

## 采用隔离池的毛细管电泳-间接紫外吸收法测定茶叶中的氨基酸

付国妮, 何友昭, 王晓葵, 王 蕾

(中国科学技术大学化学系, 安徽 合肥 230026)

**摘要** :改进的毛细管电泳-间接紫外吸收法采用了自制隔离池,以对氨基苯甲酸(PAB)为背景电解质,对茶叶中的氨基酸进行了测定。PAB能够提高分离效率,降低检出限。隔离池的使用避免了PAB的电极反应,降低了基线噪声,维持了两缓冲液池间的电流导通。研究了背景电解质的浓度、pH值以及电渗流改性剂的种类和浓度对氨基酸分离的影响。在优化的实验条件下,16种氨基酸在14 min内达到了基线分离,峰面积的相对标准偏差小于5% ( $n=5$ ),检出限为1.7~4.5  $\mu\text{mol/L}$ ,回收率为83.0%~106%。该法快速、便捷和灵敏,已成功应用于茶叶中11种游离氨基酸的检测。

**关键词** :毛细管电泳;间接紫外吸收检测;隔离池;氨基酸;茶叶

**中图分类号** :O658    **文献标识码** :A    **文章编号** :1000-8713(2007)02-0193-04    **栏目类别** :研究论文

## Determination of Amino Acids in Tea Samples by Capillary Electrophoresis with Partition Cell and Indirect Ultraviolet Detection

FU Guoni, HE Youzhao, WANG Xiaokui, WANG Lei

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

**Abstract** : An improved capillary electrophoretic (CE) separation and indirect ultraviolet (in-UV) detection system was proposed for the amino acid analysis in tea samples with a home-made partition cell and a background electrolyte (BGE) of *p*-aminobenzoic acid (PAB). PAB improved the separation efficiency and detection limits of the amino acids. The partition cell prevented PAB from chemical reaction at the electrode, reduced baseline noise and kept electric current inside the cell. The separation parameters of the amino acids, such as different BGEs, BGE concentration, buffer pH and electroosmotic flow (EOF) modifiers, were investigated. The CE separation was carried out with the running buffer solution of pH 11.2, 10 mmol/L PAB containing 0.014 mmol/L cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), an applied voltage of -15 kV and a detection wavelength of 254 nm. Sixteen amino acids were separated within 14 min under the selected conditions. The linear ranges of the amino acids were 0.02 - 0.60 mmol/L except for theanine (0.02 - 3.80 mmol/L) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (0.02 - 2.00 mmol/L). The recoveries were in the range from 83.0% to 106%. The relative standard deviations of peak area were less than 5% ( $n=5$ ) and the detection limits were in the range of 1.7 - 4.5  $\mu\text{mol/L}$ . The method is fast, convenient and sensitive, and has been applied to the determination of 11 amino acids in tea samples satisfactorily.

**Key words** : capillary electrophoresis (CE); indirect ultraviolet detection; partition cell; amino acids; tea

茶叶中氨基酸的分析对茶叶质量的评价具有重要意义。氨基酸分析法包括氨基酸自动分析仪法、比色法、液相色谱法和气相色谱法等。目前一般采用高效液相色谱法(HPLC)<sup>[1,2]</sup>,但需衍生后检测,

操作繁琐和费时。毛细管电泳(CE)是一种高效、低耗和快速的分离手段,已应用于氨基酸分析<sup>[3,4]</sup>。多数氨基酸在紫外-可见光区吸收弱,本身无荧光。为提高检测灵敏度,也需衍生后用紫外吸收法(UV)

或荧光法(荧光和激光诱导荧光)测定。毛细管电泳-间接紫外吸收法(CE-in-UV)是一种快速简便的方法。该法用于氨基酸的分析已有报道<sup>[5-8]</sup>,但存在分离的氨基酸种类少<sup>[5]</sup>、分析时间长<sup>[6]</sup>、部分氨基酸分离度和检出限差<sup>[7,8]</sup>等问题。Lee等<sup>[6]</sup>曾提出以对氨基苯甲酸(PAB)作背景电解质(BGE)的间接紫外吸收法,分离氨基酸的效果好,但由于PAB易发生电极反应而未采用。

本文提出一种快速、便捷和灵敏的氨基酸CE-in-UV分析法。通过对4种BGE的紫外吸收和有效迁移率比较,PAB最符合要求。但PAB不稳定,采用隔离缓冲池<sup>[9]</sup>避免了PAB的电极反应,降低了基线噪声。隔离缓冲池适合CE分离中电化学性质不稳定的试样和试剂。所建方法已用于茶叶中氨基酸的分离,分析结果证明所用方法可行。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

1229型毛细管电泳仪(北京新技术应用研究所),检测波长254 nm;N-2000双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所);DZF-6020型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。50 μm的毛细管(总长55 cm,有效长度40 cm,河北永年锐沓色谱器件公司)。

试剂均为分析纯,吡啶二羧酸(PDC,Alfa Aesar公司)、PAB等其他试剂购于上海化学试剂公司,实验用水为三次蒸馏水(SZ-3,上海沪西分析仪器厂)。电泳缓冲液为pH 11.2的10 mmol/L PAB(含0.014 mmol/L十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)),每天配制;电极缓冲液为pH 11.2的10 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>;两种缓冲液均用1 mol/L NaOH调pH。浓度均为0.02~0.60 mmol/L的混合氨基酸标准液由4 mmol/L储备液(酪氨酸、半胱氨酸和天冬氨酸为1 mmol/L的储备液)稀释配制。

### 1.2 电泳条件

每天使用前依次用1.0 mol/L HCl(5 min)、三次蒸馏水(1 min)、1.0 mol/L NaOH(15 min)、三次蒸馏水(1 min)、电泳缓冲液(15 min)冲洗毛细管。每次分离前用电泳缓冲液冲洗2 min。隔离缓冲池用玻璃砂芯片隔开,环氧树脂胶固定。电泳池中充电泳缓冲液,电极池中充电极缓冲液。8 cm高差进样15 s,电泳电压-15 kV。

### 1.3 电泳迁移率的测定

在pH 10.9,含0.02 mmol/L CTAB的8 mmol/L对氨基苯磺酸缓冲液中,分别测定氨基酸混合标准液和4种BGE(水杨酸、苯甲酸、PAB和

PDC)混合液的有效迁移率,硫脲作中性标记物。各氨基酸和4种BGE的浓度均为0.4 mmol/L,8 cm高差进样10 s,电泳电压为-18 kV,检测波长为254 nm。参照文献[7]中的公式计算氨基酸和BGE的有效迁移率。

### 1.4 样品处理

将茶叶置于真空干燥箱中于60℃下烘干4 h,研磨后过40目筛。称样品1.500 g,用60 mL沸腾的三次蒸馏水浸泡,置于100℃恒温水浴中浸提30 min后抽滤,滤液定容至50 mL。用等体积的乙酸乙酯萃取3次以除去茶多酚及色素等杂质,提取液用旋转蒸发器浓缩后用三次蒸馏水定容至10 mL,冷藏备用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 背景电解质的选择

CE-in-UV中应选择具有强紫外吸收和接近分析物平均迁移率的BGE以提高灵敏度和减小区带分散。在200~350 nm范围内对水杨酸、苯甲酸、PAB和PDC等4种BGE进行紫外吸收扫描,PAB的紫外吸收最强。表1是上述4种BGE的有效迁移率和氨基酸的平均迁移率。从表1可以看出PAB的有效迁移率最接近被分离氨基酸的平均迁移率,峰的前沿或后沿展宽小,因此PAB是CE-in-UV分离氨基酸的一种合适的BGE。

表1 BGE的有效迁移率和氨基酸的平均迁移率  
Table 1 Effective mobilities of BGEs and average mobility of amino acids

Analytes	Effective mobility/ ( $10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
Salicylic acid	2.62
Benzoic acid	2.81
PAB	3.44
PDC	4.34
Amino acids	3.34*

\* Average mobility of amino acids.

与文献[6]报道一致,PAB在加高电压下会发生电极反应而变色。采用自制的隔离缓冲池,将毛细管插入电泳缓冲池,将电极插入电极缓冲池(见图1),这样既防止了PAB的电极反应,又保证两池溶液的电流导通,且基线稳定性得到改善。采用隔离缓冲池前后电泳分离的基线见图2。

### 2.2 分离条件的优化

氨基酸的等电点为2.98~10.76。氨基酸阴离子在负高压和电渗流趋向正极时,分离速度提高。电泳缓冲液pH试验范围为pH 10.8~11.6,在pH 11.2时,16种氨基酸的分离度最佳。

固定电泳缓冲液的pH为11.2,在2.5~20

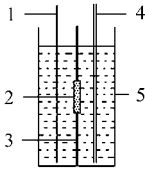


图 1 隔离池的示意图

Fig. 1 Schematic diagram of partition cell

1. electrode; 2. glass frit; 3. glass flake; 4. capillary;  
5. glass cell.

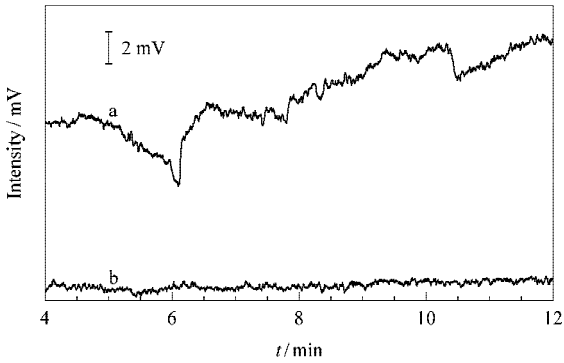


图 2 采用隔离池 (a) 前和 (b) 后毛细管电泳分离的基线比较

Fig. 2 Comparison of CE baselines between (a) normal buffer vial and (b) partition cell

Separating conditions: applied voltage,  $-15$  kV; detection wavelength,  $254$  nm. a. electrophoretic buffer solution is pH  $11.2$ ,  $10$  mmol/L PAB and  $0.014$  mmol/L CTAB; b. electrophoretic buffer solution is pH  $11.2$ ,  $10$  mmol/L PAB and  $0.014$  mmol/L CTAB and electrode buffer solution is pH  $11.2$ ,  $10$  mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ .

mmol/L 范围选择 PAB 浓度。实验发现, PAB 浓度小于  $5$  mmol/L 时, 间接紫外检测法测定氨基酸的吸收值偏低, 线性范围缩小; PAB 浓度大于  $20$  mmol/L 时, 谱图的基线噪声增大, 检出限变差。结合线性范围和基线噪声, 选 PAB 浓度为  $10$  mmol/L。

电泳缓冲液中 CTAB 浓度大于  $0.005$  mmol/L 时, 毛细管会产生趋向正极的电渗流。CTAB 浓度增加, 电渗流加大。实验发现 CTAB 浓度小于  $0.010$  mmol/L 时,  $16$  种氨基酸虽可分离, 但分析时间延长; CTAB 浓度大于  $0.018$  mmol/L 时, 分离速度加快, 但丙氨酸和苏氨酸不能达到基线分离。结合分析时间和分离度, 选择 CTAB 浓度为  $0.014$  mmol/L。

采用 pH  $11.2$ , 含  $0.014$  mmol/L CTAB 的  $10$  mmol/L PAB 电泳缓冲液进行毛细管区带电泳分离,  $16$  种氨基酸可在  $14$  min 内分离(见图 3)。

### 2.3 线性范围、精密度和检出限

对方法的精密、检出限和线性范围进行了测定。采用本方法测定的峰面积的相对标准偏差 (RSD) 均小于  $5\%$  ( $n=5$ )。用靠近分离峰的连续  $11$  个噪声信号的  $3$  倍标准偏差计算,  $16$  种氨基酸的

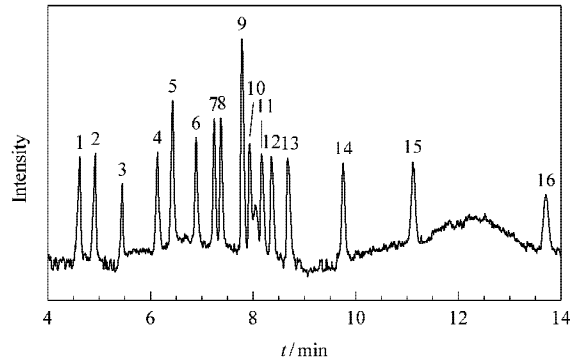


图 3 混合氨基酸标准溶液的电泳谱图

Fig. 3 Electropherogram of mixed solution of amino acid standards

Separating conditions: the concentration of each amino acid,  $0.2$  mmol/L; hydrodynamic injection,  $8$  cm height difference for  $15$  s; other conditions are the same as in Fig. 2-b.

1. Asp; 2. Glu; 3. Cys; 4. Tyr; 5. Gly; 6. Ser; 7. Thr; 8. Ala; 9. Met; 10. Val; 11. Phe; 12. Leu; 13. The (theanine); 14. GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid); 15. Pro; 16. Lys.

检出限在  $1.7 \sim 4.5$   $\mu\text{mol/L}$  范围。茶氨酸在  $0.02 \sim 3.80$  mmol/L 范围,  $\gamma$ -氨基丁酸在  $0.02 \sim 2.00$  mmol/L 范围, 其他氨基酸在  $0.02 \sim 0.60$  mmol/L 范围, 氨基酸的峰面积  $y$  ( $\text{mV} \cdot \text{s}$ ) 与其浓度  $x$  ( $\text{mmol/L}$ ) 呈良好的线性关系, 线性方程及相关系数为: 天冬氨酸 (Asp),  $y = -0.22 + 78.3x$  ( $r=0.9996$ ); 谷氨酸 (Glu),  $y = 0.94 + 82.0x$  ( $r=0.9988$ ); 半胱氨酸 (Cys),  $y = -1.76 + 82.8x$  ( $r=0.9996$ ); 酪氨酸 (Tyr),  $y = 1.32 + 70.1x$  ( $r=0.9993$ ); 甘氨酸 (Gly),  $y = 0.78 + 53.9x$  ( $r=0.9998$ ); 丝氨酸 (Ser),  $y = -0.95 + 77.0x$  ( $r=0.9998$ ); 苏氨酸 (Thr),  $y = -0.82 + 55.0x$  ( $r=0.9997$ ); 丙氨酸 (Ala),  $y = 0.62 + 58.4x$  ( $r=0.9997$ ); 蛋氨酸 (Met),  $y = -0.84 + 134x$  ( $r=0.9989$ ); 缬氨酸 (Val),  $y = 1.30 + 52.9x$  ( $r=0.9997$ ); 苯丙氨酸 (Phe),  $y = 1.55 + 57.0x$  ( $r=0.9993$ ); 亮氨酸 (Leu),  $y = -0.73 + 71.2x$  ( $r=0.9992$ ); 茶氨酸 (The),  $y = 5.27 + 161x$  ( $r=0.9952$ );  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA),  $y = 5.01 + 203x$  ( $r=0.9943$ ); 脯氨酸 (Pro),  $y = -0.20 + 70.5x$  ( $r=0.9925$ ); 赖氨酸 (Lys),  $y = 0.99 + 118x$  ( $r=0.9969$ )。这也表明采用隔离缓冲池后, PAB 表现出良好的稳定性。

### 2.4 样品分析

采用加标法对样品中的氨基酸进行定性分析, 用校正曲线法测定了  $5$  种茶叶中的氨基酸。

将研磨的茶样分别用  $20$ 、 $40$  和  $80$  目筛过筛, 取过筛后的样品进行提取测定。结果发现过  $20$  目筛的样品所测得的氨基酸含量偏低, 过  $40$  和  $80$  目筛

的样品所测得的氨基酸含量相同,但过 40 目筛样品的提取液易抽滤。故用过 40 目筛的样品做试验。

在已准确测定氨基酸含量的茶叶粉末样品中分别添加与测得的氨基酸含量接近的氨基酸标准液,

按样品处理方法处理,在选定条件下测定,平行测定 5 次,求出氨基酸的回收率。样品电泳谱图见图 4,茶叶中氨基酸的含量及在红茶与铁观音茶样(4<sup>#</sup>和 5<sup>#</sup>样品)中的加标回收率见表 2。

表 2 茶叶中氨基酸的含量及在红茶与铁观音茶样(4<sup>#</sup>和 5<sup>#</sup>样品)中的加标回收率( $n=3$ )  
Table 2 Concentrations and recoveries of amino acids in tea samples ( $n=3$ )

Amino acid	Amino acid contents in samples/( $\mu\text{g/g}$ )					Recoveries/%	
	1 <sup>#</sup>	2 <sup>#</sup>	3 <sup>#</sup>	4 <sup>#</sup>	5 <sup>#</sup>	4 <sup>#</sup>	5 <sup>#</sup>
Asp	335	482	222	712	138	95.7	86.0
Glu	327	293	327	640	248	101	94.7
Cys	60.3	159	114	201	244	98.3	103
Tyr	8.8	33.7	19.5	151	6.0	89.6	92.8
Gly	7.4	11.4	17.6	21.4	11.7	92.2	102
Ser	456	58.9	530	824	323	96.4	104
Thr	145	59.3	155	102	78.8	95.1	83.0
Ala	108	25.6	62.6	41.6	4.4	97.9	99.9
Met	65.2	82.2	24.3	59.2	3.9	94.2	102
The	4390	5060	4550	1810	14800	96.8	97.1
GABA	1420	1610	1460	369	3850	106	90.8

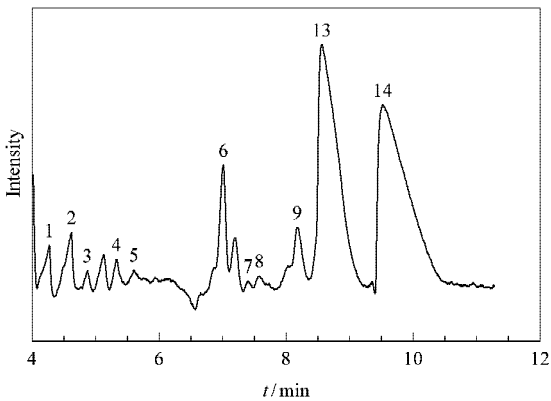


图 4 茶叶中氨基酸的电泳谱图

Fig. 4 Electropherogram of amino acids in a tea sample  
Separating conditions are the same as in Fig. 2-b.  
For peak identifications, see Fig. 3.

参考文献:

[ 1 ] Zhu Q, Shi Z P, Tong J H, Ren C M. Journal of Tea Science (朱旗, 施兆圃, 童京汉, 任春梅. 茶叶科学), 2001, 21(2): 134  
[ 2 ] Ekborg-Ott K H, Taylor A, Armstrong D W. J Agric Food Chem, 1997, 45(2): 353  
[ 3 ] Chen Y, Lu X N. Chemical Journal of Chinese Universities (陈义, 卢小宁. 高等学校化学学报), 2002, 23(5): 822  
[ 4 ] Chen B, Li X G, He P, Xiang X L. Chinese Journal of Chromatography (陈冰, 李小戈, 何萍, 项小兰. 色谱), 2004, 22(1): 74  
[ 5 ] Horie H, Yamauchi Y, Kohata K. J Chromatogr A, 1998, 817: 139  
[ 6 ] Lee Y H, Lin T I. J Chromatogr A, 1994, 680: 287  
[ 7 ] Soga T, Ross G A. J Chromatogr A, 1999, 837: 231  
[ 8 ] Salimi-Moosavi H, Cassidy R M. J Chromatogr A, 1997, 790: 185  
[ 9 ] Jiang H L, He Y Z, Zhao H Z, Hu Y Y. Anal Chim Acta, 2004, 512: 111