

茶叶中 γ -氨基丁酸与 *L*-谷氨酸的 HPLC 分析方法*

邢志强, 李立祥, 邱新平, 蒋其忠, 徐瑞瑞

(安徽农业大学茶叶生物化学与生物技术教育部、农业部重点实验室, 安徽 合肥, 230036)

摘 要 以 2,4-二硝基氟苯为衍生试剂, 以 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液 (pH=6.5, 含 10 mL/L N,N-二甲基甲酰胺) 和体积分数 50% 乙腈为流动相, 建立了茶叶中 γ -氨基丁酸与 *L*-谷氨酸的 HPLC 分析方法。结果表明: γ -氨基丁酸与 *L*-谷氨酸浓度在 0.03~2.0 mmol/L 内, 峰面积与浓度之间有良好的线性关系, 相关系数 R^2 均为 1。各样品 γ -氨基丁酸、*L*-谷氨酸含量 RSD (%) 分别为 0.91%~2.01% 和 0.94%~1.91%, 加标回收率分别为 95.82%~99.33% 和 95.83%~99.88%。

关键词 茶叶, γ -氨基丁酸, *L*-谷氨酸, HPLC, 2,4-二硝基氟苯

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是由 *L*-谷氨酸 (*L*-Glutamic acid, *L*-Glu) 脱羧生成的 1 种非蛋白质天然氨基酸, 它是哺乳动物中枢神经系统中有效的抑制性神经递质^[1], 对人体具有多种生理功能。在厌氧条件下, GABA 能在植物^[2~5]、藻类^[6]和哺乳动物脑组织^[7]中富集。茶叶中氨基酸的定量检测方法有比色法、层析法、气相色谱法、氨基酸自动分析仪法、高效毛细管电泳法等^[8]。这些方法在茶叶中 GABA 和 *L*-Glu 定量上, 存在有不能准确定量、操作繁琐、设备昂贵、分离时间长、试剂消耗较大等不足。

高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 是一种精确的定量方法, 在茶叶分析化学上, 利用其对茶叶中氨基酸进行相关分析研究的方法主要有邻苯二甲酰柱后衍生法^[9]、Waters AccQ·Tag 法^[8]等, 对普通的 17 种氨基酸具有很好的分离定量效果。但这 2 种 HPLC 方法均需要专用的试剂盒, 价格昂贵。林智等^[10]采用 2,4-二硝基氟苯柱前衍生法 (2,4-Dinitro-1-fluorobenzene, DNFB) 对茶叶中 GABA 进行定量, 采用 Waters 氨基酸专用柱及试剂盒, 但也存在价格较高的问题。本试验采用反相 C_{18} 色谱柱, 2,4-二硝基氟苯柱前衍生, 分析茶叶中 GABA 及 *L*-Glu, 并与 Waters AccQ·Tag 法进行了对比, 旨在探讨茶叶中的 GABA 及 *L*-Glu 分析方法。同时, 由于, *L*-茶氨酸 (*L*-Theanine) 是茶叶中游离氨基酸的主体部分, 所占比重特别突出^[11], 在这 2 种方法中, 均对 *L*-Theanine 作了定性, 以期避开 *L*-Thea-

nine 的干扰。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

AB104-N 型电子天平 (Mettler-Toledo Group), KQ-250 DE 型医用数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), NATIONAL NN-S 672SF 微波炉 (上海松下微波炉有限公司), SHZ-III 型循环水真空泵 (上海亚荣生化仪器厂), F2H 型水浴锅 (上海申生科技有限公司), DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司), SHIMADZU-LC-20AD 液相色谱仪、SHIMADZU-SPD-M20A PDA (photo diode array) 检测器 (日本), Waters 600 高效液相色谱仪、Waters 2489 紫外检测器、Waters 2475 荧光检测器 (USA), PL5243 PU. RELAB Classic 超纯水系统 (美国 Pall)。

1.2 实验试剂与材料

1.2.1 试剂

DNFB (>99.0%, 美国 Sigma 公司产品), GABA 标准品 (Sigma Ultra 级别, 美国 Sigma 公司产品), *L*-Glu 标准品 (>99.0%), *L*-Theanine 标准品 (>99.0%), 乙腈、甲醇、乙酸均为色谱纯 (美国 TE-DIA 公司), N,N-二甲基甲酰胺、NaAc、NaHCO₃、Na₂CO₃、NaOH、KH₂PO₄ 均为分析纯, 娃哈哈饮用纯净水 (巢湖娃哈哈饮料有限公司), Waters AccQ·Tag 化学品组件包 (含 Waters AccQ·Fluor 试剂盒、Waters AccQ·Tag 氨基酸分析柱、Waters AccQ·Tag Eluent A 浓液、Waters 17 种氨基酸水解混合标样)。

1.2.2 材料

* 第一作者: 硕士研究生 (李立祥为通讯作者)。

* 安徽省高等学校“十五”优秀人才培养项目资助

收稿日期: 2008-10-13, 改回日期: 2009-01-22

采自安徽农业大学实验茶场舒茶早品种茶鲜叶(一芽二叶)分别制成炒青绿茶以及富含 GABA 的茶。

1.3 实验方法

1.3.1 茶汤的提取

准确称取茶样 0.5 g(精确至 0.000 1)于 50 mL 三角瓶中,加 30 mL 水,于 85℃ 水浴中提取 2 h,冷却后过滤,定容至 50 mL,摇匀,备用。

1.3.2 GABA 标准品、17 种氨基酸混标和 19 种氨基酸混标的配制

分别准确配制 1 mmol/L 的 GABA 标准液和 L-茶氨酸标准液,取 Waters 17 种氨基酸水解混合校正标样(简称 17-STD)400μL,含天冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、赖氨酸(Lys)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)均为 0.1 mmol/L,含胱氨酸(Cys)为 0.05 mmol/L,相当于含半胱氨酸(Cys2)0.1 mmol/L,1 mmol/L 的 GABA 标准液和 1 mmol/L 的 L-Theanine 标准液标准液各 300μL,混合成含 19 种氨基酸的混合标样(简称 19-STD)。

1.3.3 Waters AccQ·Tag 方法

1.3.3.1 AccQ·Tag 衍生化反应原理

Waters AccQ·Fluor 衍生试剂(6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚氨基甲酸酯 6-aminoquinolyI-N-hydroxysuccinimidyl carbamate,即 AQC)是含 N-羧基琥珀酰亚氨基的活性杂环氨基甲酸酯,它是 1 种新型氨基衍生化合物(图 1)。该衍生试剂可将伯氨基酸和仲氨基酸转化为稳定的在 395 nm 发射强荧光的高稳定的脲(图 2),同时在 248 nm 紫外条件下也有最大吸收,其本身可水解生成不干扰测定的 6-氨基喹啉(NHS)。

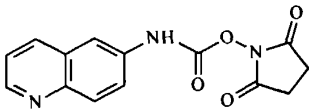


图 1 Waters AccQ·Fluor 衍生试剂

1.3.3.2 衍生化方法

取衍生管 1 支,加入待测样(过 0.45 μm 滤头)10 μL,再加入 70 μL 的 AccQ·Fluor 硼酸盐缓冲液,涡旋混匀后,再加 20 μL 的 AccQ·Fluor 衍生试剂,涡旋 10 s,室温下放置 1 min,石蜡封口膜封口,在

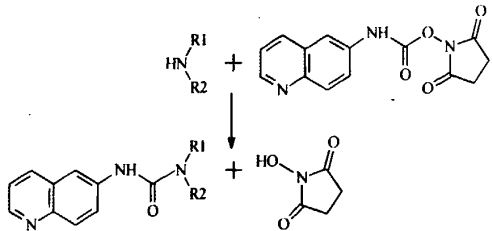


图 2 AccQ·Fluor 衍生反应

55℃ 预热烘箱中加热 10 min,上机检测。

1.3.3.3 标准品 HPLC 分离度实验

取 3 支衍生管,分别加入 GABA,17-STD 及 19-STD 标准品 10 μL,按照 1.3.3.2 方法,分别制得 GABA 衍生液,17-STD 衍生液及 19-STD 衍生液,上机检测。

1.3.3.4 茶汤的检测

制备茶汤过 0.45 μm 滤头后,按照 1.3.3.2 方法衍生制得茶汤衍生液,上机检测。

1.3.3.5 色谱条件

Waters 600 高效液相色谱仪,Waters 2489 紫外检测器,Waters 2475 荧光检测器,Empower 液相色谱工作站;色谱柱:Waters AccQ·Tag 氨基酸分析柱(3.9 mm×150 mm);流动相 A:Waters AccQ·Tag Eluent A 浓液稀释液;流动相 B:乙腈;流动相 C:水;流速:1.0 mL/min;柱温:37℃;进样量:5 μL;紫外检测波长:248 nm;荧光激发波长 250 nm,荧光发射波长 295 nm。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 AccQ·Tag 方法梯度洗脱程序

时间/ min	流速/ mL·min ⁻¹	A/%	B/%	C/%	曲线
0	1	100	0	0	—
17	1	91	5	4	6
24	1	80	17	3	6
32	1	68	20	12	6
34	1	68	20	12	6
35	1	0	60	40	6
37	1	0	60	40	6
38	1	100	0	0	6
45	1	100	0	0	6

1.3.4 DNFB 衍生化方法的研究

1.3.4.1 DNFB 衍生化反应原理

在弱碱性(pH 9.0)条件下,氨基酸中的氨基能定量地与 DNFB 反应生成二硝基苯氨基酸衍生化产物(图 3),在 360nm 处有最大吸收,紫外检测定量。

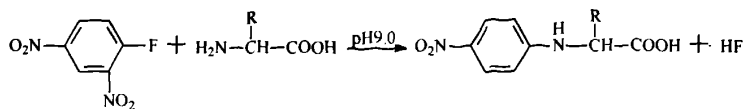


图3 DNFB 衍生反应

1.3.4.2 检测波长的选择

使用 SHIMADZU-SPD-M20A PDA 检测器在 190~400 nm 内,对 GABA 与 *L*-Glu 标准品 DNFB 衍生产物进行扫描,选取两者共同的最大吸收波长作为检测波长。

1.3.4.3 DNFB 乙腈溶液添加量的选择

取 5 只 25 mL 容量瓶,加同一茶汤 2 mL,分别取 0.2、0.5、1、1.5、2 mL 的 10 mL/L DNFB 乙腈溶液,再加 0.5 mol/L pH 9.0 的 NaHCO_3 缓冲液 2 mL,于 60℃ 水浴锅中避光衍生 1 h。冷却后,用 0.01 mol/L pH 7.0 KH_2PO_4 缓冲液定容,摇匀,过 0.45 μm 滤头,上机检测。

1.3.4.4 标准品及茶样分离度实验

取 4 只 25 mL 容量瓶,分别加入 GABA、17-STD、19-STD 标准品及茶汤 2 mL,按照 1.3.4.3 方法衍生、检测。

1.3.4.5 氨基酸衍生化产物稳定性实验

取 2 mmol/L 的 GABA 和 *L*-Glu 混标溶液按照 1.3.4.3 方法进行衍生化反应,于室温(25℃)下避光保存,对其进行连续 7 d 的测定。

1.3.4.6 标准曲线的制作

准确称取 0.294 3 g *L*-Glu、0.206 3 g GABA 溶解定容至 1 L,获得 *L*-Glu、GABA 浓度均为 2 mmol/L 的标准液,再依次稀释 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64,配制成浓度分别为 1.0、0.5、0.25、0.125、0.062 5 和 0.031 25 mmol/L 的 6 种 *L*-Glu、GABA 标准溶液。按照 1.3.4.3 方法定量。

1.3.4.7 方法精密度和回收率实验

对 6 个不同样品的同一份茶汤衍生产物重复进行 6 次测定,进行方法精密度实验。另各取 0.2 mL 茶汤衍生产物,加入等体积的 2 mmol/L *L*-Glu 和 GABA 的混标溶液,做加标回收试验。

1.3.4.8 茶样的测定

按照 1.3.4.3 方法,分别制得 6 个茶样的衍生产物,上机检测。

1.3.4.9 色谱条件

SHIMADZU LC-20AD 液相色谱仪,LCsolution 液相色谱工作站;色谱柱:大连 Elite Hypersil ODS-

C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm i.d.,5 μm);流动相 A:0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH=6.5,含 10 mL/L N,N-二甲基甲酰胺);流动相 B:乙腈-水(体积比 1:1);流速:1.0 mL/min;柱温:28℃;进样量:5 μL ;检测波长:360 nm;柱压:1 100~1 300 psi。梯度洗脱程序见表 2。

表 2 DNFB 柱前衍生方法梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%	曲线
0	100	0	6
6	90	10	6
12	85	15	6
18	80	20	6
33	75	25	6
42	70	30	6
50	50	50	6
55	20	80	6
60	0	100	6
65	0	100	6
70	100	0	6
80	100	0	6

2 结果与分析

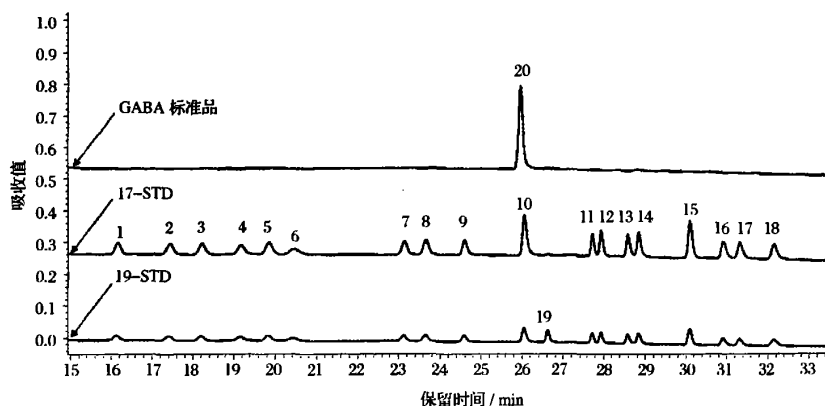
2.1 Waters AccQ·Tag 方法分离谱图

HPLC 运行紫外色谱结果表明(图 4),Pro 保留时间为 26.058 min,而 GABA 的保留时间为 25.958 min。19-STD 色谱图中,在该时间段,只出现 1 个峰,该峰为 GABA+Pro 混合峰,Pro 与 GABA 未能实现分离。

2.2 DNFB 柱前衍生化方法的研究

2.2.1 吸收波长的选择

通过日本 SHIMADZU LC-20AD 液相色谱仪 SPD-M20A 型 PDA 检测器在波长 190~400 nm 内分别对 *L*-Glu 及 GABA 标准品衍生产物扫描。扫描结果表明:GABA(图 5)190~400 nm 有 3 个吸收峰值,分别为 219、264 及 361 nm,在 361 nm 具有最大吸收峰;*L*-Glu(图 6)在 190~400 nm 也有 3 个吸收峰值,分别为 223、263 及 363 nm,在 223 nm 具有最大吸收峰。综合图 5、图 6 可知,在 360 nm 时,*L*-Glu 与 GABA 均具有 1 个良好的吸收峰值,故选择 360 nm 作为检测波长。



1-Asp;2-Ser;3-Glu;4-Gly;5-His;6-NH₂;7-Arg;8-Thr;9-Ala;10-Pro;11-Cys;12-Tyr;13-Val;14-Met;15-Lys;16-Ile;17-Leu;18-Phe;19-L-Theanine;20-GABA

图4 3种标准品衍生液的AccQ·Tag™谱图对比

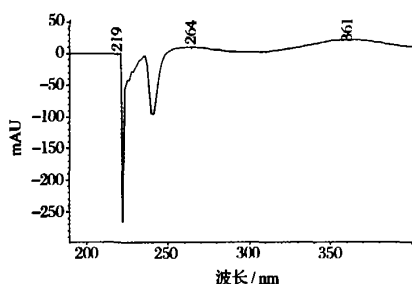


图5 GABA的光谱图

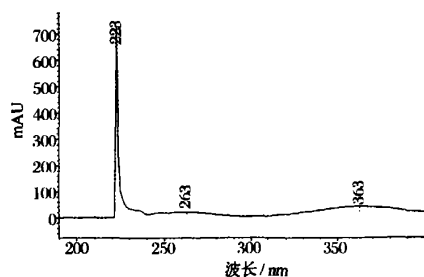


图6 L-Glu的光谱图

2.2.2 DNFB 乙腈溶液添加量的选择

结果表明(图7),衍生试剂添加量为1 mL时,样品中氨基酸已经充分衍生化,随着衍生试剂量的增加,氨基酸的检测量不再增加,而DNFB水解产物的陡增对氨基酸定量有一定的干扰。综合考虑,添加衍生试剂量为1 mL。

2.2.3 标准品和样品 HPLC 分离谱图

HPLC 运行色谱结果表明(图8),GABA 的保留时间为43.986 min,17-STD 中有1种未知氨基酸的保留时间为45.310 min,两者保留时间差距为1.324 min,从19-STD 色谱图中可以看到,两者可以实现基

线分离。同时,茶叶中含量最高的L-Theanine 的保留时间为46.124 min,并未对GABA 的定量形成干扰,而且其本身也能实现基线分离。此外,L-Glu 的保留时间为17.117 min,在茶汤中分离效果良好。

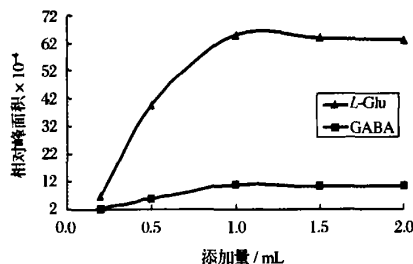


图7 DNFB 乙腈溶液添加量对GABA 和L-Glu 峰面积的变化影响

2.2.4 氨基酸衍生化产物稳定性实验

结果表明(图9),在避光的条件下,氨基酸衍生化产物可室温且稳定保存长达1 w,相对标准偏差(RSD)L-Glu 为0.84%,GABA 为0.86%。

2.2.5 标准曲线的制作

结果表明(图10、图11),进样5 μ L,L-Glu 浓度在0.03~2.0 mmol/L 内,峰面积与浓度之间有良好的线性关系,回归方程为: $y=652\,174x+1\,188$ ($R^2=1$)。GABA 浓度在0.03~2.0 mmol/L 内,峰面积与浓度之间也呈现良好的线性关系,回归方程为: $y=646\,226x+428.54$ ($R^2=1$)。

2.2.6 方法精密度和回收率实验

分析结果表明,各样品间GABA 含量RSD(%)在0.91%~2.01%之间,加标回收率为95.82%~99.33%;各样品间L-Glu 含量RSD(%)在0.94%~

1.91% 之间,加标回收率为 95.83%~99.88%(表 3)。因此,本方法具有良好的稳定性和可靠性。

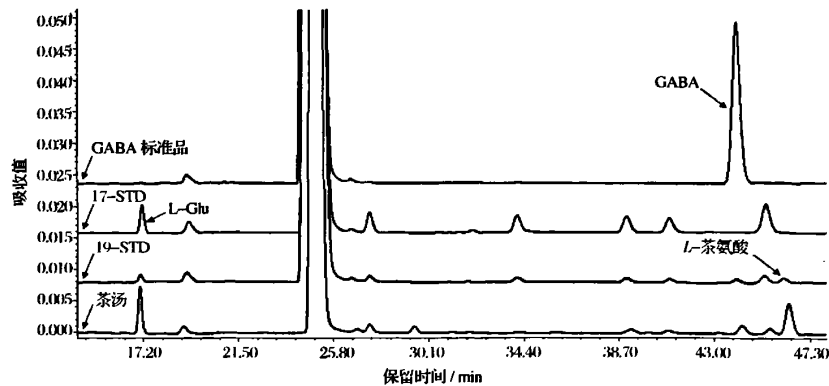


图 8 3 种标准品及茶样衍生液的 HPLC 谱图对比

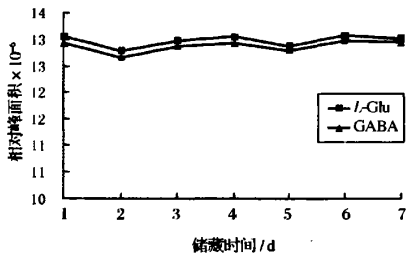


图 9 储藏时间对 GABA 与 Glu 峰面积的影响

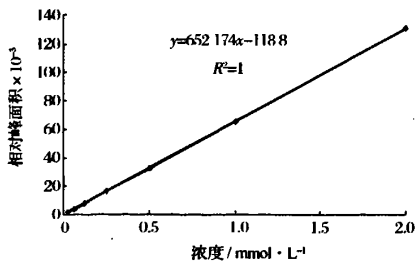


图 10 L-Glu 测定工作曲线

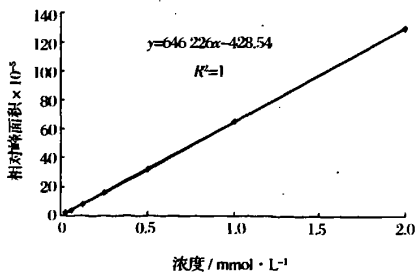


图 11 GABA 测定工作曲线

表 3 精密度与回收率实验结果*

样品	平均值/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		相对标准偏差/%		回收率/%	
	L-Glu	GABA	L-Glu	GABA	L-Glu	GABA
CK	0.104 2	0.005 3	1.91	2.01	99.88	99.33
H1	0.070 5	0.124 3	1.22	1.72	95.83	95.82
H2	0.136 4	0.040 4	1.18	0.91	99.36	99.23
H3	0.070 2	0.074 0	0.94	1.16	98.30	98.24
H4	0.135 5	0.032 1	1.29	1.11	98.65	98.74
H5	0.070 5	0.032 8	1.06	1.72	96.58	96.69

注:CK 为对照普通炒青绿茶;H1 为 3h 水网避光处理(SM)取样;H2 为 3hSM+1h 有蓝光照射处理(YG)取样;H3 为 3hSM+1hYG+3hSM 取样;H4 为 3hSM+1hYG+3hSM+1hYG 取样;H5 为 3hSM+1hYG+3hSM+1hYG+3hSM 取样。

2.3 两种方法对茶样中相关氨基酸定量结果比较

分别采用 1.3.3 和 1.3.4 方法,对 6 个茶样中的 GABA、L-Glu 和 L-Theanine 进行了定量,定量结果(表 4)表明,与 Waters 专属的 AccQ · Tag 方法相比,在 L-Glu 和 L-Theanine 定量上,两者结果相近。而在定量 GABA 上,明显可以看出,采用 AccQ · Tag 方法,Pro 对 GABA 的定量影响很大,达不到对 GABA 定量的目的。

表 4 DNFB 柱前衍生法与 AccQ · Tag 方法茶样定量结果

样品	L-Glu		GABA + Pro		L-Theanine	
	AccQ Tag	DNFB	AccQ Tag	DNFB	AccQ Tag	DNFB
	mg/g					
1	1.67	1.71	2.03	0.78	1.68	1.61
2	1.33	1.22	2.24	0.81	1.78	1.57
3	1.37	1.61	0.35	0.06	1.57	1.68
4	1.34	1.36	0.47	0.08	1.79	1.66
5	1.21	1.33	0.44	0.08	1.69	1.77
6	1.10	1.21	0.49	0.11	1.66	1.76

3 结论

HPLC 是 1 种精确的定量方法,邻苯二甲醛柱后衍生法、Waters AccQ·Tag 法对普通的 17 种氨基酸具有很好的分离定量效果,但均需专用的试剂盒,价格昂贵。笔者尝试用 Waters AccQ·Tag 法进行茶叶中 GABA 定量,发现对普通的 17 种氨基酸水解混合标样具有良好的分离定量效果,但对该混合标样中加入 GABA 后,GABA 与脯氨酸(Proline 简称 Pro)的峰重叠在一起,不能实现分离(图 4)。本研究采用反相 C_{18} 色谱柱,2,4-二硝基氟苯柱前衍生,分析茶叶中的 GABA 及 *L*-Glu,结果呈现,不仅 17 种氨基酸水解混合标样具有良好的分离,且加入 GABA 后也能实现良好的分离效果(图 8)。此外,*L*-茶氨酸是茶叶中游离氨基酸的主体部分,本方法可以实现对其的良好分离,对其他氨基酸的定量影响较小。从图 10、图 11、表 3、表 4 可知,采用 DNFB-HPLC 法进行 GABA 与 *L*-Glu 定量灵敏度高,精确性和重现性好。

参 考 文 献

- 1 Nathan B, Bao J, Hsu CC, et al. A membrane form of brain *L*-glutamate decarboxylase; identification, isolation, and its relation to insulin-dependent mellitus[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1994, 91: 242~246
- 2 Effect WR, Ranson SL. Respiratory Metabolism in Buckwheat Seedlings[J]. *Plant Physiology*, 1967, 42: 1 042~

1 052

- 3 Gene Guinn, Brinkerhoff LA. Effect of root aeration on amino acid levels in cotton plants[J]. *Crop Science*, 1970, 10: 175~178
- 4 John F Thompson, Cecil R Stewart, Clayton J Morris. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation I. the effect of water content of leaves and atmospheric oxygen level[J]. *Plant Physiol*, 1966, 41: 1 578~1 584
- 5 John G Streeter, John F. Thompson anaerobic accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus* L.)[J]. *Plant Physiol*, 1972, 49: 572~578
- 6 Lane TR, Mary Stiller. Glutamic acid decarboxylation in chlorella[J]. *Plant Physiol*, 1970, 45: 558~562
- 7 Wood JD, Watson WJ. The effect of hyperoxia and hypoxia on free and bound γ -aminobutyric acid in mammalian brain[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 1969, 47(10): 994~997
- 8 朱旗,施兆鹏. HPLC 检测分析速溶绿茶游离氨基酸[J]. *茶叶科学*, 2001, 21(2): 134~136
- 9 黄亚辉,郑红发. Gabaron 茶加工过程中 γ -氨基丁酸和谷氨酸的动态变化研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(8): 117~120
- 10 林智,林钟鸣,尹军峰,等. 厌氧处理对茶叶-氨基丁酸含量及其品质的影响[J]. *食品科学*, 2004, 25(2): 35~39
- 11 宛晓春. 茶叶生物化学(第 3 版)[M]. 北京:中国农业出版社,2003. 32~35

Determination of γ -aminobutyric Acid and *L*-glutamic Acid in Tea by HPLC

Xing Zhiqiang, Li Lixiang, Qiu Xinping, Jiang Qizhong, Xu Ruirui

(Key Lab of Tea Biochemistry & Biotechnology, Ministry of Education and Ministry of Agriculture, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

ABSTRACT A method for determination of γ -aminobutyric acid and *L*-Glutamic acid in tea by using HPLC was developed. In this method, 2,4-dinitro-1-fluorobenzene was taken as derivative while 0.05 mol/L sodium acetate buffer solution(pH=6.5, with 10 mL/L *N,N*-dimethylformamide) and 50% acetonitrile solution(V/V) was used as the mobile phase. Results showed that the peak area of γ -aminobutyric acid and *L*-Glutamic acid had a good linear relationship with their concentrations range from 0.03 mmol/L to 2.0 mmol/L and the correlation coefficients were both 1. The RSD(%) of γ -aminobutyric acid and *L*-Glutamic acid in each sample were 0.91% to 2.01% and 0.94% to 1.91%; and the recoveries were 95.82% to 99.33% and 95.83% to 99.88%, respectively.

Key words tea, γ -aminobutyric acid, *L*-Glutamic acid, HPLC, 2,4-dinitro-1-fluorobenzene