

茶中儿茶素类和生物碱成分的 HPLC 分析

张 莉 段宏瑾 方洪钜 王增盛* 刘仲华*

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所,北京 100050; *湖南农业大学,长沙 410128)

摘要 建立了以恒组成溶液为流动相的 HPLC 同时分析茶中 5 种儿茶素类(C, ECG, EC, EGC, EGCG)和 3 种生物碱(Caf, Tp, Tb)的定量方法,色谱条件为:ODS(10 μ m)柱,以 0.04 mol \cdot L⁻¹柠檬酸水溶液-N,N-二甲基甲酰胺-四氢呋喃(90:16:4)为流动相,UV 检测器(278 nm),并以二氯磺胺为内标。结果表明:8 种成分分离良好,EGCG(7.2%~9.4%)和 Caf(4.4%~4.7%)分别为儿茶素类和生物碱中含量最高的成分。同时探讨了这些成分的提取方法和分离测定条件。

关键词 儿茶素;生物碱;高效液相色谱法

茶多酚(tea polyphenols, TP)是茶叶中多酚类物质总称,主要包括儿茶素类(catechins)、黄酮类、花青素和酚酸等 4 类物质。其中数量最多、药理作用最为显著的是儿茶素类化合物,迄今已发现 6 种儿茶素类化合物:儿茶素((+)-catechin, C)、表儿茶素((-)-epicatechin, EC)、没食子儿茶素((+)-gallocatechin, GC)、表没食子儿茶素((-)-epigallocatechin, EGC)、表儿茶素没食子酸酯((-)epicatechin gallate, ECG)、表没食子儿茶素没食子酸酯((-)epigallocatechin gallate, EGCG)。

药理实验表明^[1~4],茶多酚(主要是儿茶素类)有明显的清除体内自由基,阻断 N-亚硝基化合物形成,抑制脂氧合酶活性和脂质过氧化作用,并有防突变、防癌、抗衰老及防辐射等药理活性。最近还发现^[5]ECG 和 EGCG 对人体爱滋病毒(HIV)的逆转录酶有抑制作用。儿茶素类组分的分析曾用高效液相色谱、薄层色谱和气相色谱等方法^[6~10],目前使用最多的是 HPLC,尤其用梯度 HPLC 可完成更多种成分的分析^[8]。

咖啡碱(caffeine, Caf)属黄嘌呤类生物碱,除咖啡碱外,茶叶中还有茶碱(theophylline, Tp)和可可碱(theobromine, Tb),它们均有多种药理活性^[11,12]。

3 种生物碱的化学结构相似,共存时分别定量较困难,用微分脉冲阳极伏安法、电泳扫描法、TLC 法、GC 或 HPLC 法可分别测定它们的含量。

本文报道用恒组成 HPLC 同时进行 5 种儿茶素类和 3 种茶生物碱的分析,尚属首次。

实 验 部 分

仪器与试剂

LC-3A 泵,SPD-1A 检测器,CR-1B 数据处理机,UV3000 分光光度计,日本岛津;H66005 超声清洗机,无锡电子设备厂;LD5-2A 离心机,北京医用离心机厂。

标准品 EC, EGC, EGCG, ECG 为丹麦赠送; Caf 购于中国药品生物制品检定所; C 购于 Sigma 公司; 二氯磺胺(diclofenamide, DCF)为加拿大赠送。

样品 国宾茶、大叶奇兰茶、白叶单丛茶由广东国宾茶厂提供。

试剂 均为 AR 级。

高效液相色谱条件

色谱柱: Nucleosil ODS(10 μm) 25 cm \times 4.6 mm ID; 紫外检测波长: 278 nm; 流动相: 0.04 mol \cdot L⁻¹ 柠檬酸液—DMF—THF(90:16:4); 柱温: 30°C; 流速: 1.5 ml \cdot min⁻¹; 量程: 0.08 AUFS; 内标: DCF。

上述条件下, 5 种儿茶素类和 3 种茶生物碱及内标的标准品色谱图见图 1。

提取条件

由于所测化合物极性都较大, 且有酯类化合物, 因此选用乙酸乙酯及极性大的甲醇、乙醇、水作提取溶剂, 试验了单一溶剂和混合溶剂, 最后选定 50% 甲醇为提取液。

由于儿茶素经长时间加热易氧化, 因此提取时用短时加热冷浸和超声等方法。结果表明: 热回流提取效率较高, 但提取液中有 C 而无 EC, 其它方法的提取液则含 EC, 显示加热提取导致 EC 含量的降低和 C 含量的增高, 与文献^[10]报道一致。综合比较几种方法, 选定冷浸过夜, 超声 10 min 作为提取方法。

测定方法

精密称取茶叶粉末(40 目)1.0 g 置 100 ml 具塞三角瓶中, 准确加入 50% 甲醇 50 ml, 密闭, 冷浸过夜, 超声 10 min 后离心, 精密吸取上清液 0.9 ml 和内标溶液 0.1 ml, 混匀, 即为待测样。按上述色谱条件进样 10 μl 进行分离、测定, 以内标法计算含量。



Fig 1 HPLC chromatogram of catechins, alkaloids and internal standard. 1. Theobromine (Tb); 2. Theophylline (Tp); 3. Caffeine (Caf); 4. (-)-Eicatechin gallate (EGC); 5. (+)-Catechin (C); 6. (-)-Epicatechin (EC); 7. (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG); 8. (-)-Epigallocatechin (ECG); 9. Diclofenamide (DCF).

结 果

标准曲线

将各标准品配制成标准溶液, 精密量取适量混合, 用内标法测定各标准品的标准曲线, 结果见表 1。

Tab 1 Data of calibration curves

Compound	Regression equation ($y = a + bx$)	Correlative coefficient	Linear range ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
Tb	$y = 4.300 \times 10^{-2} + 6.299x$	0.9998	0.02~0.08
Tp	$y = 3.995 \times 10^{-2} + 7.030x$	0.9998	0.02~0.07
Caf	$y = 0.1738 + 7.052x$	0.9999	0.07~0.29
EGC	$y = 6.620 \times 10^{-2} + 0.611x$	0.9994	0.14~0.58
C	$y = -1.117 \times 10^{-2} + 1.510x$	0.9999	0.16~0.66
EC	$y = -4.653 \times 10^{-3} + 1.388x$	0.9993	0.06~0.24
EGCG	$y = -4.805 \times 10^{-2} + 3.404x$	0.9999	0.24~0.96
ECG	$y = -2.848 \times 10^{-2} + 3.938x$	0.9999	0.07~0.28

Unit of X: $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tb. Theobromine; Tp. Theophylline; Caf. Caffeine; EGC. (-)-Epigallocatechin; C. (+)-Catechin; EC. (-)-Epicatechin; EGCG. (-)-Epigallocatechin gallate; ECG. (-)-Epicatechin gallate.

最小检测限

以信噪比(S/N)大于2测得各组分最小检测限, Tb, Tp, Caf, EGC, C, EC, EGCG 和 ECG 的值分别为 7.0, 8.4, 7.5, 72, 30, 29, 24 和 35 ng。由于 EGC, C 和 EC 最大紫外吸收不在 278 nm 处, 因此最小检测限较高; 而 EGCG, ECG 由于保留时间长, 峰形较宽, 最小检测限也较高。

精密度试验

吸取标准溶液 10 μl 进样, 依上述色谱条件测定, 重复进样 10 次, 各组分相对标准偏差在 1.2%~3.2% 之间, 结果见表 2。

Tab 2 Precision of catechins and alkaloids ($n = 10$)

Compound	Tb	Tp	Caf	EGC	C	EC	EGCG	ECG
A_i (peak area)	12058	8475	44492	5423	11700	4902	43080	15697
$\pm s$	269	204	521	128	345	126	983	491
RSD(%)	2.3	2.5	1.2	2.4	3.0	2.6	2.3	3.2

回收率试验

精密称取茶叶粉末(40目)25 mg 4份, 2份中加入一定量 Caf, Tp, ECG, EGCG 标准品溶液和内标溶液, 另2份只加入内标溶液, 加50%甲醇至2.0 ml, 冷浸过夜, 超声10 min后离心, 吸取上清液进样10 μl , 结果见表3。

Tab 3 Recovery of catechins and tea alkaloids

Compound	Amount in sample (I) (μg)	Amount added (μg)	Total amount determined (II) (μg)	Amount found (II-I) (μg)	Recovery (%)
Tp	0.4270	0.4434	0.8633	0.4363	98.4
Caf	3.340	1.600	4.910	1.570	98.1
EGCG	2.858	2.210	5.110	2.252	101.9
ECG	0.399	0.576	0.989	0.590	102.4

样品分析

用本法对国宾系列茶进行分析, 结果见表4。

Tab 4 Catechins and alkaloids contents (%) in 3 kinds of tea

Sample	Content (%)								Total content of catechins (%)
	Tb	Tp	Caf	EGC	C	EC	EGCG	ECG	
Baiye tea	0.07611	0.4409	4.449	0.6806	—	0.2669	7.214	1.070	9.23
Daye tea	—	0.3039	4.140	3.169	0.2106	0.6933	8.013	1.477	13.56
Guobin tea	0.1036	0.5248	4.702	—	0.3134	0.2130	9.441	1.339	11.53

讨 论

曾先后用甲醇—水、乙腈—水、柠檬酸水溶液—*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)作为流动相,效果都不理想。但在实验中发现,当 DMF 比例稍大时,Caf 和 EGC 分不开,若适当加大柠檬酸水溶液比例,则 Caf 和 EGC 分离状况得到改善,但其它组分(特别是 EGCG)保留时间过长,峰变宽、拖尾严重。为改善这种状况先后分别试验了在流动相中加入适量乙酸乙酯、甲醇、乙腈、四氢呋喃(THF),结果发现前 3 者虽能缩短分析时间,但都不利于 Caf 和 EGC 的分离,只有 THF 不仅能缩短分析时间,而且也不影响 Caf 和 EGC 的分离(其分离度达 1.8)。最后确定以 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸水溶液—DMF—THF(90:16:4)为流动相。

从表 4 中可以看出:最具药效的 Caf 和 EGCG 在国宾茶中含量较高。按 1985 年商业部颁标准^[12]测定茶多酚总量得国宾茶中茶多酚含量为 18.44%,与 HPLC 测定的儿茶素类含量比较,可以发现:前者远大于后者,这是由于茶多酚中除儿茶素类外,还含有其它黄酮类化合物及儿茶素氧化物类化合物在内的多种物质,在前者测定条件下,这些杂质皆有响应。不同茶中儿茶素类在茶多酚中所占比例不同,因此用茶多酚含量说明儿茶素含量不甚恰当。同样用部颁法测得国宾茶中咖啡碱含量为 4.91%,与 HPLC 测定结果进行比较可以发现,前者也比后者数值略大,这是因为茶碱、可可碱干扰所致(在 278 nm 下,二者盐酸盐也有较强紫外吸收),因此,商业部颁标准测定咖啡碱的方法实际上是测定 3 种生物碱的总量。与绿茶的儿茶素类分析^[9]结果比较可看出,国宾茶中结合儿茶素 EGCG 和 ECG 的含量较高,能否说明国宾茶的保健作用更好,有待实验验证。

曾将国宾茶与市售铁观音茶中的儿茶素类进行比较,发现二者虽同为乌龙茶,但儿茶素类的组成差异很大,说明产地不同,茶叶成分有较大差异。

恒组成 HPLC 虽使 8 种化合物同时得到了较好分离,但分析时间仍较长,若使用梯度洗脱,则不仅能缩短分析时间,而且可进一步提高分离度。由于仪器原因,仅进行了初步尝试,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 韩水晶,吴晓凤,钱进等. 茶儿茶素抗小鼠脑、肝及肾脂质过氧化作用. 中草药,1992,23: 477
- 2 何睦礼,伍锡岳,曾佛桂等. 品常春健身乌龙茶对高脂血症的临床疗效. 中国茶叶,1993,15: 18
- 3 原征彦. 茶カテキンの抗腫瘍作用,日本栄養. 食量学会志,1993,45: 18
- 4 林乾良. 茶疗专题讲座 I. 茶疗概述. 茶叶,1993,19: 47
- 5 Nakane H, Ono K. Differential inhibitory effect of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry*. 1990,29: 2841

- 6 李秉定, 汤蓬, 汤坚等. 用气相色谱和高效液相色谱测定茶叶抗氧化剂的组成. 南京农业大学学报, 1992, 15: 73
- 7 熊凤麟, 袁吕江, 吕才有等. 高效液相色谱测定茶叶中儿茶素组分的含量. 色谱, 1993, 11: 251
- 8 Watanabe NHT, Kenji I. Changes of catechins and methylated xanthines in teas and their canned products. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, 1992, (10): 907
- 9 王增盛. 茶儿茶素的高效液相色谱测定方法. 茶叶科学, 1991, 11(增刊): 93
- 10 度部伸夫, 寺田久屋, 一色賢司. 茶類飲料におけるカテキン類およびメチルキサンチン類の加工. 貯蔵による変動. 日本食品工業学会志, 1992, 39: 907
- 11 程启坤编著. 茶化浅析. 杭州: 中国农业科学院茶叶研究所情报资料研究室. 1982: 255
- 12 中国农科院茶叶研究所. 茶叶中粗纤维、水浸出物、茶多酚、氨基酸、咖啡碱检测方法标准. 中华人民共和国商业部标准 SBXX-85(试行)

STUDIES ON ANALYSIS OF CATECHINS AND ALKALOIDS IN TEA BY HPLC

L Zhang, HJ Duan, HJ Fang, ZS Wang* and ZH Liu*

*(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union
Medical College, Beijing 100050; * Hunan Agricultural University, Chungsha 410128)*

ABSTRACT By using HPLC, five catechins (catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate) and three tea alkaloids (caffeine, theobromine, theophylline) were separated and determined simultaneously. The chromatographic conditions were as follows: stainless steel column, ODS (Nucleosil, 10 μm), 0.04 mol \cdot L⁻¹ citric acid solution, dimethyl formamide and tetrahydrofuran (96 : 16 : 4) as mobile phase, UV detector (at 278 nm). The method is simple, convenient and sensitive.

Key words Catechins; Alkaloids; HPLC