

茶汤中游离氨基酸的分离条件初探

陈圆圆¹, 钊相龙², 陈春月², 曹喜念², 肖涵^{2*}

(1. 云南商测质量检验技术服务有限公司, 云南 昆明 650017; 2. 昆明学院 化学科学与技术系, 云南 昆明 650214)

摘要: 为建立适合滇产茶叶氨基酸分离分析的方法, 使用全自动氨基酸分析仪, 对茶汤中游离氨基酸分离条件进行初步探索. 结果表明, 茶氨酸混合标准溶液最佳配比为其他氨基酸 (100 nmol/L) 150 μ L + 茶氨酸 (17.2 nmol/L) 261.3 μ L, 进样量 50 μ L; 流动相 C 的 pH = 7.96. 在以上分离条件下, 所有氨基酸组分分离良好, 各峰型均能满足定量需求, 适用于实际茶样的分离分析.

关键词: 茶汤; 游离氨基酸; 氨基酸分析仪; 条件优化

中图分类号: TS272.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639 (2018) 03-0037-04

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2018.03.007

Preliminary Study on Separation Conditions of Free Amino Acid in Tea Infusion

CHEN Yuanyuan¹, CHUAN Xianglong², CHEN Chunyue², CAO Xinian², XIAO Han^{2*}

(1. Yunnan Shangce Quality Inspection Technology Service Co., Ltd, Kunming, Yunnan, China 650117;

2. Department of Chemical Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: The separation conditions of free amino acids in tea infusion were preliminary studied with automatic amino acid analyzer in order to find out the method for separation analysis on amino acid in the tea from Kunming areas. The results showed that the optimum matching ratio in the mixed standard solution of theanine was as follows: other amino acids (100 nmol/L) 150 μ L + theanine (17.2 nmol/L) 261.3 μ L with 50 μ L injection volume and pH of mobile phase C = 7.96. Under the separation conditions above, all the amino acid constituents were satisfied separated; the peak curve could meet the quantitative requirements. The condition could be suitable for the actual tea sample separation analysis.

Key words: tea infusion; free amino acids; amino acid analyzer; condition optimization

茶汤是山茶属 (*Camellia* L.) 植物的嫩芽叶干制品冲泡得到的水提取液. 茶汤作为常见饮品, 其中不仅具有多种营养成分和保健效果, 更具有丰富良好的风味特征. 茶汤中茶多酚、游离氨基酸总量 (Total free amino acids, TFAA)、咖啡碱等生化成分^[1]是茶汤滋味和功效的主要贡献因子. 茶叶的游离氨基酸 (Free amino acids, FAA) 指茶叶水浸出物中呈游离状态存在, 非蛋白质态的可溶性氨基酸, 目前已研究分离出的共 26 种, 包括: 天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、茶氨酸、甘氨酸、丙氨酸、 α -氨基丁酸、蛋氨酸、异亮氨酸、脯

氨酸、亮氨酸、酪氨酸、 β -丙氨酸、苯丙氨酸、 β -氨基异丁酸、 γ -氨基丁酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、缬氨酸等^[2]. 其中游离氨基酸质量分数约占茶叶干质量的 2% ~ 5%, 而茶氨酸占干物质的 1% ~ 2%^[3]. 因为游离氨基酸总量与茶叶品质显著正相关^[4-5], 所以其含量对茶叶的滋味判断、质量控制显得尤为重要.

近年来, 茶叶中游离氨基酸定量分析方法常见的有茚三酮比色法^[6-7]、氨基酸自动分析仪测定法^[8-9]、高效液相色谱法^[10-12]、近红外光谱法^[13-14]等. 而常规国标法^[6]使用茚三酮比色法测定

收稿日期: 2018-05-03

基金项目: 昆明学院应用型人才培养改革创新资助项目“化学化工类大学生创新实践基地建设”.

作者简介: 陈圆圆 (1994—), 女, 云南昆明人, 主要从事食品与药品检验研究.

* 通讯作者: 肖涵 (1981—), 女, 云南大理人, 副教授, 博士, 主要从事环境分析和食品分析研究, E-mail: blackcrossing630@vip.sina.com.

茶汤中游离氨基酸总量,结果稳定性较差,无法得知氨基酸组成及具体含量.此外,已有的26种氨基酸风味特征或偏鲜、或偏苦、或偏甜,仅使用氨基酸总量难以切实把握不同氨基酸的比例特征,因此无法准确预测出茶叶的风味特性,进而判定其品质.就测定茶汤中氨基酸含量而言,全自动氨基酸分析仪能够实现目标组分分离完全,有良好的重复性和稳定性,准确率高,已有多个报道^[8-9]使用该仪器研究分离了龙井、乌龙等茶样的游离氨基酸组分.

滇产大叶种茶叶香气口感浓郁,茶浸出物总量高,滋味组分比例特殊.为更好地了解滇产茶叶的风味特征及营养成分,本研究拟使用全自动氨基酸分析仪,对氨基酸分析过程中的标样、茶样各游离氨基酸组分分离测定条件进行研究,以建立适合滇产茶叶氨基酸分离分析的方法,以期为进一步研究滇产茶氨基酸组分与风味特征的相互规律奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 样品

茶氨酸(99.9%),BR级,100 mg/瓶,上海融禾医药科技有限公司;游离氨基酸混合标样(100 nmol/L),塞卡姆(北京)科学仪器有限公司.

茶叶样品为市场采购而得,经粉碎至100目以自封袋包装避光冷藏.

1.2 试剂

实验所用试剂如表1所示.

表1 实验所用药品

试剂	级别	规格	厂家
苯酚	98%	500g/瓶	东京化成(日本)
茚三酮	GR	20g/瓶	塞卡姆(德国)
还原剂		1 mL/支	塞卡姆(德国)
甲醇	色谱纯	4 L/瓶	Merch(德国)
硼酸	AR	500g/瓶	广东光华
氯化锂	AR	500g/瓶	广东光华
一水合氢氧化锂	AR	500g/瓶	广东光华
一水合柠檬酸钠	AR	500g/瓶	广东光华
乙酸钾	AR	500g/瓶	国药集团
三水合乙酸钠(乙酸钠)	AR	500g/瓶	国药集团
盐酸	AR(37%)	500 mL/瓶	成都科龙
无水乙醇	AR	500 mL/瓶	国药集团
冰乙酸	AR	500 mL/瓶	国药集团
5-磺基水杨酸	AR	50g/瓶	广东光华
EDTA	GR	500g/瓶	东京化成(日本)
水	超纯水		

1.3 仪器及条件

全自动氨基酸分析仪: S-433D 德国塞卡姆公司; 色谱柱: LCA K07/Li; 流动相: 柠檬酸锂 $A = \text{pH}2.90$, $B = \text{pH}4.20$, $C = \text{pH}7.96$, 采用仪器自带梯度洗脱程序(从略); 流速: 洗脱泵 0.45 mL/min + 衍生泵 0.25 mL/min ; 检测器: DAD, $570 \text{ nm} + 440 \text{ nm}$; 柱温: $38 \sim 74^\circ\text{C}$ 梯度升温; 酸度计: METTLER TOLEDO 集团(瑞士); 电子天平: 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司.

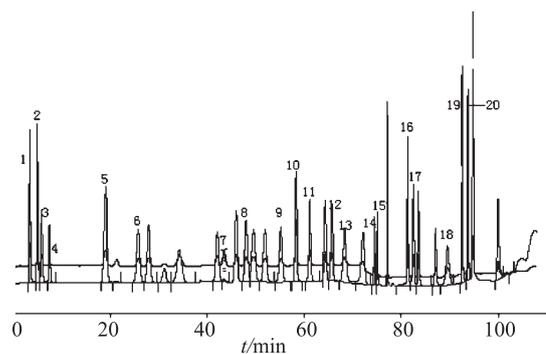
1.4 茶汤制备

称取 5.00 g 已研磨好的样品(约100目)放入比色管中,加入 10 mL 水摇匀,再加入沸蒸馏水 35 mL ,沸水浴 45 min ,浸提完毕后立即趁热减压过滤,残渣用少量热蒸馏水洗涤 $2 \sim 3$ 次,滤液定容至 50 mL .取 2.0 mL 样品溶液加入 0.4 mL 4%的磺基水杨酸溶液,摇匀,过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后直接分析.

2 结果与讨论

2.1 流动相环境的调整

首先使用常规混标检验仪器及流动相环境,谱图见图1.



1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.天冬氨酸; 6.苏氨酸; 7.丝氨酸; 8.α-氨基己二胺; 9.甘氨酸; 10.α-氨基丁酸; 11.缬氨酸; 12.胱氨酸; 13.亮氨酸; 14.β-丙氨酸; 15.β-氨基异丁酸; 16.γ-氨基丁酸; 17.3-甲基组氨酸; 18.1-甲基组氨酸; 19.色氨酸; 20.鸟氨酸; 21.精氨酸. 图2同.

图1 调节pH前谱图

由图1可知,分析周期内其他氨基酸分离度及峰型较好.而问题主要集中于后期,特别是精氨酸峰($t \approx 101 \text{ min}$),表现为峰展宽、出峰延迟.该时间段主要以流动相 C 为主要洗脱剂, pH 为 8.00 ,因此针对性的逐渐调整 pH ,并进行峰型对照,最终确定合适 pH 为 7.96 .校准后的谱图见图2.

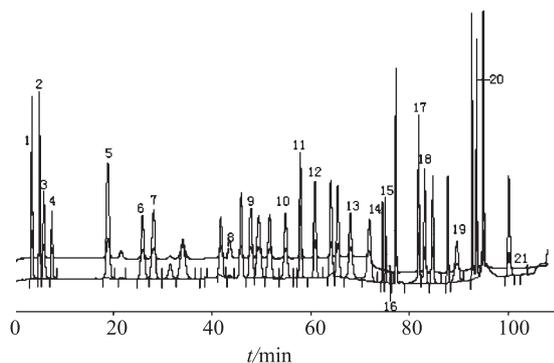


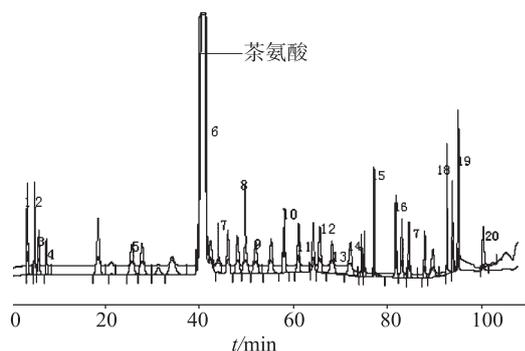
图2 调节pH后谱图

由图2可知, 流动相调整后, 所有峰均得到了较好分离, 精氨酸峰在分析周期内出峰情况良好, 适合进一步定量要求。

2.2 茶氨酸混标的配制

茶氨酸为茶汤氨基酸中主体部分, 其质量分数约占总量50%左右。由于游离氨基酸分析系统多针对生理体液, 不含茶氨酸, 因此需调整其质量分数比例。以出峰顺序、分离度、响应面积为指标, 优化茶氨酸混标的配制。

图3~图5为单次进样50 μL, 质量浓度分别为0.100 mg/mL茶氨酸~0.003 mg/mL茶氨酸混标谱图。



1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.苏氨酸; 6.丝氨酸; 7.天冬酰胺; 8.谷氨酸; 9.茶氨酸; 10.α-氨基己二胺; 11.丙氨酸; 12.瓜氨酸; 13.缬氨酸; 14.胱氨酸; 15.蛋氨酸; 16.异亮氨酸; 17.亮氨酸; 18.酪氨酸; 19.β-丙氨酸; 20.β-氨基异丁酸; 21.3-甲基组氨酸; 22.1-甲基组氨酸; 23.色氨酸; 24.鸟氨酸; 25.赖氨酸. 图4和图5同。

图3 0.100 mg/mL茶氨酸+系统混标

茶氨酸为茶汤游离氨基酸主体(总量40%~60%), 其定量结果直接影响总量准确度。经调整最佳出峰配比为: 其他氨基酸(100 nmol/L)150 μL+茶氨酸(17.2 nmol/L)261.3 μL。考虑到配制的简易性, 其质量浓度调整为: 茶氨酸

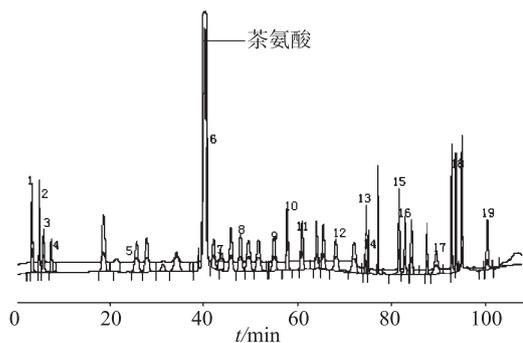


图4 0.025 mg/mL茶氨酸+系统混标

0.174 g 稀释至1 L, 临用取500 μL加入500 μL系统混标, 定容至5.0 mL(所有氨基酸浓度均为100 μmol/L), 避光保存于4℃下, 并于7 d内用完。

图6、图7分别为茶氨酸单标及自配混标谱图。

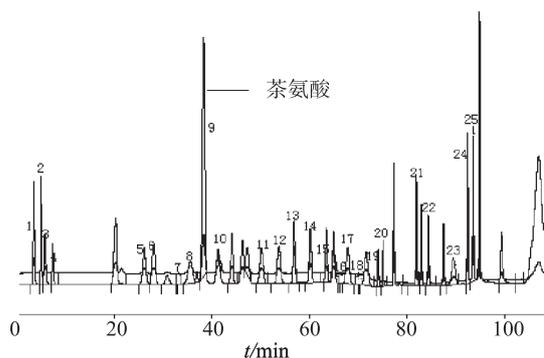


图5 0.003 mg/mL茶氨酸+系统混标

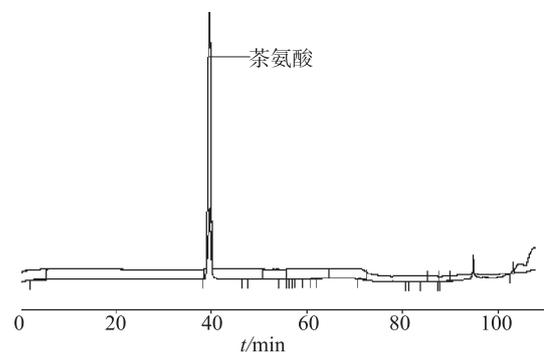


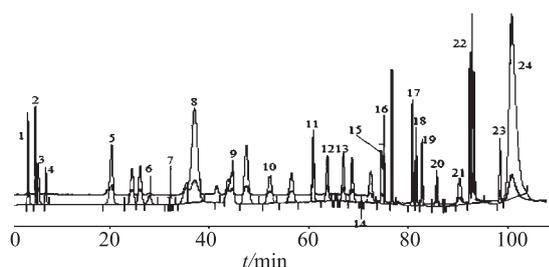
图6 茶氨酸单标色谱图

由图6和图7可知, 茶氨酸单标能在系统条件下实现完全分离, 出峰时间为38.9 min, 分离度良好, 与其他组分未见相互重叠干扰。因此适用于样品中混合氨基酸的分离分析。

2.3 样品氨基酸的分离情况

使用以上条件, 随机抽取绿茶样进行分析, 其

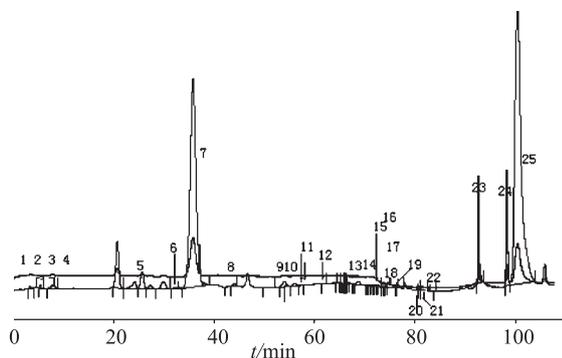
分离情况见图8.



1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.苏氨酸; 6.丝氨酸; 7.天冬酰胺; 8.谷氨酸; 9.α-氨基己二胺; 10.瓜氨酸; 11.胱氨酸; 12.蛋氨酸; 13.异亮氨酸; 14.酪氨酸; 15.β-丙氨酸; 16.β-氨基异丁酸; 17.γ-氨基丁酸; 18.组氨酸; 19.3-甲基组氨酸; 20.1-甲基组氨酸; 21.肌肽; 22.色氨酸; 23.鸟氨酸; 24.氨; 25.精氨酸.

图7 茶氨酸加标混标色谱图

由图8可以看出,在该条件下,茶叶中所含氨基酸组分分离情况良好,适用于实际样品的分离分析.



1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.苏氨酸; 6.天冬酰胺; 7.茶氨酸; 8.α-氨基己二胺; 9.丙氨酸; 10.α-氨基丁酸; 11.缬氨酸; 12.胱氨酸; 13.异亮氨酸; 14.亮氨酸; 15.酪氨酸; 16.β-丙氨酸; 17.β-丙氨酸; 18.β-氨基异丁酸; 19.γ-氨基丁酸; 20.组氨酸; 21.3-甲基组氨酸; 22.1-甲基组氨酸; 23.鸟氨酸; 24.氨; 25.精氨酸.

图8 茶叶样品游离氨基酸谱图

3 结论

1) 使用氨基酸分析仪对茶汤游离氨基酸分离条件进行了初步探索,结果表明,其他氨基酸(100 nmol/L) 150 μL + 茶氨酸(17.2 nmol/L) 261.3 μL,进样量 50 μL;流动相 C 的 pH = 7.96.

2) 以上述条件对实际茶样进行分析,结果显示,各峰分离结果符合定性、定量要求.

[参考文献]

- [1] 曾敏. 古树普洱茶特征风味的化学基础研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [2] 宛晓春. 茶叶生物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [3] CAVA-MONTESINOS P, CERVERA M L, PASTOR A, et al. Determination of arsenic and antimony in milk by hydride generation atomic fluorescence spectrometry [J]. Talanta, 2003, 60 (4): 787-789.
- [4] 赵明明, 金钰, 胡筱波, 等. 基于氨基酸特征分析的西湖龙井茶鉴别方法研究 [J]. 湖北农业科学, 2015, 54 (24): 6369-6371.
- [5] 王淑慧, 龙立梅, 宋沙沙, 等. 3种名优绿茶的特征滋味成分研究及种类判别 [J]. 食品科学, 2016, 37 (2): 128-131.
- [6] 中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院. 茶游离氨基酸总量测定: GB/T 8314—2002 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [7] 林家雄, 钊相龙, 陈春月, 等. 云南普洱和临沧地区茶产品游离氨基酸总量测定研究 [J]. 昆明学院学报, 2017, 39 (3): 30-33.
- [8] 苗雨田, 杨悠悠, 李颂, 等. 全自动氨基酸分析仪法快速测定乌龙茶中γ-氨基丁酸 [J]. 食品安全专栏, 2015, 21 (4): 231-235.
- [9] 张丹丹, 叶小辉, 赵峰, 等. 基于游离氨基酸组分的白茶滋味品质研究 [J]. 福建农业学报, 2016, 31 (5): 515-520.
- [10] 陈林, 陈健, 王丽丽, 等. 不同茶类制法对茶多酚和游离氨基酸化学模式的影响 [J]. 福建农业学报, 2017, 32 (3): 287-293.
- [11] 李金玲, 王永胜, 马强, 等. 忍冬茶及其加工过程中氨基酸和微量元素分析 [J]. 食品工业科技, 2012, 33 (12): 75-79.
- [12] 陈丹, 叶小辉, 俞滢, 等. 不同等级云南红碎茶的氨基酸组分分析 [J]. 福建茶叶, 2014 (4): 24-26.
- [13] 张民, 李银花, 袁晴春, 等. 近红外光谱对鲜茶叶茶多酚和氨基酸总量检测的研究 [J]. 上海农业学报, 2015, 31 (6): 36-40.
- [14] 吴彦红, 艾施荣, 严霖元, 等. 近红外光谱结合特征变量筛选方法测定茶汤中的氨基酸含量 [J]. 江西农业大学学报, 2012, 34 (5): 1026-1031.