

张凯新, 孔祥慧, 徐卫奇, 等. 高效液相色谱法同时测定茶叶中表儿茶素及其氧化二聚体、没食子酸和咖啡碱的含量 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(19): 366–373. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120093

ZHANG Kaixin, KONG Xianghui, XU Weiqi, et al. Simultaneous Determination of Epi-Catechins and Their Oxidized Dimers, Gallic Acid and Caffeine in Tea by HPLC[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(19): 366–373. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120093

· 分析检测 ·

高效液相色谱法同时测定茶叶中表儿茶素及其氧化二聚体、没食子酸和咖啡碱的含量

张凯新^{1, +}, 孔祥慧^{1, +}, 徐卫奇¹, 陈贵杰², 曾晓雄^{1, *}

(1. 南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095;

2. 安徽农业大学茶树生物学及资源利用国家重点实验室, 安徽合肥 230036)

摘要:目的: 本研究旨在建立同时分析茶叶中 4 种表儿茶素 (表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯) 及其氧化二聚体 (4 种茶黄素 (Theaflavins, TFs): 茶黄素、茶黄素双没食子酸酯、茶黄素-3-没食子酸酯和茶黄素-3'-没食子酸酯)、3 种聚酯型儿茶素 (Theasinensins, TSs) (TSA、TSB 和 TSC)、没食子酸和咖啡碱的高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 方法。方法: 首先利用化学合成的方法制备 TSA、TSB 和 TSC; 然后参考文献对 HPLC 流动相做适当调整和对梯度洗脱条件进行优化, 色谱柱为 Cosmosil 5C₁₈-AR-II 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为纯水 (A)、50 mmol/L 磷酸 (B) 和乙腈 (C), 检测波长为 280 nm, 流速为 0.8 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL; 最后根据建立的 HPLC 方法对绿茶、乌龙茶、红茶和黑茶中的上述 13 种物质含量进行测定。结果: 在最优梯度洗脱条件下 4 种表儿茶素、4 种 TFs、3 种 TSs、没食子酸及咖啡碱可在 66 min 内得到较好地分离, 同时各物质在 0.01~1.00 mg/mL 的质量浓度范围内与其峰面积的线性关系良好 (R^2 均在 0.9904~0.9966 范围内), 重复性相对标准偏差 (The relative standard of deviation, RSD) 为 1.034%~4.008%, 精密度 RSD 为 1.882%~4.835%, 稳定性 RSD 为 0.349%~3.994%, 三种浓度的加标回收率在 90.106%~107.331% 之间且 RSD<3.268%。此外, 上述 13 种物质含量在不同茶叶样本间存在显著差异, 且所有检测值均在标准曲线有效测定范围内。结论: 本方法操作简单高效、结果准确可靠, 可用于茶叶中表儿茶素、茶黄素、聚酯型儿茶素、没食子酸和咖啡碱的同时分析。

关键词: 茶叶, 高效液相色谱, 表儿茶素, 茶黄素, 聚酯型儿茶素, 咖啡碱

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)19-0366-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022120093

本文网刊:



Simultaneous Determination of Epi-Catechins and Their Oxidized Dimers, Gallic Acid and Caffeine in Tea by HPLC

ZHANG Kaixin¹, KONG Xianghui^{1, +}, XU Weiqi¹, CHEN Guijie², ZENG Xiaoxiong^{1, *}

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Objective: The present study was aimed to develop the simultaneous determination of four kinds of epi-catechins ((-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin gallate) and their oxidized dimers (four kinds of theaflavin (TF): theaflavin, theaflavin-3-gallate, theaflavin-3'-gallate and theaflavin-3,3'-digallate, three kinds of theasinensin (TS): TSA, TSB and TSC), gallic acid and caffeine by high performance liquid chromatography (HPLC). Methods: Firstly, TSA, TSB and TSC were chemically synthesized. Then, the gradient elution conditions for HPLC analysis

收稿日期: 2022-12-12 +并列第一作者

基金项目: 江苏省重点研发计划 (现代农业) 重点及面上项目 (BE2020341); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)。

作者简介: 张凯新 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 2020108062@stu.njau.edu.cn。

孔祥慧 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 2020108060@njau.edu.cn。

* 通信作者: 曾晓雄 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zengxx@njau.edu.cn。

were obtained according to the reported methods with some modifications. Chromatographic separation was achieved on a Cosmosil 5C₁₈-AR-II column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Ultrapure water (eluent A), 50 mmol/L H₃PO₄ (eluent B) and acetonitrile (eluent C) were used as the mobile phases. The DAD acquisition wavelength was set at 280 nm. The flow rate was 0.8 mL/min and oven temperature was set at 30 °C. The volume of injection was 20 μL. Finally, the contents of these compounds mentioned above in green, oolong, black and dark teas were determined by the developed HPLC method. Results: Under the optimized conditions, 4 kinds of epicatechins, 4 kinds of theaflavins, 3 kinds of theasinensins, gallic acid and caffeine could be separated within 66 min. At the same time, in the range of 0.01~1.00 mg/mL, the substances and their peak areas showed a good linear relationship (R^2 , 0.9904~0.9966). The relative standard of deviation (RSD) for repeatability was 1.034%~4.008%. The RSD of the precision and the stability were 1.882%~4.835% and 0.349%~3.994%, respectively. The recovery test of three concentrations was in the range of 90.106%~107.331% and the RSD was less than 3.268%. In addition, it was found that the contents of these 13 compounds were significantly different among different tea samples, and all the detected values were within the effective determination range of the standard curve. Conclusion: The developed method is simple, accurate, and reproducible, it can be used for the simultaneous determination of epi-catechins, theaflavins, theasinensins, gallic acid, and caffeine in tea samples.

Key words: tea; HPLC; epicatechins; theaflavins; theasinensins; caffeine

茶作为当今世界受欢迎的饮品,按照加工方式的不同可分为绿茶、乌龙茶、红茶、黑茶等,并且这些不同种类的茶叶中各生物活性成分含量亦不尽相同,从而影响并决定不同种类茶叶的品质^[1-4]。以儿茶素类、生物碱类、酚酸类等为代表的茶叶生物活性成分构筑了茶叶保健功能的物质基础,其中表儿茶素((-)-epicatechin, EC)、表儿茶素没食子酸酯((-)-epicatechin gallate, ECG)、表没食子儿茶素((-)-epigallocatechin, EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin gallate, EGCG)、茶黄素(Theaflavins, TFs)、聚酯型儿茶素(Theasinensins, TSs)、没食子酸(Gallic acid, GA)和咖啡碱(Caffeine)是茶叶品质的重要因子^[5]。因此,构建一种可同时测定茶叶中 4 种表儿茶素、茶黄素、聚酯型儿茶素、没食子酸和咖啡碱的高效液相(HPLC)方法对于茶叶品质的分析与质量控制具有重要意义。

表儿茶素(EGCG、ECG、EGC、EC)是茶叶中最为主要的儿茶素单体,在茶叶中含量最高,也是茶叶中重要的氧化产物-TFs 和 TSs 的主要儿茶素来源^[5-7]。在茶叶发酵过程中,四种表儿茶素单体的含量及相对组成比例对茶叶二聚体的形成有着重要影响。TSs 是可与 TFs 相媲美的一种仅通过联苯键形成^[8]的儿茶素氧化二聚体,根据儿茶素底物的不同,TSs 又可进一步分为 TSA、TSB 和 TSC 等^[9],它们仅存在于乌龙茶和红茶等发酵茶中,并且已被证明具有潜在的降血糖、抗肥胖等调节机体代谢紊乱的生物活性^[10],对茶的品质有着直接的影响。目前,国内外对茶叶中物质成分含量的测定方法主要有近红外光谱法^[11]、薄层色谱法^[12]、高效液相色谱(HPLC)法^[13-15]和液相色谱-质谱联用法^[16-19]等,其中 HPLC 方法对茶叶样品条件无严格要求,且受限制因素少,并能同时分离、识别和分析复杂的多元混合物,因此 HPLC 分析方法逐渐成为主流的检测方法。由于 TSs 制备的复杂性,缺乏 TSs 标样,目前同时检测茶叶中表儿茶素、TFs、TSs、GA 和咖啡碱的 HPLC 方

法报道较少。TSs 的制备方法主要有直接提取法^[20]、酶法合成法^[8]和化学合成法^[21]等。相较于直接提取法和酶法合成法,化学合成法对于产物的分离纯化难度较低,反应易于控制。因此,本研究首先利用化学合成的方法制备 TSA、TSB 和 TSC,然后参照文献^[22]的色谱条件对 HPLC 流动相做适当调整和对梯度洗脱条件进行优化,从而构建一种同时检测 4 种表儿茶素及其氧化二聚体(4 种 TFs、3 种 TSs)、没食子酸和咖啡碱的 HPLC 方法,最后利用该方法测定绿茶、乌龙茶、红茶和黑茶中各成分的含量,为茶叶品质分析与控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

GA、咖啡碱、EGCG、EGC、ECG、EC、TF、TFDG、TF3G 和 TF3'G(HPLC ≥ 98%) 成都普瑞法有限公司; TSA、TSB、TSC 实验室自制; 抗坏血酸 南京辉亚生物科技有限公司; 大孔树脂 HP-20 北京市索莱宝生物科技有限公司; 甲醇、乙腈 色谱纯,江苏汉邦公司; 磷酸、氯化铜等 分析纯,上海阿拉丁试剂有限公司; 绿茶(黄金芽)、红茶(正山小种红茶)、乌龙茶(凤凰单丛茶)、黑茶(益茯砖茶) 南京市玄武区苏果超市孝陵卫店。茶样信息见表 1。

表 1 茶样信息
Table 1 Information of tea samples

茶样	产地	生产日期
黄金芽	浙江省丽水市松阳县	2022年4月16日
凤凰单丛茶	广东省潮州市凤凰镇	2019年12月10日
正山小种红茶	福建省武夷山市星村镇	2021年11月23日
湘益茯砖茶	湖南省益阳市赫山区	2021年12月10日

Shimadzu AY120 万分之一天平 日本岛津公司; HH-6 数显恒温水浴锅 常州普天仪器仪器制造有限公司; CJJ78-1 磁力加热搅拌器 金坛市大地自动化仪器厂; 超纯水制备仪 南京易普易达科技发展

有限公司; HL-2B 型电脑数显恒流泵、DBS-100A 型电脑全自动部分收集器、HD-A 核酸蛋白检测仪 上海青浦沪西仪器厂; Telstar-LyoQuest 冷冻干燥机 西班牙 Telstar 公司; EYELA(N-1100) 旋转蒸发仪 日本东京理化器械株式会社; Agilent 1100 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司; AKTA 制备型液相色谱仪 美国 GE 公司; Cosmosil 5C₁₈-AR- II 色谱柱 (250 cm×4.6 mm, 5 μm) 日本 Cosmosil 公司; YMC-Pack ODS-A 色谱柱 日本 YMC 公司; Multifuge X1R 高速冷冻台式离心机 美国 Thermo Scientific 公司; MALDI-TOF-MS 德国 BRUKER 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 TSA、TSB 和 TSC 的制备与纯度测定

TSA、TSB 和 TSC 的制备参照文献 [21] 报道的方法。首先准确称取 1.00 g EGCG, 将其溶解到 400 mL 30% 甲醇水溶液(预先加有 0.34 g CuCl₂)中, 于室温下搅拌反应 24 h。随后加入 10.00 g 抗坏血酸, 于 85 ℃ 条件下加热 15 min, 得到 TSA 反应混合液。同样地, 分别以 EGCG 和 EGC 为合成底物经过上述同样条件反应得到 TSB 反应混合液, 以 EGC 为合成底物经过上述同样条件反应得到 TSC 反应混合液。将上述 TSA、TSB 和 TSC 反应混合液分别上样至已活化的 HP-20 大孔树脂层析柱中, 利用甲醇溶液进行梯度洗脱, 利用核酸蛋白检测仪于 280 nm 处进行在线监测洗脱, 收集并合并同一组分洗脱液, 得 TSA、TSB 和 TSC 粗品液。随后, 利用 AKTA 进一步纯化 TSA、TSB 和 TSC, 色谱柱: YMC-Pack ODS-A (250 mm×20 mm), 流动相条件为纯水: 乙酸: 乙腈=125:10:11(v:v:v), 检测波长: 280 nm, 收集并合并同一组分洗脱液, 旋蒸浓缩, 冷冻干燥后得 TSA、TSB 和 TSC 纯品。

利用 HPLC 方法 [21] 并做适当修改对制得的 TSA、TSB 和 TSC 进行纯度检测, 色谱柱: Cosmosil 5C₁₈-AR- II (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL; 检测波长: 280 nm; 流动相: A 相为纯水, B 相为 50 mmol/L 磷酸; C 相为乙腈; 流速: 0.8 mL/min; 梯度洗脱条件: 0~10 min, B 82%~76.54%, C 13%~16%; 10~12 min, B 76.54%~82%, C 16%~13%; 平衡 5 min。利用 MALDI-TOF-MS 对 TSA、TSB 和 TSC 纯品进行分子量鉴定。样品检测条件为: 以 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)为基质, 1 μL 的待测样品与 1 μL 的基质混匀后, 在金属靶板上点样 1 μL 样品和基质的混合物, 抽真空加速干燥, 阳离子模式下对待测样进行检测, MALDI-TOF-MS 的实验结果使用 BRUKER Flexanalysis 3.3 件进行分析。

1.2.2 高效液相色谱条件建立

1.2.2.1 标准品溶液及各茶叶样品溶液的制备

准确称取 EC、ECG、EGC、EGCG、TF、TFDG、TF3G、TF3'G、TSA、TSB、TSC、GA、咖啡碱标准品

10.0000 mg, 10% 乙腈溶液充分溶解并定容至 5.0 mL 作为浓度为 2.0 mg/mL 的混合标准品母液, 采用梯度稀释法用 10% 乙腈溶液将混合标准品母液配制成 1.0、0.75、0.5、0.25、0.1、0.05、0.025 和 0.01 mg/mL 的一系列质量浓度梯度的混合标准品工作液, 过 0.45 μm 有机滤膜, 4 ℃ 条件下贮存备用。

基于 GB/T 8313-2018 制备各茶叶样品溶液。首先称取 0.2000 g 均匀磨碎的茶样于 10 mL 离心管中, 加入 5.0 mL 70 ℃ 预热的 70% 甲醇, 摇匀, 于 70 ℃ 水浴中浸提 10 min, 每 5 min 振荡 1 次。在 3500 r/min 转速下离心 10 min, 取上清液于 10 mL 离心管中。残渣再重复以上操作。最后合并 2 次提取液, 定容至 10.0 mL, 摇匀, 过 0.45 μm 有机滤膜, 4 ℃ 条件下贮存备用。

1.2.2.2 梯度洗脱条件的优化

参照文献 [22] 同时测定 TSs 和 TFs 的 HPLC 方法, 对流动相稍作修改并进行梯度洗脱条件的优化。设定色谱条件为: 色谱柱: Cosmosil 5C₁₈-AR- II (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL; 检测波长: 280 nm; 流动相: A 相为纯水, B 相为 50 mmol/L 磷酸; C 相为乙腈; 流速: 0.8 mL/min; 梯度洗脱条件优化如下(表 2):

表 2 梯度洗脱条件
Table 2 Gradient elution

时间(min)	A相(%)	B相(%)	C相(%)
条件a	0	5	82
	10	4	76
	22	6	70
	30	15.5	58
	40	5	25
	45	5	82
	50	5	82
条件b	0	5	82
	22	9	70
	30	18.08	60
	31	5	20
	41	5	20
	42	5	82
	52	5	82
条件c	0	5	82
	22	9	70
	35	25	50
	55	25	50
	56	5	82
	66	5	82

1.2.2.3 方法学考察及验证

标准曲线的绘制: 将稀释至 1.0、0.75、0.5、0.25、0.1、0.05、0.025 和 0.01 mg/mL 的混合标准品工作液, 在 1.2.2.2 节最优梯度洗脱条件下进样 20 μL 测定, 计算峰面积, 重复测定 3 次。以标准品质量浓度(X, mg/L)为横坐标, 以峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线。

重复性实验: 按照 1.2.2.1 节方法平行制备 6 份待测茶叶样品溶液, 在 1.2.2.2 节最优梯度洗脱条件下进样 20 μL 测定, 根据测得结果计算茶叶样品中各

组分的含量,并计算相对标准偏差(RSD)。

精密度实验:按照 1.2.2.1 节方法制备待测茶叶样品溶液,在 1.2.2.2 节最优梯度洗脱条件下进样 20 μL ,重复进样 6 次,根据测得结果计算茶叶样品中各组分的含量,并计算 RSD 值。

稳定性实验:按照 1.2.2.1 节方法制备待测茶叶样品溶液,并将其放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,分别取放置 0、6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72 h 样品溶液,在 1.2.2.2 节最优梯度洗脱条件下进样 20 μL ,根据测得结果计算茶叶样品中各组分的含量,并计算 RSD 值。

加标回收率实验:按照 1.2.2.1 节方法制备待测茶叶样品溶液,根据各标准物质在茶样中的含量,向样品中分别添加低、中、高三种浓度的混合标准溶液,再根据 1.2.2.2 节最优梯度洗脱条件进样 20 μL ,根据测得结果进行平均加标回收率检测,并计算 RSD 值。

1.3 数据处理

所有实验均设置 3 次重复,结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。采用 SPSS 26.0 统计软件进行单因素方差分析和数据统计。 $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。使用 Origin 2018 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 TSA、TSB、TSC 纯度测定和质谱鉴定

利用 HPLC 方法测定上述制备的 TSA、TSB、TSC 纯度,结果如图 1A~C 所示。由图可以看出, TSA、TSB 和 TSC 的峰纯度指数(Peak purity index)均大于 0.999,且均大于其单点阈值(Single point threshold),说明峰是纯峰。此外,峰面积占比(Peak area ratio)分别为 97.52%、97.82% 和 96.91%,均大

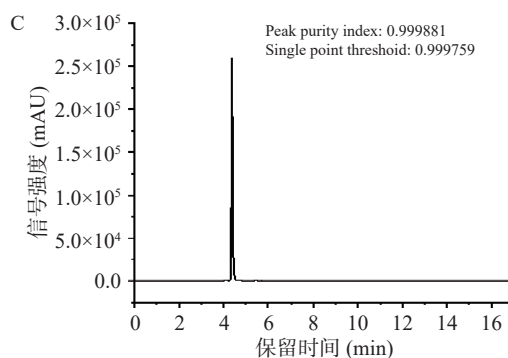


图 1 聚酯型儿茶素液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatographic diagram a of theasinensins
注: A: 聚酯型儿茶素 A; B: 聚酯型儿茶素 B; C: 聚酯型儿茶素 C。

于 95%, 因此可用来进一步进行质谱鉴定。利用 MALDI-TOF-MS 进行分子量确认, MALDI-TOF-MS 质谱结果如图 2A~C 所示。一级质谱数据经 Flexanalysis 3.3 软件分析后, 阳离子加钠条件下在图谱中发现 TSA、TSB 和 TSC 的特征荷质比分别为 $[\text{M}+\text{Na}]^+=937.168$ 、 $[\text{M}+\text{Na}]^+=784.989$ 和 $[\text{M}+\text{Na}]^+=633.018$, 与其加钠阳离子条件下的理论荷质比一致。因此, 本实验制备得到的 TSA、TSB、TSC 可用来进行后续相关实验。

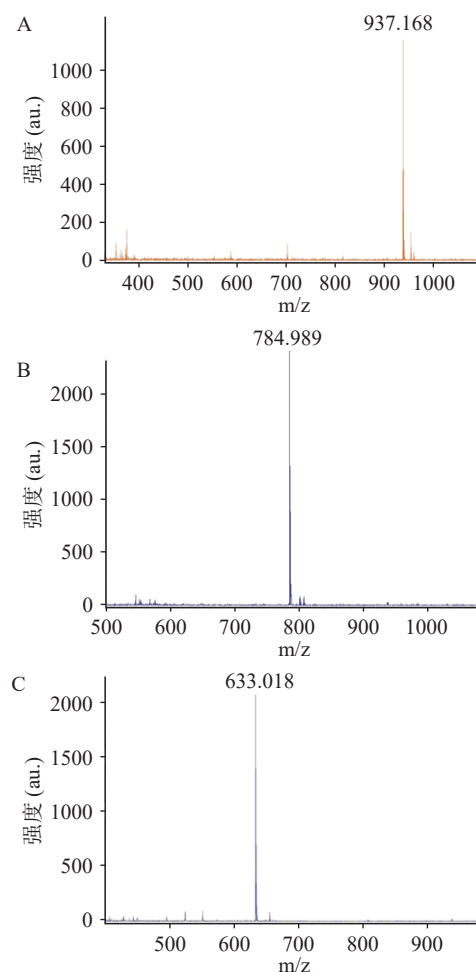
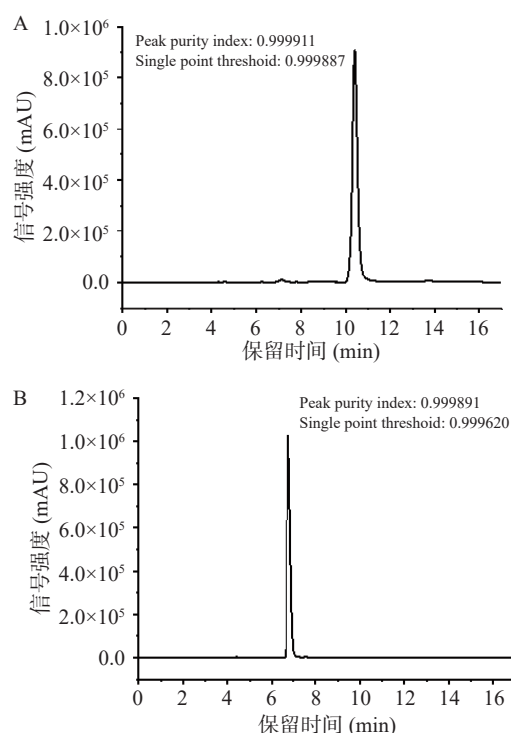


图 2 聚酯型儿茶素的质谱图

Fig.2 Mass spectra of theasinensins
注: A: 聚酯型儿茶素 A; B: 聚酯型儿茶素 B; C: 聚酯型儿茶素 C。

2.2 方法的建立与验证

2.2.1 HPLC 色谱图出峰情况 图 3A~C 显示了三种梯度洗脱条件下 13 种标准品的高效液相色谱图。由图 3 可以看出,在 A 梯度洗脱条件下由于前期流动相组成变化较快,TSC 和 GA 的分离度较差,两者不能良好分离,并且四种茶黄素未被洗脱下来。在 B 梯度洗脱条件下,TSA 和 GA 能够实现较好分离,但 TF、TFDG、TF3G 和 TF3'G 四种茶黄素均未洗脱出来,这可能是由于流动相极性较小所致。在 HPLC 中两种物质的分离程度可以用分离度(R)来衡量,在 C 梯度洗脱条件下,包括四种茶黄素在内的 13 种目标物质均能够被洗脱下来且 R 值均超过 1.5,表明在该色谱条件下 13 种物质具有较好的分离效果。在 C 梯度洗脱条件下,乌龙茶和红茶样品中 13 种物质的出峰情况如图 4A~B 所示,图中 13 种目

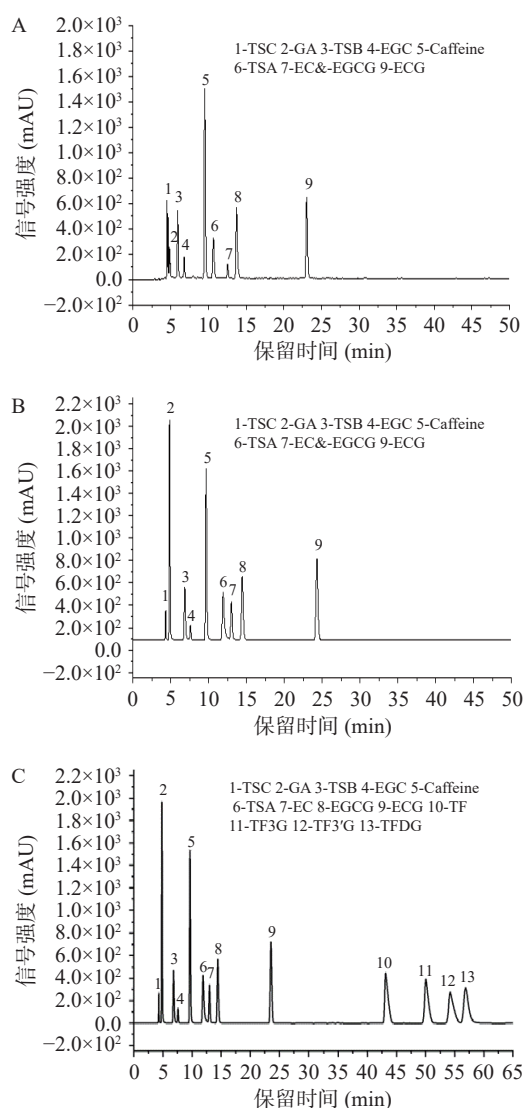


图 3 不同洗脱条件下各物质标准品色谱图

Fig.3 Elution profiles of mixed authentic standards under different gradient elution conditions

注: 1.TSC, 2.GA, 3.TSB, 4.EGC, 5.Caffeine, 6.TSA, 7.EC, 8.EGCG, 9.ECG, 10.TF, 11.TF3G, 12.TF3'G, 13.TFDG; 图 4、图 5 同。

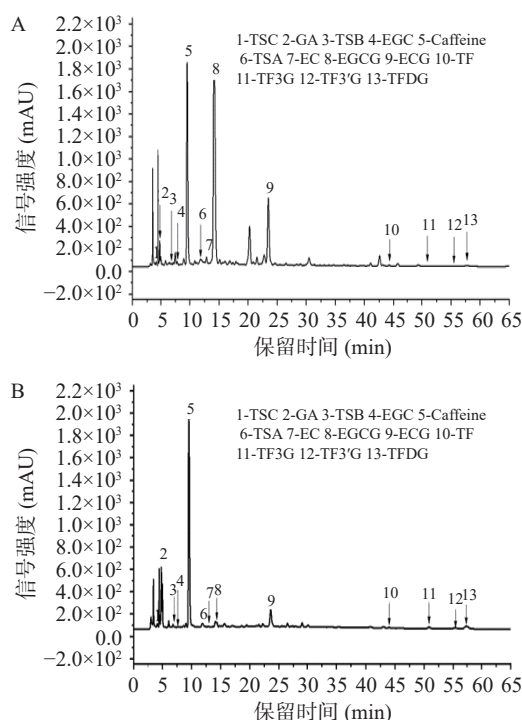


图 4 乌龙茶和红茶中 13 种物质液相色谱图

Fig.4 Liquid chromatographic diagram of oolong tea and black tea

注: A: 乌龙茶; B: 红茶。

标物质在乌龙茶和红茶中均被检测到且能够较好分离。因此选择总运行时间为 66 min 的梯度洗脱条件 C 作为高效液相后续梯度洗脱条件。

2.2.2 方法学验证结果

2.2.2.1 标准曲线建立 13 种物质的标准曲线如表 3 所示。由表 3 可以看出 13 种物质的标准曲线方程回归系数在 0.9904~0.9966 之间,说明各单体峰面积在质量浓度范围 0.01~1.00 mg/mL 之间具有较强的线性关系。检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别定义为当信噪比 S/N 为 3 和 10 时的样品浓度,13 种标准品的 LOD 为 0.0002~0.011 mg/mL, LOQ 为 0.0007~0.037 mg/mL。

2.2.2.2 重复性、精密度和稳定性 重复性实验结果如表 4 所示,各成分 RSD 值在 1.034%~4.008% 之间,说明此方法在最佳梯度洗脱条件下具有良好的重复性。精密度实验结果表明各成分 RSD 值在 1.882%~4.835% 之间,说明此方法精密度良好。稳定性实验结果表明各成分 RSD 值在 0.349%~3.994% 之间,说明此方法稳定性较好。

2.2.2.3 平均加标回收率 13 种标准物质在高、中、低三种加标浓度下的回收率结果如表 5 所示,13 种标准物质在不同加标浓度下的回收率在 90.106%~107.331% 之间,符合基质加标回收范围 80%~120%,各物质 RSD<3.268%,结果准确可靠。

2.3 不同茶叶样品中表儿茶素、没食子酸、茶黄素、聚酯型儿茶素和咖啡碱的含量测定

绿茶、乌龙茶、红茶和黑茶的液相色谱图如

表 3 各物质标准曲线
Table 3 Standard curve of authentic standards

物质	浓度范围(mg/mL)	回归方程	回归系数(R ²)	检出限(mg/mL)	定量限(mg/mL)
TSC	0.01~1.000	y=3676.9775x-209.2683	R ² =0.9966	0.002	0.007
GA	0.01~1.000	y=22704.2817x+1854.5021	R ² =0.9932	0.008	0.024
TSB	0.01~1.000	y=14950.5572x-1030.4098	R ² =0.9950	0.003	0.010
EGC	0.01~1.000	y=3529.5253x-237.9732	R ² =0.9916	0.011	0.037
咖啡碱	0.01~1.000	y=34920.3469x+700.6612	R ² =0.9934	0.0002	0.0007
TSA	0.01~1.000	y=22508.2687x-1795.0829	R ² =0.9926	0.002	0.007
EC	0.01~1.000	y=9390.1784x-238.4576	R ² =0.9935	0.006	0.018
EGCG	0.01~1.000	y=23425.5722x-1771.3976	R ² =0.9904	0.003	0.01
ECG	0.01~1.000	y=7211.3934x-283.3098	R ² =0.9945	0.003	0.010
TF	0.01~1.000	y=3676.9775x-209.2683	R ² =0.9966	0.005	0.016
TF3G	0.01~1.000	y=22704.2817x+1854.5021	R ² =0.9932	0.003	0.009
TF3'G	0.01~1.000	y=14950.5572x-1030.4098	R ² =0.9950	0.003	0.009
TFDG	0.01~1.000	y=3529.5253x-237.9732	R ² =0.9916	0.003	0.010

表 4 各物质重复性、精密度和稳定性试验结果
Table 4 The results of the repetitive, precision and stability tests for substances

物质	重复性相对标准 偏差(%)	精密度相对标准 偏差(%)	稳定性相对标准 偏差(%)
TSC	2.890	3.030	2.071
GA	1.829	1.882	2.348
TSB	3.426	3.188	2.847
EGC	1.304	2.934	1.904
咖啡碱	1.901	2.541	2.062
TSA	3.592	4.835	0.349
EC	1.94 9	3.124	0.423
EGCG	1.034	4.155	3.844
ECG	2.665	3.378	3.444
TF	3.123	3.881	2.396
TF3G	3.020	4.020	0.724
TF3'G	4.008	4.278	3.994
TFDG	3.909	4.288	3.500

图 5 所示。不同茶叶样品中 13 种物质的含量如表 6 所示。从表 6 可以看出,绿茶、红茶、乌龙茶和黑茶中 4 种表儿茶素、GA、TFs、TSs 和咖啡碱含量存在显著差异。绿茶中 4 种表儿茶素类总量最高(171.65 mg/g),其次是乌龙茶(135.19 mg/g),红茶和

黑茶含量较少(分别为 29.72 mg/g 和 29.89 mg/g),与文献报道的一致^[13,15]。此外,与绿茶相比,红茶和黑茶中的酯型儿茶素(EGCG、ECG)含量较低,这可能是由于在茶叶加工过程中部分酯型儿茶素被酶水解转化形成非酯型儿茶素和 GA,而后部分非酯型儿茶素发生氧化缩合形成茶黄素、茶红素和茶褐素^[23-24];或者部分酯型儿茶素经酶促氧化形成醌类物质,而后以不同的方式转化形成 TFs 和 TSs^[25]。TSs 方面,乌龙茶中聚酯型儿茶素含量最高(20.717 mg/g),其次是黑茶和红茶,分别为 17.228 mg/g 和 15.106 mg/g,绿茶中聚酯型儿茶素类含量最少(3.942 mg/g),且四种茶样中均是 TSA 含量最高,TSB 含量最少,与之前文献^[22]报道的一致。TFs 方面,未发酵绿茶中未检测到 TFs。后发酵黑茶中未检测到 TFs,这可能是由于黑茶后发酵过程中茶黄素、茶红素与多糖、蛋白质和脂类等其他物质进一步氧化聚合形成茶褐素^[26-27]。半发酵茶乌龙茶和发酵茶红茶中 TFs 含量较高。红茶和乌龙茶中 TFs 总量分别为 10.904 mg/g 和 9.046 mg/g,其中红茶中 TFDG 和 TF 含量均最高,分别为 2.958±0.037 mg/g 和 2.845±0.011 mg/g,此结果与文献^[28]报道的一致。红茶中 GA 含量最

表 5 各物质加标回收率试验结果
Table 5 The results of the recovery test for substances

物质	加标浓度(mg/mL)			加标回收率(%)			RSD(%)		
	高	中	低	高	中	低	高	中	低
TSC	0.45	0.25	0.05	90.996	91.166	90.878	1.234	1.219	1.204
GA	0.45	0.20	0.10	94.150	95.682	96.822	1.210	0.991	0.712
TSB	0.45	0.25	0.05	91.876	92.727	93.398	1.219	1.226	1.320
EGC	0.80	0.50	0.20	95.989	95.880	95.771	0.503	0.489	0.475
咖啡碱	0.45	0.30	0.10	95.926	93.689	91.383	1.809	2.228	2.329
TSA	0.45	0.30	0.10	92.889	93.556	92.557	1.210	1.424	1.788
EC	0.45	0.30	0.10	99.080	98.662	99.800	3.120	3.268	3.110
EGCG	0.45	0.30	0.10	104.127	105.110	103.756	1.923	1.899	1.779
ECG	0.45	0.20	0.10	95.356	97.002	97.674	3.109	3.224	3.165
TF	0.18	0.10	0.02	95.826	94.939	96.869	1.210	1.118	0.534
TF3G	0.18	0.10	0.02	101.662	102.986	101.373	1.519	2.880	2.366
TF3'G	0.18	0.10	0.02	107.331	106.313	103.827	0.308	0.210	0.154
TFDG	0.18	0.10	0.02	90.256	90.961	90.106	2.239	2.528	1.512

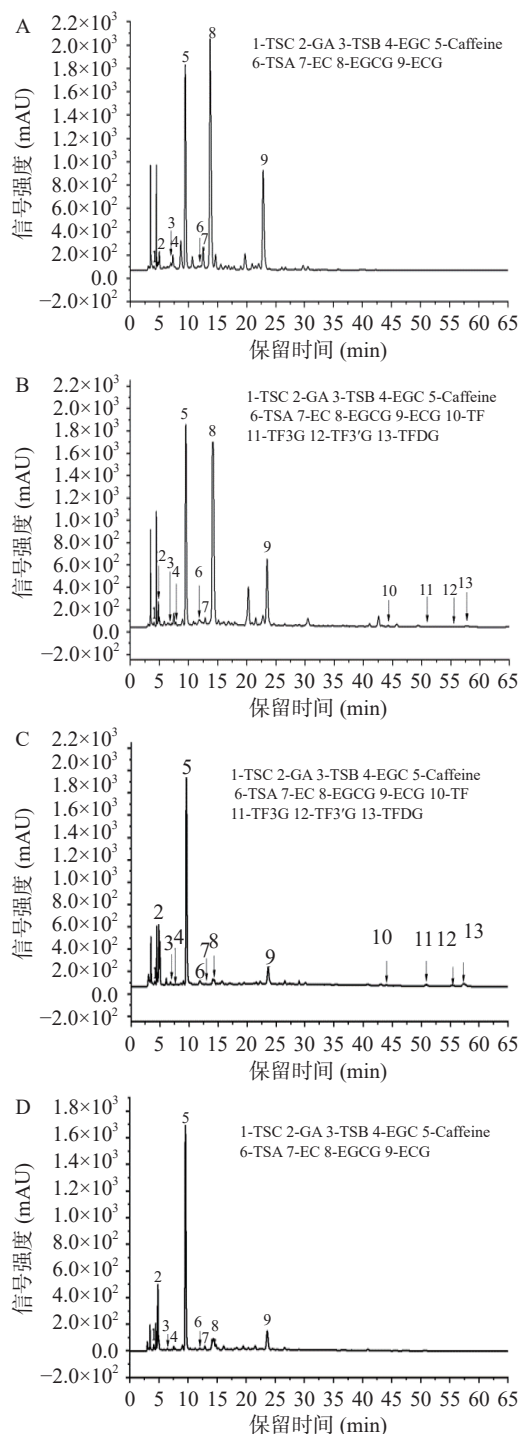


图5 绿茶、乌龙茶、红茶和黑茶液相色谱图

Fig.5 Liquid chromatographic diagram of green tea, Oolong tea, black tea and dark tea

注: A: 绿茶; B: 乌龙茶; C: 红茶; D: 黑茶。

高(5.728 ± 0.025 mg/g), 其次是黑茶和乌龙茶(分别为 5.008 ± 0.016 mg/g 和 4.775 ± 0.029 mg/g), 绿茶中含量最低(3.909 ± 0.023 mg/g), 这与文献中报道的在茶叶发酵过程中酯型儿茶素降解生成非酯型儿茶素和 GA^[29] 相一致。各茶叶样品中, 咖啡碱含量最高为 38.388 ± 0.047 mg/g(红茶), 最低为 31.139 ± 0.028 mg/g(黑茶), 这与文献^[30]报道的含量接近。

3 结论

本研究首先利用化学合成的方法制备 TSA、

表6 茶样中化合物含量

Table 6 Content of compounds in tea samples

物质	绿茶(mg/g)	乌龙茶(mg/g)	红茶(mg/g)	黑茶(mg/g)
TSC	1.008 ± 0.046^a	6.669 ± 0.007^c	4.260 ± 0.029^b	4.083 ± 0.041^b
GA	3.909 ± 0.023^a	4.775 ± 0.029^b	5.728 ± 0.025^d	5.008 ± 0.016^c
TSB	0.901 ± 0.085^a	4.854 ± 0.062^d	3.398 ± 0.032^b	3.992 ± 0.067^c
EGC	38.195 ± 0.003^c	24.858 ± 0.031^b	10.803 ± 0.030^a	10.811 ± 0.029^a
咖啡碱	34.495 ± 0.020^b	35.714 ± 0.024^c	38.388 ± 0.047^d	31.139 ± 0.028^a
TSA	2.033 ± 0.017^a	9.194 ± 0.013^c	9.570 ± 0.021^c	7.031 ± 0.031^b
EC	20.894 ± 0.045^d	10.565 ± 0.005^c	5.498 ± 0.038^a	7.348 ± 0.017^b
EGCG	81.813 ± 0.025^d	76.868 ± 0.024^c	5.979 ± 0.025^b	5.693 ± 0.005^a
ECG	30.751 ± 0.022^d	22.903 ± 0.041^c	7.443 ± 0.005^b	6.047 ± 0.025^a
TF	ND	2.845 ± 0.011^a	2.853 ± 0.025^b	ND
TF3G	ND	2.289 ± 0.045^a	2.724 ± 0.043^b	ND
TF3'G	ND	1.800 ± 0.010^a	2.369 ± 0.010^b	ND
TFDG	ND	2.112 ± 0.040^a	2.958 ± 0.037^b	ND

注: 同行不同小写字母表示存在显著差异($P < 0.05$); ND表示未检测到。

TSB 和 TSC 纯品, 然后建立同时检测 EGCG、EGC、ECG、EC、TF、TFDG、TF3G、TF3'G、TSA、TSB、TSC、GA 和咖啡碱的 HPLC 方法。在此条件下茶叶中 13 种主要化学成分均可在 66 min 内得到较好地分离, 同时各物质在 0.01~1.00 mg/mL 的质量浓度范围内与其峰面积的线性关系良好, 并且该方法重复性好、精密度高、稳定性好、加标回收率符合要求。最后利用该方法对绿茶、乌龙茶、红茶和黑茶中的 4 种表儿茶素及其氧化二聚体(4 种 TFs 和 3 种 TSs)、GA 和咖啡碱进行分析和比较, 发现各活性物质在不同茶叶中存在显著差异。红茶中咖啡碱含量最高(38.388 ± 0.047 mg/g), 黑茶中含量最低(31.139 ± 0.028 mg/g)。GA 在红茶、黑茶、乌龙茶和绿茶中的含量由高到低依次为 5.728 ± 0.025 、 5.008 ± 0.016 、 4.775 ± 0.029 和 3.909 ± 0.023 mg/g。绿茶中 4 种表儿茶素类总量为 171.65 mg/g, 其次是乌龙茶 135.19 mg/g, 红茶和黑茶含量分别为 29.72 mg/g 和 29.89 mg/g。与绿茶相比, 红茶、乌龙茶和黑茶中 EGCG 和 ECG 含量较低, 而红茶和乌龙茶中的茶黄素、EGC 和 EC 含量较高, 这可能与茶叶发酵过程中酯型儿茶素的降解以及氧化缩合有关^[26,31]。本研究建立的方法操作简单、结果准确可靠, 适用于不同茶叶中 4 种表儿茶素、茶黄素、聚酯型儿茶素、没食子酸和咖啡碱的同时分析。本研究为茶叶的加工、品质控制和营养功能评价提供了一种可靠的快速分析手段。

参考文献

- [1] 桂安辉, 高士伟, 叶飞, 等. 不同产地扁形绿茶的品质成分差异分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(20): 218-223. [GUI A H, GAO S W, YE F, et al. Differential analysis of quality components of flat green tea from different producing areas[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(20): 218-223.]
- [2] XIAO Y, ZHONG K, BAI J R, et al. Insight into effects of isolated *Eurotium cristatum* from Pingwu Fuzhuan brick tea on the fermentation process and quality characteristics of Fuzhuan brick tea[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(9): 3598-3607.

- [3] 宋楚君, 范方媛, 龚淑英, 等. 不同产地红茶的滋味特征及主要贡献物质[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(2): 383–394. [SONG C J, FAN F Y, GONG S Y, et al. Taste characteristic and main contributing compounds of different origin black tea[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(2): 383–394.]
- [4] WANG K B, LIU F, LIU Z H, et al. Analysis of chemical components in oolong tea in relation to perceived quality[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45(5): 913–920.
- [5] LEI S C, XIE M H, HU B, et al. Effective synthesis of theaflavin-3, 3'-digallate with epigallocatechin-3-O-gallate and epicatechin gallate as substrates by using immobilized pear polyphenol oxidase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 94: 709–718.
- [6] LI Z Y, FENG C X, LUO X G, et al. Revealing the influence of microbiota on the quality of Pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis[J]. *Food Microbiology*, 2018, 76: 405–415.
- [7] CHENG L Z, WANG Y F, ZHANG J R, et al. Dynamic changes of metabolic profile and taste quality during the long-term aging of Qingzhuan tea: The impact of storage age[J]. *Food Chemistry*, 2021, 359(15): 129953.
- [8] CHOI J Y, KIM E M, KO B J, et al. Production of theasinensin A using laccase as antioxidant and antiaging agent[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2022, 27(2): 253–261.
- [9] TANAKA T, WATARUMI S, MATSUO Y, et al. Production of theasinensins A and D, epigallocatechin gallate dimers of black tea, by oxidation-reduction dismutation of dehydrotheasinensin A[J]. *Tetrahedron*, 2003, 59(40): 7939–7947.
- [10] ZHANG H, QI R L, MINE Y. The impact of oolong and black tea polyphenols on human health[J]. *Food Bioscience*, 2019, 29: 55–61.
- [11] 刘洪林. 工夫红茶咖啡碱和 5 种儿茶素组分近红外快速测定方法的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(15): 316–320. [LIU H L. Research of rapid measurement methods of caffeine and five kinds of catechin components quality ingredients of congou black tea using near infrared spectroscopy[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(15): 316–320.]
- [12] WANG K B, CHEN Q C, LIN Y, et al. Separation of catechins and O-methylated (-)-epigallocatechin gallate using polyamide thin-layer chromatography[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1017–1018: 221–225.
- [13] NEILSON A P, GREEN R J, WOOD K V, et al. High-throughput analysis of catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography with diode array detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1132(1-2): 132–140.
- [14] ZHANG J Y, CUI H C, JIANG H Y, et al. Rapid determination of theaflavins by HPLC with a new monolithic column[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2019, 37(2): 112–119.
- [15] WEI K, WANG L Y, ZHOU J, et al. Comparison of catechins and purine alkaloids in albino and normal green tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) by HPLC[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(3): 720–724.
- [16] GANGULY S, G T K, MANTHA S, et al. Simultaneous determination of black tea-derived catechins and theaflavins in tissues of tea consuming animals using ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0163498.
- [17] SVOBODA P, VLČKOVÁ H, NOVÁKOVÁ L. Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of eight naturally occurring catechin derivatives in various tea samples and the role of matrix effects[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 114(10): 62–70.
- [18] TAO W Q, ZHOU Z G, ZHAO B, et al. Simultaneous determination of eight catechins and four theaflavins in green, black and oolong tea using new HPLC-MS-MS method[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 131(30): 140–145.
- [19] WANG L, YAN T, ZHANG K X, et al. A sensitive UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of polyphenols and theaflavins in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study of Da Hong Pao tea[J]. *Biomedical Chromatography*, 2019, 33(4): e4470.
- [20] TANAKA T, WATARUMI S, FUJIEDA M, et al. New black tea polyphenol having N-ethyl-2-pyrrolidinone moiety derived from tea amino acid theanine: Isolation, characterization and partial synthesis[J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(1): 81–87.
- [21] TAO S N, CHEN G J, XU W Q, et al. Preparation of theasinensin A and theasinensin B and exploration of their inhibitory mechanism on α -glucosidase[J]. *Food Function*, 2020, 11(4): 3527–3538.
- [22] 薛金金, 江和源, 龙丹, 等. HPLC 法同时测定茶叶中聚酯型儿茶素和茶黄素[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(5): 237–243. [XUE J J, JIANG H Y, LONG D, et al. Simultaneous determination of theasinensins and theaflavins content in tea by HPLC[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(5): 237–243.]
- [23] AN T T, CHEN M X, ZU Z Q, et al. Untargeted and targeted metabolomics reveal changes in the chemical constituents of instant dark tea during liquid-state fermentation by *Eurotium cristatum*[J]. *Food Research International*, 2021, 148: 110623.
- [24] MATSUO Y, TANAKA T, KOUNO I. A new mechanism for oxidation of epigallocatechin and production of benzotropolone pigments[J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(20): 4774–4783.
- [25] XIAO Y, LI M Y, LIU Y, et al. The effect of *Eurotium cristatum* (MF800948) fermentation on the quality of autumn green tea[J]. *Food Chemistry*, 2021, 358(1): 129848.
- [26] ZHU M Z, LI N, ZHOU F, et al. Microbial bioconversion of the chemical components in dark tea[J]. *Food Chemistry*, 2020, 312(15): 126043.
- [27] XUE J J, LIU P P, GUO G Y, et al. Profiling of dynamic changes in non-volatile metabolites of shaken black tea during the manufacturing process using targeted and non-targeted metabolomics analysis[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 156(15): 113010.
- [28] 王伟伟, 乐婷, 杨刘艳, 等. 骏眉工艺红茶化学成分及其抗氧化活性研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(10): 3320–3327. [WANG W W, LE T, YANG L Y, et al. Study on the chemical constituents and antioxidant activity of black tea with Junmei technology[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2022, 13(10): 3320–3327.]
- [29] HUANG Y Y, XIAO X D, CONG L, et al. A fermented tea with high levels of gallic acid processed by anaerobic solid-state fermentation[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2016, 71: 260–267.
- [30] MARUYAMA K, KIHARA-NEGISHI F, OHKURA N, et al. Simultaneous determination of catechins and caffeine in green tea-based beverages and foods for specified health uses[J]. *Food and Nutrition Sciences*, 2017, 8(3): 316–325.
- [31] LIU L, SHI J J, YUAN Y H, et al. Changes in the metabolite composition and enzyme activity of fermented tea during processing[J]. *Food Research International*, 2022, 158: 111428.