



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 30987—2020  
代替 GB/T 30987—2014

## 植物中游离氨基酸的测定

Determination of free amino acids in plant

2020-03-31 发布

2020-03-31 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会



## 目 次

前言 .....	I
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 全自动氨基酸分析仪法(第一法) .....	1
5 高效液相色谱法(第二法) .....	6
6 液相色谱-串联质谱法(第三法) .....	9
附录 A(资料性附录) 氨基酸化合物信息及定量限 .....	13
附录 B(资料性附录) 21 种氨基酸混合标准工作溶液色谱图 .....	14
附录 C(资料性附录) 液相色谱-串联质谱参数参考条件 .....	18

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 30987—2014《植物中游离氨基酸的测定》。

本标准与 GB/T 30987—2014 相比,主要技术变化如下:

——增加了液相色谱-串联质谱法(见第 6 章);

——修改了方法灵敏度的表示方式(见 4.5.5.6、5.5.6.4,2014 年版的 4.10、5.10)。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:中国测试技术研究院生物研究所、中国测试技术研究院、河北省食品检验研究院。

本标准主要起草人:李怀平、唐祥凯、杨杰斌、邹燕、赵爱平、吴微、张岩。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 30987—2014。

## 植物中游离氨基酸的测定

### 1 范围

本标准规定了植物中游离氨基酸含量的测定方法,包括全自动氨基酸分析仪法(第一法)、高效液相色谱仪法(第二法)和液相色谱-串联质谱法(第三法)三种方法。

本标准适用于茶叶、中药材、烟叶等植物样品中 21 种游离氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、胱氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、茶氨酸、苏氨酸、酪氨酸、缬氨酸)的测定。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8303—2013 茶 磨碎试样的制备及其干物质含量测定

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**游离氨基酸 free amino acids**

植物中未与其他化学物质结合,以单个分子或离子形式存在,可被水溶液或其他溶剂直接浸提出来的氨基酸。

### 4 全自动氨基酸分析仪法(第一法)

#### 4.1 原理

样品中游离氨基酸经沸水提取后,经氨基酸分析仪的磺酸型阳离子交换柱分离后,在 135 ℃ 下加热,氨基酸与茚三酮混合反应,伯胺与茚三酮生成蓝紫色化合物,仲胺与茚三酮生成黄色化合物,分别在 570 nm 和 440 nm 波长下通过可见光分光光度检测器检测两种衍生产物,保留时间定性,外标工作曲线法定量。

#### 4.2 试剂或材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为优级纯。水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 柠檬酸锂(四水)。

4.2.2 氯化锂。

4.2.3 柠檬酸。

4.2.4 氢氧化锂。

4.2.5 硼氢化钠。



GB/T 30987—2020

4.2.6 无水乙酸钠。

4.2.7 茚三酮。

4.2.8 无水乙醇。

4.2.9 硫代双乙醇。

4.2.10 聚氧乙烯月桂醚。

4.2.11 辛酸。

4.2.12 苯甲醇。

4.2.13 乙二醇甲醚。

4.2.14 冰乙酸。

4.2.15 氨基酸标准品:丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、胱氨酸(Cys)、 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、茶氨酸(The)、苏氨酸(Thr)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val),化合物信息参见附录 A 中表 A.1,纯度均 $>98\%$ 。

4.2.16 快速定量滤纸。

4.2.17  $0.45\ \mu\text{m}$  水相滤膜。

4.2.18  $0.45\ \mu\text{m}$  有机相滤膜。

### 4.3 仪器设备

4.3.1 氨基酸自动分析仪:配备双通道可见光检测器、六元梯度分离系统和三元反应液输送系统。

4.3.2 分析天平:感量  $0.000\ 1\ \text{g}$  和  $0.01\ \text{mg}$ 。

4.3.3 40 目筛,孔径  $0.425\ \text{mm}$ 。

4.3.4 移液器:量程分别为  $10\ \mu\text{L}\sim 100\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$  及  $100\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ 。

### 4.4 样品

样品按 GB/T 8303—2013 中 6.1 和 6.2 规定制样,过 40 目筛。充分混匀,装入洁净的盛样容器内,作为试样,标明标识。

### 4.5 试验步骤

#### 4.5.1 标准溶液配制

##### 4.5.1.1 混合氨基酸标准储备液配制

称取各氨基酸标准品适量(精确到  $0.01\ \text{mg}$ ),用水溶解,配制成混合溶液。混合标准溶液中的茶氨酸和其他 20 种氨基酸的浓度分别为  $5.00\ \mu\text{mol/mL}$  和  $1.25\ \mu\text{mol/mL}$ 。储备溶液冷冻保存有效期为 1 个月。

##### 4.5.1.2 混合氨基酸标准工作液配制

准确吸取  $2\ \text{mL}$  混合氨基酸标准储备液至  $5\ \text{mL}$  容量瓶中,用水稀释定容至刻度,混匀,即得到第一份标准溶液。将第一份标准溶液用水逐级稀释,制成总共 7 个不同浓度的系列混合标准工作溶液。7 个浓度的混合标准工作溶液中茶氨酸及其他 20 种氨基酸的浓度分别为: $2\ 000.00\ \text{nmol/mL}$  和  $500.00\ \text{nmol/mL}$ 、 $1\ 000.00\ \text{nmol/mL}$  和  $250.00\ \text{nmol/mL}$ 、 $500.00\ \text{nmol/mL}$  和  $125.00\ \text{nmol/mL}$ 、 $250.00\ \text{nmol/mL}$  和  $62.50\ \text{nmol/mL}$ 、 $125.00\ \text{nmol/mL}$  和  $31.25\ \text{nmol/mL}$ 、 $62.50\ \text{nmol/mL}$  和  $15.63\ \text{nmol/mL}$ 、 $31.25\ \text{nmol/mL}$  和  $7.81\ \text{nmol/mL}$ ,现配现用。

## 4.5.2 流动相配制

### 4.5.2.1 流动相 B<sub>1</sub> (pH 2.8) 配制

称取柠檬酸锂(四水)5.73 g,氯化锂 1.24 g,柠檬酸 19.90 g,溶于 700 mL 水中,加入 30.0 mL 无水乙醇,5.0 mL 硫代双乙醇,4.0 mL 聚氧乙烯月桂醚,再加入 0.1 mL 辛酸,转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,过 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜,备用。

### 4.5.2.2 流动相 B<sub>2</sub> (pH 3.7) 配制

称取柠檬酸锂(四水)9.80 g,氯化锂 6.36 g,柠檬酸 12.00 g,溶于 700 mL 水中,加入 30.0 mL 无水乙醇,5.0 mL 硫代双乙醇,4.0 mL 聚氧乙烯月桂醚,再加入 0.1 mL 辛酸,转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,过 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜,备用。

### 4.5.2.3 流动相 B<sub>3</sub> (pH 3.6) 配制

称取柠檬酸锂(四水)8.79 g,氯化锂 26.62 g,柠檬酸 11.27 g,溶于 700 mL 水中,加入 100 mL 无水乙醇,3.0 mL 苯甲醇,4.0 mL 聚氧乙烯月桂醚,再加入 0.1 mL 辛酸,转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,过 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜,备用。

### 4.5.2.4 流动相 B<sub>4</sub> (pH 4.1) 配制

称取柠檬酸锂(四水)9.80 g,氯化锂 38.15 g,柠檬酸 3.30 g,溶于 700 mL 水中,加入 4.0 mL 聚氧乙烯月桂醚,再加入 0.1 mL 辛酸,转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,过 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜,备用。

### 4.5.2.5 流动相 B<sub>5</sub> 配制

流动相 B<sub>5</sub> 为经 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜过滤后的水。

### 4.5.2.6 流动相 B<sub>6</sub> 配制

称取氢氧化锂 8.40 g,溶于 700 mL 水中,加入 30.0 mL 无水乙醇,4.0 mL 聚氧乙烯月桂醚,再加入 0.1 mL 辛酸,转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,过 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜,备用。

## 4.5.3 柱后衍生化反应溶液配制

### 4.5.3.1 反应溶液 R<sub>1</sub> 配制

称取茚三酮 39.0 g,溶于 979 mL 乙二醇甲醚中,超声溶解 5 min,过 0.45  $\mu\text{m}$  有机相滤膜,加入硼氢化钠 81.0 mg,氮气鼓泡 30 min,放置过夜使用。

注:反应溶液 R<sub>1</sub> 制备好后宜尽快使用完毕,不宜长期储存。

### 4.5.3.2 反应溶液 R<sub>2</sub> 配制

称取无水乙酸钠 204.0 g,加入 300 mL 水,123 mL 冰乙酸,401 mL 乙二醇甲醚,超声至溶解,转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,过 0.45  $\mu\text{m}$  有机相滤膜,氮气鼓泡 10 min,备用。

### 4.5.3.3 反应溶液 R<sub>3</sub> 配制

准确移取无水乙醇 50 mL 于 1 000 mL 容量瓶中,用纯水定容至 1 000 mL,混匀后过 0.45  $\mu\text{m}$  有机相滤膜过滤,备用。



4.5.4 试样提取

准确称取样品(见 4.4)约 2.0 g(精确至 0.000 1 g)于 250 mL 锥形瓶中,加入 200 mL 沸水冲泡,95 ℃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,经 0.45 μm 水相滤膜过滤后待测。

4.5.5 测定

4.5.5.1 色谱柱

磺酸型阳离子交换柱,3 μm,4.6 mm×60 mm,或同等性能的色谱柱。

4.5.5.2 仪器分离体系运行参考条件

流动相配制见 4.5.2,流动相流速为 0.35 mL/min,流动相及柱温梯度参考条件见表 1,仪器进样体积为 20 μL。

表 1 氨基酸分析仪分离梯度条件程序

时间/min	流动相						柱温/℃
	B <sub>1</sub> /%	B <sub>2</sub> /%	B <sub>3</sub> /%	B <sub>4</sub> /%	B <sub>5</sub> /%	B <sub>6</sub> /%	
0.0	100	0	0	0	0	0	38
2.0	100	0	0	0	0	0	30
21.5	100	0	0	0	0	0	30
21.6	80	20	0	0	0	0	60
32.5	70	30	0	0	0	0	60
32.6	10	90	0	0	0	0	60
36.5	10	90	0	0	0	0	40
43.5	10	90	0	0	0	0	40
43.6	0	100	0	0	0	0	40
50.5	0	100	0	0	0	0	70
50.6	0	0	100	0	0	0	70
68.4	0	0	100	0	0	0	45
69.5	0	0	100	0	0	0	45
69.6	60	0	0	40	0	0	45
74.0	60	0	0	40	0	0	45
74.1	0	0	0	100	0	0	45
82.0	0	0	0	100	0	0	45
82.1	0	20	0	80	0	0	45
92.5	0	20	0	80	0	0	70
99.5	0	20	0	80	0	0	70
99.6	0	0	0	100	0	0	70

表 1 (续)

时间/min	流动相						柱温/℃
	B <sub>1</sub> /%	B <sub>2</sub> /%	B <sub>3</sub> /%	B <sub>4</sub> /%	B <sub>5</sub> /%	B <sub>6</sub> /%	
112.5	0	0	0	100	0	0	70
112.6	0	0	0	0	0	100	70
121.5	0	0	0	0	0	100	70
121.6	100	0	0	0	0	0	70
148.0	100	0	0	0	0	0	38

## 4.5.5.3 氨基酸反应检测体系运行参考条件

反应液配制见 4.5.3, 反应柱温度为 135 ℃, 反应液流速为 0.30 mL/min, 反应液梯度参考条件见表 2。检测器检测波长 570 nm 和 440 nm。

表 2 氨基酸分析仪反应体系条件程序

时间/min	反应溶液		
	R <sub>1</sub> /%	R <sub>2</sub> /%	R <sub>3</sub> /%
0.0	50	50	0
116.0	50	50	0
116.1	0	0	100
126.0	0	0	100
126.1	50	50	0
148.0	50	50	0

## 4.5.5.4 绘制标准工作曲线

启动氨基酸自动分析仪, 设定工作参数, 待基线稳定后, 分别吸取不同浓度的系列混合氨基酸标准工作溶液, 注入氨基酸自动分析仪进行测定, 分别得到 21 种氨基酸的峰面积。分别以各氨基酸峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 建立标准工作曲线。通过保留时间识别各氨基酸出峰顺序。在上述条件(见 4.5.5.1~4.5.5.3)下, 混合氨基酸标准工作溶液色谱图参见附录 B 中图 B.1。

## 4.5.5.5 样品测定

用氨基酸分析仪测定样品溶液, 分别得到样品中各氨基酸色谱峰面积, 代入标准工作曲线计算含量。以水作为空白样品, 在相同测定条件下进行测定, 计算空白样品中各氨基酸本底值。样品测定值扣除空白样品中各氨基酸本底值, 即得各样品中氨基酸净含量。

## 4.5.5.6 方法定量限

方法定量限参见附录 A 中表 A.1。



#### 4.6 试验数据处理

样品中各游离氨基酸含量的计算见式(1):

$$W_1 = \frac{(c - c_k) \times V \times M \times 10^{-6}}{m \times m_1} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$W_1$ ——试样中各氨基酸组分的含量,单位为毫克每100克(mg/100 g);

$c$  ——试样溶液中由标准工作曲线计算出的氨基酸浓度,单位为纳摩尔每毫升(nmol/mL);

$c_k$  ——空白试样溶液中由标准工作曲线计算出的氨基酸浓度,单位为纳摩尔每毫升(nmol/mL);

$V$  ——试样总体积,单位为毫升(mL);

$M$  ——氨基酸的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol);

$m$  ——试样质量,单位为克(g);

$m_1$  ——试样干物率,测定方法见 GB/T 8303。

以两次测定的算术平均值作为测定结果,结果精确至 0.01 mg/100 g。

#### 4.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 12%。

### 5 高效液相色谱法(第二法)

#### 5.1 原理

样品中游离氨基酸经 6-氨基喹啉-*N*-羧基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯衍生,使之生成具有荧光的衍生物,经液相色谱分离,用荧光检测器测定,保留时间定性,外标工作曲线法定量。

#### 5.2 试剂或材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为优级纯。水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 无水硼砂。

5.2.2 无水磷酸氢二钠。

5.2.3 无水磷酸二氢钾。

5.2.4 盐酸三乙胺。

5.2.5 磷酸。

5.2.6 乙腈:色谱纯。

5.2.7 6-氨基喹啉-*N*-羧基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯(CAS 号:148758-94-2);纯度>98%。

5.2.8 氨基酸标准品,见 4.2.15。

5.2.9 快速定量滤纸。

5.2.10 0.45  $\mu$ m 水相滤膜。

5.2.11 0.45  $\mu$ m 有机相滤膜。

#### 5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪(HPLC):配备荧光检测器。

5.3.2 分析天平:感量 0.000 1 g 和 0.01 mg。

5.3.3 涡旋混匀器。

5.3.4 移液器:量程分别为 10  $\mu$ L~100  $\mu$ L, 20  $\mu$ L~200  $\mu$ L 和 100  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L。

## 5.4 样品

见 4.4。

## 5.5 试验步骤

### 5.5.1 混合氨基酸标准工作溶液配制

见 4.5.1.2。

### 5.5.2 衍生试剂的配制

#### 5.5.2.1 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯溶液

称取 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯 3.0 mg, 用 1.0 mL 乙腈溶解, 加盖密封, 涡旋混合 10 s, 置于 55 °C 烘箱中加热, 直到衍生试剂充分溶解, 取出备用。

#### 5.5.2.2 衍生用缓冲溶液配制

称取无水硼砂 10.06 g, 加水溶解并定容至 250 mL, 用磷酸调节 pH 至 8.8, 0.45 μm 水相滤膜过滤后, 即得 0.20 mol/L 的硼砂盐缓冲液, 备用。

### 5.5.3 流动相配制

#### 5.5.3.1 800 mmol/L 磷酸氢二钠储备液配制

称取 113.568 g 无水磷酸氢二钠, 溶解于 800 mL 水中, 加热溶解, 冷却至室温后用水定容至 1 000 mL, 0.45 μm 水相滤膜过滤后备用, 溶液 pH 约为 8.90。

#### 5.5.3.2 800 mmol/L 磷酸二氢钾储备液配制

称取 108.872 g 无水磷酸二氢钾, 溶解于 800 mL 水中, 加热溶解, 冷却至室温后用水定容至 1 000 mL, 0.45 μm 水相滤膜过滤后备用, 溶液 pH 约为 4.28。

#### 5.5.3.3 1 mol/L 的盐酸三乙胺水溶液配制

取 137.650 g 盐酸三乙胺, 用水溶解并定容至 1 000 mL, 0.45 μm 水相滤膜过滤后备用。

#### 5.5.3.4 流动相 A(80 mmol/L 磷酸盐缓冲液)配制

准确移取 800 mmol/L 磷酸二氢钾储备液 95 mL, 800 mmol/L 磷酸氢二钠储备液 5 mL, 1 mol/L 的盐酸三乙胺水溶液 10 mL, 54 mL 乙腈, 于 1 000 mL 容量瓶中, 用水定容至 1 000 mL, 混匀, 超声脱气 10 min 后备用。

#### 5.5.3.5 流动相 B(80 mmol/L 磷酸盐缓冲液)配制

准确移取 800 mmol/L 磷酸二氢钾储备液 100 mL 到 1 000 mL 容量瓶中, 加入水 250 mL, 加入乙腈 500 mL, 用水定容至 1 000 mL, 混匀, 超声脱气 10 min 后备用。

### 5.5.4 试样提取

见 4.5.4。

GB/T 30987—2020

5.5.5 衍生化操作

移取制备好的样品溶液或标准工作溶液 10  $\mu\text{L}$  于洁净的玻璃内插管中,加入衍生用缓冲溶液 70  $\mu\text{L}$ ,然后加入衍生试剂 20  $\mu\text{L}$ ,涡旋混合 10 s,加盖密封于进样瓶中,在室温下静置 1 min,转移至 55  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中加热 10 min,取出待测。

5.5.6 测定

5.5.6.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:  $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$ 250 mm,或同等性能的色谱柱;
- b) 流动相:具体梯度洗脱程序见表 3;
- c) 荧光检测器参数:激发波长 250 nm,发射波长 395 nm;
- d) 柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ;
- e) 流速:1 mL/min;
- f) 进样体积:5  $\mu\text{L}$ 。

表 3 高效液相色谱法洗脱程序

时间/min	流动相	
	A/%	B/%
0	100.0	0.0
5	100.0	0.0
25	97.3	2.7
40	81.2	18.8
55	74.4	25.6
67	50.2	49.8
70	0.0	100.0
75	0.0	100.0
77	100.0	0.0

5.5.6.2 绘制标准工作曲线

启动高效液相色谱仪,设定工作参数,待基线稳定后,分别吸取不同浓度的系列混合氨基酸标准工作溶液,按照 5.5.5 规定进行衍生化操作。衍生化完毕后,注入高效液相色谱仪进行测定,分别得到 21 种氨基酸的峰面积。分别以各氨基酸峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,建立标准工作曲线。通过保留时间识别各氨基酸出峰顺序。在上述色谱条件(见 5.5.6.1)下,混合氨基酸标准工作溶液色谱图参见附录 B 中图 B.2。

5.5.6.3 样品测定

样品溶液与标准工作溶液在相同条件下进行衍生化和测定操作(衍生完毕的样品建议在 48 h 内完成测定),分别得到样品中各氨基酸色谱峰面积,代入标准工作曲线计算含量。以水作为空白样品,在相同测定条件下进行衍生化和测定,计算空白样品中各氨基酸本底值。样品测定值扣除空白样品中各氨基酸本底值,即得各样品中氨基酸净含量。



#### 5.5.6.4 方法定量限

方法定量限参见附录 A 中表 A.1。

#### 5.6 试验数据处理

样品中各游离氨基酸含量的计算见式(2)：

$$W_2 = \frac{(c - c_k) \times V \times M \times 10^{-6}}{m \times m_1} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$W_2$ ——试样中各氨基酸组分的含量，单位为毫克每 100 克(mg/100 g)。

$c$  ——试样溶液中由标准工作曲线计算出的氨基酸浓度，单位为纳摩尔每毫升(nmol/mL)。

$c_k$  ——空白试样溶液中由标准工作曲线计算出的氨基酸浓度，单位为纳摩尔每毫升(nmol/mL)。

$V$  ——试样总体积，单位为毫升(mL)。

$M$  ——氨基酸的摩尔质量，单位为克每摩尔(g/mol)。

$m$  ——试样质量，单位为克(g)。

$m_1$  ——试样干物率，测定方法见 GB/T 8303。

以两次测定的算术平均值作为测定结果，结果精确至 0.01 mg/100 g。

#### 5.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 12%。

### 6 液相色谱-串联质谱法(第三法)

#### 6.1 原理

样品经沸水浸泡提取后过滤，滤液经稀释后进样，液相色谱-串联质谱仪测定，外标工作曲线法定量。

#### 6.2 试剂或材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为优级纯。水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

6.2.1 甲酸铵。

6.2.2 浓盐酸。

6.2.3 甲醇：色谱纯。

6.2.4 甲酸：色谱纯。

6.2.5 乙腈：色谱纯。

6.2.6 氨基酸标准品，见 4.2.15。

6.2.7 快速定量滤纸。

6.2.8 0.45  $\mu$ m 水相滤膜。

6.2.9 0.45  $\mu$ m 有机相滤膜。

#### 6.3 仪器设备

6.3.1 液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS)：配电喷雾离子源(ESI)。

6.3.2 电子天平：感量为 0.000 1 g 和 0.01 mg。

## GB/T 30987—2020

6.3.3 高速离心机:最高转速大于或等于 15 000 r/min。

6.3.4 涡旋混匀器。

6.3.5 移液器:量程分别为 10  $\mu$ L~100  $\mu$ L, 20  $\mu$ L~200  $\mu$ L 和 100  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L。

## 6.4 样品

见 4.4。

## 6.5 试验步骤

### 6.5.1 溶液配制

#### 6.5.1.1 0.1 mol/L 盐酸溶液

取浓盐酸 9.0 mL,倒入预先盛有适量水的试剂瓶中,用水稀释至 1 000 mL,混匀。

#### 6.5.1.2 50%乙腈溶液

取乙腈 500 mL,加水 500 mL,混匀。

#### 6.5.1.3 混合氨基酸标准储备液配制

称取各氨基酸标准品适量(精确到 0.01 mg),用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并配制成各氨基酸质量浓度均为 1 000 mg/L 的混合氨基酸标准储备液,于 0  $^{\circ}$ C~4  $^{\circ}$ C 下保存,有效期为 1 个月。

#### 6.5.1.4 混合氨基酸标准中间液配制

准确吸取 1.0 mL 混合氨基酸标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用 0.1 mol/L 盐酸溶液稀释并定容至刻度,混匀,配制成质量浓度均为 100 mg/L 的混合氨基酸标准中间液,现配现用。

#### 6.5.1.5 混合氨基酸标准工作溶液配制

准确吸取 1.0 mL 混合氨基酸标准中间液于 10 mL 容量瓶中,用 50%乙腈溶液稀释并定容至刻度,混匀,即得第一份标准溶液。将第一份标准溶液用 50%乙腈溶液逐级稀释,制成总共 7 个不同浓度的系列混合标准工作溶液。7 个浓度的混合标准工作溶液中 21 种氨基酸的质量浓度均为 10 mg/L、5.0 mg/L、2.5 mg/L、1.0 mg/L、0.50 mg/L、0.25 mg/L、0.10 mg/L,现配现用。

### 6.5.2 流动相配制

#### 6.5.2.1 200 mmol/L 甲酸铵溶液配制

称取 12.612 g 甲酸铵,溶解于 1 000 mL 水中,用甲酸调节 pH 至 3.0。

#### 6.5.2.2 流动相 A(20 mmol/L 甲酸铵-水溶液)配制

准确移取 100 mL 200 mmol/L 甲酸铵溶液,加入 900 mL 水,混匀。

#### 6.5.2.3 流动相 B(20 mmol/L 甲酸铵-乙腈溶液)配制

准确移取 100 mL 200 mmol/L 甲酸铵溶液,加入 900 mL 乙腈,混匀。

### 6.5.3 试样提取

试样提取按 4.5.4 规定执行。移取 1 mL 提取液于 10 mL 容量瓶中,用 50%乙腈溶液稀释并定容

至刻度,混匀,取 2 mL 稀释液于 4 ℃ 14 000 r/min 下离心 10 min,取适量上清液待测。

#### 6.5.4 测定

##### 6.5.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:HILIC-Z, 2.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$ 150 mm,或同等性能的色谱柱;
- b) 流动相:具体梯度洗脱程序见表 4;
- c) 流速:0.5 mL/min;
- d) 柱温:25 ℃;
- e) 进样量:1  $\mu\text{L}$ 。

表 4 液相色谱-串联质谱法洗脱程序

时间/min	流动相	
	A/%	B/%
0	0	100
11.5	30	70
12	0	100
30	0	100

##### 6.5.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- b) 扫描方式:正离子模式;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 干燥气、雾化气、碰撞气、鞘气均为高纯氮气;使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求,参考条件参见附录 C;
- e) 喷雾电压、碎裂电压、碰撞气能量等参数应优化至最佳灵敏度,参考条件参见附录 C。

##### 6.5.4.3 绘制标准工作曲线

在相同仪器条件(见 6.5.4.1、6.5.4.2)下,将系列混合氨基酸标准工作溶液由低浓度到高浓度依次进样分析,以各氨基酸的定量离子峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,建立标准工作曲线。在上述色谱条件(见 6.5.4.1、6.5.4.2)下,21 种氨基酸的参考保留时间参见附录 C 中表 C.1,总离子流图参见附录 B 中图 B.3,多反应监测图参见附录 B 中图 B.4~图 B.24。

##### 6.5.4.4 样品测定

在相同仪器条件(见 6.5.4.1、6.5.4.2)下,将待测液注入液相色谱-质谱/质谱仪,得到样品溶液中各氨基酸的定量离子峰面积,代入标准工作曲线计算含量。待测液中各氨基酸的响应值应在标准工作曲线线性范围内,如果含量超过标准工作曲线范围,应稀释到合适浓度后再进样分析。

##### 6.5.4.5 定性判断

在相同仪器条件(见 6.5.4.1、6.5.4.2)下,如果样品中待测物质的色谱峰保留时间和标准工作溶液



的相同,并且样品谱图中被测组分监测离子的相对丰度和标准品的相对丰度一致,允许偏差不超过表 5 规定的范围,则可判断样品中存在对应的氨基酸。

表 5 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

#### 6.5.4.6 方法定量限

方法定量限参见附录 A 中表 A.1。

#### 6.6 试验数据处理

样品中各游离氨基酸含量的计算见式(3):

$$W_s = \frac{\rho \times V \times 10^{-3} \times 100}{m \times m_1} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$W_s$ ——试样中各氨基酸组分的含量,单位为毫克每 100 克(mg/100 g)。

$\rho$  ——试样溶液中由标准工作曲线计算出的氨基酸质量浓度,单位为毫克每升(mg/L)。

$V$  ——试样总体积,单位为毫升(mL)。

$m$  ——试样质量,单位为克(g)。

$m_1$ ——试样干物率,测定方法见 GB/T 8303。

以两次测定的算术平均值作为测定结果,结果精确至 0.01 mg/100 g。

#### 6.7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 12%。

## 附录 A

(资料性附录)

## 氨基酸化合物信息及定量限

氨基酸化合物信息及定量限见表 A.1。

表 A.1 氨基酸化合物信息及定量限

序号	中文名称	英文简写	CAS号	分子式	相对分子质量	定量限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
						第一法	第二法	第三法
1	丙氨酸	Ala	56-41-7	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	89.09	13.92	3.03	25.00
2	精氨酸	Arg	1119-34-2	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	174.20	27.24	19.80	12.50
3	天冬酰胺	Asn	70-47-3	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	132.12	75.06	13.62	50.00
4	天冬氨酸	Asp	56-84-8	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	133.10	13.44	31.95	50.00
5	胱氨酸	Cys	56-89-3	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$	240.30	44.88	43.63	50.00
6	$\gamma$ -氨基丁酸	GABA	56-12-2	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	103.12	20.04	4.50	12.50
7	谷氨酰胺	Gln	56-85-9	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$	146.15	19.41	8.94	25.00
8	谷氨酸	Glu	56-86-0	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	147.13	22.80	21.90	25.00
9	甘氨酸	Gly	56-40-6	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	75.07	16.68	6.60	50.00
10	组氨酸	His	5934-29-2	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	155.16	75.42	14.07	12.50
11	异亮氨酸	Ile	73-32-5	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	131.18	30.24	2.01	12.50
12	亮氨酸	Leu	61-90-5	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	131.18	28.74	1.92	12.50
13	赖氨酸	Lys	657-27-2	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$	146.19	39.63	7.08	25.00
14	蛋氨酸	Met	63-68-3	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$	149.20	23.79	10.14	12.50
15	苯丙氨酸	Phe	63-91-2	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2$	165.19	33.63	1.41	12.50
16	脯氨酸	Pro	147-85-3	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	115.13	296.31	13.20	12.50
17	丝氨酸	Ser	56-45-1	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	105.09	13.71	15.72	25.00
18	茶氨酸	The	3081-61-6	$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$	174.20	19.20	9.27	12.50
19	苏氨酸	Thr	72-19-5	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	119.13	15.90	7.83	25.00
20	酪氨酸	Tyr	60-18-4	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$	181.19	41.79	10.47	25.00
21	缬氨酸	Val	72-18-4	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$	117.15	18.81	4.65	12.50

## 附录 B (资料性附录)

### 21 种氨基酸混合标准工作溶液色谱图

21 种氨基酸混合标准工作溶液的第一法色谱图见图 B.1, 第二法色谱图见图 B.2, 第三法总离子流图见图 B.3, 各氨基酸的多反应监测图见图 B.4~图 B.24。

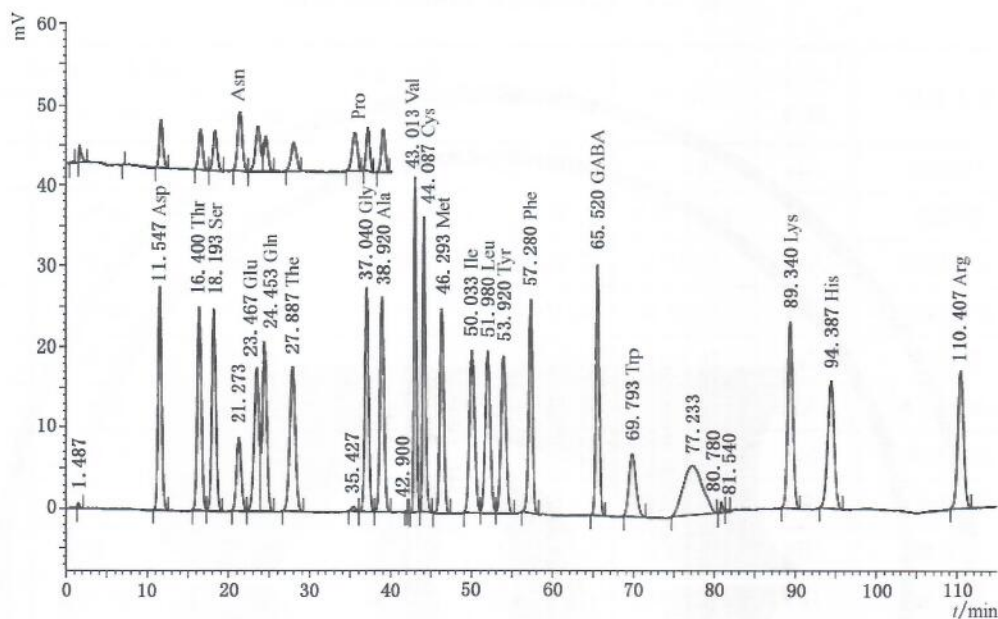


图 B.1 21 种氨基酸混合标准工作溶液的第一法色谱图(其中茶氨酸浓度为 400 nmol/mL, 其余氨基酸浓度均为 100 nmol/mL)

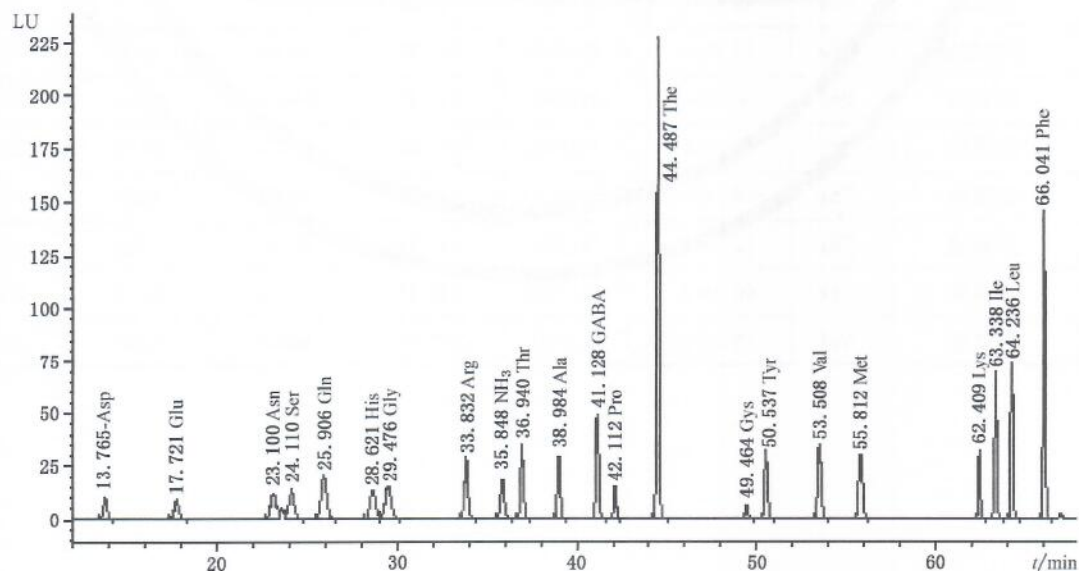
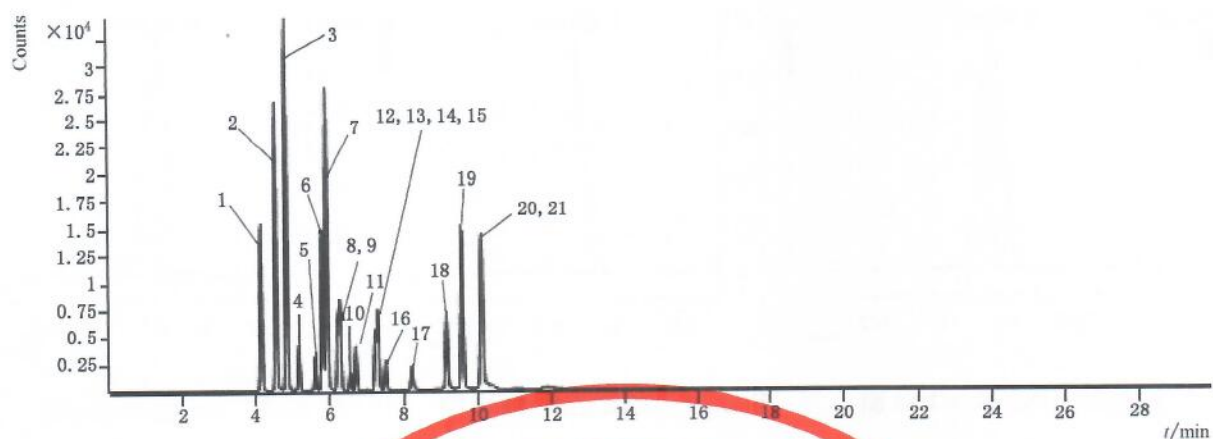


图 B.2 21 种氨基酸混合标准工作溶液的第二法色谱图(其中茶氨酸浓度为 200 nmol/mL, 其余氨基酸浓度均为 50 nmol/mL)





说明:

1 — Phe;  
2 — Ile;  
3 — Leu;  
4 — Met;  
5 — Tyr;  
6 — Val;  
7 — Pro;

8 — GABA;  
9 — The;  
10 — Ala;  
11 — Thr;  
12 — Gly;  
13 — Gln;  
14 — Ser;

15 — Asn;  
16 — Glu;  
17 — Asp;  
18 — His;  
19 — Arg;  
20 — Cys;  
21 — Lys.

图 B.3 21 种氨基酸混合标准工作溶液的第三法总离子流图 (各氨基酸浓度均为 1 mg/L)

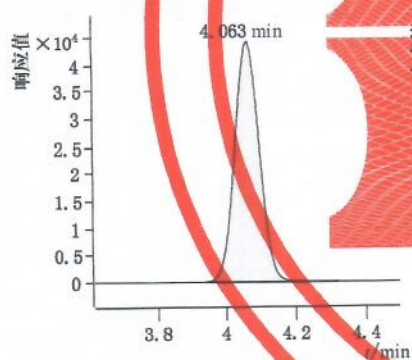


图 B.4 Phe 的 MRM 图

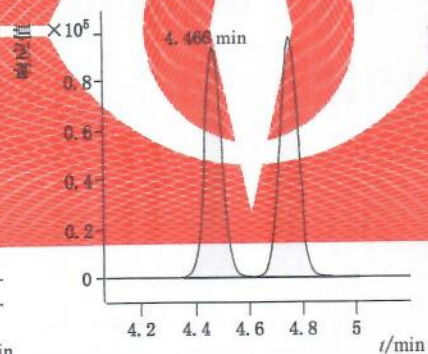


图 B.5 Ile 的 MRM 图

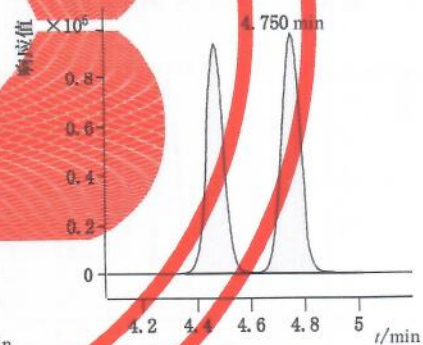


图 B.6 Leu 的 MRM 图

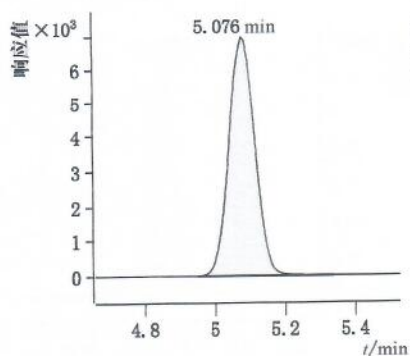


图 B.7 Met 的 MRM 图

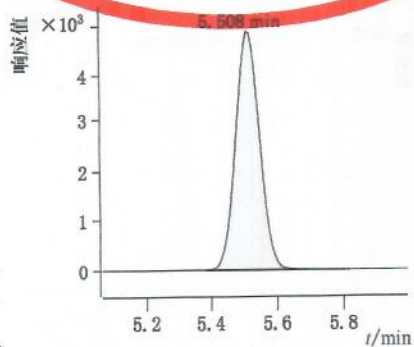


图 B.8 Tyr 的 MRM 图

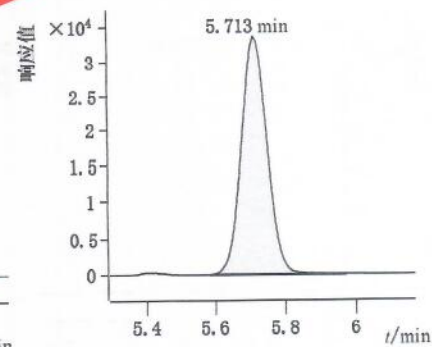


图 B.9 Val 的 MRM 图

GB/T 30987—2020

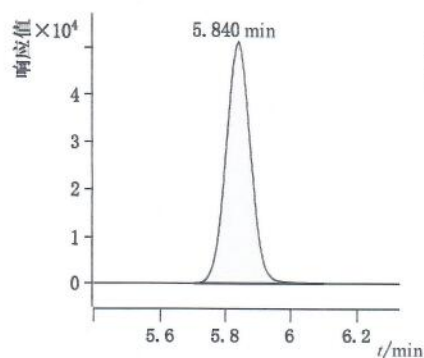


图 B.10 Pro 的 MRM 图

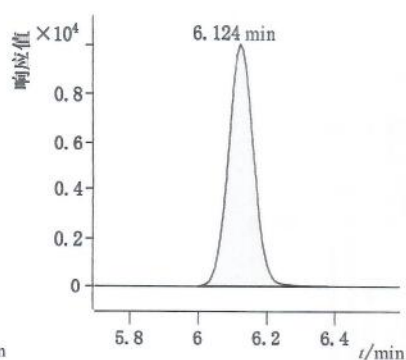


图 B.11 GABA 的 MRM 图

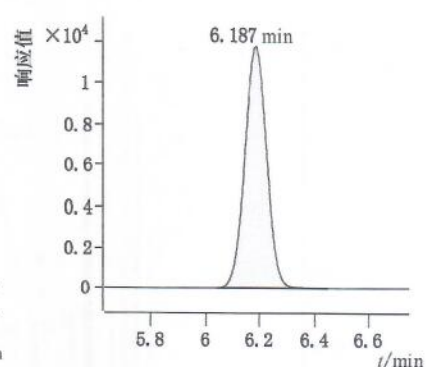


图 B.12 The 的 MRM 图

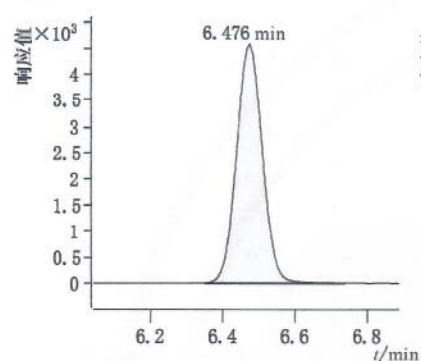


图 B.13 Ala 的 MRM 图

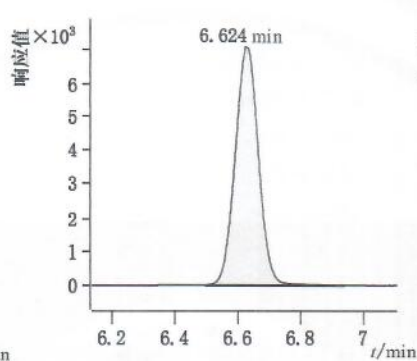


图 B.14 Thr 的 MRM 图

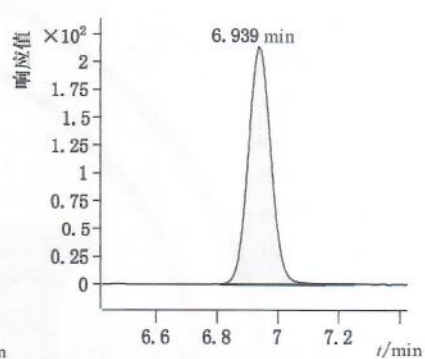


图 B.15 Gly 的 MRM 图

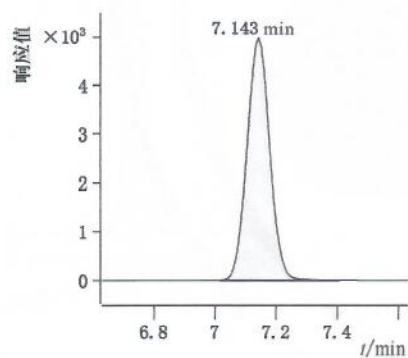


图 B.16 Gln 的 MRM 图

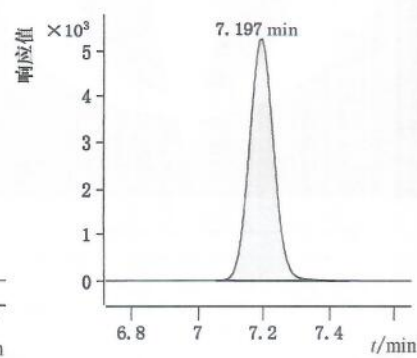


图 B.17 Ser 的 MRM 图

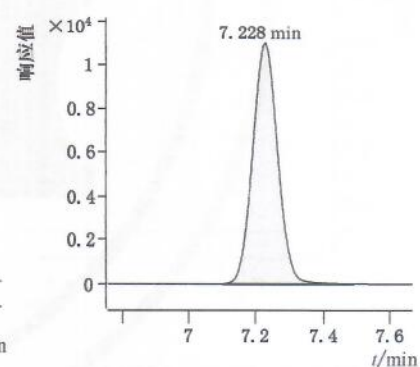


图 B.18 Asn 的 MRM 图

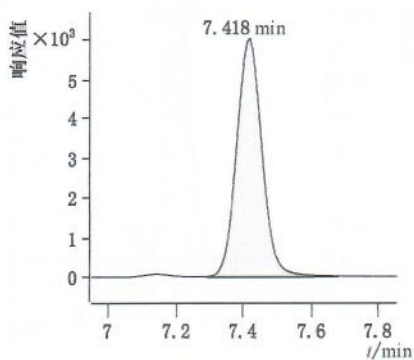


图 B.19 Glu 的 MRM 图

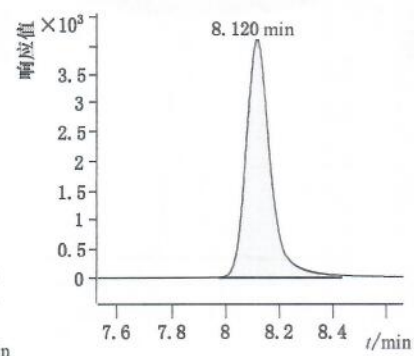


图 B.20 Asp 的 MRM 图

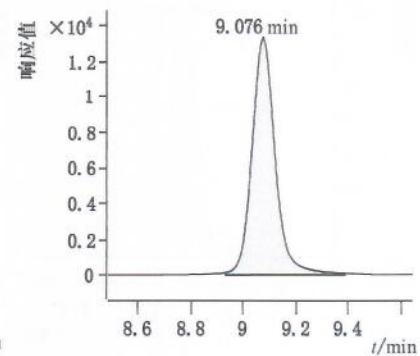


图 B.21 His 的 MRM 图

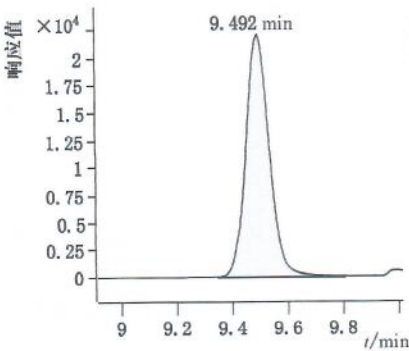


图 B.22 Arg 的 MRM 图

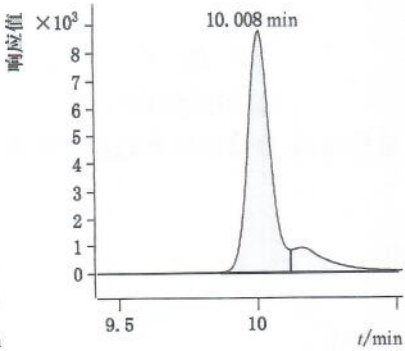


图 B.23 Cys 的 MRM 图

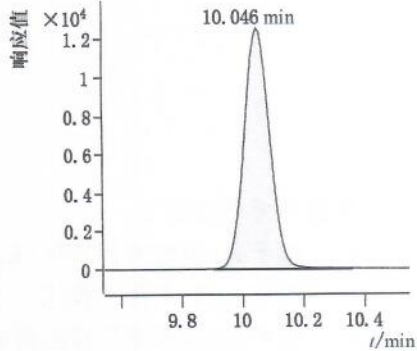


图 B.24 Lys 的 MRM 图



附 录 C  
(资料性附录)

液相色谱-串联质谱参数参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源(ESI)；
- b) 扫描方式：正离子模式；
- c) 检测方式：多重反应监测(MRM)；
- d) 干燥气(N<sub>2</sub>)温度：230 ℃；
- e) 干燥气流速：11.0 L/min；
- f) 鞘气温度：390 ℃；
- g) 鞘气流速：12.0 L/min；
- h) 雾化气(N<sub>2</sub>)压力：0.14 MPa(20 psi)；
- i) 毛细管电压：1 500 V；
- j) 定性离子对、定量离子对、源内碎裂电压、碰撞气能量见表 C.1。

表 C.1 21 种氨基酸的定量离子对、定性离子对、碎裂电压和碰撞气能量

序号	中文名称	英文简写	保留时间 min	定量离子对 <i>m/z</i>	定性离子对 <i>m/z</i>	源内碎裂 电压 V	碰撞气 能量 V
1	丙氨酸	Ala	6.48	90.0/44.1	90.0/42.1;90.0/44.1	50	40;1
2	精氨酸	Arg	9.49	175.1/70.1	175.1/70.1;175.1/116.1	95	17;5
3	天冬酰胺	Asn	7.23	133.1/74.0	133.1/74.0;133.1/87.1	70	7;1
4	天冬氨酸	Asp	8.12	134.0/74.0	134.0/74.0;134.0/88.0	65	5;1
5	胱氨酸	Cys	10.01	241.1/152.0	241.1/73.9;241.1/152.0	90	20;2
6	γ-氨基丁酸	GABA	6.12	104.1/87.1	104.1/69.1;104.1/87.1	65	7;1
7	谷氨酰胺	Gln	7.14	147.1/84.0	147.1/84.0;147.1/130	70	10;1
8	谷氨酸	Glu	7.42	148.1/84.0	148.1/84.0;148.1/130.1	70	7;1
9	甘氨酸	Gly	6.94	76.0/48.1	76.0/30.1;76.0/48.1	55	1;1
10	组氨酸	His	9.08	156.1/110.0	156.1/83.1;156.1/110.0	80	20;5
11	异亮氨酸	Ile	4.47	132.0/86.1	132.0/69.1;132.0/86.1	70	10;1
12	亮氨酸	Leu	4.75	132.1/86.1	132.1/44.1;132.1/86.1	70	15;1
13	赖氨酸	Lys	10.05	147.1/84.1	147.1/84.1;147.1/130.1	75	10;1
14	蛋氨酸	Met	5.08	150.1/104.0	150.1/104.0;150.1/133	75	1;1
15	苯丙氨酸	Phe	4.06	116.1/120.1	166.1/103.1;116.1/120.1	75	22;5
16	脯氨酸	Pro	5.84	116.1/70.1	116.1/43.1;116.1/70.1	75	25;7
17	丝氨酸	Ser	7.20	106.1/60.1	106.1/42.1;106.1/60.1	65	15;1
18	茶氨酸	The	6.19	175.2/158.1	175.2/84;175.2/158.1	75	15;1

表 C.1 (续)

序号	中文名称	英文简写	保留时间 min	定量离子对 $m/z$	定性离子对 $m/z$	源内碎裂 电压 V	碰撞气 能量 V
19	苏氨酸	Thr	6.62	120.1/74.1	120.1/56.1;120.1/74.1	65	7;1
20	酪氨酸	Tyr	5.51	182.1/136.1	182.1/136.1;182.1/165.1	70	2;1
21	缬氨酸	Val	5.71	118.1/72.1	118.1/55.1;118.1/72.1	70	15;1

注：表 C.1 所列参数在 Agilent 6465 质谱仪上完成，此处列出试验用仪器型号仅供参考，使用者可尝试采用不同厂家或型号的仪器。

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
植物中游离氨基酸的测定  
GB/T 30987—2020

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 40 千字  
2020年3月第一版 2020年3月第一次印刷

\*

书号: 155066 • 1-64113 定价 24.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换  
版权专有 侵权必究  
举报电话:(010)68510107



GB/T 30987—2020