

赵玥琪,郝婧玮,王 颖. HPLC 法评价储存温度对茶叶中 3 种儿茶素含量的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):232-236.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.09.044

HPLC 法评价储存温度对茶叶 中 3 种儿茶素含量的影响

赵玥琪,郝婧玮,王 颖

(牡丹江师范学院生命科学与技术学院,黑龙江牡丹江 157011)

摘要:利用高效液相色谱(HPLC)法研究不同储存温度对茶叶中儿茶素(C)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)以及表儿茶素(EC)含量的影响。以 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=15:85$ 为流动相等度洗脱,进样体积为 $10\ \mu\text{L}$,柱温为 $30\ ^\circ\text{C}$,检测波长为 $278\ \text{nm}$ 。结果表明,儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯以及表儿茶素 3 种单体质量浓度分别在 $0.1\sim 3.2\ \text{mg/mL}$ ($r=1$)、 $0.1\sim 3.2\ \text{mg/mL}$ ($r=0.999\ 9$)、 $0.1\sim 3.2\ \text{mg/mL}$ ($r=0.999\ 6$) 范围内与峰面积呈良好的线性关系。儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素在 $5\ ^\circ\text{C}$ 储存温度下含量最高,分别为 $0.012\ 4$ 、 $0.805\ 0$ 、 $0.154\ 7\ \text{mg/g}$; $95\ ^\circ\text{C}$ 下含量最低,分别为 $0.001\ 8$ 、 $0.147\ 1$ 、 $0.026\ 6\ \text{mg/g}$ 。表明 $5\ ^\circ\text{C}$ 是茶叶的最适储存温度。

关键词:高效液相色谱法(HPLC);储存温度;儿茶素;表儿茶素;表没食子儿茶素没食子酸酯

中图分类号:S571.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)09-0232-05

我国是世界上最早发现和应用茶叶的国家,在古代,很早就有神农尝百草,得茶而解之的传说,其

中茶就是茶叶^[1],而绿茶正是受大家欢迎的茶叶之一。由于产地、采摘季节及采摘要求、加工方式等的不同,茶叶的种类很多。从大类上可以分为白茶、绿茶、红茶、普洱茶、乌龙茶等,其中绿茶主要是以茶树的新叶和枝芽为原料,未经过任何发酵工序,但经过一系列杀青、整形、烘干等典型工艺过程制作而成的茶叶。

绿茶中含有大量的儿茶素(C)、咖啡碱以及少

收稿日期:2018-11-19

基金项目:黑龙江省教育厅项目(编号:1353MSYQN009、1353MSYQN012);牡丹江市科学技术计划(编号:G2018k2588);牡丹江师范学院科研项目(编号:QN2018001)。

作者简介:赵玥琪(1984—),女,黑龙江牡丹江人,硕士,讲师,主要从事植物学研究。E-mail:swxzyq77@126.com。

分虽相同质量浓度下对酪氨酸酶抑制活性与熊果苷接近,但由于其得膏率较低,不作选择,考虑到成本问题遂选择无患子提取物通过大孔树脂 D101、70%乙醇洗脱方法对无患子提取物进行富集纯化。纯化后无患子总皂苷提取物利用效率更高,对酪氨酸酶抑制活性更强,能更好地发挥无患子的美白功效。

参考文献:

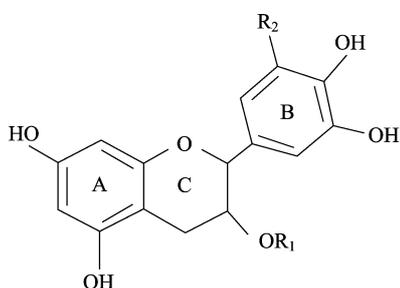
- [1]刘玉壶,罗献瑞. 中国植物志(第四十七卷第一分册)[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [2]张敏杰,刘佩茹,赵俊滋,等. 无患子的开发利用[J]. 天然产物研究与开发,1993,12(4):76-79.
- [3]李 锐,周 燕,杨永成,等. 无患子皂苷成分的串联质谱分析[J]. 高等学校化学学报,2006,27(1):52-54.
- [4]解 辉. 无患子总皂苷分离纯化的研究[M]. 合肥:合肥工业大学,2008.
- [5]杨志斌,杨 柳,李 晖. 无患子有效化学成分的分析研究[J].

湖北林业科技,2010,22(5):32-34.

- [6]赵志敏,南艳平,唐青涛,等. 无患子总皂苷抗炎及抑制酪氨酸酶活性研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(7):1592-1595.
- [7]陈清西,宋康康. 酪氨酸酶的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2006,45(5):731-737.
- [8]陈莎莎,陈丽萍,林继辉. 无患子果皮皂苷提取工艺研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2019,28(6):558-562.
- [9]冯月燕,李智斌. 天然无患子总皂苷提取工艺研究[J]. 广东化工,2019,46(9):128-129.
- [10]张永忠,徐建军,叶玉杰. 无患子果皮皂苷提取及天然洗手液制备研究[J]. 亚太传统医药,2017,13(14):34-36.
- [11]马丽珍. 无患子皂苷提取工艺的优化[J]. 日用化学工业,2015,45(3):149-151.
- [12]李智斌,张彦焘. 无患子总皂苷表面活性及其含量测定方法的研究[J]. 广东化工,2019,46(9):124-125.
- [13]陈 雷,赵春琳,周生学. 无患子总皂苷体外抑制酪氨酸酶活性的研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(21):56-58.
- [14]赵志敏,南艳平,唐青涛,等. 无患子总皂苷抗炎及抑制酪氨酸酶活性研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(7):1592-1595.

量的叶绿素、维生素、氨基酸等营养成分。儿茶素是类黄酮化合物^[2],它具有抗氧化^[3]、抗菌消炎、抗病毒、预防癌症^[4]以及调节免疫系统、降血脂、降胆固醇等一系列药理作用。

随着研究的深入和新产品的不断开发,绿茶中的儿茶素在食品、日用化妆品、精细化工、医药保健等不同领域得到了广泛的应用^[5]。茶叶的主要功能性成分是茶多酚(TP),它是茶叶中主要抗氧化物质,约占茶叶干质量的 15%~45%。茶多酚中大部分为黄烷醇,通常称之为儿茶素^[6],儿茶素是一种复合化合物,也是茶树次生代谢物的重要组成部分,使茶叶充分发挥了其保健功能。它由多种单体物质构成,目前已确认的单体就有 20 多种。儿茶素主要的有效成分有 4 种,分别是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)、表儿茶素(EC)^[7]。在儿茶素类物质中表没食子儿茶素没食子酸酯和表儿茶素没食子酸酯为主要有效成分,其中 EGCG 含量最高,占儿茶素总含量的 50% 左右^[8]。茶叶中各有效成分的结构见图 1。



表儿茶素: $R_1=R_2=H$; 表没食子儿茶素: $R_1=H, R_2=OH$;

表儿茶素没食子酸酯: $R_1=Galloyl, R_2=H$;

表没食子儿茶素没食子酸酯: $R_1=Galloyl, R_2=OH$

图1 茶叶中各有效成分的结构

儿茶素是构成绿茶功效和品质的必不可少的化学成分,它的含量决定了绿茶品质好坏,所以对儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯的提取进行研究,将有助于天然抗氧化剂的开发。茶叶在储存期间,其内含物质受环境的影响,会发生各种各样的变化,从而导致茶叶的感官质量指标降低。几十年来,许多科学家对儿茶素的基本特性、组成及其基本的生化动态和检测方法等开展了研究并获得了不少的成就,为茶叶生化研究奠定了基础^[9-13]。许多研究表明,酯型儿茶素是茶叶抗癌的重要组成部分^[14-16],可抑制癌细胞生长和诱导癌细胞分化和凋亡,具有很强的抗癌作用,并具有很强的抗氧化、抗

辐射、抗突变、抗高血脂、降血压、抗血小板凝集、抗糖尿病、抗过敏和降低香烟毒害、除臭、杀菌、抑制病毒等功效,是茶多酚具有生理活性和广阔用途的关键组分^[17-18]。酯型儿茶素影响着茶叶饮料的品质^[19-20]。

本试验以绿茶为原料,利用高效液相色谱(HPLC)法对其在不同储存温度条件下儿茶素的含量进行比较研究,以期探求绿茶储存的最适宜温度提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选用的是超市随机购买的绿茶。无水乙醇、色谱级甲醇(沈阳市民联化工有限公司);超纯水;蒸馏水;2695 高效液相色谱仪、 C_{18} 色谱柱[沃特世科技(上海)有限公司];GM-0.33A 隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司);SB-5200DTN 型台式数控超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);台式离心机(美国贝克曼公司);电子天平(上海天美天平仪器有限公司);恒温干燥箱(上海-恒科学仪器有限公司);25 mL 量筒;50 mL 锥形瓶;25 mL 烧杯;离心管;玻璃棒;电热恒温水浴锅;100、1 000 μ L 移液枪;进样瓶;抽滤瓶;移液管。

1.2 试验方法

本试验利用高效液相色谱法研究不同储存温度对茶叶中儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯以及表儿茶素含量的影响。

1.2.1 样品溶液的制备 取 2.000 0 g 茶叶置于不同的温度(-15、-5、5、15、35、55、75、95 $^{\circ}C$)下放置 5 d,然后将其分别置于 50 mL 锥形瓶中,分别加入配制好的甲醇溶液 20 mL,用玻璃棒充分搅拌均匀后,移入超声波清洗机中,超声提取 30 min。取出锥形瓶,冷却至室温后,用移液枪吸取浸提液于量筒中,全部吸取后测其体积,分别进行记录。用移液枪分别取不同储存温度的浸提液 1 mL 于离心管中并标号,放在离心机中,在 4 $^{\circ}C$ 、12 000 r/min 下离心 20 min,用移液枪取上清液于进样瓶中,制得样品。

1.2.2 色谱检测条件 色谱柱: C_{18} 色谱柱,粒径 5 μ m,250 mm \times 4.6 mm;进样量:10 μ L;流动相: $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=15:85$;柱温:30 $^{\circ}C$;检测波长:278 nm;检测器:2998PDA 紫外检测器。每次检测完成后,系统平衡 30 min,重复进样,并计算峰面积。

1.2.3 标准曲线的绘制 儿茶素标准曲线的绘制: 配制 0.1 ~ 3.2 mg/mL 不同浓度的儿茶素标准溶液, 以等度的条件放置在高效液相色谱仪中, 测定不同溶液浓度情况下儿茶素的积峰面积。以积峰面积为纵坐标, 儿茶素浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

表没食子儿茶素没食子酸酯标准曲线的绘制: 配制 0.1 ~ 3.2 mg/mL 不同浓度的没食子儿茶素没食子酸酯标准溶液, 以等度的条件放置在高效液相色谱仪中, 测定不同溶液浓度情况下没食子儿茶素没食子酸酯的积峰面积。以积峰面积为纵坐标, 表没食子儿茶素没食子酸酯浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

表儿茶素的标准曲线的绘制: 配制 0.1 ~ 3.2 mg/mL 不同浓度的表儿茶素标准溶液, 以等度的条件放置在高效液相色谱仪中, 测定不同溶液浓度情况下表儿茶素的积峰面积。以积峰面积为纵坐标, 表儿茶素浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.2.4 精密度试验 取同一份样品试液, 连续进样 5 次, 测得儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素的峰面积的相对标准偏差 (*RSD*) 分别为 1.30%、0.82%、1.50%, 表明仪器精密度良好。

1.2.5 重复性试验 精确称取 6 份质量为 0.5 g 的茶叶样品, 并按“1.2.1”节中的方法制备供试品溶液, 取 10 μ L 进样, 测得儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素 3 种单体的平均含量分别为 0.56%、2.82%、2.03%, *RSD* 分别为 1.3%、1.4%、1.6%, 说明这种操作方法重复性良好。

1.2.6 稳定性试验 取样品溶液配制成浓度为对照品溶液 80%、100%、120% (分别为低、中、高浓度) 的溶液, 分别在 0、6、12、18、24 h 进样分析。结果表明, 儿茶素低、中、高 3 种浓度峰面积 *RSD* 分别为 1.2%、1.3%、1.3%, 表没食子儿茶素没食子酸酯低、中、高 3 种浓度峰面积 *RSD* 分别为 1.3%、1.8%、1.4%, 表儿茶素低、中、高 3 种浓度峰面积 *RSD* 分别为 1.3%、1.8%、1.5%, 表明样品溶液放置 24 h 稳定, 能够满足测定要求。

1.2.7 加样回收率试验 准备制备已知含量的样品适量, 精确称量后, 分别加入标准品适量, 按“1.2.5”节溶液的制备方法, 制备加样供试品溶液, 分别进样 6 次, 观察 3 种单品(儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素)的峰面积, 计算 *RSD* 及平均回收率, 其平均回收率分别为 99.17%、99.25%、99.22%, *RSD* 分别为 1.08%、1.22%、0.78%。

2 结果与分析

2.1 儿茶素的标准曲线建立

以积峰面积为纵坐标, 儿茶素含量为横坐标, 二者的线性回归方程为 $y = 6.6 \times 10^6 x - 28\ 835.8$, 相关系数 $r = 1$, 说明儿茶素标准品在 0.1 ~ 3.2 mg/mL 范围内, 峰面积与儿茶素含量呈良好的线性关系(图 2)。

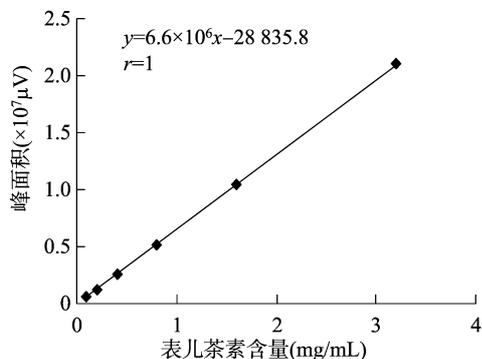


图2 C 标准曲线

2.2 表没食子儿茶素没食子酸酯的标准曲线建立

以积峰面积为纵坐标, 表没食子儿茶素没食子酸酯含量为横坐标, 二者的线性回归方程为 $y = 1.3 \times 10^7 x - 746\ 680.9$, 相关系数 $r^2 = 0.999\ 9$, 说明表没食子儿茶素没食子酸酯标准品在 0.1 ~ 3.2 mg/mL 范围内, 峰面积与表没食子儿茶素没食子酸酯含量呈良好的线性关系(图 3)。

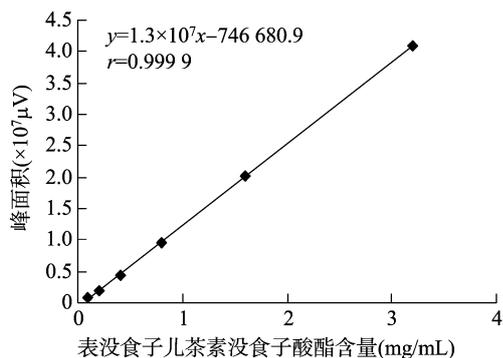


图3 EGCG 标准曲线

2.3 表儿茶素的标准曲线建立

以积峰面积为纵坐标, 表儿茶素含量为横坐标, 二者的线性回归方程为 $y = 4.0 \times 10^6 x + 166\ 618.3$, 相关系数 $r = 0.999\ 6$, 说明表儿茶素标准品在 0.1 ~ 3.2 mg/mL 范围内, 峰面积与表儿茶素含量呈良好的线性关系(图 4)。

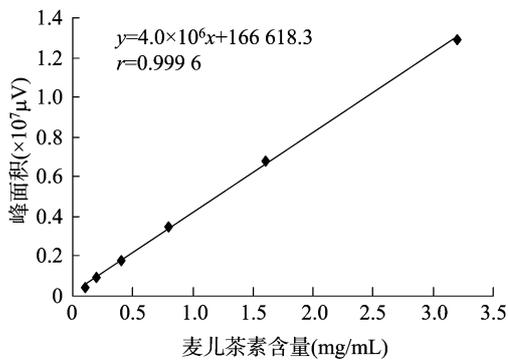


图4 EC标准曲线

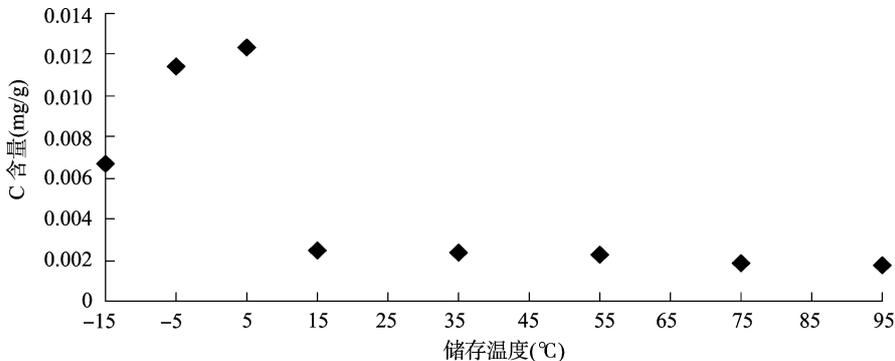


图5 储存温度对C含量的影响

2.5 储存温度对茶叶中表没食子儿茶素没食子酸酯含量的影响

由图6可知,储存温度在5℃时,表没食子儿茶素没食子酸酯的含量最多,为0.8050 mg/g。随着温度的升高或降低,表没食子儿茶素没食子酸酯的含量均呈现不同程度的下降趋势。从5℃到

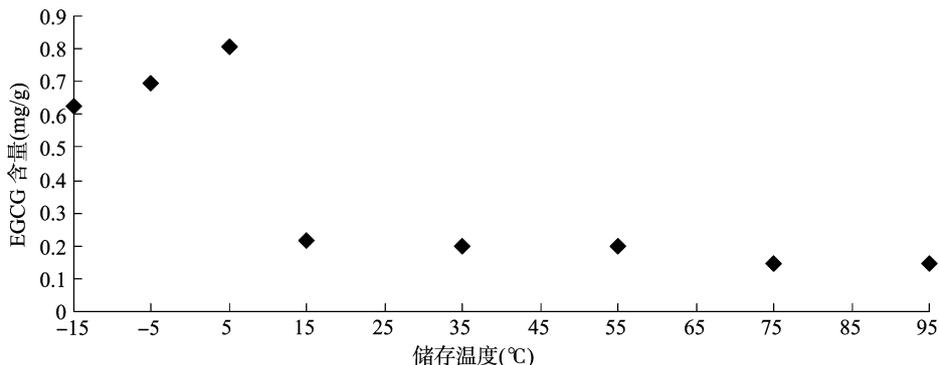


图6 储存温度对EGCG含量的影响

2.6 储存温度对茶叶中表儿茶素含量的影响

由图7可知,储存温度为5℃时,表儿茶素含量最高,为0.1547 mg/g。随着温度的升高或降低,表儿茶素的含量均呈现不同程度的下降趋势。从5℃到-15℃,表儿茶素的含量从0.1547 mg/g降为0.1296 mg/g;从5℃到15℃,表儿茶素的含量从0.1547 mg/g急剧下降为0.0411 mg/g;从15℃到

2.4 储存温度对茶叶中儿茶素含量的影响

由图5可知,储存温度为5℃时,儿茶素的含量最多,为0.0124 mg/g。随着温度的升高或降低,儿茶素的含量均呈现不同程度的下降趋势。从5℃到-15℃,儿茶素的含量从0.0124 mg/g降为0.0067 mg/g;存储温度从5℃到15℃,儿茶素的含量从0.0124 mg/g急剧下降为0.0025 mg/g;从15℃到95℃,儿茶素的含量下降趋势平缓,95℃时儿茶素含量为0.0018 mg/g。

-15℃,表没食子儿茶素没食子酸酯的含量从0.8050 mg/g降为0.6256 mg/g,从5℃到15℃,表没食子儿茶素没食子酸酯的含量从0.8050 mg/g急剧下降为0.2157 mg/g;从15℃到95℃,表没食子儿茶素没食子酸酯的含量下降趋势平缓,95℃时含量为0.1471 mg/g。

95℃,表儿茶素的含量下降趋势平缓,95℃时含量为0.0266 mg/g。

3 讨论与结论

储存温度从-15℃到95℃,儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯以及表儿茶素的含量呈先上升后下降的趋势,其中,在5℃储存温度下含量最高,

95 ℃下含量最低。研究表明,随着储存温度的升高,可导致其浓度和含量的差异。

储存温度对儿茶素提取率的影响如下。(1)储存温度升高可以加快传质过程,有利于有效成分的

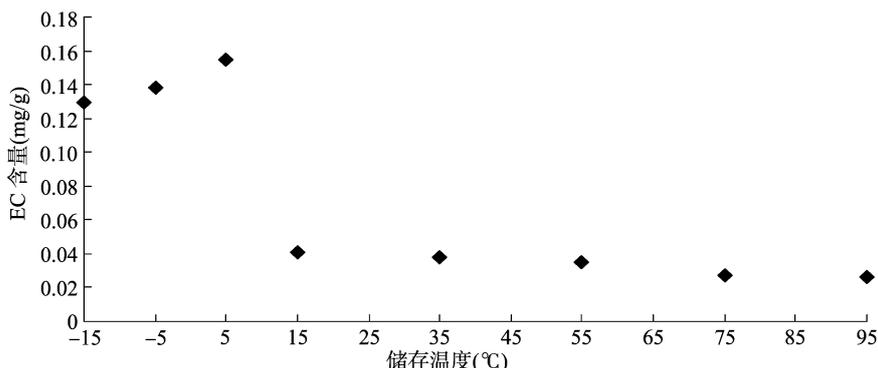


图7 储存温度对 EC 含量的影响

酸酯以及表儿茶素的含量在其他条件相同的情况下,储存温度为 5 ℃时达到最大值,之后随着储存温度的增加逐渐降低,在储存温度为 95 ℃时达到最小值。在日常的茶叶储存过程中,应避免温度过高或过低,以免导致茶叶中的有效成分含量降低。将茶叶避光保存在 5 ℃左右条件下,其有效成分含量最高。本试验中的研究方法简单并且易于操作,所用的主要药品甲醇为常规试剂,成本偏低,而且对环境污染较少,儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯以及表儿茶素的提取率也相对较高,表明本试验中工艺方法有较高的市场应用前景和参考价值。

参考文献:

[1] 尤新. FIC 学术报告绿茶提取物儿茶素及 EGCG 的功能和发展状况[C]. 第十四届中国国际食品添加剂和配料展览会学术论文集,2010.

[2] 朱斌,陈晓光,宋航,等. 茶多酚制备高纯度 EGCG 的工艺研究[J]. 食品研究与开发,2009,30(4):7-10.

[3] 孙志栋,顾富强,梁月荣,等. 茶多酚提取优化工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(增刊1):490-493.

[4] 陈宗懋. 茶多酚类化合物抗癌的生物化学和分子生物学基础[J]. 茶叶科学,2003,23(2):83-93.

[5] 杨志辉. 儿茶素单体高效分离纯化技术研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2011.

[6] 徐春明,乐胜锋,罗晶洁,等. 不同种类绿茶提取物抗氧化活性研究[J]. 中国农学通报,2010,26(16):68-71.

[7] 孙晓莉,刘帅华,汪雷,等. 高效液相色谱法同时测定五指山绿茶中 5 种儿茶素类成分[J]. 植物研究,2011,31(3):377-380.

[8] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2007:9-10.

[9] 陆锦时. 茶树儿茶素含量及组成特性与品种品质的关系[J]. 西

南农业学报,1994,7(增刊1):6-9.

[10] 李倩,王玉,丁兆堂,等. 崂山绿茶儿茶素组分含量变化分析[J]. 西南农业学报,2010,23(3):670-673.

[11] 陈保,姜东华,吕生,等. 云抗 10 号大叶种茶晒青芽叶的生化特性研究[J]. 茶叶科学技术,2013(1):1-4.

[12] 康海宁,陈波,韩超,等. HPLC 法测定茶叶水提液中五种儿茶素和咖啡碱及其用于茶叶分类的研究[J]. 分析测试学报,2007,26(2):211-215.

[13] 廖夫生. HPLC 法同时测定茶叶中 4 种儿茶素类成分[J]. 中国茶叶,2008(9):24-25.

[14] Jerzy J, Steven H S, Rafal S, et al. Why drinking green tea could prevent cancer? [J]. Nature,1997,387(6633):561.

[15] Tan X H, Hu D R, Li S R, et al. Differences of four catechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells[J]. Cancer Letters,2000,158(1):1-6.

[16] 辛华雯,曾繁典. 聚酯型儿茶素抗癌作用的机制研究[J]. 中国药理学通讯,2001,18(4):18.

[17] 赵保路. 茶多酚的抗氧化作用[J]. 科学通报,2002,47(16):1206-1210.

[18] Huang H, Xu X Q. Anticancer activity of tea: evidence from recent animal experiments and human studies[J]. 茶叶科学,2004,24(1):1-11.

[19] 黄建安,施兆鹏,施英,等. 乌龙茶“岩韵”与“音韵”的感官体验及化学特性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2003,29(2):134-136.

[20] 浙江农业大学. 茶树栽培学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,1996.

[21] 应艳杰,邵平,孙培龙. 茶末中儿茶素的乙醇提取工艺优化研究[J]. 农机化研究,2008(4):123-126.

[22] 吕远平,何强,姚开,等. 儿茶素提取的优化条件研究[J]. 四川大学学报(工程科学版),2004,36(2):65-68.

[23] 范新年,宋航,兰先秋,等. 温度和 pH 对儿茶素萃取平衡的影响[J]. 食品科技,2006(4):34-37.