

科诺美 Leaps AA5000 氨基酸分析仪测定植物中 21 种氨基酸含量

前言:茶叶中的氨基酸是茶汤的主要成分,它对茶汤的鲜甜味有重要作用,与茶叶的品质呈高度的正相关。在茶叶加工过程中氨基酸在热力等作用下通过美拉德反应、Strecker 降解等形成醛类等香气物质,从而影响茶叶品质。因此氨基酸是评判茶叶品质的重要指标。

本应用采用 Leaps AA5000 氨基酸分析仪,参考国标 GB/T 30987-2020《植物中游离氨基酸的测定》,检测不同茶叶中 21 中氨基酸的含量,其自动化程度高,稳定性良好,且不易受基质干扰,适用于植物中氨基酸的含量测定。

实验部分

1. 仪器系统

Chromai Leaps AA5000 氨基酸分析仪

2. 试剂材料

试剂:分离缓冲液 A、分离缓冲液 B、分离缓冲液 C、再生液;衍生缓冲液,茚三酮试剂,清洗液;样本稀释液。

标准物质:17 种氨基酸混标(L-天冬氨酸, L-苏氨酸, L-丝氨酸, L-谷氨酸, L-脯氨酸, 甘氨酸, L-丙氨酸, L-胱氨酸, L-缬氨酸, L-蛋氨酸, L-异亮氨酸, L-亮氨酸, L-酪氨酸, L-苯丙氨酸, L-赖氨酸, L-组氨酸, L-精氨酸)(1.00 $\mu\text{mol/mL}$ 溶于 0.1 mol/L HCl, 1mL), 购自中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所; L-天冬酰胺(阿拉丁, 纯度 98 %); L-谷氨酰胺(上海安谱瑞世标准技术服务有限公司, 纯度 99.8 %); γ -氨基丁酸(阿拉丁, 纯度 ≥ 99 %); 茶氨酸(阿拉丁, 纯度 98 %)。



样品：xx 牌龙井绿茶，xx 牌茉莉花茶，xx 牌红茶袋泡茶。

3. 储备液和标准曲线配制

标准储备液 (100 nmol/mL)：取 1.00 $\mu\text{mol/mL}$ 混合标准溶液用样本稀释液稀释，配制成浓度为 100 nmol/mL 的混合标准储备液。

标准曲线配制：取适量混合标准储备液用样本稀释液稀释，分别得到浓度 5 nmol/mL、10 nmol/mL、25 nmol/mL、50 nmol/mL、100 nmol/mL 的混合标准工作液供液相色谱测定。

4. 样品制备

准确称取样品约 2.0 g (精确至 0.0001g) 于 250 mL 锥形瓶中，加入 200 mL 沸水冲泡，95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热，每隔 5 min 混匀一次，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，混匀后取适量样品溶液，0.45 μm 水相滤膜过滤后待测。

5. 色谱条件

色谱柱：除氨柱：Lotus-AAA-除氨柱 4.0 mm*50 mm

分析柱：Lotus-AAA-色谱柱 4.6 mm*150 mm

进样量：50 μL

梯度洗脱：时间程序见表 1。

检测波长：一级氨基酸 570 nm，二级氨基酸（脯氨酸）440 nm。

表 1 梯度洗脱时间程序

分离泵						衍生泵					柱温箱	
时间 min	流速 mL/min	A%(分 离缓冲 液 A)	B%(分 离缓冲 液 B)	C%(分 离缓冲 液 C)	D (再生 液)	时间 min	流速 mL/min	A%(衍 生缓 冲液)	B%(茚 三酮试 剂)	C% (清洗 液)	时间 min	温 度 $^{\circ}\text{C}$



0.01	0.45	100	0	0	0	0.01	0.25	40	60	0	0.01	50
15	0.45	100	0	0	0	117	0.25	40	60	0	50	60
20	0.45	91	9	0	0	117.1	0.25	0	0	100	76	70
34	0.45	91	9	0	0	124	0.25	0	0	100	110	50
38	0.45	66	34	0	0	124.1	0.25	40	60	0	-	-
44	0.45	62	38	0	0	145	0.25	40	60	0	-	-
48	0.45	62	38	0	0	-	-	-	-	-	-	-
70	0.45	0	100	0	0	-	-	-	-	-	-	-
71	0.45	0	100	0	0	-	-	-	-	-	-	-
76	0.45	0	0	100	0	-	-	-	-	-	-	-
86	0.45	0	0	100	0	-	-	-	-	-	-	-
89	0.45	0	0	86	14	-	-	-	-	-	-	-
93	0.45	0	0	86	14	-	-	-	-	-	-	-
93.1	0.45	0	0	80	20	-	-	-	-	-	-	-
112	0.45	0	0	76.5	23.5	-	-	-	-	-	-	-
112.1	0.45	0	0	0	100	-	-	-	-	-	-	-
117	0.45	0	0	0	100	-	-	-	-	-	-	-
117.1	0.45	100	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-
145	0.45	100	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-

实验结果

1. 标准溶液谱图

本应用中的 21 种氨基酸峰形良好，分离度高，标准溶液谱图如图 1 和图 2 所示。



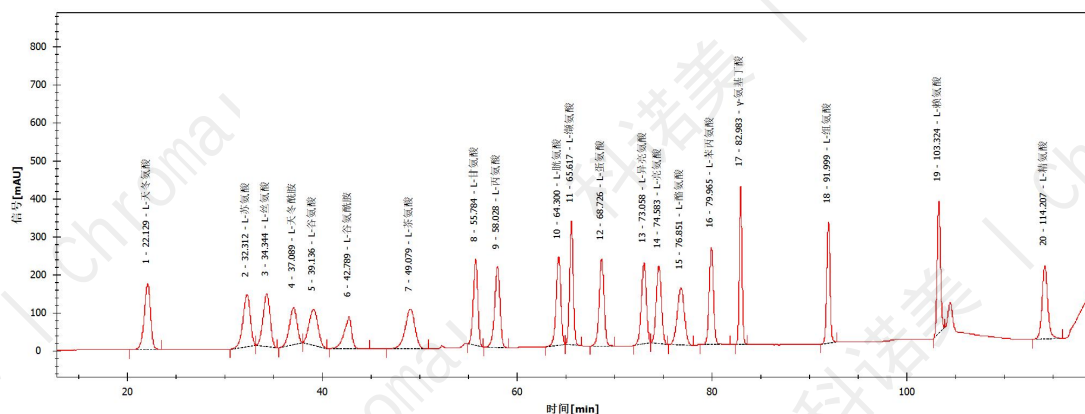


图 1 一级氨基酸标准溶液谱图 (570 nm)

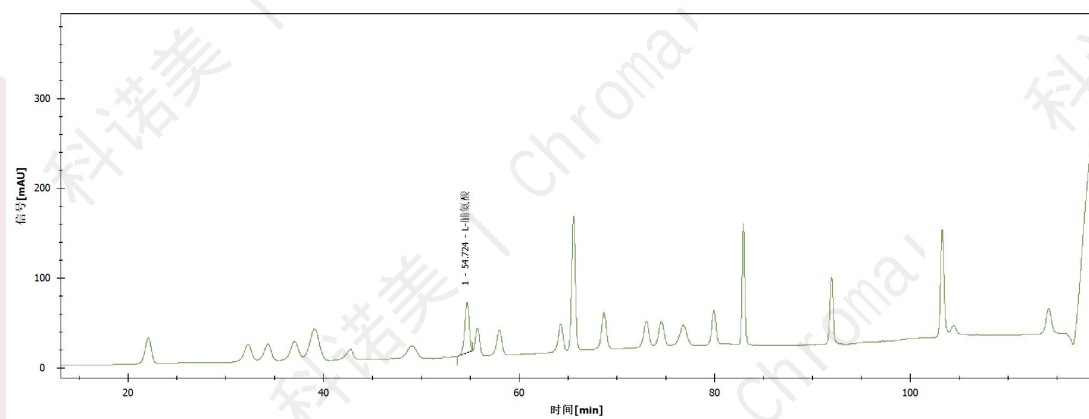


图 2 二级氨基酸标准溶液谱图 (440 nm)

2. 线性关系

依次将标准工作溶液按浓度从低到高进样，以不同浓度点为横坐标，以每个浓度点下氨基酸峰面积为纵坐标绘制标准曲线。各氨基酸在线性范围内，线性相关系数均大于 0.9998。

表 1 氨基酸标准曲线结果表

峰	化合物	线性范围 (nmol/mL)	线性方程	相关系数
1	L-天冬氨酸	5.0-100.0	$Y=78.552X-17.719$	1.0000



2	L-苏氨酸	5.0-100.0	$Y=70.965X-2.7041$	1.0000
3	L-丝氨酸	5.0-100.0	$Y=70.35X+8.2583$	1.0000
4	L-天冬酰胺	5.0-100.0	$Y=52.91X+10.126$	1.0000
5	L-谷氨酸	5.0-100.0	$Y=59.944X+11.418$	1.0000
6	L-谷氨酰胺	5.0-100.0	$Y=45.814X+1.1675$	0.9999
7	L-茶氨酸	5.0-100.0	$Y=73.928X-39.874$	1.0000
8	L-脯氨酸	5.0-100.0	$Y=17.461X-1.903$	1.0000
9	甘氨酸	5.0-100.0	$Y=73.33X+2.6623$	1.0000
10	L-丙氨酸	5.0-100.0	$Y=80.348X-15.552$	1.0000
11	L-胱氨酸	5.0-100.0	$Y=77.887X+3.8592$	1.0000
12	L-缬氨酸	5.0-100.0	$Y=85.252X-4.0538$	1.0000
13	L-蛋氨酸	5.0-100.0	$Y=79.297X-8.0401$	1.0000
14	L-异亮氨酸	5.0-100.0	$Y=76.317X-0.6521$	1.0000
15	L-亮氨酸	5.0-100.0	$Y=76.184X+1.7291$	1.0000
16	L-酪氨酸	5.0-100.0	$Y=77.664X-107.59$	1.0000
17	L-苯丙氨酸	5.0-100.0	$Y=79.485X-2.1177$	0.9998
18	γ -氨基丁酸	5.0-100.0	$Y=78.995X-20.013$	1.0000
19	L-组氨酸	5.0-100.0	$Y=74.483X-81.208$	0.9999
20	L-赖氨酸	5.0-100.0	$Y=82.888X-97.048$	1.0000
21	L-精氨酸	5.0-100.0	$Y=77.096X-45.608$	1.0000



3. 精密度

同一浓度的 21 种氨基酸标准溶液重复进样 6 次，保留时间 RSD%均小于 0.4%，峰面积 RSD%均

小于 1.0%，满足氨基酸测定要求。

表 2 氨基酸精密度结果表

化合物	L-天冬氨酸	L-苏氨酸	L-丝氨酸	L-天冬酰胺	L-谷氨酸	L-谷氨酰胺	L-茶氨酸
保留时间 RSD%	0.24%	0.04%	0.08%	0.23%	0.38%	0.03%	0.10%
峰面积 RSD%	0.29%	0.53%	0.57%	0.51%	0.69%	0.49%	0.51%
化合物	L-脯氨酸	L-甘氨酸	L-丙氨酸	L-胱氨酸	L-缬氨酸	L-蛋氨酸	L-异亮氨酸
保留时间 RSD%	0.03%	0.02%	0.02%	0.01%	0.01%	0.08%	0.03%
峰面积 RSD%	0.78%	0.35%	0.59%	0.36%	0.60%	0.81%	0.45%
化合物	L-亮氨酸	L-酪氨酸	L-苯丙氨酸	γ-氨基丁酸	L-组氨酸	L-赖氨酸	L-精氨酸
保留时间 RSD%	0.04%	0.10%	0.04%	0.01%	0.05%	0.02%	0.06%



峰面积	0.36%	0.49%	0.60%	0.29%	0.83%	0.51%	0.81%
RSD%							

4. 样品测试

分别对 xx 牌红茶袋泡茶、xx 牌龙井绿茶和 xx 牌茉莉花茶进行测试，测试结果见表 3。

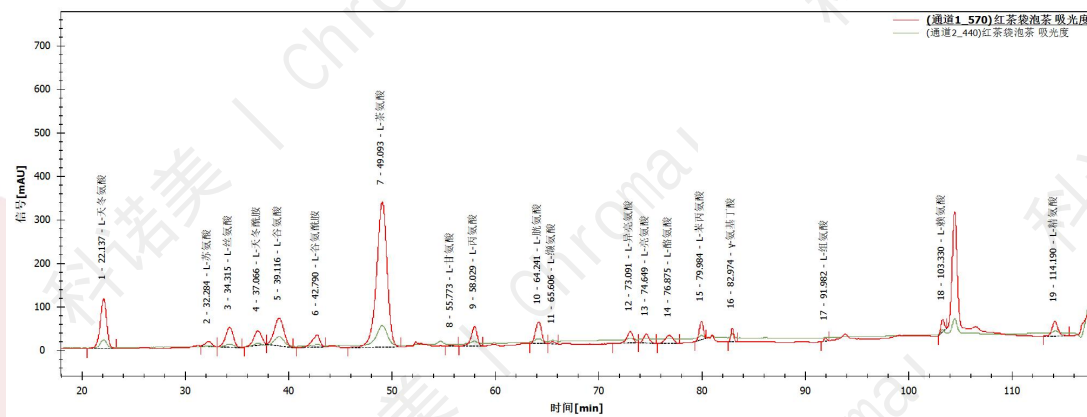


图 3 红茶袋泡茶样品谱图

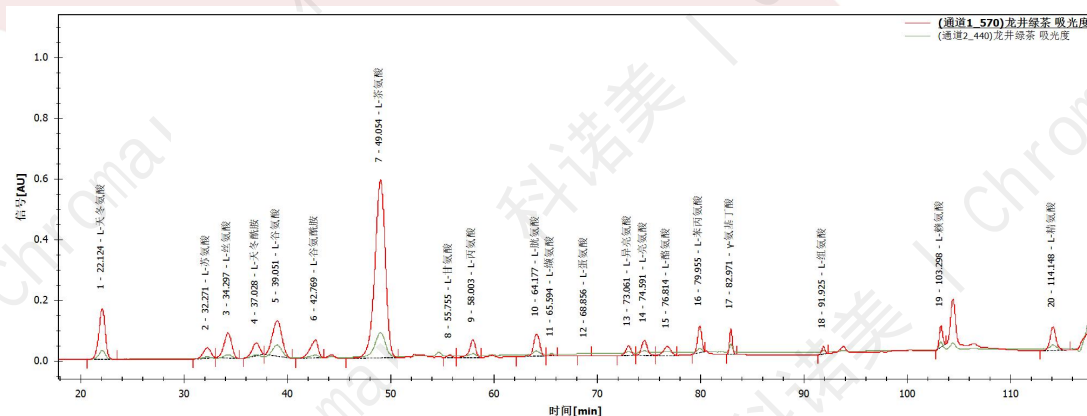


图 4 龙井绿茶样品谱图



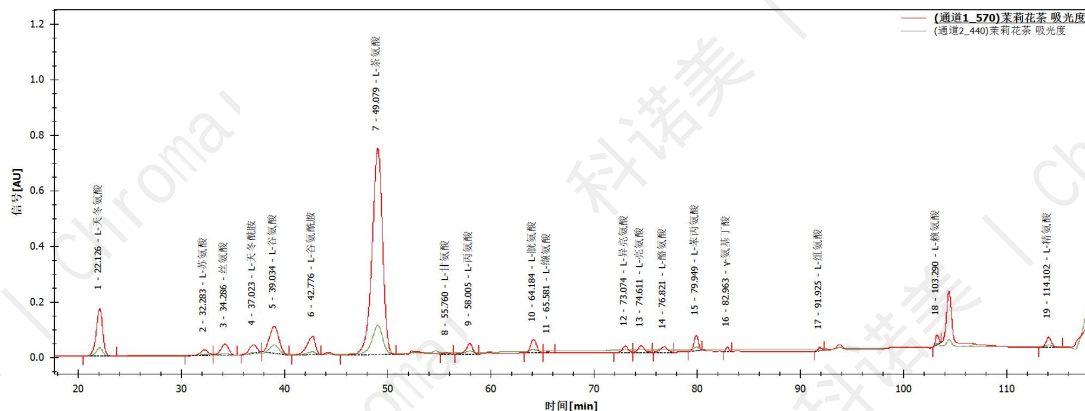


图 5 茉莉花茶样品谱图

表 3 样本测试结果表

序号	化合物名称	xx 牌红茶袋泡茶		xx 牌龙井绿茶		xx 牌茉莉花茶	
		样品结果 (nmol/mL)	样品中氨基酸含量 (mg/kg)	样品结果 (nmol/mL)	样品中氨基酸含量 (mg/kg)	样品结果 (nmol/mL)	样品中氨基酸含量 (mg/kg)
1	L-天冬氨酸	63.62	1058.48	93.16	1549.90	96.26	1601.51
2	L-苏氨酸	6.78	100.90	24.28	361.54	15.85	236.11
3	L-丝氨酸	33.88	445.02	61.18	803.63	31.67	416.04



	氨酸						
4	L-天冬酰胺	43.40	716.79	57.75	953.68	43.10	711.85
5	L-谷氨酸	78.12	1436.73	145.32	2672.67	119.59	2199.42
6	L-谷氨酰胺	31.68	578.81	72.32	1321.12	82.13	1500.41
7	L-茶氨酸	319.86	6964.95	563.19	12263.56	711.61	15495.30
8	L-脯氨酸	13.18	189.64	24.53	353.08	11.96	172.12
9	L-甘氨酸	0.86	8.08	3.08	28.92	1.84	17.31
10	L-丙氨酸	22.09	246.03	29.29	326.20	20.07	223.49
11	L-胱氨酸	25.44	764.30	38.50	1156.34	24.42	733.50
12	L-缬氨酸	1.56	22.87	1.39	20.40	1.27	18.59



	氨酸						
13	L-蛋氨酸	0.00	0.00	0.51	9.51	0.00	0.00
14	L-异亮氨酸	14.57	238.87	14.75	241.92	10.84	177.71
15	L-亮氨酸	10.03	164.55	24.55	402.60	12.30	201.68
16	L-酪氨酸	13.23	299.62	20.55	465.48	13.56	307.22
17	L-苯丙氨酸	14.81	305.87	31.24	645.11	20.12	415.49
18	γ-氨基丁酸	7.62	98.17	20.23	260.78	4.37	56.37
19	L-组氨酸	2.75	53.25	8.09	156.91	4.38	84.96
20	L-赖氨酸	8.53	155.93	20.71	378.53	11.14	203.55



21	L-精氨酸	17.86	388.92	41.06	894.13	19.13	416.51
----	-------	-------	--------	-------	--------	-------	--------

结论

本方案采用 Chromai Leaps AA5000 氨基酸分析仪，搭配专属的试剂包，建立了 21 种氨基酸的测定方法。21 种氨基酸的线性相关系数均大于 0.9998，保留时间重复性均小于 0.4 %，峰面积重复性均小于 1.0 %。自动化程度高，稳定性好，过程简便易操作，可实现氨基酸的精准快速检测要求。

