

茶中茶多酚的高效液相色谱法分离分析

朱勤艳*, 陈振宇

(香港中文大学生物化学系, 香港 新界 沙田)

摘要: 用改进的 Agarwal 方法萃取不同种类茶叶和茶饮料中的茶多酚 (green tea polyphenols, GTPs), 建立了用高效液相色谱 (HPLC) 法对茶多酚进行分离分析的方法。HPLC 可有效分离 GTPs 主要组成成分 EC、EGC、ECG 和 EGCG 并精确定量, 相对标准偏差小于 5%。茶叶加工过程对 GTPs 含量有很大影响, 绿茶总 GTPs 含量在 6~ 15 g/100g 干茶叶, 乌龙茶总 GTPs 含量在 5~ 7g/100g 干茶叶, 红茶总 GTPs 含量低于 2g/100g 干茶叶。

关键词: 茶多酚; 高效液相色谱; 茶叶; 茶饮料

中图分类号: O 65 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(1999) 04-070-03

近年来, 茶多酚生理机制的研究日益受到人们的重视。茶多酚生理机制研究通常需要对茶多酚各组分进行分离纯化和精确定量测定, 常用的茶多酚测定方法有酒石酸亚铁分光光度法、高锰酸钾滴定法和紫外分光光度法, 其中酒石酸亚铁分光光度法被定为国家标准^[1], 但上述方法均为茶多酚总量测定, 通常用于茶及茶多酚制品的品质指标鉴定, 且测定结果的重现性、精密度都不够理想^[2, 3], 难以满足进行茶多酚生理生化机制研究的需要。高效液相色谱法是目前实验室应用最广泛、最有效的分离分析技术之一, 具有分辨率高、分析速度快、重复性好、定量分析精确度高等优点, 并可用作实验室小量制备。为此, 进行了利用高效液相色谱 (HPLC) 法分离分析茶多酚主要成分的研究。

1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪 (Alltech Model 525

HPLC, Deerfield, IL, USA), 色谱柱 (Hypersil ODS, 250 × 4.6mm, 5μm, Alltech, Deerfield, IL, USA), 紫外检测器 (UV IS- 205, Alltech, Deerfield, IL, USA), SP4600 型积分仪。

各种市售绿茶、红茶、乌龙茶; 各种市售茶饮料; 儿茶素 (catechin): 购自 Sigma 公司, 色谱纯; EC, ECG, EGC, EGCG: 购自日本 Kurita Industrial 公司, 色谱纯。

2 实验方法

2.1 GTPs 的提取

茶叶中 GTPs 抽提参照 Agarwal^[4]方法, 作下述改进: 取 0.2g 粉碎茶叶, 悬浮于含儿茶素内标物 (质量浓度约为 3.0 g/L) 的 3.0 mL 蒸馏水 (80 °C) 中, 30 min 后, 冷却至室温, 过滤除渣, 用等体积氯仿抽提除去咖啡因和色素, 取上层水相, 用等体积乙酸乙酯抽提两次, 弃水相, 保存乙酸乙酯相待测。

收稿日期: 1998-08-14

作者简介: 朱勤艳 (1965-), 女, 34 岁, 博士研究生

茶饮料中 GTPs 抽提方法: 取 1 mL 茶饮料, 加入 10 μ L 含儿茶素内标物(质量浓度约为 3.0 g/L)的水溶液, 用等体积乙酸乙酯抽提两次, 保存乙酸乙酯相待测。

2.2 GTPs 抽提物的 HPLC 分析

取 15 μ L 待测样品, 通过微量加样系统(20 μ L 容积, Cotati, CA)注射上柱, 流动相为体积分数为 0.05% 的硫酸水溶液; 乙腈: 乙酸乙酯(86: 12: 2, v/v/v), 流速 1 mL/min, 用紫外检测器(UV IS-205, Alltech, Deerfield, IL, USA)监测分离的 GTPs 异构物, 用儿茶素作为内标进行定量, 根据相对保留时间以及与 EC、EGC、ECG、EGCG 混合色谱分析鉴定各 GTPs 异构物, 用 ANOVA 数据处理系统计算各 GTPs 异构物成分含量。

3 结果与讨论

3.1 GTPs 组成的 HPLC 分离分析方法的建立

选用极品龙井茶, 按 2.1 方法抽提 GTPs, 按 2.2 方法分析龙井茶 GTPs 抽提物, 重复进样 3 次。其 HPLC 图谱见图 1。利用 ANOVA 数据处理系统计算各 GTPs 异构物成分含量和标准偏差, 结果见表 1。

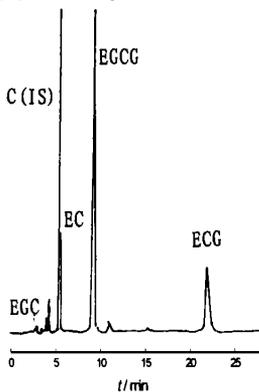


图 1 龙井茶 GTPs 抽提物的 HPLC 图谱

Figure 1 HPLC profile of longjing tea polyphenols

在本实验条件下, 茶多酚各成分得到有效分离, 且重复性、精确度较高, 相对标准偏差小

于 5%, 主要成分为 EC、EGC、ECG、EGCG, 另有数个未知少量组分。我们利用 HPLC 法分离纯化的茶多酚异构物, 已进一步进行茶多酚生理生化机制研究^[5]。

表 1 龙井茶 GTPs 组成成分

Table 1 Composition of longjing tea polyphenols

GTPs	含量 (g/100g 干茶叶)	相对标准偏差 (n=3)(%)
EGC	0.09	0.0
EC	0.53	0.0
EGCG	6.47	0.3
ECG	2.05	0.1
其他	0.98	0.3
总 GTPs	10.13	0.5

3.2 不同茶叶品种 GTPs 成分分析

根据生产过程的不同, 具有代表性的茶叶类型有: 非发酵的绿茶, 部分发酵的乌龙茶和完全发酵的红茶。我们从市售茶叶中选择数种有代表性的茶叶品种, 分析其 GTPs 组成成分, 结果如表 2 所示。

表 2 绿茶、乌龙茶和红茶中茶多酚成分分析
(g/100g 干茶叶)

Table 2 Polyphenol content of green tea, oolong tea and black tea (g/100g dry tea leaves)

茶叶类型	EGC	EC	EGCG	ECG	其他	总 GTPs
绿	绿珠茶	0.35	0.56	5.66	1.34	8.72
	云南绿茶	0.16	1.41	4.70	6.30	13.41
	极品龙井	0.09	0.53	6.47	2.05	10.13
	白沙绿茶	0.22	1.74	4.55	6.23	13.45
	龙珠绿茶	0.16	0.58	3.88	1.36	6.67
茶	毛尖绿茶	0.38	0.67	8.51	2.20	12.62
	碧螺春	0.30	0.50	9.80	3.50	15.2
	大红袍	0.22	0.36	3.13	0.69	5.17
乌龙茶	凤凰单丛	0.09	0.26	4.47	1.21	6.94
	铁观音	0.25	0.37	3.49	0.72	5.73
	武夷乌龙	0.21	0.34	3.26	3.26	5.12
红	福州红茶	0.00	0.00	0.13	0.11	0.88
	荔枝红茶	0.00	0.05	0.16	0.17	1.51

表 3 部分茶饮料中茶多酚成分分析

(mg/100mL)

Table 3 Polyphenol content of some tea drinks

(mg/100mL)

	EGC	EC	EGCG	ECG	总GTPs
日本白叶乌龙茶	0.25	0.17	12.97	3.05	16.44
日本玄米茶	0.65	0.62	10.95	3.11	15.33
日本煎茶	0.78	0.42	13.03	3.63	17.87
美国 Snapple 柠檬冰茶	0.00	0.34	0.82	0.60	1.76
美国 Refresh 柠檬冰茶	0.00	0.18	0.12	0.00	0.30
雀巢红茶	0.00	0.00	0.00	0.64	0.64
雀巢蜜桃茶	0.00	0.03	0.00	0.00	0.03
雀巢柠檬茶	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09
碧泉哈哈蜜茶	0.00	0.26	1.14	0.72	2.11
碧泉苹果茶	0.03	0.06	1.20	0.77	2.06
碧泉蜜桃茶	0.07	0.24	1.37	0.84	2.51
Laceby Hall 苹果茶	0.04	0.41	4.12	3.99	8.57
暴暴茶	0.00	0.14	0.35	0.00	0.49
阳光柠檬茶	0.00	0.10	0.16	0.00	0.27
维他柠檬茶	0.19	0.75	8.82	5.35	15.11

同类型不同品种、产地的茶叶，其 GTPs 成分基本一致，含量、组成成分比例则有一定差异，如绿茶中云南绿茶和白沙绿茶 ECG 含量高于 ECGC，而其他品种则与之相反，但总的趋势是绿茶 > 乌龙茶 > 红茶，绿茶、乌龙茶、红茶中总 GTPs 含量范围分别为 6~15 g/100g、5~7g/100g、低于 2 g/100g (均为干茶叶中)。根据朱敏等测定结果，同种茶叶不同等级之间差异较小^[6]，表明原料来源是影响 GTPs 的重要因素。

3.3 各种茶饮料中茶多酚组成分析

随着对茶叶保健功能的认识不断深入，饮茶之风正日益盛行，市面上也出现了越来越多的茶饮料。我们随机分析了部分茶饮料中的 GTPs，结果见表 3，不同品牌的茶饮料，GTPs 含量差异很大，其中以日本产三种茶饮料和维他柠檬茶 GTPs 含量最高，达 15 mg/100mL 以上，部分饮料则含 GTPs 甚少或基本不能检出 GTPs。

参考文献

- [1] GB 8313- 87. 茶- 茶多酚的测定
- [2] 张自力, 吴天荣. 中国茶叶加工, 1995, (4): 28
- [3] 张凯农, 肖 纯. 中国茶叶加工, 1995, (2): 34
- [4] Agarwal R, Katiyar S K, Zaidi S A, Mukatar H. Cancer Research, 1992, 52: 3582
- [5] Zhang A, Zhu Q Y, Luk Y S, Ho KY, Fong K P, Chen ZY. Life Science, 1997, 61(4): 383
- [6] 朱 敏, 肖培根, 章平甫等. 中国中药杂志, 1992, 17(11): 677

Isolation and Analysis of GTPs by HPLC

ZHU Q in-yan* and CHEN Zhen-yu
(Department of Biochemistry, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories, Hong Kong), Fenxi Shiyanshi, 1999, 18(4): 70~ 72

The method described by Agarwal et al (1992) was modified and used to extract total green tea polyphenols (GTPs) from different tea and tea drinks. A method for the isolation and analysis of GTPs was developed using high performance liquid chromatography. The main components including epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) and epigallocatechin gallate (EGCG) were well separated and quantified. The relative standard deviation (RSD) was less than 5% ($n=3$). It was found that the content of GTPs was significantly affected by the manufacturing process. The unfemented green tea contained about 6~15 g GTPs per 100 g dry tea leaves. In comparison, wulong tea contained about 5- 7g GTPs while black tea had less than 2g GTPs per 100g dry tea leaves.

Keywords Green tea polyphenols, HPLC; tea leaves; tea drink