

不同茶叶中表没食子儿茶素没食子酸酯的含量测定

费文静¹, 诸晨¹, 许纪锋¹, 丁慧¹, 钱勇^{2*}, 谢天培²

(1. 上海佰年诗丹德检测技术有限公司, 上海 201203; 2. 上海诗丹德生物技术有限公司, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立反相高效液相色谱法检测茶叶中表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)的含量, 并对不同茶叶中 EGCG 的含量。**方法** 对不同产地茶叶样品用 70% 甲醇提取 10 min, 提取后冷却至室温, 提取溶液经过离心; 采用反相色谱柱 Agilent SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 检测, 以流动相 A(90 mL 乙腈:20 mL 乙酸:2 mL 乙二胺四乙酸二钠:888 mL 水)、流动相 B(800 mL 乙腈:20 mL 乙酸:2 mL 乙二胺四乙酸二钠:178 mL 水)梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 278 nm。**结果** EGCG 在 78.0~468.0 μg/mL 的范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r^2=1.0000$), 平均加标回收率为 95.6%, RSD 为 1.29%。**结论** 该方法简单、灵敏、稳定、可靠, 可用于不同茶叶 EGCG 的含量测定。实验同时发现, 不同茶叶由于产地和工艺不同, EGCG 含量差异较为明显。

关键词: 茶; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 含量测定; 反相高效液相色谱法

Determination of epigallocatechin gallate in different tea

FEI Wen-Jing¹, ZHU Chen¹, XU Ji-Feng¹, DING Hui¹, QIAN Yong^{2*}, XIE Tian-Pei²

(1. Standard Testing Lab (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Nature Standard R&D and Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determining epigallocatechin gallate (EGCG) in tea by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), and compare the content of EGCG in different tea. **Methods** Different tea was extracted for 10 min by 70% methanol solution; extraction solution was placed at room temperature, and then centrifuged. The chromatographic column was Agilent SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The mobile phase A was ACN: HAC: EDTA-2Na: H₂O = 90:20:2: 888 and the mobile phase B was ACN: HAC: EDTA-2Na: H₂O = 800:20:2: 178. The flow was 1.0 mL/min, the column temperature was 35 °C and the detection wavelength was 278 nm. **Results** EGCG had good linearity with the peak areas in 78.0~468.0 μg/mL ($r^2=1.0000$). The average recovery was 95.6% and the RSD was 1.29%. **Conclusion** The method is simple, sensitive, stable and reliable and it can be used to detect the EGCG in tea. This paper also finds that EGCG content is obviously different in different tea due to the different origin and technology.

KEY WORDS: tea; epigallocatechin gallate; content determination; reverse phase high performance liquid chromatography

基金项目: 科技部中小企业发展专项资金(13C26243101815)

Fund: Supported by the Inno fund for small and medium sized enterprises of Ministry of Science and Technology of PRC (13C26243101815)

*通讯作者: 钱勇, 工程师, 主要研究方向为中药和健康食品的检测及化学成分研究。E-mail: Qianyong2232@163.com

*Corresponding author: QIAN Yong, Engineer, Room 103, Building 2, #720 Cailun Road, Shanghai 201203, China. E-mail: Qianyong2232@163.com

1 引言

茶叶为山茶科植物茶(*Camellia sinensis* kuntze)的芽叶,具有抗癌、抗衰老、防治心血管疾病、提高人体免疫力等多种奇特功效^[1,2],这些功效是茶叶中各种物质成分共同作用的结果。目前茶叶中已发现的化学成分有 500 多种,其主要成分有咖啡因、茶多酚、氨基酸以及蛋白质等^[3,4]。茶多酚是茶叶中多酚类物质的总称,是茶叶中重要的功能性成分,由于具有抗氧化、抗肿瘤、调节血脂以及降低血糖等多种功效,被誉为 21 世纪对人类健康产生巨大影响的化合物^[5-8]。茶多酚占茶叶干重的 22%~30%^[9],主要由儿茶素类、黄酮类、酚酸类、花色素类等 4 类物质组成。儿茶素类物质占茶多酚总量的 60%~80%^[10,11],主要包括儿茶素((+)-catechin, C)、表儿茶素((-)-epicatechin, EC)、没食子儿茶素((-)-gallocatechin, GC)、表没食子酸儿茶素(epigallocatechin, EGC)、儿茶素没食子酸酯((-)-catechin gallate, CG)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)、没食子儿茶素没食子酸酯((-)-gallocatechin gallate, GCG)、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)。EGCG 的含量占茶多酚总量的 50%~60%,结构如图 1 所示,具有抗氧化、防癌、抗癌等功效^[12,13]。目前对茶多酚类物质的测定方法研究较多,采用的方法包括紫外吸收法、薄层色谱法、毛细管电泳法、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[14,15]。从灵敏度、准确性上看,HPLC 法是目前最为有效的方法,但是前方法往往存在前处理步骤繁琐、检测分离度不高、准确性不高等问题。本文通过总结前人研究方法^[1,10,14,15],建立了反相高效液相色谱法检测茶叶中的 EGCG,该方法简单、灵敏、稳定、可靠,可用于不同茶叶中 EGCG 的含量测定。同时本文对市售茶叶中 EGCG 的含量进行检测,以研究 EGCG 在茶叶的不同生产工艺中的含量变化规律,为茶叶的等级评定和质量控制提供依据。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

EGCG 对照品(中国食品药品检定研究院)。茶叶样品均为市售品。

乙腈(色谱纯, CNW); 水为超纯水(自制); 其他试剂均为分析纯(Adamas)。

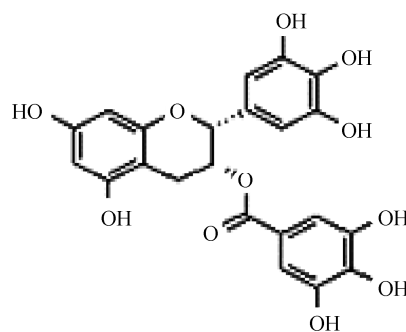


图 1 EGCG 结构式

Fig. 1 Structure of EGCG

2.2 仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Chemstation 色谱工作站(安捷伦科技有限公司); AUW-220D 电子天平(日本岛津); Purelab Option S7 纯水机(威立雅 ELGA); W2-100SP 恒温水浴锅(上海申生科技有限公司); TGL-16C 常温离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 色谱条件

色谱柱: Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 流动相 A(90 mL 乙腈:20 mL 乙酸:2 mL EDTA-2Na:888 mL 水); 流动相 B(800 mL 乙腈:20 mL 乙酸:2 mL EDTA-2Na:178 mL 水), 0~10 min 100%A, 10~25 min A 从 100%到 68%, 25~35 min A 保持 68%, 35~36 min A 从 68%到 100%, 36~40 min A 保持 100%; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 278 nm; 柱温 35 °C。

2.3.2 稳定溶液的制备

分别将 25 mL EDTA-2Na 溶液(10 mg/mL, 现配)、25 mL 抗坏血酸溶液(10 mg/mL, 现配)、50 mL 乙腈加入 500 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。

2.3.3 对照品溶液的制备

精密称取 EGCG 对照品 11.70 mg 置 25 mL 容量瓶中,加稳定液稀释至刻度,摇匀,得 EGCG 标准贮备液 0.468 mg/mL。

2.3.4 供试药材溶液的制备

取样品粗粉约 0.2 g,精确称重,置于 10 mL 离心管中,加入经 70 °C 预热过的 70% 甲醇 5 mL,润湿,立即移入 70 °C 水浴中,浸提 10 min(隔 5 min 搅拌一次),浸提后冷却至室温,转入离心机在 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% 甲醇提取一次, 重复以上操作。合并提取液并定容至 10 mL, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 待用。精确移取 2 mL 上述溶液至 10 mL 容量瓶中, 用稳定液定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 作为供试品溶液。

3 结果与分析

3.1 线性范围的考察

分别精确量取 EGCG 标准贮备液适量, 用稳定液分别稀释成浓度为 78.0、93.6、117.0、234.0、468.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 5 个工作液, 按照上述色谱条件分别进样 10 μL , 测定。以峰面积值(Y)为纵坐标, 对照品进样量(X)为横坐标绘制标准曲线, 其回归方程为: $Y=12606.1502X-0.0905$, $r^2=1.0000(n=5)$ 。EGCG 在 78.0~468.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内呈良好的线性关系。

3.2 精密度试验

分别取 EGCG 工作溶液, 连续进样 6 次, 每次 10 μL , 分别测得 EGCG 峰面积 RSD 为 0.77%, 表明仪器的精密度好。

3.3 稳定性试验

分别取 EGCG 工作溶液, 每隔 0、1、2、4、6、

8、10 h 进样一次, 连续进样 7 次, 每次 10 μL , 分别测得 EGCG 峰面积 RSD 为 0.61%, 表明对照品溶液在放置 10 h 内稳定。

3.4 重现性试验

精确称取同一批次茶叶样品粗粉 5 份, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱条件检测, 进样量为 10 μL , 计算 EGCG 的含量, EGCG 含量平均值为 75.9 mg/g, RSD 为 1.45%。

3.5 加样回收率试验

取已知含量的茶叶样品粗粉 6 份, 精确称重, 分别准确加入 EGCG 标准贮备液(0.468 mg/mL)0.5、1、2 mL 各 2 份, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱条件检测, 进样量为 10 μL , 测得 EGCG 加标回收率为 95.6%, RSD 为 1.29%。

3.6 不同品系的茶叶含量测定

取市售不同品系的茶叶样品, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱条件检测, 进样量为 10 μL , 样品进样 3 次, 测定 EGCG 的含量, 检测代表图谱见图 2, 测定结果见表 1(均保留 3 位有效数字)。

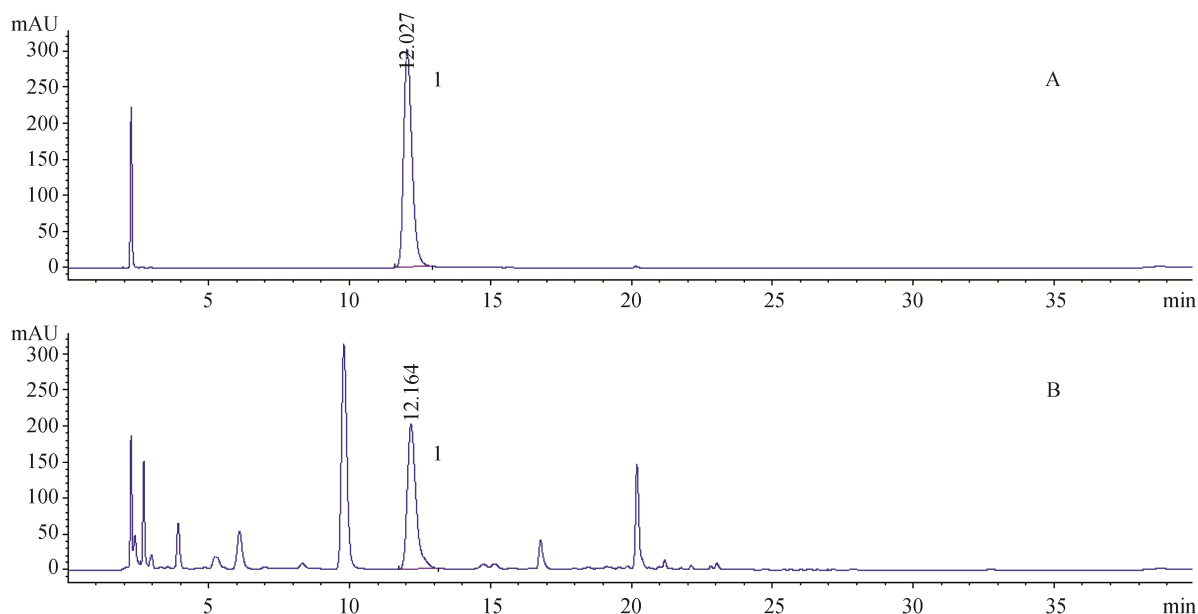


图 2 EGCG 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of EGCG

(注: A 为 EGCG 对照品; B 为茶叶提取样品; 1 为 EGCG)

(Note: A: EGCG reference standard sample; B: extract sample of tea; 1: EGCG)

表 1 不同品系茶叶中 EGCG 的含量($n=3$)
Table 1 Content of EGCG in different tea ($n=3$)

品系	品种	含量(g/kg)	RSD(%)	品系	品种	含量(g/kg)	RSD(%)		
绿茶	碧螺春	75.8	0.35	青茶	乌龙茶	35.6	0.74		
		76.2				35.7			
	碧螺春(艺福堂)	75.7	0.36		安溪铁观音	36.1	0.80		
		95.6				33.3			
		95.0				32.8			
		95.6				33.2			
		45.5				30.5			
		44.9				0.66		御品观音	30.7
	西湖龙井	45.2	0.61		韵香铁观音	29.7	0.95		
		56.4				36.8			
		57.0				36.2			
		57.0				36.2			
56.1		6.72							
57.4		1.12		金骏眉 1		6.82		1.27	
太平猴魁 1	57.1	0.40	金骏眉 2	6.65	1.80				
	67.0			1.46					
	66.9			1.45					
	66.5			1.50					
	47.3			6.49					
	蒙顶黄芽			47.9		0.73	正山小种 1	6.51	0.31
47.3		6.53							
安吉白茶		51.2	1.17	正山小种 2	6.12			0.19	
		52.3			6.10				
		52.2			6.12				
		42.8			5.92				
	福鼎白茶	43.3			0.61	范山红	5.87		0.43
		43.2					5.90		
50.5		2.62							
野生极品牡丹		49.8	0.72	立顿红茶			2.60	0.59	
		50.0					2.59		
		42.1					0.412		
	2008 年有机银针	42.1			1.22	普洱	0.415		0.85
		43.0					0.408		
		2012 年有机银针					47.6		
47.5			0.215						
48.6			0.218						

4 结论与讨论

本实验通过反相高效液相色谱法对 6 大品系 24 种不同茶叶中的 EGCG 含量进行了测定, 结果表明绿茶中的 EGCG 含量较多, 黑茶中的 EGCG 含量较少。研究表明茶叶中的 EGCG 含量与产地和生产工艺密切相关, 随着发酵度的增加, EGCG 的含量逐渐减少。EGCG 是茶叶中儿茶素类成分的代表物质, 因此 EGCG 含量高的茶叶儿茶素类总量也相应较高。本实验为选择较高含量 EGCG 茶叶饮品提供了参考。

同时, 本实验通过方法学验证, 证明该方法具有良好的线性、精密度和回收率, 同时提取操作较前方法更简便, 分离度和准确性较高^[1,10,14,15], 可用于茶叶中的 EGCG 质量控制。

参考文献

- [1] 宁井铭, 张正竹, 方世辉, 等. 指纹图谱技术及其在茶叶品质控制中的应用[J]. 中国茶叶加工, 2009(3): 39-41.
Ning JM, Zhang ZZ, Fang SH, *et al.* Application of fingerprint technology in quality control of tea [J]. Chin Tea Proc, 2009(3): 39-41.
- [2] 金惠淑. 茶叶品质化学和仪器鉴定研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
Jin HS. Chemical and instrumental assessment of tea quality [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007.
- [3] 朱旗, 施兆鹏, 任春梅. 绿茶香气不同提取方法的研究[J]. 茶叶科学, 2001, 21(1): 38-43.
Zhu Q, Shi ZP, Ren CM. Research on different extraction methods of green tea aroma [J]. Tea Sci, 2001, 21(1): 38-43.
- [4] 李思义. 茶叶功能性成分与开发[J]. 食品研究与开发, 1997, 18(1): 35-37.
Li SY. The development of tea functional components [J]. Food Res Devel, 1997, 18(1): 35-37.
- [5] 戴立武, 李国华, 吴若平. 茶叶的功效与健康[J]. 温州农业科技, 2004, (4): 6-8.
Dai LY, Li GH, Wu RP. Effect of tea and health [J]. Wenzhou Agric Technol, 2004, (4): 6-8.
- [6] Katiyar SK, Elmets CA. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection [J]. Int J Oncol, 2011, 18(6): 1307-1313.
- [7] Yang C S, Prabhu S, landau J. Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols [J]. Drug Metab Rev, 2011,33(3-4): 237-253
- [8] Gong CS. Extraction and application of tea polyphenol [J]. Mod Chem Ind, 1999, 19(3): 14-16.
- [9] 于华忠, 龚竹, 张东山. 茶多酚的研究进展[J]. 福建茶叶, 2004, (4): 28.
Yu HZ, Gong Z, Zhang DS. Research progress of tea polyphenols [J]. Tea Fujian, 2004, (4): 28.
- [10] 王辉. 粗茶多酚中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的提取方法研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(21): 9130-9132.
Wang H. Research on the extraction of EGCG from tea polyphenol [J]. J Anhui Agric Sci, 2008, 36(21): 9130-9132.
- [11] 卢涛, 兰先秋, 朱斌, 等. 不同茶多酚中儿茶素的测定及柱层析提取 EGCG 的比较[J]. 化工进展, 2008, 27(5): 746-752.
Lu T, Lan XQ, Zhu B, *et al.* Determination of catechins in different tea polyphenols and comparison of EGCG isolation by column chromatography [J]. Chem Ind Eng Prog, 2008, 27(5): 746-752.
- [12] 蒋莎莉, 罗招阳. 表没食子儿茶素没食子酸酯抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中外医学研究, 2009, 12, 7(14): 64-65.
Jiang SL, Luo ZY. Research progress on anti tumor effect of EGCG [J]. Chin Foreign Med Res, 2009, 12, 7(14): 64-65.
- [13] 陈勋, 贾尚智, 闵彩云, 等. 茶叶的抗癌作用研究进展[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(2): 221-225.
Chen X, Jia SZ, Min CY, *et al.* Research progress of tea anticancer effects [J]. Hubei Agric Sci, 2011, 50(2): 221-225.
- [14] 廖晓玲, 王会玲, 徐凯明, 等. 茶多酚含量测定方法的研究[J]. 中国油脂, 2002, (1): 68-69.
Liao XL, Wang HL, Xu KM, *et al.* Study on the determination of the content of tea polyphenols [J]. Chin Grease, 2002, (1): 68-69.
- [15] 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.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



费文静, 本科, 工程师, 主要研究方向为中药和健康食品的检测及化学成分研究。
E-mail: fidis@163.com



钱勇, 硕士研究生, 工程师, 主要研究方向为中药和健康食品的检测及化学成分研究。
E-mail: Qianyong2232@163.com