

纸层析-分光光度法检测茶氨酸

马雪泷¹, 邹鹏飞¹, 王荡强¹, 曹顺利², 房江育^{1,3,*}, 王昶³

¹黄山学院生命与环境科学学院, 安徽黄山245041; ²安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术农业部重点实验室, 合肥230036; ³黄山先农生物科技有限公司, 安徽黄山245900

摘要: 为了满足普通实验室对茶中茶氨酸测定的需要, 研究了茶氨酸的纸层析-分光光度检测方法。结果表明, 用茚三酮-乙醇水溶液做展层剂, 对茶苗根、芽叶和茶叶的水浸提液进行纸层析, 能够有效地将茶氨酸与其它氨基酸分离, 紫色色斑清晰而均匀。用乙醇溶液洗脱色斑后用分光光度计在570 nm比色, 在20~70 μL 茶氨酸溶液点样量范围内其含量与吸光度呈线性关系。本方法检出限为 $0.0057 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 测定下限为 $0.0191 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 平均回收率90.28%~115.38%, 平均相对标准差1.51%, 具有安全、药品种类少和操作步骤简单等特点。

关键词: 茶; 茶氨酸; 茚三酮; 乙醇; 纸层析; 分光光度法

Determination of Theanine in Tea (*Camellia sinensis* L.) by Paper Chromatography-Spectrophotometry

MA Xue-Long¹, ZOU Peng-Fei¹, WANG Dang-Qiang¹, CAO Shun-Li², FANG Jiang-Yu^{1,3,*}, WANG Chang³

¹College of Life and Environmental Sciences, Huangshan University, Huangshan, Anhui 245041, China; ²Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology of Ministry of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; ³Huangshan Xiannong Bio-Technology Co., Ltd, Huangshan, Anhui 245900, China

Abstract: To meet the needs of ordinary laboratory determination of theanine, paper chromatographic-spectrophotometry was developed. The results showed that by paper chromatography, ninhydrin-ethanol water solution could effectively separate theanine from other amino acids extracted in the water from roots or shoots of tea seedling or from tea. The purple stains were clear and even. After the stains were eluted with ethanol solution, theanine content could be assayed with the spectrophotometer at 570 nm. The theanine content appeared a linear relationship with the absorption value when the solution was spotted on the paper at the range of 20–70 μL . The detection limit was $0.0057 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the lowest detection limit was $0.0191 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The average recovery ranged from 90.28% to 115.38%, and the average relative standard deviation was 1.51%. The paper chromatography-spectrophotometry characterizes safety, fewer chemicals, and easy to operate.

Key words: tea; theanine; ninhydrin; ethanol; paper chromatography; spectrophotometry

L-茶氨酸(L-theanine)是茶树中特有的一种非蛋白质氨基酸, 具有焦糖香和类似味精的鲜爽味, 占茶叶干重的1%~2%之间, 是构成茶风味的主要物质之一; 茶氨酸在茶树的根中合成, 运输到地上部生长点, 在新梢芽叶中占总游离氨基酸的70%左右, 与茶叶品质的形成和茶树碳、氮代谢的调节和控制有关(宛晓春2003)。

目前测定茶氨酸的方法主要有高效液相色谱(HPLC)法、毛细管电泳法、氨基酸自动分析仪法、阴离子交换色谱-积分脉冲安培检测法等(Vuong等2011)。这些方法灵敏度高, 准确性强, 但设备购置和维护成本也很高, 无法满足普通实验室对茶氨酸测定的需求。

分光光度计价格低廉、容易操作, 是实验室的常备仪器。茚三酮反应是实验室测定氨基酸最常用的方法, 但用这种方法测出来的是全部游离氨基酸的混合结果(中华人民共和国国家标准2002)。高小红等(2005)采用浓盐酸分解茶氨酸成乙胺, 利用胺的氯代衍生物进行茶氨酸分光光度定量测定。由于该方法涉及诸多药品, 操作步骤

收稿 2011-11-21 修定 2012-03-14

资助 国家自然科学基金项目(30771755)、黄山学院引进博士启动资助项目(2012xkj003)、黄山市科技孵化资金项目(2010F-03)和黄山学院大学生科研项目(2011xdkj043和2011xdkj056)。

* 通讯作者(E-mail: fjy@hsu.edu.cn; Tel: 0559-2546631)。

繁杂,尤其是中间加入 NaClO_3 后需要放置1 min,加入 NaNO_2 后放置5 min。当有数个样品时,这些时间很难控制,更有显色时间仅仅10 min,不适合多个样品同时测定。

阮宇成和王月根(1981)用乙醚-醋酸乙酯混合液和乙醇溶液依次浸提茶样,浓缩后溶于乙醇溶液,离心,取上清液在圆形滤纸上点样,浓氨水熏,吹去氨气,用正丁醇-冰醋酸-水作展层剂,水平展谱。干燥,再用新的展层剂二次展谱。纸谱干燥后用茚三酮溶液喷雾,干燥、显色,乙醇溶液洗脱,分光光度计570 nm处比色测定茶氨酸。该方法浸提使用的乙醚极易挥发,为麻醉剂,属危险品,醋酸乙酯对人体有刺激性,属低毒类。展层中使用的正丁醇、冰醋酸和氨水皆为对人体有刺激性的低毒类药品。圆形滤纸因半径所限,展谱距离较短,需要二次展谱才能将氨基酸分离,不仅浪费药品,也无时间优势。显色反应则在纸层析之后用茚三酮喷雾,由于对显色剂缺乏量的控制,色斑不均匀:标准曲线直接用标样配制,即标样没有经过纸层析步骤,与样品处理不同。以上这些都将影响测定结果。

最近,陈舒丽等(2011)用茚三酮乙醇溶液对谷氨酸和丙氨酸混合液进行展层,取得了较好的分离效果。本试验用水浸提茶样,检测这种层析方法能否用于茶中茶氨酸的分离,并用分光光度计对其进行定量检测,以确定能否满足普通实验室茶氨酸分析的需要。

材料与方法

1 仪器与试剂

试验仪器包括配备紫外检测器的高效液相色谱仪(Agilent 1100)、色谱柱Xterra RP 18柱(150 mm \times 3.9 mm)、分光光度计(721型,上海第三仪器分析厂)、分析天平(AB204N梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)、电热恒温水浴锅(HH.S 21-6V型,上海医疗器械五厂)、电热恒温干燥箱(SZ202-1型,浙江诸暨电热仪器厂)。

试剂有:色谱纯乙腈(上海星可生化有限公司),色谱纯甲醇(天津市四友精细化学品有限公司),分析纯邻苯二甲醛和乙硫醇(上海晶纯试剂有限公司),分析纯硼酸、乙酸铵、氢氧化钠(广东汕头西

陇化工股份有限公司),分析纯90%乙醇(上海博河精细化学品有限公司),茚三酮($\geq 95.0\%$)、L-茶氨酸(含量 $\geq 99\%$) (上海源聚生物科技有限公司),L-谷氨酸(上海展云化工有限公司)。准确称取100 mg(精确到0.1000 g)茶氨酸或谷氨酸溶于100 mL水中作母液,准确吸取5 mL母液,加水定容至50 mL,为茶氨酸或谷氨酸标准液(浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2 样品浸提

取当年种子萌发茶苗(*Camellia sinensis* L.) ‘杨树林’的根和芽叶,烘干,磨碎后称0.300 g;或取2.400 g茶叶(为市售的当年信阳毛尖、祁门红茶和安溪铁观音),烘干后准确称重,加蒸馏水60 mL,沸水浴中浸提45 min,冷却至室温,过滤,定容至100 mL。

3 展层分离

在长方形层析滤纸长边距下沿1.5 cm处用铅笔画一横线,从左向右每隔2.5 cm在横线上画一交叉点,另在距此横线向上10 cm处画一记号,为展层停止标记。

用微量吸管准确吸取样品浸提液20~40 μL ,在滤纸交叉点上点样,直径不超过0.5 cm,用吹风机吹干,再点样、吹干,直至点完吸管内浸提液为止。

依照样品点样方法,用微量吸管吸取20、30、40、50、60、70和100 μL 茶氨酸工作液依次点样。其中20、70和100 μL 三个点分别重复10次点样,用于确定标准曲线线性范围和计算检测限与测定下限。与样品同体积的蒸馏水点样作空白,20 μL 谷氨酸标准液点样作谷氨酸标记。

另取保存2周的茶根浸提液点18个点,每点40 μL 。对其中12个点分别加入20、30、40和50 μL 茶氨酸标准液,每一点重复3次,用于回收率和精密度的测定与计算。

在实验台上铺保鲜膜,将装有展层剂(含0.2%茚三酮的75%乙醇溶液)的培养皿[展层剂体积(mL):培养皿直径(cm)=10:3]放在保鲜膜中央,扣上烧杯,保鲜膜边缘折起封口,熏蒸40 min以上。点样结束,将滤纸二短边相对弯曲,用棉线或透明胶连接(勿接触),移开熏蒸的烧杯,将滤纸样品一边放入培养皿中,扣上烧杯,保鲜膜封口(图1)。展层时间约3 h,直至展层剂到达上沿标记处为止。

取出滤纸,挂在干燥箱中,60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥10 min。以茶氨酸色斑为参照,裁下各层析点色斑(1.5 cm \times



图1 纸层析分离茶氨酸的装置

Fig.1 Appliance of paper chromatography for separating theanine

1.5 cm), 剪碎, 投入试管, 加5 mL洗脱剂(60%乙醇), 轻摇, 40 °C水浴中20 min, 取出冷却, 待测。

4 比色与计算

以空白为参比, 在分光光度计570 nm处测定样品吸光度。以茶氨酸标样吸光度对质量作标准曲线, 得出线性方程。将样品吸光度带入标方程, 求出样品茶氨酸质量。再按下面公式计算样品中的茶氨酸含量: $\text{茶氨酸}(\%) = \frac{M \times L_1}{L_2 \times W} \times 100$ 。其中, M 为测定样品茶氨酸质量(mg), L_1 为样品浸提液定容体积(mL), L_2 为样品浸提液点样体积(μL), W 为样品干重(g)。

5 HPLC法测定

样品浸提液按照GB/T 23193-2008“茶叶中茶氨酸的测定高效液相色谱法”(中华人民共和国国家标准2008)测定。

结果与讨论

1 浸提液的纸层析

如图2所示, 用茚三酮-乙醇溶液作展层剂, 对茶根、茶芽叶和茶叶水浸提液进行垂直方向纸层析, 样品中的茶氨酸和谷氨酸色斑清晰, 与其他氨基酸在滤纸上分配速率明显不同, 茶氨酸在前, 谷氨酸在它后面。从而可以将它们从中分离出来。

2 茶氨酸的测定

2.1 标准曲线的范围

以点样20 μL 为茶氨酸标准溶液的下限, 点样70和100 μL 为上限, 测定其10个吸光度, 吸光度平

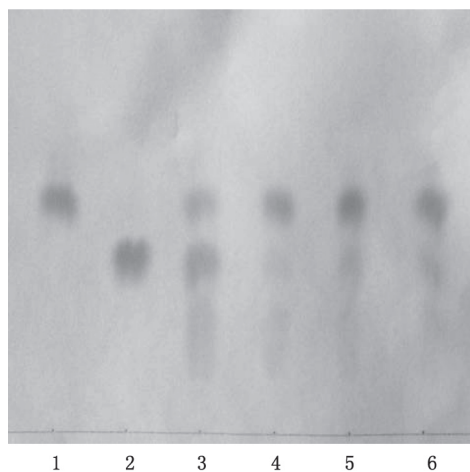


图2 用茚三酮-乙醇溶液纸层析浸提液

Fig.2 Water extract of tea seedling separated by paper chromatography with ninhydrin-ethanol solution

1: 茶氨酸标准溶液; 2: 谷氨酸标准溶液; 3和4: 茶根浸提液; 5和6: 茶苗芽叶浸提液。

均值分别为0.013、0.041和0.045, 方差分别为 3.22×10^{-7} 、 6.22×10^{-7} 和 1.16×10^{-6} 。求得下限20 μL 与上限100 μL 的方差之比 $F=3.59$, 查统计表 $F_{0.05(9, 9)}=3.18$, $F > F_{0.05(9, 9)}$, 说明曲线的工作范围太宽, 需降低上限的浓度。

求出下限20 μL 与上限70 μL 的方差之比 $F=1.93$, 此时 $F < F_{0.05(9, 9)}$, 说明二者方差为齐性, 即下限20 μL 与上限70 μL 的吸光度之间只存在随机变异, 由此可以进行简单的回归分析。在3次测定结果(表1)中, 茶氨酸含量与吸光度之间的相关系数 r 分别为0.9984、0.9968和0.9978, 表明在20~70 μL (含2~7 μg 茶氨酸)区间内茶氨酸含量(y)与吸光度(x)之间呈线性关系, 可以制作茶氨酸含量测定的标准曲线, 分别为 $y=0.1728x-0.0004$ 、 $y=0.2022x-$

表1 不同点样量的茶氨酸吸光度

Table 1 Absorbance of theanine with different amounts

点样量/ μL	吸光度		
	第1次测定	第2次测定	第3次测定
20	0.013	0.011	0.015
30	0.019	0.016	0.021
40	0.024	0.022	0.026
50	0.030	0.026	0.033
60	0.034	0.032	0.039
70	0.041	0.035	0.047
相关系数 r	0.9984	0.9968	0.9978

0.0003和 $y=0.1577x-0.0003$ 。

2.2 检出限与测定下限

检出限依照田强兵(2007)方法计算,公式如下
 $C_L = k_i s_i \frac{c}{\bar{X}}$ 。式中, C_L : 方法的检出限; k_i : 置信因子, 一般取3; s_i : 样品测量读数的标准偏差; c : 样品含量值; \bar{X} : 样品测量读数平均值。

将标准曲线上限70 μL 吸光度作为检出限和测定限计算依据。10次点样的吸光度标准偏差为0.000788811。将各相关数据带入公式, 得出此方法检出限为0.0057 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。测定下限与上述公式

基本相同, 只是置信度更高, k_i 取10 (田强兵2007), 由此得出本方法的测定下限为0.0191 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 精密度与正确度

表2表明, 样品加入20~50 μL 茶氨酸标准液后, 各水平回收率均值在90.28%~115.38%之间。其中回收率115.38%是由于样品中待测物含量较低, 加入标准物质太少, 造成了测得回收率值较差; 各水平相对标准差<3.57%, 平均1.51%。因此, 方法正确度较好, 精密度较高, 能够满足茶氨酸的定量分析要求。

表2 加标回收率和精密度的试验结果

Table 2 The results of spiked recoveries and precision

茶氨酸标准液/ μL	本底吸光度均值	标样吸光度	加标吸光度均值	回收率均值/%	RSD/%
20	0.008	0.013	0.023	115.38	2.47
30	0.008	0.019	0.028	103.51	3.57
40	0.008	0.024	0.030	90.28	0
50	0.008	0.030	0.036	92.22	0

本底均值来自于6个样点的测定; 加标均值来自于3个样点的测定。

2.4 样品茶氨酸含量的测定

茶根浸提液和芽叶浸提液吸光度分别代入回归方程 $y=0.2022x-0.0003$, 算出根和芽叶茶氨酸含量。将3个品种信阳毛尖、祁门红茶和安溪铁观音的吸光值分别代入回归方程 $y=0.1577x-0.0003$, 计算出茶氨酸含量。再将相关数值带入公式, 计算出样品茶氨酸百分含量, 并与HPLC法结果进行比较。由结果(表3)可知, 经纸层析后用分光光度计测定, 样品茶氨酸含量的变异系数为2.11%~6.62%, 表明该方法比较稳定。本方法与HPLC法之间的相对误差为4.12%~5.72%, 表明纸层析分-光光度法可

以作为普通实验室茶氨酸测定的一种经济可靠的检测技术。

高小红等(2005)从茶氨酸化学性质出发, 采取一系列化学反应, 最后用分光光度计通过检测反应液中淀粉-碘化钾变化来达到茶中茶氨酸含量间接测定的目的。该方法排除了样品中其它氨基酸对茶氨酸检测的干扰, 具有线性范围广, 灵敏度强, 准确度高, 同HPLC近似的测定结果(高小红等2008), 但由于其不适应多个样品的同时测定, 限制了其在普通实验室的广泛应用。

本实验采用纸层析分离茶样中氨基酸, 和茚三酮反应后用分光光度计比色直接测定茶氨酸含量。由于仅仅包含最终显色时候的一个化学反应, 整个过程步骤单纯, 只需要乙醇、茶氨酸、茚三酮等3种化学药品, 因而操作简单, 容易控制。此外, 茚三酮与氨基酸显色在较长时间内保持稳定, 可实现多个样品的同时分析, 真正满足普通实验室对茶氨酸测定的需要。然而, 本方法灵敏度不够强, 不适合茶氨酸含量较低样品的测定。此外, 在纸层析分离时, 需要将20~70 μL 水溶液不断点到滤纸上的一个点上, 吹干, 花费时间较长。

表3 纸层析法与HPLC法测得的茶氨酸含量

Table 3 The contents of theanine measured by paper chromatography and HPLC

样品	茶胺酸含量/%		相对误差/%
	纸层析法	HPLC法	
茶根	7.74±0.16	7.43	4.12
芽叶	2.39±0.09	2.29	4.54
信阳毛尖	1.16±0.04	1.11	4.45
祁门红茶	1.17±0.06	1.11	5.10
安溪铁观音	0.54±0.04	0.51	5.72

纸层析结果为5次重复的平均值($\bar{x}\pm\text{sd}$)。

参考文献

- 陈舒丽, 王梅娟, 罗丽丹, 刘汉才, 罗德生(2011). 对氨基酸纸层析实验的改进. 山西医科大学学报, 42 (3): 273~374
- 高小红, 章小林, 袁华(2005). 分光光度法测定茶叶中的茶氨酸. 光谱实验室, 22 (3): 524~526
- 阮宇成, 王月根(1981). 茶氨酸的简化定量法. 茶叶通讯 3: 41~45
- 田强兵(2007). 分析化学中检出限和测定下限的探讨. 化学分析计量, 16 (3): 72~73
- 宛晓春(2003). 茶叶生物化学. 北京: 中国农业出版社, 34~35
- 中华人民共和国国家标准(2002). 茶游离氨基酸总量测定. GB/T 8314-002
- 中华人民共和国国家标准(2008). 茶叶中茶氨酸的测定高效液相色谱法. GB/T 23193-2008
- Vuong QV, Bowyer MC, Roach PD (2011). L-theanine: properties, synthesis and isolation from tea. J Sci Food Agric, 91: 1931~1939