

HPLC 内标标准曲线法测定茶叶中 4 种儿茶素和咖啡因

张国民, 廖予琦, 王庆忠

(云南大学 化学科学与工程学院, 云南 昆明 650091)

摘要: 选用葛根素作为内标物质, 利用内标标准曲线法建立高效液相色谱同时测定茶叶中(-)表没食子儿茶素(EGC), (-)表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG), (-)表儿茶素(EC), (-)表儿茶素没食子酸酯(ECG), 咖啡因(CAF)5种组分的分析方法. 采用C18柱, 甲醇和0.05%三氟乙酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, DAD检测器, 检测波长278 nm. 结果表明, 各组分的色谱峰均达到基线分离, 该方法重复性好, 灵敏度高, 回收率高, 已用于不同种类26个茶叶样品的测定. 以这5种活性成分为指标, 采用聚类分析法可对不同来源的样品进行统计分析.

关键词: HPLC; 内标标准曲线法; 儿茶素; 咖啡碱

中图分类号: O6-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639(2010)03-0047-04

Simultaneous Determination of Four Catechins and Caffeine in Tea by the Internal Standard Curve Method Using HPLC

ZHANG Guo-min, LIAO Yu-qi, WANG Qing-zhong

(School of Chemical Science and Technology, Yunnan University, Yunnan Kunming 650091, China)

Abstract: An internal standard curve method with puerarin as an internal standard was established for measuring five components in tea simultaneously by HPLC, they are epigallocatechin(EGC), epigallocatechin gallate(EGCG), epicatechin(EC) and epicatechin gallate(ECG) and caffeine. The tea extract was separated using a C18 column (4.5 × 250 mm, 5 μm) with methanol-0.05% trifluoroacetic acid as the eluent in gradient elution mode. All components were baseline separated peaks at 278 nm accurately. This reproducibility, high sensitivity and high recovery rate are acceptable for determining the catechins and caffeine in 26 tea samples with satisfactory results. The cluster analysis has been used to discuss the results of tea samples from different origins.

Key words: HPLC; internal standard curve method; Catechins; Caffeine

茶叶中对身体健康最有益的物质首推茶多酚, 占茶叶干重的22%~30%, 其中以儿茶素为主的黄烷醇类化合物占茶多酚总量的60%~80%, 含量(质量分数)最高的几种组分为EGCG, EGC, ECG和EC, 分别占50%~60%, 15%~20%, 10%~15%, 5%~10%^[1-2]. 儿茶素还具有诸多药效^[3-5]. 茶多酚在医药、保健品、食品工业和日用化工等领域均有广泛地应用^[6].

1976年Hoefler^[7]等人首次将反相HPLC法用于茶提取液中儿茶素的分析, 1996年Goto^[8]等人建立了同时分析8种儿茶素的LC/UV方法, 但该分离方法的梯度体系复杂且分离效果又依靠柱温的变化. 国内采用反相HPLC测定茶叶中儿茶素的文献也有报道^[9-13]. 目前, 采用LC测定茶叶中儿茶素的方法分析时间都比较长, 对仪器的稳定性有较高的要求. 在LC测定过程中加入内标物质则可较好地消除由于仪器因素波动而产生的误差^[14], 本文选用葛根素作为茶多酚定量的内标物, 建立了内标标准曲线法测定茶叶中4种儿茶素和咖啡因的方法, 可

用于不同种类茶叶样品的测定.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪(DAD检测器, 美国Agilent公司); KQ-240B型超声波清洗器; ALC-210型电子天平; 25 mL比色管; 0.45 μm微孔滤膜. 甲醇(色谱纯, Fisher公司生产); 三氟乙酸(色谱纯, Fisher公司生产); 实验用水为纯净水, 其他试剂均为分析纯. 所用试剂均经0.45 μm微孔滤膜过滤.

1.2 标准品

表儿茶素[(-)-Epicatechin](EC), 表没食子儿茶素[(-)-Epigallocatechin](EGC), 表儿茶素没食子酸酯[(-)-Epicatechin gallate](ECG), 表没食子儿茶素没食子酸酯[(-)-Epigallocatechin gallate](EGCG), 均购自中国药品生物制品检定所. 葛根素(Puerarin), 咖啡因(caffeine)购自Dr. Ehrenstorfer GmbH公司.

1.3 标准溶液的配制

称取EGC 10.2 mg, EC 10.1 mg, ECG 10.0 mg,

收稿日期: 2010-05-24

基金项目: 云南大学骨干教师培训计划资助项目(W33020000)

作者简介: 张国民(1972—), 男, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要从事高效液相色谱—质谱联用仪研究.

EGCG 13.3 mg, Caffeine 16.7 mg, 葛根素 12.0 mg 分别置于 6 个 50 mL 容量瓶, 用甲醇溶解后稀释至刻度, 混匀, 作为标准储备溶液于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存. 取上述溶液 EGC 300 mL, EC, ECG 和 EGCG 各 100 mL, Caffeine 50 mL, 混匀, 再分别取 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 10.0 mL 加入到 10 mL 的容量瓶中定容到刻度线, 再分别加入葛根素 0.5 mL, 作为混合标准的工作溶液.

1.4 样品的制备

将茶叶样品在玛瑙研钵中研碎后过 40 目筛, 准

确称取约 0.10 g 于 25 mL 比色管中, 准确加入 50% 的甲醇水溶液 10 mL, 超声提取 40 min, 取经微孔滤膜过滤液 1.0 mL 到 10 mL 的容量瓶, 定容至刻度线, 然后加入 0.5 mL 的葛根素摇匀待用, 取出约 1 mL 至样品瓶待测.

1.5 色谱条件

色谱柱: Lichrospher C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相为 A: 水—三氟乙酸 (体积比为 100:0.05), B: 甲醇; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 278 nm; 柱温: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL . 梯度洗脱程序见表 1.

表 1 梯度洗脱程序

t/min	0~5	5~15	15~20	20~25	25~30	30~45	45~55	55~65	65~70
B/%	13	13~20	20	20~25	25	25~40	40~80	80~13	13

2 结果与讨论

2.1 试验条件的优化

2.1.1 提取溶剂的选择

实验分别比较了: 1) 100% 乙腈; 2) 50% 乙腈和纯水溶液; 3) 100% 甲醇; 4) 50% 甲醇和纯水作为提取溶剂的提取效率. 结果表明, 50% 甲醇和纯水, 50% 乙腈和纯水提取的茶叶溶液谱峰最多, 浸出率高; 纯水提取溶液中由于用热水浸提, 高温条件下儿茶素是不稳定的. 综合考虑, 50% 甲醇和纯水提取溶液是理想的选择.

2.1.2 不同流动相及检测波长的选择

实验分别考察了: 1) 甲醇—水; 2) 甲醇—0.05% 三氟乙酸水溶液; 3) 甲醇—0.05% 乙酸水溶液; 4) 乙腈—水; 5) 乙腈—0.05% 乙酸水溶液; 6) 乙腈—0.05% 三氟乙酸水溶液 6 种不同的流动相体系, 结果表明, 甲醇—0.05% 三氟乙酸水溶液体系的

洗脱效果最好, 加入少量三氟乙酸, 可以改善峰形, 防止峰的拖尾, 有利于提高分离度.

实验采用 DAD 检测器, 分别用波长为 278, 254, 210 nm 进行检测, 结果表明采用波长 278 nm 效果理想.

2.1.3 内标物质的选择

经分析对比, 采用大黄素, 与儿茶素能实现完全分离, 但保留时间在 49 min 左右, 丹参酮 II A 不能与儿茶素实现完全分离, 葛根素能够与儿茶素完全分离, 保留时间在 33 min 左右, 间于 EC 和 EGCE 之间, 故选用葛根素作为测定的内标物质.

2.2 内标标准工作曲线与线性范围

用葛根素作为测定的内标物质, 在相同的色谱条件下对上述已配制好的标准溶液进行测定, 以茶多酚的质量浓度为横坐标, 各种儿茶素的吸收面积 (A) 和葛根素的吸收面积 (A) 的比值为纵坐标得线性回归方程 (见表 2).

表 2 5 种组分的线性回归方程

组分	保留时间/min	线性范围/($\text{m} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)	线性回归方程	相关系数 R^2	LOD/($\text{m} \cdot \text{ng}^{-1}$)	RSD (%, $n=6$)	
						保留时间/min	峰面积
EGC	19.24	0.0377~4.2	$Y=0.0061X+0.1872$	0.997	37.7	0.75	1.18
CAF	25.53	0.0103~1.2	$Y=0.0839X+0.0257$	0.997	10.3	0.95	2.80
EGCG	28.38	0.0102~4.2	$Y=0.0356X-0.0028$	0.998	10.2	0.80	2.78
EC	31.83	0.0078~1.2	$Y=0.0159X-0.0075$	0.998	7.8	0.90	2.67
ECG	40.43	0.0077~1.1	$Y=0.0381X-0.0123$	0.998	7.7	0.95	2.92
PUERARIN	33.83					0.90	2.67

结果表明, 对所分析组分的测定均具有较宽的线性范围, 且线性关系良好 ($R^2 > 0.997$).

2.3 定性分析

根据混合标准溶液 (见图 1) 和茶样 (001) (见图 2) 的保留时间, 对比定性如下图示.

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性

以茶叶 001 样品的甲醇—水提溶液为供试品,

分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 30 h 测定其稳定性. 实验结果表明, 样品在室温条件下 0~24 h 内稳, 各色谱峰的相对标准偏差在 10% 左右.

2.4.2 精密度

取混合标准的工作溶液在相同色谱条件下重复进样 6 次, 测得了各组分的保留时间 (t_R) 和峰面积 A 的相对标准偏差 (RSD), 以考察方法的精密度 (见表 3, 表 4). 结果显示, 测定的各儿茶素及咖啡因的

保留时间(t_R)的相对标准偏差(RSD)小于1%以及峰面积A的相对标准偏差(RSD)小于3%,符合方法的要求。

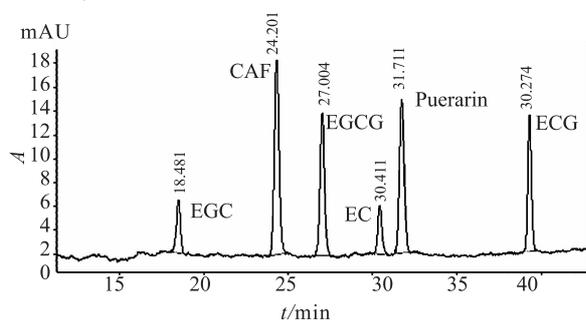


图1 混合标准溶液的色谱图(278 nm)

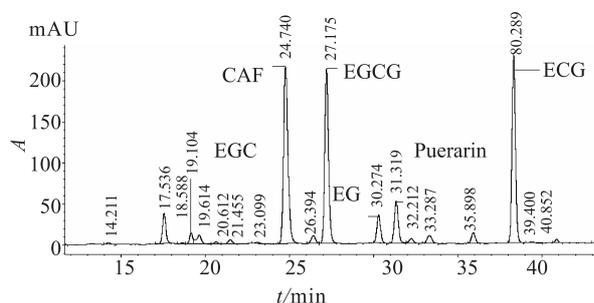


图2 茶叶样品的色谱图(278 nm)

表3 保留时间精密度实验

编号	EGC /min	CAF /min	EGCG /min	EC /min	ECG /min	PUERARIN /min
1	19.38	25.62	28.59	32.22	40.95	33.98
2	19.37	25.62	28.58	32.04	40.54	33.66
3	19.14	25.22	28.08	31.60	40.33	33.88
4	19.19	25.34	28.12	31.47	40.00	33.92
5	19.02	25.91	28.51	31.70	40.02	33.86
6	19.34	25.48	28.42	31.96	40.72	33.66
平均值	19.24	25.50	28.38	31.83	40.43	33.83
RSD/%	0.753	0.951	0.803	0.900	0.946	0.398

表4 吸收面积精密度实验

编号	EGC	CAF	EGCG	EC	ECG	PUERARIN
1	62.5	340.2	215.2	67.7	177.0	739.6
2	63.7	352.2	226.6	71.3	187.0	774.0
3	61.2	343.0	222.0	72.5	175.6	756.0
4	62.2	350.4	220.2	68.3	184.6	787.0
5	64.4	367.8	229.1	70.0	182.0	780.0
6	62.5	346.3	213.4	68.7	188.8	762.3
平均值	62.75	349.9	221.1	69.75	182.5	766.5
RSD/%	1.81	2.80	2.79	2.68	2.93	2.27

2.4.3 重复性

以编号为001的样品作为供试品,平行取样6

份按前面所述条件进行样品处理和测定,实验结果表明,各色谱峰的相对保留时间的RSD不超过4%(见表5),实测样品各组分含量(质量分数,下同)的RSD不超过4.5%(见表6),说明本方法重复性良好。

表5 保留时间重复性实验

编号	EGC /min	CAF /min	EGCG /min	EC /min	PUERARIN /min	EGC /min
1	19.06	24.67	27.10	30.54	31.86	39.46
2	18.82	24.72	27.31	30.53	31.68	38.77
3	19.83	25.52	28.52	32.06	33.92	40.88
4	19.78	25.62	28.63	32.38	34.29	41.31
5	19.68	25.59	28.63	32.28	34.18	41.07
6	19.78	25.60	28.47	32.05	33.89	40.86
平均	19.49	25.29	28.11	31.64	33.30	40.39
RSD/%	1.46	1.53	2.36	2.89	3.99	3.42

表6 儿茶素及咖啡因含量

编号	EGC/%	CAF/%	EGCG/%	EC/%	ECG/%
1	2.677	4.231	10.43	3.162	7.867
2	2.655	4.021	10.14	2.976	7.870
3	2.710	4.093	10.13	2.804	7.602
4	2.689	4.375	10.79	2.980	8.155
5	2.680	4.340	10.85	2.846	8.144
6	2.686	4.131	10.16	2.876	7.619
平均	2.683	4.199	10.42	2.941	7.876
RSD/%	0.670	3.36	3.19	4.39	3.06

2.4.4 回收率

精密称取编号为001的茶样3份,分别加入已精密称定的儿茶素和咖啡碱标准品,按以上方法测定回收率(见表7),回收率结果比较理想。

表7 回收率试验结果(n=3)

组分	样品量/ng	加入量/ng	测定量/ng	回收率/%	RSD/%
EGC	107.3	94.20	196.1	97.32	2.660
CAF	167.9	26.00	202.5	104.4	1.019
EGCG	416.7	41.00	477.5	104.3	0.932
EC	117.6	31.10	145.3	97.69	2.932
ECG	315.1	30.70	355.9	102.9	0.832

2.5 实际样品测定结果

2.5.1 26个茶叶样品的儿茶素和咖啡因含量的测定
采用上述方法,对实际采集的鲜叶茶和市场上购买的26个样品进行了儿茶素和咖啡因含量的测定,结果如表8所示。

表8 茶叶样品中5种组分含量

样品 编号	采集地点 及特征	EGC /%	CAF /%	EGCG /%	EC /%	ECG /%	总含量 /%
001	普洱	2.680	4.23	10.4	3.16	7.87	24.1
002	江城明子山	0.653	3.93	11.8	1.25	5.08	18.8
003	东塔	0.521	4.85	4.77	1.71	6.73	13.7
004	东塔	0.391	4.64	2.98	0.815	6.38	10.6
005	无量山	0.746	3.56	6.36	1.87	5.44	14.4
006	普宁茶厂	0.469	3.34	5.65	0.476	3.49	10.1
007	普洱(熟茶)	0.080	2.68	0.374	0.332	0.290	1.08
008	普洱(熟茶)	0.089	2.48	0.572	0.047	0.256	0.964
009	普洱(熟茶)	0.389	2.63	7.72	2.71	5.65	16.5
010	紫芽	0.041	2.22	0.568	0.047	0.971	1.63
011	台地	0.070	3.98	3.84	1.65	6.93	12.5
012	东塔	0.069	4.49	2.70	0.761	6.21	9.73
013	太达老凤寨	0.041	3.47	3.37	1.80	2.98	8.20
014	因远	0.041	1.99	1.50	0.722	2.43	4.70
015	因远	0.041	3.67	6.44	1.43	5.29	13.2
016	沅桥	0.059	2.14	2.94	1.14	3.06	7.19
017	东塔	0.071	2.19	5.33	1.10	5.35	11.8
018	百年乔树茶	0.041	3.47	2.04	1.51	4.31	7.91
019	太达老凤寨	0.041	5.29	4.79	0.946	2.19	7.97
020	百年乔树茶	0.041	2.78	1.32	1.12	3.68	6.15
021	太达老凤寨	0.041	4.87	7.13	1.32	2.81	11.3
022	白口茶	0.041	0.966	1.13	0.950	2.61	4.73
023	苦聪山老茶	0.078	1.77	3.94	1.66	3.03	8.70
024	无量山春茶	0.066	2.41	4.97	1.32	4.36	10.7
025	大渡岗	0.041	3.82	3.58	1.01	4.20	8.84
026	普洱	0.096	3.40	7.68	0.613	1.87	10.3

2.5.2 26个茶叶样品的聚类分析

采用 SPSS13.0 软件包中的聚类分析程序对所测定 26 个茶叶样品进行聚类分组。在方法上采用欧式距离测量,每两样品间用 Average Linkage 法连接^[13],聚类结果见图 3 所示。从图中可知,当取临界值大于 10 时,26 个样品可以分别聚为两类,23 个生茶为一类,2 个熟茶和 1 个紫芽样品为一类,其中熟茶为发酵茶,其中的儿茶素类物质含量明显低,紫芽由于受日光照强烈,儿茶素含量也降低,所以聚为一类;当取临界值为 5 时,26 个茶叶样品分别聚为 4 类,第 1 类包含了 9 个未经加工的鲜茶叶;第二类包括 2 种太达老凤寨鲜茶叶和晒青成品茶;第三类包括 12 种晒青或炒青成品茶;第四类包括 3 种茶叶,其中 2 种熟茶和 1 种生茶。聚类分析结果表明,以 5 种主要组分含量作为评价指标,可以对不同种类、不同产地、以及不同加工工艺的茶叶进行合理区分,体现不同茶叶之间的种类、产地和工艺差别^[13],可为茶叶的品质鉴定提供参考。

3 小 结

选用葛根素为内标物,利用内标标准曲线法建立了高效液相色谱同时测定茶叶 5 种活性成分的方

法,该法重复性好,灵敏度高,回收率高,可用于不同种类茶叶样品的测定。

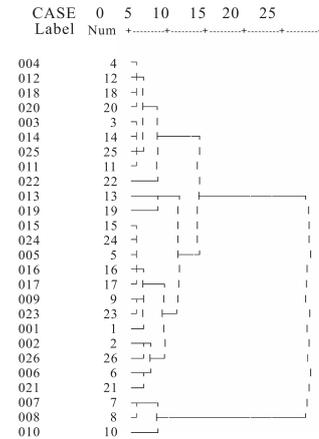


图3 26个茶叶样品系统聚类分析图

[参考文献]

- [1]魏泱,丁明玉. 茶多酚的色谱分析法[J]. 色谱,2000,18(1):35-38.
- [2]赵和涛. 茶叶中特殊化学物质及开发利用[J]. 热带作物科技,1995(5):12-14.
- [3]LI J K. Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, pu-erh and black teas[J]. J Agric food Chem,1998,46:3635-3642.
- [4]JANKON J, SELMAN S H, SWIERCZ R, et al. Why drinking green tea could prevent cancer[J]. Nature,1997,387:561.
- [5]张睿,肖文平,田维熙. Inhibitory effects of green tea extract on fatty acid synthase[D]. 昆明:云南大学,2004.
- [6]杨贤强,王岳飞,陈留记. 茶多酚化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2003.
- [7]GOTO T, YOSHIDA Y, KISO M, et al. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea [J]. J Chromatography A, 1996,749(2):295-299.
- [8]DALLUGE J J, NELSON B C, THOMAS J B, et al. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high performance liquid chromatography[J]. J Chromatography A, 1998,793(2):264-274.
- [9]钟世安,周春山,李宇萍. 反相高效液相色谱法同时测定茶叶中六种儿茶素组分的研究[J]. 理化检验:化学分册,2003,39(9):542-544.
- [10]张莉,段宏瑾,方洪钜,等. 茶儿茶素和生物碱成分的 HPLC 分析[J]. 茶叶科学,1995,15(2):141-144.
- [11]罗晓明,蒋雪薇. 高效液相色谱快速测定茶叶中儿茶素的含量[J]. 湖北化工,2003(1):46-48.
- [12]凌云,赵云峰,李志军,等. 茶叶及茶饮料中儿茶素和咖啡因的多组分 HPLC 分析方法[J]. 卫生研究,2005,34(2):187-190.
- [13]康海宁,陈波,韩超,等. HPLC 法测定茶叶水提液中五种儿茶素和咖啡碱及其用于茶叶分类的研究[J]. 分析测试学报,2007,26(2):211-215.
- [14]汪正范. 色谱定性定量[M]. 北京:化学工业出版社,2004.