

# 大叶种茶叶中游离氨基酸的提取条件研究

陈春月<sup>1</sup>, 钊相龙<sup>1</sup>, 曹喜念<sup>1</sup>, 陈圆圆<sup>2</sup>, 肖涵<sup>1\*</sup>

(1. 昆明学院 化学科学与技术系, 云南 昆明 650214;

2. 云南商测质量检验技术服务有限公司, 云南 昆明 650117)

**摘要:** 茶汤游离氨基酸分布特征与茶叶风味、品质口感呈正相关。研究采用氨基酸分析仪作为测定仪器, 选取有代表性的滇产大叶种茶叶, 对其游离氨基酸的水浸提条件进行初步的方法学研究。结果表明, 大叶种茶中游离氨基酸最佳提取方案为: 茶叶粉碎至 100 目, 取 5.000 g 茶叶样品用 45.0 mL 沸水冲泡 5 min, 第 2 次冲泡液稀释过滤后直接检测。此外, 发酵茶稀释倍数相应减少。在该条件下, 茶汤游离氨基酸组分出峰时间稳定, 峰型良好, 适用于定量分析。

**关键词:** 大叶种茶; 游离氨基酸; 提取条件; 氨基酸分析仪

中图分类号: TS272.7 文献标识码: A 文章编号: 1674-5639 (2018) 06-0038-05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2018.06.008

## Study on Extraction Conditions of Free Amino Acids from Large-leaf Tea

CHEN Chunyue<sup>1</sup>, CHUAN Xianglong<sup>1</sup>, CAO Xinian<sup>1</sup>, CHEN Yuanyuan<sup>2</sup>, XIAO Han<sup>1\*</sup>

(1. Department of Chemical Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;

2. Yunnan Shangce Quality Inspection Technology Service Co., Ltd, Kunming, Yunnan, China 650117)

**Abstract:** There is a positive correlation between the free amino acid distribution characters of tea soup and the flavor and quality of tea. The amino acid analyzer was used as the measurement. The representative tea samples of the large-leaf tea from Kunming areas were collected and their water extraction conditions for free amino acids were studied. The results showed that the best extracting method of free amino acids in large-leaf tea was as follows: tea was crushed through 100 screen mesh. 5.000 g tea sample was brewed with 45.0 mL boiling water for 5 minutes; the second infusion solution was filtrated, and then directly tested after dilution, but the dilution times of the fermentation decreased accordingly. Under this condition, every component in the tea soup showed stable retention time with good resolution and peak shape, which was suitable for quantitative analysis.

**Key words:** large-leaf tea; free amino acids; extraction conditions; amino acid analyzer

茶是山茶属 (*Camellia sinensis* L.) 茶树的新梢芽叶经不同特殊工艺<sup>[1]</sup>加工而制作的冲泡型饮品。云南省是茶叶的原产地, 产茶区水热条件良好, 土壤 pH 偏酸性, 富含多种矿物质及有机质, 特别适合茶树生长。云南茶园主产大叶种茶, 其成品叶展大、芽头粗壮、香高味浓、口感鲜爽, 具有显著的风味特征<sup>[2-3]</sup>。

茶叶中富含多种物质, 主要以冲泡的方式进入茶汤, 呈现其风味。其中游离氨基酸总量 (Total Free amino acids, TFAA)、茶多酚、咖啡碱等生化成分<sup>[4]</sup>是茶汤风味和功效的主要贡献因子<sup>[5]</sup>。目前, 茶汤中已分离鉴定出 26 种游离氨基酸 (Free amino acids, FAA), 包括: 天冬氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、茶氨酸、甘氨酸

收稿日期: 2018-05-03

基金项目: 昆明学院应用型人才培养改革创新资助项目“化学化工类大学生创新实践基地建设”。

作者简介: 陈春月 (1995—), 女, 云南昆明人, 本科生, 主要从事食品与药品检验研究。

\*通讯作者: 肖涵 (1981—), 女, 云南大理人, 副教授, 博士, 主要从事环境分析和食品分析研究, E-mail: blackcrossing630@vip.sina.com.

酸、丙氨酸、 $\alpha$ -氨基丁酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、酪氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、苯丙氨酸、 $\beta$ -氨基异丁酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、赖氨酸、色氨酸、组氨酸、精氨酸、半胱氨酸、缬氨酸等<sup>[6-7]</sup>。其中游离氨基酸含量约占茶叶干质量的2%~5%，而代表性氨基酸-茶氨酸占干物质的1%~2%<sup>[8]</sup>。茶叶中氨基酸含量与感官品质正相关<sup>[9]</sup>。游离氨基酸不仅是茶叶中有效氨基酸摄入的主要来源，还可抑制由咖啡碱引起的人体过度兴奋，促进多巴胺的释放，使饮茶者心情愉悦、情绪稳定，也是茶汤鲜爽口感、独特香气的主要贡献因子<sup>[10]</sup>，更是茶叶重要的质控指标<sup>[11]</sup>。

目前茶叶 FAA 的提取一般采用 3 g 左右的茶样，更换萃取剂，改变冲泡时间和次数进行前处理；其后采用平面色谱法<sup>[12]</sup>、比色法<sup>[11-14]</sup>、近红外光谱法<sup>[15]</sup>测定其 TFAA。或衍生化法处理目标样品，并采用氨基酸分析仪<sup>[16]</sup>配合柱后衍生、柱前衍生配合高效液相色谱法<sup>[3]</sup>或毛细管电泳法<sup>[17]</sup>对氨基酸各组分进行分离，光谱特征吸收波长采取定性，峰面积进行定量。

水浸提法能模拟泡茶过程，操作简单，成本低，应用范围广，但是浸提液能否充分提取茶汤中 FAA，对研究茶叶氨基酸分布特征，判定其品质格外重要。实验拟以氨基酸分析仪作为分析手段，对不同浸提条件下的典型云南大叶种茶样中 FAA 的提取情况进行探索，从而探讨不同提取方法对茶种氨基酸的可能影响，以确定适宜的水浸提法提取方案，结果可为茶产业研究提供参考，亦能为进一步研究滇产茶叶风味特征奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

茶氨酸 (99.9%)，BR 级，100 mg/瓶 (上海融禾医药科技有限公司)；游离氨基酸混合标样 (100 mmol/L，塞卡姆 (北京) 科学仪器有限公司)。

以市场采购的方式收集云南各茶区茶叶，并参考课题组前期 TFAA 测定结果<sup>[13-14]</sup>，自绿茶、普洱熟茶中选择 TFAA 较高和较低的 10 个组分进行分析。茶样粉碎过 100 目筛后封袋编号。分类为：绿茶 G、红茶 B、普洱生茶 PE、普洱熟茶 PU。真空包装后避光冷藏。其详细信息见表 1。

表 1 茶样详细信息

茶叶种类	采样号	序号	芽叶数
绿茶	B-LAC-G-6	G1	一叶、杆
	A-XM-G-1	G2	一芽二叶~三叶
	B-YD-G-1	G3	一芽两叶
	B-LH-G-1	G4	一芽两叶
	B-LC-G-2	G5	一芽两叶
	B-BN-G-3	G6	一芽一叶
	B-LC-G-4	G7	一芽两叶
	B-YY-G-1	G8	一芽一叶
普洱	C-DL-PU-2	PU1	一芽两叶
熟茶	B-LH-PU-2	PU2	一芽两叶

### 1.2 试剂

实验所需提取剂、缓冲溶液及显色剂均按赛卡姆公司标准配置和使用。所涉及到的试剂见表 2。

表 2 实验试剂简况

试剂	级别	规格	厂家
苯酚	98%	500 g/瓶	广东光华
茚三酮	光学纯	20 g/瓶	德国塞卡姆
还原剂		1 mL/支	德国塞卡姆
甲醇	色谱纯	4 L/瓶	德国 Merck
硼酸	AR	500 g/瓶	广东光华
氯化锂	AR	500 g/瓶	广东光华
一水合氢氧化锂	AR	500 g/瓶	广东光华
一水合柠檬酸钠	AR	500 g/瓶	广东光华
乙酸钾	AR	500 g/瓶	国药
三水合乙酸钠	AR	500 g/瓶	国药
盐酸	AR	500 mL/瓶	成都科龙
无水乙醇	AR	500 mL/瓶	天津风船
冰乙酸	AR	500 mL/瓶	天津风船
5-磺基水杨酸	AR		广东光华
EDTA	优级纯	500 g/瓶	东京化成
茶氨酸	BR	100 mg/瓶	上海融禾
氨基酸标样 (100 mmol/L)		2 mL	德国赛卡姆
水	超纯水		

### 1.3 仪器及条件

全自动氨基酸分析仪：S-433D 德国塞卡姆公司；色谱柱：LCA K07/Li；流动相：柠檬酸锂 A = pH2.90；B = pH4.20；C ≈ pH8.00；采用自动梯度

洗脱(程序从略);流速:洗脱泵 0.45 mL/min + 衍生泵 0.25 mL/min;检测器: DAD, 570 nm + 440 nm;柱温: 38 ~ 74°C 梯度升温(从略). 酸度计: 梅特勒-托利多集团(瑞士);电子天平: 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司.

#### 1.4 样品制备

##### 1.4.1 标准溶液的配制

1) 茶氨酸标准溶液: 称取 0.087 g 茶氨酸, 样品稀释液定容至 5 mL, 临测时取其中 0.5 mL 稀释 1 000 倍, 即为 100 nmol/L 茶氨酸标液. 样品制备后 4°C 保存, 3 d 内使用.

2) 系统混标: 量取 0.5 mL 上述茶氨酸溶液加入 0.5 mL 002 号溶液, 用样品稀释液稀释至 5 mL 备用.

3) 茶氨酸混标: 准确量取 200  $\mu$ L 002 号溶液 + 1 800  $\mu$ L 样品稀释液混匀, 临用现配.

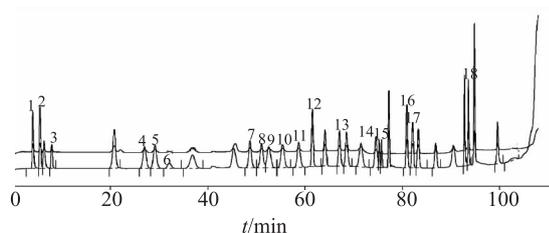
##### 1.4.2 茶样制备

称取 5 g 精确至 0.001 g 已研磨好的茶叶样品(约 100 目)放入 50 mL 具塞比色管中, 准确加入 45 mL 沸水, 冲泡 3 次, 每次 5 min, 过滤. 然后取 2.0 mL 滤液, 加入样品稀释液定比稀释, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后备用. 样品制备后 12 h 内完成分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 标样分离情况

茶氨酸为茶汤氨基酸主体成分, 其质量分数约占 FAA 总量 50% 左右. 但茶氨酸较易变质, 常规系统混标中无此成分. 为合理配制茶氨酸混标, 对混标各调整样品的出峰顺序、分离度、响应面积进行观察, 确定其添加最适比例. 图 1 ~ 图 3 为系统混标、茶氨酸单标及自配混标谱图.



1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.尿素; 4.苏氨酸; 5.丝氨酸; 6.天冬酰胺; 7.甘氨酸; 8.丙氨酸; 9.瓜氨酸; 10.  $\alpha$ -氨基丁酸; 11. 缬氨酸; 12. 胱氨酸; 13. 亮氨酸; 14.  $\beta$ -丙氨酸; 15.  $\beta$ -氨基异丁酸; 16. 组氨酸; 17. 1-甲基组氨酸; 18. 精氨酸.

图1 系统混标谱图

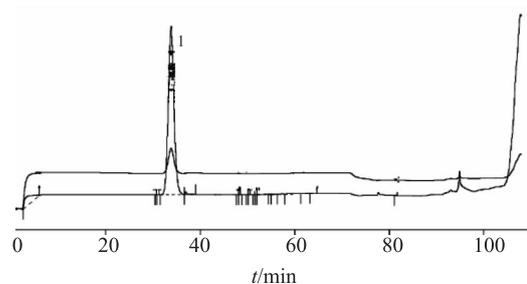
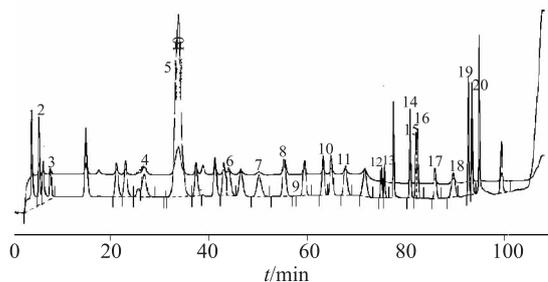


图2 茶氨酸单标谱图



1.磷酸丝氨酸; 2.磷乙醇胺; 3.尿素; 4.苏氨酸; 5.茶氨酸; 6.  $\alpha$ -氨基己二酸; 7.丙氨酸; 8.  $\alpha$ -氨基丁酸; 9.缬氨酸; 10. 蛋氨酸; 11.亮氨酸; 12.  $\beta$ -丙氨酸; 13.  $\beta$ -氨基异丁酸; 14.组氨酸; 15. 3-甲基组氨酸; 16. 1-甲基组氨酸; 17. 肌肽; 18. 色氨酸; 19. 鸟氨酸; 20. 赖氨酸.

图3 茶氨酸混标谱图

对比图 1 ~ 图 3 可知, 使用前期优化的分离条件, 得到的系统混标基线平稳, 所有峰达到完全分离, 仪器条件稳定良好. 茶氨酸单标略有杂质(37 min 左右), 但其保留时间与系统混标各组分未见重叠, 不影响定量结果. 加入茶氨酸后的混标溶液, 基线平稳, 噪音较低, 所有峰均可分离, 满足定量要求.

### 2.2 不同提取方式对茶叶中游离氨基酸含量的影响

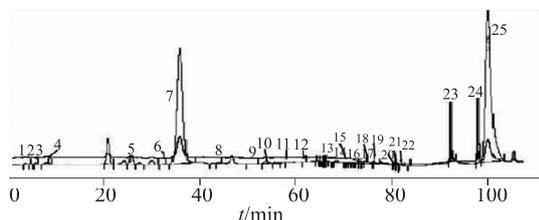
根据课题组前期研究结果<sup>[13-14]</sup>, 选择前期实验中, 总游离氨基酸含量最高的绿茶样品(编号 B-LAC-G-6)为研究对象, 采用两种提取方式(下述 A 和 B)提取 FAA 后, 进行进样分析.

#### 2.2.1 A 法

称取 5.000 g 样品于比色管中, 加入适量水至匀浆, 加入沸水 45 mL, 在沸水浴中提取 45 min, 浸提完毕后立即趁热减压过滤, 残渣用少量沸水洗涤 2 ~ 3 次, 滤液定容至 50 mL, 吸取 2.0 mL 滤液于比色管中加入 0.4 mL 4% 碘基水杨酸溶液, 摇匀, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜, 滤液进氨基酸分析仪分析(见图 4).

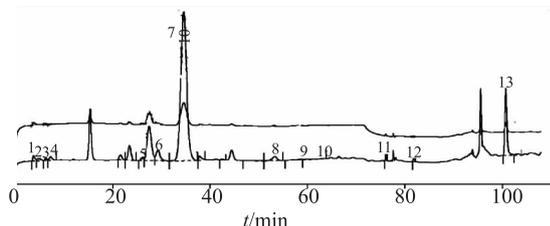
2.2.2 B法

称取5 g精确至0.1 mg已研磨好的茶叶样品(约100目)放入50 mL具塞比色管中,准确加入45 mL沸水,冲泡5 min,取首次冲泡液过滤,取2.0 mL滤液,加入一定量的样品稀释液稀释,0.45 μm微孔滤膜过滤,滤液直接进样测定(见图5).



1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.苏氨酸; 6.天冬酰胺; 7.茶氨酸; 8.α-氨基己二胺; 9.丙氨酸; 10.α-氨基丁酸; 11.缬氨酸; 12.胱氨酸; 13.异亮氨酸; 14.亮氨酸; 15.酪氨酸; 16.苯丙氨酸; 17.β-丙氨酸; 18.β-氨基异丁酸; 19.γ-氨基丁酸; 20.组氨酸; 21.3-甲基组氨酸; 22.1-甲基组氨酸; 23.鸟氨酸; 24.氨; 25.精氨酸.

图4 A法提取FAA分析结果



1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.苏氨酸; 6.丝氨酸; 7.茶氨酸; 8.瓜氨酸; 9.缬氨酸; 10.蛋氨酸; 11.1-甲基组氨酸; 12.3-甲基组氨酸; 13.精氨酸.

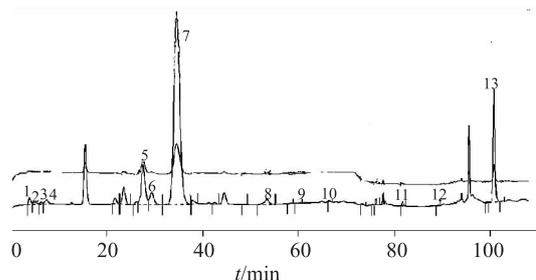
图5 B法提取FAA分析结果

对比图4和图5可知,两图基线都比较平稳,说明仪器和试剂工作状态良好.图4中的鬼峰、噪音较图5显著增加,说明其提取过程中杂质较多,这可能是由于长时间高温提取下,部分含氨基化合物也进入提取液,而原有提取液中不稳定氨基酸发生了变质导致的.图5较图4峰型和分离度明显提高,特别是在后期精氨酸的显著拖尾得到了改善,有利于准确定量.

综合考虑各种因素,由于B法提取成本低,更能模拟日常冲泡过程,因此选择法B作为浸提方法.

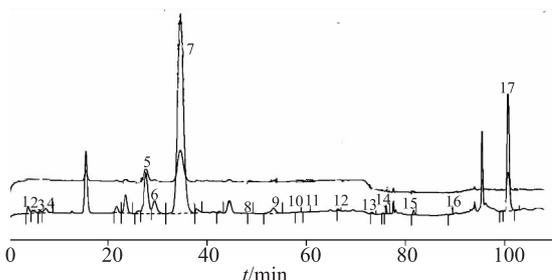
2.3 茶样不同提取次数FAA分离情况

采用B法条件,对TFAA最高的绿茶(B-LAC-G-6),最低的普洱熟茶(C-DL-PU-2)进行提取分离,每茶样提取3次,其结果见图6~图11.



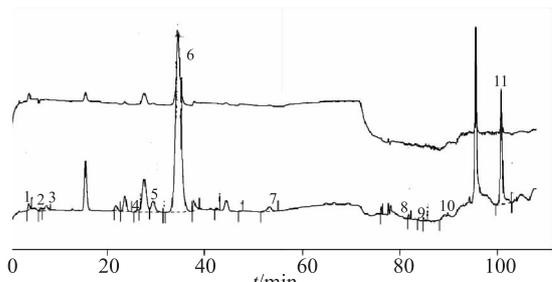
1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.苏氨酸; 6.丝氨酸; 7.茶氨酸; 8.瓜氨酸; 9.缬氨酸; 10.蛋氨酸; 11.1-甲基组氨酸; 12.3-甲基组氨酸; 13.精氨酸.

图6 样品B-LAC-G-6第1次提取FAA谱图



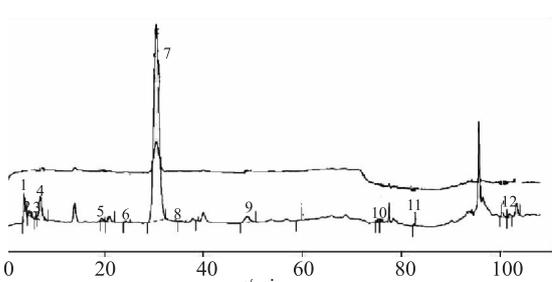
1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.苏氨酸; 6.丝氨酸; 7.茶氨酸; 8.甘氨酸; 9.瓜氨酸; 10.结氨酸; 11.胱氨酸; 12.异亮氨酸; 13.苯丙氨酸; 14.β-氨基丁酸; 15.3-甲基组氨酸; 16.色氨酸; 17.精氨酸.

图7 样品B-LAC-G-6第2次提取FAA谱图



1.磷酸丝氨酸; 2.磷乙醇胺; 3.尿素; 4.苏氨酸; 5.丝氨酸; 6.茶氨酸; 7.瓜氨酸; 8.3-甲基组氨酸; 9.肌肽; 10.色氨酸; 11.精氨酸.

图8 样品B-LAC-G-6第3次提取FAA谱图



1.磷酸丝氨酸; 2.牛磺酸; 3.磷乙醇胺; 4.尿素; 5.天冬氨酸; 6.苏氨酸; 7.茶氨酸; 8.谷氨酸; 9.甘氨酸; 10.β-氨基异丁酸; 11.1-甲基组氨酸; 12.精氨酸.

图9 C-DL-PU-2第1次提取FAA谱图

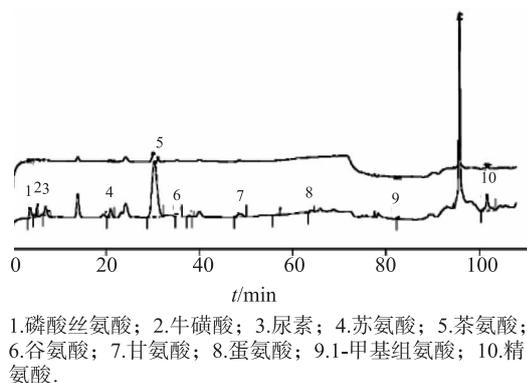


图10 C-DL-PU-2第2次提取FAA谱图

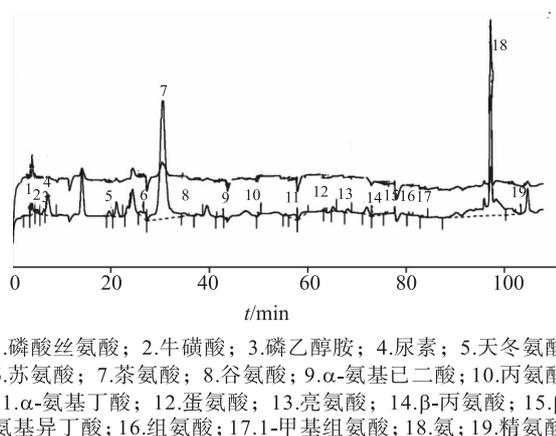


图11 C-DL-PU-2第3次提取FAA谱图

从以上谱图比较可以看出,同一品种茶叶冲泡过程中,首次冲泡和第2次冲泡,氨基酸响应信号大致相当;第2次冲泡过程较第1次出现更多微量氨基酸,各微量氨基酸含量亦有一定程度增加;第3次冲泡茶汤中各氨基酸含量显著减少;首次和第2次冲泡图谱出峰最多,峰面积响应较高,信噪比低,各峰之间分离度较好.由此可知,首次、第2次冲泡均能完整体现未知样品的氨基酸含量特征,但第2次冲泡信息含量更为丰富.

样品 FAA 均以茶氨酸为主流氨基酸.而绿茶与普洱熟茶相比,FAA 无论从种类还是含量均显著增高,这与茶叶风味品评中绿茶鲜爽而普洱熟茶温和的结论吻合,也与已有文献 [18-19] 测定结果相符.其原因是普洱熟茶在发酵后期堆渥过程<sup>[20]</sup>引入多重酶和细菌作用,氨基酸大量代谢导致的.

综上所述,在后续研究工作中,宜以首次浸提液为茶样 FAA 代表.此外,对于发酵茶(红茶、

普洱熟茶)等 FAA 含量较低的茶种,可适当减少稀释倍数,以保证响应信号定量的准确性.

### 3 结论

1) 通过对大叶种茶中游离氨基酸最佳提取方案进行研究,优选的方案为:茶叶粉碎过 100 目筛,5.000 g 茶叶样品使用 45.0 mL 沸水冲泡 5 min,取第 2 次冲泡液直接稀释过滤后进样检测.

2) 发酵茶种受生产工艺影响,FAA 含量急剧减少,其首次水提物稀释倍数应相应减少.

### [参考文献]

- [1] 陈然,孟庆佳,刘海新,等.不同种类茶叶游离氨基酸组分差异分析[J].2017,42(6):258-263.
- [2] 曾敏.古树普洱茶特征风味的化学基础研究[D].重庆:西南大学,2015.
- [3] 杨志坚,李金辉,袁弟顺,等.OPA柱前衍生HPLC测定白茶游离氨基酸[J].福建茶叶,2013(1):19-21.
- [4] 王淑慧,龙立梅,宋沙沙,等.3种名优绿茶的特征滋味成分研究及种类判别[J].食品科学,2016,37(2):128-131.
- [5] 范培珍,薄晓培,王梦馨,等.4个等级内山六安瓜片茶叶氨基酸的组成及差异[J].安徽农业大学学报,2017,44(1):14-21.
- [6] 王昕,李新生,陈小玲,等.汉中工夫红茶氨基酸种类和含量的分析与评价研究[J].食品研究与开发,2017,38(5):162-168.
- [7] 宛晓春.茶叶生物化学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [8] CAVA-MONTESINOS P, CERVERA M L, PASTOR A, et al. Determination of arsenic and antimony in milk by hydride generation atomic fluorescence spectrometry[J]. Talanta, 2003, 60(4): 787-789.
- [9] 赵明明,金钰,胡筱波,等.基于氨基酸特征分析的西湖龙井茶鉴别方法研究[J].湖北农业科学,2015,54(24):6369-6371.
- [10] 张丹丹,叶小辉,赵峰,等.基于游离氨基酸组分的白茶滋味品质研究[J].福建农业学报,2016,31(5):515-520.
- [11] 中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院,国家茶叶质量监督检测中心.茶游离氨基酸总量测定:GB/T 8314—2013[S].北京:中国标准出版社,2013.

(下转第71页)

## [参考文献]

- [1] CVETKOVIĆ L, KOSTIĆ V, BRU R, et al. A simple generalization of Gersgorin's theorem [J]. *Advances in Computational Mathematics*, 2011, 35: 271–280.
- [2] 李艳艳. Dashnic-Zusmanovich 矩阵的逆的无穷范数上界的估计 [J]. *西南师范大学学报 (自然科学版)*, 2017, 42 (6): 1–4.
- [3] 蒋建新. 块  $H$  矩阵的逆矩阵无穷范数和最小奇异值的估计 [J]. *文山学院学报*, 2014, 27 (6): 34–36.
- [4] CVETKOVIĆ L.  $H$ -matrix theory vs: eigenvalue localization [J]. *Numerical Algorithms*, 2007, 42: 229–245.
- [5] 杨占山. 严格  $\alpha$ -对角占优  $M$ -矩阵逆的无穷范数的上界估计 [D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [6] ZHAO J X, LIU Q L, LI C Q, et al. Dashnic-Zusmanovich type matrices: a new subclass of nonsingular  $H$ -matrices [J]. *Linear Algebra & Its Applications*, 2018, 552: 277–287.

.....

(上接第42页)

- [12] SASAOKA K, KILO M. Studies on the biosynthesis of theanine in tea seedlings synthesis of theanine by the homogenate of tea seedlings [J]. *Agric Biol Chem*, 1963, 27 (6): 467–468.
- [13] 肖涵, 申亮, 杨婉秋. 云南普洱地区大叶种茶酚氨比研究 [J]. *昆明学院学报*, 2017, 39 (3): 34–39.
- [14] 林家雄, 钊相龙, 陈春月, 等. 云南普洱和临沧地区茶产品游离氨基酸总量测定研究 [J]. *昆明学院学报*, 2017, 39 (3), 30–33.
- [15] 张民, 李银花, 袁晴春, 等. 近红外光谱对鲜茶叶茶多酚和氨基酸总量检测的研究 [J]. *上海农业学报*, 2015, 31 (6): 36–40.
- [16] 苗雨田, 杨悠悠, 李颂, 等. 全自动氨基酸分析仪快速测定乌龙茶中  $\gamma$ -氨基丁酸 [J]. *食品安全专刊*, 2015, 21 (4): 231–235.
- [17] 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]. *茶叶通报*, 2006, 28 (3): 108–110.
- [18] 陈林, 陈健, 王丽丽, 等. 不同茶类制法对茶多酚和游离氨基酸化学模式的影响 [J]. *福建农业学报*, 2017, 32 (3): 287–293.
- [19] 廖珺. 摊放 (萎凋) 技术对茶鲜叶游离氨基酸影响的研究进展 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2016, 38 (4): 15–19.
- [20] 陈丹, 叶小辉, 俞滢, 等. 不同等级云南红碎茶的氨基酸组分分析 [J]. *福建茶叶*, 2014, 36 (4): 24–26.

