

HPLC 法测定茯茶中黄酮类成分

李适^{1,2}, 卢强¹, 李银花², 黄建安², 刘仲华^{2*}

(1. 湖南农业大学植物资源工程系; 2. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙, 410128)

摘要: 目的: 建立茯茶中的黄酮类成分的高效液相色谱(HPLC)分析测定方法。方法: welchrom C18 (250mm*4.6mm, 5 μm) 色谱柱, 流速0.8mL/min, 检测波长280nm, 分析时间80min; 以A相甲醇, B相0.5%冰醋酸为洗脱溶剂梯度洗脱。结果: 该方法精密度、稳定性和重复性好, 平均回收率为94.88%。结论: 方法操作简便, 专属性强, 结果准确, 可用于茯茶中的黄酮类成分的监测。

关键词: 茯茶、高效液相色谱、黄酮类

中图分类号: TS201.2

文献标识码:

文章编号:

Determination of Flavonoids of Fuzhuan Tea by HPLC

Li Shi^{1,2}, Lu Qiang¹, Li Yin-hua², Huang Jian-an², Liu Zhong-hua^{2*}

(1. Botanic Resource Engineering Department of Hunan Agricultural University; 2. Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education in Hunan Agricultural University, Hunan Changsha 410128)

Abstract: Objective: To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of the flavonoids of Fuzhuan tea. Result: under the condition of welchrom C18(250mm*4.6mm, 5 μm) column, using gradient elution with Phase A-Methanol, Phase B-0.5% acetic acid at a flow rate of 0.8 mL/min, the wavelength of 295nm and the recording duration was 80 minutes. the average recovery was 94.88%. Conclusion: The established method is accuracy, sensitive and simple. It can be used for the determination of the flavonoids of Fuzhuan tea.

Key words: Fuzhuan tea ; High performance liquid chromatography(HPLC); Flavonoid

茯砖茶是一类重要的黑茶产品, 随着茯砖茶降脂、减肥等保健功能逐步被认识, 针对茯茶的功能成分研究也日益受到人们的关注^[1,2]。对茯砖茶及冠突散囊菌发酵过程中次生代谢产物展开研究, 将对科学阐述茯砖茶的保健功能提供理论依据^[3]。本文以茯茶中黄酮类成分为研究对象, 建立茯茶黄酮类成分的特征性HPLC图谱, 为进一步探讨冠突散囊菌发酵过程中黄酮类的变化规律和茯砖茶保健作用的物质基础, 以及未来开发系列保健品提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及样品制备

试验材料: 购于湖南益阳茶厂07年金湘益茯茶。没食子酸、咖啡碱、EGCG、EC、GCG对照品均购于美国sigma公司。

样品的制备: 60g茯茶加入900mL 70%的乙醇, 80℃提取0.5h, 55℃减压浓缩, 冷冻干燥得样品。

1.2 实验仪器

高效液相色谱仪(日本岛津公司): LC-20AT泵, SIL-20A自动进样器, DGU-20A5在线脱气装置, CBM-20A系统控制器, SPD-M20A高灵敏度二级管阵列检测器, CTO-20A柱温箱; 岛津 AUW220D型电子分析天平(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件的选择

检测波长的选择^[4-6]：称取20mg70%醇提取物粉末于100mL容量瓶中，加甲醇稀释至100mL摇匀，微孔滤膜(0.45 μ m)滤过，即得供试液。进样量10 μ l，比较不同波长下的HPLC图谱的分离效果，确定最佳的检测波长。

流动相条件的选择^[7-11]：采用乙腈-0.4%冰醋酸、甲醇-0.4%冰醋酸、甲醇-0.5%冰醋酸、甲醇-0.6%冰醋酸四个溶剂体系分别在不同梯度下进行梯度洗脱，比较不同流动相和梯度条件下茯苓提取物的高效液相色谱图，确定合适的流动相和洗脱梯度。

1.3.2 方法学考察

稳定性试验：称取20mg样品粉末于10mL容量瓶中，加甲醇稀释至10mL，摇匀，微孔滤膜(0.45 μ m)滤过，得供试液。分别于0h, 2h, 4h, 6h, 8h检测指纹图谱，以色谱图上主要色谱峰的相对峰面积和相对保留时间为指标计算RSD值，以RSD值为标准评价方法的稳定性。

精密度试验：称取20mg样品粉末于10mL容量瓶中，加甲醇稀释至10mL，摇匀，微孔滤膜(0.45 μ m)滤过，得供试液。取供试液，重复进样5次，每次进样10 μ l，以高效液相色谱图上主要色谱峰的相对峰面积和相对保留时间为指标计算RSD值，根据RSD值评价方法的精密度。

重现性试验：称取20mg样品粉末5份，分别置于10mL容量瓶中，加甲醇稀释至10mL，摇匀，微孔滤膜(0.45 μ m)滤过，得供试液1、2、3、4、5。分别进样10 μ l，以高效液相色谱图上主要色谱峰的相对峰面积和相对保留时间为指标计算RSD值，以RSD值为标准评价方法的重现性。

回收率实验：采用标准加入法进行方法准确度测定。取已知含量的样品1份，加入对照品，以3次进样测定计算平均值。

2 结果与分析

2.1 色谱条件研究

2.1.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器，分别在黄酮类成分测定常用的检测波长254nm、280nm、295nm、330nm处进行检测^[9-11]，比较四个波长下的茯苓茶黄酮提取物的HPLC图谱。

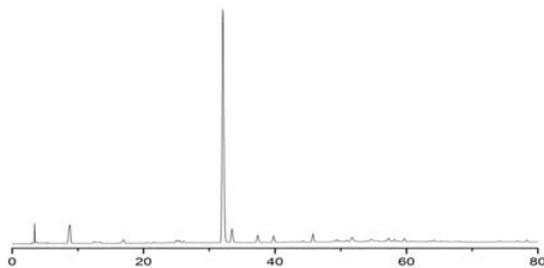


图1 254nm下HPLC图谱

Fig.1 HPLC chromatogram under the wavelength of 254nm

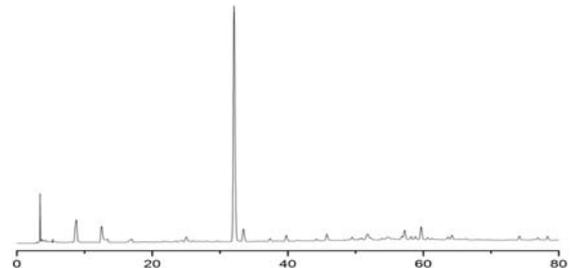


图2 280nm波长下HPLC图谱

Fig.2 HPLC chromatogram under the wavelength of 280nm

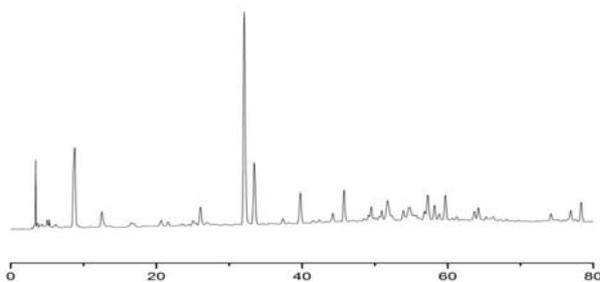


图3 295nm波长下HPLC图谱

Fig.3 HPLC chromatogram under the wavelength of 295nm

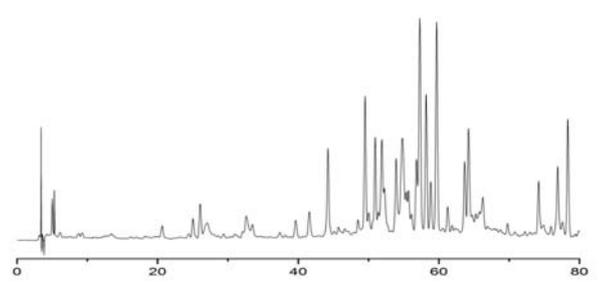


图4 330nm波长下HPLC图谱

Fig.4 HPLC chromatogram under the wavelength of 330nm

由图1、图2、图3、图4可以看出254nm和280nm波长下，图谱峰较少，330nm波长下图谱40min

以前的峰吸收太小，峰分布不均，295nm 波长下色谱峰分布较均匀，峰形良好，各峰吸收值适中，故选择 295nm 波长为检测波长。

2.1.2 流动相条件的选择

采用乙腈-0.4%冰醋酸水溶液、甲醇-0.4%冰醋酸水溶液、甲醇-0.5%冰醋酸水溶液、甲醇-0.6%冰醋酸水溶液四种二元流动相体系，分别在不同的梯度条件下进行梯度洗脱，比较不同体系、不同洗脱梯度的 HPLC 图谱。

(1) 乙腈-0.4%冰醋酸水溶液，柱温 25℃，梯度条件如表 1:

表 1 梯度条件 1

Table.1 Gradient condition 1

时间 (min)	A% 甲醇	B% 0.4%冰醋酸水溶液
Time	A% Mathanol	B% 0.4% acetic acid
0	5	95
15	30	70
25	30	70
45	40	60
60	80	20

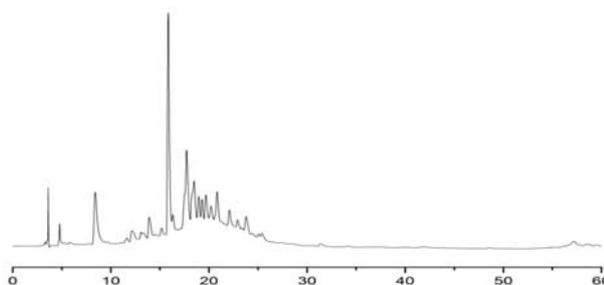


图 5 乙腈-0.4%冰醋酸水溶液 HPLC 图谱

Fig.5 HPLC chromatogram using gradient elution with acetonitrile-0.4% acetic acid

(2) 甲醇-0.4%冰醋酸水溶液，柱温 25℃，梯度条件如表 2:

表 2 梯度条件 2

Table.2 Gradient condition 2

时间 (min)	A% 甲醇	B% 0.4%冰醋酸水溶液
Time	A% Mathanol	B% 0.4% acetic acid
0	10	90
10	25	75
40	45	55
80	60	40

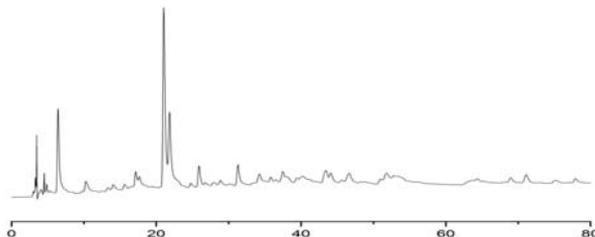


图 6 甲醇-0.4%冰醋酸水溶液 HPLC 图谱

Fig.6 HPLC chromatogram using gradient elution with methanol-0.4% acetic acid

(3) 甲醇-0.6%冰醋酸水溶液，柱温 25℃，梯度条件如表 3:

表 3 梯度条件 3

Table.3 Gradient condition 3

时间 (min)	A% 甲醇	B% 0.6%冰醋酸水溶液
Time	A% Mathanol	B% 0.6% acetic acid
0	10	90
10	25	75
40	45	55
80	60	40

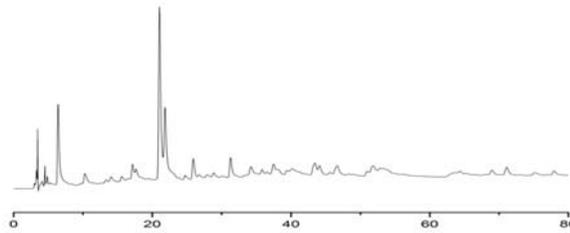


图 7 甲醇-0.6%冰醋酸水溶液 HPLC 图谱

Fig.7 HPLC chromatogram using gradient elution with methanol-0.6% acetic acid

(4) 甲醇-0.5%冰醋酸水溶液，柱温 30℃，梯度条件如表 4:

表 4 梯度条件 4

Table.4 Gradient condition 4

时间 (min)	A% 甲醇	B% 0.5%冰醋酸水溶液
Time	A% Mathanol	B% 0.5% acetic acid
0	8	92
20	20	80
30	25	75
80	60	40

从上述色谱条件可以看出：乙腈-0.4%冰醋酸水溶液，梯度条件 1 下洗脱，色谱峰过于集中，色谱峰重叠现象严重；甲醇-0.4%冰醋酸水溶液，梯度条件 2 下洗脱，色谱峰较少，且仍有多个色谱峰未分开；甲醇-0.6%冰醋酸水溶液，梯度条件 3 下洗脱，各色谱峰峰形较差，部分色谱峰重叠，基线漂移较严重。甲醇-0.5%冰醋酸水溶液，柱温 30℃，梯度条件 4 下洗脱，如图 13 所示，各色谱峰基本分开，色谱峰分别均匀，峰形较好。选择甲醇-0.5%冰醋酸水溶液，柱温 30℃，梯度条件 4 作为检测的流动相体系和梯度条件在此条件下，采用外标法，将 4 种茶叶中的黄酮类标准品和茶叶中含量较高的咖啡碱分别进样，得到图 8~图 12，儿茶素标准品与样品中主要色谱峰的保留时间，确定 1 号峰为没食子酸，2 号峰为咖啡碱，3 号峰为 EGCG，4 号峰为 EC，5 号峰为 GCG，含量较高的 6 号峰暂时不能确定。

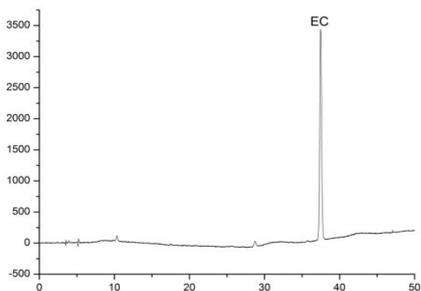


图 8 EC 标准品的 HPLC 图谱

Fig.12 HPLC chromatogram of EC standard

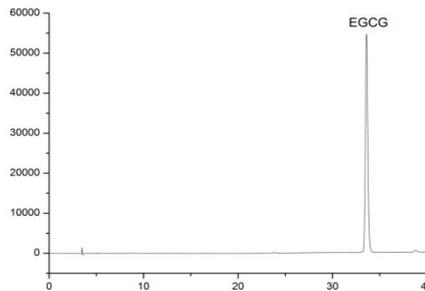


图 9 EGCG 标准品 HPLC 图谱

Fig.13 HPLC chromatogram of EGCG standard

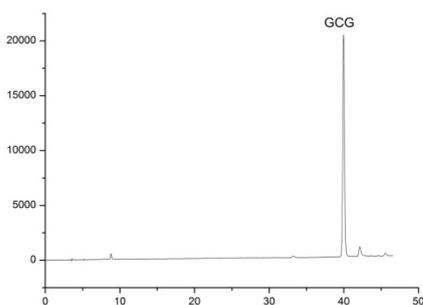


图 10 GCG 标准品 HPLC 图谱

Fig.14 HPLC chromatogram of GCG standard

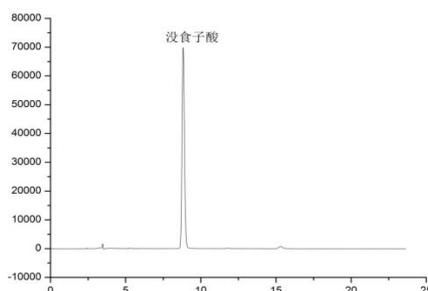


图 11 没食子酸标准品 HPLC 图谱

Fig.15 HPLC chromatogram of gallic acid standard

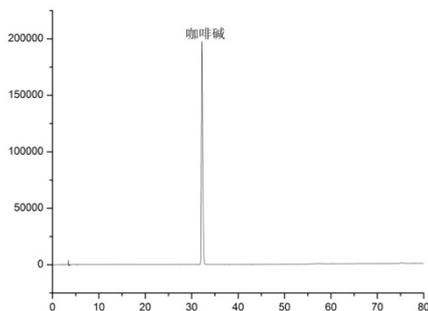
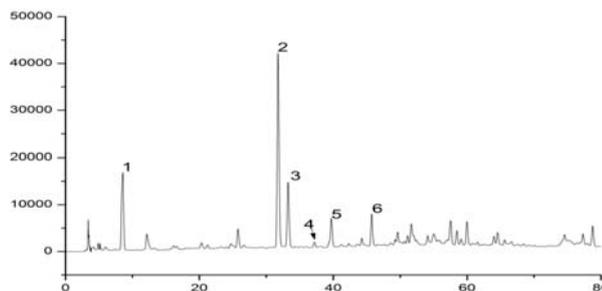


图 12 咖啡碱标准品 HPLC 图谱

Fig.12 HPLC chromatogram of caffeine standard



1 没食子酸, 2 咖啡碱, 3 EGCG, 4 号 EC, 5 号 GCG, 6. 未定

图 13 甲醇-0.5%冰醋酸水溶液 HPLC 图谱

Fig.13 HPLC chromatogram using gradient elution with methanol-0.5% acetic

2.2 方法学考察

2.2.1 稳定性试验

以色谱图上 8min、33min、34min、38min、41min、47min 色谱峰的保留时间和峰面积计算 RSD 值，以 RSD 值为指标来判断方法的稳定性。由表 5 既共有峰的保留时间来计算 RSD 值，其 RSD 值<1%；由表 6 既共有峰的峰面积来计算 RSD 值，其 RSD 值>5%，但由表 6 可以看出，4h 各峰的峰面积出现异常，计算 RSD 值，可得 RSD 值<4%。结果表明，该方法具有较好的稳定性。

表 5 共有峰的保留时间

Table.5 Retention time of the peaks

时间	保留时间					
time	Retention time					
0h	8.803	32.75	34.408	38.62	41.302	47.549
2h	8.952	33.304	34.918	38.944	41.477	47.552

4h	8.965	33.304	34.917	38.938	41.47	47.546
6h	8.953	33.263	34.882	38.906	41.442	47.516
8h	8.94	33.246	34.873	38.888	41.42	47.496
均值	8.9226	33.1734	34.7996	38.8592	41.4222	47.5381
RSD值	0.676	0.6418	0.5651	0.3123	0.1532	0.0464

表 6 共有峰的峰面积

Table.6 Peak area of the peaks

时间	峰面积					
Time	Peak area					
0h	595380	6725435	453212	222776	174402	215613
2h	556272	6234119	415113	213644	177252	210488
4h	478544	5341479	346033	186283	148109	180963
6h	593485	6646252	430101	232232	182054	224967
8h	582496	6538643	428124	226900	179868	219767
均值	561235.4	6297186	414516.6	216367	172337	210359.6
RSD值	7.775	8.0376	8.7753	7.4986	7.1847	7.345

2.2.2 精密度试验

以色谱图上 8min、33min、34min、38min、41min、47min 色谱峰的保留时间和峰面积计算 RSD 值, 以 RSD 值为指标来判断方法的稳定性。由表 7 可得以共有峰的保留时间来计算 RSD 值, RSD 值<2%; 由表 8 可得以共有峰的峰面积来计算 RSD 值, RSD 值<5%。结果表明, 该方法的精密性较好。

表 7 共有峰保留时间和峰面积

Table.7 Retention time of the peaks

峰序号	保留时间RSD%	峰面积RSD%
No.	Retention time RSD%	Peak area RSD%
1	1.0562	2.2698
2	1.5062	2.2896
3	1.8096	4.2923
4	1.7085	2.9649
5	1.7325	1.9993
6	1.6292	3.3187

2.2.3 重现性试验

以高效液相色谱图上 8min、32min、33min、37min、40min、46min 色谱峰的保留时间和峰面积来计算 RSD 值, 以色谱峰的保留时间来计算 RSD 值, RSD 值在 0.267%~0.519%之间, RSD 值均<1%; 以色谱峰的峰面积来计算 RSD 值, RSD 值在 2.414%~3.545%之间, RSD 值<4%。结果表明, 该方法重现性好。

3. 讨论

本实验以茯茶中的黄酮类物质为研究对象, 通过对检测波长、流动相及梯度洗脱条件进行选择, 采用 welchrom C18(250mm*4.6mm, 5 μ m) 色谱柱, 流速 0.8mL/min, 检测波长 295nm, 分析时间 80min; A 相为甲醇, B 相为 0.5%冰醋酸为洗脱溶剂梯度洗脱可以获得较好的分离和检测效果。

茶叶中含有大量的黄酮类物质，黄酮类物质既是茶叶风味形成的主要物质，也是茶叶发挥保健作用的重要功能成分^[13,14]，本研究以茯茶为原料，构建了茯茶黄酮类成分分析的 HPLC 检测条件，为后续跟踪和探讨微生物对黄酮类成分的转化作用，科学阐述黑茶的品质形成机理，进一步揭示和评价黑茶的保健作用提供了依据。对于发花过程中究竟是哪些黄酮类物质发生变化还有待 HPLC-MS 等研究的深入。

参考文献：

- [1] 傅冬和,刘仲华,黄建安,等. 茯砖茶加工过程中主要化学成分的变化[J]. 食品科学. 2008: 29 (2): 65-67.
- [2] 傅冬和,刘仲华,黄建安,等. 茯砖茶中几种单体成分功效的高通量筛选研究[J]. 茶叶科学. 2008. 28 (1): 39-42.
- [3] 王增盛,施兆鹏,刘仲华,等. 论茯砖茶品质风味形成机理[J]. 茶叶科学. 1991(S1):6-9.
- [4] 陈晓青,蒋新宇,等. 中草药成分分离分析技术与方法[M]. 化学工业出版社, 2006(4):57-60.
- [5] 韩国民. 葡萄酒多酚 HPLC 指纹图谱的初步研究[D]. 西北农林科技大学, 2010.
- [6] 赵渤年,于宗渊,丁晓彦. 黄芩质量评价谱-效相关模式的研究[J]. 中草药 2011, 42 (2): 380-383.
- [7] Fang Fang, Jingming Li, QiuHong Pan, et al. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging[J]. Food Chemistry, 101(2007) : 428- 433.
- [8] Merken H M, Beecher G B. Liquid chromatographic method for the separation and quantification flavonoids[J]. chromatogr A, 2000, 897(1-2):177-184.
- [9] Justesen UJ, Knuthsen P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes[J]. Food Chemistry, 2001, 73(3):245-250.
- [10] 谭仁祥等. 植物成分分析[M]. 科学出版社, 2004: 30-47.
- [11] 张淑秋,张海红. 蒙古黄芪中黄酮类有效成分指纹图谱研究[J]. 中国现代药物应用, 2008. 2 (17): 20-22.
- [12] 王微. 黄芩指纹图谱及谱效关系研究[D]. 北京中医药大学, 2009.
- [13] 傅冬和,刘仲华,黄建安,等. 高通量筛选研究茯砖茶降脂减肥功效[J]. 茶叶科学, 2006, 26(3): 209-214.
- [14] 余智勇,黄建安,杨明臻,等. 茯砖茶抗腹泻效果研究[J]. 茶叶科学. 2009. 29 (6): 465-469.