

茶叶儿茶素组分 HPLC 测定中的提取方法研究*

吕海鹏¹, 林智^{1,2}, 谷记平¹, 郭丽¹, 谭俊峰¹

1(中国农业科学院茶叶研究所, 农业部茶叶化学工程重点开放实验室, 浙江杭州, 310008)

2(中国科学院昆明植物所, 植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南昆明, 650204)

摘要 以蒸青绿茶为材料, 利用单因素试验和正交实验研究了不同提取时间、不同提取温度以及不同提取料液比例等对茶叶中儿茶素组分的影响。结果表明: 当提取料液比例为 1:125(g:mL)、提取温度为 70℃、提取时间为 30 min 时, 蒸馏水一次提取可以达到相对理想的提取效果, 适用于常规分析实验。

关键词 茶, 儿茶素组分, 高效液相色谱, 提取方法

茶叶中的黄烷-3-醇衍生物(俗称儿茶素类), 是茶叶药理作用最为明显的组分^[1~3], 又是对茶叶品质具有决定性作用的影响因子之一^[4], 因此这类成分的定量是茶叶科研中一项重要的常规分析内容。茶叶中的儿茶素总量可以采用香兰素比色法准确测定^[5], 然而儿茶素组分的分析方法多种多样, 其中高效液相色谱(HPLC)因为具有高效、高速、高灵敏度以及高度自动化的特点得到了人们的青睐^[6,7], 是目前最为流行的茶叶儿茶素分析方法。

然而, 在目前国内外相关文献中, 通过 HPLC 测定茶叶中儿茶素组分时, 采用的提取方式差异很大; 提取所使用的溶剂一般以蒸馏水为主, 但不同文献中所使用的提取温度和提取时间差异悬殊; 另外, 使用的其他提取溶剂还有甲醇、乙醇、乙腈、以及丙酮等。研究发现, 在茶叶样品前处理过程中, 提取温度、提取时间、提取料液比例以及提取溶剂的不同, 都能导致 HPLC 检测结果中茶叶儿茶素组成的差异, 尤其是表式儿茶素, 包括占儿茶素主导地位以及功效核心地位的表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的差异更为明显^[8~11]。可见, 在茶叶中儿茶素组分的 HPLC 测定中, 由于对茶样的提取方法缺乏统一的规范, 导致所发表文章数据之间缺乏可比性, 尤其是在探讨儿茶素组分和茶叶品质以及茶叶生理功效之间的关系时就更显不妥。

对于茶叶中儿茶素组成的分析, 水是最好的提取溶剂^[12,13]; 相应检测结果, 在药理学研究中可以真实地反映茶叶中儿茶素的药理功能及其价值, 还可以在茶叶品质评价中作为一个相对有效的参考数据。因此, 本文利用蒸馏水作为提取溶剂, 利用单因素试验

和正交实验研究分析最佳提取方法。目前, 茶叶中公认的最主要的抗氧化成分为 EGCG, 所以本文把 EGCG 的含量以及与茶叶品质相关的酯型儿茶素总量、儿茶素总量等作为重要的衡量参数。

1 材料与方法

1.1 材料

供试茶叶样品: 自制龙井 43# 蒸青茶样, 粉碎后过 40 目筛, 备用。

1.2 儿茶素 HPLC 分析方法

见参考文献^[14]。

1.3 试验方案

通过单因素试验分析提取时间、提取温度、料液比例和提取次数对茶叶中儿茶素组分的影响。并在此基础上进行正交实验。

1.4 数据处理

采用 Origin(Origin7.5) 软件, 实验重复 3 次, 以平均值表示; 采用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同提取时间对茶叶中儿茶素组分的影响

固定料液比例(g:mL, 下同)为 1:100 以及 80℃与 100℃ 2 个提取温度(这 2 个提取温度在文献中比较有代表性), 不同提取时间茶叶中儿茶素组分的 HPLC 测定结果分别如表 1 和表 2 所示。从表 1 和表 2 可以看出, (1)随着提取时间的延长, 茶叶中没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)和儿茶素没食子酸酯(CG)含量有明显增加的趋势; 80℃和 100℃ 2 个提取温度下, 当提取时间达到 60min 时, 茶叶中 GCG 含量的测定结果分别是相应提取时间为 5min 的 2.35 倍和 3.17 倍; 即使这 2 种不同提取温度间的差异也能达到 2.60 倍; (2)80℃提取 10min 后, 随着提

第一作者: 硕士生(林智研究员为通讯作者)。

* 浙江省科技计划项目(No. 2006C32034)

收稿日期: 2007-03-15, 改回日期: 2007-04-29

取时间的延长,茶叶中 EGCG 含量有降低的趋势;100℃提取温度下,这种降低的趋势更为明显,60min 的测定结果比 5min 的下降了 18.10%;(3)其他儿茶素组分变化趋势相对比较缓和;(4)茶叶中的酯型儿茶素总量和儿茶素总量,在 80℃提取 10~60min 时

间内,检测结果保持相对的稳定;而在 100℃提取 40min 后两者都有明显下降的趋势。鉴于短时间的提取效果不充分以及长时间提取导致 EGCG 异构化等问题,选用 10、20 和 30min 作为正交实验中提取时间中的 3 个水平。

表 1 提取时间对茶叶儿茶素组分的影响(1:100;80℃) mg/g(每克干茶中的质量,mg,下同)

时间 /min	含量/mg·g ⁻¹ (干茶)								
	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	CG	酯型儿茶素总量	儿茶素总量
5	8.291±0.217	7.542±0.160	75.74±0.467	13.18±0.460	2.832±0.225	26.11±0.613	0.818±0.030	104.8±0.101	134.5±1.215
10	9.178±0.148	9.218±0.026	81.14±0.148	16.48±0.198	3.820±0.102	27.13±0.120	1.380±0.032	113.4±0.386	148.3±0.627
20	9.259±0.065	9.383±0.066	80.49±0.207	17.01±0.134	4.401±0.106	26.78±0.314	1.546±0.029	113.2±0.388	148.8±0.653
30	9.237±0.148	9.529±0.135	78.69±0.312	16.96±0.257	4.924±0.113	26.84±0.549	1.692±0.031	112.1±0.573	147.8±1.046
40	9.208±0.114	9.682±0.051	79.34±0.717	16.61±0.336	5.388±0.045	26.85±0.162	1.819±0.009	113.4±0.927	148.9±0.881
60	9.013±0.022	10.15±0.045	77.90±0.403	16.87±0.205	6.563±0.044	26.90±0.434	2.157±0.007	113.5±0.818	149.5±1.048

表 2 提取时间对茶叶儿茶素组分的影响(1:100;100℃)

时间 /min	含量/mg·g ⁻¹ (干茶)								
	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	CG	酯型儿茶素总量	儿茶素总量
5	8.825±0.108	8.539±0.088	79.77±0.423	14.23±0.151	5.387±0.248	27.81±0.310	2.017±0.018	115.6±1.126	146.5±0.323
10	8.922±0.105	9.817±0.115	79.46±0.202	16.42±0.615	6.479±0.085	27.16±0.273	2.143±0.030	115.5±0.153	151.4±0.398
20	8.876±0.093	10.53±0.087	77.45±0.336	16.01±0.626	9.106±0.100	26.82±0.330	2.839±0.021	115.8±1.205	151.3±1.943
30	8.819±0.158	11.02±0.114	76.40±0.333	15.92±0.666	10.70±0.208	26.60±0.289	3.290±0.092	116.3±1.348	152.1±2.255
40	8.730±0.008	11.35±0.037	73.80±0.165	16.03±0.509	11.80±0.196	26.10±0.105	3.567±0.057	115.2±0.428	151.3±0.838
60	8.207±0.163	12.92±0.184	65.33±0.678	14.33±0.303	17.08±0.223	24.42±0.424	5.150±0.061	112.3±1.845	147.7±2.465

2.2 不同提取温度对茶叶中儿茶素组分的影响

固定料液比例 1:100 和提取时间 30 min,不同提取温度对茶叶中儿茶素组分的影响如表 3 所示。从表 3 可以看出,在 70℃时茶叶中 EGCG 的含量测定值达到最高,然后随着温度的升高有降低的趋势;茶叶中 GCG 和 CG 的含量 HPLC 测定结果在 60℃和 70℃时差异比较小,但 80、90 以及 100℃时 GCG 的测定结果分别为 70℃时的 1.41 倍、2.23 倍和 3.07 倍;另外,茶叶中其他儿茶素组分受温度变化的

影响相对较小,茶叶中的酯型儿茶素总量和儿茶素总量随着温度的升高有增加的趋势。可见,提取温度在 70℃可以达到比较好的提取效果。在正交实验中,温度适宜选择低温,因为 70~80℃是儿茶素与茶多酚适宜的提取温度范围^[15,16];当温度达到 80℃以上时,溶液中所有的儿茶素单体都能发生几何异构的转化^[8,10];沸水提取法不宜用作茶叶中儿茶素的全量分析^[11]。因此选用 60、70 和 80℃作为正交实验中提取温度的 3 个水平。

表 3 提取温度对茶叶儿茶素组分的影响(1:100;30min)

温度/℃	含量/mg·g ⁻¹ (干茶)								
	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	CG	酯型儿茶素总量	儿茶素总量
60	9.440±0.258	8.834±0.044	77.59±0.417	16.99±0.052	3.141±0.051	25.66±0.420	1.216±0.013	107.6±0.645	143.5±0.091
70	9.185±0.252	8.181±0.074	80.92±0.714	16.08±0.314	3.485±0.324	26.95±0.385	1.419±0.018	112.7±1.269	146.9±0.736
80	9.237±0.148	9.529±0.135	78.69±0.312	16.96±0.257	4.924±0.113	26.84±0.549	1.692±0.031	112.1±0.573	147.8±1.046
90	9.201±0.063	10.31±0.081	77.08±0.680	16.72±0.470	7.781±0.126	27.49±0.257	2.479±0.030	114.8±1.013	151.0±1.079
100	8.819±0.158	11.02±0.114	75.73±1.047	15.92±0.666	10.70±0.208	26.60±0.289	3.290±0.092	116.3±1.348	152.1±2.255

2.3 不同料液比例对茶叶中儿茶素组分的影响

固定提取时间 30 min 和提取温度 80℃,不同料液比例对茶叶中儿茶素组分的影响如表 4 所示。从表 4 可以看出,随着料液比例的减小,茶叶中的儿茶素各单体、酯型儿茶素总量以及儿茶素总量的测定结果都有增加的趋势。例如:料液比例从 1:50 变成 1

:150,茶叶中的酯型儿茶素总量和儿茶素总量分别增加了 10.97%和 11.11%;而 GCG 和 ECG 分别增加了 52.20%和 16.27%。可见,茶叶中儿茶素含量的测定结果随着料液比例的减小而有所增加。鉴于 1:50 提取效率比较低,以及 1:125 和 1:150 提取效果差别不大,选择 1:75、1:100 和 1:125 作为正

交实验中提取料液比例的 3 个水平。

表 4 提取料液比例对茶叶儿茶素组分的影响(80℃;30min)

料液比例	含量/mg·g ⁻¹ (干茶)								
	EGC	C	EGCG	EC	GCG	ECG	CG	酯型儿茶素总量	儿茶素总量
1:50	8.646±0.105	8.064±0.199	74.88±0.260	13.48±0.420	3.611±0.018	24.88±0.395	1.445±0.134	104.8±0.676	135.0±0.657
1:75	8.857±0.051	8.143±0.081	78.23±0.326	14.14±0.129	4.211±0.212	26.44±0.403	1.508±0.141	110.4±0.879	141.5±1.085
1:100	9.237±0.148	9.529±0.135	78.69±0.312	16.96±0.257	4.924±0.113	26.84±0.549	1.692±0.031	112.1±0.573	147.8±1.046
1:125	9.043±0.076	9.111±0.103	80.63±0.602	15.11±0.165	5.315±0.274	28.93±0.172	1.110±0.009	115.9±0.892	149.2±1.032
1:150	9.215±0.283	9.118±0.114	81.32±0.704	15.31±0.235	5.496±0.099	28.46±0.428	1.104±0.027	116.3±0.884	150.0±1.268

2.4 不同提取次数对茶叶中儿茶素组分的影响

固定料液比例 1:100、提取时间 20min 以及提取温度 80℃,连续提取 3 次,计算第 1 次提取量占 3 次全部提取量的百分数。结果发现,表没食子儿茶素(EGC)、儿茶素(C)、EGCG、表儿茶素(EC)、GCG、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、CG、酯型儿茶素总量以及儿茶素总量的第 1 次提取得率分别为 96.75%、92.11%、95.67%、95.72%、90.80%、89.54%、65.62%、95.15%、95.34%。可见,除 CG 以外的其他儿茶素各单体、酯型儿茶素总量以及儿茶素总量第

1 次提取的得率占 3 次可提取总量的 90%以上,1 次提取就可以达到比较好的提取效果。

2.5 正交实验结果与分析

依据单因素试验结果,进行三因素三水平正交实验;选取 EGCG、酯型儿茶素总量以及儿茶素总量等检测结果作为指标,结果见表 5 所示。从表 5 可以看出,当料液比例为 1:125,提取时间为 30min,提取温度为 60℃时,EGCG、酯型儿茶素总量以及儿茶素总量的检测结果都达到最高值。

表 5 正交实验结果

实验号	料液比例	提取温度/℃	提取时间/min	含量/mg·g ⁻¹ (干茶)		
				EGCG	酯型儿茶素总量	儿茶素总量
1	1:75	60	10	77.11±0.605	108.1±0.786	142.8±1.010
2	1:75	70	20	78.34±0.109	110.5±0.676	145.0±0.343
3	1:75	80	30	75.95±0.136	111.0±0.950	146.0±0.991
4	1:100	60	20	78.82±0.882	111.0±0.605	146.2±1.046
5	1:100	70	30	78.85±1.061	112.4±1.573	147.4±0.955
6	1:100	80	10	79.35±0.682	112.9±0.881	147.8±1.347
7	1:125	60	30	81.82±0.534	117.3±0.857	153.7±0.988
8	1:125	70	10	80.13±0.410	113.5±0.649	149.2±0.573
9	1:125	80	20	79.56±0.414	115.8±0.995	151.6±1.180

正交实验极差分析和方差分析的结果分别如表 6 和表 7 所示。从表 6 和表 7 可以看出,(1)对于茶叶中酯型儿茶素总量和儿茶素总量的检测结果,影响因素的依次顺序为:料液比例>提取时间>提取温度,其中料液比例和提取时间两因素的不同水平间差异达到极显著水平($P \leq 0.01$);(2)对于 EGCG 而言,影响因素的依次顺序为:料液比例>提取温度>提取时间,只有料液比例的不同水平间差异达到极显著水平($P \leq 0.01$)。

表 6 极差分析

	EGCG	酯型儿茶素总量	儿茶素总量
料液比例	3.354	5.654	6.895
提取温度	0.979	1.123	1.268
提取时间	0.027	2.065	2.442

表 7 方差分析

	EGCG	酯型儿茶素总量	儿茶素总量
料液比例	**	**	**
提取温度			
提取时间		**	**

注:**表示差异极显著($P \leq 0.01$)

对于 EGCG、酯型儿茶素总量以及儿茶素总量的检测结果,提取温度不同水平间的差异没有达到显著水平($P > 0.05$);而上述提取温度单因素试验分析结果表明,提取温度在 70℃能够达到相对理想的提取效果。通过对以上试验结果的综合分析,可得到茶叶中儿茶素组分的最佳提取参数:蒸馏水一次性提取,料液比例为 1:125;提取温度为 70℃;提取时间为 30min。

3 结 论

在利用 HPLC 分析茶叶中儿茶素组分的前处理过程中,当料液比例为 1:125、提取温度为 70℃、提取时间为 30 min 时,蒸馏水 1 次性提取可以达到比较理想的提取效果,适用于常规分析实验。该提取方法在一定程度上与日本茶叶研究报告以及 ISO 中的提取方法接近;日本茶叶研究报告 1990 年第 71 号中的茶叶分析法,所使用的儿茶素的浸提温度和浸提时间分别为 80℃ 和 30 min^[17];ISO/TC 34/SC 8N 14502 在测定茶叶多酚总量时所使用的浸提温度和浸提时间分别为 70℃ 和 30 min。

参 考 文 献

- 1 杨贤强,王岳飞,陈留记,等. 茶多酚化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2003. 201~344, 520
- 2 Jankun J, Selman S H, Swierez R. Why drinking green tea could prevent cancer[J]. Nature,1997,387:561
- 3 赵保路. 茶多酚的抗氧化作用[J]. 科学通报, 2002, 47(16):1 206~1 210
- 4 浙江农业大学主编. 茶树栽培学(第 2 版)[M]. 北京:中国农业出版社,1996. 92~101
- 5 何 强, 吕远平, 姚 开, 等. 儿茶素的分析比较研究[J]. 食品科学, 2003, 24(2):114~116
- 6 Dalluge J J, Nelson B C. Determination of tea catechins[J]. Journal of Chromatography A, 2000 (881):411~424
- 7 杨贤强,王岳飞,陈留记,等. 茶多酚化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2003. 521~524
- 8 Komatsu Y, Suematsu S, Hisanobu Y, et al. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, (57):907~910
- 9 严明潮,徐向群,单夏锋. 提取条件对茶多酚制品儿茶素组成的影响[J]. 茶叶科学,1996,16(2):155~156
- 10 Huafu Wang, Keith Helliwell. Epimerisation of catechins in green tea infusions[J]. Food Chemistry, 2000 (70) 337~344
- 11 熊凤麒,袁吕江,吕才有. 高效液相色谱法测定茶叶中儿茶素组分的含量[J]. 色谱,1993,11(4):251~254
- 12 Khokhar S, Magnusdottir S G M. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 565~570
- 13 Wang H, Helliwell K, You X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC[J]. Food Chem, 2000, 68:115~121
- 14 林 智,尹军峰,吴剑民,等. 出口炒青绿茶品质提升加工技术研究[J]. 食品科学,2006,27(3):161~165
- 15 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
- 16 范新年,兰先秋,宋 航. 儿茶素的两种浸提工艺的优化及比较[J]. 现代食品科技,2005, 21(2):121~123
- 17 Kenjiro Ikegaya, Hirotsuge Takayanagi, Toyomasa Anan. 茶叶分析法[S]. 茶叶研究报告第 71 号,1990. 46~47

Study on Extracting Method of Catechins from Green Tea by HPLC

Lv Haipeng¹, Lin Zhi^{1,2}, Gu Jiping¹, Guo Li¹, Tan Junfeng¹

1(Key Laboratory of Tea Chemical Engineering, Ministry of Agriculture; Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China)

2(State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

ABSTRACT The methods of extracting catechins from tea suitable for HPLC analysis were investigated with the orthogonal design tests as well as the single factor experiment. Results showed that the best extracted condition was as follows: 1g of tea power sample, sifted through a 0.40mm sieve, infused by 125ml deionized water, and extracted once in 70℃ water bath for 30min. This method was suitable for the routine determination of catechins composition and content in tea.

Key words tea, catechins composition, HPLC, extracting method