

## 茶氨酸检测分析方法研究进展

宁井铭, 史成颖, 陈 琪, 梁 进, 宛晓春, 张正竹  
(安徽农业大学教育部农业部茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036)

**摘 要:** 茶氨酸作为茶叶中的特征氨基酸是构成茶叶滋味的重要组成部分, 其对人体具有多种保健功能, 因此对茶氨酸的检测与分析显得十分重要。本文综述了近年来国内外在茶氨酸检测分析方面的研究进展。

**关键词:** 茶氨酸; 检测; 分析

**中图分类号:** S571.1; Q517

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-352X (2012)06-0930-04

### Research progresses on detection method of theanine

NING Jing-ming, SHI Cheng-ying, CHEN Qi, LIANG Jin, WAN Xiao-chun, ZHANG Zheng-zhu  
(Key Laboratory of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Education & Ministry of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Theanine, a tea characteristic amino acid, is an important taste component in tea, and has several functions in human health care. Therefore, it is very important to the detection and analysis of theanine. This article summarizes the research progress on detection method of theanine at home and abroad in recent years.

**Key words:** theanine; examine; analysis

茶氨酸(Theanine, N-乙基- $\gamma$ -L-谷氨酰胺)属酰胺类化合物, 是从绿茶中分离出的一种茶树特性游离氨基酸, 也是茶树中具有重要生理活性的次生代谢产物<sup>[1-3]</sup>。茶氨酸以其具有保护神经、兴奋拮抗、放松镇静、改善睡眠、降血压血脂、增加免疫、减肥及消除疲劳等功效<sup>[4]</sup>, 逐渐成为近年来国内外学者对茶叶开发利用的研究热点之一。随着茶氨酸在食品、保健品以及医药等领域的广泛应用, 开展茶氨酸检测方法的研究显得尤为重要。目前, 茶氨酸检测分析方法主要有碱式碳酸铜沉淀法、非水滴定法、纸色谱法、分光光度法、薄层色谱法、高效液相色谱法以及毛细管电泳等。本文主要对近年来国内外有关茶氨酸检测分析方法的研究进展做了概要综述, 供进一步研究参考。

### 1 茶氨酸性质

茶氨酸是茶树次生代谢产物, 其分子式为  $C_4H_{14}N_2O_3$ , 分子量为 174.20, 等电点为 5.6。茶叶中的天然茶氨酸大多数是 L-型, 少数 D-型茶氨酸也

在乌龙茶、红茶和绿茶中发现<sup>[5-10]</sup>。茶氨酸纯品为白色针状结晶或结晶性粉末, 熔点  $217\sim 218^\circ\text{C}$ , 比旋光度  $[\alpha] = 7.1$ , 无臭, 易溶于水, 不溶于乙醇、乙醚, 水溶液呈酸性, 略有焦糖的香味和一定的鲜爽味, 能够缓解茶叶的苦涩味, 增加茶汤的香甜味, 以改善茶叶的滋味等作用<sup>[11]</sup>。茶氨酸的阈值为 0.06%, 而其他氨基酸的阈值为 0.15%; 茶氨酸是茶叶中的最主要氨基酸成分, 约占茶叶氨基酸含量的 40%以上<sup>[12-13]</sup>。茶叶中的茶氨酸含量与茶叶品质以及茶叶的等级呈较强的正相关性, 其相关系数可高达  $0.787\sim 0.876$ , 这在很大程度上影响了绿茶的滋味品质, 因此, 茶氨酸也是评价茶叶品质的一个重要因子<sup>[14]</sup>。

近年来, 随着茶氨酸理化性质研究的逐渐深入, 许多国家的科学家已开始关注茶氨酸的生物学作用, 尤其是其在药用价值方面的开发与应用。日本在 1964 年批准茶氨酸为食品添加剂, 茶氨酸生产在日本也已形成产业化。美国在 1985 年也确认茶氨酸为公认的安全物质。目前, 国际上已将茶氨酸公认

收稿日期: 2012-08-30

基金项目: 农业部现代农业产业体系(农科教发[2008]10号)资助。

作者简介: 宁井铭, 男, 博士。E-mail: ningjm@ahau.edu.cn

为安全的物质,美、日等国还将茶氨酸的允许摄入量定为成人每次 200~300 mg,每日 1~2 次均可。如今,茶氨酸作为一种“抗焦虑、镇静与提高大脑工作效率”的天然镇静剂在国外市场上也广受欢迎,美日等国的市场上出现了上百种添加茶氨酸的口服液、饮料等保健产品<sup>[11-12]</sup>。因而,开发能够快速而精确地测定茶氨酸含量的分析方法显得十分重要。自从茶叶中的茶氨酸被发现以来,其检测分析方法也随着现代仪器设备的发展而不断变化。早期的检测主要是采用纸层析法和薄层色谱法,随后出现的氨基酸分析仪测定茶叶中茶氨酸等氨基酸的方法,近些年来,色谱和质谱技术也逐渐被应用于茶氨酸的分析检测。

## 2 茶氨酸的传统检测方法

### 2.1 碱式碳酸铜沉淀法和非水滴定法

碱式碳酸铜沉淀法测定茶氨酸的原理主要是因其能够与碱式碳酸铜反应而生成淡紫色柱状铜盐,以此来检测茶氨酸的含量<sup>[5,9,15]</sup>。而采用非水滴定法分析茶氨酸的含量,主要是以结晶紫为指示剂,通过高氯酸标准溶液滴定法来计算茶氨酸含量<sup>[16]</sup>。还可通过测定样品熔点值来判别其是否为茶氨酸,并确定制品的纯度<sup>[17]</sup>。然而,以上方法仅适用于测定茶氨酸纯品或较纯品,对于成分较为复杂的样品中的茶氨酸含量分析则不适用。

### 2.2 纸色谱和薄层色谱法

纸色谱法是鉴别茶叶中的茶氨酸较为简易的检测方法,主要利用一定的溶剂将滤纸上的样品各组分展开的色谱分离方法。阮宇成等<sup>[18]</sup>采用圆型纸谱水平纸层析法简易定量茶氨酸。随后,邵宛芳等<sup>[19]</sup>在此基础上进行适当简化,将其运用于真假茶鉴别,取得良好的测定效果。近年来,马雪沆等<sup>[20]</sup>采用茚三酮-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,且紫色色斑清晰而均匀,取得较好的分离效果。薄层色谱法主要是将样品点以玻璃板、铝以及塑料等片材为载体的多孔吸附剂薄层上,并利用特定的流动相将样品中的各组分推移到不同距离处,从而达到分离各不同组分的目的。Feldheim 等<sup>[21]</sup>以硅胶铺板,正丁醇、冰醋酸和水为展开剂,利用茚三酮显色法分析鉴定出了 20 个不同质量、不同来源红茶样中的茶氨酸。

### 2.3 分光光度法

分光光度法检测茶氨酸主要是利用其水解产物乙胺的氯代衍生物与碘化钾反应再加入淀粉后,通

过溶液显色反应而用紫外检测其吸光度值,并进行茶氨酸的定量分析。高小红等<sup>[22]</sup>利用分光光度法检测茶叶中茶氨酸含量,结果显示,在一定茶氨酸浓度范围内其浓度与吸光度呈较好的线性关系,该方法能够直接测定茶叶样品中茶氨酸的含量。尽管该方法操作简单,分析结果较为准确,然而,该方法的显色时间较短,仅为 10 min,难以满足多个样品的同时检测。

### 2.4 氨基酸自动分析仪法

氨基酸自动分析仪主要是利用阳离子交换树脂柱分离,柱后茚三酮衍生,紫外分光或荧光检测。由于茶叶中的茶氨酸与其它游离氨基酸同时存在,因此在分离纯化之前采用常规比色法检测样品中的茶氨酸含量一般难以实现,而采用氨基酸自动分析仪可以使茶氨酸的分离与检测同时进行。氨基酸自动分析仪法是直接用离子交换柱对其分离而不必采用氨基酸衍生的方法,避免因衍生造成的检测误差,进而能更好地分析茶叶中的氨基酸组成<sup>[23]</sup>。李布青等<sup>[24]</sup>采用氨基酸分析仪测定茶叶样品中茶氨酸含量,主要是通过增加柱温以及提高缓冲液流速等方法对仪器标准分析方法进行改良,将茶叶中的茶氨酸自行分离并检测。尽管该方法能准确测定茶氨酸含量,具有快速、精确等特点,但是其存在着仪器比较昂贵、试剂消耗较大等缺点,难以大规模推广与应用。

## 3 高效液相色谱法分析检测茶氨酸

高效液相色谱法(HPLC, high-performance liquid chromatography)是近几年发展起来的一种茶氨酸检测新方法。该方法主要是先将氨基酸衍生成具有荧光性的衍生物,再通过检测器来测定氨基酸,而选择有效的衍生试剂是该检测技术的关键所在。郭升平<sup>[25]</sup>建立异硫氰酸苯酯(PITC)作衍生剂、醋酸钠缓冲液与乙腈梯度洗脱、反向 C<sub>18</sub> 柱分离、紫外 243 nm 检测的高效液相色谱法检测茶氨酸,该方法具有快速、灵敏、准确等特点;朱松等<sup>[26]</sup>和 Ying 等<sup>[27]</sup>使用 OPA 柱前自动衍生—紫外检测茶汁中茶氨酸的 HPLC 法,也获得了满意的结果;Thippeswamy 等<sup>[28]</sup>分别使用 2 种衍生剂 OPA 及 PITC 进行柱前衍生结合荧光和二极阵列紫外检测,结果表明两种衍生方法都可精确、快速测定茶氨酸,但 PITC 衍生方法的灵敏度是 OPA 的 500 倍。另外, Peng 等<sup>[29]</sup>报道了一种简单快速的分析多酚化合物、嘌呤碱和茶氨酸的 HPLC 方法,该方法使用酰胺 C<sub>16</sub> 柱和梯度洗脱系统可在 45 min 之内快速分离儿茶素、没食

子酸、咖啡碱、可可碱、生物碱、茶碱及茶氨酸,检测限为  $0.0001\sim 0.072\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ;朱旗等<sup>[30]</sup>采用 AccQ-Tag 衍生方法,经 HPLC 检测分析茶叶的游离氨基酸能够较好地分离包括茶氨酸在内的氨基酸组分且灵敏度高。由于衍生操作相对较为复杂,朱小兰等<sup>[31]</sup>和施倩等<sup>[32]</sup>建立了未衍生化高效液相色谱法(HPLC)测定茶叶中茶氨酸含量的方法,以 0.05% 的三氟乙酸等作为流动相,实验结果精确、灵敏。王汉领等<sup>[33]</sup>采用高效液相色谱蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)快速定量测定白茶、碧螺春、翠竹中 L-茶氨酸的含量,测定结果显示,该方法精密度高、准确度好,稳定性高,能简便、快速、准确地测定茶叶中 L-茶氨酸的含量。丁逸梅等<sup>[34]</sup>利用反向高效液相色谱法同时测定复合氨基酸多维胶囊中 L-茶氨酸和维生素 B 的含量,该测定方法专属性强,重复性好。涂云飞等<sup>[35]</sup>采用邻苯二甲醛(OPA)及 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)为衍生试剂,对茶叶中的茶氨酸和  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)建立了柱前衍生方法,并利用高效液相色谱法对衍生物进行了测定。结果显示,该检测方法经优化的柱前衍生-高效液相色谱体系可用于茶叶中 2 种特征性氨基酸的测定。

#### 4 毛细管电泳法分析检测茶氨酸

毛细管电泳法也是一种高效液相检测分离茶氨酸的新技术。与传统检测方法相比,该分离分析方法的优点是高效、快速、灵敏、低耗等。高效毛细管电泳法(HPCE, high performance capillary electrophoresis)用于茶叶中的氨基酸检测分析近年来发展较为迅速,包括毛细管区域电泳(CZE, capillary zone electrophoresis)和胶束电动毛细管色谱(MEKC, micellar electrokinetic capillary chromatography)。Hoire<sup>[36]</sup>首次将 CZE 方法引入绿茶茶汤中,以 pH8.0 的硼砂为缓冲液,在 200 nm 的波长下,紫外检测同时分析了包括茶氨酸在内的 8 种成分,随后又将该方法进行了改进,于 pH8.4 的硼砂缓冲液中添加  $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的十二烷基硫酸钠(SDS, sodium dodecyl sulfate),并选用二级管阵列检测器代替紫外检测器,以对羟基苯甲酸为内标,在 194 nm 波长处检测,得到更为精确的测定结果。随后, Aucamp 等<sup>[37]</sup>采用 MEKC 方法,以 *p*-硝基苯酚作为内标,使用 57 cm 未涂层的石英毛细管柱,200 nm 检测,可实现在 13 min 内完成茶叶中 5 种儿茶素、茶氨酸、咖啡碱、没食子酸和抗坏血酸 9 种成分的分析。李平等<sup>[38]</sup>采用胶束电动力学毛细管电泳技术定量茶氨酸,以 2, 4-二硝基氟苯为衍生化试

剂,以 D-正白氨酸为内标,360 nm 波长下检测,建立茶氨酸定量方法用于茶氨酸合成酶的活性检测。张峻萍等<sup>[39]</sup>采用胶束电动毛细管电泳技术检测茶氨酸,并对检测条件进行了优化。结果表明,在  $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸盐、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  SDS、6% 甲醇的运行缓冲液(pH8.5)条件下,分离电压为 22 kV,分离温度为  $25^\circ\text{C}$ ,检测波长为 200 nm,茶氨酸可以得到很好的分离。Kvasnička 等<sup>[40]</sup>采用毛细管等速电泳方法分析茶叶和食品添加剂中的茶氨酸,优化的电解液系统为: $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl+ $0.02\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TRIS + 0.05% HEC(leading electrolyte), $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  缬氨酸+氢氧化钡至 pH 10(终止电解质),20 min 内可将茶氨酸与其他化合物分离。与高效液相色谱法相比,毛细管电泳法不需要衍生,无毒试剂,且操作步骤简单,尤其分离测定无荧光特性、紫外吸收弱、易受性质相似氨基酸的干扰的茶氨酸,解决了高效液相色谱法的一些技术难题,也是一种很有发展前景的检测方法。

#### 5 其它方法

2008 年龚雨顺等<sup>[41]</sup>利用离子对色谱法(IPC, ion pair chromatography),通过添加离子对试剂快速检测茶氨酸。王虹等<sup>[42]</sup>采用高效液相色谱-大气压化学电离质谱(HPLC-APCI-MS)联用技术,建立的 HPLC-APCI-MS 方法操作简便、重现性好,灵敏度较紫外检测器有很大的提高,可用于微量茶氨酸的快速测定。此外,还有核磁共振法、GC-MS 阴离子色谱分析结合脉冲电流法阴离子色谱分析结合脉冲电流法<sup>[43]</sup>等分析方法。

#### 6 总结与展望

自从茶树中茶氨酸被发现以来,茶氨酸的检测方法随着现代仪器设备的发展而不断变化。早期的纸层析法和薄层色谱法等,由于其重复性差、灵敏度低等缺点现在已很少使用。随后出现的氨基酸分析仪测定茶叶中茶氨酸等氨基酸的方法可以较为准确的测定茶叶中的一些氨基酸,但茶氨酸、天门冬氨酸等不易分离,且很难同时检测茶氨酸和谷氨酰胺。近些年来,高效液相色谱法、高效毛细管电泳法、离子对色谱法及阴离子色谱分析结合脉冲电流法等逐渐应用于茶氨酸的分析检测。高效液相色谱法和氨基酸分析仪法是目前较为成熟的茶氨酸检测方法,但是也因其仪器价格昂贵、操作过程复杂等缺点而难以广泛推广。随着分析方法的不断进步,将来的茶氨酸检测方法研究也必定会向着操作更简

单、测定快捷灵敏、稳定性好的方向发展。

## 参考文献:

- [1] Casimir J, Jadot J, Renard M. Separation and characterisation of N-ethyl-glutamine in *Xerocomus badius* (*Boletus ladius*) [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1960, 39: 462-468.
- [2] Tsushida T, Doi Y. Caffeine, theanine and catechin content in calluses of tea stem and anther [J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1984, 58(11): 1131-1133.
- [3] Li J, Li P, Liu F. Production of theanine by *Xerocomus badius* (mushroom) using submerged fermentation [J]. *Lwt-Food Sci Technol*, 2008, 41(5): 883-889.
- [4] Sakato Y. The chemical constituents of tea: III. A new amide theanine [J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1949, 23: 262-267.
- [5] Juneja L R, Chu D C, Okubo T, et al. L-Theanine--a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10 (6/7): 199-204.
- [6] Yokogoshi H, Kobayashi M, Mochizuki M, et al. Effect of theanine,  $\gamma$ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats [J]. *Neurochemical research*, 1998, 23(5): 667-673.
- [7] Yamada T, Terashima T, Okubo T, et al. Effects of theanine,  $\gamma$ -glutamylethylamide, on neurotransmitter release and its relationship with glutamic acid neurotransmission [J]. *Nutritional Neuroscience*, 2005, 8(4): 219-226.
- [8] Kimura K, Ozeki M, Juneja L R, et al. L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses [J]. *Biological Psychology*, 2007, 74 (1): 39-45.
- [9] Kakuda T, Matsuura T, Sagesaka Y, et al. Product and method for inhibiting caffeine stimulation with theanine: USA, 5501866[P], 1996-03-26.
- [10] 张莹, 杜晓, 王孝仕. 茶叶中茶氨酸研究进展及利用前景[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(11): 170-174.
- [11] Ekborg-Ott K H, Taylor A, Armstrong D W. Varietal differences in the total and enantiomeric composition of theanine in tea [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(2): 353-363.
- [12] Nakagawa M. Chemical components and taste of green tea [J]. *Jpn Agric Res Q*, 1975, 9(3): 156-160.
- [13] Narukawa M, Morita K, Hayashi Y. L-theanine elicits an umami taste with inosine 5'-monophosphate [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72 (11): 3015-3017.
- [14] 邵淑宏, 王开荣, 林晨, 等. 茶氨酸制备和检测研究进展[J]. *茶叶*, 2009, 35(3): 145-149.
- [15] Guanting L. Exploitable Food Additives (VIII): L-Theanine and its functional activity [J]. *Journal of Cereals & Oils*, 2003, 5.
- [16] 中国农业科学院茶叶研究所. 茶树生理及茶叶生化实验手册[M]. 北京: 农业出版社, 1983.
- [17] 金正林. 茶氨酸提取与合成的研究[D]. 广州: 暨南大学, 1999.
- [18] 李荣森. 茶叶中茶氨酸的研究[J]. *茶叶通讯*, 1992(3): 31-34.
- [19] 阮宇成, 王月根. 茶氨酸的简化定量法[J]. *茶叶通讯*, 1981(3): 41-45.
- [20] 邵宛芳, 袁唯. 假茶化学鉴定的依据及方法[J]. *食品科学*, 1990(4): 43-45.
- [21] 马雪泷, 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.
- [22] Feldheim W, Yongvanit P, Cummings P H. Investigation of the presence and significance of theanine in the tea plant [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1986, 37: 527-534.
- [23] 高小红, 章小林, 袁华. 分光光度法测定茶叶中的茶氨酸[J]. *光谱实验室*, 2005, 22(3): 524-526.
- [24] 倪君, 须海荣. 茶叶氨基酸检测方法的研究进展[J]. *茶叶*, 2007, 33(2): 63-66.
- [25] 李布青, 湖海明. 茶叶中茶氨酸的快速测定[J]. *分析测试通报*, 2005(8): 51-53.
- [26] 郭升平. 高效液相色谱法测定茶叶中茶氨酸的研究[J]. *色谱*, 1996, 14(6): 464-465.
- [27] 朱松. 茶叶茶氨酸的分离纯化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [28] Ying Y, Ho J W, Chen Z Y, et al. Analysis of theanine in tea leaves by HPLC with fluorescence detection [J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2005, 28 (5): 727-737.
- [29] Thippeswamy R, Gouda K G M, Rao D H, et al. Determination of theanine in commercial tea by liquid chromatography with fluorescence and diode array ultraviolet detection [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (19): 7014-7019.
- [30] Peng L, Song X H, Shi X G, et al. An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species [J]. *J Food Compos Anal*, 2008, 21 (7): 559-563.
- [31] 朱旗, 童京汉. HPLC 检测分析速溶绿茶游离氨基酸[J]. *茶叶科学*, 2001, 21(2): 134-136.
- [32] 朱小兰, 陈波, 罗旭彪, 等. 高效液相色谱法测定茶叶中的茶氨酸 [J]. *色谱*, 2003, 21 (4): 400-402.
- [33] 施倩, 陈林, 张正竹, 等. 茶叶中 L-茶氨酸 HPLC-PDAD 分析方法的建立[J]. *安徽农业大学学报*, 2006, 33(3): 347-350.
- [34] 王汉领, 宗素艳, 陆斌, 等. HPLC-ELSD 法快速检测白茶等 3 种茶叶中 L-茶氨酸的含量 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39 (34): 21323-21324.
- [35] 丁逸梅, 陈飞, 周卫, 等. HPLC 法同时测定复合氨基酸多维胶囊中 L-茶氨酸和维生素 B6 的含量量 [J]. *营养学报*, 2012, 34 (1): 82-86.
- [36] 涂云飞, 杨秀芳, 张士康, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定茶叶中茶氨酸及  $\gamma$ -氨基丁酸 [J]. *色谱*, 2012, 30 (2): 184-189.
- [37] Horie H, Mukai T, Kohata K. Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 758 (2): 332-335.
- [38] Aucamp J, Hara Y, Apostolides Z. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 876 (1/2): 235-242.
- [39] 李平, 宛晓春, 李健, 等. 茶氨酸的衍生化及毛细管电泳定量技术[J]. *茶叶科学*, 2004, 24 (2): 119-123.
- [40] 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]. *茶业通报*, 2006, 28(3): 108-110.
- [41] Kvasnicka F, Kratka J. Isotachophoretic determination of theanine [J]. *Cent Eur J Chem*, 2006, 4(2): 216-222.
- [42] 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.
- [43] 王虹, 康海宁, 陈军辉, 等. HPLC-APCI-MS 法测定茶叶中的茶氨酸[J]. *茶叶科学*, 2008, 28(6): 20-26.