

文章编号:1001-6880(2016)10-1568-05

一测多评法测定茶多酚中6种儿茶素类含量

谢 静¹,熊 静¹,宋 丽¹,廖洪利¹,青芳竹^{2*}¹成都医学院,成都 610083; ²电子科技大学,成都 610054

摘要:采用HPLC法,以表没食子基儿茶素没食子酸酯(EGCG)为对照品,外标法测定其在茶多酚提取物中的量,并分别测定EGCG与表没食子儿茶素(EGC)、儿茶素(C)、表儿茶素(EC)、没食子基儿茶素没食子酸酯(GCG)和没食子酰表儿茶素(ECG)的相对校正因子,用获得的相对校正因子计算后5种成分的量,实现一测多评;同时,用外标法测茶多酚提取物中EGC、C、EC、GCG和ECG的量。向量夹角余弦法分析,表明外标法的测定值与采用相对校正因子的计算值之间无显著性差异,说明一测多评法可以应用于茶多酚提取物及其制剂的多指标质量评价。

关键词:茶多酚;儿茶素;一测多评法;高效液相色谱法

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.012

Determination of 6 Catechins in Tea Polyphenols Extract by Quantitative Analysis of Multi-Components via Single Marker Method

XIE Jing¹, XIONG Jing¹, SONG Li¹, LIAO Hong-li¹, QING Fang-zhu^{2*}¹Chegndu Medical College, Chengdu 610083, China; ²University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China

Abstract: In this study, a new strategy for quantitative analysis of multi-components using a single marker (QAMS) was developed and validated to analyze six catechins (epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, gallo-catechin gallate, and epicatechin gallate) in tea polyphenols extract by HPLC. The QAMS method is based on the relative correction factor (RCF) between each analyte and single standard within certain concentration ranges. In the present study, epigallocatechin gallate was selected as the internal reference substance. The RCFs values between epigallocatechin gallate and the other five catechins were investigated using five different types of chromatographic columns. The content of other five components were calculated by RCFs, respectively. Meanwhile, the content of the six analytes was also determined by a conventional external standard method to compare with QAMS method. Finally, the angle cosine value which were all above 0.999542 revealed that there was no significant difference between the QAMS method and the external standard method. The QAMS method established in this study solved the problem of the availability and high cost of some standard substances, and would be useful for providing an efficient and feasible quality assessment method for tea polyphenols extract and its preparations.

Key words: tea polyphenols extract; catechins; quantitative analysis of multi-components via single marker method; high performance liquid chromatography

茶多酚是一类存在于茶叶中的多羟基酚性化合物的混合物,包括黄烷醇(儿茶素)类、花色苷类、黄酮醇类和酚酸类等,其中,儿茶素类是茶多酚的主要成分,占80%左右。茶多酚是一种非常重要的天然抗氧化剂,具有极强的自由基清除作用,广泛应用于食品、化妆品、保健品等领域^[1];此外,茶多酚还具

有抗菌^[2]、抗骨质疏松^[3]、降血糖^[4]、降血脂^[5]以及心血管保护^[6]等多种活性。茶多酚中主要含有表没食子儿茶素(EGC)、儿茶素(C)、表没食子基儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素(EC)、没食子基儿茶素没食子酸酯(GCG)、没食子酰表儿茶素(ECG)等六个儿茶素类化合物,目前,一般采用HPLC外标法对茶多酚中的儿茶素进行含量测定^[7,8]。但是,由于这些成分主要是光学异构体,纯化难度大,不易获得,价格较贵,这些因素导致文献所报道的外标法在生产和检验实际工作中有所局

收稿日期:2016-05-11 接受日期:2016-06-22

基金项目:四川省2015大学生创新训练项目(201513705078);四川省教育厅科研计划(16ZA0299);电子科技大学新进教师科研启动基金(ZYGX2015KYQD077)

*通讯作者 Tel:86-28-83208770;E-mail:qingfz@uestc.edu.cn

限。

针对这一矛盾,“一测多评”的新思路应运而生,即通过测定 1 个成分(对照品供应充足、易得者)而实现多个成分(对照品难供应、昂贵者)的同时测定^[9,10]。其原理是,组分的含量与检测器响应值在一定线性范围内成正比(即 $f = A/C$)。在进行多组分同时测定时,可以选取其中一种典型组分为内标物,建立该组分与其他组分之间的相对校正因子(f_{km}),如公式(1)所示;

$$f_{km} = \frac{f_k}{f_m} = \frac{C_k \times A_m}{C_m \times A_k} \quad (1)$$

其中 C_k 、 C_m 分别为内标物、待测物的浓度, A_k 、 A_m 分别为内标物、待测物的峰面积。通过待测组分与内标组分的 f_{km} 即可按照公式(2)计算出样品中其它待测组分的含量:

$$C_m = \frac{C_k \times A_m}{f_{km} \times A_k} \quad (2)$$

本研究即在“一测多评”思路的指引下,采用 HPLC 法,建立以 EGCG 为对照品、同时测定茶多酚中的 EGC、C、EC、GCG 和 ECG 含量的一测多评法,更好地服务于科研与生产实践。

1 材料与方法

1.1 材料

超声波清洗器(KH5200B, 昆山禾创超声仪器

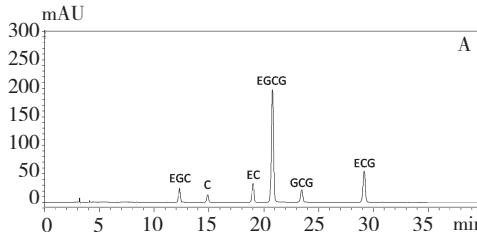


图 1 混合对照品(A)和茶多酚样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards (A) and sample (B)

1.2.2 对照品储备液的制备

分别取一定量的 EGC、C、EGCG、EC、GCG、EGC 购对照品,精密称定,用 50% 甲醇溶解配成相应的对照品储备液:EGC 6.2、C 5.1、EC 9.5、EGCG 4.9、GCG 4.9、ECG 4.7 mg/mL,4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 样品溶液的制备

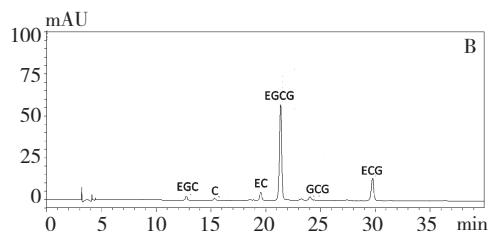
取 50 mg 茶多酚提取物粉末,精密称定,至 50 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇定容。

有限公司);分析天平(GA110, Ohaus)、移液器(KA0004731: 100-1000 μL, KE0040836: 10-100 μL),岛津高效液相色谱系统(包含 LC-20AD 二元高压泵、DGU-20A3R 自动脱气机、SIL-20A 自动进样器、MSD-M20A 二极管阵列检测器)。6 个对照品表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)、儿茶素(catechin, C)、表没食子基儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、表儿茶素(epicatechin, EC)、没食子基儿茶素没食子酸酯(gallocatechin gallate, GCG)、没食子酰表儿茶素(epicatechin gallate, ECG)购买于成都普思生物科技股份有限公司,使用娃哈哈纯净水和色谱乙腈作为洗脱溶剂,其它试剂均为分析纯。五个茶多酚样品来自于陕西、湖北、江西等地的五家不同提取物生产企业。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

选用 Shimadzu Wonda Cract ODS-2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相为 0.5% 乙酸水溶液(A 相)、乙腈(B 相),梯度洗脱:0 ~ 40 min, 10% ~ 30% B; 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 35 ℃。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 如图 1 所示, 理论塔板数以儿茶素峰计不低于 12000。



1.2.4 线性关系考察

将对照品储备液按照 10:1:2:25:1.5:8 的比例混合,得到混标工作溶液 I,将其逐级稀释得到混标工作溶液 II ~ V。分别吸取混标工作溶液 I ~ V 10 μL,注入液相色谱仪,测定峰面积,以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.5 重复性试验

取同一茶多酚提取物粉末 6 份,精密称定,分别按照“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按照

“1.2.1”项下色谱条件测定。

1.2.6 回收率试验

取同一茶多酚提取物粉末9份,精密称定,分为3组,每组精密加入相当于已知含量50%、100%和150%的对照品储备液,分别按照“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按照“1.2.1”项下色谱条件测定含量,计算加样回收率。

1.2.7 不同色谱柱对相对校正因子(f_{km})的影响

不同类型的色谱柱由于具有不同的含碳量、比表面积、末端封尾方式等,对分离效果(包括对称性因子,保留时间和理论板数等)有明显的影响。为了更好的控制相关参数,本研究评估了对照品在不同色谱柱上的色谱行为,分别选择了5根色谱柱Shimadzu WondaCreact ODS-2(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Tianhe Kromasil C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Phenomenex Luna C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Dalian Elite hypersil BDS C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax SB-aq C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)进行实验,根据公式(1)计算出不同色谱柱下的 f_{km} 。表没食子基儿茶素没食子酸酯(EGCG)较易获得、成本低,且在样本中含量高,因此,选择EGCG作为内标峰,计算其余5各儿茶素化合物的 f_{km} 。

1.2.8 样品测定

分别取不同来源的茶多酚样品,按照“1.2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定。

1.2.9 测定结果分析

借鉴指纹图谱相似度评价方式^[11],采用夹角余弦值比较常规的外标法实测含量与一测多评计算的含量,验证一测多评方法用于多指标成分质量评价的准确性,根据公示(3),使用Excel 2007计算两种

计算方法的夹角余弦值。

表1 不同色谱柱下的相对校正因子(f_{km})

Table 1 The RCFs with different chromatographic columns of QAMS method

$$C_{ir} = \frac{\sum_{k=1}^n X_{ik} \cdot X_{rk}}{\sqrt{(\sum_{k=1}^n X_{ik}^2)(\sum_{k=1}^n X_{rk}^2)}} \quad (3)$$

其中 X_{ik} 是常规的外标法实测的第 k 个化合物含量, X_{rk} 是一测多评计算的第 k 个化合物含量。

2 实验结果

2.1 方法学考察结果

6个儿茶素类对照品线性关系考察结果表明线性良好,标准曲线分别为:EGC Y = 1433515X-822, $r^2 = 0.9997$; C Y = 4036738X + 1369, $r^2 = 0.9995$; EC Y = 12365713 X-21708, $r^2 = 0.9998$; EGCG Y = 7399901X + 1751, $r^2 = 0.9997$; GCG Y = 12255005 X-1032, $r^2 = 0.9996$; ECG Y = 15629836X-781, $r^2 = 0.9998$;对同一茶多酚提取物粉末的6份样品重复性试验结果表明重复性良好,EGC、C、EC、EGCG、GCG和ECG的RSD分别为:2.32%、1.12%、1.64%、1.26%、1.76%和0.87%;高中低三个浓度梯度加样回收率结果良好,EGC、C、EC、EGCG、GCG和ECG的平均回收率($n=9$)分别为:98.06%(RSD = 2.64%)、97.08%(RSD = 2.68%)、99.58%(RSD = 1.71%)、98.20%(RSD = 1.74%)、99.94%(RSD = 2.35%)、97.89%(RSD = 2.08%)。方法学考察结果说明本方法满足定量分析的要求,准确可靠,可以用于茶多酚样品中儿茶素类化合物的含量测定。

2.2 不同色谱柱对相对校正因子(f_{km})

选择EGCG作为内标峰,根据公式(1)计算其余5个儿茶素化合物的 f_{km} ,结果如表1所示,不同色谱柱上测得的 f_{km} 差别很小,满足定量分析的要求。

色谱柱 Column	EGC	C	EC	EGCG	GCG	ECG
Shimadzu Wonda Creact ODS-2	0.54	0.35	0.41	1	0.89	0.60
Tianhe Kromasil C18	0.55	0.36	0.42	1	0.90	0.61
Phenomenex Luna C18	0.54	0.36	0.41	1	0.90	0.61
Dalian Elite hypersil BDS C18	0.52	0.36	0.40	1	0.88	0.59
Agilent Zorbax SB-aq C18	0.56	0.38	0.43	1	0.91	0.62
Mean	0.54	0.37	0.41		0.90	0.61
SD	0.015	0.011	0.013		0.013	0.014
RSD	2.80%	2.92%	3.06%		1.46%	2.26%

2.3 样品测定

分别采用一测多评法和外标法计算茶多酚样品中表没食子儿茶素(EGC)、儿茶素(C)、表没食子基

儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素(EC)、没食子基儿茶素没食子酸酯(GCG)、没食子酰表儿茶素(ECG)的含量,结果见表2。

表2 不同茶多酚样品中儿茶素含量测定结果(%)

Table 2 The contents of catechins in five batches of tea polyphenols extract by QAMS method and external standard (ES) method (%)

	EGCG		EGC		C		EC		GCG		ECG	
	ES [*]	QAMS [#]	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	QAMS	ES	
S 1	49.92	13.11	13.21	2.18	2.28	5.98	5.88	2.12	1.93	9.64	9.88	
S 2	48.75	12.29	12.37	2.23	2.31	5.74	5.46	2.12	1.91	9.48	9.77	
S 3	55.27	9.04	9.13	0.95	1.02	8.67	8.50	2.69	2.57	7.07	7.35	
S 4	44.32	10.09	10.28	1.16	1.21	10.32	10.20	8.35	8.20	5.55	5.60	
S 5	42.95	11.65	11.86	1.19	1.36	10.01	9.82	9.58	9.40	4.58	4.78	
Cir ^{&}		0.999986		0.999542		0.999948		0.999845		0.999960		

注: * ES:外标法; [#] QAMS:一测多评法; [&] Cir:夹角余弦值。

Note: * ES:external standard method; [#] QAMS:multi-components using a single marker method; [&] Cir:angle cosine value.

采用公式(3)计算一测多评法和外标法测得的计算值和实测值之间的夹角余弦值,以便于评估两种方法测定结果的差异性。两组数据的夹角余弦值越接近1,说明两组数据之间的差异越小。在本实验中,EGC、EGCG、EC、GCG 和 ECG 的一测多评法和外标法结果夹角余弦值在 0.999542 ~ 0.999986 之间,表明两种方法的测量结果没有显著性差异。

3 讨论与结论

本实验以茶多酚提取物为例,对一测多评法的技术适用性和可行性进行了探讨研究。结果表明,一测多评法计算的结果与外标法所得结果没有显著差异,提示本方法可实现以表没食子基儿茶素没食子酸酯(EGCG)为内标物,通过确定的相对校正因子计算其余5种儿茶素的量,实现茶多酚提取物的多指标质量评价,并能推广到茶多酚相关制剂的多指标质量控制中。

五个不同厂家的产品中,6种儿茶素类化合物单体的含量差异较大,但总儿茶素含量差别不大(79.81% ~ 83.84%之间)。文献报道儿茶素类的对应异构体在一定的条件下可能会构型互相转化^[12]。在本研究中,表型儿茶素与其对应的非表型儿茶素含量呈负相关性,很可能是不同厂家的生产工艺不一样,导致儿茶素的相对含量差别较大。这一结果也从另一个角度说明,分别测定每一个儿茶素化合物的含量,比测定总茶多酚含量,更能反应产品的质量。

参考文献

- Li CM(李春美), Xie BJ(谢笔钧). Study on the ability of tea catechin oxidation for scavenging hydroxyl radicals. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12:50-53.
- Wang JL(汪金莲), Qiu YX(邱业先), Chen HW(陈宏伟), et al. Inhibitive action of tea-polyphenol on some plant pathogenic fungi. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2008, 20:690-694.
- Che XM(车晓明), Chen L(陈亮), Gu Y(顾勇), et al. Research progress in the treatment of osteoporosis using tea polyphenol. *Chin J Osteoporos* (中国骨质疏松杂志), 2015, 21:235-240.
- Yang F(杨冯), Zhao GH(赵国华). Research progress of hypoglycemic effect of tea polyphenol. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2009, 30:324-327.
- Liao MH(廖明宏). A summary of the function of lowering blood fat of tea polyphenols. *Tea Comm* (茶叶通讯), 2005, 32:33-35.
- Li L(李露), Lv JJ(吕佳倩), Jiang CJ(江承佳), et al. Advances in research of polyphenols in cardiovascular disease. *Food Sci* (食品科学), 2016, 37:1-8.
- Liu XQ(刘小乔), Li ZQ(李忠岐), Gao J(高静), et al. HPLC analysis of catechins in tea polyphenols. *Chin J Spectr Lab* (光谱实验室), 2012, 29:2611-2615.
- Wang ZM(王增明), Guo Q(郭庆东), Xie F(谢芳), et al. Determination of catechins and caffeine in tea polyphenols by HPLC. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2011, 46:1674-1676.

(下转第 1638 页)