

## 等度反相高效液相色谱法测定茶多酚中的儿茶素和咖啡因

唐根源, 吴红京, 吴 棱, 李兆基, 姚元根

(中国科学院福建物质结构研究所结构化学国家重点实验室, 福建 福州 350002)

**摘要:**介绍一种简便的等度反相高效液相色谱分析茶多酚中 5 种儿茶素和咖啡因的快速方法。样品总的分析时间在 0.5 h 内。色谱柱为 Resolve C<sub>18</sub>; 流动相为水-体积分数为 85% 的磷酸水溶液-乙腈-*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) (体积比为 859:1:120:20); 柱温为 43 ℃; 紫外检测波长为 280 nm。研究了流动相中改良剂 DMF 与容量因子的关系。被测组分的含量与其峰面积有良好的线性关系( $r=0.9992\sim0.9999$ ); 加标回收率在 83.33%~104.42% (RSD 在 0.74%~1.43%)。

**关键词:**等度高效液相色谱法; 儿茶素; 咖啡因; 茶多酚

**中图分类号:** O658      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-8713(2001)03-0233-03

### 1 前言

儿茶素有良好的抗氧化剂, 具有生物活性和诸多药效(如抗肿瘤, 抗诱变, 预防龋齿等), 因而儿茶素已成为一类重要的食品添加剂和药物。

儿茶素是茶多酚的主要组分, 其质量分数约占茶多酚总量的 90% 左右, 而茶多酚在干茶叶中的质量分数达 30% 左右。茶叶的味道, 绿茶的苦味和涩味主要是由儿茶素引起的。目前研究茶叶中的儿茶素的文章很多, 魏涛等<sup>[1]</sup>对此作了总结。在诸多文章中高效液相色谱方法独占鳌头, 但该方法也存在一些不能令人满意的地方, 如一般采用复杂的流动相组成或浓度梯度洗脱<sup>[2,3]</sup>, 造成实验重复性差, 实际分析时间长等不足, 给样品分析带来困难和不便。我们建立了方便的等度反相高效液相色谱分析法, 使茶叶中的 5 种儿茶素和咖啡因在 0.5 h 内完全分离。另外, 可通过控制和调节流动相来适应不同的分析要求和不同来源的茶叶分析。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器和主要试剂

LC-4A 高效液相色谱仪、SPD-2AS 紫外检测器(日本岛津), U6K 进样阀(Waters), CSF-1A 超声波清洗器(上海超声仪器厂)。

乙腈、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)和磷酸均为 AR 级试剂; 水(二次蒸馏), 表没食子儿茶素((-)-epigallocatechin, EGC, 纯度为 98%, Sigma), 儿茶素((+)-catechin, C, 纯度为 98%, Sigma), 表儿茶素((-)-epicatechin, EC, 纯度为 99%, Acros), 表没食

子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin gallate, EGCG, 纯度为 80%, Sigma), 表儿茶素没食子酸酯((-)-epicatechin gallate, ECG, 纯度为 98%, Sigma) 和咖啡因(caffeine, CAF, Sigma)。

#### 2.2 色谱分析条件

色谱柱: Resolve C<sub>18</sub> (3.9 mm i. d. × 300 mm, 5 μm, Waters); 流动相: 水-体积分数为 85% 的磷酸水溶液-乙腈-DMF (体积比为 859:1:120:20), 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 43 ℃; 检测波长: 280 nm。

#### 2.3 标准溶液的配制

标准样品价格昂贵, 我们用酸性水(pH < 4)配成 10 mL 的标准溶液, 内含 EGC, C, EC, EGCG, ECG 和 CAF 分别为 0.539 0 mg, 0.214 5 mg, 0.213 4 mg, 0.144 0 mg, 0.311 3 mg 和 0.020 7 mg。

#### 2.4 样品溶液的制备

按文献[4]提取茶多酚。茶多酚用酸性水溶解后经 0.45 μm 孔径的滤膜过滤, 作为样品溶液。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 流动相的选择

在建立分析方法时, 不仅要考虑标准儿茶素和咖啡因的分离, 还要考虑茶多酚中其他成分干扰待测组分的问题。色谱柱选定后, 流动相的选择就成了关键问题。所选择的流动相应符合以下条件, 即儿茶素和咖啡因与茶多酚中其他组分的分离在合理的时间内完成。为了达到这个目的, 在诸多论文中均采用复杂的流动相组成或浓度梯度洗脱<sup>[2,3]</sup>。初看起来, 采用那些方法分离样品, 各组分的分离度和样品的分析时间都很合适, 但样品的实际分析时间

收稿日期: 2000-10-13

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(B9810012)

作者简介: 唐根源(1941-), 副研究员, 毕业于南京大学。

通讯联系人: 姚元根(1962-), 男, 博士生导师, 电话: (0591)3711523, 传真: (0591)3714946, E-mail: yyg@ms.fjirsm.ac.cn。

却要增加 1 倍,甚至 2 倍以上。因为一个样品分析完成后,必须用流动相冲洗色谱柱至平衡,这样就增加了样品的实际分析时间。也有采用流动相等度洗脱的,但效果不尽人意,或分离不理想<sup>[5]</sup>,或分析时间太长<sup>[6]</sup>。在我们选择的流动相体系(水-磷酸-乙腈)中加入改良剂 DMF 能收到意想不到的效果(图 1),而且组分之间的分离可用加入 DMF 的量来调节(见图 2)。从图 2 看出,流动相中未加 DMF 时,CAF,EC,EGCG 不能分离;随着 DMF 的加入,咖啡因首先与 EC,EGCG 分离;当 DMF 达到一定量时,EC,EGCG 分离;但 DMF 不能无限增加,当 DMF 达到一定比例时,咖啡因和 C 重合。因而,在实验中可以很方便地利用加入流动相中 DMF 的量来调节各组分间的分离,在各组分之间的分离度达到要求的前提下,使样品分析在 0.5 h 内完成。

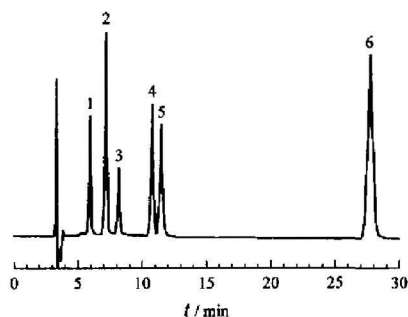


图 1 儿茶素和咖啡因混合标准的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the mixture of catechins and caffeine standards

1. (-)-epigallocatechin(EGC); 2. (+)-catechin(C); 3. caffeine(CAF); 4. (-)-epicatechin(EC); 5. (-)-epigallocatechin gallate(EGCG); 6. (-)-epicatechin gallate(ECG).

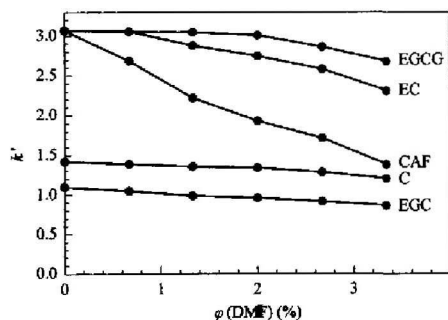


图 2 流动相中 DMF 的体积分数对  $k'$  的影响

Fig. 2 Effect of volume fraction of DMF in mobile phase on  $k'$

### 3.2 线性回归方程和相关系数

分别取“2.3”节的标准溶液 2.5  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 40  $\mu\text{L}$  和 80  $\mu\text{L}$  进行分析。同一体积的样品平行分析 6 次,取其平均值。以峰面积(Y)为

纵坐标,进样量 X( $\mu\text{g}$ )为横坐标作图,线性回归处理的结果如表 1。

表 1 线性回归方程和相关系数

Table 1 Regression equations and correlation coefficients

Component *	Regression equation	r
EGC	$Y = 17.4227X - 1.3501$	0.9992
C	$Y = 66.2882X - 68.0811$	0.9999
CAF	$Y = 236.6935X + 14.6750$	0.9998
EC	$Y = 59.7804X + 0.0552$	0.9999
EGCG	$Y = 118.2514X - 0.7601$	0.9996
ECG	$Y = 199.1078X - 0.3944$	0.9997

\* For components, see the note in Fig. 1.

### 3.3 样品分析

我们对按“2.4”节方法提取的茶多酚进行了分析,典型谱图如图 3。

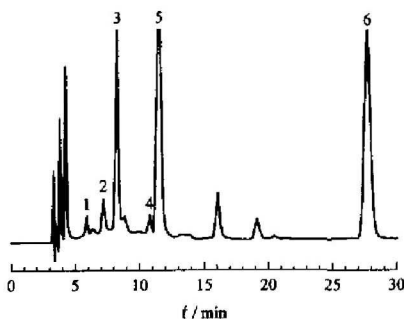


图 3 样品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of the sample

Peak No. the same as in Fig. 1.

### 3.4 方法精密度和加标回收率

取含有 5 种儿茶素和咖啡因的样品进行测定,用外标法定量,考察方法精密度和加标回收率,结果见表 2。

表 2 方法精密度(n=6)和加标回收率(n=5)

Table 2 Precision of method (n=6) and the recovery of added standard (n=5)

Component	Background (mg)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	RSD (%)
EGC	2.20	1.81	4.09	104.42	1.30
C	0.35	0.42	0.70	83.33	1.25
CAF	1.90	2.99	4.78	96.32	1.43
EC	2.07	2.11	4.05	93.84	0.98
EGCG	43.64	31.28	74.58	98.91	0.74
ECG	14.12	15.52	28.43	92.14	1.33

因缺乏其他儿茶素标准品,茶多酚的全面分析有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] WEI Yang, DING Ming-yu. Chinese Journal of Chromatography, 2000, 18(1):35-38  
魏 洪, 丁明玉. 色谱, 2000, 18(1):35-38
- [2] MA Qing-yun, WANG Xiao-xia. Bulletin of Instrumental Analysis, 1988, 7:25-27  
马卿云, 王小霞. 分析测试通报, 1988, 7:25-27
- [3] Goto T, Yoshida Y, Kiso M, et al. J-Agric Food Chem, 1998, 46:295-299
- [4] YAO Yuan-gen, WU Ling, WANG Li-zhu. Chinese Patent: CN1194966A. 8, 1998  
姚元根, 吴 凌, 王丽珠. 中国专利: CN1194966A. 8, 1998
- [5] Hoefler A C, Coggon P. J Chromatogr. 1976, 129:460-463
- [6] Lin J K, Lin C L, Liang Y C, et al. J Agric Food Chem, 1998, 46:3 635-3 642

## Separation of Catechins and Caffeine in Tea Polyphenol by Isocratic Elution High Performance Liquid Chromatography

TANG Gen-yuan, WU Hong-jing, WU Ling, LI Zhao-ji, YAO Yuan-gen  
(State Key Laboratory of Structural Chemistry, Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, The Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The catechins, particularly in green tea, have been found to possess anti-mutagenic and anti-tumorigenic properties. As each catechin possesses distinct properties, a simple and rapid method that could be used for analysis of individual catechins in a complex mixture would be necessary.

A relatively simple and rapid method for simultaneous separation of five catechins and caffeine in tea polyphenol by isocratic elution high performance liquid chromatography has been developed. The analysis could be finished within 30 min. They were measured using Resolve C<sub>18</sub> column (at 43 °C) and UV detector (at 280 nm), water-85% phosphoric acid aqueous solution-acetonitrile-dimethyl formamide (DMF) (859:1:120:20, V/V) as mobile phase. There was a good linear relationship between the content of component and its peak area for catechins and caffeine, with the correlation coefficients of 0.999 2-0.999 9. The average recoveries ( $n=5$ ) were 83.33%-104.42%, and the relative standard deviations ( $n=6$ ) were 0.74%-1.43%. The effect of concentration of DMF in mobile phase was studied.

**Key words:** isocratic elution high performance liquid chromatography; catechin; caffeine; tea polyphenol

### 欢迎购买《色谱》过期刊物

本部现有部分过期刊物,欲购者请与编辑部联系。邮购地址:大连市中山路457号,邮编:116023,收款单位:《色谱》编辑部。请在汇款单上注明所购刊物的发行年、期、数量及购刊人的详细地址、邮编,收据上要开的单位名称等。款到后寄刊。

现有过期刊物的价格如下:

1990年~1993年:2.60元/期,全年15.00元

1994年~1996年:4.50元/期,全年27.00元

1997年~2000年:7.50元/期,全年45.00元

以上刊物均免收邮费,欢迎读者踊跃购买!