

高效液相色谱法测定茶叶中儿茶素含量^{*}

林俐莎¹, 葛建^{1,2}, 杨晶晶¹, 韩帅玮琦¹, 邓丽娟¹, 韩宝瑜²

(1. 中国计量学院药学系, 杭州 310018; 2. 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要 目的 建立茶叶中 3 种儿茶素检测方法, 比较目前市场不同品种茶叶中儿茶素含量差异性。方法 采用改进的高效液相色谱(HPLC)法测定了不同茶叶中 3 种儿茶素的含量, 对 5 个不同品种茶叶进行了儿茶素含量差异性检查。色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为乙腈: 0.1% 柠檬酸溶液=10: 90; 柱温 30 ℃, 波长 280 nm。结果 改进的 HPLC 方法测定 3 种儿茶素在 2~400 mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好($r>0.999$), 平均回收率>99.0%, 精密度<2.0%。结论 不同品种茶叶中儿茶素含量变化差异性较显著。建议进一步研究和完善茶叶的采摘、加工及贮存等流程, 并制定出科学、合理的质量标准。

关键词 茶叶; 儿茶素; 色谱法, 高效液相

中图分类号 R282.71; R927.2

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2011)12-1639-03

Simultaneous Determination of Catechin in Different Species of Tea by RP-HPLC

LIN Li-sha¹, GE Jian^{1,2}, YANG Jing-jing¹, HAN SHUAI Wei-qi¹, DENG Li-juan¹, HAN Bao-yu² (1. Department of Pharmacy, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT Objective To establish a method for determination of three kinds catechin in tea and compare content of which from different species of tea in current market. **Methods** The content of three kinds of catechin was measured by modified HPLC method and difference of which was tested. The determination was performed on Hypersil BDS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% citric acid (10: 90) as mobile phase at detection wavelength of 280 nm. And the column temperature was set at 30 ℃ and the wave length was 280 nm. **Results** The good linear relationship of three kinds of catechin occurred in the range of 2~400 mg·L⁻¹ ($r>0.999$). And the average recoveries were more than 99.0% and RSD were less than 2.0%. **Conclusion** There was great difference in the content of catechin from five species of tea. It is suggested to further study and complete picking, processing and preserving of tea and formulate scientific and resonable quality standard.

KEY WORDS Tea; Catechin; High performance liquid chromatography

儿茶素、咖啡因等为茶叶以及茶制品中有效成分, 目前关于儿茶素的研究主要集中在茶叶及其制品中含量检测、生物活性^[1], 国内外大量研究表明儿茶素具有抗癌、抗突变、预防和治疗心脑血管系统疾病以及调节内分泌、免疫系统生物活性^[2-3], 同时对机体内生物代谢酶、肺损伤等也具有抑制活性^[4], 由此将对机体的肝解毒功能及药物的联合应用产生重要影响。

目前, 关于茶叶及其制品中儿茶素的检测方法主要有反相高效液相色谱法(RP-HPLC)及其质谱联用技术, 有研究报道了 RP-HPLC 等度洗脱检测了不同茶叶中儿茶素含量^[5]; 张国民等^[6]采用 HPLC 梯度洗

脱分析了不同茶叶中儿茶素和咖啡因含量; 国外有学者采用高效液相-质谱法对不同茶叶和茶制品中的多种儿茶素和咖啡因进行了定量分析, 同时也有学者利用 HPLC 化学发光检测器分析了血浆、组织器官中各种儿茶素的含量^[7-13]。然而到目前为止, 采用 HPLC 等度洗脱法同时检测多种儿茶素研究的报道较少。因此, 笔者采用 RP-HPLC 等度洗脱法检测了茶叶中 3 种儿茶素活性成分的含量, 并比较了不同品种茶叶中儿茶素的含量, 以期茶叶生产及深加工提供技术支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 日本岛津 Shimadzu 20AT 高效液相色谱系统, N2000 色谱工作站, 色谱柱为大连伊利特 Hypersil BDS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 孔径 0.45 μm 微孔滤膜(上海新亚净化器件厂)、WMZK-01 恒温水浴锅、干燥器、BS200S-WEI 电子天平、电热干燥箱、Hettich Mikro 22R 超高速低温离心机(德国), SHBZ-IIIA 型循环水真空泵, KQ-250B 型超声波仪(昆山超声仪器有限公司), YKH-型漩涡混合器(上海精科实业有限公司)。

1.2 试剂 儿茶素 EGC、EGCG、ECG 标准品购于杭

收稿日期 2011-05-09 **修回日期** 2011-06-11

基金项目 * 国家自然科学基金资助项目(基金编号: 31100499); 中国计量学院第十四届学生科研计划项目资助(基金编号: JL10-2-31)

作者简介 林俐莎(1990-), 女, 浙江台州人, 专业方向: 药物分析。电话: (0) 15158110364, E-mail: lisauff901031@sina.com。

通讯作者 葛建(1979-), 男, 安徽蚌埠人, 副教授, 硕士生导师, 博士, 从事药物分析与代谢动力学研究工作。E-mail: gejian@cjlu.edu.cn。

州和田生物技术有限公司,批号:20101012,纯度>98%,色谱甲醇、乙腈购自杭州米克化工仪器有限公司,不同品种茶叶购于当地超市和茶叶市场。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:大连依利特 BDS C_{18} (250 mm×4.6 mm,5 μ m) 柱;流动相为乙腈:0.1%柠檬酸水溶液=10:90;柱温30 $^{\circ}$ C,波长280 nm;流速为1.0 mL·min⁻¹;进样量为20 μ L。在上述色谱条件下,ECG、EGCG 和 ECG 以及与不同来源茶叶中杂质均能够较好地分离(图1)。

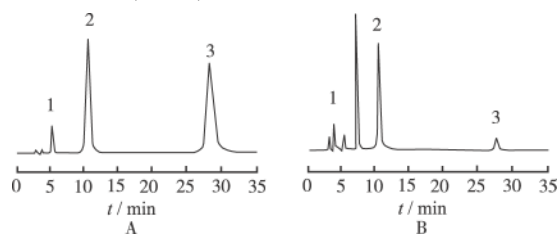


图1 儿茶素 HPLC 色谱图

A. 标准色谱图; B. 铁观音色谱图; 1. EGC; 2. EGCG; 3. ECG

Fig.1 HPLC chromatography of catechins

A. Chromatography of standard; B. Chromatography of Tie Guan Yin; 1. EGC; 2. EGCG; 3. ECG

2.2 供试品溶液和对照品溶液的制备 分别准确称取 EGC、EGCG 及 ECG 对照品各 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,用色谱甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照

品贮备液。分别称取不同品种的干燥茶叶适量,研磨碾碎后过 120 目筛,准确称取 0.5 g 粉末加入 50% 甲醇溶液 10 mL 中,振荡 3 min,水浴超声 5 min,6 000 r·min⁻¹ 离心,取上清液用孔径 0.45 μ m 滤膜过滤后,用 50% 甲醇溶液稀释 10 倍后,取样适量,经过 18 000 r·min⁻¹ 高速离心后,20 μ L 进样分析。

2.3 线性关系考察 精密量取不同儿茶素标准贮备液分别置于量瓶中,用甲醇定容,制备成浓度分别为 2,4,20,40,200,400 mg·L⁻¹ 的不同儿茶素标准溶液,分别取 20 μ L 进样分析。以对照品浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归。结果 3 种儿茶素标准曲线方程分别为 EGC: $Y=1\,755.5X+1\,333.2$ ($r=0.999\,6$),EGCG: $Y=15\,383X-30\,520$ ($r=0.999\,9$) 及 ECG: $Y=18\,507X-24\,028$ ($r=0.999\,9$),由此说明在 2~400 mg·L⁻¹ 范围内线性关系较好。

2.4 加样回收率实验 准确制备已知含量的样品适量,精密称定,分别加入标准品适量,按“供试品溶液”的制备方法制备加样回收供试品溶液,分别进样 6 次,测定 3 种儿茶素的峰面积,计算平均回收率及 RSD,结果见表 1。

2.5 精密度实验 分别取 3 种儿茶素标准溶液 2,20,200 mg·L⁻¹,在同一条件下连续测定 3 次,记录儿茶素的峰面积,计算 RSD 值。结果显示 3 种儿茶素的

表1 EGC、EGCG 和 ECG 加样回收率实验结果

Tab.1 Results of recovery test for EGC, EGCG and ECG

$n=6$

项目	序号	原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
			mg			%	
EGC	1	9.10	9.00	18.09	99.89	99.17	1.08
	2	9.11	9.00	18.10	99.89		
	3	8.98	9.00	17.79	97.89		
	4	9.01	9.00	17.82	97.89		
	5	8.89	9.00	17.80	99.00		
	6	8.97	9.00	18.01	100.44		
EGCG	1	31.40	30.00	61.38	99.93	99.39	1.39
	2	30.96	30.00	60.90	99.80		
	3	31.23	30.00	61.19	99.87		
	4	30.26	30.00	60.28	100.07		
	5	30.18	30.00	60.21	100.10		
	6	31.12	30.00	60.09	96.57		
ECG	1	8.87	9.00	17.81	99.33	99.48	0.63
	2	8.92	9.00	17.78	98.44		
	3	8.79	9.00	17.82	100.33		
	4	8.75	9.00	17.69	99.33		
	5	9.10	9.00	18.06	99.56		
	6	8.91	9.00	17.90	99.89		

RSD 均<2%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液,分别于配制后 0,2,4,8 h 依法测定,分别进样 20 μ L,每个时间段进样 3 次,结果 3 种儿茶素的 RSD 分别为 0.98%,1.02% 及 1.13%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 重复性实验 对同一批号或来源的供试品 6 份进行测定,记录色谱峰面积,结果显示 3 种儿茶素的 RSD 分别为 0.89%,0.96% 及 1.21%,表明样品的重复性良好。

2.8 样品含量测定 选择 5 个品种茶叶,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算含量,结果见表 2。

表 2 不同品种茶叶中 3 种儿茶素含量测定结果

Tab.2 Content determination of 3 catechins in tea from different strains n=3

品种	EGC+EGCG+ECG/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/ %
湖北白毫	98.74	0.95
云南普洱	64.84	0.98
西湖龙井	93.59	1.03
铁观音	92.11	1.21
金华武义茶叶	125.63	0.89

3 讨论

儿茶素类化合物为茶叶及茶类制品中的主要活性成分。此类化合物具有较高的药用价值,是茶叶质量评定的一项重要指标。关于儿茶素的含量分析,主要有 HPLC、LC-MS 等分析方法,然而各种分析条件的摸索和建立是决定采取何种检测方法的前提。笔者曾尝试了 ODS C_{18} 色谱柱和 BDS C_{18} 色谱柱以及不同的检测波长和流动相来分析儿茶素,通过比较发现 BDS C_{18} 柱填料、波长 280 nm 以及乙腈-0.1% 柠檬酸溶液($V/V=10/90$) 作为检测条件来定量分析儿茶素较理想。

本研究结果显示,不同品种茶叶中儿茶素含量均较高,其中浙江武义茶叶中儿茶素含量最高,含量达到 125.63 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,而普洱茶中的儿茶素含量相对较低,含量仅为 64.84 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,几乎相差一半,而茶叶中儿茶素含量的降低,往往对茶叶的品质产生一定影响。然而不同品种茶叶中儿茶素含量差异较大的原因可能有多种因素,与每种茶叶的生长环境、采摘、加工以及贮存等多个环节紧密相关。

DOI 10.3870/yydb.2011.12.031

参考文献

[1] 陈义,汪小刚,宛晓春. 没食子儿茶素没食子酸酯制备新

工艺的研究 [J]. 安徽农业大学学报,2007,34(3):364-368.

[2] 毛小强,那万里,赵丹,等. 茶多酚对前列腺癌 PC-3M 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国实验诊断学,2010,14(2):170-173.

[3] 傅颖,梅松,陈建国,等. 茶多酚对高脂大鼠体质量及血清中脂代谢水平的影响 [J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(11):2506-2508.

[4] 陈悦,刘秋慧. 茶多酚对豚鼠心肌细胞钙电流及动作电位的影响 [J]. 中国药理学杂志,2010,45(3):190-192.

[5] NURULAIN T Z. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications [J]. *Life Sciences*,2006,78(18):2073-2080.

[6] DALE G N,DANEEL F,ZHOU Y D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives [J]. *Phytochemistry*,2006,67(11):1849-1855.

[7] ZHEN M C,WANG Q,HUANG X H,et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride - induced hepatic fibrosis [J]. *J Nutr Biochem*,2007,18(7):795-805.

[8] GEORGE L T,TUNG M L,EMILY C L,et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride(CCl_4) - induced liver injury in mice [J]. *Toxicology*,2010,273(1-3):45-52.

[9] 胡公义,龚裕强,王飞海,等. 茶多酚对肠缺血-再灌注后大鼠肺损伤的影响 [J]. 医药导报,2009,28(5):560-562.

[10] 戴军,王洪新,陈尚未,等. 茶叶及茶多酚中儿茶素的高效液相色谱分析方法研究 [J]. 色谱,2001,19(5):398-402.

[11] 张国民,廖予琦,王庆忠. HPLC 内标标准曲线法测定茶叶中 4 种儿茶素和咖啡因 [J]. 昆明医学院学报,2010,32(3):47-50.

[12] XU J,ZHANG G F,TAN T W,et al. One-step purification of epigallocatechin gallate from crude green tea extracts by isocratic hydrogen bond adsorption chromatography on β -cyclodextrin substituted agarose gel media [J]. *J Chrom B*,2005,824(3):323-326.

[13] CHU K O,WANG C C,CHU C Y,et al. Determination of catechins and catechin gallates in tissues by liquid chromatography with coulometric array detection and selective solid phase extraction [J]. *J Chrom B*,2004,810(2):187-195.