

茶叶中茶氨酸含量的测定方法研究

刘小力, 李 想

(国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

摘 要: 研究茶叶中茶氨酸含量的测定。茶叶提取液净化后用邻苯二甲醛(OPA)衍生剂衍生, 并用液相色谱配紫外检测器测定茶叶中的茶氨酸含量。茶氨酸最佳提取工艺为 0.5g 茶叶用 100ml 水进行水浴提取, 温度 80℃, 提取时间 45min, 提取液用 Sep-Pak C₁₈ 柱净化。高效液相色谱条件: 色谱柱: XDB-C₁₈(4.6mm × 250mm); 柱温 40~50℃; 流动相: 醋酸铵-甲醇-乙腈(1:21:2, V/V); 流速 1ml/min, 检测波长 338nm。方法检出限为 5mg/kg, 茶叶样品平均加标回收率 98.6%~101.1%, 平均相对标准偏差为 0.67%~1.41%(*n*=6)。并通过对绿茶、花茶、红茶等不同茶叶品种的样品进行了茶氨酸含量的测试, 获得了大量的茶叶中氨基酸含量的基础数据。

关键词: 茶叶; 茶氨酸; 氨基酸

HPLC Determination of Theanine in Tea

LIU Xiao-li, LI Xiang

(China National Food Quality and Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

Abstract: A HPLC method was presented for the determination of theanine in tea. The sample preparation was achieved by extraction of samples with water (material/liquid ratio: 0.5 g/100 ml) in 80 °C water bath for 45 min, cleanup using solid phase extraction on a Sep-pak C₁₈ column and derivatization with ortho-phthalaldehyde. The chromatographic conditions were as follows: XDB C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 5 μ m) used temperature, 40—50 °C; mobile phase A, ammonium acetate solution containing 20 mmol and mobile phase B, ammonium acetate solution, methanol and acetonitrile (1:2:2, V/V, containing 20 mmol of ammonium acetate) for isocratic elution; flow rate, 1 ml/min; and detection wavelength, 338 nm. The limit of detection was 5 mg/kg. The average recoveries at two spike levels of 0.02 and 0.05 mg/ml (*n* = 6) were 98.6% and 101.1% and the relative standard deviations (RSDs) were 0.67% and 1.41%, respectively. Contents of theanine in various different varieties of tea such as green tea, flower petal tea, black tea, dark tea and oolong tea were determined by this method. Theanine content was the highest in green tea while was the lowest in red tea, however no obvious differences were observed among flower petal tea, black tea and oolong tea.

Key words: tea; theanine; amino acid

中图分类号: S571.1; R151.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0282-04

氨基酸是具有氨基和羧基的有机化合物, 是组成蛋白质的基本单位, 它参与生物体内的新陈代谢和生理过程。茶叶中的氨基酸, 不仅是决定茶汤滋味的主要成分, 而且与茶叶的品质有一定的相关性。茶叶中的氨基酸超过 25 种, 茶氨酸是茶叶中游离氨基酸的主体部分, 不同等级和不同品种的茶叶, 茶氨酸都占茶叶游离氨基酸的 50% 以上, 约占茶叶干重的 1%~2%。它是 1950 年由日本学者酒户弥二郎从绿茶中分离并命名的, 属酰胺类化合物(N-乙基-γ-谷氨酰胺), 极易溶于水, 具有焦糖的香味和类似味精的鲜爽味, 对绿茶滋味具有重要作用^[1]。茶氨酸还能缓解茶的苦涩味, 并增

强其甜味, 是茶叶品质的重要评价因子之一^[2]。

文献中关于茶氨酸测定的研究统计显示, 茶氨酸的测定方法包括电化学分析法、纸层析和薄层色谱法、气相色谱法、离子交换色谱法、毛细管电泳法和高效液相色谱法等。高效液相色谱法是目前使用较多的一种氨基酸分析方法。1986 年, 朱衍报道采用高效液相色谱法测定茶叶中的茶氨酸。在一定条件下用纯品茶氨酸作标准曲线, 在线性范围内, 根据峰高或峰面积即可换算出茶叶中茶氨酸的含量。2003 年, 朱小兰等建立了一种非衍生化高效液相色谱法测定茶叶中茶氨酸含量的方法。采用的色谱条件为 C₁₈ 柱, 以 0.05% 三氟乙酸水

收稿日期: 2008-09-03

作者简介: 刘小力(1980—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品安全检测。E-mail: frida.liu@cfqs.org

溶液为流动相, 流速 1.0ml/min, 进样量 10 μ l, 检测波长 203nm, 同时以高效液相色谱-电喷雾离子化质谱对所分离的茶氨酸进行了纯度鉴定^[3]。本实验前期应用“日立-8800 型氨基酸分析仪”对茶叶中的茶氨酸测定方法进行了摸索, 但是由于茶氨酸的保留时间与天门冬氨酸和苏氨酸等酸性氨基酸的保留时间十分接近, 而茶叶中的茶氨酸含量较高, 对其出峰附近的其他氨基酸峰覆盖严重, 分离困难, 不易达到理想的分离效果, 影响茶叶中茶氨酸的定量分析。高效液相色谱法具有简便、快速、灵敏的特点, 因此, 本实验拟采用高效液相色谱法, 以期实现对茶氨酸的准确定性和定量。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

绿茶等 22 种茶叶 市售。

茶氨酸标准品(纯度>99%)、邻苯二甲醛(OPA)、乙硫醇、硼酸、氢氧化钠、乙腈、甲醇、醋酸铵等, 如无特别说明, 所用试剂均为分析纯; 水为超纯水。

0.4mol/L 硼酸钠缓冲液: 称取 2.48g 硼酸和 1.41g 氢氧化钠, 用水溶解定容至 100ml。

衍生试剂的配制: 称取 0.1g OPA 用 10ml 甲醇溶解, 加 0.1ml 乙硫醇, 0.4mol/L 硼酸钠缓冲液定容至 100ml。

茶氨酸标准溶液: 精确称取 0.0500g 茶氨酸, 用水溶解后移入 50ml 容量瓶中, 并用水稀释至刻度, 混匀, 此溶液每毫升含 1mg 茶氨酸(1mg/ml)。

茶氨酸标准使用液: 吸取茶氨酸标准溶液 1.0ml 于 50ml 容量瓶中, 加水至刻度, 既得 0.020mg/ml 茶氨酸标准使用液。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(配有紫外检测器)、离心机、振荡水浴锅、微孔滤膜过滤器、SEP-PAK classic C₁₈ 色谱柱。

1.3 前处理条件

1.3.1 提取方法的选择

不同提取时间、提取温度和提取溶剂的量对茶叶样品中茶氨酸的提取有决定性影响, 本实验通过正交试验法获得提取茶氨酸的最佳因素水平。

1.3.2 净化方法的选择

利用 Sep-pak C₁₈ 柱对样品进行预处理。先用 5ml 甲醇活化 Sep-pak C₁₈ 柱, 5ml 水清洗平衡后将茶叶样品浸提液经过小柱净化脱色, 经 0.45 μ m 滤膜专家过滤后待衍生。

1.4 仪器分析条件

1.4.1 流动相的选择

流动相中醋酸铵溶液和甲醇的配制比例对茶氨酸的出峰时间和分离效果均有直接影响, 这一比例的最终确定应在样品分离时, 使茶氨酸峰能与其他氨基酸峰完全分离为首要考虑因素, 其次才是尽量使分离时间缩至最短。根据这一原则, 应用 B 相醋酸铵与甲醇和乙腈的不同配比进行测试, 确定茶叶样品分离的最优化流动相条件。

在流动相流速 1.0ml/min 条件下进行配比选择, 等度洗脱(A:B=1:1, V/V), A 相: 固定为 20mmol 醋酸铵溶液, B 相配比如表 1 所示。

表 1 流动相 B 组配比选择(V/V)
Table 1 Selection of composition of mobile phases B (V/V)

20mmol 醋酸铵溶液	1	1	2	1
甲醇	1	2	1	2
乙腈	1	1	2	2

1.4.2 柱温的选择

柱温高, 氨基酸出峰时间提前, 但柱子易老化; 反之, 氨基酸出峰时间推迟。柱温太低柱压过高会影响泵的寿命, 当柱温为 30℃时, 柱压可达 28MPa, 故柱温以 40~50℃较为适宜。

1.4.3 最佳检测波长

为提高分析方法的灵敏度, 应选择最佳吸收波长。取 5ml 浓度为 10 μ g/ml 的茶氨酸标准溶液, 与 5ml OPA 衍生试剂反应, 2min 后立即加入 10ml 磷酸钠溶液(pH7.0)。将此溶液放入紫外分光光度计中进行扫描, 得到最大吸收波长为 338nm。

1.4.4 衍生剂的选择及原理

邻苯二甲醛(OPA)衍生剂在乙硫醇存在下与第一级氨基酸迅速反应生成 1-硫代-2-烷基异吲唑, 加成物在紫外区有较强吸收。异硫氢酸苯酯(phenylisothiocyanate, PITC)衍生剂与一、二级氨基酸反应, 反应产物在原来氨基酸结构上引入苯环产生紫外吸收, 使其产物可以用紫外检测器检测^[4]。但是异硫氢酸苯酯(PITC)衍生时需要真空干燥除去过量试剂, 因此很难全部自动化。相比邻苯二甲醛(OPA)衍生剂本身不干扰分离与检测, 不必除去过量试剂, 色谱图基线比较平稳。基于以上考虑, 本方法中茶氨酸的测定采取邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生法。氨基酸经邻苯二甲醛(OPA)衍生剂衍生后的产物不稳定, 因此使用自动柱前衍生的方法, 如采用手动柱前衍生, 要保证衍生反应 2min 后立即进样。

2 结果与分析

2.1 茶氨酸提取条件实验

在样品量 0.5g, 加标浓度 0.02mg/ml 条件下, 茶氨

酸提取的实验方案及结果见表2。由表2可知,对一定量的茶叶样品进行提取试验,采取4个不同时间(15、30、45、60min);三个不同温度(60、80、100℃)和两个加水量(50、100ml)进行茶氨酸含量的测定,结果显示,0.5g茶叶样品在80℃水浴中,用100ml水提取45min的平均回收率最高为99.3%。因此,本方法最终选择采用此条件对茶叶中的茶氨酸进行提取。

表2 不同时间、温度和提取溶剂的量测定茶氨酸的平均回收率(%)
($n=3$)

Table 2 Recovery test by different extraction methods (%) ($n=3$)

提取时间(min)	15	30	45	60
50ml/60℃	48.5	79.1	87.1	85.8
50ml/80℃	60.1	78.5	90.2	90.9
50ml/100℃	59.7	65.4	89.5	86.6
100ml/60℃	59.3	80.3	97.4	97.2
100ml/100℃	67.8	83.4	97.9	95.4
100ml/80℃	70.1	85.6	99.3	98.7

2.2 茶氨酸提取液净化

表3 净化前后茶氨酸分析测定含量比较($n=6$)

Table 3 Content of theanine in the extract before and after purification ($n=6$)

氨基酸名称	含量($\bar{x} \pm s$ mg/ml)		平均回收率(%)
	净化前	净化后	
L-茶氨酸	1.0003 ± 0.0155	0.9997 ± 0.0164	99.9

实验结果如表3所示:经Sep-Pak C₁₈柱净化前后比较,茶氨酸含量均无明显变化,平均回收率为99.9%,所以对茶氨酸提取液进行净化并不会影响回收率。由于茶叶中的色素在液相色谱检测过程中明显影响茶氨酸测定结果,因此,本方法采用SEP-PAK C₁₈萃取柱对茶叶样品进行脱色净化。

2.3 流动相配比确定

按1.4.1节方法进行实验,最终确定的分离最好的流动相条件为:A相:20mmol醋酸铵溶液,B相:醋酸铵:甲醇:乙腈=1:2:2(V/V)。

2.4 标准曲线制作

分别准确吸取茶氨酸标准储备液(1mg/ml)0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0ml,用水定容至10ml,此标准系列的浓度为0.0、0.01、0.02、0.05、0.10、0.15、0.20mg/ml的茶氨酸标准系列溶液,进样分析,用峰面积对浓度进行线性回归,表明在给定的浓度范围内茶氨酸检测呈线性,回归方程为 $y = 16716.226x - 3.1490919$ (y 为峰面积, x 为浓度, $\mu\text{g/ml}$):线性相关系数 $R^2=0.9999$ 。

2.5 方法检出限研究

本实验在空白样品中添加一系列浓度的茶氨酸标准溶液,按照液相色谱检测灵敏度(信噪比大于3)和样品处

理步骤中稀释倍数的确定,最终确定本方法测定茶叶中茶氨酸的检出限为5mg/kg。

2.6 回收率与精密度实验

每组准确称取空白样品6份,每份0.5g,共2组,分别定量加入茶氨酸标准溶液,添加水平分别为0.02、0.05mg/ml,按茶叶样品制备方法制备后,进行测定,结果见表4。从表4中可看出,不同样品平均加标回收率为98.6%~101.1%,平均相对标准偏差为0.66%~1.43%($n=6$)。

表4 茶氨酸回收率测定结果(HPLC)

Table 4 The recovery testing of theanine

添加浓度 (mg/ml)	加标后测定 浓度(mg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	标准 偏差(%)	相对标准 偏差(%)
0.02	0.0199	0.93	78.6	0.66	0.67
	0.0196	98.1			
	0.0197	98.7			
	0.0198	99.2			
	0.0195	97.6			
	0.0198	98.8			
0.05	0.0506	101.1	101.0	1.43	1.41
	0.0518	103.5			
	0.0510	102.0			
	0.0501	99.7			
	0.0499	99.7			
	0.0501	100.2			

2.7 样品实测情况

由图1显示,茶氨酸标准样品经衍生后测定,出峰时间在6.5min左右,图2茶叶样品的测定显示,茶氨酸衍生物出峰前后无其他氨基酸衍生物干扰,此方法可用作茶氨酸准确性及定量的测定方法。

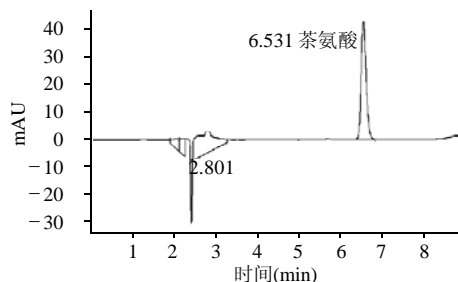


图1 0.02 mg/ml 标准品的液相色谱图
Fig.1 The chromatogram of standard

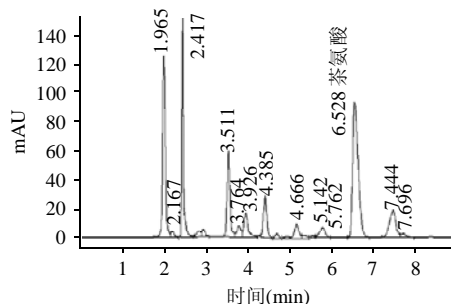


图2 茶叶样品中茶氨酸的液相色谱图
Fig.2 The chromatogram of tea sample

2.5 不同品种茶叶中茶氨酸的含量测定

表5 茶叶中茶氨酸的检测结果

Table 5 Determination of theanine in different types of tea

序号	茶叶品种	样品名称	茶氨酸(g/kg)
1	绿茶	崂山云峰茶(一级)	10.44
2	绿茶	崂山绿茶(特级)-大松茶叶	13.16
3	绿茶	崂山绿茶(特级)-海馨茶叶	12.41
4	绿茶	崂山绿茶(特级)-众品鑫茶叶	12.93
5	绿茶	日照绿茶(一级)	18.07
6	绿茶	信阳毛尖	17.40
7	绿茶	信阳毛尖(特级)	17.86
8	绿茶	云雾绿茶	10.53
9	绿茶	黄山毛峰	16.53
10	绿茶	碧螺春(一级品)	11.19
11	绿茶	洞庭碧螺春	17.81
12	花茶	茉莉花茶(特级)	5.95
13	花茶	茉莉花茶	8.77
14	花茶	茉莉珍珠	9.12
15	花茶	茉莉花茶(袋泡茶)	4.94
16	红茶	红茶(袋泡茶)	7.57
17	乌龙茶	铁观音	8.43
18	乌龙茶	大红袍	10.12
19	乌龙茶	铁观音(散装)	8.83
20	黑茶	普洱茶	6.18
21	黑茶	精品青砖茶	2.76
22	黑茶	生牲川(贡砖)	0.77

表5显示,不同品种茶叶和不同品质的茶叶中茶氨酸含量均有所不同。总体比较,绿茶的茶氨酸含量偏高,黑茶的茶氨酸含量偏低,花茶、红茶、乌龙茶

的茶氨酸含量无明显差异,但是,同一品种,不同品牌茶叶的茶氨酸含量有较明显的差异。孔惠宪等的研究也显示,氨基酸的含量与茶叶品质有明显的正相关($r = 0.997 \sim 0.998$)^[5],因此,作为鉴别茶叶品质的重要指标,酸含量的研究应进一步开展。

3 结 论

茶氨酸作为茶叶中的特有氨基酸,在茶叶氨基酸中含量最多。除了人们已熟知的茶氨酸有抑制咖啡因和改善茶汤风味的作用,近年来研究发现其更重要的生理作用在于对脑内神经传达物质变化的影响和降血压的作用。因此,茶氨酸在食品、保健品以及医药领域的应用将越来越广泛。开展茶氨酸含量检测方法的研究及对不同品种和品质的茶叶中茶氨酸含量的监测研究,将为茶氨酸的应用发展提供重要的基础数据资源。

参考文献:

- [1] 李银花,刘仲华,黄建安,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定茶叶中茶氨酸[J]. 茶叶科学, 2005, 25(2): 225-228.
- [2] 朱小兰,陈波,等. 高效液相色谱法测定茶叶中的茶氨酸[J]. 色谱, 2003, 21(4): 400-402.
- [3] 谭和平,陈丽,等. 茶叶中氨基酸的测试方法概述[J]. 中国测试技术, 2007, 33(6): 1-4.
- [4] 梁冬生,常碧影. 柱前衍生高效液相色谱法测定氨基酸[J]. 色谱, 1993, 11(3): 140-143.
- [5] 徐杰,钱爱萍. 茶叶游离氨基酸测定前处理方法探讨[J]. 福建省农科院学报, 1993, 8(4): 39-43.