

手性衍生-高效液相色谱法拆分和定量测定茶氨酸对映体

李银花, 刘仲华, 黄建安

(湖南农业大学天然产物研究中心, 湖南长沙 410128)

摘要:建立了以1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸酰胺(FDAA)为手性衍生试剂、高效液相色谱拆分茶氨酸对映体的方法。采用的色谱条件为:Kromasil C₁₈色谱柱;三乙胺-磷酸缓冲液和乙腈为流动相,梯度洗脱,流速1.0 mL/min;检测波长为340 nm,柱温为35℃。L-茶氨酸的进样量在 1.732×10^{-3} ~ $2.077 \mu\text{g}$ 范围内峰面积与进样量之间的线性关系良好,加标回收率为97.3% ~ 102.0%,检测限为 $4.973 \times 10^{-4} \mu\text{g}$,定量限为 $1.223 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ 。D-茶氨酸的进样量在 1.696×10^{-3} ~ $2.044 \mu\text{g}$ 范围内峰面积与进样量之间的线性关系良好,加标回收率为97.2% ~ 103.2%,检测限为 $5.871 \times 10^{-4} \mu\text{g}$,定量限为 $1.236 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ 。该方法灵敏度高,分析过程中不发生消旋化。

关键词:高效液相色谱;手性衍生;1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸酰胺(FDAA);茶氨酸对映体

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2007)05-0719-04 栏目类别:研究论文

Separation and Quantification of Theanine Enantiomers Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Chiral Derivatization

LI Yinhua, LIU Zhonghua, HUANG Jian'an

(Institute of Natural Products, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: L-Theanine is a unique non-protein amino acid in tea, and shows many physiological functions. To directly extract L-theanine from tea is a lengthy and very costly process. Although the chemical synthesis of theanines is simple, the product is unfortunately a mixture of DL-enantiomers. A chiral derivatization method was developed for the separation and quantification of theanine enantiomers by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). 1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (FDAA) was used as the chiral reagent. This method showed good linearity for both L-theanine (ranging from 1.732×10^{-3} to $2.077 \mu\text{g}$) and D-theanine (ranging from 1.696×10^{-3} to $2.044 \mu\text{g}$). The recoveries were in the range of 97.3% - 102.0% for L-theanine and 97.2% - 103.2% for D-theanine. This method also showed excellent limit of detection ($\sim 5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$) and limit of quantification ($\sim 1 \times 10^{-3} \mu\text{g}$) for both L-theanine and D-theanine. The results demonstrated that this method is precise, accurate and can be used for the determination of theanine enantiomers.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); chiral derivatization; 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide (FDAA); D-theanine enantiomers

L-茶氨酸是茶叶中特有的化学成分之一,又名N-乙基- γ -L-谷氨酸酰胺(N-ethyl- γ -L-glutamine),占茶叶干重的1% ~ 2%,占茶叶中游离氨基酸的40%以上^[1]。L-茶氨酸作为一种安全、无毒、有多种生理功能的天然产物,具有广阔的开发应用前景^[2]。从茶叶中直接提取天然的L-茶氨酸,是茶的功能成分高效利用的重要途径之一。但是,以茶叶为原料生产高纯度的天然L-茶氨酸,分离纯化成本较高,价格

竞争力不强,从而影响了其规模化生产。化学合成法制备茶氨酸,操作相对简单,易于工业化生产,但产品多为D-、L-茶氨酸的混合体,而D-茶氨酸的分离与去除具有较高的技术难度^[3],并且D-茶氨酸的生理功能与活性尚不明晰。因此,有必要对茶氨酸对映体进行定性鉴定和定量分析方法的研究。

利用高效液相色谱(HPLC)可测定蛋白质中的手性氨基酸的绝对构型^[4]。该方法是基于D-和L-

氨基酸与手性试剂衍生后生成的异构体能够利用 HPLC 进行分离。1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸酰胺 (FDAA) 是一种新型的手性衍生试剂, 又称 Marfey 试剂, 用于 DL-氨基酸的拆分取得了较好的效果^[5-9]。本文尝试用 FDAA 这一手性衍生试剂与具有光学活性的茶氨酸反应, 采用反相高效液相色谱法拆分茶氨酸对映体。

1 实验部分

1.1 仪器

Shimadzu LC-10 ATVP 高效液相色谱仪, Class-VP 色谱数据工作站, AS5150 A 超声波清洗仪, 电热蒸馏水器(天津市泰斯特仪器有限公司), 纯水发生器(上海申生科技有限公司)。

1.2 试剂及样品

分析纯的盐酸、磷酸、丙酮、三乙胺、碳酸氢钠和色谱纯的甲醇、乙腈购自天津科密欧公司; FDAA 购自德国默克公司; 茶氨酸提取物、绿茶原料、DL-茶氨酸对映体、D-茶氨酸、L-茶氨酸对照品由湖南金农生物资源股份有限公司提供。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 2% 三乙胺-磷酸盐缓冲液(pH 4.0); 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0~25 min, 16% B 线性升至 32% B; 25~32 min, 32% B 线性升至 48% B; 保持 5 min 后于 2 min 内降至 16% B; 流速 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长 340 nm。

1.4 对照品储备液的制备

精密称取 D-茶氨酸、L-茶氨酸对照品适量, 用纯水溶解并定容使两者的浓度均为 25 mmol/L, 作为对照品储备液。

1.5 供试品溶液的制备

1.5.1 茶氨酸提取物或化学合成物

精密称取茶氨酸样品, 用纯水配制成适当浓度的溶液, 并用 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤, 滤液作为供试品溶液待用。

1.5.2 茶叶原料

精密称取 5 g 茶叶, 加入 200 mL 沸水, 在沸水浴中浸提 45 min, 每隔 10 min 摇动一次, 用棉花初滤, 冷却后用纯水定容到 250 mL, 经 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 收集续滤液, 待用。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

将 DL-茶氨酸与衍生试剂 FDAA 反应后, 在 220

~600 nm 范围内对茶氨酸衍生物进行紫外吸收扫描。从图 1 可以看出茶氨酸衍生物在 340 nm 有最大吸收值, 故本文选用 340 nm 作为检测波长。340 nm 最大吸收波长的产生是由于衍生物中的二硝基苯基上的硝基、茶氨酸和 L-丙氨酸酰胺上的氨基的存在, 使苯基吸收带的最大吸收波长向长波长方向移动而产生。

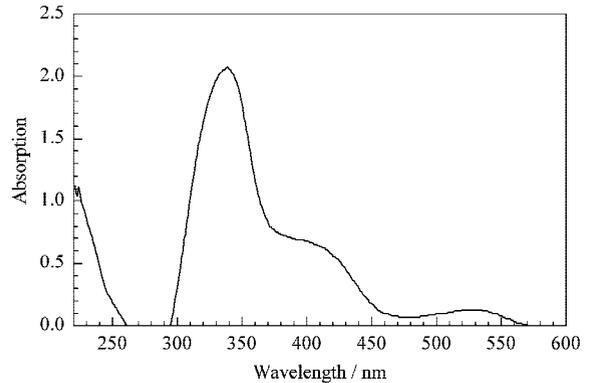


图 1 茶氨酸衍生物的紫外-可见波长扫描图谱

Fig. 1 UV-VIS scanning spectrum of theanine derivative

2.2 色谱柱的选择

文献[4]报道: FDAA 衍生试剂衍生后的 DL-氨基酸衍生物的分离机理是基于 D 型和 L 型氨基酸衍生物的疏水性不同。因此本文选用反相色谱柱(C₂、C₁₈柱)进行试验。试验结果表明, D 型和 L 型茶氨酸衍生物在 C₂ 柱上的保留时间比在 C₁₈ 柱上的短。这是因为在反相色谱分离中, 化合物的保留时间通常直接取决于固定相的碳数多少, 碳数少, 疏水性低, 而低疏水性的固定相可以有效地降低分析时间。但由于茶氨酸衍生物在 C₂ 柱上的保留弱, 当分离多组分氨基酸时, 抗干扰能力差, 因此本文选用保留能力较强的 C₁₈ 柱分离茶氨酸衍生物。其分离效果好, 能与其他的氨基酸达到很好的分离。

2.3 流动相 pH 的选择

反相液相色谱柱的优点是固定相稳定, 应用广泛, 可使用多种溶剂。但以硅胶为基质的反相色谱填料在使用时要注意流动相 pH 值的范围, 一般要求 pH 值的范围在 2~7 之间; 硅胶基质的色谱填料在 pH 3~5 之间使用最稳定, 极端 pH 值的流动相能溶解硅胶^[10]。本文选用 pH 值为 2.5, 3.5, 4.0, 4.5, 5.5, 6.5 的流动相考察 pH 值对茶氨酸分离的影响。从图 2 可以看出, 随着 pH 的增加, 两种构型的茶氨酸的保留因子 *k* 均减小, 说明在 C₁₈ 色谱柱上两者的保留时间越来越短; 但两者间的分离因子 α 、分离度 *R_s* 均随着 pH 值的增加而增加, 说明两峰之间的距离变大; 当 pH 值大于 4.0 时, *k*、 α 和 *R_s* 三者

的变化均不明显。综合考虑, 本文选用 pH 值为 4.0 的流动相对茶氨酸衍生物进行分离。

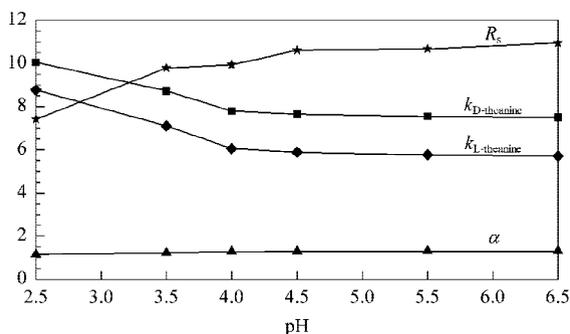


图 2 流动相 pH 值对茶氨酸对映体分离的影响

Fig. 2 Effect of the pH value of mobile phase on the enantioseparation of theanines

2.4 衍生条件的优化

通过考察稀释剂、 NaHCO_3 、 HCl 、茶氨酸和

表 1 茶氨酸测定的线性方程、相关系数及线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges for the determination of theanines

Component	Regression equation [*]	Correlation coefficient (r)	Linear range/ μg
L-Theanine	$Y = 8766504X - 121263$	0.9997	$1.732 \times 10^{-3} - 2.077$
D-Theanine	$Y = 8907425X - 121182$	0.9997	$1.696 \times 10^{-3} - 2.044$

* Y : peak area, $\mu\text{V} \cdot \text{s}$; X : sample size, μg .

2.6 精密度试验

取同一浓度的茶氨酸对映体对照品溶液在同一天连续进样 5 次, 进行精密度测定。L-及 D-茶氨酸峰面积的相对标准偏差 (RSD) 均为 0.7%。

2.7 方法的稳定性

将衍生后的样品分别放置 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 h 后测定茶氨酸对映体的峰面积, L-茶氨酸峰面积的 RSD 为 0.7%, D-茶氨酸峰面积的 RSD 为 1.0%, 由此可知衍生后的样品在 5 h 之内稳定。

2.8 方法的重现性

将茶氨酸对映体在同一天内平行衍生 5 份样品进行重现性测定。L-茶氨酸峰面积的 RSD 为 0.9%, D-茶氨酸峰面积的 RSD 为 1.2%。不难看出, 用此方法测定茶氨酸对映体的日内重现性较好。

2.9 方法的检测限和定量限

将茶氨酸对照品储备液配成低浓度的溶液进样, 以信噪比 (S/N) ≥ 10 为定量限, $S/N \geq 3$ 为检测限。L-茶氨酸和 D-茶氨酸的检测限分别为 $4.973 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ 和 $5.871 \times 10^{-4} \mu\text{g}$, L-茶氨酸和 D-茶氨酸的定量限分别为 $1.223 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ 和 $1.236 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ 。

2.10 方法的回收率

本实验采用标准加入法进行方法的准确度测定。取已知含量的样品, 在其中分别加入不同浓度的对照品, 制备成高、中、低 3 个浓度的混合液, 以 3 次进样测定的平均值计算, 测定结果如表 2 所示。

FDAA 的加入量及反应时间等因素对衍生化反应的影响, 得出最佳的衍生条件为: 取 100 mL 浓度低于 25 mmol/L 的茶氨酸标准溶液或茶氨酸供试液于衍生反应瓶中, 加入 50 μL 1 mol/L NaHCO_3 、200 μL 1% FDAA 的丙酮溶液, 用微型旋涡混合仪混合, 置于 40 $^\circ\text{C}$ 电热恒温鼓风干燥箱中反应 120 min (此过程中溶液会由橙色变成红色)。将反应液冷却到室温, 加入 50 μL 1 mol/L 盐酸, 用丙酮定容到 2 mL, 并经 0.45 μm 的油膜过滤, 滤液供分析。

2.5 线性回归方程和相关系数

分别将对照品贮备液稀释为 6 个不同浓度的对照品溶液, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标作线性回归, 其线性回归方程、相关系数、线性范围如表 1 所示。测定结果表明, 进样量 (X , μg) 与峰面积 (Y , $\mu\text{V} \cdot \text{s}$) 呈良好的线性关系。

从表 2 可看出, D-茶氨酸的回收率为 97.2% ~ 103.2%, L-茶氨酸的回收率为 97.3% ~ 102.0%。

表 2 茶氨酸的加标回收率

Table 2 The spiked recovery of theanines

Component	Background/ mg	Added/ mg	Found/ mg	Recovery/ %
D-Theanine	51.23	20.82	21.48	103.17
	50.82	32.34	32.36	100.06
	50.43	50.48	49.06	97.19
L-Theanine	50.41	21.35	21.78	102.01
	51.39	30.28	30.52	100.79
	52.43	51.24	49.86	97.31

2.11 实际样品的分析

将按照供试品溶液和衍生方法处理后的绿茶原料、茶氨酸提取物、化学合成的茶氨酸分别取 10 μL 进行分析, 测定的色谱图见图 3。从图 3 中可以看出, 在茶氨酸提取物和绿茶原料中未发现 D-茶氨酸, L-茶氨酸能与其他物质很好地分离, 茶氨酸提取物中 L-茶氨酸的含量为 23.426%, 绿茶原料中 L-茶氨酸的含量为 0.913%, 化学合成的茶氨酸中有 D-茶氨酸的存在, D-茶氨酸含量为 48.214%, L-茶氨酸含量为 49.001%。

3 结论

本文以 1-氟-2,4-二硝基苯基-5-L-丙氨酸胺为手性衍生试剂, 将茶氨酸衍生为具有紫外吸收的化

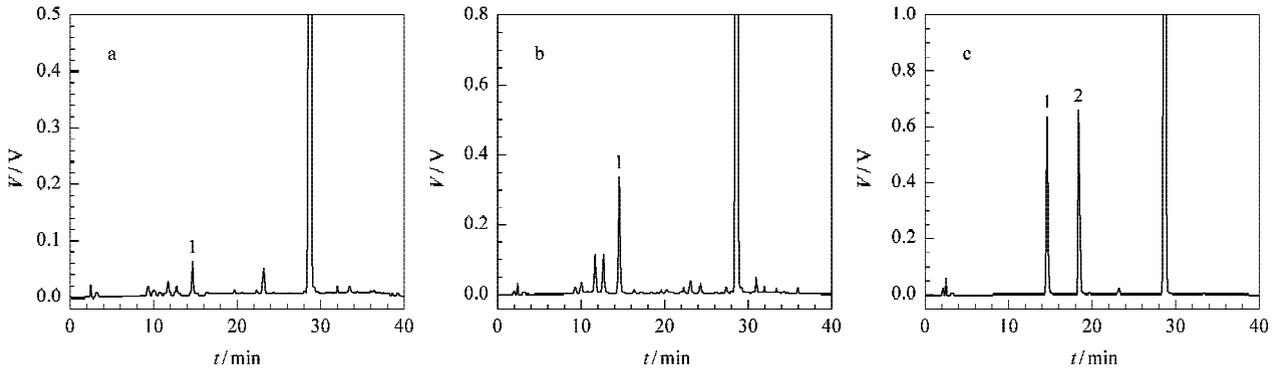


图 3 (a)绿茶原料、(b)茶氨酸提取物、(c)化学合成的茶氨酸的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of (a) green tea raw material, (b) theanine extract and (c) synthesized theanines

1. L-theanine ; 2. D-theanine.

合物。通过衍生化反应,增加了检测茶氨酸对映体的灵敏度。在实际操作过程中,手性试剂稳定,衍生过程中不发生消旋化反应,且反应速率一致,分离效果好,能与其他物质达到基线分离。方法的回收率高,稳定性、精密性、重现性、通用性好。

参考文献:

[1] Xiao W T, Zhu X L, Chen B, Yao S Z. Chinese Traditional and Herbal Drugs (肖伟涛,朱小兰,陈波,姚守拙. 中草药), 2004, 35(2): 148

[2] Du R M, Xiang Q N. China Food Additives (杜荣茂,向庆宁. 中国食品添加剂), 2003(1): 13

[3] Lin Z. China Tea, 2003, 25(3): 4

[4] Fujii K, Ikai Y, Mayumi T, Oka H, Suuki M, Harada K. Anal Chem, 1997, 69 : 3 346

[5] Brückner H, Keller-Hoehl C. Chromatographia, 1990, 30 : 621

[6] Szókún G, Mezò G, Majer Z. J Liq Chromatogr, 1989, 12 : 2 855

[7] Brückner H, Gah C. J Chromatogr, 1991, 555 : 81

[8] Szókún G, Mezò G, Hudecz F. J Chromatogr, 1988, 444 : 115

[9] Brückner H, Wittner R, Godel H. J Chromatogr, 1989, 476 : 73

[10] Wu F D. Preventive Maintenance and Corrective Maintenance for Chromatograph. Beijing : Chemical Industry Press (吴方迪. 色谱仪器维护与故障排除. 北京 : 化学工业出版社), 2002

欢迎订阅 欢迎投稿 承接广告

《岩矿测试》 中国科技核心期刊

国内统一刊号 :CN11-2131 /TD

国际标准刊号 :ISSN 0254-5357

国际 CODEN 码 :YACEEK

《岩矿测试》杂志是中国地质学会岩矿测试专业委员会和国家地质实验测试中心共同主办的分析测试技术科技期刊。

《岩矿测试》的宗旨是突出服务于地球科学和地质找矿事业以及促进岩矿测试技术的发展 ;根据国家地质工作的重点由单一资源向资源环境并重的转变 《岩矿测试》的内容有所拓宽 ,主要报道国内与分析科学、资源环境、地球科学相关的新技术、新方法、新理论和新设备等研究成果、动态、评述及相关实践经验。

《岩矿测试》于 1982 年创刊 ,为国内外公开发行人物。近年来刊物地位不断提高 ,是中国科技核心期刊、中国期刊方阵双效期刊。目前被列为中国科技论文统计源期刊 ,美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、英国《分析文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等数据库收录期刊。曾先后被评为国家、原地矿部、北京市、中国科协的优秀科技刊物。适合于地质、冶金、环保、石油、化工、煤炭等部门从事分析测试的科技工作者及大专院校分析化学、环境资源、地球科学等相关专业的师生阅读。

《岩矿测试》为双月刊 ,大 16 开版本 80 页/期 ,逢双月出版 ;国内邮发代号 2-313 ;国际书店发行代号 BM4089 ;广告经营许可证 :京西工商广字第 0227 号 ;定价 10.00 元/本 ,全年 60.00 元。漏订的读者可直接与编辑部联系。

联系方式 :

联系电话 010-68999562 传真 :010-68999563 E-mail ykcs_zazhi@ sina.com , ykcs_zazhi@ 163.com

编辑部地址 :北京阜外百万庄大街 26 号 国家地质实验测试中心 邮编 :100037