

利用氨基酸分析仪对酱油中皮革水解蛋白标志物羟脯氨酸的鉴定

彭碧宁¹, 曾川¹, 钟艺园², 潘亮¹, 蔡德玲¹

(1. 中华人民共和国拱北海关技术中心, 广东珠海 519000; 2. 南海区市场监督管理局里水分局, 广东佛山 528200)

摘要 [目的]建立一种利用氨基酸分析仪分析鉴定酱油中皮革水解蛋白标志物羟脯氨酸的方法。[方法]选用4-羟基- α -吡咯甲酸为参考物质,利用氨基酸自动分析仪法和紫外分光光度计法对酱油中L-羟脯氨酸的含量进行测定,比较这2种检测方法测定羟脯氨酸的优缺点。[结果]紫外分光光度法在羟脯氨酸的质量浓度为1~6 mg/L与吸光度之间线性关系良好($R^2=0.9980$),RSD为0.91%,分别添加0.5、2.0、6.0 mg/L羟脯氨酸标准溶液的加标回收率为90.0%~93.8%。氨基酸分析仪法在羟脯氨酸质量浓度为0.5~30.0 mg/L与峰面积之间线性关系良好($R^2=0.9993$),RSD为0.75%,分别添加0.5、10.0、20.0 mg/L羟脯氨酸标准溶液的加标回收率为96.8%~99.7%。[结论]氨基酸分析仪法自动化程度好,重现性和准确度较好,适用于酱油中是否添加动物皮革水解蛋白的鉴定和检测,为食品安全监管提供可靠的技术支持。

关键词 氨基酸分析仪法;皮革水解蛋白标志物;羟脯氨酸;酱油掺假;紫外分光光度法

中图分类号 TS264.2⁺¹ 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)21-0202-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.21.052



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Identification of Hydrolyzed Protein Reagent Protein-Hydroxyproline in Soy Sauce Using Amino Acid Analyzer

PENG Bi-ning¹, ZENG Chuan¹, ZHONG Yi-yuan² et al (1. Technical Center of Gongbei Customs District P. R. China, Zhuhai, Guangdong 519000; 2. Lishui Branch of Nanhai Market Supervision Administration, Foshan, Guangdong 528200)

Abstract [Objective] To set a method for the identification of the hydrolyzed protein marker-hydroxyproline in soy sauce using an amino acid analyzer. [Method] Using 4-hydroxy- α -pyrrolicarboxylic acid as the reference substance, the content of L-hydroxyproline in soy sauce was determined by the automatic amino acid analyzer method and the ultraviolet spectrophotometer method, and the advantages and disadvantages of the two detection methods for the determination of hydroxyproline were compared. [Result] The UV spectrophotometry showed a good linear relationship between the mass concentration of hydroxyproline 1~6 mg/L and the absorbance ($R^2=0.9980$), the RSD was 0.91%, and the recoveries of standard addition of 0.5, 2.0, 6.0 mg/L hydroxyproline standard solution were 90.0%~93.8%. Amino acid analyzer method had a good linear relationship between the mass concentration of hydroxyproline 0.5~30.0 mg/L and the peak area ($R^2=0.9993$), the RSD was 0.75%, the spiked recovery rates of 0.5, 10.0, and 20.0 mg/L hydroxyproline standard solutions were 96.8%~99.7%. [Conclusion] The amino acid analyzer method has good automation, good reproducibility and accuracy. It is suitable for the identification and detection of whether to add animal leather hydrolyzed protein in soy sauce, and provides reliable technical support for food safety supervision.

Key words Amino acid analyzer method; Leather hydrolyzed protein marker; Hydroxyproline; Soy sauce adulteration; UV spectrophotometry

酱油是我国传统的调味品,因其用途广泛,营养成分丰富,广受人们的喜爱。酱油调味品出现方兴未艾的增长势头,市场竞争也日趋激烈。酱油的主要原料经过曲霉、酵母和氨基酸多种微生物的降解作用,产生一系列的生化反应,构成了营养丰富、风味独特的酱油制品,这种便称为酿造酱油。而配制酱油是以酿造酱油为主体,允许在一定的范围内添加酸水解植物蛋白的液体调味品。

酱油的酿造成本并不会很高,但由于许多非法企业希望获得更大的经济收益,便利用掺假酱油(在酱油中偷偷掺入动物水解蛋白)代替高品质的酿造酱油。非法商贩使用动物蛋白质如动物内脏和残羹剩饭生产水解蛋白质来制造掺假酱油,甚至发酵垃圾、头发、皮鞋的下脚料以产生氨基酸,表面上达到酿造酱油的蛋白质质量检验标准。事实上,产生的氯丙醇将对人们造成严重伤害^[1]。为保证酱油相关产品的质量,如何检测酱油是否添加了动物水解蛋白迫在眉睫。

目前检测羟脯氨酸基本使用紫外分光光度计法^[2-6]。国家食品标准 GB/T 9695.23-2008《肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定》也是利用紫外分光光度计法^[7]。而氨基酸分析仪法

大多用来检测乳及乳制品是否添加动物水解蛋白的鉴定^[8-11]。氨基酸自动分析仪尚未有较大普及范围,其费用较高,而且存在需要较多缓冲液,普通实验室难以实现,比较局限于精密检测研究的实验室。而且目前针对研究利用氨基酸分析仪法鉴定酱油制品的羟脯氨酸的文献和科学试验非常少。笔者选用4-羟基- α -吡咯甲酸为参考物质,采用氨基酸自动分析仪法和紫外分光光度计法2种检测方法对酱油中L-羟脯氨酸的含量进行测定,并研究这2种方法的精密度、加标回收率、优缺点、异同点等,探讨对羟脯氨酸的鉴定在区分掺假酱油中的应用价值^[12]。

1 氨基酸分析仪法试验部分

1.1 试验原理 酱油中的蛋白质被盐酸水解成游离氨基酸,经离子交换柱分离后,与茚三酮溶液反应生成显色反应,然后用氨基酸分析仪测定游离氨基酸含量。羟脯氨酸是肌肉胶原蛋白(动物氨基酸)的主要成分之一,其含量为正常胶原蛋白的13.4%,在弹性蛋白中含量较低。L-羟脯氨酸不存在于其他蛋白质中,包括植物水解蛋白质;它被认为是胶原蛋白中的特征性氨基酸。羟脯氨酸有L-羟脯氨酸和D-羟脯氨酸2种,但D-羟脯氨酸在自然界中不存在。因此,L-羟脯氨酸含量的检测已成为衡量动物氨基酸存在的重要指标。所以,一旦在酱油中检测出羟脯氨酸,就可以认为酱油添加了动物水解蛋白。

作者简介 彭碧宁(1983—),女,广东佛山人,工程师,在读硕士,从事食品安全研究。

收稿日期 2021-01-11

1.2 仪器 高速氨基酸自动分析仪(L-8900,日本日立公司);全自动氮吹浓缩仪(TurboVapII,美国 Caliper 公司);电热恒温干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);分析天平(Sartorius BT224S 型,德国赛多利斯公司);安瓿瓶(山西宏光医药公司);酒精喷灯(福州北玻实验仪器公司);高纯氮气瓶(山东天海有限公司)。

1.3 试剂 羟脯氨酸(4-羟基- α -吡咯甲酸),北京恒业中远化工有限公司;茚三酮溶液,日本和光纯药工业公司;MCI® L-8500 缓冲溶液(L-8500-PH-KIT 和 L-8500-PF-KIT),三菱化学公司;盐酸、乙醇均为分析纯,广州化学试剂厂。样品稀释液:1:600 HCL 溶液。5%乙醇溶液:在 1 L 的容量瓶中加入 900 mL 的蒸馏水,再加入 50 mL 的乙醇,充分混匀。所用水为超纯水。

1.4 试验步骤

1.4.1 称样。称取一定量的酱油(精确至 0.000 1 g)于洁净安瓿瓶中或者使用 200 μ L 的移液枪吸取酱油于安瓿瓶中。

1.4.2 水解。称取样品后,加入 6 mol/L 的盐酸溶液至安瓿瓶的 2/3 处,将安瓿瓶口置于酒精喷灯最高温处灼烧封口。随后将其放入 110 $^{\circ}$ C 的电热恒温干燥箱内,水解 22 h,取出,冷却室温。

1.4.3 稀释。利用磨砂片将水解好的安瓿瓶打开,将溶液转移至 50 mL 的比色管中,并用纯净水定容至 50 mL,混匀。

1.4.4 浓缩。取 1 mL 上述样品稀释液至氮吹管中,置于自动氮吹浓缩仪中吹干。氮吹仪的温度设置为 60 $^{\circ}$ C。氮吹是为了将 6 mol/L 的盐酸吹干,因为氨基酸分析仪有不同 pH 的梯度洗脱流程,水解时所加的 6 mol/L 盐酸浓度过高,会导致分析出来的数据有较大误差,并且氮吹的过程可以将氨基酸进行浓缩。

1.4.5 上机分析。加入 2 mL 的样品稀释液,将其调至与缓冲溶液接近的 pH。经 0.22 μ m 水相滤膜过滤,备用上机分析。

1.5 仪器条件 色谱柱为 4.6 mm \times 60 mm 填充柱,阳离子树脂填充;色谱柱温度 57 $^{\circ}$ C;反应器温度 135 $^{\circ}$ C;第 1 通道检测波长 570 nm;第 2 通道检测波长 440 nm;进样体积 20 μ L;分析时间 53 min。

该试验改进的分析程序见表 1。使用 53 min 分析程序,这样较充分地完成对分离柱的洗脱、再生、平衡效果,也较好地保证了对氨基酸的分离效果,又大量地节省了价格昂贵的茚三酮试剂,仅使用原用量的 1/10。压力泵 1 和泵 2 色谱图见图 1。

表 1 分析程序方法

Table 1 Analysis procedure method

时间 Time min	B1 %	B2 %	B3 %	B4 %	B5 %	B6 %	流速 Flow rate mL/min	温度 Temperature $^{\circ}$ C	R1 %	R2 %	R3 %
0.0	100	0	0	0	0	0	0.4	57	50	50	0
2.5	100	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—
2.6	0	100	0	0	0	0	—	—	—	—	—
4.5	0	100	0	0	0	0	—	—	—	—	—
4.6	0	0	100	0	0	0	—	—	—	—	—
12.8	0	0	100	0	0	0	—	—	—	—	—
12.9	0	0	0	100	0	0	—	—	—	—	—
29.0	0	0	0	100	0	0	—	—	—	—	—
29.1	0	0	0	0	0	100	—	—	—	—	—
32.0	—	—	—	—	—	—	—	—	50	50	0
32.1	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	100
33.0	0	0	0	0	0	100	—	—	—	—	—
33.1	0	100	0	0	0	0	—	—	—	—	—
34.0	0	100	0	0	0	0	—	—	—	—	—
34.1	100	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—
37.0	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	100
37.1	—	—	—	—	—	—	—	—	50	50	0
53.0	100	0	0	0	0	0	—	—	50	50	0

注: B1. pH-1; B2. pH-2; B3. pH-3; B4. pH-4; B5. H₂O; B6. pH-RG; R1. 茚三酮; R2. 茚三酮缓冲溶液; R3. 5%的乙醇

Note: B1. pH-1; B2. pH-2; B3. pH-3; B4. pH-4; B5. H₂O; B6. pH-RG; R1. Ninhydrin; R2. Ninhydrin buffer solution; R3. 5% ethanol

2 结果与分析

2.1 前处理及仪器条件的优化 按照 GB 5009.124—2016 标准方法中盐酸水解的试验步骤是用水解管冷冻后充氮气封口,于 110 $^{\circ}$ C 水解 22 h。但在实际操作过程中发现,使用上述方法密封性不好,甚至在水解的过程中,水解管中的液体极易泄露出来,造成盐酸的挥发和烘箱的腐蚀。于是该试

验优化水解的试验步骤,利用酒精喷灯在高温灼烧时对安瓿瓶进行密封封口。

氨基酸分析仪的分析程序设置和缓冲液的配制是试验的关键之一,该试验受缓冲液的 pH 影响较大,pH 的不同可能会导致最后的分析色谱图的差异。将缓冲液按说明书中的配方配制好后,应用 0.22 μ m 水相滤膜过滤,以免缓冲液

中的杂质堵塞氨基酸分析仪的细小管路。日立 L-8900 原来的分析程序并不能把每种氨基酸完全分离,所以必须进行优

化 B1、B2、B3、B4 的切换时间。通过一系列的微调程序,调整出最适宜的分析程序。

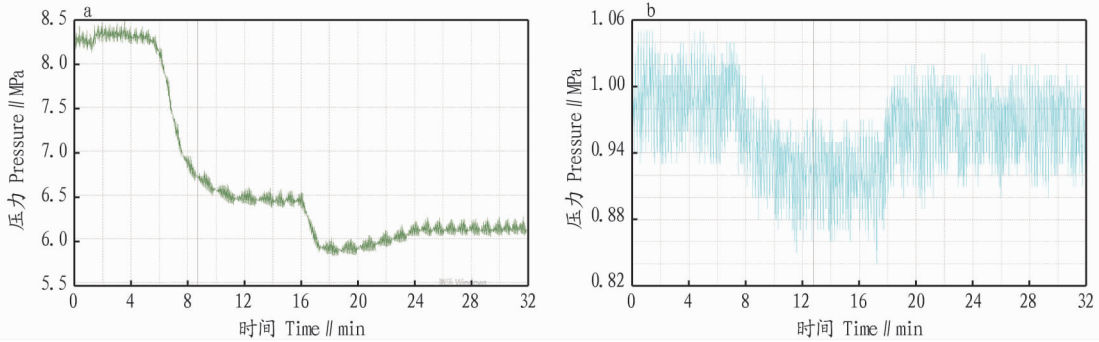


图1 压力泵1(a)和压力泵2(b)色谱图

Fig.1 Chromatograms of pressure pump 1(a) and pressure pump 2(b)

2.2 羟脯氨酸标准曲线的绘制 称取 100 mg 羟脯氨酸标准品至 100 mL 容量瓶中,加超纯水定容,摇匀待用。吸取上述配制好的羟脯氨酸标准溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 分别置于 100 mL 容量瓶中,加超纯水定容,待上仪器分析。以羟脯氨酸浓度 (mg/L) 为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线。由图 2 可知,羟脯氨酸线性回归方程为 $y = 33\ 247x + 3\ 645.8$ ($R^2 = 0.999\ 3$),在羟脯氨酸质量浓度为 0.5~30.0 mg/L 时与峰面积之间有良好的线性关系。羟脯氨酸标准溶液色谱图见图 3。

2 mL 上述配制好的 15 mg/L 的标准溶液稀释液于 6 个进样瓶中。平行测定 6 个进样瓶。分析得出峰面积 RSD 为 0.75%,表明氨基酸分析仪试验方法的精密度高。

2.4 加标回收率 分别取 3 种不同品牌的酱油样品,根据“1.4”试验步骤,分别测定样品中羟脯氨酸含量。再在测定完成后的样品中分别在样品 1、2、3 中添加 1 mg/mL 的羟脯氨酸标准溶液 250.00、0.50、1.00 mL,样品加标后再稀释 10 倍。最后使加标样品溶液的浓度分别为 0.5、10.0、20.0 mg/L。依次进行上机分析测定,每个样品做 3 次平行试验。试验结果见表 2,加标回收率为 96.8%~99.7%,平均加标回收率为 98.4%。

表2 氨基酸自动分析仪加标回收率试验结果

Table 2 Test results of standard addition recovery rate of amino acid automatic analyzer

样品 Sample	本底值 Background value//mg/L	加入值 Added value mg/L	加标测定值 Spiked measured value//mg/L	加标回收率 Spiked recovery rate//%
1	未检出	0.5	0.491	98.3
1	未检出	0.5	0.493	98.6
1	未检出	0.5	0.490	98.0
2	未检出	10	9.869	98.7
2	未检出	10	9.968	99.7
2	未检出	10	9.963	99.6
3	0.975	20	20.335	96.8
3	0.987	20	20.534	97.8
3	0.982	20	20.547	97.8

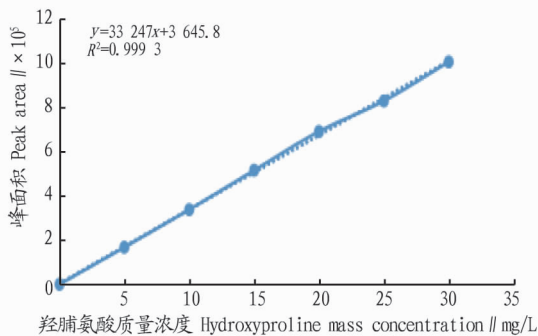


图2 羟脯氨酸标准曲线

Fig.2 Standard curve of hydroxyproline

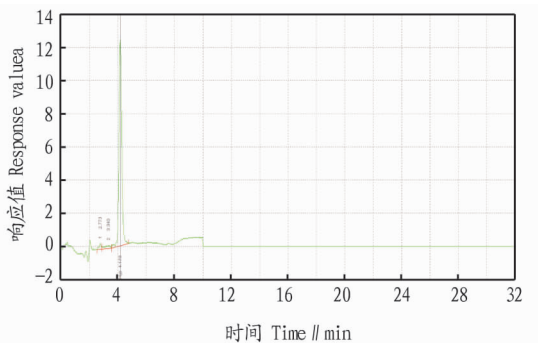


图3 20 mg/L 羟脯氨酸标准溶液 VIS2 整体色谱图

Fig.3 VIS2 overall chromatogram of 20 mg/L hydroxyproline standard solution

2.3 精密度分析 使用配制好的 1 mg/mL 羟脯氨酸标准溶液,吸取 1.5 mL 于 100 mL 容量瓶中,稀释摇匀。分别取

2.5 实际样品测定 分别取市售不同品牌的酱油样品,按“1.4”方法进行处理后上机分析,分别用该试验的氨基酸分析仪法和参照 GB/T 9695.23—2008《肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定》紫外分光光度计法测定酱油样品中羟脯氨酸含量,得到的数据见表 3。1 号酱油样品和 2 号酱油样品色谱图见图 4。

为了更准确判断氨基酸自动分析仪法数据和紫外分光光度计法数据的差异性,选择了羟脯氨酸含量较高的鱼胶原

蛋白肽粉进行 2 种方法的测定。结果显示,紫外分光光度计法测定鱼胶原蛋白肽粉中羟脯氨酸含量为 13.588 $\mu\text{g}/\text{mL}$,使用氨基酸自动分析仪法测定鱼胶原蛋白肽粉中羟脯氨酸含量为 15.681 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。从上述试验结果可知,无论是羟脯氨酸含量高低,相同样品使用氨基酸分析仪检测值高于紫外分光光度计法检测值。氨基酸分析仪的精密度和加标率均比紫外分光光度计好,其测定结果更为准确。鱼胶原蛋白肽粉 VIS2 整体色谱图见图 5。

2.6 辅助鉴定 根据文献[13]报道,酿造酱油和配制酱油在氨基酸组成成分上有明显的差异,所以利用氨基酸自动分析仪确定氨基酸组分的比例关系,不仅可以检测其中是否含有羟脯氨酸,还可以作为区分酿造酱油和非酿造酱油鉴别体系的方法之一,有效打击市场以次充好的现象。

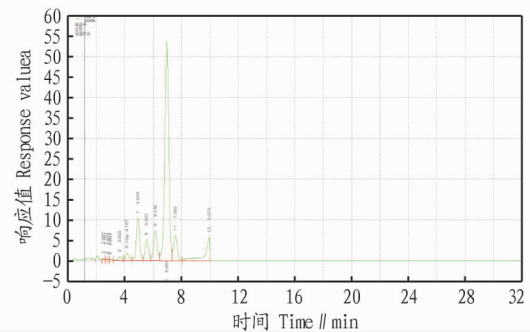
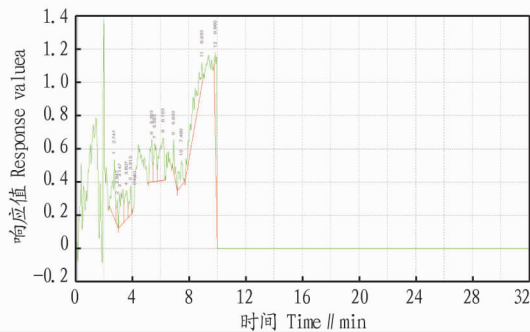


图 4 1号(a)和2号(b)酱油样品 VIS2 色谱图

Fig. 4 IS2 chromatograms of No. 1(a) and No. 2(b) soy sauce samples

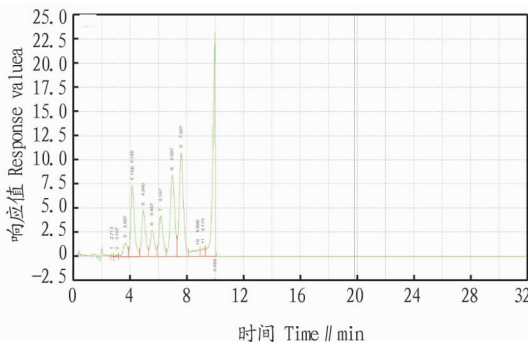


图 5 鱼胶原蛋白肽粉 VIS2 整体色谱图

Fig. 5 VIS2 overall chromatogram of fish collagen peptide powder

以 2 号酱油样品为例,利用氨基酸自动分析仪检测出 16 种氨基酸数据见表 4,这 16 种氨基酸均在第 1 通道检出。由表 4 可知,酱油中谷氨酸的含量较高,而半胱氨酸最低,天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸含量在谷氨酸和半胱氨酸之间。与文献[14]报道的相符,这些氨基酸特征指标及比例关系可辅助判别酱油中是否含有皮革水解蛋白标志物——羟脯氨酸。2 号酱油样品 VIS1 整体色谱图见图 6。

3 结论与讨论

该研究建立了一种利用氨基酸自动分析仪分析鉴定酱

表 3 酱油样品测定结果

Table 3 Test results of soy sauce samples

样品 Sample	方法 Method	羟脯氨酸含量 Hydroxyproline content $\mu\text{g}/\text{mL}$
1号酱油样品	紫外分光光度计法	未检出
	氨基酸自动分析仪法	未检出
2号酱油样品	紫外分光光度计法	0.089
	氨基酸自动分析仪法	0.110
3号酱油样品	紫外分光光度计法	0.520
	氨基酸自动分析仪法	0.630
4号酱油样品	紫外分光光度计法	未检出
	氨基酸自动分析仪法	未检出
5号酱油样品	紫外分光光度计法	0.012
	氨基酸自动分析仪法	0.021
6号酱油样品	紫外分光光度计法	未检出
	氨基酸自动分析仪法	未检出

表 4 酱油样品中检测的氨基酸

Table 4 Amino acids detected in soy sauce samples

序号 No.	出峰时间 Peak time min	氨基酸 Amino acid	峰高 Peak height	峰面积 Peak area	含量 Content nmol
1	4.927	天冬氨酸 Asp	191 468	3 341 265	2.468
2	5.553	苏氨酸 Thr	92 555	1 670 673	1.164
3	6.153	丝氨酸 Ser	124 221	2 284 333	1.585
4	6.947	谷氨酸 Glu	304 484	6 395 398	4.404
5	9.980	甘氨酸 Gly	110 583	2 839 593	1.975
6	10.900	丙氨酸 Ala	121 445	3 600 954	2.658
7	11.747	半胱氨酸 Cys	8 867	192 868	0.129
8	12.380	缬氨酸 Val	114 966	2 132 169	1.528
9	13.713	蛋氨酸 Met	19 389	507 851	0.353
10	16.100	异亮氨酸 Ile	55 125	1 693 797	1.200
11	17.280	亮氨酸 Leu	83 228	2 582 743	1.835
12	18.013	酪氨酸 Tyr	18 257	363 307	0.269
13	18.973	苯丙氨酸 Phe	42 453	1 093 160	0.792
14	21.167	赖氨酸 Lys	137 959	2 333 498	1.503
15	23.387	组氨酸 His	33 887	718 945	0.495
16	27.387	精氨酸 Arg	44 223	1291 695	0.976
17	22.360	羟脯氨酸 Hyp	253 895	6 163 642	6.579

油中皮革水解蛋白标志物羟脯氨酸的方法。通过改进食品标准中测定氨基酸的前处理水解试验步骤以及优化仪器条件,设计了酱油中羟脯氨酸检测的试验流程。同时通过紫外分光光度计法进行验证,确定氨基酸自动分析仪测定的数据是有效可信的。

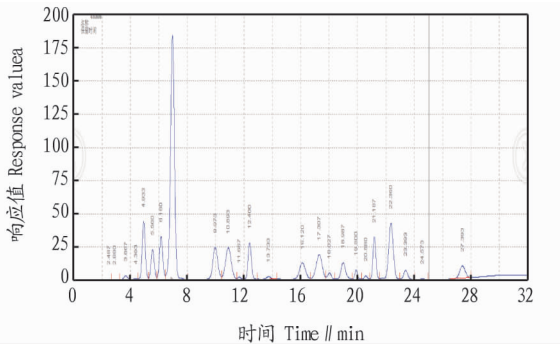


图6 2号酱油样品VIS1整体色谱图

Fig. 6 VIS1 overall chromatogram of No. 2 soy sauce sample

氨基酸自动分析仪可实现羟脯氨酸与其他氨基酸完全洗脱分离,保留时间与酱油中的其他氨基酸不重叠,同时也能测定和分析酱油中其他水解氨基酸。该方法准确,对比其他方法前处理过程更为简便,自动化程度高,无须专人观察仪器的运转情况,灵敏度高,精确度高,变异系数小,能避免氨基酸衍生物的多样性,能够快速地测定羟脯氨酸的含量。该方法具有良好的线性关系、精密度以及回收率。但是氨基酸自动分析仪成本较高,维护费用较为昂贵,会限制中小型企业及基层实验室的使用。

在酱油的生产过程中,如严格按照强制性国家标准 GB/T 2717—2003《酱油卫生标准》^[15]和 GB 2760—2014《食品添加剂使用标准》^[16]的规定执行,则不存在食品超标、微生物污染等的安全性问题。但是非法商贩会使用水解蛋白制造酱油,所以对此类酱油的鉴别是十分必要的。目前市面上的酱油仅从检测氨基酸态氮是否达到了国家标准来衡量酱油的品质,要对其来源进行鉴定,可以对酱油的氨基酸组分进行分析,进一步地确定酱油是否掺假。

在检测掺假的过程中不能单一用羟脯氨酸检测标准,这样不具有可靠性。而是需要结合酱油中含氯化物、氨基酸组成成分分析、羟脯氨酸含量、香味成分指纹图谱、铵盐含量

分析、过氧化值等方面的分析,形成一个联合特征指标标准的鉴别体系。同时要打击酱油掺伪日益严重的现象,不仅需要有关检测方法的不断改进,还需有关政府部门加大执法力度,加强对生产厂家的监管,严惩不法商贩,才能有效地解决人为添加皮革水解物造成的酱油安全性问题^[17]。

参考文献

- [1] 曲云龙. 酱油掺假检测技术的研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2017(5): 86.
- [2] 浦军强. 对酱油中添加动物水解蛋白的鉴定方法[J]. 中国调味品, 2010, 35(3): 100-101, 117.
- [3] 彭亚锋, 周耀斌, 薛峰, 等. 比色法测定酱油中羟脯氨酸含量的探讨[J]. 中国调味品, 2010, 35(2): 100-101.
- [4] 蓝蔚青, 王川, 李燕, 等. 猪皮中羟脯氨酸含量的测定[J]. 中国食物与营养, 2006(10): 38-40.
- [5] 戴绚丽, 范立英, 任艳. 对二甲氨基苯甲醛分光光度法测定奶粉中 L-羟脯氨酸含量[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 313-314, 318.
- [6] 赵天珍, 袁秀金, 谭贵良, 等. 比色法快速测定奶粉和含乳饮料中游离 L-羟脯氨酸[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 111-113.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定: GB/T 9695. 23—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [8] 曾暖茜, 王洪健, 周兴起, 等. 氨基酸自动分析仪对乳制品中羟脯氨酸的测定方法研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(7): 719-721.
- [9] 张秀尧, 梁晓蓉, 蔡欣欣. 氨基酸自动分析仪检测乳及乳制品中羟脯氨酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(10): 2305-2306.
- [10] 冯志强, 许根叶, 黄永连, 等. 氨基酸自动分析仪测定胶原蛋白保健品中羟脯氨酸的含量[J]. 食品工业, 2014, 35(5): 248-250.
- [11] 姜涛, 冯永建, 何学超, 等. 氨基酸自动分析仪快速分析方法的研究[J]. 化学研究与应用, 2012, 24(7): 1159-1163.
- [12] 王海轩, 谷瑞增, 金振涛, 等. 胶原蛋白水解物中 L-羟脯氨酸两种检测方法对比分析[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(22): 119-122.
- [13] 冯志强, 周芳梅, 黄永连, 等. 全自动氨基酸分析仪鉴别不同种类酱油中氨基酸的分析研究[J]. 中国食品添加剂, 2013(5): 198-205.
- [14] 宗雯雯, 冷云伟, 葛冬梅, 等. 几种酱油中氨基酸组分分析与比较[J]. 食品与机械, 2008, 24(4): 105-107.
- [15] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 酱油卫生标准: GB/T 2717—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [17] 徐伟丽, 单毓娟, 张兰威, 等. 酱油掺假检测技术的研究进展[J]. 中国调味品, 2013, 38(11): 103-106, 112.
- [8] 姚卫民. 河池市瓜、果实蝇监测情况初报[J]. 广西植保, 2006, 19(1): 9-11.
- [9] 陈旭, 刘晓飞, 叶辉. 云南主要有害实蝇种类及区划[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 717-725.
- [10] 梁广勤, 杨国海, 梁帆, 等. 亚太地区寡毛实蝇[M]. 广州: 广东科技出版社, 1996: 1-479.
- [11] 陈韶萍, 黄振, 郭琼霞, 等. 实蝇类害虫分子鉴定研究进展[J]. 生物安全学报, 2014, 23(3): 151-155.
- [12] 黄可辉, 郭琼霞, 虞赞, 等. 分子标记法在昆虫学研究中的应用[J]. 华东昆虫学报, 2005, 14(2): 109-114.
- [13] JAMNONGLUK W, BAIMAI V, KITTAAPONG P. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene[J]. *Genetica*, 2003, 119: 19-25.
- [14] JAMNONGLUK W, BAIMAI V, KITTAAPONG P. Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial COI sequences[J]. *Genome*, 2003, 46(1): 112-118.
- [15] 黄振, 陈韶萍, 谢婧, 等. 应用种特异性 PCR 技术快速鉴定辣椒实蝇[J]. 昆虫学报, 2015, 58(4): 460-466.
- [16] 黄振, 郭琼霞, 陈韶萍. 基于 mt DNA Co I 设计种特异性引物快速鉴定具条实蝇[J]. 福建林业科技, 2020, 47(2): 20-25.
- [17] 黄振, 郭琼霞, 陈韶萍. 应用 SS-PCR 技术设计种特异性引物快速鉴定瓜实蝇[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(6): 83-86, 96.
- [18] 黄振. 果实蝇属重要种的鉴定、人工饲料筛选、适生性预测和风险分析[D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [19] 殷玉生, 张帆, 安榆林. 基于线粒体 COI 基因鉴定大小蠹属昆虫[J]. 福建林业科技, 2014, 41(1): 63-67, 120.

(上接第 166 页)