

使用氨基酸分析仪测定茶叶中 21 种氨基酸的含量

LC-373

摘要：本实验参考 GB/T 30987-2020《植物中游离氨基酸的测定》测试条件以茶叶为检测基质，使用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 建立了 21 种氨基酸茚三酮柱后衍生高效液相色谱分析方法。实验结果表明：20 种氨基酸在 7.81~500 nmol/L 浓度范围内，茶氨酸在 31.25~2000 nmol/L 浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均大于 0.999，准确度为 83.7~117.4%。精密度实验中，15.63 nmol/L 标准溶液（其中茶氨酸浓度为 62.5 nmol/L）峰面积 RSD% 为 0.62~4.43%。该方法茚三酮柱后衍生和样品测定为全自动完成，线性好，分离效果佳，适合茶叶中游离氨基酸的测定，同时也为其他需要检测游离氨基酸项目的样品提供参考。

关键词：LC-16AAA 氨基酸分析仪 锂型 茚三酮柱后衍生 茶叶

技术特点：

❖ 氨基酸分析仪配备整套试剂方法包，实验操作简单，上手快，效果好。

岛津 Essentia LC-16AAA 氨基酸分析仪是基于经典的阳离子交换柱分离、柱后茚三酮衍生、光度法测定的原理，对氨基酸进行分离及定性定量分析的仪器。仪器基本结构同普通 HPLC 相似，但针对氨基酸分析进行了细节优化，符合国家标准。系统具有衍生试剂有惰性气体保护，试剂瓶带独立阀门，在线真空脱气，优化后的洗涤梯度只需 2-3 种缓冲液，并配备专属的试剂包，检测系统包含可控温的柱温箱及衍生反应箱，双波长同时检测等特点从而实现氨基酸快速、稳定、灵敏的分析要求。

茶叶中的氨基酸不但能够补充人体内必需的氨基酸，而且还会影响到茶汤的口感，茶叶的成色等等。对茶叶中氨基酸种类含量的检测是对市场上茶叶质量的一种关键控制手段。

本实验使用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 锂型分析柱参考国标 GB/T 30987-2020《植物中游离氨基酸的测定》，选用茶叶作为样品，检测其中 21 种游离氨基酸含量，实现较好的分离，给其他食品等物质检测游离氨基酸提供了更多可能性。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A
输液泵：LC-16×3
阀切换单元：FCV-11AL
化学反应箱：CRB-40
检测器：SPD-16

自动进样器：SIL-16
脱气机：DGU-20A5R
鼓泡单元：DGU-10B
柱温箱：CTO-16L
色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

分析柱：Shimadzu Shim-pack Amino-Li (100 mm×6.0 mm I.D., 5 μm)
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 228-18837-92)
捕氨柱：Shimadzu Shim-pack ISC-30/S0504 Li (50 mm×4.0 mm I.D., 5 μm)
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 228-00821-91)
流动相：锂型氨基酸流动相试剂包流动相 A,B,C
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 228-21195-95)

衍生试剂：茚三酮溶液
 流动相流速：0.6 mL/min
 衍生温度：130°C
 进样量：20 μL
 洗脱方式：梯度洗脱，A 相起始浓度为 100%，时间程序如表 1 所示。

衍生液流速：0.2 mL/min
 柱温：39°C
 检测波长：570 nm/440 nm

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
5.00	泵	B Conc	0
15.00	泵	B Conc	1
22.00	泵	B Conc	1
22.01	泵	B Conc	4
22.01	泵	B Curve	4
45.00	泵	B Conc	6
45.01	泵	B Conc	9
60.00	泵	B Conc	9
60.00	泵	B Curve	-1
71.00	泵	B Conc	29
78.00	泵	B Conc	34
78.01	泵	B Curve	-2
82.00	泵	B Conc	51
82.01	泵	B Curve	4
92.00	泵	B Conc	100
102.00	泵	SV(Pump A)	B-A-A
127.00	泵	B Conc	100
127.01	泵	B Conc	0
130.00	泵	B Conc	0
130.00	泵	SV(Pump A)	A-A-A
145.00	控制器	Stop	

注：SV(PumpA) 表示 A 泵溶剂切换阀，“值”中选择 A 和 B 代表不同的流动相。

1.3 标准品

市售 21 种氨基酸混合标准品：1.25 μmol/mL（茶氨酸浓度为 5 μmol/L）

标准溶液：将市售 21 种氨基酸混合标准品与标准储备液 1 混合，并用流动相 A 逐级稀释成浓度为 7.81、15.63、31.25、62.5、125、250 和 500 nmol/mL 的溶液（其中茶氨酸浓度分别为 31.25、62.5、125、250、500、1000 和 2000 nmol/mL）。

1.4 样品前处理

取市售品牌茶叶适量，研钵研碎，使之能通过40目筛后，备用。

取样品粉末 2.0 g 于 250 mL 锥形瓶中，加 200 mL 沸水冲泡，95°C 水浴加热，每隔 5 min 混匀 1 次，提取 10 min 后取出，趁热抽滤。

滤液冷却至室温后，用水定容至 250 mL，混匀。取适量样品溶液经 0.45 μm 水相滤膜过滤后上机测试。

■ 结果与讨论

2.1 化合物信息

表 2 21 种氨基酸信息表

序号	中文名称	英文缩写	CAS. 号	保留时间 (min)	检测波长 (nm)
1	天冬氨酸	Asp	56-84-8	18.98	570
2	苏氨酸	Thr	72-19-5	25.59	570
3	丝氨酸	Ser	56-45-1	28.26	570
4	天冬酰胺	Asn	56-86-0	31.19	570
5	谷氨酸	Glu	56-85-9	33.31	570
6	茶氨酸	The	147-85-3	38.84	570
7	谷氨酰胺	Gln	3081-61-6	43.06	570
8	甘氨酸	Gly	56-41-7	47.97	570
9	丙氨酸	Ala	72-18-4	53.70	570
10	缬氨酸	Val	52-90-4	57.03	570
11	半胱氨酸	Cys	63-68-3	60.28	570
12	蛋氨酸	Met	63-68-3	64.29	570
13	异亮氨酸	Ile	61-90-5	67.61	570
14	亮氨酸	Leu	60-18-4	69.67	570
15	酪氨酸	Tyr	63-91-2	71.32	570
16	苯丙氨酸	Phe	56-12-2	81.80	570
17	氨基丁酸	GABA	73-22-3	88.48	570
18	组氨酸	Ans	56-87-1	102.65	570
19	赖氨酸	Lys	71-00-1	105.90	570
20	精氨酸	Arg	74-79-3	124.29	570
21	脯氨酸	Pro	56-40-6	46.25	440

2.2 校准曲线和定量限

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，采用外标法建立线性校准曲线，脯氨酸的检测波长是 440 nm，其余 20 种氨基酸的检测波长是 570 nm，结果如图 1 和图 2 所示，21 种氨基酸在 7.81~500 nmol/L 浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均大于 0.999，准确度为 83.7~117.4%。

根据最低浓度点标样数据，以 10 倍信噪比计算方法定量限，各化合物定量限和线性相关系数如表 3 所示。

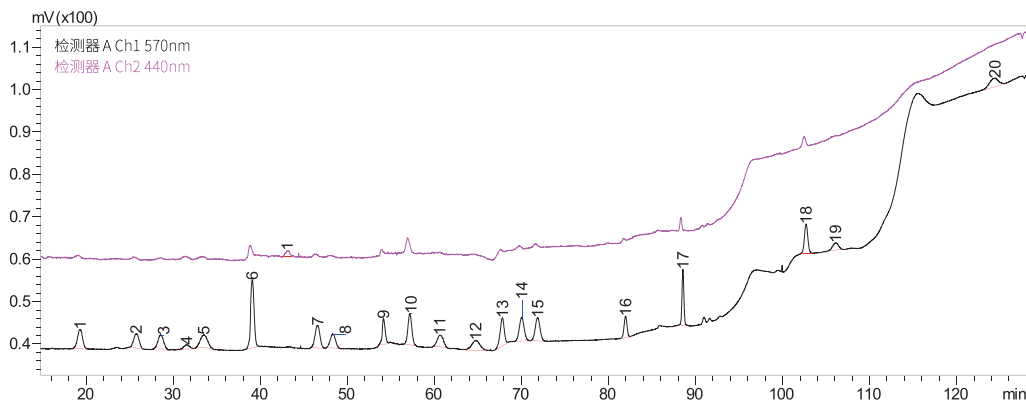


图 1 21 种氨基酸标准溶液图谱

(440 nm, 峰 1 为脯氨酸, 表 2 中序号 21; 570 nm, 峰 1-20 序号同表 2)

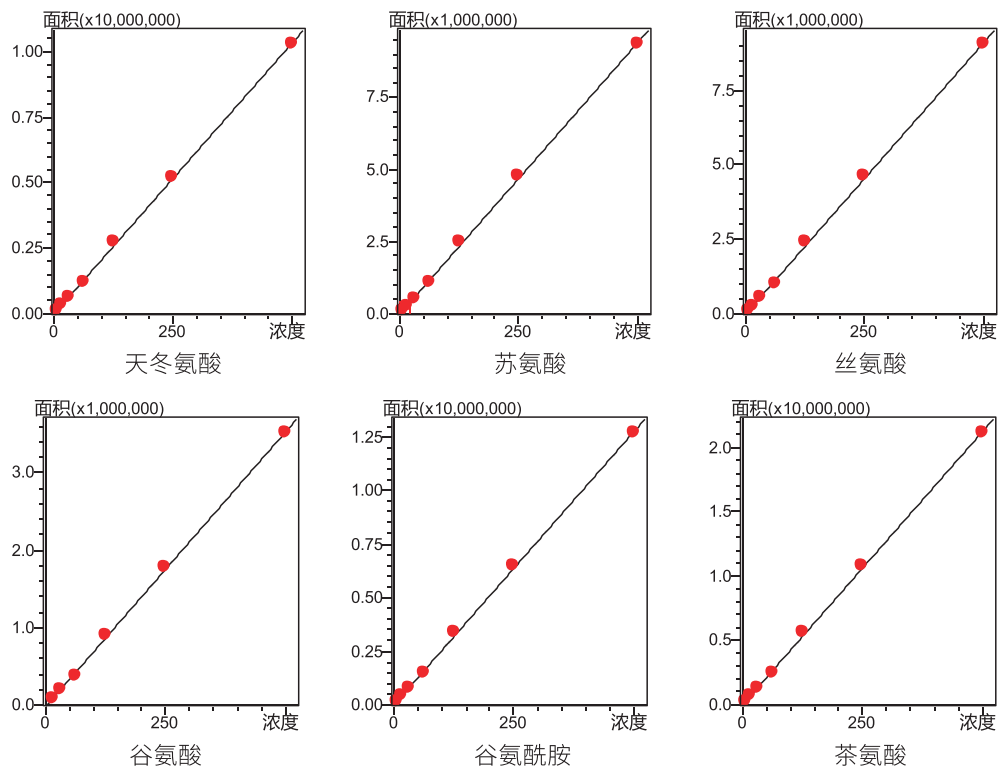


图 2 部分氨基酸校准曲线

表 3 21 种氨基酸相关系数及定量限

ID	组分名称	相关系数 (R)	定量限 (µg/kg)	ID	组分名称	相关系数 (R)	定量限 (µg/kg)
1	天冬氨酸	0.9997	7.653	12	蛋氨酸	0.9997	16.972
2	苏氨酸	0.9993	8.935	13	异亮氨酸	0.9997	5.083
3	丝氨酸	0.9997	8.407	14	亮氨酸	0.9997	5.903
4	天冬氨酸	0.9998	37.489	15	酪氨酸	0.9997	8.607
5	谷氨酸	0.9997	6.942	16	苯丙氨酸	0.9997	8.260
6	茶氨酸	0.9997	10.888	17	氨基丁酸	0.9995	1.934
7	谷氨酰胺	0.9997	14.713	18	组氨酸	0.9995	5.625
8	甘氨酸	0.9997	5.912	19	赖氨酸	0.9995	22.294
9	丙氨酸	0.9999	3.786	20	精氨酸	0.9993	22.864
10	缬氨酸	0.9997	3.954	21	脯氨酸	0.9997	48.355
11	半胱氨酸	0.9998	15.588				

2.3 重复性实验

取 15.63 nmol/L 标准品溶液, 连续进样 6 次, 考察仪器的重复性, 测定结果见表 4。实验结果表明, 该分析方法具有良好的精密度。

表 4 21 种氨基酸峰面积重复性结果

ID	组分名称	RSD(%)	ID	组分名称	RSD(%)
1	天冬氨酸	3.46	12	蛋氨酸	0.62
2	苏氨酸	3.68	13	异亮氨酸	1.70
3	丝氨酸	2.07	14	亮氨酸	1.24
4	天冬氨酸	3.74	15	酪氨酸	2.06
5	谷氨酸	3.02	16	苯丙氨酸	3.26
6	茶氨酸	2.60	17	氨基丁酸	2.19
7	谷氨酰胺	1.23	18	组氨酸	2.60
8	甘氨酸	2.18	19	赖氨酸	2.55
9	丙氨酸	1.30	20	精氨酸	3.86
10	缬氨酸	2.01	21	脯氨酸	3.67
11	半胱氨酸	4.43			

2.4 实际样品分析

将市售茶叶按 1.4 样品前处理后, 用 1.2 方法进样分析, 色谱图如图 3 所示, 所测样品中各氨基酸的含量如表 5 所示。

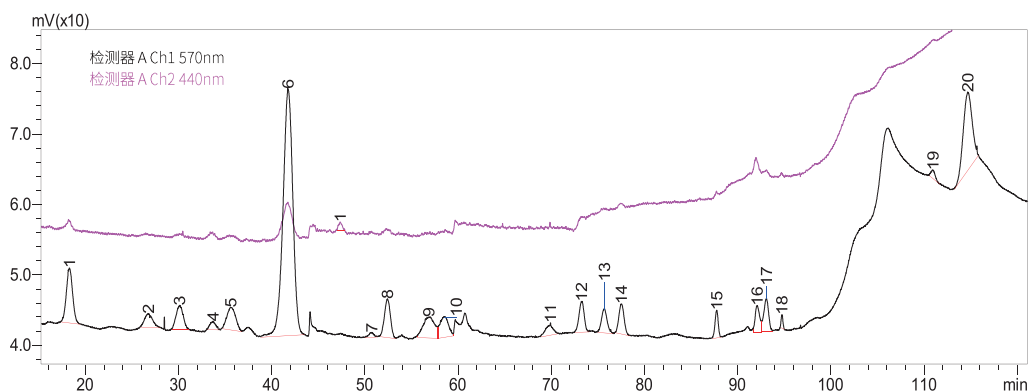


图3 红茶样品色谱图(440 nm, 峰1为脯氨酸, 表2中序号21; 570 nm, 峰1-20序号同表2)

表5 茶叶中氨基酸含量检测结果

ID	组分名称	样品结果 (nmol/L)	样品中氨基酸含量 (μg/kg)	ID	组分名称	样品结果 (nmol/L)	样品中氨基酸含量 (μg/kg)
1	天冬氨酸	17.418	289.79	12	蛋氨酸	7.155	133.44
2	苏氨酸	7.689	114.50	13	异亮氨酸	8.177	134.08
3	丝氨酸	11.197	147.09	14	亮氨酸	4.845	79.45
4	天冬酰胺	13.247	218.77	15	酪氨酸	6.417	145.34
5	谷氨酸	8.767	161.24	16	苯丙氨酸	6.813	140.68
6	茶氨酸	241.311	5254.55	17	氨基丁酸	2.312	29.80
7	谷氨酰胺	1.941	35.46	18	组氨酸	未检出	未检出
8	甘氨酸	14.722	138.15	19	赖氨酸	9.691	177.09
9	丙氨酸	12.656	140.94	20	精氨酸	60.023	1307.00
10	缬氨酸	未检出	未检出	21	脯氨酸	13.192	189.85
11	半胱氨酸	未检出	未检出				

2.5 加标回收率

取2.4中样品溶液(样品中各氨基酸检出值详见表5)进行低浓度(20种氨基酸7.81 nmol/L, 茶氨酸31.25 nmol/L)和中浓度(20种氨基酸62.5 nmol/L, 茶氨酸250 nmol/L)加标后,按照上述前处理方法处理后上机,平行3份样品考察回收率和RSD,具体结果如下:低浓度的加标回收率为82.2%-111.9%,RSD为0.74%-9.08%,中浓度的加标回收率为78.7%-95.8%,RSD为0.26%-2.42%,回收率高,重现性好。

表6 各组分添加回收率结果

ID	组分名称	添加水平 - 低		添加水平 - 中	
		回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)
1	天冬氨酸	97.5	1.65	82.5	0.75
2	苏氨酸	82.2	1.28	81.4	1.71
3	丝氨酸	94.2	3.20	79.6	0.52
4	天冬酰胺	96.9	3.14	80.6	1.68
5	谷氨酸	91.4	3.27	82.7	0.90
6	茶氨酸	96.3	0.76	83.2	0.30
7	谷氨酰胺	89.6	1.33	78.7	0.91

8	甘氨酸	98.7	2.35	84.0	1.19
9	丙氨酸	84.9	7.20	82.0	0.26
10	缬氨酸	107.7	9.08	80.5	1.43
11	半胱氨酸	111.9	0.74	81.0	0.88
12	蛋氨酸	88.6	6.60	81.1	1.21
13	异亮氨酸	100.4	3.98	81.3	0.44
14	亮氨酸	99.9	2.36	83.0	0.17
15	酪氨酸	100.3	2.76	92.4	0.39
16	苯丙氨酸	92.8	1.85	82.7	0.75
17	氨基丁酸	84.4	0.99	81.4	0.29
18	组氨酸	87.4	2.75	81.8	3.33
19	赖氨酸	82.2	3.45	95.8	0.47
20	精氨酸	104.1	5.83	89.3	2.42
21	脯氨酸	91.8	4.11	80.0	0.39

■ 结论

本实验使用岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 参考国标 GB/T 30987-2020《植物中游离氨基酸的测定》用锂型分析柱建立了 21 种氨基酸茚三酮柱后衍生高效液相色谱分析方法。该方法表现出优良的重复性，回收率以及较高的灵敏度。岛津还能够提供对应的专属试剂包，免去试剂配制繁琐，实验人员操作过程误差等可能性，提升实验效率与准确性。氨基酸检测项目一站式搞定，省心省力。

岛津应用云

