

不同仪器检测方法及标准品对保健食品中茶多酚含量测定的影响

周利平¹, 何志敏², 潘小红^{2*}

(1. 湖南省科技交流交易中心, 长沙 410001; 2. 湖南省药品检验研究院, 长沙 410001)

摘要: **目的** 以茶多酚及没食子酸为标准品, 分别采用紫外分光光度法及高效液相色谱法测定保健食品中茶多酚含量。**方法** 通过对市场上部分宣称含茶多酚的保健食品进行测定, 探讨不同仪器检测方法、不同标准物质对保健食品中茶多酚含量的影响。**结果** 高效液相色谱法测定的结果均低于紫外分光光度法, 其中紫外分光光度法测定中, 以茶多酚为标准品测定结果低于以没食子酸为标准品的结果。**结论** 测定保健食品样品中茶多酚含量时, 应根据产品的原辅料及目的进行仪器方法及标准品的选择。

关键词: 保健食品; 茶多酚; 高效液相色谱法; 紫外分光光度法

Effects of different instrument testing methods and standard substances on determination of tea polyphenols in health food

ZHOU Li-Ping¹, HE Zhi-Min², PAN Xiao-Hong^{2*}

(1. Hunan Science and Technology Exchange Center, Changsha 410001, China; 2. Hunan Institute for Food and Drug Control, Changsha 410001, China)

ABSTRACT: Objective To establish methods for determination of tea polyphenols in health food by high performance liquid chromatography (HPLC) and ultraviolet (UV) spectrophotometry using tea polyphenols and gallic acid as standards. **Methods** Through the detection of the part of health food which declared containing tea polyphenols in the market, the effects of different instrument testing methods and standard substances on determination of tea polyphenol in health food were analyzed. **Results** The results by HPLC were lower than those by UV spectrophotometry. The results using tea polyphenols as standard substances were lower than those using gallic acid in UV spectrophotometry. **Conclusion** The selection of instrument testing methods and standard substances shall be carried out according to the product of raw materials and purpose in the determination of tea polyphenols in health food.

KEY WORDS: health food; tea polyphenols; high performance liquid chromatography; ultraviolet spectrophotometry

1 引言

茶多酚是茶叶中酚类物质及其衍生物的总称, 又称

作茶鞣质、茶单宁^[1], 茶多酚由儿茶素类、黄酮甙类、花青甙类、酚酸类、缩酚酸类等 30 多种化学物质组成, 其中儿茶素类化合物是茶多酚的主要成分, 约占茶多酚含量的

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2016JJ6079)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2016JJ6079)

*通讯作者: 潘小红, 助理研究员, 主要研究方向为食品、药品、保健食品及化妆品的检验及研发。E-mail: panxiaohong56781@163.com

*Corresponding author: PAN Xiao-Hong, Researcher Assistant, Hunan Institute for Food and Drug Control, No.60, Bayi Road, Furong District, Changsha 410001, China. E-mail: panxiaohong56781@163.com

65%~80%左右^[2]。研究发现茶多酚具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗辐射、抗高血脂、延缓衰老等药理和保健作用, 有关茶多酚的研究目前已成为药学领域的研究热点^[3-6], 茶叶及其提取物茶多酚被广泛应用于保健食品中, 国家食品药品监督管理局网站查询宣称含茶多酚或绿茶的保健食品近 62 条^[7], 茶多酚已成为保健食品中的主要功能/标志性成分, 茶多酚含量高低, 不仅是茶叶及茶多酚制品(茶饮料、茶食品、保健品)质量的重要指标, 也可衡量其药用价值, 用于茶树多酚代谢的生理调控机制研究^[8], 所以建立准确、高效的茶多酚检测方法非常重要。

目前保健食品中茶多酚含量测定主要质量标准有 GB 8313-2008《茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法》^[9]、GB 1886.211-2016《食品安全国家标准食品添加剂 茶多酚(又名维多酚)》^[10]、QB 2154-95《食品添加剂茶多酚》^[11]、GB/T 31740.2-2015《茶制品第 2 部分: 茶多酚》^[12], 仪器方法有紫外分光光度法及高效液相色谱法, 包括以没食子酸为标准品的总量检测(以没食子酸计)及以没食子酸、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、没食子酸酯等为标准品的组分检测 2 部分, 以茶多酚为标准品进行含量检测的仅有侯冬岩等^[13]在采用茶多酚标准品测定绿茶中茶多酚的含量中有报道。茶多酚为混合物, 不同组分的吸收值差异不同^[8], 以单一或几种成分为代表测定, 不能准确反映样品中茶多酚的含量。

本研究以茶多酚及没食子酸为标准品, 分别采用紫外分光光度法及高效液相色谱法测定分析, 并对市场上部分宣称含绿茶或茶多酚的保健食品结果进行比较, 以期对茶多酚含量测定中标准品及仪器测定方法的选择提供参考。

2 材料与amp;方法

2.1 试验原料

绿藻保健茶, 湖南海济药业有限公司, 批号为 20151201、20151202、20151203。

2.2 仪器与试剂

Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国戴安公司);

UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); SBZS-12D 超声波清洗器(中国 SCIENTZ 公司); TB-215D 电子分析天平(美国 DENVER 公司)。

没食子酸标准品: 批号: 11221, 纯度: 97.8%, 购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH; 去咖啡因的绿茶多酚标准品: 批号: FOH142, USP Certificate。

2.3 实验方法

2.3.1 仪器条件的选择

紫外分光光度法: 在 190~900 nm 波长范围内, 中速扫描, 确定其最大吸收波长。

高效液相色谱法: 色谱柱: Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 检测器: 二极管阵列; 检测波长: 278 nm; 流动相 A: 0.4%乙酸+0.004%EDTA; 流动相 B: 乙腈, 梯度洗脱程序见表 1; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2.3.2 供试品溶液的制备

参照 GB 8313-2008《茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法》^[6]测定。

样品前处理: 精密称取 0.2 g 均匀磨碎的试样于 10 mL 离心管中, 加入 70 °C 中预热过的 70%的甲醇溶液 5 mL, 用玻璃棒充分搅拌均匀湿润, 立即移入 70 °C 水浴中, 浸提 10 min(隔 5 min 搅拌 1 次), 浸提后冷却至室温, 转入离心机 3500 r/min 转速下离心 10 min, 将上清液转移至 10 mL 容量瓶中。残渣再用 5 mL 的 70%的甲醇溶液提取 1 次, 重复以上操作, 合并提取液定容至 10 mL, 摇匀, 作为母液。

高效液相色谱法: 精密吸取样品母液 1 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用 10 mg/mL EDTA:10 mg/mL 抗坏血酸溶液:乙腈(1:1:2, V:V:V)的混合溶液定容至刻度, 过 0.45 μm 膜。

紫外分光光度法: 精密吸取样品母液 1 mL 至 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀, 精密量取标准溶液、空白及样品测试液各 1 mL 于 10 mL 刻度试管内, 在每个试管内分别加入 5.0 mL 的 10%福林酚试剂, 摇匀。反应 5 min 内, 加入 4.0 mL 7.5%碳酸钠溶液, 加水至刻度, 摇匀。室温下放置 60 min, 在最大吸收波长条件下用紫外分光光度计测定吸光度(A)。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0.00	90	10	22.00	80	20
6.00	90	10	23.00	20	80
12.00	77	23	28.00	20	80
15.00	77	23	29.00	90	10
18.00	80	20	31.00	90	10

2.3.3 标准溶液的配制

标准储备溶液: 分别精密称取没食子酸、茶多酚标准品约 50 mg, 用甲醇溶解并稀释定容至 25 mL 容量瓶中, 摇匀, 作为标准品储备液(2 mg/mL)。

高效液相色谱法: 临用前用 10 mg/mL EDTA:10 mg/mL 抗坏血酸溶液:乙腈(1:1:2, V:V:V)的混合溶液将没食子酸稀释成浓度为 1~40 $\mu\text{g/mL}$ 标准使用液, 茶多酚稀释成浓度为 10~400 $\mu\text{g/mL}$ 标准使用液。

紫外分光光度法: 用水将没食子酸及茶多酚标准品标准储备液分别稀释成浓度为 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 标准使用液, 精密量取 1 mL 于 10 mL 刻度试管内, 以下同“2.3.2 供试品溶液制备中紫外分光光度法”, 在每个试管内分别加入 5.0 mL 的 10%福林酚试剂……”操作。

3 结果与分析

3.1 紫外分光光度法

3.1.1 仪器及检测波长的选择

没食子酸及茶多酚的紫外可见扫描光谱图见图 1。从图 1 可以看出, 没食子酸的紫外可见最大吸收波长为 756.4 nm, 茶多酚的紫外可见最大吸收波长为 751.80 nm, 与 GB 8313-2008《茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法》^[6] 规定的测定波长 765 nm 不一致, 参照《中国药典 2015 年版》(四部)0401^[14]紫外-可见分光光度法的要求, 吸收峰波

长应在该品种项下规定的波长 ± 2 nm 以内, 并以吸光度最大的波长作为测定波长, 本研究选择没食子酸测定波长为 756 nm, 茶多酚测定波长为 751 nm。

3.1.2 线性分析

以浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 分别绘制没食子酸及茶多酚的标准曲线, 计算回归方程。没食子酸及茶多酚在浓度 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。没食子酸及茶多酚的标准曲线图见图 2。

3.1.3 测定结果分析

分别以没食子酸及茶多酚为标准品, 对湖南海济药业有限公司绿藻保健茶 3 批样品进行测定, 见表 2。

表 2 以没食子酸及茶多酚为标准品的样品测定结果(紫外分光光度法)($n=3$)

Table 2 Results of samples using gallic acid and tea polyphenols as standards (UV) ($n=3$)

项目	结果(g/100 g)		
批号	20151201	20151202	20151203
以没食子酸为标准品	7.23	7.32	7.22
以茶多酚为标准品	6.61	6.72	6.59
RSD%/偏差	6.3%/0.62	6.0%/0.60	6.4%/0.63
平均 RSD%/偏差	6.3%/0.61		

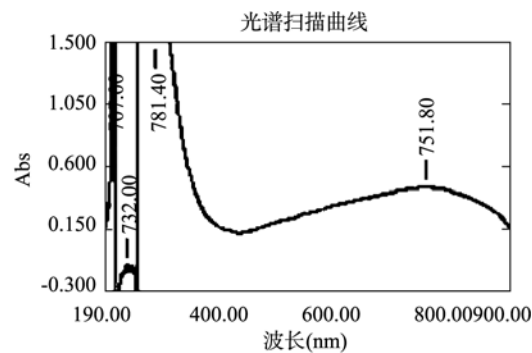
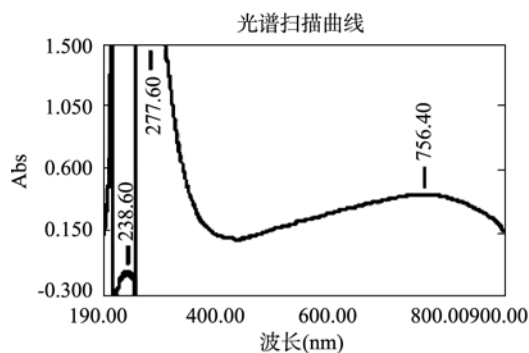


图 1 没食子酸及茶多酚的紫外可见扫描光谱图(左-没食子酸; 右-茶多酚)

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of gallic acid and tea polyphenols (left-gallic acid, right-tea polyphenols)

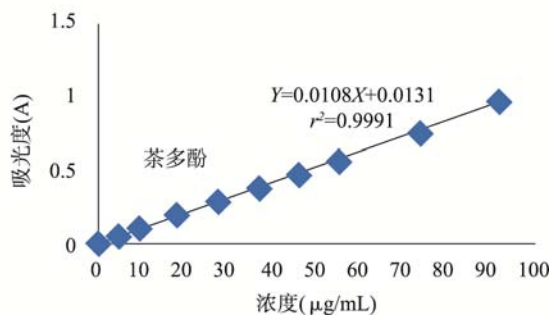
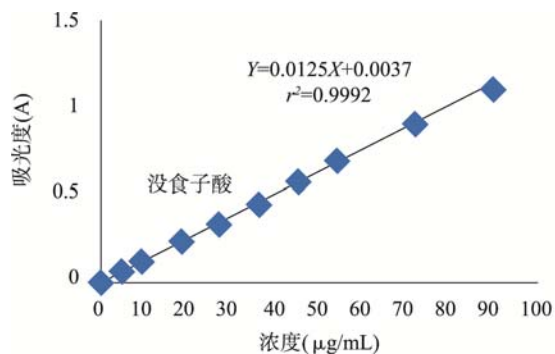


图 2 没食子酸及茶多酚的标准曲线图

Fig. 2 Standard curves of gallic acid and tea polyphenols

从表 2 中可以看出, 以茶多酚为标准品测定的结果低于以没食子酸为标准品的结果, 测定结果相对标准偏差为 6.3%, 根据 GB8313-2008《茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法方法二 茶叶中茶多酚的检测》(紫外分光光度法) 重复性规定, 不能满足“同一样品, 每 100 g 试样不得超过 0.5 g”的要求, 表明分别以茶多酚和没食子酸为标准品, 紫外分光光度法测定结果存在较大差异。

3.2 高效液相色谱法

3.2.1 标准品的测定

本研究对没食子酸及茶多酚标准品进行了高效液相

色谱分析, 图 3 为没食子酸标准品、茶多酚标准品及样品的高效液相色谱图, 图 4 为没食子酸及茶多酚标准品中部分组分的光谱扫描图。从图 3、图 4 看出, 没食子酸最大吸收波长为 272 nm 的单一标准品; 茶多酚标准品为一组最大吸收波长在 272~281 nm、包含没食子酸的混合标准品。

3.2.2 样品含量结果测定

从图 3 可以看出, 样品为包含没食子酸、约有 13 个峰的混合物。以不同标准品计算的样品中茶多酚的含量结果见表 3。

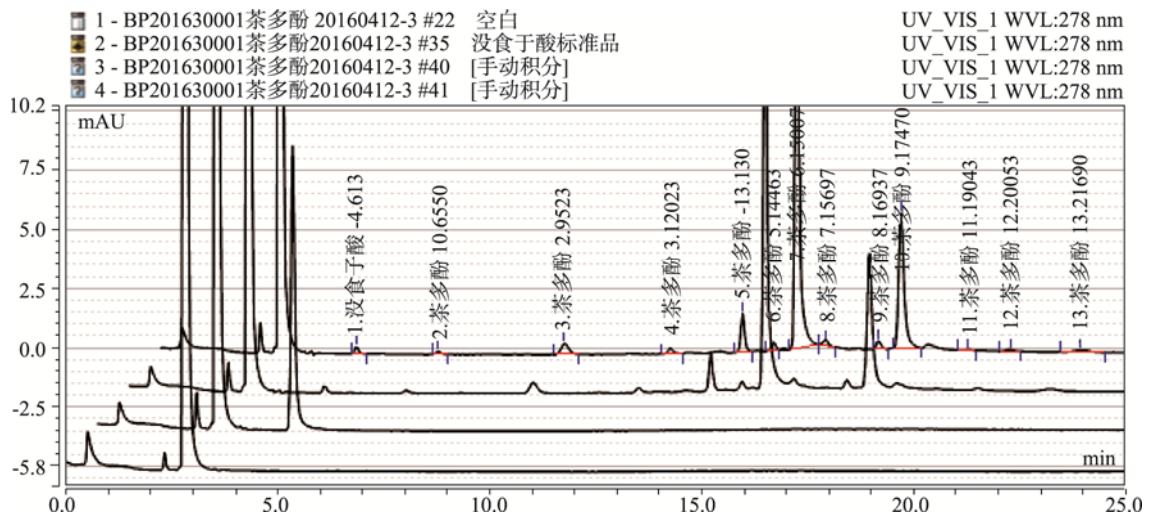


图 3 没食子酸、茶多酚及样品的色谱图(从上往下依次为: 空白、没食子酸标准品、茶多酚标准品及样品)

Fig. 3 Chromatogram of gallic acid, tea polyphenols and sample (From up to down: blank, gallic acid, tea polyphenols and sample)

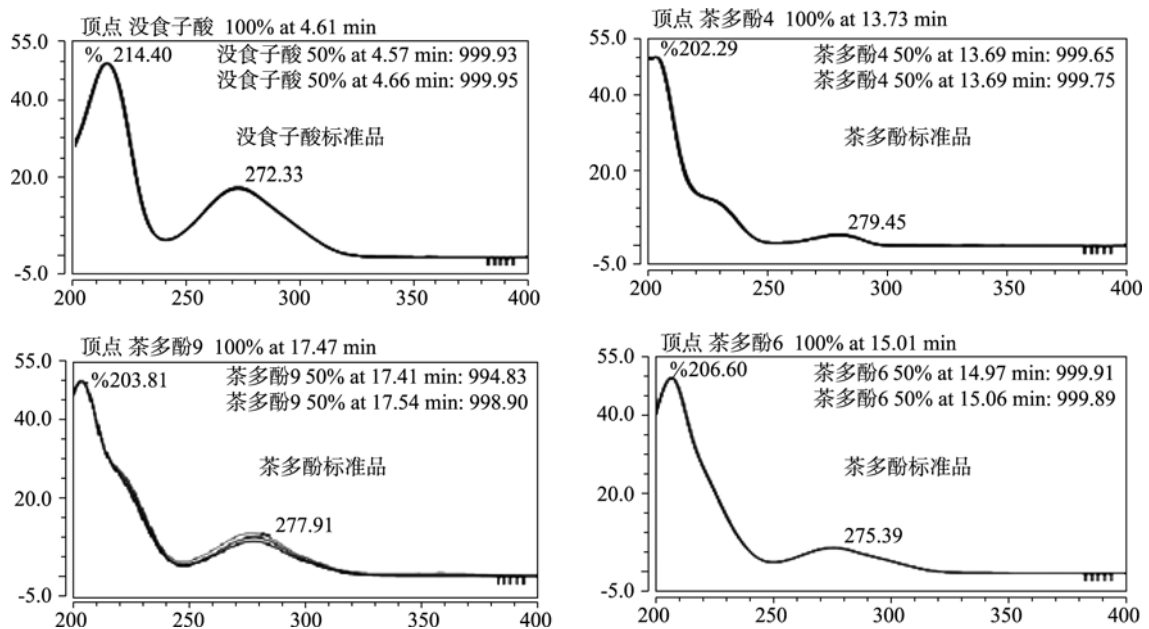


图 4 紫外扫描图

Fig. 4 UV scanning chromatograms

表 3 以没食子酸及茶多酚为标准品的样品测定结果(高效液相色谱法)($n=3$)

Table 3 Results of samples using gallic acid and tea polyphenols as standards (HPLC) ($n=3$)

批号	结果(g/100 g)		
	20151201	20151202	20151203
以没食子酸为标准品	5.54	5.65	5.57
以茶多酚为标准品	5.87	5.79	5.82
RSD%	4.09	1.73	3.10
平均 RSD%	2.97		

从表 3 可以看出,茶多酚标准品测定的结果略高于没食子酸标准品的结果,但在部分保健食品品种中用高效液相色谱法测定茶多酚含量,不同标准品计算的结果不完全符合此现象,推测原因可能是不同保健食品中,用的茶原料不一致,另外,根据高效液相色谱法的面积归一法统计,在茶多酚标准品中,没食子酸含量约为 1.2%,但在样品中,没食子酸含量约为 6.7%,样品中茶多酚中各组分比例与茶多酚标准品中各组分的比例不一致,造成了不一致的结果偏差。

3.3 不同检测方法的结果分析

从表 2 和表 3 的结果可以看出,以不同物质为标准品,不同检测仪器的样品含量测定的结果不一致。但用高效液相色谱法测定,以茶多酚及没食子酸为标准品计算,样品中茶多酚的结果均要低于紫外分光光度法。

在研究过程中,随机抽取 5 种宣称含以茶多酚为功效成分的保健食品进行测定,均有类似发现。因紫外分光光度法采用显色法测定,酚酸、黄酮、黄烷酮等物质均对酚类均有干扰,增加了茶多酚含量测定值^[15],造成了紫外测定结果高于高效液相色谱法。

4 结果与讨论

本研究以茶多酚及没食子酸为标准品,分别采用了紫外分光光度法及高效液相色谱法进行测定分析,发现没食子酸最大吸收波长为 272 nm 的单一标准品,茶多酚标准品为一组最大吸收波长在 272~281 nm、包含没食子酸的混合标准品。

以湖南海济药业有限公司生产的绿藻保健茶为样本,对不同检测方法,不同标准品的测定结果进行了分析比较,以没食子酸和茶多酚为标准品的高效液相色谱法测定的结果均低于紫外分光光度法,其中紫外分光光度法测定中,以茶多酚为标准品测定的结果低于以没食子酸为标准品的结果,因此建议测定保健食品样品中茶多酚含量时,应根据产品的原辅料及目的进行方法及标准品的选择,降低出现不合格产品及边缘产品的机率。

参考文献

- [1] Finger A, Kuhr S, Engelhardt UH. Chromatography of tea constituents [J]. *J Chromatogr* 1992, 624(1-2): 293-315.
- [2] 陈荣义. 茶多酚的提取纯化及其改性的研究[D]. 成都: 四川大学, 2005.
Chen RY. Research on the extraction, purification and its modification of polyphenols [D]. Chengdu: Sichuan University, 2005.
- [3] 王栋, 康健. 茶多酚的功效、提取和应用前景[J]. *新疆大学学报(自然科学版)*, 2007, 5: 217-221.
Wang D, Kang J. The efficiency of tea polyphenol, extraction and the application prospect [J]. *J Xinjiang Univ (Nat Sci Ed)*, 2007, 5: 217-221.
- [4] 陈海军. 茶多酚的生理保健功能及检测方法探析[J]. *广西轻工业*, 2009, 3(124): 4-5, 9.
Chen HJ. Analysis on the physiological health function and detection method of tea polyphenols [J]. *Guangxi J Light Ind*, 2009, 3(124): 4-5, 9.
- [5] 林海. 天然抗氧化剂茶多酚的化学和应用 [J]. *海峡药学*, 1997, 9(2): 99-101.
Lin Hai. Chemical and application of natural antioxidant tea polyphenols [J]. *Strait Pharm J*, 1997, 9(2): 99-101.
- [6] 张晓梦, 倪艳, 李先荣. 茶多酚的药理作用研究进展[J]. *药物评价研究*, 2013, 36(2): 157-160.
Zhang XM, Ni Y, Li XR. The pharmacological effects of tea polyphenols are reviewed [J]. *Drug Evaluat Res*, 2013, 36(2): 157-160.
- [7] 国家食品药品监督管理局. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1029/>. [EB/OL]. [2017-02-01].
China Food And Drug Administration. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1029/>. [EB/OL]. [2017-02-01].
- [8] 王丽丽, 陈键, 宋振硕, 等. 茶叶中茶多酚检测方法研究进展[J]. *茶叶科学技术*, 2013, (4): 6-12.
Wang LL, Chen J, Song ZS, et al. Advances in study on test method of tea polyphenols in tea [J]. *Tea Sci Technol*, 2013, (4): 6-12.
- [9] GB 8313-2008 食品安全国家标准 茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法[S].
GB 8313-2008 National food safety standards Detection method of tea polyphenols and catechins content [S].
- [10] GB 1886.211-2016 食品安全国家标准 食品添加剂茶多酚(又名维多酚) [S].
GB1886.211-2016 National food safety standards Food additives tea polyphenols (Another name was d polyphenols) [S].
- [11] QB 2154-95 食品添加剂茶多酚[S].
QB 2154-95 Food additives [S].
- [12] GB/T 31740.2-2015 茶制品第 2 部分: 茶多酚[S].
GB/T 31740.2-2015 Tea Part2: tea polyphenols [S].
- [13] 侯冬岩, 回瑞华, 李铁纯, 等. 高效液相色谱法对绿茶中茶多酚含量的测定[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 305-307.
Hou DY, Hui RH, Li TC, et al. Determination of polyphenols in green tea by HPLC [J]. *Food Sci*, 2010, 31(24): 305-307.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部(2015 年版) [M]. 北京: 中

国医药科技出版社, 2010.

Chinese Pharmacopoeia Commission. The pharmacopoeias of China Part IV (2015) [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010.

- [15] 李春阳, 许时婴, 王璋. 香草醛-盐酸法测定葡萄籽、梗中原花青素含量的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 157-161.

Li CY, Xu SY, Wang Z. Determination of procyanidins in grape seed and stem by hydrochloric acid method [J]. Food Sci, 2004, 25(2):157-161.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介

周利平, 副研究员, 主要研究方向为科技成果推广、产业技术转移、科技金融等。

E-mail: 284902963@qq.com

潘小红, 助理研究员, 主要研究方向为食品、药品、保健食品及化妆品的检验及研发。

E-mail: panxiaohong56781@163.com

《食品贮藏保鲜与品质控制专题》征稿函

食品主要来源于农业、林业、水产业、养殖业, 食品贮藏保鲜与加工是这些产业体系的延伸, 食品的贮藏保鲜与品质控制有利于发展农村经济, 改善人民的膳食结构和营养结构, 提高人们的生活和健康水平, 保持社会稳定。

鉴于此, 本刊特别策划了“**食品贮藏保鲜与品质控制专题**”专题, 由大连海洋大学食品学院赵前程院长担任专题主编, 围绕(1)果蔬、粮油、肉制品和水产品等食品保鲜的新工艺开发与应用; (2)栅栏技术、生物酶技术、可食性包装膜、超高压、辐照、冰温等新型保鲜技术在食品杀菌与保鲜方面的研究与应用; (3)食品贮藏、抑菌保鲜机制分析; (4)食品保鲜包装容器/材料、食品流通中的保鲜技术; (5)食品卫生质量控制和检测方法等或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2017 年 10 月份出版。

鉴于您在该领域的成就, 赵前程院长和主编吴永宁研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2017 年 9 月 30 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部