

# 多种茶叶废料中多酚类成分和咖啡碱的含量测定

张 梁, 周 杰, 秦金花

(安徽农业大学 茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 安徽 合肥 230036)

**摘要:**目的: 建立高效液相色谱(HPLC)法同时测定各种茶叶废料中8种多酚类成分以及咖啡碱的含量。方法: 色谱柱: Agilent SB-Aq C<sub>18</sub>(4.6mm×250mm, 5μm); 柱温30℃, 流动相: 0.6%甲酸-水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~60min: 5% B~30% B; 流速0.8mL/min; 检测波长278nm。结果: 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、表儿茶素(EC)、咖啡碱(CA)、没食子酸(GA)、原儿茶酸(PA)、没食子儿茶素(GC)、表没食子儿茶素(EGC)在10ng~20μg之间呈良好的线性关系( $r>0.99$ ), 且重复性和稳定性RSD小于15%。结论: 此方法简便、准确, 重现性良好, 为评价各类茶叶的质量提供可靠的分析方法。

**关键词:** 高效液相色谱法; 茶叶; 多酚

## Determination of Major Polyphenols and Caffeine in Different Tea Wastes

ZHANG Liang, ZHOU Jie, QIN Jin-hua

(Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** The contents of eight tea polyphenols and caffeine in wastes from various types of tea were determined by high performance liquid chromatography using 0.6% formic acid-water (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min with gradient elution from 0 to 60 min (5%–30% B). The column was Agilent SB-Aq C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The HPLC column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 278 nm. The results showed a good linear relationship ( $r > 0.99$ ) for epigallocatechin gallate, galocatechin gallate, epicatechin gallate, epicatechin, caffeine, gallic acid, protocatechuic acid, galocatechin and epigallocatechin in the concentration range of 10 ng to 20 μg. The RSDs of repeatability and stability were both less than 15%. This method was simple, accurate and repeatable and allowed reliable analysis of tea wastes.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC); tea; polyphenols

中图分类号: R282.71

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)20-0113-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201320022

茶叶为山茶科植物茶(*Camellia sinensis*)或者普洱茶(*Camellia sinensis* var. *assamica*)的芽叶经过不同的加工方式制造而成。茶叶是全世界最主要的日常饮品之一,具有多种保健功效<sup>[1-4]</sup>。按照茶叶的发酵工艺分类,茶叶可以分为不发酵茶、半发酵茶、发酵茶和后发酵茶;而按照茶叶的加工工艺分类,则可以分为绿茶、白茶、黄茶、乌龙茶、红茶和黑茶<sup>[5]</sup>。茶鲜叶中主要的化学成分为黄烷醇单体及其聚合物、黄酮醇及黄酮苷类、嘌呤类生物碱、茶氨酸以及一些少量的皂苷类成分<sup>[6-7]</sup>。由于受到茶叶加工工艺的影响,茶叶鲜叶中的各种成分在加工过程中发生了变化,例如儿茶素类成分在绿茶中的含量就显著高于红茶和黑茶,而红茶和黑茶中没食子酸成分的含量也显著高于绿茶和乌龙茶<sup>[8]</sup>。

文献对绿茶中多酚类成分的含量研究很多, 且已有国家测定标准(GB/T 8313—2008《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》)。许多文献<sup>[9-12]</sup>报道了各种成品茶叶中的多酚及嘌呤碱含量, 但是其分析方法常常较为复杂。近年来, 随着茶叶深加工行业的快速发展, 茶叶加工过程中的废料得到了最大程度的利用。茶叶废渣可以作为天然有机多酚类抗氧化成分的原料, 降低茶多酚类功能成分的生产成本<sup>[13]</sup>。此外, 茶叶废料也被用于污水处理、畜牧养殖、有机肥料和化工等行业<sup>[14-21]</sup>。但是, 由于目前我国茶叶种类很多, 而每一种茶叶废料的成分含量缺少详实的数据报道。本研究采用较为简便的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析方法, 对10种主要的成品茶加工过程中的废料进行分析和

收稿日期: 2012-11-15

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目(31201335)；安徽省自然科学基金青年基金项目(1308085QC51)

作者简介: 张梁(1985—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为茶叶化学成分及功效。E-mail: zhli2091@sina.com

测定, 积累一些关键质量分析数据, 以期这些茶叶废料今后在食品添加剂、抗氧化剂和天然色素领域的应用提供研究依据<sup>[22]</sup>, 为食品加工生产中进一步开发利用其综合价值提供新的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

10个供试样品, 于2012年购买, 1~10号样品分别为黄山毛峰(安徽)、龙井(浙江)、祁门红茶(安徽)、炒青(陕西)、六安瓜片(安徽)、铁观音(福建)、霍山黄芽(安徽)、炒青(四川)、泾渭茯茶(陕西)和普洱茶(云南)的加工废料或者低等茶叶末。

9个标准品(峰面积归一化法下纯度均大于98%): 表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、没食子儿茶素没食子酸酯(gallocatechin gallate, GCG)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)、表儿茶素(epicatechin, EC)、咖啡碱(caffeine, CA)、没食子酸(gallic acid, GA)、原儿茶酸(protocatechuic acid, PA)、没食子儿茶素(gallocatechin, GC)和表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC) 上海同田生物技术有限公司。

乙腈和甲醇均为色谱纯 美国Tedia公司; 水为双蒸水; 其余试剂为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(配有1525 Binary HPLC泵、2707自动进样器、2489 UV/Visible检测器) 美国Waters公司; 色谱柱SB-Aq(4.6mm×250mm, 5μm) 美国Agilent公司; KQ-500DE型数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; AB104-N电子分析天平 瑞士Mettler Toledo公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱分析条件A

国家标准儿茶素测试方法: A相: 90mL乙腈, 20mL乙酸, 纯水定容于1000mL容量瓶; B相: 800mL乙腈, 20mL乙酸, 纯水定容于1000mL容量瓶。梯度洗脱条件如表1所示, 流速1mL/min, 检测波长278nm, 柱温35℃, 进样量10μL。

表1 国标法HPLC梯度洗脱条件

Table 1 Chromatographic conditions for HPLC analysis by the Chinese national standard method

编号	时间/min	流动相	
		A/%	B/%
1	0	100	0
2	10	100	0
3	25	68	32
4	35	68	32
5	45	100	0
6	50	100	0

#### 1.3.2 色谱分析条件B

改进方法: A相: 0.6%甲酸水(V/V); B相: 乙腈;

0~60min, 5%~30% B; 流速0.8mL/min, 检测波长278nm, 柱温30℃, 进样量5μL。

#### 1.3.3 标准品的配制

精密称取标准品GA、PA 10.0mg, CA、EC 5.0mg, ECG、GCG、EGCG 1.0mg, GC、EGC 2.0mg, 于9个10mL容量瓶中, 色谱级甲醇溶液定容, 溶解, 摇匀。即得质量浓度分别为1mg/mL GA、1mg/mL PA、0.5mg/mL CA、0.5mg/mL EC、0.1mg/mL ECG、0.1mg/mL GCG、0.1mg/mL EGCG、0.2mg/mL GC、0.2mg/mL EGC 标准原液。4℃冰箱保存, 待用。

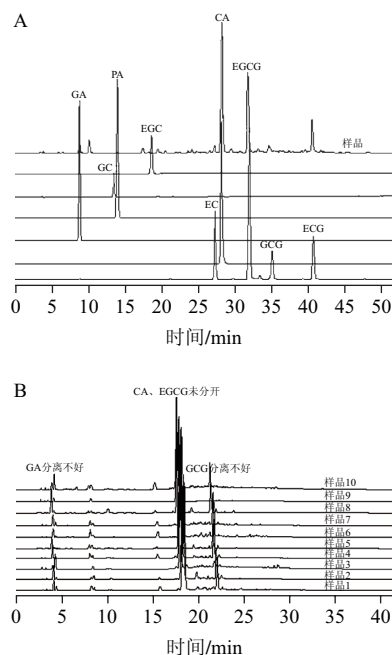
#### 1.3.4 供试液的配制

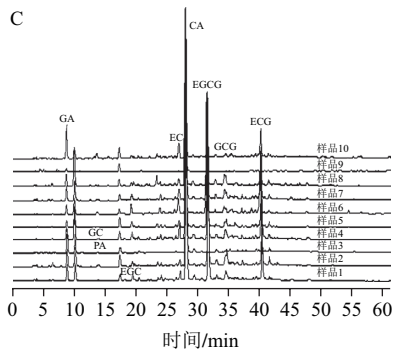
母液: 精确称取0.2g各供试茶叶废料或茶末, 磨碎, 将均匀磨碎的试样置于10mL离心管中, 加入在70℃中预热过的70%甲醇溶液(V/V)5mL, 用玻璃棒充分搅拌均匀润湿, 立即移入70℃水浴中, 浸提10min(隔5min搅拌1次), 浸提后冷却至室温, 转入离心机在3500r/min离心10min, 将上清液转移至10mL容量瓶。残渣再用5mL的70%甲醇溶液提取1次, 重复以上操作。合并提取液定容至10mL, 摇匀, 过0.45μm膜, 待用(该提取液在4℃条件下可至多保存24h)。

测试液: 用移液管移取母液2mL至10mL容量瓶中, 用稳定溶液(50mL乙腈加入500mL容量瓶中, 水定容)定容至刻度, 摇匀, 过0.45μm膜, 待测。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件选择性结果





A.10个标准品色谱图; B.国家标准法样品色谱图; C.改进方法样品色谱图。

图1 两种HPLC方法分析茶叶中9种主要成分的图谱比较

Fig.1 Comparison of chromatograms for 9 polyphenols in tea wastes by the original and modified HPLC methods

国家标准儿茶素测试方法结果如图1B所示,主要的色谱峰分离度小于1.5,未能达到8种主要多酚类和咖啡碱成分的分离。采用改进方法的色谱条件,主要标准品、样品溶液色谱图如图1A、C所示。由图1可知,各对照品峰保留时间分别为:EGCG 31.91min、GCG 34.97min、ECG 40.54min、EC 27.18min、CA 28.29min、GA 8.91min、PA 13.75min、GC 13.70min、EGC 18.89min。确定供试样品中该9种成分的位置。由图1还可以看出,在改进后的色谱条件下,样品溶液中待测成分能和其他杂峰分开,各成分之间分离度良好。

## 2.2 标准品的标准曲线

以进样量中各成分质量对峰面积作图,得到标准曲线。EGCG、GCG、ECG、EC、CA、GA、PA、GC、EGC在10ng~20μg之间呈良好的线性关系。各物质单体回归方程见表2。

表2 标准品回归方程

单体	回归方程	r
EGCG	$Y=0.0001X+6.5716$	0.9993
GCG	$Y=0.0005X+0.8595$	0.9992
ECG	$Y=0.0003X+0.0836$	0.9992
EC	$Y=0.0005X-1.0386$	0.9991
CA	$Y=0.0003X+107.48$	1.0000
GA	$Y=0.0003X+127.59$	0.9999
PA	$Y=0.0005X+296.30$	1.0000
GC	$Y=0.0040X+3.8178$	0.9989
EGC	$Y=0.0066X+2.8090$	0.9979

## 2.3 重复性实验

按改进方法色谱条件,取供试液,平行操作5份,进样5μL进行测定,EGCG、GCG、ECG、EC、CA、GA、PA、GC、EGC的相对标准偏差(RSD)分别为14.9%、13.0%、5.3%、7.5%、4.6%、5.3%、5.6%、6.1%、5.8%。各成分的RSD值均小于15%,说明该方法具有良好的操作重复性。

## 2.4 精密度实验

按改进方法色谱条件,分别进样5μL,重复进样6次。EGCG、GCG、ECG、EC、CA、GA、PA、GC、EGC的相对标准偏差(RSD)分别为4.8%、1.3%、1.4%、3.9%、0.31%、6.0%、2.1%、0.79%、9.0%。结果显示改进色谱条件下各成分的RSD值均小于14%,说明该方法条件是可行的。

## 2.5 稳定性实验

按改进方法色谱条件,间隔2、4、6、8、24h进样,每次进样5μL。结果EGCG、GCG、ECG、EC、CA、GA、PA、GC、EGC的相对标准偏差(RSD)分别为11.8%、10.5%、2.7%、5.1%、2.4%、7.9%、5.1%、2.3%、10.8%。数据表明本实验中所采用的提取方法是可靠的,各成分可保持良好的稳定性。

## 2.6 茶叶样品中9种单体成分的含量

根据表2回归方程,计算10个茶叶样品中EGCG、GCG、ECG、EC、CA、GA、PA、GC、EGC的含量,结果如表3所示。

表3 10个茶样中9种单体成分的含量( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

Table 3 Contents of nine individual polyphenols in tea samples ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

样品	CA	GA	PA	EGCG	ECG	GCG	EC	GC	EGC
黄山毛峰	25.80±1.21 <sup>a</sup>	7.69±0.07	15.09±0.02	4.74±0.24	5.63±0.36	1.43±0.32	1.98±0.12	2.40±0.14	0.67±0.13
龙井	34.84±0.63	8.33±0.06	15.35±0.01	10.06±0.18	10.57±0.22	5.49±0.18	2.00±0.06	4.48±0.10	0.23±0.01
祁门红茶	29.91±0.33	8.83±0.05	15.00±0.01	0.34±0.00	0.77±0.01	0.78±0.00	0.07±0.00	1.67±0.09	0.24±0.01
陕西炒青	28.05±0.37	7.52±0.04	15.04±0.01	7.37±0.09	9.70±0.20	1.99±0.06	3.70±0.08	2.01±0.08	0.62±0.05
六安瓜片	28.05±0.95	7.46±0.03	15.21±0.01	9.72±0.26	8.86±0.41	3.12±0.17	2.51±0.12	3.31±0.07	ND
安溪铁观音	38.95±0.49	7.27±0.01	15.10±0.01	5.67±0.13	7.05±0.15	1.36±0.38	3.29±0.07	2.45±0.08	ND
霍山黄芽	24.70±0.18	7.52±0.01	14.92±0.05	4.58±0.10	6.02±0.17	1.59±0.07	2.19±0.05	1.50±0.04	ND
四川炒青	35.11±0.43	7.90±0.04	15.11±0.00	6.27±0.08	8.22±0.12	3.32±0.03	2.10±0.04	1.16±0.03	1.45±0.14
泾渭茯茶	31.89±0.61	6.72±0.02	14.97±0.02	0.33±0.00	0.08±0.00	0.18±0.01	0.07±0.01	1.39±0.13	ND
普洱茶	22.21±0.30	8.64±0.04	15.68±0.02	1.35±0.01	3.58±0.02	1.41±0.10	2.79±0.03	7.15±0.13	0.30±0.28

注:ND:未测出。

由表3可以看出,在10个供试样品中,CA的含量最高,均在22mg/g以上;PA含量比较稳定,均在15mg/g左右,其余成分各供试样品之间差别较大;EGC含量最低,除蜀山炒青外,含量均在1mg/g以下,在六安瓜片、安溪铁观音、霍山黄芽和泾渭茯茶中均未检出。

## 3 结论

本实验采用较为简便的梯度洗脱条件,就能够实现不同茶叶中9种主要化学成分的分析。通过与国标法HPLC的比较,本实验采用的梯度洗脱条件能够很好地实现茶叶中咖啡碱与EGCG的分离,且此HPLC方法中流动相的配制也较为简易,便于操作。

采用本实验建立的方法对不同品种的茶叶加工过程废料进行了初步评价,结果显示,不同发酵茶叶中多

酚类成分的含量有较大差异,其主要原因可能是由于茶叶品种不同,加工和发酵方式不同等多种因素造成。而且,在所有绿茶中,龙井茶加工废料中总多酚类成分的含量最高,而红茶和后发酵茶叶(普洱茶和泾渭茯茶)中多酚类成分的含量最低。泾渭茯茶和普洱茶均属于黑茶,但是经过分析发现普洱茶中的多酚类成分含量稍高于泾渭茯茶,其主要原因可能是由普洱茶加工过程中所使用的大叶种成熟鲜叶原料与泾渭茯茶所使用的鲜叶原料不同所致。

#### 参考文献:

- [1] 邹盛勤. 茶叶的药用成分、药理作用及应用研究进展[J]. 中国茶叶加工, 2004(3): 35-37.
- [2] 曾磊, 张玉军, 邹正. 茶多酚的功能特性及应用[J]. 郑州工程学院学报, 2002, 23(2): 90-94.
- [3] CHOI J H, YOON S K, LEE K H, et al. Antitumor activity of cell suspension culture of green tea seed[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2006, 11(5): 396-401.
- [4] 胡凯, 黄惠华. 不同茶叶对胆酸盐的结合及其降血脂机理的研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 42-45.
- [5] 魏先林, 徐建新. 浅谈茶叶的分类与品质特点[J]. 南昌高专学报, 2011(5): 186-188.
- [6] ZUO Yuegang, CHEN Hao, DENG Yiwei. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector[J]. Talanta, 2002, 57(2): 307-316.
- [7] WANG Dongmei, LU Jiali, MIAO Aiqing, et al. HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis in leaves of 22 tea of polyphenols and purine alkaloids cultivars in China[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2008, 21(5): 361-369.
- [8] YANG Xiaorong, YE Chuangxing, XU Jiekun, et al. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC[J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 1132-1136.
- [9] 王丽鹭, 成浩, 周健, 等. 普洱茶的HPLC化学指纹图谱分类研究[J]. 浙江林业科技, 2009, 29(1): 25-30.
- [10] 朱旗, CLIFFORD M N, 毛清黎, 等. LC-MS分析普洱茶和茯砖茶与红茶成分的比较研究[J]. 茶叶科学, 2006, 26(3): 191-194.
- [11] 侯冬岩, 回瑞华, 关崇新, 等. 绿茶及其茶饮料中茶多酚的光谱分析[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 109-111.
- [12] 侯冬岩, 回瑞华, 李铁纯, 等. 高效液相色谱法对绿茶中茶多酚含量的测定[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 305-307.
- [13] 李明元, 李鑫, 白德飞, 等. 茶叶生产废料中茶多酚提取工艺研究[J]. 西华大学学报: 自然科学版, 2010, 29(2): 202-204.
- [14] 李建章, 周文瑞, 徐力峥, 等. 茶叶废料在脲醛树脂中的应用研究[J]. 生物质化学工程, 2007, 41(2): 44-46.
- [15] 崔晓宁, 杨晓萍. 茶叶功能成分在环境修复中的应用进展[J]. 茶叶科学, 2010, 30(增刊1): 506-510.
- [16] 彭英. 茶籽饼粕在水产养殖中的应用研究进展[J]. 常州工学院学报, 2009, 22(6): 75-78.
- [17] 李荣林, 周维仁, 申爱华. 茶叶及其提取物在畜牧和饲料中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2002(7): 30-31.
- [18] 韩杰, 孟军, 袁纓. 新型饲料添加剂茶多酚在畜禽生产中的应用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(9): 1876-1877.
- [19] 马雪珑, 房江育. 茶粕有机肥的开发与利用[J]. 资源开发与市场, 2005, 21(6): 536-537.
- [20] 仇方方, 杨晓萍. 茶渣肥料的应用[J]. 福建茶叶, 2011(6): 21-23.
- [21] 吴树良. 在养殖业中巧用茶饲料效果好[J]. 茶叶科学技术, 2001(1): 34.
- [22] 葛尧, 陈文伟, 贾振宝. 新型功能性天然色素: 茶色素[J]. 中国食品添加剂, 2008(1): 51-53.