

液相層析法分析茶飲料中兒茶素

吳白玟 劉曉芸 鄭郁琪 曾素香 蘇淑珠 關麗卿

研究檢驗組

摘要

本研究係建立利用高效液相層析儀(high performance liquid chromatograph, HPLC)配合光二極體陣列偵測器(photodiode array detector, PDA), 檢測茶飲料中8種兒茶素之檢驗方法。檢體經稀釋、濾膜過濾後即可以Agilent Eclipse Plus C₁₈ (5 μ m, 內徑4.6 mm $\times$ 25 cm)液相層析管柱, 配合添加0.1%甲酸之去離子水及乙腈溶液作為移動相梯度之條件下, 依流速1 mL/min以高效液相層析儀配合光二極體陣列偵測器於波長280 nm進行檢測, 可將8種兒茶素與咖啡因(caffeine)分離。進行22件茶飲料健康食品之兒茶素標示符合性之評估, 其兒茶素檢測含量範圍介於24-96 mg/mL之間, 除年初抽驗之4件茶飲料檢體外, 其餘陸續抽驗之18件檢體, 其兒茶素檢出量均與標示相符, 顯示茶飲料兒茶素標示不符之情形確有改善。

關鍵詞：茶飲料、兒茶素、咖啡因、高效液相層析

前言

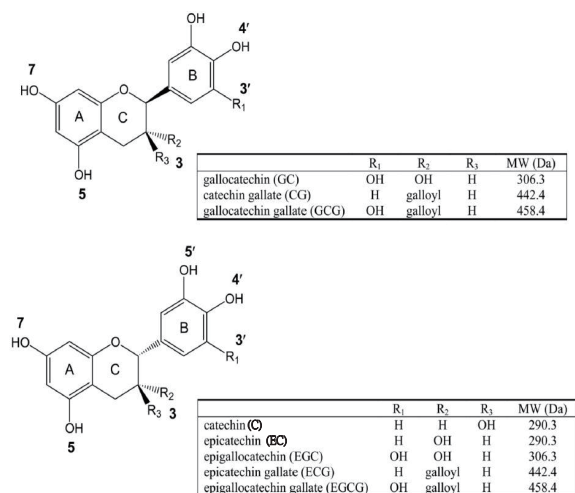
茶是廣受歡迎的飲料之一, 隨著近年來健康食品的日益風行, 茶的保健功能倍受關注。已有許多研究顯示, 茶中兒茶素成分可降低癌症的發生率、預防心血管疾病、增強免疫力等功效⁽¹⁻⁶⁾。自茶樹摘下的葉子稱之茶菁, 依發酵程度不同而有不同種類的茶, 如綠茶屬不發酵茶、烏龍茶屬半發酵茶, 紅茶屬全發酵茶。茶菁中40-60%的可溶性固形物為類黃酮(flavonoids)等多酚類化合物, 具特殊的生理功能, 是茶湯滋味、香氣及色澤的重要來源⁽⁷⁾。茶中的類黃酮化合物又可分成黃烷醇類(flavanols)、黃酮醇類(flavonols)、酚酸(phenolic acids)、縮酚(depsides)和其他多酚類等。黃烷醇類中兒茶素類(catechins), 是茶菁中主要的多酚類化合物, 約占多酚類總量的75-80%。其中epigallocatechin gallate (EGCG)是茶菁中含量最多, 約占總兒茶素的50%, 證實是抗氧

化活性最強的兒茶素, 具降脂、抗癌等生理功能⁽⁷⁻⁹⁾。有關兒茶素之生合成、代謝、製茶過程中之變化、抗氧化性質及分析分法等研究報告相當豐富⁽¹⁰⁻¹³⁾。兒茶素定量分析可以高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器(photodiode array detector, PDA)檢測, 目前常列為兒茶素分析項目分別為epigallocatechin (EGC)、epicatechin (EC)、epigallocatechin gallate (EGCG)和epicatechin gallate (ECG), gallocatechin (GC)、catechin (C)、gallocatechin gallate (GCG)、catechin gallate (CG) 8種成分⁽¹⁴⁻¹⁵⁾(圖一)、(表一)。

隨著近年來健康食品的盛行, 茶的多項保健功效又再度受到重視, 迄今通過之茶飲料健康食品共有7件(表二)。99年1月發生市售具健康食品標誌之茶飲料, 其保健功效成分兒茶素含量, 經檢測與標示不符事件, 引起各界關注健康食品品質問題, 監察院亦對此議題多次來函調查。

由於「健康食品」係驗證業者就其產品特

性，載明保健功效成分及檢驗方法提出查驗登記申請，雖然各家廠商申請保健功效成分檢驗，皆採用液相層析儀分析兒茶素，但申請測定之兒茶素品項及層析條件不一(表二)。為避免因層析條件不恰當衍生結果誤差，且因目前中華民國國家標準(CNS) 15022類號N6384「食品檢驗法-兒茶素之測定」之層析條件⁽¹⁴⁾應用於茶飲料中，兒茶素catechin及咖啡因易產生波峰重疊情形，故本研究進行「茶飲料中兒茶素之檢驗方法探討」，期能建立茶飲料中兒茶素之檢驗方法，以作為健康食品工廠查核及產品保健功效監測之檢驗依據，以利上市後產品之安全品質監測。



圖一、8種兒茶素之化學結構式及其分子量 (Niemeyer and Brodbelt, 2007)

材料與方法

一、檢體來源

於99年1、3、5、7、9及11月間，由衛生局分別抽驗茶飲料12、2、4、1、2及1件，合計22件。

二、器具及裝置

- (一)容量瓶：5 mL、10 mL、50 mL，褐色。
- (二)天平：Precisa XB 4200C，瑞士Precisa (Dietikon)公司產品。
- (三)濾膜：孔徑0.45 μm，Nylon材質。

表一、茶飲料中常見之8種兒茶素成分

中文	英文	簡寫
兒茶素	Catechin	C
表兒茶酚	Epicatechin	EC
沒食子兒茶素	Gallocatechin	GC
表沒食子兒茶酚	Epigallocatechin	EGC
兒茶素沒食子酸酯	Catechin gallate	CG
表兒茶酚沒食子酸	Epicatechin gallate	ECG
沒食子兒茶素沒食子酸酯	Gallocatechin gallate	GCG
表沒食子兒茶酚沒食子酸	Epigallocatechin gallate	EGCG

表二、取得健康食品許可字號之茶飲料

序號	許可證字號	中文品名	申請廠商	兒茶素數
1	60	茶裏王日式無糖綠茶	統一企業股份有限公司	6
2	61=74	御茶園每朝健康綠茶	維他露食品股份有限公司	7
3	89	愛之味兒茶素健康綠茶	愛之味股份有限公司	6
4	145	御茶園每朝健康黑烏龍	維他露食品股份有限公司	7
5	159	茶裏王濃茶阿里山烏龍茶	統一企業股份有限公司	6
6	160	茶裏王濃茶靜岡玉露綠茶	統一企業股份有限公司	6
7	177	御茶園每朝健康烏龍綠	維他露食品股份有限公司	7

(四)拋棄式針筒：1 mL。

(五)高效液相層析儀：溶液輸出系統(L-2130)、自動取樣器(L-2200)、溫度控制系統(L-2300)及光二極體陣列檢出器(photodiode array detector L-2455)，均為日本Hitachi公司產品。

(六)層析管：Agilent Eclipse Plus C₁₈，5 μm，內徑4.6 mm × 25 cm，美國Agilent公司產品。

三、試藥

乙腈採用液相層析級，甲酸及磷酸採用試藥特級，均為德國 Merck公司產品。

四、標準品

Gallocatechin (GC)、epigallocatechin (EGC)、

catechin (C)、epicatechin (EC)、epigallocatechin gallate (EGCG)、gallocatechin gallate (GCG)、catechin gallate (CG)、epicatechin gallate (ECG) 8種兒茶素對照用標準品購自日本Nacalai公司，純度99 %以上。

五、標準溶液之配製

(一) 0.1 % 磷酸溶液之配製

量取85%磷酸1.2 mL，加去離子水使成1000 mL。

(二) 標準原液之配製

取兒茶素對照用標準品各約10 mg，精確稱定，分別置於5 mL之容量瓶中，以0.1%磷酸溶液溶解並定容，作為標準原液，分裝至褐色樣品瓶，避光冷藏。臨用時，分別各取1 mL標準原液，置於10 mL之容量瓶中，以0.1%磷酸溶液，定容至10 mL，再以0.1%磷酸溶液稀釋配製成2.5-100 µg/mL之混合標準溶液。

六、檢液之調製

精確量取檢體加入0.1%磷酸溶液經(2-3倍)適當稀釋，混合均勻後以濾膜過濾，取濾液供作檢液。

七、高效液相層析儀分析條件

(一) 分析條件I (參考CNS 15022類號N6384「食品檢驗法-兒茶素之測定」)⁽¹⁴⁾

1. 移動相溶液之調製

(1) 移動相溶液A (0.1%甲酸溶液)

量取85%磷酸1.2 mL，加去離子水使成1000 mL，混合均勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

(2) 移動相溶液B

乙腈

2. 高效液相層析測定條件

(1) 層析管柱：Agilent Eclipse Plus C₁₈，5 µm，內徑4.6 mm × 25 cm。

(2) 光二極體陣列檢出器：波長280 nm。

(3) 注入量：20 µL。

(4) 移動相流速：1.2 mL/min。

(5) 移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析。

時間(min)	A (%)	B (%)
0→12	16	84
12→15	16→35	84→65
15→18	35	65
18→22	35→16	65→84

(二) 分析條件II

1. 移動相溶液之調製

(1) 移動相溶液A (0.1%甲酸溶液)

量取甲酸與去離子水以0.1：99.9 (v/v)之比例混合均勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

(2) 移動相溶液B (0.1 % 甲酸/乙腈)

量取甲酸與乙腈以0.1：99.9 (v/v)之比例混合均勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

2. 高效液相層析測定條件

(1) 層析管柱：Agilent Eclipse Plus C₁₈，5 µm，內徑4.6 mm × 25 cm。

(2) 光二極體陣列檢出器：波長280 nm。

(3) 注入量：20 µL。

(4) 移動相流速：1.0 mL/min。

(5) 移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

時間(min)	A (%)	B (%)
0→10	90	10
10→24	90→80	10→20
24→30	80→78	20→22
30→35	78→75	22→25
35→35.1	75→90	25→10
35.1→45	90	10

八、標準曲線製作

精確量取2.5、5、12.5、25、50、100

$\mu\text{g/mL}$ 混合標準溶液各20 μL ，分別注入高效液相層析儀進行檢測，由層析圖譜之兒茶素波峰面積與濃度作圖，經回歸分析製作標準曲線，得到回歸方程式。

九、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各20 μL ，分別注入高效液相層析儀中，參照分析條件II進行液相層析，就檢液與標準液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中各兒茶素含量。

$$\text{檢體中各兒茶素含量}(\mu\text{g/mL}) = \frac{C \times V_2}{V_1}$$

C：由標準曲線求得檢液中兒茶素之濃度($\mu\text{g/mL}$)

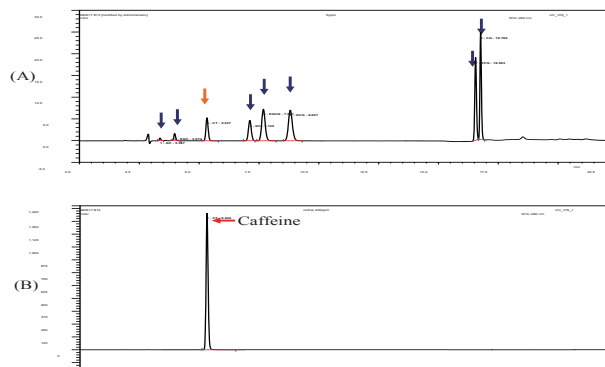
V1：取樣分析檢體之體積 (mL)

V2：檢體最後定容之體積 (mL)

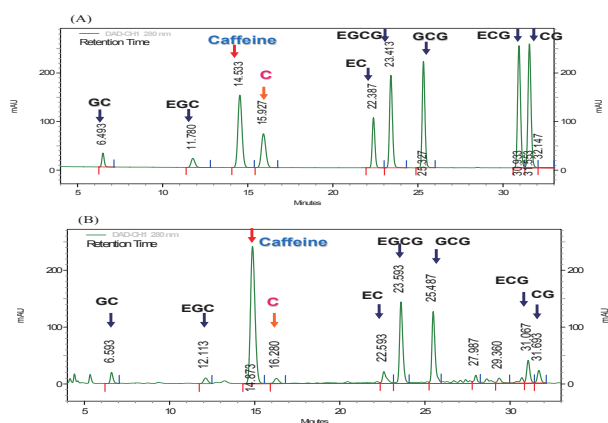
結果與討論

一、HPLC分析條件

參考文獻有關8種兒茶素分析之方法⁽¹⁴⁾係以高效液相層析儀分析，本研究以Agilent Eclipse Plus C₁₈ (5 μm ，內徑4.6 mm $\times$ 25 cm)層析管柱分析，比較0.1%磷酸溶液搭配乙腈之梯度移動相，流速1.2 mL/min，管柱溫度30 $^{\circ}\text{C}$ (參考CNS 15022類號N6384「食品檢驗法-兒茶素之測定」)(分析條件I)；與0.1%甲酸溶液搭配0.1%甲酸/乙腈之梯度移動相，流速1 mL/min，(分析條件II)之解析效果。分析條件I下catechin (C)之波峰(滯留時間約為5.3分鐘)，與咖啡因(cafeine)之波峰(滯留時間約5.24分鐘)重疊(圖二)，茶飲料中皆含有咖啡因且濃度普遍較兒茶素高，因而無法定量。分析條件II則可有效將此兩重疊之波峰分離(圖三A)。因此採用0.1%甲酸溶液搭配0.1%甲酸/乙腈溶液作為移動相溶液，於室溫、流速1 mL/min之分析條件，進行茶飲料中8種兒茶素檢測。



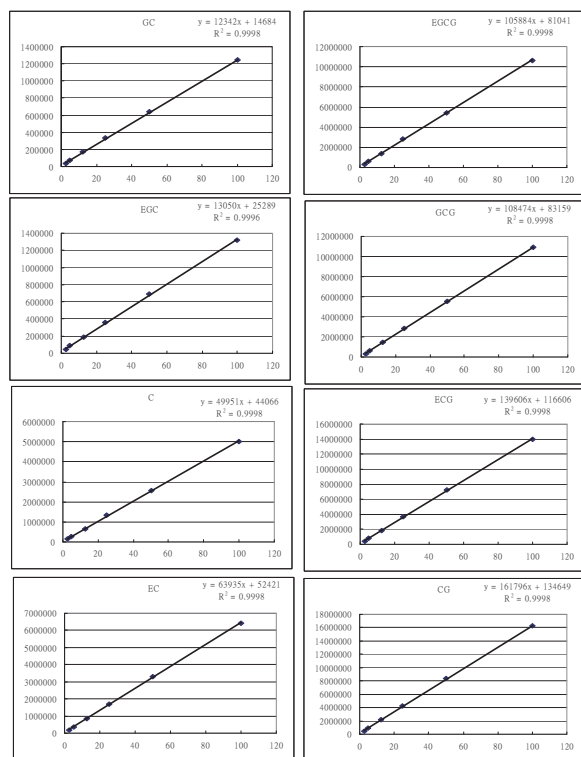
圖二、利用HPLC分析(A) 8種兒茶素混合標準溶液(各50 $\mu\text{g/mL}$)，與(B)咖啡因標準溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)層析圖。(分析條件I：Agilent Eclipse Plus C₁₈，5 μm ，內徑4.6 mm $\times$ 25 cm層析管柱，搭配0.1%磷酸溶液乙腈之梯度移動相，流速1.2 mL/min，管柱溫度30 $^{\circ}\text{C}$ ，偵測波長280 nm)



圖三、利用HPLC分析(A) 8種兒茶素與咖啡因之混合標準溶液，與(B)茶飲料檢體之分析圖譜。(分析條件II：0.1%甲酸溶液搭配0.1%甲酸/乙腈之梯度移動相，流速1 mL/min，偵測波長280 nm)

二、標準曲線之製作

將8種兒茶素標準溶液依「材料與方法 八、標準曲線製作」繪製得標準曲線，其coefficient of determination (R^2)皆達0.9996以上，表示在2.5-100 $\mu\text{g/mL}$ 內之濃度與波峰面積有良好之線性關係(圖四)。由於兒茶素具ortho-dihydroxy catechol結構特性，常作為抗氧化劑，本身易變化，故於分析時之標準品純度及標準溶液之保存，均應特別留意。



圖四、利用HPLC分析8種兒茶素之標準曲線圖(縱座標: response, 橫座標: $\mu\text{g/mL}$)

三、抽驗茶飲料檢體兒茶素標示及含量

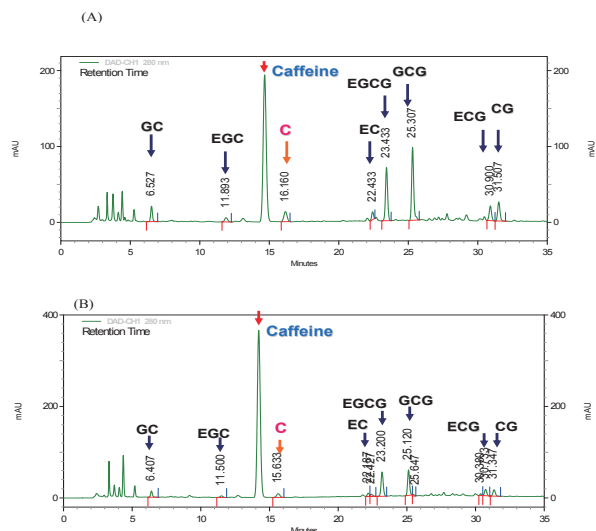
以本研究建立之方法檢測22件茶飲料樣品，可得良好HPLC層析圖(圖五)，22件樣品之兒茶素檢測含量介於24-96 mg/mL 之間。評估樣品之兒茶素檢測值(以該案申請之兒茶素品項合計)與標示值之符合性，檢測結果計有4件之檢測值與標示值之百分比值介於35至77%之間，其餘18件之兒茶素含量檢測結果均與其標示相符。其中檢測值與標示值之百分比值介於90至110%之間者計有7件，介於80至120%之間者有11件。以抽樣時間而論，不符合標示值之抽樣樣品皆係於1月間採樣，其餘月份抽樣之10件檢體兒茶素含量均符合標示(圖六)。

結 論

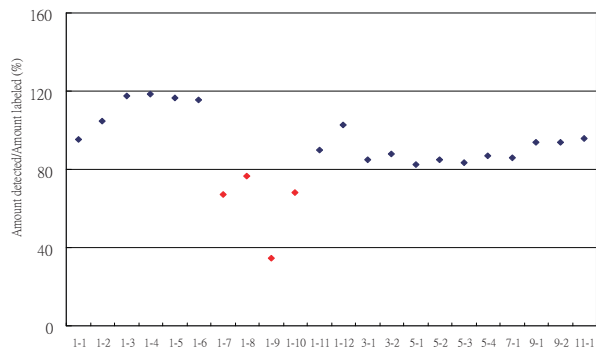
一、本研究以Agilent Eclipse Plus C₁₈ (5 μm ，內

徑4.6 mm $\times$ 25 cm)液相層析管柱，配合添加0.1%甲酸之去離子水及乙腈溶液作為移動相，並在梯度濃度之條件下，可將8種兒茶素galliccatechin (GC)、epigallocatechin (EGC)、catechin (C)、epicatechin (EC)、epigallocatechin gallate (EGCG)、galliccatechin gallate (GCG)、catechin gallate (CG)、epicatechin gallate (ECG)與咖啡因(cafeine)分離，且得到良好的分離效果。

二、99年度於1月份抽驗之茶飲料檢體，12件中有4件與標示不符；後續抽驗之10件檢體兒茶素含量則與其標示含量相符，顯示茶飲料兒



圖五、以分析條件II分析經稀釋3倍之(A) A廠牌茶飲料，(B) B廠牌茶飲料中之兒茶素層析圖



圖六、22件茶飲料檢體兒茶素檢測值與標示值之百分比值

茶素含量與標示不符之情形已有改善。

參考文獻

1. Jian, L., Xie, L. P., Lee, A. H. and Binns, C. W. 2004. Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *Int. J. Cancer* 108(1): 130-135.
2. Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C. C., Hankin, J. and Pike, M. C. 2003. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *Int. J. Cancer* 106(4): 574-579.
3. Zhang, M., Binns, C. W. and Lee, A. H. 2002. Tea consumption and ovarian cancer risk: a case control study in China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11(8): 713-718.
4. Setiawan, V. W., Zhang, Z. F., Yu, G. P., Lu, Q. Y., Li, Y. L., Lu, M. L., Wang, M. R., Guo, C. H., Yu, S. Z., Kurtz, R. C. and Hsieh, C. C. 2001. Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer. *Int. J. Cancer* 92(4): 600-604.
5. Babu, P. V. and Liu, D. 2008. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr. Med. Chem.* 15(18): 1840-1850.
6. Cabrera, C., Artacho, R. and Gimenez, R. 2006. Beneficial effects of green tea - a review. *J. Am. Coll. Nutr.* 25(2): 79-99.
7. 吳亮宜、孫璐西。2004。茶與健康。科學發展月刊。行政院國家科學委員會。384: 18-23。
8. Balentine, D. A., Wiseman, S. A. and Bouwens, L. C. 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37(8): 693-704.
9. Crespy, V. and Williamson G. 2004. A review of the health effects of green tea catechins in vivo animal models. *J. Nutr.* 134: 3431S-3440S.
10. Beecher, G. R., Warden, B. A. and Merken, H. 1999. Analysis of tea polyphenols. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220(4): 267-270.
11. Tanaka, T. 2008. Chemical studies on plant polyphenols and formation of black tea polyphenols. *Yakugaku Zasshi.* 128(8): 1119-1131.
12. Yagi, K., Goto, K. and Nanjo, F., 2009. Identification of a major polyphenol and polyphenolic composition in leaves of *Camellia irrawadiensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 57(11): 1284-1288.
13. Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R. and Nishigak, I. 2010. Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese Medicine* 5: 13.
14. 經濟部標準檢驗局。2006。食品檢驗法－兒茶素之測定。中華民國國家標準(CNS) 15022 類號N6384。
15. Niemeyer, E. D. and Brodbelt, S. J. 2007. Isomeric differentiation of green tea catechins using gas-phase hydrogen/deuterium exchange reactions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18(10): 1749-1759.

Determination of Catechins in Tea Drinks by High Performance Liquid Chromatography

PAI-WEN WU, HSIAO-YUN LIU, YU-CHI CHENG, SU-HSIANG TSENG,
SHU-CHU SU AND LIH-CHING CHIUEH

Division of Research and Analysis

ABSTRACT

A method was developed for the determination catechins in tea drinks by high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detector (PAD). Samples were diluted with 0.1% phosphoric acid solution appropriately, eluted in stepwise with 0.1% formic acid (prepared with deionized water) and acetonitrile at flow rate 1 mL/min through an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (4.6 mm i.d. × 25 cm, 5 μm) and detected at 280 nm wavelength. Eight kinds of catechins and caffeine in tea drinks were well separated. The amounts of catechins detected from 22 samples were in the range of 24-96 mg/mL. Except for 4 samples, the amounts of catechins detected in the rest 18 samples were all coincided with the labeling regulation.

Key words: tea drink, catechin, caffeine, HPLC