

方法开发报告： 2013-APP-RLC-038-液相色谱紫外检测器柱

前衍生分析测定茶叶中的茶氨酸 (LC+UV)

检测项目	茶氨酸
样品基体	茶叶
仪器型号	Ultimate 3000 系列: 泵: LPG-3400SD 自动进样器: WPS-3000SL 柱温箱: TCC-3000RS 检测器: DAD - 3000 色谱软件: Chromeleon Chromatography Data System
色谱柱类型尺寸、S/N 号及柱温	Acclaim 120 C18, 150 × 4.6mm 3um , P/N:059133, S/N:002689;; 40℃
检测器类型、工作参数及 S/N 号	DAD, 338nm
流动相组成及流速	流动相 A: 20mM 乙酸铵溶液 流动相 A: 20mM 乙酸铵溶液: 甲醇: 乙腈=1: 2: 2 洗脱条件 1: 等度, 1.0ml/min, A:B=1:1, 参照国标方法, 由于等度洗脱, 分离情况不好, 谱图见附件, 因此改用梯度洗脱方法分析。 洗脱条件 2: 梯度, 1.0ml/min, 0-10min, B 从 0%到 50%, 10-15min, B 保持 50%。
进样体积	自动进样器柱前衍生 (方法见附录), 10uL

1. 简介

茶叶系山茶科植物茶树 (*Camellia sinensis* O. Ktze) 的干燥嫩叶或叶芽, 是一种传统的药食同源的天然保健饮品。茶叶中含有咖啡碱、茶多酚、维生素类、茶氨酸、矿物质和脂多糖等物质。茶氨酸 (L-Theanine) 是茶叶中特有的游离氨

基酸，茶氨酸是谷氨酸 γ -乙基酰胺，有甜味。茶氨酸含量因茶的品种、部位而变动。茶氨酸在化学构造上与脑内活性物质谷酰胺、谷氨酸相似，是茶叶中生津润甜的主要成份。茶氨酸可以明显促进脑中枢多巴胺(dopamine)释放，提高脑内多巴胺生理活性。本方法参照GB/T 23193-2008茶叶中茶氨酸的测定高效液相色谱法，对茶氨酸采用柱前衍生进行分析，基本上完全参照该方法执行。

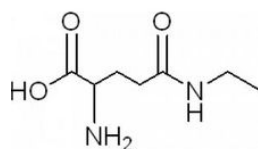


图1 茶氨酸分子结构式

2. 标准品与样品前处理

标准溶液配制：取茶氨酸0.050g，置50ml量瓶中，加水使溶解，摇匀，定容即得。然后，再用水稀释至标准工作溶液，最终浓度为10、20、50、100、200 ug/ml。

样品前处理：称取0.50g 茶叶置于100mL 圆底烧瓶中，加水100mL，在80℃振摇，恒温水浴锅中浸提45min，提取后滤液过滤、离心，上清液过SPE柱净化即得。具体参照GB/T 8303。

样品名称及编号：红茶-HC，龙井-LJ，茉莉花茶-MLH，普洱茶-PE，铁观音-TGY。以上茶叶均为市售品。

3. 衍生试剂及方法

硼酸钠缓冲液（0.4mol/L）：称取2.48g硼酸和1.41g氢氧化钠，用水溶解定容至100mL。

衍生试剂：称取0.1g OPA用10mL甲醇溶解，加0.1mL乙硫醇，用0.4mol/L硼酸钠缓冲液定容至100mL。

衍生方法：先通过自动进样器取2.5uL衍生试剂置于定量环中，再取5.0uL样品溶液，再取2.5uL衍生试剂，来回混匀30次，等待2 min，进样。具体见附录2。

4. 分析结果与谱图

4.1 茶氨酸标准溶液谱图及标准曲线分析结果

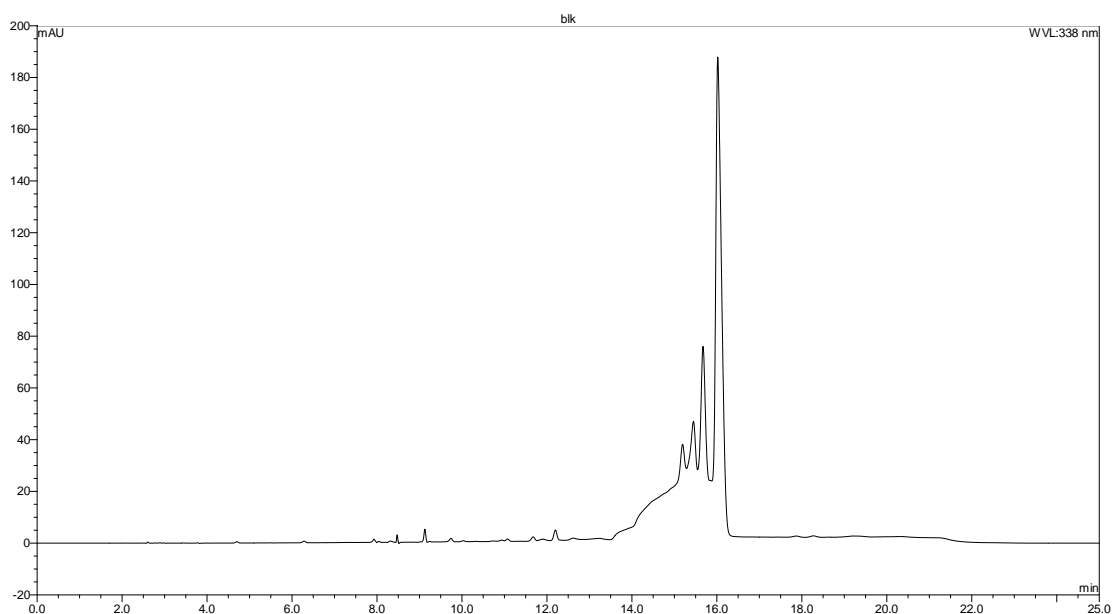


图 2 空白溶液谱图

注明：谱图上的杂质峰均为衍生试剂杂质及剩余的衍生试剂 OPA 的峰。以下所以谱图均为扣去该空白背景谱图。

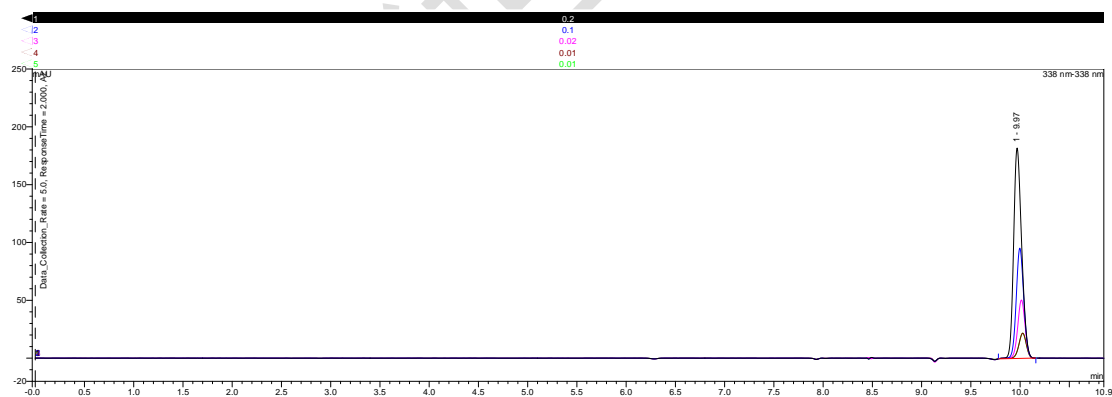


图 3 茶氨酸标准溶液谱图

表 1 茶氨酸标准溶液分析结果

No.	Peak Name	Cal.Type	#Points	Coeff.Det. %	Offset	Slope
1	茶氨酸	LOff	5	99.99	0.5478	0.1418

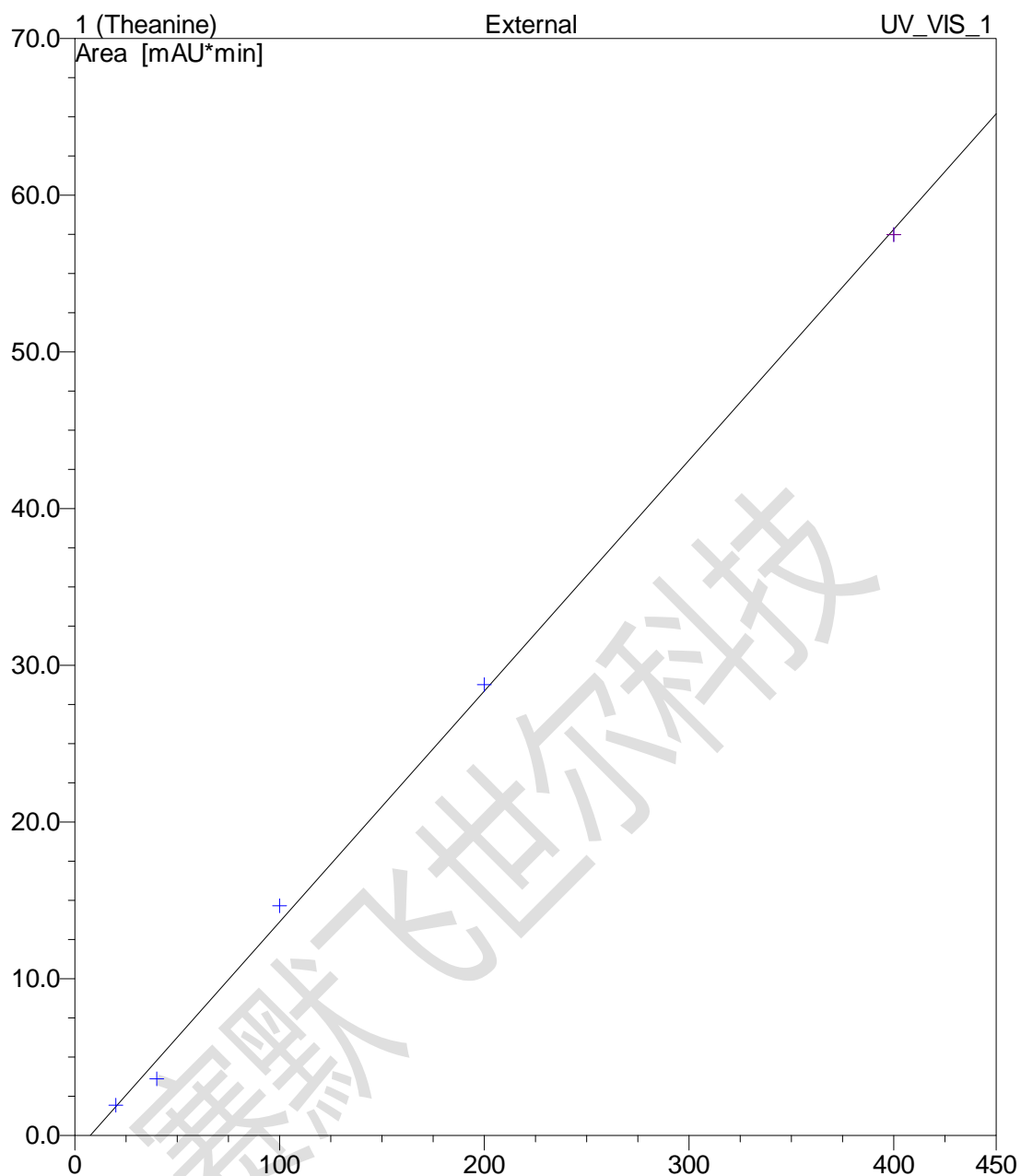


图 4 茶氨酸标准曲线图

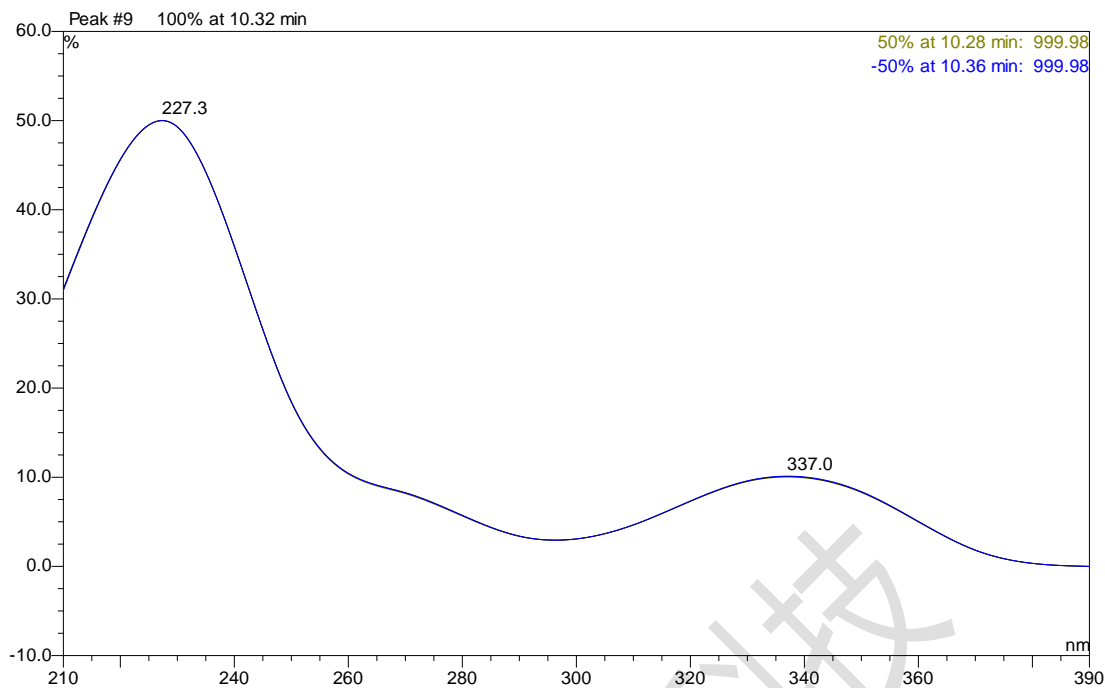


图 5 茶氨酸标准溶液峰纯度图

从以上图表，可以看出茶氨酸的线性回归系数较好，峰纯度较高。

4.2 茶氨酸标准溶液重现性分析结果



图 6 标准溶液重现性分析图（浓度为 100ug/ml, n=6）

表 2 标准溶液重现性分析结果（浓度为 100ug/ml, n=6）

Sample No.	Sample Name	Ret.Time min	Area mAU*min	Height mAU	Amount	Plates(EP)
1	STD	10.043	1.7988	20.5567	9.6004	82770

2	STD	10.037	1.7566	20.3668	9.3031	84363
3	STD	10.043	1.7838	20.4896	9.4949	83446
4	STD	10.037	1.7587	20.3729	9.3182	84018
5	STD	10.027	1.8188	21.3347	9.7412	85592
6	STD	10.027	1.9157	21.6654	10.4238	83169
Average:		10.036	1.8054	20.7977	9.6469	83893
Rel.Std.Dev:		0.08%	3.27%	2.69%	4.31%	1.21%

从以上图表可以看出，对浓度为 100ug/ml 的标准溶液连续进样 6 次，重现较好，峰面积值 RSD<5.0%，保留时间 RSD 值<0.1%。

4.3 样品加标分析结果

对龙井茶进行了加标回收率实验，分别加入高、低两个浓度值，并各测试了三次，计算得回收率及 RSD 值如下表。

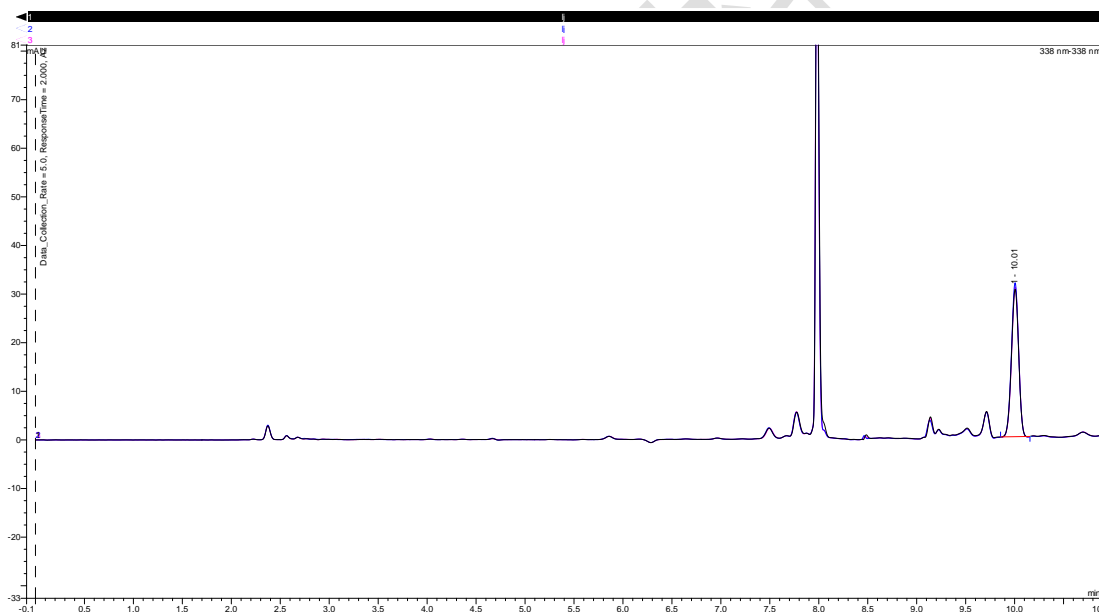


图 7 加标回收样品重现性分析图

表 3 加标溶液回收分析结果

No.	Peakname	Ret.Time min	理论值 μg/mL	实际值 μg/mL	测得值 μg/mL	平均加标 回收 率 %	RSD 值 %
加标 1	Theanine	10.00	5.0	14.8	19.719	98.4	2.5
加标 2	Theanine	10.05	30.0	14.8	50.073	117.6	1.8

4.4 样品分析结果

分别对 4 种不同茶叶样品进行了分析，分析谱图及结果如下：

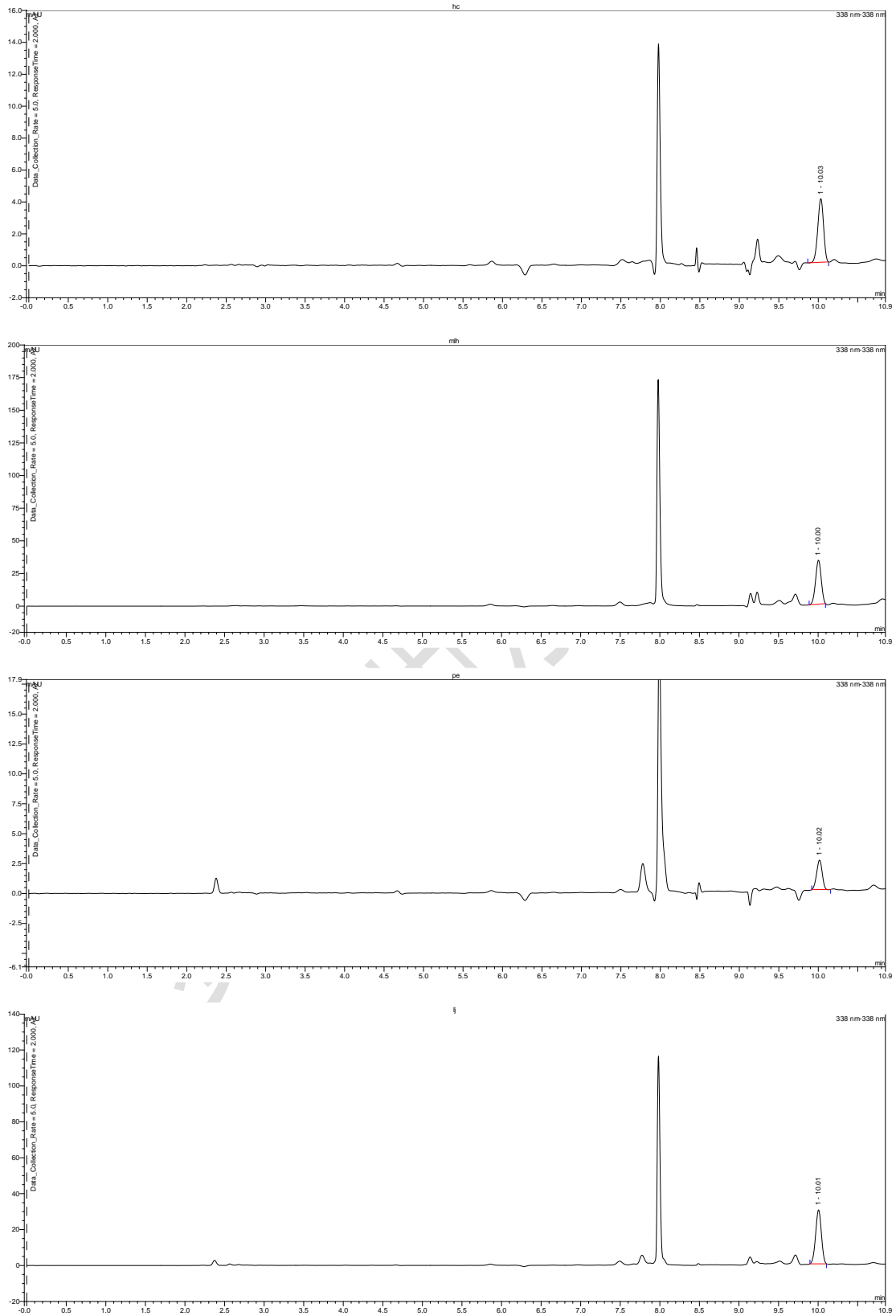


图 5 样品分析谱图

(自上至下，红茶-HC，茉莉花茶-MLH，普洱茶-PE，龙井-LJ)

表 4 样品分析结果

No.	Peakname	Ret.Time min	Area mAU*min	Amount μg/mL
红茶	Theanine	10.03	0.6376	1.614
茉莉花茶	Theanine	10.00	2.7876	16.643
普洱茶	Theanine	10.01	0.3998	0.585
龙井茶	Theanine	10.00	2.5269	14.807

5. 结论

该方法可用于对茶叶中的茶氨酸的测定。

赛默飞世尔科技

附录 1：采用国标等度方法洗脱。

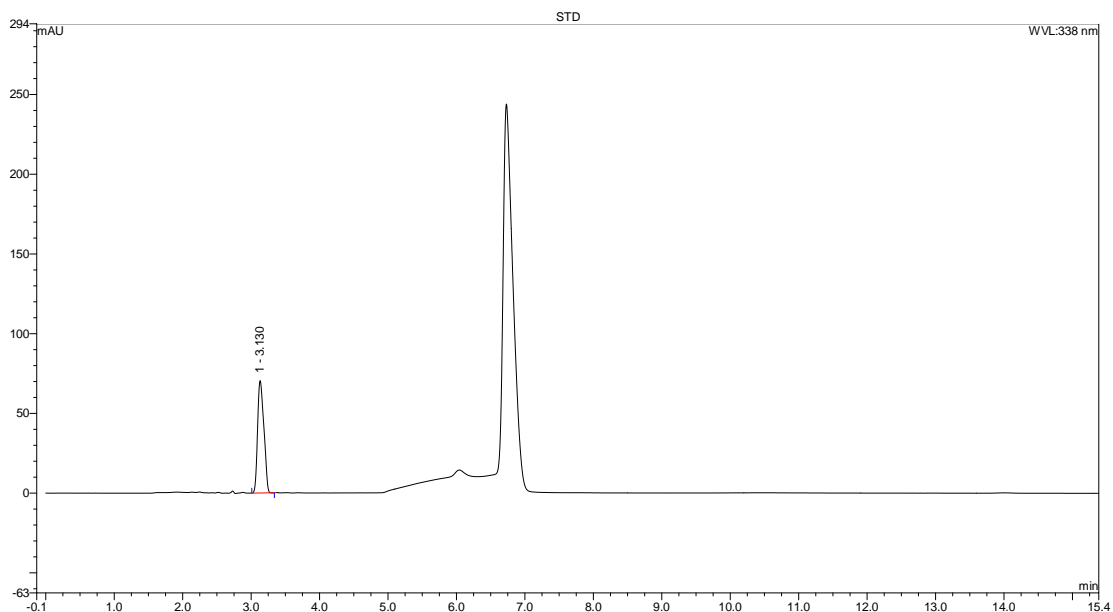


图 标准溶液分析图（茶氨酸保留时间：3.13min）

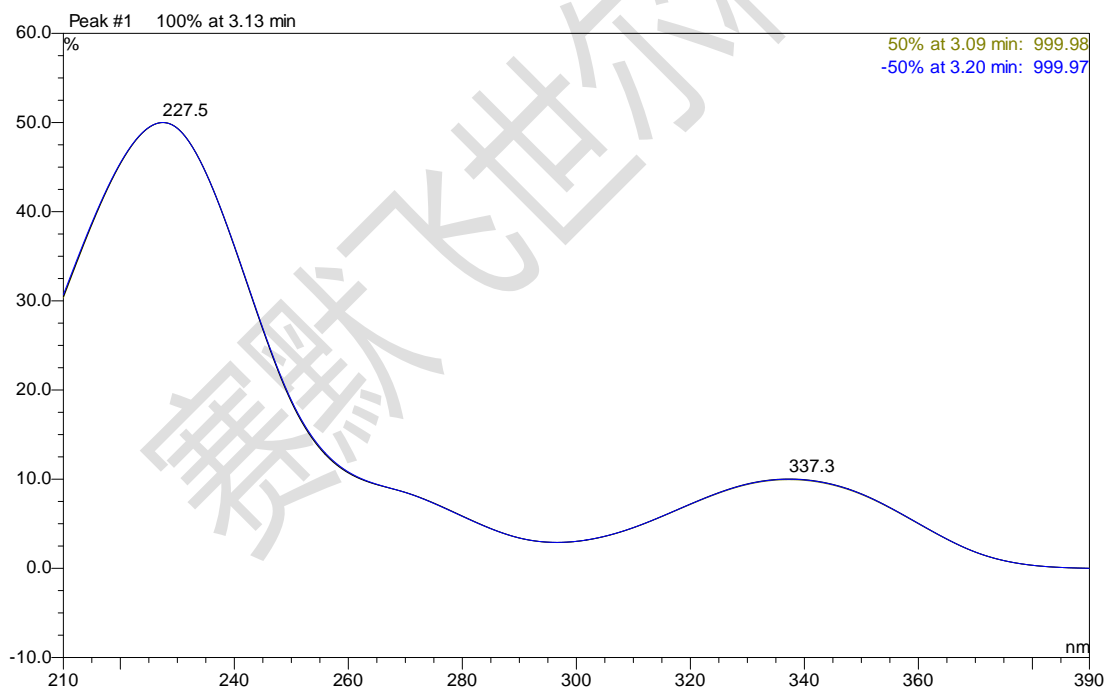


图 茶氨酸标准溶液光谱图

从以上图谱可以看出，采用国标的等度方法，在 AcclaimC18 上保留较弱，因此，采用了梯度分析，保留时间更长，以便与杂质进行完全基线分离。

附录 2: 自动进样器衍生程序。

UdpDrawFrom=ReagentAVial, Volume=2.500, SyringeSpeed=GlobalSpeed,
SampleHeight=GlobalHeight ; 衍生试剂瓶放在 ReagentAVial, 吸取 2.5uL 至定量环中。

UdpMixNeedleWash Volume=10.000 ; 由于针会残留衍生试剂, 所以, 洗针外壁,
约 10uL.

UdpDrawFrom=SampleVial, Volume=5.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed,
SampleHeight=GlobalHeight ; 吸取样品, 5.0uL.

UdpMixNeedleWash Volume=10.000 ; 洗针

UdpDrawFrom=ReagentAVial, Volume=2.500, SyringeSpeed=GlobalSpeed,
SampleHeight=GlobalHeight ; 吸取 ReagentAVial 瓶中的衍生试剂 2.5uL 至定量环中。

UdpDrawFrom=Air, Volume=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed,
SampleHeight=GlobalHeight ; 吸取 10uL 空气。

UdpMoveSyringe Load=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed ; 移动注射器针, 10uL, 起混合作用。

UdpMoveSyringe Unload=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Load=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Unload=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Load=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Unload=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Load=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Unload=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Load=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Unload=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Load=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Unload=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Load=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Unload=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Load=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMoveSyringe Unload=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed

UdpMixWait Duration=120 ; 混合, 等待 120 秒。

UdpDispense To=Waste, Volume=10.000, SyringeSpeed=GlobalSpeed,
SampleHeight=GlobalHeight ; 排出 10.0uL 空气。

UdpInjectValve Position=Inject ; 进样阀切到进样位置。

UdpInjectMarker ; 执行进样命令。

; 注意: 可以在进样后, 增加 washbufferloop 命令, 清洗缓冲环。