

不同茶叶中茶氨酸含量的测定比较

张 健, 荣绍丰, 龚钢明, 邱子春

(上海应用技术学院香料香精技术与工程学院, 上海 200233)

摘 要: 建立用高效液相色谱法测定茶叶中茶氨酸的方法, 用于比较红茶、绿茶、甜茶等各种茶叶中茶氨酸的含量。采用的色谱柱为 C₁₈ 色谱柱, 以甲醇和 0.05% 体积分数的三氟乙酸溶液为流动相进行梯度洗脱。流速为 0.8 ml/min, 紫外检测波长为 208 nm, 柱温 30℃, 外标法定量。结果表明, 在一定浓度的茶氨酸浓度范围内, 峰面积与质量浓度具有良好的线性关系, 以茶氨酸浓度为横坐标, 建立线性回归方程 $Y=4299.366X+14.828$, 相关系数 R 为 0.9997。通过对各种茶叶的测定, 比较其中含有的茶氨酸的量。茶氨酸的加样回收率为 101.06%, 对各种茶叶方法精密度相对标准偏差均小于 0.5%, 该操作方法简便、快速、准确。测定发现红茶、绿茶、甜茶等各种类型的茶叶中茶氨酸的含量与茶叶类别有关。

关键词: 茶氨酸; 茶叶; 高效液相色谱法

Comparison of Determination of Theanine in Different Tea Species

ZHANG Jian, RONG Shao-feng, GONG Gang-ming, QIU Zi-chun

(School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200233, China)

Abstract: High performance liquid chromatography (HPLC) was used for the determination of theanine in different tea species. Theanine can be separated on a Eclipse XDB-C₁₈ column with trifluoroacetic acid (0.05%) as solution and methanol as mobile phase for gradient elution. The UV detection wavelength is set at 208 nm, the flow rate 0.8 ml/min. and the temperature of column 30 °C. Under the conditions mentioned above, the relative peak area (Y) is linearly related with the concentration (X) of theanine and its linear regression equation is $Y=4299.366X+14.828$, $R^2=0.9997$. The average recovery is 101.06%. The RSD is <0.5%. The method is simple and accurate, and can be used in determination of the black tea, green tea, sweet tea and most of the tea species.

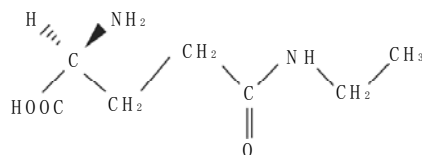
Key words theanine tea high performance liquid chromatography

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0335-03

茶氨酸(theanine, γ -glutamylethylamide)是茶叶中特有的一种氨基酸, 属酰胺类化合物, 结构式为



至今为止人们在茶叶中已发现 25 种氨基酸^[1]。茶氨酸被认为是茶叶的特征氨基酸, 到目前为止除了茶叶只在茶梅、山茶、油茶、蘑菇等四种天然植物中检测出其微量存在, 其他植物中尚未发现。茶氨酸作为茶叶氨基酸中特殊的氨基酸, 它与绿茶等级的相关系数约为 0.8, 对于红茶与乌龙茶的品质与风味的形成至关重要^[2], 通常茶氨酸含量越多茶叶的等级越高。

茶氨酸是一种安全、无毒、具有多种生理功能的天然食品添加剂, 它不仅易溶于水, 还可抑制苦味物

质, 改善食品的风味, 茶氨酸作为茶叶的主要呈味物质, 常被作为食品添加剂用于茶饮料中。茶氨酸还可用于各类点心、糖果、果冻、饮料及口香糖等食品中, 并且添加茶氨酸后, 不会使食品的品质下降。此外, 茶氨酸还有很多生理功能, 如降血压作用、抗肿瘤作用、静心安神作用、促进大脑功能和抗疲劳作用等^[3-4], 在开发应用方面, 拓宽茶氨酸在食品领域的应用, 利用茶氨酸的特殊生理功能, 开发功能性药物, 将具有广阔的开发应用前景。

对于茶氨酸的测定已有报道^[5], 但实践中发现对某些成分复杂的茶叶进行测定时受干扰较大, 本实验建立高效液相色谱梯度洗脱^[6]方法测定各种茶叶中的茶氨酸, 用甲醇和三氟乙酸溶液作流动相, 测定甜茶、绿茶、红茶和乌龙茶中的茶氨酸含量, 还首次对甜茶中的茶氨酸进行测定。

收稿日期: 2007-05-29

基金项目: 上海市教委资助项目 (050Z18)

作者简介: 张健(1968-), 女, 副研究员, 研究方向为植物活性成分及保健品。E-mail: jianzhang@sina.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

广西甜茶黔 南州甜茶种植园; 黄山毛峰、黄山绿茶、黄山炒青、祁门红茶、滇山红茶、铁观音 市售。

甲醇(色谱纯)、三氟乙酸(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司; 茶氨酸标准品 东京东洋化成工业有限公司。

1100高效液相色谱系统 安捷伦公司; 数据恒温水浴锅 W201B 上海申胜生物技术有限公司; 电子天平FA604A 上海精天电子仪器有限公司; 数字移液枪德国Witeg公司; 纯水制备仪 美国Millipore公司。

1.2 标准溶液配制

准确称取10mg 茶氨酸标准品于10ml 容量瓶中, 用高纯水溶解定容至10ml, 得质量浓度为1mg/ml的标准储备溶液, 用移液枪分别准确移取0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1ml 上述储备液, 用水稀释并定容至1ml, 配制成0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1mg/ml 质量浓度的标准溶液。

1.3 样品处理

准确称取红茶、绿茶、乌龙茶和甜茶等茶叶各5g, 分别捣碎, 加入250ml 蒸馏水, 浸泡1h, 置于100℃的恒温水浴锅中上置冷凝管水浴加热150min, 冷却, 过滤, 滤液待用。

1.4 色谱条件

HPLC 条件色谱柱: Eclipse XDB-C₁₈ 柱(i.d 5μm, 250mm × 4.6mm); 流动相: 0.05% (体积分数) 三氟乙酸水溶液与甲醇梯度洗脱; 流速0.8ml/min; 紫外检测波长208nm; 柱温: 30℃; 进样量: 5μl。每次进样分析后, 用100% 甲醇溶液冲洗色谱柱15min, 然后再用流动相平衡色谱柱大约15min, 至基线平稳。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择

用水和甲醇作流动相时, 出峰有拖尾现象。由于茶叶中的氨基酸除茶氨酸外, 还有谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸等其它氨基酸, 用冰醋酸的水溶液与甲醇作流动相时, 抗干扰能力较弱, 峰分离不明显, 但采用0.05% 的三氟乙酸水溶液与甲醇作流动相时, 茶氨酸在C₁₈ 柱上的保留能力加强, 抗干扰能力提高, 在色谱图上能与其它物质分开。

2.2 梯度洗脱

流动相中三氟乙酸水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或其他物质的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, 设计了几种洗脱液梯度。结果表明, 根据表1 的洗脱液梯度, 表

中A 相为三氟乙酸水溶液, B 相为甲醇, 茶氨酸分离效果较好, 其余的峰分离度也较高, 与茶氨酸以及相互之间能够分离, 有利于测定。对于茶氨酸的测定, 测定方法在15min 时已经能够完全洗脱, 开发的本方法在15min 之后梯度的改变主要用于茶叶中其它物质的测定。

2.3 检测波长的选择

表1 梯度洗脱条件

Table 1 Eluent gradient conditions

时间(min)	0	5	8	12	15	15.1
A (% , V/V)	94	92	92	90	90	75
B (% , V/V)	6	8	8	10	10	25
流速(ml/min)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

为提高分析方法的灵敏度, 应选择最佳吸收波长。取一定量茶氨酸标准溶液, 进样测定, 利用二极管阵列(DAD) 检测器的全波长进行紫外检测功能扫描, 得到茶氨酸的最大紫外吸收波长为208nm。

2.4 标准曲线的绘制

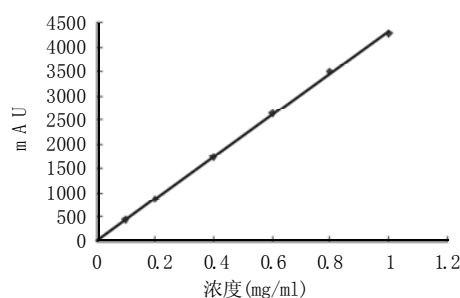


图1 茶氨酸标准曲线

Fig.1 Calibration curves of theanine

将不同浓度的茶氨酸系列标准溶液进样测定。以茶氨酸标准品的质量浓度为横坐标X(mg/ml), 峰面积Y为纵坐标作图, 得到线性回归方程 $Y=4299.366X+14.828$, 相关系数 $R^2=0.9997$ 。茶氨酸标准曲线见图1, 检测波长为208nm 时的茶氨酸标样的HPLC 图谱见图2。

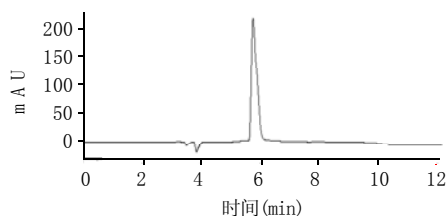


图2 茶氨酸标准品高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of theanine standard

2.5 回收率测定

在提取测定茶氨酸含量的茶叶提取物中加入一定量的标准品做测定方法的回收率实验。准确量取定量的红茶提取液, 分别加入0.04、0.06 和0.08mg 标准品, 进样测定, 最后得到平均回收率为101.06%, 结果如表2 所示。

表2 方法的回收率结果
Table 2 Recovery of method

实验号	样品量 (mg)	添加量 (mg)	理论总量 (mg)	测出量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	0.2852	0.04	0.3252	0.3362	103.3	101.06
2	0.2678	0.06	0.3278	0.3301	100.7	
3	0.2803	0.08	0.3603	0.3574	99.19	

2.6 精密度测定

精确吸取茶汁 1ml, 按 1.4 所述色谱条件重复进样 5 次, 根据测得的峰面积计算茶氨酸在各种茶叶中的浓度, 并计算得出茶氨酸在各种茶叶中的精密度相对标准偏差(RSD)值, 如表 3 所示。结果表明, 该方法的精密度好, 测定各种茶叶中的茶氨酸相对标准偏差均小于 0.5%。

表3 茶氨酸测定的精密度及稳定性结果
Table 3 Results of precision and stability test for theanine determination

RSD 值(%)	甜茶	绿茶	红茶	乌龙茶
精密度	0.47	0.36	0.43	0.11
稳定性	2.24	0.57	0.60	1.48

2.7 稳定性测定

精确吸取茶汁 1ml, 每隔 24h 按上述色谱条件进样一次, 测定 96h 内茶氨酸的含量, 根据测得的峰面积计算茶氨酸在各种茶叶中的浓度, 并通过计算 RSD 值考查茶氨酸在各种茶叶中的稳定性, 结果如表 3 所示, 发现茶氨酸在各种茶叶中的含量随时间的变化, 虽均呈下降的趋势, 但是由 RSD 值可见其下降的幅度不是很大, 所以由此可见茶氨酸在茶汁中的稳定性是较好的, 同时也说明了该测定方法在该段时间内的数据稳定可靠。可以看出茶氨酸在不同的茶叶中稳定性有所不同, 推测这与各茶叶中所含有的物质成分有关, 其中茶氨酸在绿茶和红茶中的稳定性较高。

2.8 不同茶叶样品中茶氨酸含量的测定

分别准确吸取 1.3 中制备的各种甜茶汁、绿茶汁、红茶汁、乌龙茶汁各 1ml, 进行进样测定, 测得其中的茶氨酸含量见图 3。图 4 图 5 分别是黄山绿茶和滇红茶茶氨酸测定的液相色谱图。

实验中发现, 茶氨酸的含量与茶叶的种类有关。茶氨酸在茶叶中的含量可能与茶叶的发酵程度有联系, 不发酵的绿茶中包含的茶氨酸比发酵工艺加工的茶叶如红茶和乌龙茶中的茶氨酸含量高。而同样是绿茶, 价格和等级较高的黄山毛峰中含有的茶氨酸含量较高, 而其他两种绿茶中的茶氨酸含量相对较低, 这也从一个侧面反映出茶氨酸的含量是直接影响茶叶品质的一个重要因素。

3 结 论

本研究建立了一种用高效液相色谱方法测定各种茶叶中的茶氨酸的方法, 用 0.05% 的三氟乙酸水溶液和甲

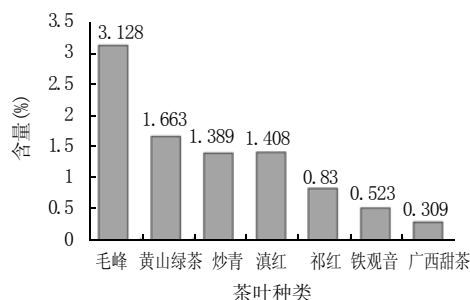


图3 不同种类茶叶中茶氨酸含量

Fig.3 Content of theanine in different kinds of tea samples

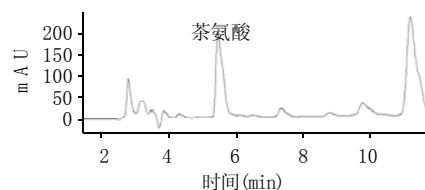


图4 黄山绿茶的高效液相色谱图

Fig.4 HPLC chromatograms of Huangshan green tea

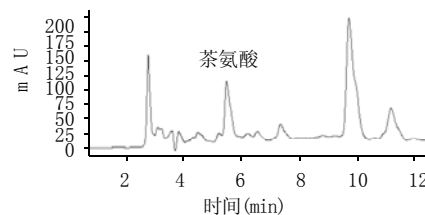


图5 滇红茶的高效液相色谱图

Fig.5 HPLC chromatograms of Dian black tea

醇作流动相, 进行梯度洗脱, 分离效果好, 而且该方法简便、实用, 精密度好, 可以用于产品含量检验或品质控制。通过实验, 发现茶氨酸在绿茶中的含量最多, 这既可能是由于品种的影响, 也可能是由于发酵工艺的影响, 茶氨酸在甜茶中的含量少是因为甜茶属于蔷薇科悬钩子属植物, 过去甜茶的相关文献均未提及茶氨酸^[7-8], 本实验是首次测定甜茶中的茶氨酸, 同时茶氨酸在绿茶中的稳定性最好。茶氨酸的含量与茶叶的品种也有关, 品种好的茶叶中茶氨酸含量也越多。

参考文献:

- 赵丹, 王朝旭. 茶氨酸的国内外研究现状[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 146-147.
- 袁海波, 童华荣, 高爱红. 茶氨酸的保健功能及合成[J]. 广州食品工业科技, 2000, 18(2): 201-203.
- 朱松, 王洪新. 茶氨酸的生理功能及在食品中的应用[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(3): 18-20.
- 吕毅, 郭雯飞, 倪捷儿, 等. 茶氨酸的生理作用及合成[J]. 茶叶科学, 2003, 23(1): 1-5.
- 郭升平. 高效液相色谱法测定茶叶中茶氨酸的研究[J]. 色谱, 1996, 14(6): 464-467.
- 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 218-224.
- 张健, 叶丽琼. 甜茶叶中甜茶苷的测定[J]. 食品工业, 2007, 28(1): 55-57.
- 王立波, 毕彩虹. 甜茶活性成分最新研究进展[J]. 粮食与油脂, 2007(2): 47-49.