

高效液相色谱法测定速溶滇红茶制品中茶黄素含量

刘雪娜¹, 吴雪娇¹, 刘顺航², 卢念东², 李丽维^{1*}

(1. 天士力研究院, 天津 300410; 2. 云南天士力帝泊洱生物茶集团有限公司, 普洱 665000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定速溶滇红茶制品中茶黄素含量的分析方法。**方法** 样品提取后, 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长为 280 nm, 外标法定量。**结果** 4种茶黄素单体在各自浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.9995, 检出限为 1.1~1.6 µg/g, 定量限为 3.7~5.5 µg/g, 加标回收率为 95.08%~104.50%, 相对标准偏差均小于 2.01%。**结论** 本检测方法具有较好的重复性、精密度及稳定性, 适用于检测速溶滇红茶制品中茶黄素的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 滇红茶; 速溶茶; 茶黄素

Determination of theaflavins in instant Yunnan black tea products by high performance liquid chromatography

LIU Xue-Na¹, WU Xue-Jiao¹, LIU Shun-Hang², LU Nian-Dong², LI Li-Wei^{1*}

(1. Tasly Academy, Tianjin 300410, China; 2. Yunnan Tasly Deepuer Biological Tea Group Company Limited, Puer 665000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of theaflavins in instant Yunnan black tea products by high performance liquid chromatography. **Methods** After extraction, the samples were separated by Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column using 0.1% formic acid acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 280 nm. The samples were quantified by external standard method. **Results** The 4 theaflavins had good linear relationships within their respective concentration ranges, the correlation coefficients were all greater than 0.9995, the limits of detection were 1.1–1.6 µg/g, the limits of quantification were 3.7–5.5 µg/g, the standard recoveries were 95.08%–104.50%, and the relative standard deviations were less than 2.01%. **Conclusion** This method has good repeatability, precision and stability, and is suitable for the determination of theaflavins in Yunnan black instant tea products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; Yunnan black tea; instant tea; theaflavins

*通信作者: 李丽维, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为普洱茶和功能食品。E-mail: liliwei@tasly.com

*Corresponding author: LI Li-Wei, Master, Senior Engineer, Tasly Academy, No.1 Tingjiang Road, Beichen District, Tianjin 300410, China. Email: liliwei@tasly.com

0 引言

滇红茶属于大叶种类型工夫茶，外形条索紧结，肥硕雄壮，干茶色泽乌润，金毫特显，内质汤色艳亮，香气鲜郁高长，滋味浓厚鲜爽，叶底红匀嫩亮^[1]。经现代医学临床验证，饮用红茶对人体具有保健作用^[2-4]。茶黄素类物质(theaflavins, TFs)是红茶的重要生物活性物质之一，对红茶的汤色、滋味和品质起着决定性的作用^[5]。茶黄素是一类具有苯并卓酚酮结构的色素化合物，具有抗氧化^[6-7]、抗病毒^[8-9]、抗炎症^[10-11]、抗肿瘤^[12-13]、抗骨质疏松^[14-15]、降脂减肥^[16]、抗高尿酸^[17]等多种生物活性。目前，已从红茶中分离鉴定出 20 多种 TFs，其中最主要的 TFs 有 4 种：茶黄素(theaflavin, TF)、茶黄素-3-没食子酸酯(theaflavin-3-gallate, TF-3-G)、茶黄素-3'-没食子酸酯(theaflavin-3'-gallate, TF-3'-G)、茶黄素-3,3'-没食子酸酯(theaflavin-3,3'-gallate, TF-3,3'-G)。以滇红茶叶为原料制备固态速溶茶制品，产品形式方便消费者携带及饮用，但目前关于速溶滇红茶制品中茶黄素类物质检测方法的报道较少。因此，本文建立针对速溶滇红茶制品的高效液相色谱分析方法(high performance liquid chromatography, HPLC)，测定 4 种茶黄素单体的含量，以期为速溶滇红茶制品的质量评价提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Mettler Toledo AG135 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Allegra 64R 台式冷冻高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); Millipore-Q 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

TF 对照品(纯度 98.70%)、TF-3-G 对照品(纯度 99.24%)、TF-3,3'-G 对照品(纯度 99.16%)(成都德思特生物技术有限公司); TF-3'-G 对照品(纯度 96.10%，上海同田生物技术有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯，德国默克公司); 甲酸、冰乙酸(色谱纯，阿拉丁试剂有限公司); 实验用水均为一级水。

速溶滇红茶(批号：20200610)为天士力研究院保健食品开发中心制备，制备方法为以滇红茶叶(批号 202005，等级：四级，云南天士力帝泊洱生物茶集团有限公司)为原料经水提、过滤、浓缩、干燥工艺制成。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱，进样体积为 10 μL，流动相为 0.1%甲酸乙腈-0.1%

甲酸水溶液，流速为 1.0 mL/min，柱温 30 °C，检测波长为 280 nm，采用梯度洗脱，流动相梯度洗脱程序见表 1。

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

时间/min	流动相体积分数/%	
	0.1%甲酸乙腈	0.1%甲酸水溶液
0	8	92
30	15	85
60	25	75
72	28	72
75	8	92

1.2.2 对照品溶液的制备

精密称取 TF 对照品 9.47 mg, TF-3-G 对照品 9.86 mg, TF-3'-G 对照品 9.98 mg, TF-3,3'-G 对照品 6.96 mg 分别置于 5 mL 容量瓶中，加提取溶液(70%甲醇、29.9%水和 0.1%甲酸)溶解并定容，即得 TF(1.894 mg/mL)、TF-3-G (1.972 mg/mL)、TF-3'-G(1.996 mg/mL)和 TF-3,3'-G (1.392 mg/mL)4 种茶黄素单体对照品母液。精密移取 4 种单体对照品母液各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，加入提取溶液至刻度处，即得混合对照品工作液，此时溶液中各对照品浓度为 TF 189.4 μg/mL、TF-3-G 197.2 μg/mL、TF-3'-G 199.6 μg/mL、TF-3,3'-G 139.2 μg/mL。稀释混合对照品工作液，使 TF 对照品浓度分别为 0.947、1.894、9.47、47.35、94.7、189.4 μg/mL; TF-3-G 对照品浓度分别为 0.986、1.972、9.86、49.3、98.6、197.2 μg/mL; TF-3'-G 对照品浓度分别为 0.998、1.996、9.98、49.9、99.8、199.6 μg/mL; TF-3,3'-G 对照品浓度分别为 0.696、1.392、6.96、34.8、69.6、139.2 μg/mL，即得梯度对照品工作液。

1.2.3 供试样品的制备

称取 0.2g 速溶滇红茶样品(精确到 0.0001 g)置于 10 mL 离心管中，加入 5 mL 70 °C 预热过的提取溶液，涡旋混匀，70 °C 水浴 10 min，每 5 min 涡旋混匀一次，待冷却至室温后，4000 r/min 离心 10 min，转移上清液至 10 mL 容量瓶，重复之前操作，将两次提取液全部转移至 10 mL 容量瓶，定容并摇匀，用 0.45 μm 滤膜过滤，所得滤液即为供试样品。

2 结果与分析

2.1 条件优化

2.1.1 流动相的考察

本研究采用的色谱条件，参考相关文献^[18]，流动相考察了乙腈-水、2%乙酸乙腈-2%乙酸水溶液、0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液 3 种洗脱系统对茶黄素的分离效果。结果显示乙腈-水作为流动相色谱峰宽较大，峰形较差，无

法达到有效分离; 2%乙酸乙腈-2%乙酸水溶液作为流动相, 相比前者而言, 色谱峰宽有所减小, 峰形得到改善, 但 TF-3'-G 与 TF-3,3'-G 2 个单体分离效果较差, 最终选择 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液为本研究的流动相, 用此流动相洗脱后各峰的峰形良好, 且各组分的分离度较好。因此, 本研究在参考文献的基础上稍作改变, 以实现 4 个单体茶黄素组分的分离。

2.1.2 提取溶液的选择

本研究采用的样品制备方法, 参考 GB/T 30483—2013《茶叶中茶黄素的测定高效液相色谱法》, 考察了水、70%甲醇溶液、含 0.1%甲酸的 70%甲醇溶液 3 种提取溶液对茶黄素提取效率及分离效果的影响。结果显示, 虽然不同提取溶液对茶黄素提取效率影响很小, 但采用含 0.1%甲酸的 70%甲醇溶液作为提取溶液, 各组分峰形尖锐, 分离度更好。因此, 本研究选择含 0.1%甲酸的 70%甲醇溶液为提取溶液。

2.2 方法学验证

2.2.1 标准曲线、检出限和定量限

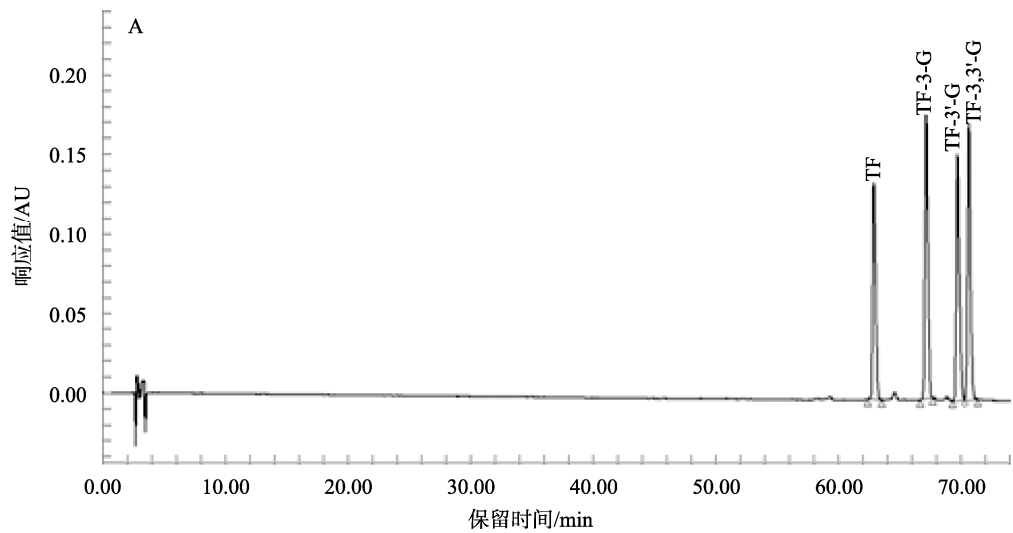
将 1.2.2 项中得到的梯度混合对照品工作液, 按照 1.2.1 项中色谱条件分别测定各成分的峰面积, 以对照品峰面积为纵坐标, 以对照品浓度为横坐标进行线性回归, 绘制标准曲线。将最低浓度的标准溶液进样, 按照 3 倍信噪比(S/N)得到检测方法的检出限, 按照 10 倍信噪比(S/N)得到检测方法的定量限。结果如表 2 所示, TF 各自相应范围内具有良好的线性关系, 4 种茶黄素单体的检出限范围为 1.1~1.6 $\mu\text{g/g}$, 定量限范围为 3.7~5.5 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2.2 定性分析

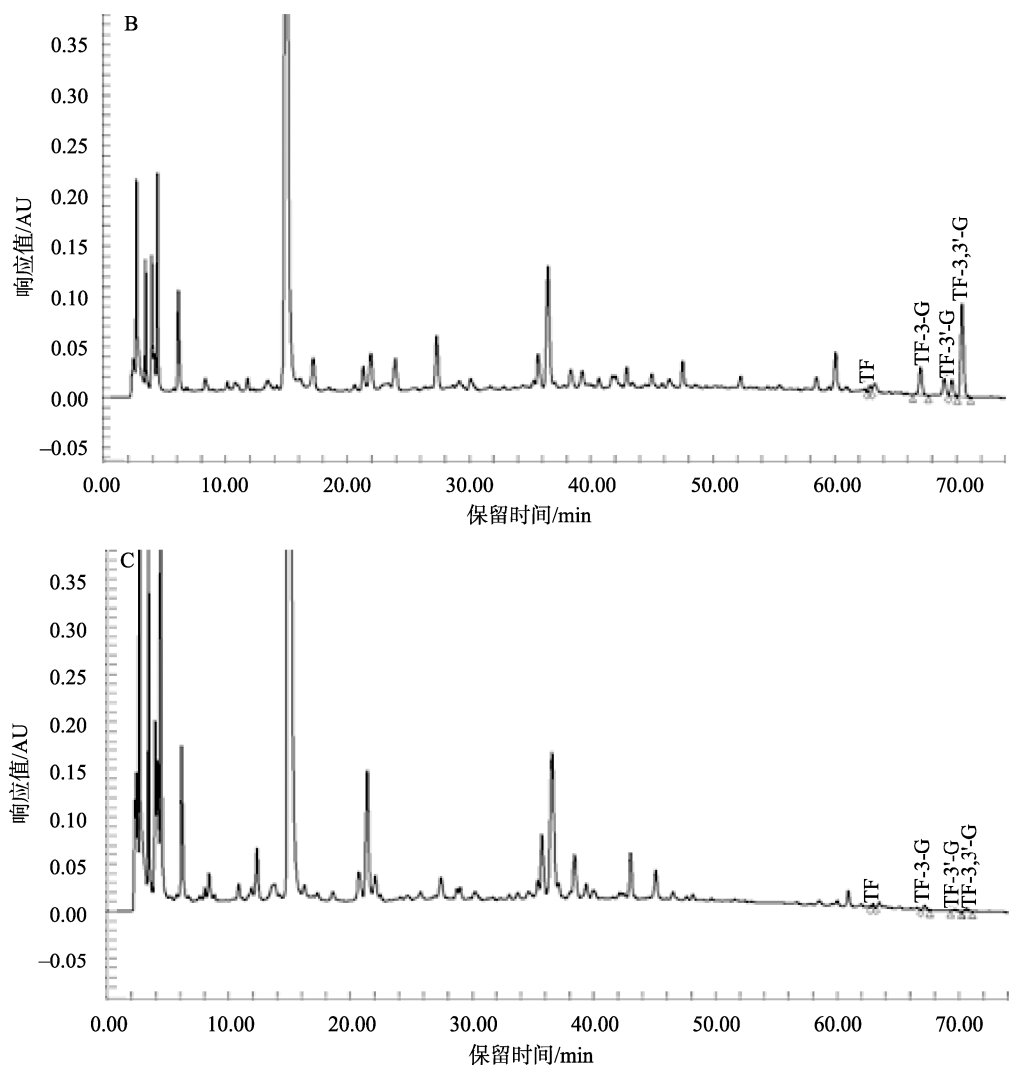
采用 1.2.1 项中色谱条件, 进样混合对照品工作液、滇红茶样品及其固态速溶茶样品溶液各 10 μL , 记录各溶液的色谱图。结果如图 1 所示, 速溶滇红茶样品含有 TF、TF-3-G、TF-3'-G、TF-3,3'-G。

表 2 茶黄素的标准曲线、检出限和定量限
Table 2 Standard curve, limit of detection and limit of quantitative of theaflavins

成分	线性范围/($\mu\text{g/mL}$)	线性方程	相关系数	检出限/($\mu\text{g/g}$)	定量限/($\mu\text{g/g}$)
TF	0.947~189.4	$Y=14503X+9856.1$	0.9997	1.3	4.4
TF-3-G	0.986~197.2	$Y=20609X-3335.6$	0.9999	1.2	4.0
TF-3'-G	0.998~199.6	$Y=14583X-5394$	1.0000	1.6	5.5
TF-3,3'-G	0.696~139.2	$Y=20614X+3115.7$	0.9997	1.1	3.7



注: A: 混合对照品,
图 1 HPLC 色谱图
Fig.1 HPLC chromatogram



注: B: 滇红茶样品, C: 速溶滇红茶样品。

图 1(续) HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram

2.2.3 精密度

制备速溶滇红茶供试样品, 连续进样 6 次, 每次 10 μ L。根据各成分的含量, 计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。结果表明, 速溶滇红茶的 4 种茶黄素单体的 RSD 在 0.63%~1.15%之间, 说明该方法具有良好的精密度。

2.2.4 重复性

制备速溶滇红茶供试样品, 样品平行制备 6 份, 每次进样 10 μ L。根据各成分的含量, 分别计算它们的 RSD。结果表明, 速溶滇红茶的 4 种茶黄素单体的 RSD 在 0.77%~1.20%之间, 说明该方法具有良好的重复性。

2.2.5 稳定性

制备速溶滇红茶供试样品, 分别于 0、2、4、6、8、

10、12、18、24 h 对此样品进行 HPLC 分析, 根据各成分的含量变化, 计算 RSD。结果表明, 速溶滇红茶的 4 种茶黄素单体的 RSD 在 1.50%~2.08%之间, 说明该方法在 24 h 内具有较好的稳定性。

2.2.6 加标回收

取 1.2.3 项中供试样品(已知茶黄素含量的速溶滇红茶)原称样量的 1/2, 向其中加入不同水平的茶黄素对照品, 以使各茶黄素单体含量水平分别达到原含量的 80%、100%和 120%, 按 1.2.1 项下的色谱条件进行测定, 并计算茶黄素各单体的回收率。结果如表 3 所示, 固态速溶茶 4 种茶黄素单体的平均加标回收率在 95.08%~104.50%之间, RSD 在 1.39%~2.01%之间, 说明该方法操作过程中损失少, 回收率高。

表 3 茶黄素加标回收实验结果
Table 3 Results of standard recoveries for theaflavins

成分	本底值/ μg	加入量/ μg	测定值/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
TF	27.86	16.20	41.05	93.17	95.08	1.85
	27.86	27.00	53.01	96.63		
	27.86	37.80	62.66	95.43		
TF-3-G	44.07	27.00	68.65	96.59	95.11	1.39
	44.07	45.00	84.33	94.68		
	44.07	63.00	100.72	94.07		
TF-3'-G	14.50	9.00	25.01	106.43	104.50	2.01
	14.50	15.00	30.92	104.81		
	14.50	21.00	36.30	102.25		
TF-3,3'-G	20.04	12.00	31.10	97.07	98.83	1.96
	20.04	20.00	39.45	98.53		
	20.04	28.00	48.47	100.90		

2.2.7 样品测定

取速溶滇红茶样品制备供试样品, 采用 1.2.1 项中的色谱条件下测定茶黄素含量。结果显示, 速溶滇红茶样品 TF、TF-3-G、TF-3'-G、TF-3,3'-G 的含量分别为 0.03%、0.04%、0.02%、0.02%, 茶黄素总量为 4 种单体含量之和, 茶黄素总量为 0.11%。

3 结论与讨论

本研究通过对流动相、提取溶液 2 个条件的优化, 建立了适用于速溶滇红茶制品中 4 种茶黄素单体含量测定的高效液相色谱检测方法。通过一系列方法学验证, 证实该方法操作简便、重复性好、准确度高, 可作为检测速溶茶滇红制品的重要依据。与文献^[19-20]报道的超高效液相色谱串联质谱检测方法(样品检测周期通常不过 15 min)相比, 本方法样品检测周期略长, 检测效率偏低。但是本方法使用仪器设备受限制小, 便于方法的推广, 同时具有较低检出限且在茶黄素低浓度时线性关系良好, 适用于茶黄素含量较低的固态速溶茶制品的测定。

参考文献

[1] 陈宗懋. 中国茶经[M]. 上海: 上海文化出版社, 1992.
CHEN ZM. Chinese tea classics [M]. Shanghai: Shanghai Culture Publishing House, 1992.

[2] DUFFY SJ, KEANEY JF, HOLBROOK M, *et al.* Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2001, 104(2): 28.

[3] MAHDAVI RM, SALARI A, GHORBANI Z, *et al.* The effects of regular consumption of green or black tea beverage on blood pressure in those with elevated blood pressure or hypertension: A systematic review and

meta-analysis [J]. *Complement Ther Med*, 2020, 51: 102430.

[4] RASHEED Z. Molecular evidences of health benefits of drinking black tea [J]. *Int J Health Sci*, 2019, 13(3): 1-3.

[5] 沈丽萍. 茶黄素研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(1): 134-139.
SHEN LP. Theaflavin research progress [J]. *Chin AgricSci Bull*, 2010, 26(1): 134-139.

[6] YANG Z, JIE G, DONG F, *et al.* Radical-scavenging abilities and antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters in H₂O₂-mediated oxidative damage system in the HPF-1 cells [J]. *ToxicolVtro*, 2008, 22(5): 1250-1256.

[7] HE JT, XU L, YANG L, *et al.* Anti-oxidative effects of catechins and theaflavins on glutamate-induced HT22 cell damage [J]. *RSC Adv*, 2019, 9: 21418-21428.

[8] CHOWDHURY P, SAHUC ME, ROUILLE Y, *et al.* Theaflavins, polyphenols of black tea, inhibit entry of hepatitis C virus in cell culture [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(11): e198226.

[9] SUSMIT M, TISHYA S, SHIYRAJ N, 等. 绿茶和红茶多酚类化合物的抗病毒活性在新型冠状病毒肺炎预防和治疗中的应用[J]. 中国茶叶, 2021, 43(1): 1-9.
SUSMIT M, TISHYA S, SHIYRAJ N, *et al.* Antiviral activity of green tea and black tea polyphenols in prophylaxis and treatment of COVID-19 [J]. *ChinTea*, 2021, 43(1): 1-9.

[10] WU YH, KURAJI R, TARA Y, *et al.* Effects of theaflavins on tissue inflammation and bone resorption on experimental periodontitis in rats [J]. *J Periodontal Res*, 2018, 53(6): 1009-1019.

[11] 周盈, 黄倩, 王帅, 等. 茶黄素对白介素-1 β 诱导的大鼠软骨细胞炎症性退变的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2017, 43(4): 511-518.
ZHOU Y, HUANG Q, WANG S, *et al.* Effect of theaflavins on inflammatory degeneration of rat chondrocytes induced by interleukin-1 β [J]. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci Ed)*, 2017, 43(4): 511-518.

[12] IMRAN A, BUTT MS, XIAO H, *et al.* Inhibitory effect of black tea

- (*Camelliasinensis*) theaflavins and thearubigins against HCT 116 colon cancer cells and HT 460 lung cancer cells [J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(5): e12822.
- [13] 黄夏宁, 余展鹏, 钟艳平, 等. 茶黄素对人鼻咽癌 CNE2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中药材*, 2019, 42(2): 393–398.
- HUANG XN, YU ZP, ZHONG YP, *et al.* Effect of theaflavin on proliferation and apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells [J]. *Chin Med Mat*, 2019, 42(2): 393–398.
- [14] XIAO YZ, YANG M, XIAO Y, *et al.* Reducing hypothalamic stem cell senescence protects against aging-associated physiological decline [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(3): 534–548.
- [15] 艾泽馨, 李家, 吴洋欧, 等. 茶黄素-3, 3'-双没食子酸酯对骨质疏松的作用及机制初探[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2020, 30(4): 206–210.
- AI ZX, LI J, WU YO, *et al.* The effect and mechanism of theaflavin-3, 3'-digallate on osteoporosis: A preliminary study [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2020, 30(4): 206–210.
- [16] 蒋慧颖, 马玉仙, 曾文治, 等. 茶黄素、茶红素与茶褐素对高脂饮食大鼠肠道菌群的影响[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 274–279, 351.
- JIANG HY, MA YX, ZENG WZ, *et al.* Effects of theaflavins, thearubigins and theabrownine on intestinal flora in rats fed with high-fat diet [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(20): 274–279, 351.
- [17] TAI LL, LIU ZH, SUN MH, *et al.* Anti-hyperuricemic effects of three theaflavins isolated from black tea in hyperuricemic mice [J]. *J Funct Foods*, 2020, 66: 1–9.
- [18] SU YL, LEUNG LK, HUANG Y, *et al.* Stability of tea theaflavins and catechins [J]. *Food Chem*, 2003, 83(2): 189–195.
- [19] 孟怡璠, 杜欢欢, 江海, 等. UPLC-MS-MS 测定红茶中的茶黄素含量[J]. *农业技术与装备*, 2017, (7): 9–12, 14.
- MENG YP, DU HH, JIANG H, *et al.* Determination of theaflavins in black tea by UPLC-MS-MS [J]. *Agric Tech Equip*, 2017, (7): 9–12, 14.
- [20] 李伟, 张春燕, 李凤, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定茶叶中儿茶素和茶黄素[J]. *现代预防医学*, 2019, 46(22): 4179–4184.
- LI W, ZHANG CY, LI F, *et al.* Simultaneous determination of catechins and theaflavins in tea by UPLCMS/MS [J]. *Mod Prev Med*, 2019, 46(22): 4179–4184.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



刘雪娜, 硕士, 主要研究方向为保健食品研发及功能性天然产物研究。
E-mail: lxnnnn@126.com



李丽维, 硕士, 级工程师, 主要研究方向为普洱茶和功能食品。
E-mail: liliwei@tasly.com