining the content of tryptophan in Infant formula milk [J]. Science and Technology of Food Industry, 2007(7): 203–204.

[15] KOMAROVA NV, KAMENTSEV JS, SOLOMONOVA AP, *et al*. Determination of amino acids in fodders and raw materials using capillary zone electrophoresis [J]. Journal of Chromatography, B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2004, 800(1/2): 135–143.

[16] 程娇, 孙敬, 梁肖娜, 等. 蛋白酶处理对脱脂乳感官品质及游离氨基酸的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 14–22.
CHENG J, SUN J, LIANG XN, *et al*. Effects of protease treatment on sensory quality and free amino acids in skimmed milk [J]. Food Science, 2021, 42(16): 14–22.

[17] ZHAI ZM, FAN ZF. Optical determination of tryptophan using persistent luminescence nanoparticles (PLNPs) [J]. Analytical Letters, 2024, 57(10/12): 1753–1764.

[18] 冯峰, 王丽娜, 王文枝, 等. 超高效液相色谱法测定婴幼儿乳粉中的色氨酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(10): 3157–3162.
FENG F, WANG LN, WANG WZ, *et al*. Ultra performance liquid chromatography for the determination of tryptophan in infant milk powder [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014(10): 3157–3162.

[19] 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]. 分析试验室, 2023, 42(12): 1622–1630.
LU LX, XUE X, ZHANG YX, *et al*. Determination of various amino acids and taurine in special medical food formulations by acid hydrolysis-enzymatic hydrolysis-UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2023, 42(12): 1622–1630.

[20] 范志颖, 王奇, 吴益淳, 等. 酶解-柱前衍生 UPLC 法检测特医食品中天冬酰胺及谷氨酰胺[J]. 中国测试, 2023, 49(11): 127–131.
FAN ZY, WANG Q, WU YC, *et al*. Enzymatic hydrolysis-pre-column derivatization UPLC method for the determination of asparagine and glutamine in special medical foods [J]. China Measurement & Test, 2023, 49(11): 127–131.

[21] 孙立臻, 别梅, 冯峰, 等. 酶水解-液相色谱法测定婴幼儿食品中的色氨酸[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(9): 47–51.
SUN LZ, BIE M, FENG F, *et al*. Enzymatic hydrolysis-liquid chromatography method for the determination of tryptophan in infant food [J]. China Dairy Industry, 2019, 47(9): 47–51.

[22] 孙宇, 周璇, 莫慧明, 等. 高效液相色谱法测定特殊医学配方食品中的色氨酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(14): 5803–5807.
SUN Y, ZHOU X, MO HM, *et al*. High performance liquid chromatography for the determination of tryptophan in special medical formula foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(14): 5803–5807.

[23] 蒲云月, 陈少波. 氨基酸分析仪法测定奶粉中色氨酸[J]. 农产品加工, 2015(8): 42–43.
PU YY, CHEN SB. Determination of tryptophan in milk powder by amino acid analyzer [J]. Agricultural Products Processing, 2015(8): 42–43.

[24] 区美怡. 高效液相色谱法测定饲料原料中色氨酸的含量[J]. 粮食与饲料工业, 2022(5): 56–58.
OU MY. Determination of tryptophan content in feed raw materials by high performance liquid chromatography [J]. Cereal & Feed Industry, 2022(5): 56–58.

[25] 宋洁, 王丽芳, 姚一萍, 等. 微波水解—氨基酸自动分析仪法测定饲料中色氨酸的含量[J]. 畜牧与饲料科学, 2021, 42(2): 19–25.
SONG J, WANG LF, YAO YP, *et al*. Determination of tryptophan content in feed by microwave hydrolysis-amino acid automatic analyzer method [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2021, 42(2): 19–25.

[26] 单晓雪. 高效液相色谱测定粮食中 *L*-色氨酸的方法分析[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 281–286.
SHAN XX. Analysis of the method for determining *L*-tryptophan in grains by high performance liquid chromatography [J]. Food Science and Technology, 2020, 45(9): 281–286.

[27] 赵长峰, 梅行, 林希蕴, 等. 木瓜蛋白酶水解法测定高粱中色氨酸含量[J]. 中华预防医学杂志, 1995, 29(6): 326.
ZHAO CF, MEI X, LIN XY, *et al*. Determination of tryptophan content in sorghum by papain hydrolysis method [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 1995, 29(6): 326.

[28] 曹梦思, 吴志豪, 高红波, 等. 特殊医学用途配方食品原料标准进展研究之一: 蛋白质与氨基酸[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(4): 230–238.
CAO MS, WU ZH, GAO HB, *et al*. Progress in research on raw material standards for special medical purposes formula foods-protein and amino acids [J]. China Food Additives, 2022, 33(4): 230–238.

[29] 别梅, 孙立臻, 王骏, 等. 液相色谱内标法测定婴幼儿配方食品中色氨酸含量[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(17): 272–276.
BIE M, SUN LZ, WANG J, *et al*. Determination of tryptophan content in infant formula foods by liquid chromatography internal standard method [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(17): 272–276.

[30] 肖云娜, 梁伟娜. 全自动氨基酸分析仪法同时测定复方 *α*-酮酸片中的 5 种氨基酸含量[J]. 分析仪器, 2021(6): 26–31.
XIAO YN, LIANG WN. Simultaneous determination of five amino acids in compound *α*-keto acid tablets by the fully automatic amino acid analyzer [J]. Analytical Instrumentation, 2021(6): 26–31.

[31] 宋洁, 王丽芳, 姚一萍, 等. 饲料中色氨酸测定方法研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2021, 42(1): 45–50. .
SONG J, WANG LF, YAO YP, *et al*. Research progress on the determination methods of tryptophan in feed [J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2021, 42(1): 45–50.

[32] 王永辉, 李培兵, 金宏, 等. 氨基酸分析仪测定血清中犬尿氨酸和色氨酸的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(1): 59–61.
WANG YH, LI PB, JIN H, *et al*. The application value of amino acid analyzer in the determination of kynurenine and tryptophan in serum [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2010, 33(1): 59–61.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)