

高效液相色谱法同时测定茶叶中 8 种儿茶素、3 种嘌呤碱和没食子酸

李银花, 李娟, 龚雪, 刘仲华*

(国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南农业大学 茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 建立高效液相色谱同时测定茶叶中 8 种儿茶素(EGC、DL-C、EC、EGCG、GCG、EGCG4 Me、EGCG3 Me、ECG)、3 种生物碱(茶碱、可可碱、咖啡碱)和没食子酸的方法。色谱条件为 Welchrom C₁₈(250mm × 4.6mm, 5 μm) 色谱柱、磷酸缓冲液-乙腈溶液为流动相、梯度洗脱、波长 278nm、流速 1.0mL/min、柱温 30 。采用此方法, 茶叶中各种成分都能达到基线分离的效果, 线性关系良好, 具有良好的稳定性和准确度。

关键词: 高效液相色谱(HPLC); 儿茶素; 甲基化 EGCG; 嘌呤碱; 没食子酸

Simultaneous Determination of Eight Catechins, Three Purine Alkaloids and Gallic Acid in Tea by High-performance Liquid Chromatography

LI Yin-hua, LI Juan, GONG Xue, LIU Zhong-hua*

(National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Functional Ingredients from Botanicals, Key Laboratory of Tea Science, Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: A method was developed to determine catechins, purine alkaloids and gallic acid in tea by HPLC-PDA. The optimum condition was achieved by separation on a Welchrom C₁₈ column kept at 30 using phosphate buffer-acetonitrile as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min through gradient elution and detection at 278 nm. This method showed a good linearity for all 12 tested compounds. The results demonstrated high accuracy and stability of this method.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); catechin; methylated EGCG; purine alkaloid; gallic acid

中图分类号: TS272.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0214-04

茶叶是世界上消费量最大的饮料之一。儿茶素是茶叶中最重要的生理活性物质, 约占多酚类 80%, 其主要由表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)和表儿茶素(EC)等单体组成^[1]。儿茶素的许多生理和药理功能已被证实, 如抗氧化、抗诱变/抗癌、抗动脉粥样硬化和抗菌等。20 世纪 90 年代末期, Mitsuaki 等^[2]从台湾冻顶乌龙中分离纯化出两种甲基化 EGCG, 其分子结构分别为(-)-表没食子儿茶素-3-O(3-O-甲基)没食子酸酯(EGCG3 Me)和(-)-表没食子儿茶素-3-O(4-O-甲基)没食子酸酯(EGCG4 Me)。

研究发现, 这两种甲基化 EGCG 具有高效的抗过敏功效, 尤其是抗花粉过敏表现出的优势, 而且他们的生物学功能已经在体内和体外的临床研究中得以证实^[3-9]。花粉症已成为变态性疾病中最常见的疾病之一, 如大约有 30% 的日本人患有不同程度的花粉过敏症, 因此有关甲基化 EGCG 的研究引起了日本业界的高度重视, 也掀起了研究甲基化 EGCG 的热潮。因此有必要建立一种同时分析茶叶中儿茶素、甲基化 EGCG、嘌呤碱和没食子酸的高效液相色谱方法, 为我国开展甲基化 EGCG 茶树资源的筛选和分离纯化研究提供依据。

收稿日期: 2010-10-28

基金项目: 湖南省重大科技专项(07FJ1005)

作者简介: 李银花(1977—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事植物功能成分分离纯化与分析检测研究。

E-mail: liyinhua1012@126.com

* 通信作者: 刘仲华(1965—), 男, 教授, 硕士, 主要从事茶植物功能成分的开发与利用研究。

E-mail: larkin-liu@163.com

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

日本 Benifuji 绿茶; 湖南农业大学长安基地资源圃采集的茶叶。

KH₂PO₄(分析纯); 纯水; 甲醇(色谱纯); 乙腈(色谱纯和分析纯); 磷酸(分析纯); 食用酒精; EGCG4 Me、EGCG3 Me 日本长良科技有限公司; 茶碱(fluka); 其他对照品 美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

LC-10ATVP 高效液相色谱仪、LC-solution 色谱数据工作站 日本岛津公司; KQ3200B 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; D8611 纯水发生器 美国 Thermo 公司; 320pH Meter pH 计、AE240 电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司; SKY-200B 摇床 上海苏坤实业有限公司; 35R 离心机 德国 Rotina 公司; DSY-2-8 水浴锅 北京国华医疗器械厂。

1.3 色谱条件

LC-10ATVP 高效液相色谱仪, PDA 检测器, Welchrom C₁₈ 色谱柱; 流动相为 KH₂PO₄ 磷酸缓冲液(0.02mol/L, pH2.5)- 乙腈溶液, 梯度洗脱程序: 0~15min, B 泵乙腈维持 13%, 15~25min, 13% B 线性升至 20% B, 保持 5min 后于 2min 内降至 13% B; 流速: 1.0mL/min; 进样量 10mL; 波长 278nm; 柱温 30 。

1.4 对照品溶液的制备

分别称取各对照品适量, 用纯水溶解定容, 并用 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤, 待用。

1.5 供试品溶液的制备

1.5.1 茶叶提取物

称取茶叶提取物适量于容量瓶中, 加入纯水超声溶解后定容, 并用 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液待用。

1.5.2 茶叶原料

准确称取干燥的茶叶粉末 150mg 左右, 加入体积分数 75% 乙醇溶液 25mL、30 以 120r/min 浸提 40min, 8000r/min 离心 15min, 取上清液稀释 1 倍, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液待用。

2 结果与分析

2.1 流动相 pH 值的选择

选用水-乙腈、磷酸缓冲盐(pH2.5)-乙腈两种流动相分离茶叶中的各种成分。从结果看, 虽然用水-乙腈流动相也能将茶叶中的各种成分分开, 但加入一定量的酸明显改善色谱图的峰形, 减少多酚类化合物拖尾的现象。本实验选用磷酸缓冲液分离茶叶中的各种成分, 其色谱图如图 1b 所示, 各种成分均可达到基线分离的效果。

2.2 不同前处理方法的选择

选用水(A)、75% 乙醇溶液(B)、水-乙腈(1:1, V/V)(C)^[10]3 种溶剂按照 1.5.2 节的方法处理茶叶样品, 并与 GB/T 8313—2002《茶多酚测定》(D)、GB/T 8313—2008《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》(E)前处理方法处理茶叶原料相比较, 找到简单经济的茶叶原料处理方法, 每个方法处理两个平行取其平均值, 茶碱含量在此茶叶原料中的含量低于 0.001%, 未予以考虑。其结果如表 1 所示, 经过方差分析发现: 方法 B 和方法 C 对于酯型儿茶素 EGCG、ECG、EGCG4 Me、EGCG3 Me 和咖啡碱的提取效果最佳, 二者之间差异不明显; 酯型儿茶素 GCG 在方法 D 中含量最高, 这是因为在高温条件下儿茶素异构化的原因而形成, 同时 EGC 在此方法中含量最低, 也是因为高温的异构化反应; 方法 A 对于简单儿茶素 EC、EGC 和没食子酸的提取效果高于其他方法; 方法 E 的提取效果仅次于 B 和 C。考虑到乙腈的价格和毒性问题, 本实验选用 75% 乙醇溶液处理茶叶样品能达到较好的效果。

表 1 不同提取方法对茶叶原料有效成分含量的影响

Table 1 Effect of extraction methods on the determination of 11 target analytes in tea %

标成分含量	方法				%
	A	B	C	D	
没食子酸	0.0765	0.00476	0.00368	0.0145	0.00568
可可碱	0.173	0.188	0.126	0.199	0.193
EGC	3.805	3.363	3.374	2.900	3.280
咖啡因	3.296	3.666	3.634	3.517	3.570
DL-C	0.107	0.0655	0.073	0.105	0.100
EC	1.412	0.874	0.874	0.871	0.922
EGCG	8.042	11.923	11.827	8.858	11.307
GCG	0.0205	0.024	0.020	1.604	0.0305
EGCG4 Me	0.246	0.350	0.340	0.241	0.300
EGCG3 Me	1.153	1.726	1.708	1.252	1.648
ECG	1.159	2.459	2.400	1.865	2.309

2.3 方法的线性范围

表 2 方法线性范围

Table 2 Linear equations with correlation coefficients and linear ranges of 11 target analytes

成分	线性方程	相关系数 r	线性范围/ μg
没食子酸	$Y = 30733962.8X + 3654.59$	0.9999	$1.724 \times 10^{-4} \sim 0.414$
可可碱	$Y = 2957554.4X + 8324.71$	0.9999	$1.463 \times 10^{-3} \sim 0.878$
茶碱	$Y = 30687632.6X + 18688.67$	0.9998	$2.838 \times 10^{-4} \sim 0.445$
EGC	$Y = 222946.2X + 5332.96$	0.9997	$7.155 \times 10^{-2} \sim 5.3664$
咖啡因	$Y = 2697583.1X + 38331.27$	0.9998	$1.578 \times 10^{-3} \sim 2.367$
DL-C	$Y = 618129.1X + 3354.90$	0.9999	$2.150 \times 10^{-2} \sim 3.225$
EC	$Y = 721771.9X + 737.94$	0.9999	$3.326 \times 10^{-2} \sim 4.990$
EGCG	$Y = 1383018.5X + 19150.50$	0.9999	$2.982 \times 10^{-2} \sim 4.473$
GCG	$Y = 1361874.7X + 7840.14$	0.9996	$2.187 \times 10^{-2} \sim 3.281$
EGCG4 Me	$Y = 514639.8X + 3231.38$	0.9999	$9.800 \times 10^{-3} \sim 1.96$
EGCG3 Me	$Y = 1238685.0X + 1022.23$	0.9999	$7.409 \times 10^{-3} \sim 3.334$
ECG	$Y = 142663.2X + 14135.85$	0.9997	$1.467 \times 10^{-2} \sim 5.870$

精密称取各对照品适量,用三重水溶解后并定容,作为标准储备液,将储备液进行稀释配成不同质量浓度的标准品溶液,在1.3节所述条件下进行测定,以进样量为横坐标、峰面积为纵坐标作线性回归,其线性回归方程、相关系数、线性范围如表2所示。测定结果表明,进样量 $X/(\mu\text{g})$ 与峰面积 $Y/(\mu\text{V} \cdot \text{s})$ 呈良好的线性关系。

2.4 方法的精密度

取同一质量浓度各对照品溶液在同1d连续进样5次以考察方法精密度,测定其保留时间和峰面积的相对标准偏差,结果如表3所示。

表3 方法的精密度、检测限和定量限

Table 3 Precision, limits of detection and limits of quantification of the method

成分	保留时间 RSD/%	峰面积 RSD/%	检测限/ μg	定量限/ μg
没食子酸	0.228	1.636	1.379×10^{-5}	3.448×10^{-5}
可可碱	0.188	1.705	2.925×10^{-3}	7.313×10^{-3}
茶碱	0.195	1.043	1.112×10^{-4}	4.448×10^{-5}
EGC	0.373	1.576	7.155×10^{-3}	1.788×10^{-2}
咖啡因	0.0968	0.969	3.124×10^{-4}	7.890×10^{-4}
DL-C	0.447	1.274	2.150×10^{-3}	5.376×10^{-3}
EC	0.556	1.466	6.653×10^{-3}	1.663×10^{-2}
EGCG	0.764	1.262	2.982×10^{-3}	7.455×10^{-3}
GCG	0.192	1.223	1.367×10^{-3}	5.469×10^{-3}
EGCG4 Me	0.250	0.832	2.616×10^{-3}	6.530×10^{-3}
EGCG3 Me	0.224	1.129	1.482×10^{-3}	3.704×10^{-3}
ECG	0.215	1.347	2.935×10^{-3}	7.337×10^{-3}

2.5 检测限和定量限

将各对照品溶液配成低质量浓度的溶液进样,以 $R_{SN} 10$ 为定量限、 $R_{SN} 3$ 为检测限,进样量如表3所示。表3表明,用该方法来检测茶叶中的各种成分灵敏度高,微量成分也能被检测和定量。

2.6 方法的回收率实验

本实验采用标准加入法进行方法准确度测定。取已知含量的样品1份,加入对照品,按1.5.2节方法处理样品,在1.3节所述条件下进行测定,以3次进样测定计算平均值。测定结果如表4所示,各组分的回收率在97%~100.62%之间。

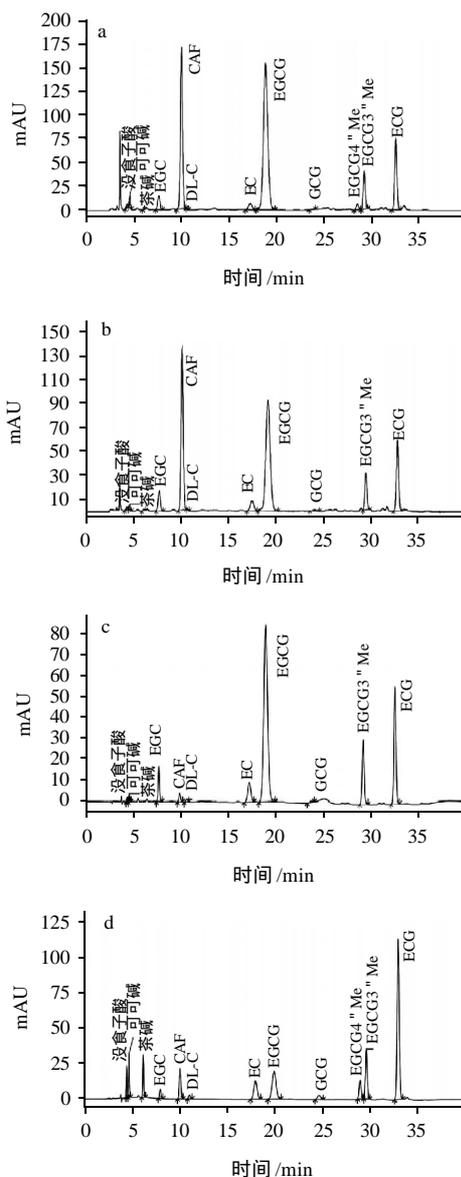
表4 回收率测定

Table 4 Recoveries for 11 target analytes in a known sample

名称	初始值/mg	加入量/mg	检出量/mg	回收率/%
没食子酸	0.00476	0.338	0.3328	97.09
可可碱	0.188	3.05	3.258	100.62
茶碱	0.00107	0.343	0.3356	97.81
EGC	3.363	10.12	13.258	98.33
咖啡因	3.666	3.15	6.734	98.80
DL-C	0.0655	8.52	8.328	97.00
EC	0.874	15.2	15.64	97.30
EGCG	11.923	10.28	21.58	97.19
GCG	0.024	8.32	8.258	98.97
EGCG4 Me	0.350	10.15	10.243	97.55
EGCG3 Me	1.726	8.58	10.098	97.98
ECG	2.459	4.32	6.581	97.08

2.7 样品分析

由于甲基化EGCG在茶树中的含量甚少和有些品种没有EGCG4 Me的特点,本实验选择两种茶叶原料来分析,一种茶叶原料(A)同时含有两种甲基化EGCG,另1种茶叶原料为日本Benifuji绿茶(B),仅含有EGCG3 Me。按照供试品溶液的制备方法处理茶叶样品和茶叶提取物,其色谱图如图1a~1c所示,对照品图谱如图1d所示,茶叶原料A中EGCG4 Me和EGCG3 Me的含量分别为0.189%和0.711%,茶叶原料B的含量高达1.44%,茶叶提取物是用日本绿茶经过处理后,其EGCG3 Me为8.671%,从色谱图上可知,各种成分都能够达到基线分离的效果。



a. 茶叶原料 A; b. 茶叶原料 B; c. 茶叶提取物; d. 对照品。

图1 各样品的高效液相色谱图

Fig.1 Chromatograms of tea, tea extract and mixed standard substances

3 结 论

本实验建立了茶叶中8种儿茶素(EGC、DL-C、EC、EGCG、GCG、EGCG4 Me、EGCG3 Me、ECG)、3种生物碱(茶碱、可可碱、咖啡碱)和没食子酸的HPLC测定方法,色谱条件为Welchrom C₁₈(250mm × 4.6mm, 5 μm)色谱柱、磷酸缓冲液-乙腈溶液为流动相、梯度洗脱、波长278nm、流速1.0mL/min、柱温30℃,方法的精密性、通用性好。该方法除了可以同时测定两种甲基化EGCG外,还能监控茶叶中的其他成分,对茶叶资源的筛选提供强有力的分析工具。

参 考 文 献 :

- [1] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [2] MITSUAKI S, MASAZUMI S, TOSHIO M, et al. Novel anti-allergic catechin derivatives isolated from oolong tea[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(5): 1906-1910.
- [3] YAMAMOTO M M, NAGAI H, ASAI K, et al. Changes in epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate and strictinin contents of tea (*Camellia sinensis* L.) cultivar 'Benifiki' in various degrees of maturity and leaf order[J]. Food Sci Technol Res, 2004, 10(2): 186-190.
- [4] SUZUKI M, YOSHINO K, YAMAMOTO M M, et al. Inhibitory effects of tea catechins and *O*-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate on mouse type I allergy[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(11): 5649-5653.
- [5] YAMAMOTO M M, INAGAKI N, KITaura J, et al. *O*-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells [J]. The Journal of Immunology, 2004, 72(1): 4486-4492.
- [6] OHMORI Y, ITO M, KISHI M, et al. Antiallergic constituents from oolong tea stem[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(5): 683-686.
- [7] KAWASE M, WANG R, SHIOMI T, et al. Antioxidative activity of (-)-epigallocatechin-3-(3-*O*-methyl) gallate isolated from fresh tea leaf and preliminary results on its biological activity[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(10): 2218-2220.
- [8] FUJIMURA Y, UMEDA D, YANOS S, et al. The 67kDa laminin receptor as a primary determinant of anti-allergic effects of *O*-methylated EGCG [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 364(1): 79-85.
- [9] FUJIMURA Y, TACHIBANA H, YAMAMOTO M M, et al. Antiallergic tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)-gallate, suppresses *FcεR1* expression in human basophilic KU812 cells[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(20): 5729-5734.
- [10] YAMAMOTO M M, NAGAI H, SUZUKI Y, et al. Manufacturing method for low caffeine 'Benifuki', 'Banihomare' green tea remaining the contents of anti-allergic compounds[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 2004, 51(8): 435-439.