

茶中游离氨基酸测定标样的选择

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, 安徽合肥 230036;

3. 黄山先农生物科技有限公司, 安徽黄山 245900)

摘要:茶中游离氨基酸测定中, 国家标准没有对标准样品谷氨酸和茶氨酸加以区别, 造成这一指标测定结果的混乱。运用统计学成对比较t检验方法, 将2种标样的2个吸光度、按2种标样算出的样品的2种氨基酸含量以及文献中2种标样下游离氨基酸的2种含量分别一一配对, 进行样本差数方差分析, 结果表明, 谷氨酸的吸光度高于茶氨酸, 达到极显著水平, 且差异随着氨基酸量的增加而增大; 样品游离氨基酸含量谷氨酸标样测定结果普遍低于茶氨酸测定结果, 差异达到极显著或显著水平。根据茶中各种氨基酸各自的含量和分子量, 用加权法计算出混合氨基酸的相对平均分子量为147~150u, 与谷氨酸分子量147.1u接近, 偏离茶氨酸分子量174.2u; 此外, 谷氨酸吸光值高, 测定更加灵敏。为此, 认为茶中游离氨基酸测定的国家标准应该保留谷氨酸做标样, 取消茶氨酸作标样。

关键词:茶, 氨基酸, 国标, 标样, 谷氨酸

Choice of standard sample in determination of free amino acids content in tea

MA Xue-long¹, ZOU Peng-fei¹, WANG Dang-qiang¹, CAO Shun-li², FANG Jiang-yu^{1,3,*}, WANG Chang³

(1. College of Life and Environmental Sciences, Huangshan University, Huangshan 245041, China;

2. Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology of Ministry of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

3. Huangshan Sino Bio Technology Co., Ltd., Huangshan 245900, China)

Abstract: The stipulation by the national standard that both glutamic acid and theanine can be used as the standard sample in determination of free amino acids in tea is blamed for the difference of this index. By paired-comparison t-test statistics, data of glutamate and theanine absorbances, amino acid contents by glutamic and theanine standards and in literatures were paired one to one, and the variance from the average difference of each sample were analyzed. The result showed that glutamic acid absorbance was very significantly higher than that of theanine, and the difference between the two increased with the increased the amount of the amino acids. Free amino acids content in all samples was lower by glutamic acid standard than by theanine standard, this difference reached significant level. Based on the portion and molecular weight of each amino acid, the average molecular weight of the mixture of the amino acids in tea was calculated as 147~150u, close to the molecular weight 147.1u of glutamic acid but far from the weight 174.2u of theanine. Furthermore, the lower absorbance of glutamic acid made the measurement more insensitive. Therefore, it is suggested that the national standard for determination of free amino acids in tea retain glutamic acid and cancel theanine as standard sample.

Key words: tea; amino acids; national standard; standard sample; glutamic acid

中图分类号: TS272.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)16-0061-04

氨基酸是茶叶中的主要化学成分之一, 占茶叶干重的1%~4%, 已发现26种^[1], 其与茶叶的滋味和香气密切相关, 是构成茶叶品质的重要成分之一。准确

地测定茶叶游离氨基酸量对于了解茶叶质量非常重要。目前我国茶叶中游离氨基酸总量的测定采用国家标准GB/T 8314-2002^[2]。其原理是 α -氨基酸与茚三酮反应形成紫色络合物, 在570nm波长具有最大吸收, 颜色深度与氨基酸含量成正比。标准规定使用的标准物为茶氨酸或谷氨酸, 没有说明二者有什么区别。但在实际测定中, 各实验室用谷氨酸标准测定的氨基酸含量普遍低于用茶氨酸标准测定结果^[3-5]。然而, 对这一问题虽有所认识, 却鲜有对这种差别进行

收稿日期: 2011-12-23 * 通讯联系人

作者简介: 马雪泷(1963-), 男, 副教授, 研究方向: 生物技术。

基金项目: 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); 黄山学院大学生科研项目(2011xdkj043, 2011xdkj056)。

系统分析。在茚三酮比色中,参与反应的是氨基酸分子中的 α -氨基,因此氨基酸分子数目越多,显色反应越强;质量相同、分子量不同的氨基酸因含有的氨基数不同,吸光值也不同。谷氨酸分子量为147.13u,茶氨酸分子量为174u,质量相同时,谷氨酸分子数多于茶氨酸,吸光值较高。此外,茶中游离氨基酸为20多种氨基酸的混合物,吸光值的大小不仅与质量总和有关,也与各氨基酸分子数目有关。为此,用谷氨酸和茶氨酸同时做标样,进行茶中氨基酸测定,对2种标样的吸光值和据此算出的茶样氨基酸含量以及相关文献数据[4-5]分别进行生物统计学成对数据平均数比较的单尾t检验,辨析谷氨酸标样和茶氨酸标样之间的差异的本质所在。此外,对茶叶中各游离氨基酸进行加权平均分子量的计算,以便选择更接近茶中氨基酸实际情况的标准样品。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

信阳毛尖一级绿茶、祁门红茶特级和一级红茶市场购买;茶树(*Camellia sinensis* L.) 杨树林品种,种子萌发、生长在硝态氮:铵态氮分别为40:0、30:10、20:20、10:30和0:40的营养条件下,4个月后取茶苗的根和芽叶;茶树(*Camellia sinensis* L.) 楮叶种、薮北品种,14月龄茶苗的根和芽叶;茚三酮(含量 $\geq 95.0\%$)、L-茶氨酸(含量 $\geq 99\%$) 上海源聚生物科技有限公司;L-谷氨酸(含量 $\geq 99\%$) 上海展云化工有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钾 汕头西陇化工股份有限公司,分析纯。

721型分光光度计 上海第三仪器分析厂;AB204N分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH.S 21-6V型电热恒温水浴锅 上海医疗器械五厂;SZ202-1型电热恒温干燥箱 浙江诸暨电热仪器厂;PHS-2C型精密酸度计 上海隆拓仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标样的配制 用于游离氨基酸测定的谷氨酸和茶氨酸标样按照GB/T 8314-2002配制。将2种标准工作液在滤纸上梯度点样后,用酒精-茚三酮展层。

1.2.2 试液的制备 a.一级绿茶(信阳毛尖)和特级红茶(祁门红茶)试液按照GB/T 8312-2002制备。b.取烘干、粉碎的茶苗芽叶或根0.2~0.5g,加入100mL水,100℃水浴中浸提60min,冷却,过滤,定容至100mL。

1.2.3 测定 样品游离氨基酸测定按照GB/T 8314-2002进行,另送2份一级和1份特级祁门红茶至中国农科院茶叶研究所(中茶所)进行游离氨基酸检测。

1.2.4 数据处理与计算 因本实验探讨2种标样对测定结果的影响,所以省略计算样品中游离氨基酸的实际质量步骤,仅以试液游离氨基酸为比较对象,参加比较的还有相同质量谷氨酸和茶氨酸标样的吸光值和文献[4-5]中的数据。分别计算以上4种情况中各成对数据的差值,求出差值平均数、标准误差和t值,与各自自由度下查出的 $t_{0.01}$ 值或 $t_{0.05}$ 值进行比较,做出推断。综合送检茶样氨基酸测定数据和各氨

基酸分子量,计算不同氨基酸在茶中的相对分子数相加后除总氨基酸含量,得到茶中氨基酸的相对分子量。

2 结果与讨论

表1为游离氨基酸测定中2种标样谷氨酸和茶氨酸的吸光值。在相同质量下,谷氨酸标样的吸光值高于茶氨酸的吸光值,且随着标样质量的增加这种差异也愈大,从标样质量为1mg的吸光度差值0.010逐步增大到质量为3.5mg的0.080。这不仅验证了前面的推测,也表明2种标样制作的标准曲线会有很大的差异,按谷氨酸标准曲线计算得出的氨基酸含量将低于按茶氨酸标准曲线的计算数值。

表1 游离氨基酸测定谷氨酸和茶氨酸标样的吸光度

Table 1 Absorption value of glutamic acid and theanine standard sample

标样质量(mg)	谷氨酸吸光度	茶氨酸吸光度	吸光度差值
1.0	0.025	0.015	0.010
1.5	0.068	0.033	0.035
2.0	0.117	0.059	0.058
2.5	0.162	0.087	0.075
3.0	0.210	0.128	0.082
3.5	0.234	0.154	0.080
平均			0.057

表2~表4分别为3个实验室的茶样、茶苗根和茶苗芽叶中游离氨基酸的测定结果。可以看出,每对测定中,按谷氨酸标准曲线算出的数据均低于按茶氨酸标准曲线计算的数据,显然这是由于谷氨酸吸光值高于茶氨酸所致。统计分析t检验表明,无论是商品茶叶、茶苗芽叶还是茶根,2种标样下的测定结果之间达到极显著水平或显著水平(如表5所示),即用谷氨酸标准曲线得到的游离氨基酸含量极显著或显著低于用茶氨酸标准曲线获得的氨基酸含量,以谷氨酸为标样的氨基酸占以茶氨酸为标样氨基酸的70%~94%。

表2 按2种标准曲线计算的各样品中游离氨基酸含量(mg/mL)

Table 2 Free amino acid contents in samples calculated by the 2 standard curves(mg/mL)

样品	谷氨酸标样	茶氨酸标样	差值
1	0.199	0.283	-0.084
2	0.195	0.278	-0.082
3	0.186	0.264	-0.078
4	0.220	0.315	-0.095
5	0.204	0.291	-0.087
6	0.184	0.260	-0.077
7	0.128	0.176	-0.049
8	0.204	0.291	-0.087
9	0.188	0.267	-0.079
10	0.215	0.307	-0.092
11	0.199	0.283	-0.084
12	0.181	0.257	-0.076
13	0.153	0.214	-0.061
14	0.171	0.242	-0.070
15	0.185	0.262	-0.077
16	0.123	0.170	-0.047
平均			-0.077

表3 按文献[4]测定的茶样游离氨基酸含量(%)

Table 3 Free amino acid contents in tea samples in literature[4](%)

茶样	谷氨酸标样	茶氨酸标样	差值
1	2.3	2.6	-0.3
2	4.6	5.4	-0.8
3	5.0	5.8	-0.8
平均			-0.6

表4 按文献[5]测定的茶样游离氨基酸含量(mg/mL)

Table 4 Free amino acid contents in tea samples in literature[5](mg/mL)

茶样	谷氨酸标样	茶氨酸标样	差值
1	0.291	0.311	-0.020
2	0.309	0.330	-0.021
3	0.186	0.199	-0.013
4	0.123	0.132	-0.009
5	0.527	0.563	-0.036
平均			-0.020

对表1~表4中4组实验数据进行统计学成对比较、分析,如表5所示,在表1组成标准曲线的6个点中,谷氨酸标样的吸光值比茶氨酸标样平均高出0.057,其差异超过0.01水平,由此断定按照这样2个标准曲线求得的样品游离氨基酸含量也将出现极显著差异,即谷氨酸标样测定结果明显低于茶氨酸标样。正如表5所示,本实验对绿茶、红茶以及茶苗根和芽叶的测定、刘晓霞对茶样的测定、Chen对茶样的测定皆表明,以谷氨酸作标样的氨基酸含量普遍低于以茶氨酸为标样的含量,差异达到极显著或显著水平。样品中氨基酸含量越高,差异越大。

表5 表1~表4成对数据的t检验

Table 5 t-test to figures in pair from table 1 to table 4

表格序号	\bar{d}	S_x	t	t检验
表1	0.057	0.013	4.386925**	3.365($t_{0.01}$)
表2	-0.077	0.003462	22.10712**	2.602($t_{0.01}$)
表3	-0.020	0.00462	4.286156**	3.747($t_{0.01}$)
表4	-0.633	0.204124	3.102687*	2.920($t_{0.05}$)

表6为中茶所对特级红茶祁门红茶中氨基酸的检测结果(其余2份一级红茶数据略)。可以看出,茶叶中各种氨基酸混合存在,以茶氨酸含量最高,质量分数占总含量的54.4%,相对分子数占总氨基酸分子数的46.2%,可见用茶氨酸作为茶中游离氨基酸测定的标准样品有一定的道理。也正因为如此,国标规定了茶中游离氨基酸含量的测定可以用此二种中任意一种作为标准物质。然而,如表7所示,通过计算发现,尽管3份茶叶中测出的22种游离氨基酸(蛋氨酸痕量检出)在茶叶中的比例不同,3份茶叶的相对平均分子量却很接近,为147~150u,与谷氨酸的分子量147.1u非常靠近,而离茶氨酸的分子量174.2u相距较远。

3 结论

在茶的游离氨基酸测定中,谷氨酸和茶氨酸的吸光度差异很大,达到极显著水平,是不同标样下样品中游离氨基酸含量测定结果不一致的主要原因,

表6 中茶所测定茶中各类氨基酸含量

Table 6 Amino acids in tea samples assayed by Tea Research Institute

氨基酸	百分含量(%)	分子量(u)	相对分子数
The	1.603	174.2	0.009213
Asn	0.24	132.1	0.001817
GABA	0.138	103.1	0.001339
Arg	0.128	174.2	0.000735
Glu	0.111	147.1	0.000755
Asp	0.068	133.1	0.000511
Thr	0.041	119.1	0.000344
Ser	0.091	105.1	0.000866
Pro	0.059	115.1	0.000513
Gly	0.007	75.1	0.000093
Ala	0.08	89.1	0.000898
Val	0.051	117.1	0.000436
Cys	0.009	240.3	0.000037
Ile	0.04	131.2	0.000305
Leu	0.052	131.2	0.000396
Tyr	0.062	181.2	0.000342
β -Ala	0.061	89.1	0.000685
β -Aminoisobutyric acid	0.003	103.1	0.000029
His	0.012	155.2	0.000077
Trp	0.04	204.2	0.000196
Lys	0.051	146.2	0.000349
Met	0	149.2	0
合计	2.947		0.019935

表7 茶叶中混合游离氨基酸平均分子量

Table 7 Average weight of free amino acids molecular in tea

茶样	氨基酸种类	氨基酸平均分子量(u)
1	22	150.06
2	22	147.98
3	22	147.83

各实验室用谷氨酸标准测定的氨基酸含量普遍低于用茶氨酸标准测定结果^[3-5]。

谷氨酸是各类植物样品测定游离氨基酸普遍选用的标准样品。茶中游离氨基酸有26种^[1],各种氨基酸所占比例不同,低的痕量存在,高的如茶氨酸占整个游离氨基酸含量50%以上。茶叶中混合氨基酸的平均分子量为147~150u左右,接近谷氨酸分子量147.1u,距离茶氨酸分子量174.2u较远,所以应该选择谷氨酸作为茶中游离氨基酸测定的标准样品。此外,由于谷氨酸吸光度较大,提高了测定的灵敏性;茶氨酸分子量较大,吸光度较小,使得标准曲线的上限下降,测定范围缩小。遇到氨基酸含量较高的样品时,样品吸光度很容易超过标样最大值,给测定带来麻烦。测定中还发现,茶氨酸标准曲线的相关系数总是略低于谷氨酸的相关系数(数据略)。显然,在测定茶中游离氨基酸时选择谷氨酸做标样更加合适。

目前我国茶叶中游离氨基酸总量的测定标准是2002年颁布的,距今已有近10年的时间。随着我国茶叶理论、生产和销售的向前发展,迫切需要提升茶叶功能物质的检测方法。茶叶游离氨基酸检测标准样品使用谷氨酸比茶氨酸具有较多的优点,不仅更加

(下转第66页)

5.054min, 与标准品中舒巴坦的保留时间基本一致。

2.3 工作曲线

在上述色谱条件下, 配制舒巴坦标准溶液10、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 每个浓度样品平行3次实验。以峰面积(Y)为纵坐标, 浓度(X)为横坐标, 得回归方程 $y=10196x+70083$, 相关系数(R^2)为0.9998, 说明在10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好, 见图3。该方法定量限为0.75mg/kg(按信噪比S/N>10计算), 检出限为0.25mg/kg(按信噪比S/N>3计算)。

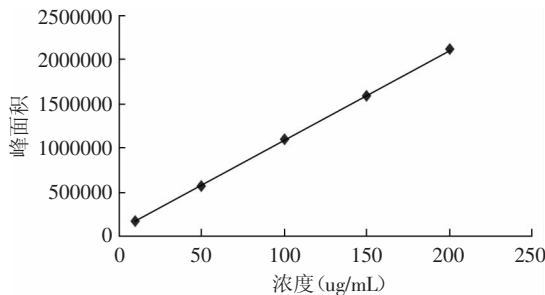


图3 舒巴坦标准曲线

Fig.3 The standard curve of sulbactam

2.4 精密度与回收率

采用标准添加法, 取空白原料乳, 分别加入舒巴坦标准溶液5、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 进行3个浓度水平的加标回收实验, 各浓度做3次平行, 进行HPLC-PAD测定, 该方法的回收率在98.82%~101.42%、相对标准偏差在2.31%~2.76%之间, 见表1。

表1 原料乳中添加舒巴坦的回收率和精密度

Table 1 Recoveries and precisions of sulbactam in raw milk

加标水平 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 (%)					平均 回收率 (%)	RSD (%)
5	97.86	97.77	99.53	102.48	96.47	98.82	2.31
50	100.83	102.56	100.76	98.37	104.58	101.42	2.76
100	98.97	97.47	103.48	100.54	96.46	99.38	2.32

3 结论

本研究采用反相 C_{18} 色谱柱, 以磷酸盐缓冲溶液(pH5.0)-乙腈作为流动相, 样品经乙腈溶液提取, 乙酸锌沉淀蛋白, 得到舒巴坦在原料乳中的保留时间为5.054min。该方法快速可靠, 经大量实验结果验证, 适合原料乳中舒巴坦的检测要求, 填补了国内空白。建立了HPLC-PDA方法检测乳中舒巴坦含量。采用二极管阵列检测器对样品峰进行全波长扫描, 避免其他物质的干扰, 定性更可靠。样品前处理操作简

(上接第63页)

科学、合理, 而且价格更低, 应用更普遍, 容易购买。

参考文献

- [1] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [2] 中 华 人 民 共 和 国 国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局, 中 国 国 家 标 准 化 管 理 委 员 会. GB/T 8314-2002 茶 游 离 氨 基 酸 总 量 测 定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [3] 周国兰, 何萍, 郑文莉. 茚三酮比色法测定茶叶中游离氨基

酸总量方法存在问题的探讨[J]. 化学分析计量, 2009, 18(5): 79-81.

参考文献

- [1] 桑春燕, 闫玥. 舒巴坦钠相关物质高效液相色谱分析[J]. 黑龙江科技信息, 2009, 36(7): 179.
- [2] Zelalem M, Abdel-Maaboud I Mohammed, Adnan, et al. Simultaneous determination of ampicillin sodium and sulbactam sodium in binary mixtures and commercial dosage forms using chemometrics-assisted spectrophotometric techniques[J]. The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 35(3): 110-122.
- [3] Jelínek I, Krejčírová H, Dohnal J, et al. Determination of sulbactam in human serum using capillary isotachopheresis[J]. Cesk Farm, 1990, 39(7): 305-307.
- [4] Foulds G, Gans DJ, Girard D, et al. Assays of sulbactam in the presence of ampicillin[J]. Ther Drug Monit, 1986, 8(2): 223-227.
- [5] 郭启雷, 王浩, 杨红梅, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中舒巴坦和他唑巴坦[J]. 质谱学报, 2010, 30(增刊): 162-164.
- [6] G Fredj, M Paillet, F Aussel, et al. Determination of sulbactam in biological fluids by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1986, 383(1): 218-222.
- [7] R E Bawdon, P O Madsen. High-pressure liquid chromatographic assay of sulbactam in plasma, urine, and tissue[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1986, 30(2): 231-233.
- [8] Haginaka J, Wakai J, Yasuda H, et al. High-performance liquid chromatographic assay of sulbactam using pre-column reaction with 1,2,4-triazole[J]. Journal of Chromatography, 1985, 341(1): 115-122.
- [9] J Haginaka, H Yasuda, T Uno, et al. Sulbactam: alkaline degradation and determination by high-performance liquid chromatography[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1984, 32(7): 2752-2758.
- [10] A Paricio, MA Bello, M Callejon, et al. Simultaneous determination of rifampicin and sulbactam in mouse plasma by high-performance liquid chromatography[J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20(8): 748-752.
- [11] 国家药典委员会 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 937.
- [12] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 785-786.
- [13] 刘敏, 李玉兰, 杨敏, 等. 高效液相色谱法测定舒巴坦钠的有关物质[J]. 中国药师, 2005, 8(6): 467-472.
- [4] 刘晓霞, 周国兰, 何萍, 等. 茶叶游离氨基酸及其总量的国标法测定探讨[J]. 贵州茶叶, 2008, 36(1): 13-17.
- [5] Chen Lin, Chen Qi, Zhang Zhengzhu, et al. A novel colorimetric determination of free amino acids content in tea infusions with 2,4-dinitrofluorobenzene[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2009, 22(2): 137-141.