

食品中茶胺酸之檢驗方法

Method of Test for Theanine in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於茶飲料、膠囊及錠狀食品中茶胺酸(theanine)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS) 分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化正離子 (positive ion electrospray ionization, ESI⁺)。
 - 2.1.1.2. 層析管：Poroshell 120 EC-C18，2.7 μm ，內徑3.0 mm $\times$ 15 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 均質機(Homogenizer)。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 超音波振盪器(Ultrasonicator)。
 - 2.1.5. 離心機(Centrifuge)：可達3000 $\times g$ 以上者。
 - 2.2. 試藥：甲醇採用液相層析級；冰醋酸採用試藥級；去離子水(比電阻於25°C可達18 M $\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；茶胺酸(theanine)對照用標準品；茶胺酸-d₅ (theanine-d₅)同位素內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 離心管：50 mL，PP材質。
 - 2.3.2. 容量瓶：5 mL、50 mL及100 mL。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.22 μm ，CA (cellulose acetate)材質。
 - 2.4. 移動相溶液之調製：
 - 2.4.1. 移動相溶液A：

取冰醋酸1 mL，加去離子水使成1000 mL，經濾膜過濾後，取濾液供作移動相溶液A。
 - 2.4.2. 移動相溶液B：甲醇。

2.5. 內部標準溶液之配製：

取茶胺酸-d₅同位素內部標準品約10 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至10 mL，作為內部標準原液，冷藏避光貯存。臨用時，取適量內部標準原液，以去離子水稀釋至100 ng/mL，供作內部標準溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取茶胺酸對照用標準品約10 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至10 mL，作為標準原液，冷藏避光貯存。臨用時，取適量標準原液及內部標準溶液混合，以去離子水稀釋至1~100 ng/mL (含內部標準品濃度20 ng/mL)，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

將檢體均質混勻後，取約1 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入去離子水30 mL，旋渦混合，於室溫下超音波振盪30分鐘後，以去離子水定容至50 mL，經適當稀釋後，取1 mL，加入內部標準溶液1 mL，以去離子水定容至5 mL，於3000 ×g離心10分鐘，取上清液，經濾膜過濾，供作檢液。

2.8. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各5 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就茶胺酸與內部標準品之波峰面積比，與對應之茶胺酸濃度，製作標準曲線。

液相層析串聯質譜測定條件^(註)：

層析管：Poroshell 120 EC-C18，2.7 µm，內徑3.0 mm × 15 cm。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 4.0	99 → 99	1 → 1
4.0 → 4.1	99 → 10	1 → 90
4.1 → 6.0	10 → 10	90 → 90
6.0 → 6.1	10 → 99	90 → 1
6.1 → 12.0	99 → 99	1 → 1

移動相流速：0.3 mL/min。

注入量：5 μ L。

離子化模式：ESI⁺。

毛細管電壓(Capillary voltage)：4.5 kV。

離子源溫度(Ion source temperature)：100°C。

溶媒揮散溫度(Desolvation temperature)：500°C。

氣簾氣體(Curtain Gas)：25 psi。

碰撞氣體(Collision Gas)：12 psi。

霧化氣體(Nebulizer gas, GS1)：60 psi。

輔助加熱氣體(Heated gas, GS2)：70 psi。

偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)。偵測離子對、去集簇電壓(declustering potential)與碰撞能量(collision energy)如下表：

分析物	離子對	去集簇電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)		
茶胺酸	175 > 158*	46	16
	175 > 84	46	28
茶胺酸-d ₅	180 > 163*	50	17

*定量離子對

註：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

2.9. 鑑別試驗及含量測定：

精確量取檢液及標準溶液各5 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依2.8.節條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測之相對離子強度^(註)鑑別之，並依下列計算式求出檢體中茶胺酸之含量(g/kg)：

$$\text{檢體中茶胺酸之含量(g/kg)} = \frac{C \times V \times F}{M \times 10^6}$$

C：由標準曲線求得檢液中茶胺酸之濃度(ng/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

F：稀釋倍數

註：相對離子強度由定性離子對與定量離子對之波峰面積比而得(≤100%)。容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

附註：1. 本檢驗方法之定量極限為0.001 g/kg。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Bedner, M., Sander, L. C. and Sharpness, K. E. 2010. An LC-ESI/MS method for determining theanine in green tea dietary supplements. Anal. Bioanal. Chem. 397: 1773–1777.