

# 正交试验优选茶梗中茶氨酸的提取工艺

陈沛鑫<sup>1</sup>, 高英<sup>2</sup>, 李卫民<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学新药研究开发中心, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 优选茶梗中茶氨酸的提取工艺。方法: 以茶氨酸为指标, HPLC 测定茶氨酸含量, 选择提取溶剂、料液比、提取温度、提取次数和提取时间为考察因素, 用单因素试验确定因素水平; 以料液比、提取温度、提取时间为考察因素, 采用正交试验优选提取工艺。结果: 最佳提取工艺为 20 倍量水于 80 ℃ 提取 1 h。结论: 该优选工艺稳定、可控、提取率高。

**[关键词]** 茶梗; 茶氨酸; 单因素考察; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0039-03

## Optimization of Extraction Technology of Theanine from Tea Stalk by Orthogonal Test

CHEN Pei-xin<sup>1</sup>, GAO Ying<sup>2</sup>, LI Wei-min<sup>1\*</sup>

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;  
2. New Drug Research and Development Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of theanine from tea stalk. **Method:** With the content of theanine as index which was determined by HPLC, ratio of liquid-material, extraction solvent, extraction temperature, extraction time and extraction times were selected as factors, factors and levels were determined by single-factor test; Orthogonal test was used to optimize extraction technology with ratio of liquid-material, extraction temperature and extraction time as factors. **Result:** Optimum extraction process was: extracted 1 h with 20 times the amount of water at 80 ℃. **Conclusion:** This optimized technology was stable and reliable with high extraction rate.

**[Key words]** tea stalk; theanine; single-factor test; orthogonal test

茶氨酸又名 *N*-乙基- $\gamma$ -谷氨酰胺<sup>[1]</sup>, 具有促进大脑功能和神经生长、降压安神等生理功能<sup>[2-3]</sup>, 有“天然镇静剂”之称, 是保健品市场的新宠, 常把它作为茶叶品质的评价指标。目前对茶梗等茶下脚料资源并未有效利用, 绝大多数处理方式是焚烧、填埋, 对茶梗中茶氨酸的开发利用还未见报道。为更充分、更合理地开发利用茶氨酸, 本试验以茶氨酸为

指标, 采用单因素试验和正交试验对茶梗中茶氨酸的提取工艺进行优化, 为茶氨酸的后续开发利用的奠定基础, 同时为茶梗的进一步开发提供参考。

### 1 材料

MC215S 型 1/万电子天平 (Sartrious), SHIMADZU LC-10AT vp plus 型高效液相色谱仪 (SHIMADZU SPD-10A vp plus 紫外检测器, SHIMADZU CBM-10A vp plus 化学工作站, 7251j 手动进样器, 800 型蒸发光散射检测器, 美国 Alltech 公司), 茶氨酸对照品 (Sigma 公司, 纯度  $\geq 99.8\%$ , 货号 T6576), 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯, 茶梗由海丰县金瑞丰生态农业有限公司提供, 经广州中医药大学新药研究开发中心高英教授鉴定为成品上拣下的叶梗。

**[收稿日期]** 20120408(008)

**[第一作者]** 陈沛鑫, 硕士, 从事中药新药开发与研究, Tel: 13719128109, E-mail: cpxfighting2010@sina.com

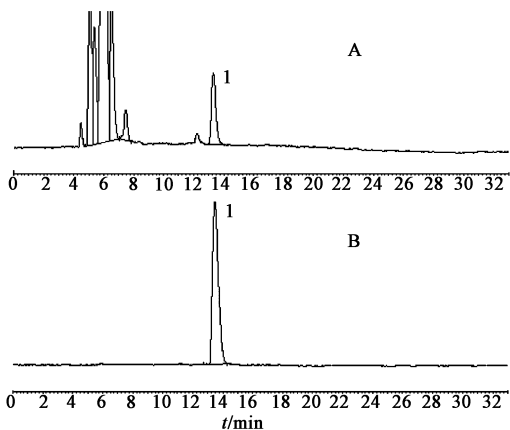
**[通讯作者]** \* 李卫民, 教授, 博导, 从事中药新药研究与开发, Tel: 020-39358290, E-mail: liweimin@gzucm.edu.cn

## 2 方法与结果

### 2.1 茶氨酸含量测定

**2.1.1 色谱条件** AE. Lichrom C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-含 0.1% 三氟乙酸的水 (2:98), 流速 0.5 mL · mL<sup>-1</sup>, 分流漂移管温度 54 °C, 载气 N<sub>2</sub>, 1.46 Bar。

**2.1.2 对照品溶液的制备和标准曲线的建立** 精密称取茶氨酸对照品适量, 加水制成 5.11 g · L<sup>-1</sup> 的储备溶液。精密量取对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加超纯水至刻度, 摇匀。分别精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪。测定峰面积, 以峰面积积分的自然对数值为纵坐标, 进样质量的自然对数值为横坐标, 得回归方程  $Y = 1.14X + 4.35$  ( $r = 0.9996$ ), 结果表明茶氨酸在 2.55 ~ 20.43 μg 与峰面积对数值呈良好线性关系。色谱图见图 1。



A. 样品; B. 对照品; 1. 茶氨酸

图 1 茶梗 HPLC

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取茶梗于 35 °C 干燥 6 h, 粉碎, 过 24 目筛, 取粗粉约 4 g 进行提取, 提取液转移至 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

**2.1.4 精密密度试验** 取同一茶氨酸对照品溶液, 重复进样 6 次, 每次 15 μL, 结果茶氨酸峰面积 RSD 2.30%, 表明仪器精密密度良好。

**2.1.5 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 8, 12, 24 h 进样, 每次进样 15 μL, 茶氨酸峰面积 RSD 1.09%。表明供试品中茶氨酸在 24 h 内稳定。

**2.1.6 重复性试验** 取同一批号样品 5 份, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 各取 15 μL 进样, 计算该批样品中茶氨酸质量分数 6.45 mg · g<sup>-1</sup>,

RSD 2.19%。

**2.1.7 加样回收率试验** 取已知含量的茶梗 (6.5 mg · g<sup>-1</sup>) 粗粉 6 份, 每份约 2 g, 精密称定, 分别加入茶氨酸对照品 13 mg, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 各取 15 μL 进样, 结果平均回收率 98.5%, RSD 2.30%, 表明该方法可靠性良好。

**2.1.8 样品测定** 精密吸取供试品溶液 15 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

### 2.2 单因素试验

**2.2.1 提取溶剂考察** 选用水, 30% 乙醇, 50% 乙醇为提取溶剂, 温浸 1 次, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件进样, 计算茶氨酸含量分别为 6.35, 6.01, 5.89 mg · g<sup>-1</sup>。故确定提取溶剂为水。

**2.2.2 料液比考察** 选择水为溶媒, 分别按料液比 1:8, 1:12, 1:16, 1:20, 1:24 温浸 1 次, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件进样, 计算茶氨酸含量分别为 5.47, 6.10, 6.19, 6.45, 6.21 mg · g<sup>-1</sup>。即当料液比 1:20 时, 茶氨酸含量最高。

**2.2.3 提取温度的选择** 以水为溶媒, 料液比 1:20, 分别于 30, 50, 60, 70, 80, 100 °C 温浸 1 次, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件进样, 计算茶氨酸含量分别为 3.40, 5.24, 5.15, 6.09, 6.29, 6.32 mg · g<sup>-1</sup>。结果显示, 当提取温度为 70, 80, 100 °C 时, 茶氨酸含量变化不大。

**2.2.4 提取时间的选择** 以水为溶媒, 料液比 1:20, 分别温浸 0.5, 1, 1.5, 2, 3 h, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件进样, 计算茶氨酸含量分别为 5.87, 6.43, 6.39, 6.20, 6.21 mg · g<sup>-1</sup>。结果显示, 当提取时间 > 1.5 h, 茶氨酸提取量有所减少, 推测由于提取时间越长, 氨基酸被氧化分解的量随之增多。

**2.2.5 提取次数的选择** 取茶梗粗粉 4 g, 加 20 倍量水提取 1 次, 10, 10 倍量水提取 2 次, 7, 7, 6 倍量水提取 3 次, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件进样, 计算茶氨酸含量分别为 6.44, 6.31, 6.40 mg · g<sup>-1</sup>。说明提取次数对茶氨酸含量影响不大, 故确定提取次数为 1 次。

**2.3 正交试验优选** 在单因素试验基础上, 以茶氨酸含量为考察指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表安排试验, 考察料液比、提取温度、提取时间 3 个因素, 提取次数确定为 1 次。称取茶梗粗粉 9 份, 每份 4 g, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表1 茶梗中茶氨酸的水提工艺优选正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取温度/°C	C 提取时间/h
1	1:16	60	0.5
2	1:20	80	1
3	1:24	100	1.5

表2 茶梗中茶氨酸的水提工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	茶氨酸/mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	5.96
2	1	2	2	2	6.25
3	1	3	3	3	6.25
4	2	1	2	3	6.58
5	2	2	3	1	6.51
6	2	3	1	2	5.95
7	3	1	3	2	6.31
8	3	2	1	3	6.14
9	3	3	2	1	6.28
K <sub>1</sub>	6.15	6.28	6.02	6.25	
K <sub>2</sub>	6.35	6.30	6.37	6.17	
K <sub>3</sub>	6.24	6.16	6.36	6.32	
R	0.19	0.14	0.35	0.15	

表3 茶氨酸提取率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.056	2	1.6	>0.05
B	0.035	2	1	>0.05
C	0.241	2	6.886	>0.05
D(误差)	0.035	2	1	

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由方差分析结果可见,料液比、提取温度、提取时间3个因素对茶氨酸的含量影响均不显著,从极差可知,各因素对水提工艺影响的次序为  $C > A > B$ ,确定最佳水提工艺为  $A_2B_2C_2$ 。

**2.4 验证试验** 称取茶梗粗粉3份,每份4g,按优选工艺进行3次验证试验,结果茶氨酸平均含量  $6.45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,RSD 0.73%,表明茶氨酸的水提工艺

稳定可行。

### 3 讨论

HPLC-ELSD 多用来检测无紫外吸收物质<sup>[4-5]</sup>,有文献报道使用 HPLC-ELSD 测定茶叶中茶氨酸含量<sup>[6-7]</sup>,未见茶梗中茶氨酸含量的报道。本文对检测方法进行优化,结果表明,采用  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速及等度洗脱方式,可在 20 min 内完成茶梗中茶氨酸的检测工作。

本试验进行溶剂考察时,发现水对茶氨酸的提取率高于稀乙醇,可能与茶氨酸极易溶于水的化学性质有关。茶氨酸作为国内保健品市场的新宠,其特殊的生理功能备受关注,其开发利用有着重要意义,每年有大量茶梗得不到合理利用,本工艺简单可行,可为茶梗的合理利用提供参考。

### [参考文献]

- [1] 胡凤奎,王在震,朱仁山,等. 现代英汉药物词汇[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2003:1220.
- [2] Akiko Higashiyama, Hla Hla Htay, Makoto Ozeki, et al. Effects of *L*-theanine on attention and reaction time response [J]. *J Func Food*,2010,3(3):171.
- [3] Kawada S, Kobayashi K, Ohtani M, et al. Cystine and theanine supplementation restores high-intensity resistance exercise-induced attenuation of natural killer cell activity in well-trained men [J]. *J Strength Conditioning Res*, 2010,24(3):846.
- [4] 蔡玲,黄坚,吕杨,等. HPLC-ELSD 法测定夜关门 *D*-松醇的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*,2011,17(5):80.
- [5] 赵强强,韩丽,欧水平,等. HPLC-ELSD 测定黄芪提取物中黄芪皂苷 I, II 及乙酰黄芪皂苷[J]. *中国实验方剂学杂志*,2011,17(11):56.
- [6] 李银花,刘仲华,黄建安,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定茶叶中茶氨酸[J]. *茶叶科学*,2005,25(2):225.
- [7] 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.

[责任编辑 仝燕]