

## 超高压高效液相色谱法测定茶酒中茶氨酸含量

杨威, 吕超志, 刘峰, 李丹, 曹忠\*

(长沙理工大学化学与生物工程学院, 微纳生物传感与食品安全检测协同创新中心, 湖南长沙 410114)

**摘要** [目的] 研究茶酒中茶氨酸含量的分析方法。[方法] 以邻苯二甲醛(OPA)为衍生剂, 采用超高压高效液相色谱测定茶酒中的茶氨酸。[结果] 检测茶氨酸的线性范围为 0.1 ~ 100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 线性方程可拟合为  $Y = 53.57X - 41.664$ , 相关系数  $r$  为 0.999 59, 该方法的最低检出限达到 0.05  $\mu\text{g}/\text{g}$  (以  $S/N=3$  计)。样品中茶氨酸的含量为 0.25  $\text{mg}/\text{kg}$ , 加标试验的回收率在 99.6% ~ 100.1%。[结论] 该方法快速、简单、定量准确, 可在茶氨酸的测定分析中推广应用。

**关键词** 超高压; 高效液相色谱; 茶酒; 茶氨酸

中图分类号 TS262.91 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)30-0070-02

## Determination of Theanine in Tea Liquor by Ultra High Pressure and High Performance Liquid Chromatography

YANG Wei, LU Chao-zhi, LIU Feng, CAO Zhong\* et al (Collaborative Innovation Center of Micro/nano Bio-sensing and Food Safety Inspection, School of Chemistry and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114)

**Abstract** [Objective] The analytical method for content of theanine in tea liquor was investigated. [Method] Using o-phthalaldehyde (OPA) as a derivating agent, a method was established for determination of theanine in tea liquor by super high-pressure high performance liquid chromatography. [Result] The results showed that the linear range of 0.1 - 100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for theanine detection was obtained, and the corresponding linear equation was fitted as  $Y = 53.57X - 41.664$  with correlation coefficient  $r$  of 0.999 59. Also, the minimum detection limit of 0.05  $\mu\text{g}/\text{g}$  ( $S/N=3$ ) was reached. The theanine content of the sample was determined as 0.25  $\text{mg}/\text{kg}$  with a recovery rate of 99.6% - 100.1%. [Conclusion] The method is rapid, simple and accurate, which is easy to be widely used in the determination and analysis of theanine in tea liquor.

**Key words** Ultra high pressure; High performance liquid chromatography; Tea liquor; Theanine

茶酒是茶叶经过复杂的酿制工艺酿造而成的一种既有酒的香醇又有茶的香气的保健型功能饮料酒, 具有醒脑明目、杀菌解毒和健胃生津的功效。目前国内外的主要研究方向为保健茶酒的生产方式、茶酒成分及功效分析<sup>[1-2]</sup>。

茶氨酸是茶叶中特有的非蛋白氨基酸, 在茶叶氨基酸中占 50% 左右。茶氨酸不仅能降压、抗肿瘤, 还能促进神经生长<sup>[3]</sup>, 同时茶氨酸还能够提高食品鲜味, 具有放松大脑的功能。对老鼠的脑电图研究表明, 茶氨酸表现出了咖啡因抑制特性<sup>[4]</sup>。茶的主要成分如茶氨酸等是主要的生物活性物质, 有益于人们的健康, 以茶成分为基础的产品如冷热茶饮料、茶保健品及化妆品等也受到人们的关注<sup>[5]</sup>。因此, 研究简单灵敏, 能快速定性、定量分析不同茶叶中茶氨酸含量的方法已引起广泛重视。目前对茶氨酸的分析方法主要有傅立叶变换近红外 (FT-IR) 光谱法<sup>[6]</sup>、电动力学毛细管色谱法 (ECC)<sup>[7-8]</sup>、酶催化法<sup>[9]</sup>、纸层析-分光光度法<sup>[10]</sup>、离子对色谱法<sup>[11]</sup>、薄层色谱法<sup>[12]</sup>、气相色谱法<sup>[13]</sup>、气质联用法<sup>[13]</sup>、柱后补偿高效液相色谱法<sup>[14]</sup>、手性衍生-高效液相色谱法<sup>[15]</sup>等。为了提高分析检测的灵敏度和分离的选择性, 笔者结合样品特性, 采用邻苯二甲醛 (OPA) 柱前衍生超高压液相色谱法分析茶酒中的茶氨酸, 以期能够达到快速、准确的分析要求。

## 1 材料与方

1.1 材料 供试茶酒, 市售。Agilent 1290 超高压液相色谱

仪, 美国安捷伦公司; 数显恒温水浴锅, 常州市顶新实验仪器有限公司; 分析天平, 北京科仪仪器有限公司。

茶氨酸标准品 (纯度 > 99%), 坛墨质检标准物质中心; 邻苯二甲醛 (OPA)、硼酸盐溶液, 美国安捷伦公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 默克化工技术 (上海) 有限公司; 磷酸氢二钠, 重庆市华东化工有限公司。所用试剂除注明外均为分析纯或优级纯, 试验用水均为超纯水 (电阻率  $\geq 18.3 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ )。

## 1.2 样品的处理

1.2.1 标准溶液的配制。准确称取一定质量的茶氨酸标准品于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水溶解配制成浓度为 1.00  $\text{mg}/\text{mL}$  的标准储备液, 该溶液可在 4  $^{\circ}\text{C}$  的条件下存放 3 个月。试验测定时移取不同体积的上述储备液于容量瓶中, 用超纯水稀释定容配制成相应梯度的标准溶液。

1.2.2 样品的前处理。准确称取 5.0 g (精确到 0.001 g) 茶酒样品于比色管, 加水稀释至 5 mL。于 70  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中水浴 30 min, 冷却至室温, 过 0.45  $\mu\text{m}$  的水系滤膜, 待进样分析。

1.3 色谱条件 色谱柱: Eclipse AAA  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm); 流动相 A: 40  $\text{mmol}/\text{mL}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液 (用 NaOH 溶液调 pH 至 7.8); 流动相 B: ACN: MeOH:  $\text{H}_2\text{O}$  (45: 45: 10, V/V/V); 流速 0.5  $\text{mL}/\text{min}$ ; 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长 338 nm。流动相随时间的变化进行梯度洗脱, 具体洗脱条件见表 1。

1.4 柱前衍生 Agilent 1290 的自动进样器可以进行程序进样, 柱前衍生的过程可以在自动进样器中进行, 具体程序如表 2 所示。

## 2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择 由于茶氨酸的极性较强<sup>[13-15]</sup>, 依据反相色谱分离原理, 化合物的保留时间取决于固定相碳的数

基金项目 国家自然科学基金项目 (31527803)。

作者简介 杨威 (1983 - ), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 研究方向: 食品/药品质量检测。\* 通讯作者, 教授, 博士, 从事化学生物传感与食品、药品安全检测研究。

收稿日期 2016-08-12

表 1 流动相洗脱梯度

Table 1 Mobile phase elution gradient

时间 Time min	流动相 B Mobile phase B//%	流动相 A Mobile phase A//%
0	0	100
1.0	0	100
6.0	57	43
7.5	57	43
8.0	0	100

表 2 衍生程序

Table 2 Derivative procedure

编号 No.	操作 Operation	过程 Process
1	吸取	以最大速度吸取 10.0 $\mu\text{L}$ 硼酸盐溶液
2	清洗	以最大速度吸取超纯水清洗
3	吸取	以最大速度吸取超 2.0 $\mu\text{L}$ OPA
4	混合	在空气中以最大速度混合 5 次
5	等待	30 s
6	清洗	以最大速度吸取超纯水清洗
7	吸取	以最大速度吸取 2.0 $\mu\text{L}$ 待测样品
8	混合	在空气中以最大速度混合 30 次
9	等待	1 min
10	进样	

目。通过对不同  $\text{C}_{18}$  柱在超高压下的试验,发现普通的  $\text{C}_{18}$  柱在超高压下容易出现疏水塌陷,杂质干扰大,响应值较弱,而 Eclipse AAA  $\text{C}_{18}$  柱能较好地分离杂质,保留能力也较强。因此选择 Eclipse AAA  $\text{C}_{18}$  柱进行试验。

**2.2 检测波长的选择** 取某浓度的标准溶液进行衍生后进样,在 190 ~ 610 nm 波长范围内进行茶氨酸衍生物的紫外吸收扫描。从测得的光谱图可以发现,其衍生物的最大吸收波长在 335 ~ 345 nm,通过多波长的设定及对标准溶液和样品的测定,结合杂质的干扰和衍生物响应值的考量,最终选择 338 nm 作为最佳的检测波长。标准溶液色谱图见图 1 所示。

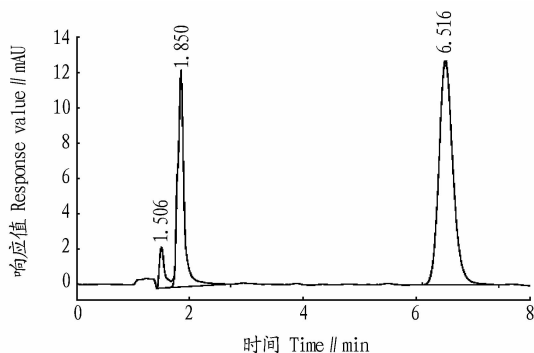


图 1 L-茶氨酸标准溶液色谱

Fig.1 Chromatography of L-theanine standard solution

**2.3 线性关系及检出限** 配制不同浓度的茶氨酸标准溶液,再在最佳的色谱条件进行测定,以标准溶液浓度  $X$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 为横坐标,以色谱峰的峰面积  $Y$  为纵坐标进行线性回归分析,结果显示:线性方程  $Y = 53.57X - 41.664$ ,相关系数  $r$  为 0.999 59,线性范围为 0.1 ~ 100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,浓度和峰面积

呈现出良好的线性关系,方法的最低检出限为 0.05  $\mu\text{g}/\text{g}$  (以  $S/N=3$  计)。相关数据如图 2 所示。

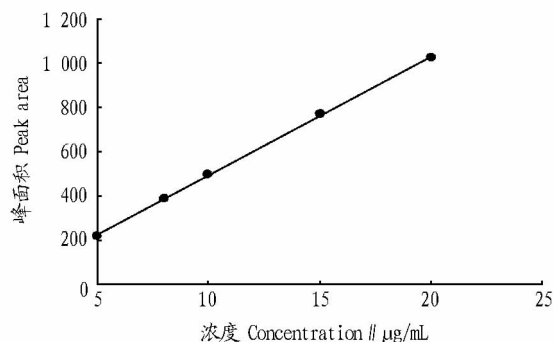


图 2 线性图谱

Fig.2 Linear map

**2.4 精密性及方法稳定性** 取一定浓度的茶氨酸标准溶液在同一天内进行 6 次测定,测得的峰面积的相对标准偏差 ( $RSD$ ) 为 0.9%。取衍生前样品和衍生样品各 2 份,分别放置 0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 h 后进行测定,通过对测定峰面积数据的处理得出其相对标准偏差为 1.1%。上述 2 个试验说明方法的精密度较佳,衍生前和衍生后样品在一定时间内性质较稳定。

**2.5 样品测定结果及回收率** 采用标准加入法进行回收率试验,分别在空白溶液和待测样品中加入不同浓度的标准溶液,按照样品处理方法进行处理后上机测定,对测定数据进行整理后如表 3 所示。从表 3 可以看出,样品的茶氨酸含量为 0.25  $\text{mg}/\text{kg}$ ,加标试验的回收率在 99.6% ~ 100.1%,满足普通实验室对茶氨酸分析的要求。

表 3 加标回收试验

Table 3 Standard addition recovery experiment

测试项目 Test items	本底值 Background values $\text{mg}/\text{kg}$	加标值 Added value $\text{mg}/\text{kg}$	测定值 Measured value// $\text{mg}/\text{kg}$	回收率 Recovery rate//%
空白 Blank	0.00	5.00	4.98	99.6
样品 1 Sample 1	0.25	5.00	5.24	99.8
样品 2 Sample 2	0.24	10.00	10.22	99.8
样品 3 Sample 3	0.26	15.00	15.27	100.1

### 3 结论

该试验采用超高压高效液相色谱对茶酒中茶氨酸的含量进行了分析研究,利用 OPA 衍生剂增加了茶氨酸的紫外吸收效果,超高压高效液相色谱对目标物的保留时间、响应灵敏度都有较大地提升。该方法快速、简单、定量准确,易于在茶氨酸的测定分析中推广应用。

### 参考文献

- [1] 卫春会,罗惠波,豆永强.我国茶酒生产现状及发展[J].酿酒科技,2007(10):126-127,129.
- [2] 周才碧,张敏星,穆瑞禄,等.浅析茶酒的研制与发展[J].酿酒,2014,41(1):71-74.
- [3] 朱松,王洪新.OPA 柱前衍生高效液相色谱法测定茶氨酸的研究[J].食品工业科技,2005,26(2):182-183.

(下转第 92 页)

BBR WP 稀释 800 倍能与咪菌酯防效有明显区别,故对于发病严重的草莓白粉病喷药间隔以 7 d 为宜,喷药间隔超过 12 d,白粉病发病率迅速增加,与咪菌酯比较,出现防效降低的趋势,说明在相同条件下 BBR 的防效期较咪菌酯短。植物源农药的特点之一是在环境中易降解,半衰期短<sup>[8-9]</sup>,推测这可能是导致 BBR 防效期比化学农药咪菌酯短的原因之一,其他原因有待于进一步研究。

预防治疗,即温度、湿度适合草莓白粉病发病,但尚未出现症状时用药。该研究表明,间隔 7 d 喷施 10% BBR WP 稀释 800、1 200 倍的预防效果较咪菌酯好,当 10% BBR WP 稀释 1 600 倍防效与咪菌酯相同;间隔 12 d 喷施 10% BBR WP 稀释 800、1 200、1 600 倍,其防治效果与咪菌酯无明显区别,且在试验浓度范围内,防治效果无明显差别。因此,预防用药,10% BBR WP 施药间隔在 12 d 左右,以稀释 1 200 ~ 1 600 倍为宜。该研究结果说明对于草莓白粉病,BBR 预防用药效率高于治疗用药。生物农药能增强多数作物的抗性,如黄瓜、烟草等<sup>[10]</sup>。黄柏提取物能提高褐腐病菌感染桃的过氧化物酶、苯丙氨酸脱氨酶、几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶等防御酶活性,BBR 为黄柏的主要成分之一,推测 BBR 防治草莓白粉病与其提高寄主防御能力有关<sup>[11]</sup>。

目前,白粉病的防治主要使用咪菌酯、腈菌唑、四氟醚唑、氟硅唑等化学农药<sup>[12]</sup>。长期施用单一杀菌剂,导致病菌对其产生抗药性,防治效果下降。BBR 是异喹啉生物碱,存在于小檗科等 4 科 10 属植物中,其杀菌性和安全性已得到反复验证<sup>[13]</sup>。BBR 对西瓜白粉病菌<sup>[14]</sup>、桃褐腐病菌<sup>[4]</sup>、莴苣霜霉病菌、番茄早疫病、西瓜枯萎菌、苹果落叶斑菌、葡萄柄孢菌等表现出较强的抑制效果<sup>[15]</sup>,说明 BBR 作为农用杀菌剂抗菌谱较广,同时其工业化提取工艺成熟,价格低廉,高效、安全,因此,BBR 作为防治草莓白粉病的天然杀菌剂具有

广阔的应用前景,但其作用机制仍有待于深入研究。

## 参考文献

- [1] 张建军,刘红,李霞.不同有机肥配施对大棚草莓品质及土传病害发生率的影响[J].安徽农业大学学报,2013,40(1):65-69.
- [2] ZHANG Y Y,ZENG L Z,YANG J L,et al.6-Benzylaminopurine inhibits growth of *Monilinia fructicola* and induces defense-related mechanism in peach fruit[J].Food Chem,2015,187:210-217.
- [3] HOU D Y,YAN C Q,LIU H X,et al.Berberine as a natural compound inhibits the development of brown rot fungus *Monilinia fructicola*[J].Crop protection,2010,29(9):979-984.
- [4] 葛喜珍,李可意,刘学尧,等.小檗碱复方对桃褐腐病的田间防效和安全性评价[J].安徽农业科学,2015,43(10):124-125.
- [5] DOMADIA P N,BHUNIA A,SIVARAMAN J,et al.Berberine targets assembly of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ[J].Biochemistry,2008,47(10):3225-3234.
- [6] YAO J,KONG W J,JIANG J D.Learning from berberine:Treating chronic diseases through multiple targets[J].Sci China(Life Sci),2015,58(9):854-859.
- [7] 葛喜珍,张思路,李可意,等.一种防治果蔬褐腐病、蚜虫的可湿性粉剂及其制备方法:CN103975962A[P].2014-08-13.
- [8] YANG X J,YANG L J,ZENG F S,et al.Distribution of baseline sensitivities to natural product physon among isolates of *Sphaerotheca fuliginea* and *Pseudoperonospora cubensis*[J].Plant disease,2008,92(10):1451-1455.
- [9] 张兴,马志卿,冯俊涛,等.植物源农药研究进展[J].中国生物防治学报,2015,31(5):685-698.
- [10] SCHNEIDER S,ULLRICH W R.Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers[J].Physiol Mol Plant Pathol,1994,45(4):291-304.
- [11] FENG X Y,WANG B G,LI W S,et al.Preharvest application of Phellodendron Bark extracts controls brown rot and maintains quality of peento-shaped peach[J].Horts Cience,2008,43(6):1857-1863.
- [12] 张焕春,尹国香,刘学卿,等.保护地南瓜白粉病的发生及综合防治技术研究[J].安徽农业科学,2014,42(2):431-443.
- [13] WANG Y.Comprehensive study in the inhibitory effect of berberine on gene transcription,including TATA box[J].PLoS One,2011,6:23495.
- [14] 张珍,周小军,陈礼威,等.0.5%小檗碱水剂对大棚西瓜白粉病的防治效果[J].长江蔬菜,2011(1):48.
- [15] 阮元,任伟,申进文,等.盐酸小檗碱对植物病原真菌抑制作用及其抑菌的生理指标分析[J].河南农业大学学报,2014,48(2):194-198.
- [16] SHIMIZU Y,IMAOKA M,YANO S,et al.Sensitive enzymatic method for the quantification of theanine,a principal umami component of commercial tea beverages[J].Food Sci Technol Res,2013,19(5):909-913.
- [17] 马雪沅,邹鹏飞,王荡强,等.纸层析-分光光度法检测茶氨酸[J].植物生理学报,2012,48(4):413-417.
- [18] 龚雨顺,黄建安,崔湘兴,等.离子对色谱法测定茶叶中的茶氨酸[J].茶叶科学,2008,28(2):89-92.
- [19] 刘小力,李想.茶叶中茶氨酸含量的测定方法研究[J].食品科学,2009,30(14):281-284.
- [20] 张佳,王川杰,阮建云.GC-MS及GC测定茶叶中主要游离氨基酸的方法研究[J].茶叶科学,2010,30(16):445-452.
- [21] 赵颀,阙斐,周晓红,等.柱后补偿液相色谱与电雾式检测器结合测定茶氨酸含量[J].食品工业科技,2013,34(1):317-318.
- [22] 李银花,刘仲华,黄建安.手性衍生-高效液相色谱法拆分和定量测定茶氨酸对映体[J].色谱,2007,25(5):719-722.

(上接第 71 页)

- [4] RANA A,SINGH H P,GULATI A.Concurrent analysis of theanine,caffeine,and catechins using hydrophobic selective  $C_{12}$  stationary phase[J].J Liquid Chromatogr Relat Technol,2015,38(6):709-715.
- [5] HARA Y.Green tea:Health benefits and applications[M].New York:Food Science and Technology,Marcel Dekker,Inc.,2001.
- [6] SONG H J,KIM Y D,JEONG M J,et al.Rapid selection of theanine-rich green tea (*Camellia sinensis* L.) trees and metabolites profiling by fourier transform near-infrared (FT-IR) spectroscopy[J].Plant Biotechnol Rep,2015,9(2):55-65.
- [7] HANCU G,SIMON B,RUSU A,et al.Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis[J].Adv Pharm Bull,2013,3(1):1-8.
- [8] 张峻萍,方从兵,宛晓春,等.茶叶中茶氨酸的胶束电动毛细管电泳定量方法初步研究[J].茶叶通报,2006,28(3):108-110.