

实验技术与方法

食品添加剂茶黄素高效液相色谱测定方法建立及优化

田洪芸,吕邓义,刘毅,吴裕健,王爱竹,胡明燕,王骏,胡梅

(山东省食品药品检验研究院,山东省特殊医学用途配方食品质量控制工程技术研究中心,国家市场监管重点实验室(肉及肉制品监管技术),产业技术基础公共服务平台,山东 济南 250101)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定食品添加剂茶黄素纯度的方法。方法 试样用乙醇-水(2:8, V/V)溶液提取后,使用 C_{18} 反相色谱柱分离,以乙腈、0.1% 磷酸溶液为流动相,流速为 1 mL/min,柱温为 35 °C,使用紫外检测器于 278 nm 下进行检测。结果 茶黄素混合标准工作溶液在 20~500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好,相关系数 $r^2 > 0.99$,茶黄素 4 种组分的检出限均为 0.2 $\mu\text{g/mL}$,定量限均为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。对试样进行低、中、高 3 个浓度的加标回收试验,加标回收率为 97.9%~101.3%,相对标准偏差为 0.3%~1.6%。结论 该方法精密度高、准确性好、操作简便,可满足食品添加剂茶黄素纯度测定的要求。

关键词:茶黄素; 高效液相色谱法; 最大吸收波长; 准确度; 精密度

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2025)03-0240-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.03.005

Development and optimization of a high-performance liquid chromatography method for the determination of theaflavin purity

TIAN Hongyun, LYU Dengyi, LIU Yi, WU Yujian, WANG Aizhu, HU Mingyan, WANG Jun, HU Mei
(Shandong Institute of Food and Drug Control, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Quality Control of Food for Special Medical Purposes, Key Laboratory of Supervising Technology for Meat and Meat Products for State Market Regulation, Industrial Technology Foundation Public Service Platform, Shandong Jinan 250101, China)

Abstract: Objectives A high-performance liquid chromatography method was developed to determine the purity of theaflavins, a food additive. **Methods** The samples were dissolved in ethanol-water (2:8, V/V) solution and separated by C_{18} reversed-phase chromatography with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid as mobile phase. The flow rate was 1 mL/min and the column temperature was 35 °C, the detection was performed at 278 nm using a UV detector. **Results** The linear relationship of theaflavins was good in the range of 20-500 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficient $r^2 > 0.99$, the limit of detection of the four components of tea polyphenols was 0.2 $\mu\text{g/mL}$, and the limit of quantification was 0.5 $\mu\text{g/mL}$. The recovery rate of the samples was 97.9%-101.3%, and the relative standard deviation was 0.3%-1.6%. **Conclusion** The method has high precision, good stability, simple operation, and can meet the requirements for the purity determination of food additive theaflavin.

Key words: Theaflavin; high-performance liquid chromatography; maximum absorption wavelength; accuracy; precision

茶黄素(Theaflavin, TF)是茶叶中多酚类物质经氧化缩合而成的一类化合物^[1],茶黄素中含量较高的化合物主要为茶黄素-3,3'-双没食子酸酯、茶黄素-3-没食子酸酯、茶黄素-3'-没食子酸酯^[2-5]。食品添加剂茶黄素作为抗氧化剂可在脂肪、油炸面制品、熟肉制品等食品中使用^[6-7]。茶黄素是我国特有的食品添加剂品种,2016年原国家卫生和计划生育

委员会发布《关于海藻酸钙等食品添加剂新品种的公告(2016年第8号)》批准其为食品添加剂新品种,2020年立项制定补充标准号《食品安全国家标准 食品添加剂 茶黄素》。

目前,关于食品添加剂茶黄素纯度的测定方法仅涉及分光光度法,相关测定文献均为茶叶基质中茶黄素含量的测定,主要有氧化铝比色法、柱层析

收稿日期:2024-08-06

基金项目:国家卫生健康管理委员会食品安全国家标准制定项目(spaq-2020-030);山东省市场监督管理局科技创新项目(2022298)

作者简介:田洪芸 女 正高级工程师 研究方向为食品安全检测 E-mail:sdsythy@126.com

通信作者:胡梅 女 研究员 研究方向为食品安全检测 E-mail:sdzjyhm@163.com

法、分光光法、液相色谱法、毛细管电泳法等^[8-11]。上述文献方法存在操作步骤烦琐、试样易氧化损失、结果精密度差等问题。此外,由于茶黄素属于多羟基类化合物,不同材质滤膜对其吸附力不同也检测值存在一定差异^[12-14]。本文针对食品添加剂茶黄素纯度测定存在的问题,对试样前处理、测定条件及方法学指标进行研究,建立了使用液相色谱法进行纯度测定的方法。经验证该方法灵敏度高、准确性好,可满足食品添加剂茶黄素纯度的准确测定的要求。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪配有紫外检测器(沃特世公司,美国)、分析天平(梅特勒-托利多,瑞士)、紫外分光光度计(日立,日本)。

茶黄素标准品、茶黄素-3-没食子酸酯(TF-3-G)标准品、茶黄素-3'-没食子酸酯(TF-3'-G)标准品、茶黄素-3,3'-双没食子酸酯(TFDG)标准品(纯度≥98%,源叶生物,上海)、无水乙醇(国药化学试剂,上海)、磷酸(国药化学试剂,上海)、乙二胺四乙酸二钠(国药化学试剂,上海)、L-抗坏血酸(分析纯,国药化学试剂,上海)、乙腈(色谱纯,默克,德国)、聚四氟乙烯滤膜(安谱,上海)、尼龙滤膜(安谱,上海)、混合材质微孔滤膜(安谱,上海)

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

准确称取试样 0.1 g,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙醇-水(2:8,V/V)溶解后定容至刻度,试样经 0.45 μm 聚四氟乙烯滤膜过滤至棕色进样瓶中备用。

1.2.2 溶液配制

L-抗坏血酸溶液(10 mg/mL):称取 1.00 g 的 L-抗坏血酸于 100 mL 棕色容量瓶中,用适量水溶解并混匀。乙二胺四乙酸二钠溶液(10 mg/mL):称取 1.00 g 乙二胺四乙酸二钠,用适量水溶解至 100 mL 容量瓶中。稳定溶液:分别移取 50 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液、50 mL 抗坏血酸溶液和 175 mL 乙腈至 1 000 mL 棕色容量瓶中,用水稀释并混匀。磷酸溶液(0.1%):移取 1 mL 磷酸至烧杯中,用适量水稀释至 1 000 mL。标准储备溶液(2.0 mg/mL):分别准确称取茶黄素、TF-3-G、TF-3'G、茶黄素-3,3'-双没食子酸酯各 20.0 mg,分别置于 10 mL 棕色容量瓶中,加入适量稳定溶液溶解并定容至刻度,混匀。混合标准系列工作溶液:分别移取 4 种标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用稳定溶液定容至刻度,配成浓度分别为 20、50、100、200、300、400、500 μg/mL 的混

合标准工作溶液。

1.2.3 仪器条件

色谱柱:C₁₈反相色谱柱(150 mm×4.6 mm,3.5 μm,填料为键合十八烷基的硅胶)或性能相当者。流动相:A 相为乙腈,B 相为磷酸溶液,梯度洗脱程序见表 1。流速:1 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:10 μL;波长:278 nm。

表1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase gradient elution procedure

时间/min	乙腈/%	磷酸溶液/%
0.0	17.5	82.5
0.5	17.5	82.5
15.0	25.0	75.0
24.0	25.0	75.0
24.5	50.0	50.0
29.5	50.0	50.0
30.0	17.5	82.5
35.0	17.5	82.5

1.2.4 样品测定

将浓度为 20、50、100、200、300、400、500 μg/mL 的混合标准系列工作液注入液相色谱仪,以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算线性方程及相关系数。

在参考色谱条件下,分别将试样溶液注入液相色谱仪中进行测定。以混合标准系列溶液的质量浓度为横坐标、以峰面积为纵坐标,计算标准曲线并计算待测液中各种化合物的质量浓度。

2 结果与分析

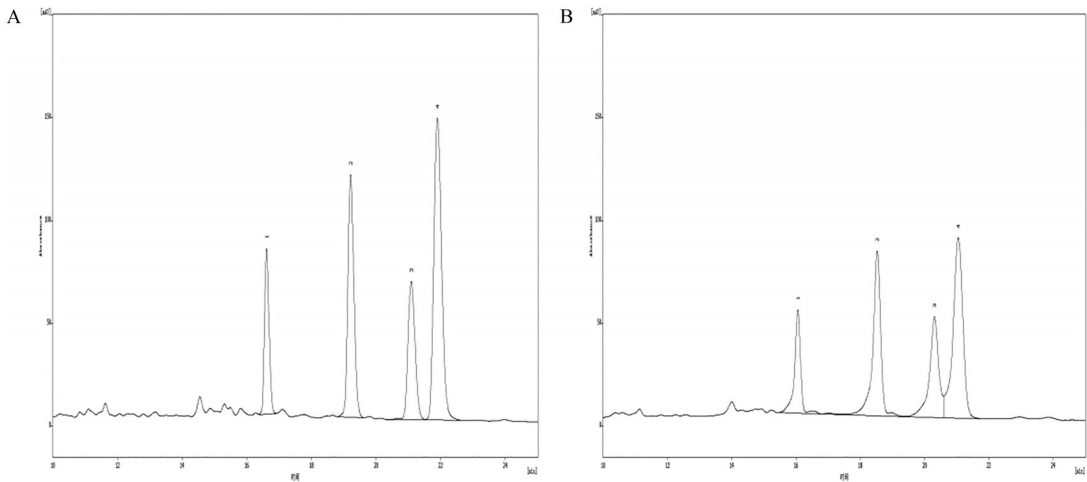
2.1 样品前处理条件优化

2.1.1 溶剂的优化

茶黄素在水中的溶解度较差,试样呈浑浊状无法进行上机测试;溶剂中添加乙醇能够提升茶黄素的溶解度。试验比对了采用乙醇-水(1:9,V/V)、乙醇-水(2:8,V/V)作为溶剂对检测的影响,结果显示采用乙醇-水(1:9,V/V)溶解后的试液目标峰出现了前沿,对分离度有明显影响;而采用乙醇-水(2:8,V/V)处理后的分离度较好,可满足检测需求(图 1)。

2.1.2 滤膜种类的优化

茶黄素的分子结构中含有羧基,方法制定过程中发现不同材质的滤膜对其产生的吸附力均不同,尤其是尼龙材质的滤膜吸附力最强。试验选择了 10 种不同材质及类型的滤膜进行研究。试验过程中用浓度为 50 μg/mL 茶黄素混合标准溶液经不同材质滤膜过滤后进行上机测定,测定结果见表 2。因茶黄素化学结构中的羧基会与尼龙进行阴离子交换吸附导致测定结果偏低^[15],结果显示尼龙滤膜对 4 种化合物均产生了明显的吸附作用。聚醚砜



注:A:乙醇-水(1:9,V/V);B:乙醇-水(2:8,V/V)

图 1 采用不同乙醇-水比例提取的液相色谱图

Figure 1 Liquid chromatogram obtained by different extraction with ethanol water

材质滤膜,0.22 μm 型号的吸附力比 0.45 μm 型号的相对高些,尤其是对 TF DG 的吸附力相对较大;混合纤维素滤膜(0.22、0.45 μm)处理后的检测结果

差别不大;聚四氟乙烯材质滤膜(0.22、0.45 μm)基本上未产生吸附作用。故最终使用聚四氟乙烯(0.22 μm)的滤膜进行试验。

表 2 不同材质滤膜处理结果(μg/mL)

Table 2 Results of membrane treatment with different materials (μg/mL)

序号	品牌	材质	TF		TF-3-G		TF-3'-G		TFDG	
			平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2
1	A	尼龙(0.22 μm)	0	0	0	0	0	0	0	0
2	A	尼龙(0.45 μm)	0	0	0	0	0	0	0	0
3	B	尼龙(0.22 μm)	15.7	21.4	11.5	18.6	10.3	17.2	6.01	11.7
4	B	尼龙(0.45 μm)	26.3	25.9	22.1	22.4	19.6	22.1	13.8	19.4
5	A	聚醚砜(0.22 μm)	49.5	49.1	50.2	49.5	49.6	49.8	41.3	36.4
6	A	聚醚砜(0.45 μm)	50.3	50.1	50.6	50.3	50.5	50.1	47.9	46.1
7	B	混合纤维素(0.22 μm)	49.8	49.5	49.5	50.2	50.3	49.5	50.2	50.6
8	B	混合纤维素(0.45 μm)	49.2	48.6	50.4	50.1	49.2	49.3	49.8	50.4
9	C	聚四氟乙烯(0.22 μm)	49.2	49.7	49.6	50.1	50.2	49.7	50.1	50.3
10	C	聚四氟乙烯(0.45 μm)	49.3	49.9	49.8	50.3	49.9	50.0	50.2	50.0

注:平行 1、平行 2 为样品进行平行测定的 2 个结果

2.2 检测条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

对 4 种物质的混合标准溶液分离情况开展测试,结果表明在乙腈-磷酸溶液的梯度洗脱程序下,4 种目标物在 C₁₈ 色谱柱中具有理想的分离效果,其分离度和峰形能够满足方法要求(图 2)。

2.2.2 最佳检测波长的确定

用紫外检测器于 190~400 nm 波长范围内对茶黄素混合标准溶液(100 μg/mL)进行全波长扫描,结果显示 4 种目标化合物的在 210、278 nm 波段处均有大的吸收峰,考虑到在 210 nm 处基质干扰物

吸收较强,最终确定的检测波长为 278 nm(图 3)。

2.2.3 标准曲线、检出限和定量限

在确定的色谱条件下,对浓度范围在 20~500 μg/mL 的混合标准工作溶液进行测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算 4 种化合物的标准曲线、检出限和定量限。测定结果显示(表 3),标准曲线相关系数 $R^2>0.99$,线性关系良好。对最低浓度的标准溶液进样,按照 GB/T 5009.1 附录 A 的规定对方法的检出限、定量限进行计算,茶黄素 4 种组分的检出限均为 0.2 μg/mL、定量限均为 0.5 μg/mL。

表 3 茶黄素线性范围、检出限、定量限

Table 3 Linear range, detection limit, quantitative limit of theaflavins

标物名称	线性范围/(μg/mL)	回归方程	相关系数 R^2	检出限/(μg/mL)	定量限/(μg/mL)
TF	20~500	$Y=0.176\ 7X-0.049\ 8$	0.999	0.2	0.5
TF-3-G	20~500	$Y=0.186\ 7X-0.044\ 0$	0.999	0.2	0.5
TF-3'-G	20~500	$Y=0.198\ 2X-0.011\ 7$	0.999	0.2	0.5
TFDG	20~500	$Y=0.201\ 0X-0.070\ 6$	0.999	0.2	0.5

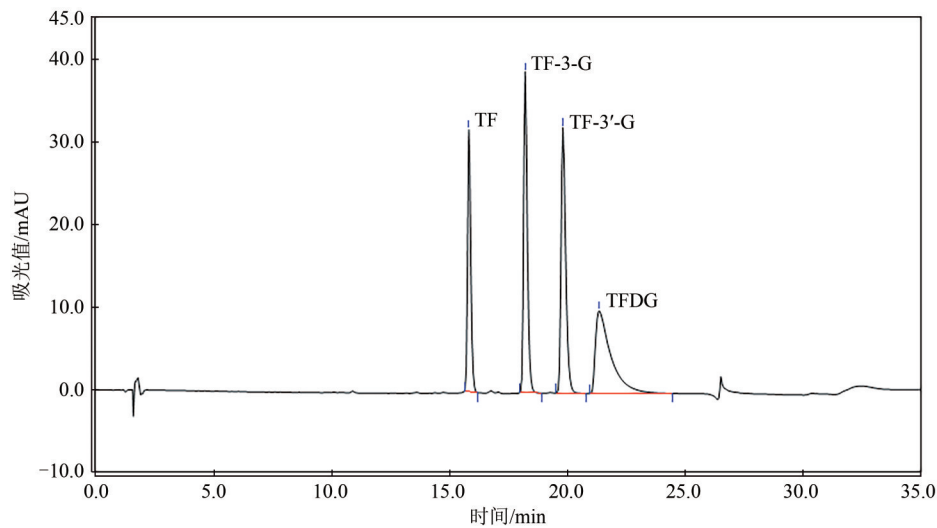


图2 茶黄素标准溶液(20 µg/mL)液相色谱图

Figure 2 Chromatogram of theaflavin standard solution (20 µg/mL)

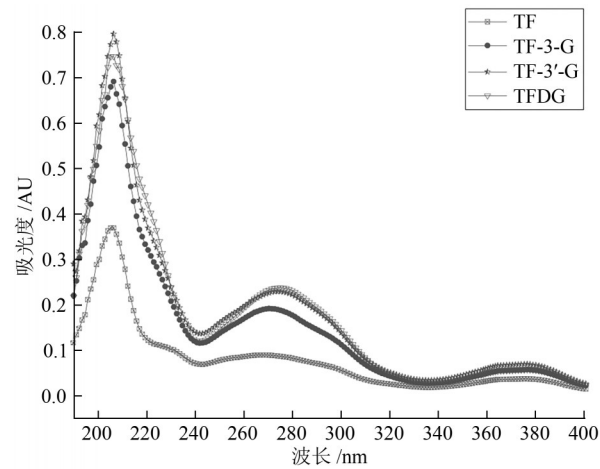


图3 茶黄素混合标准溶液的光谱图

Figure 3 Spectral diagram of the mixed standard solution of theaflavins

2.3 精密度、准确度试验

选择 0.1%、1%、5% 3 个加标测试浓度,开展 6 平行加标测试,以加标回收率考察准确度,以平行样品检测结果的相对标准偏差(Relative standard deviation,RSD)考察精密度,以对检测方法的精密度

和准确度开展验证。结果如表 4 所示。测试结果显示,各目标物的平均加标回收率为 97.9%~101.3%,RSD 为 0.3%~1.6%,表明本方法具有理想的准确性和重复性,满足检测需求。

2.4 样品测定

收集国内 5 家生产企业的茶黄素产品,采用本试验建立的方法进行茶黄素纯度的测定,结果见表 5。由样品测定结果可知,5 家企业样品茶黄素含量测定结果分布在 23.37%~28.35%。测定的 4 种化合物中 TFDG 含量最高,其他依次是 TF-3-G、TF、TF-3'-G 含量最低。

3 小结

本试验建立了使用高效液相色谱仪紫外检测器进行茶黄素纯度测定的方法。茶黄素混合标准工作溶液在 20~500 µg/mL 浓度范围内线性关系良好, $R^2>0.99$ 。茶黄素 4 种组分对应的标准溶液 6 平行测定结果显示。加标回收试验结果显示加标回收率为 97.9%~101.3%,相对标准偏差为 0.3%~1.6%。

表4 样品加标回收结果

Table 4 Results of recovery

样品编号	目标物	样品中含量/(µg/mL)	加标水平 0.1%(n=6)		加标水平 1%(n=6)		加标水平 5%(n=6)	
			平均回收率/%	RSD	平均回收率/%	RSD	平均回收率/%	RSD
1	TF	4.69	98.7	1.1	99.4	0.9	99.2	0.5
	TF-3-G	6.76	101.3	0.8	99.1	1.1	99.6	0.9
	TF-3'-G	4.22	98.9	1.4	101.2	0.7	100.3	0.5
	TFDG	9.83	97.9	1.4	100.1	0.7	100.2	0.6
2	TF	4.52	98.5	0.9	99.5	0.8	100.5	0.4
	TF-3-G	9.71	99.6	0.7	99.6	0.5	99.4	0.4
	TF-3'-G	2.41	98.9	1.2	100.5	0.7	100.2	0.3
	TFDG	11.2	99.3	1.6	98.8	1.0	99.5	0.5
3	TF	5.29	100.8	1.2	99.4	1.0	100.2	0.6
	TF-3-G	7.16	100.2	1.1	100.3	0.7	100.6	0.4
	TF-3'-G	4.91	98.3	1.5	100.1	0.8	100.5	0.7
	TFDG	11.0	99.4	0.9	101.1	0.5	99.7	0.5

表5 不同企业样品纯度测定结果/($\mu\text{g/mL}$)
Table 5 Results of purity determination of samples from
different enterprises/($\mu\text{g/mL}$)

样品编号	TF含量	TF-3-G 含量	TF-3'-G 含量	TFDG 含量	茶黄素 含量
企业1	4.69	6.76	4.22	9.83	25.50
企业2	4.52	9.71	2.41	11.20	27.84
企业3	5.29	7.16	4.91	10.99	28.35
企业4	4.01	6.46	3.86	9.04	23.37
企业5	4.21	8.28	2.06	9.83	24.37

5家企业食品添加剂茶黄素纯度测定结果分布在23.37%~28.35%之间。

参考文献

- [1] 叶美君, 周卫龙, 徐建峰, 等. 不同茶类中茶黄素类含量的测定与分布探讨[J]. 农产品加工, 2015(4): 49-53.
YE M J, ZHOU W L, XU J F, et al. Determination and distribution of theaflavins in different teas [J]. Processing of Agricultural Products, 2015(4): 49-53.
- [2] HE H F. Research progress on theaflavins: efficacy, formation, and preparation[J]. Food & Nutrition Research, 2017, 61(1): 134-521.
- [3] 郑艳超, 於天, 郑志刚, 等. 茶黄素生物活性与开发应用的研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(23): 6095-6101.
ZHENG Y C, YU T, ZHENG Z G, et al. Adrian Cheng, et al. Research progress of theaflavins biological activity and its development and application [J]. Chinese Herbal Medicine, 2020, 51(23): 6095-6101.
- [4] FU G L, WANG H, CAI Y L, et al. Theaflavin alleviates inflammatory response and brain injury induced by cerebral hemorrhage via inhibiting the nuclear transcription factor kappa β -related pathway in rats [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2018, 12:1609-1619.
- [5] WU Y T, JIN F J, WANG Y L, et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of theaflavin-3,3'-digallate on lipopolysaccharide-induced inflammation [J]. European Journal of Pharmacology, 2017, 794: 52-60.
- [6] SAITO A, NAKAZATO R, SUHARA Y, et al. The impact of theaflavins on systemic-and microcirculation alterations: the murine and randomized feasibility trials [J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2016, 32:107-114.
- [7] 刘泽崧, 韩驰. 茶色素和茶多酚防癌作用的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(4): 312-314.
LIU Z Q, HAN C. Studies on the anti-cancer effects of tea pigments and tea polyphenols [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2005, 17(4): 312-314.
- [8] 国家卫生和计划生育委员会. 国家卫生计生委发布关于海藻酸钙等食品添加剂新品种的公告(2016年第8号)[EB/OL]. (2016-07-01) [2022-06-10]. <http://www.nhfp.gov.cn/sps/s7890/201606/125c3d8fa2034de3b7d52a82608709d2.shtml>.
National Health and Family Planning Commission. The National Health and Family Planning Commission (NHFPC) issued a notice on new varieties of food additives such as calcium alginate (no. 8 of 2016) [EB/OL]. (2016-07-01) [2022-06-10]. <http://www.nhfp.gov.cn/sps/s7890/201606/125c3d8fa2034de3b7d52a82608709d2.shtml>.
- [9] 国家卫生健康委员会. 2020年度食品安全国家标准立项计划[EB/OL]. (2020-09-30) [2020-10-13]. <https://sppt.cfssa.net.cn:8086/db>.
National Health Commission. 2020 National Food Safety Standard program [EB/OL]. (2020-09-30) [2020-10-13]. <https://sppt.cfssa.net.cn:8086/db>.
- [10] 王坤波, 刘仲华, 黄建安, 等. 高效液相色谱法测定红茶中的茶黄素[J]. 色谱, 2004, 22(2): 151-153.
WANG K B, LIU Z H, HUANG J A, et al. Determination of theaflavins in black tea by high-performance liquid chromatography [J]. Chromatography, 2004, 22(2): 151-153.
- [11] 刘洪林, 童华荣. 高效液相色谱法同时测定工夫红茶10种内含物成分[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 97-101.
LIU H L, TONG H R. The high-performance liquid chromatography contents of 10 kinds of gongfu black tea were also determined [J]. Food Science, 2016, 37(8): 97-101.
- [12] 刘美霞, 王丹慧. 奶茶粉中茶多酚质量分数的检测方法[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(7): 50-53.
LIU M X, WANG D H. Method for determination of tea polyphenols in milk tea powder [J]. China Dairy Industry, 2010, 38(7): 50-53.
- [13] 夏文娟, 张丽霞. 毛细管电泳分析茶黄素的方法研究[J]. 茶叶科学, 2018(4): 13-15.
XIA W J, ZHANG L X. Study on the capillary electrophoresis analysis of theaflavins [J]. Science of Tea, 2018(4): 13-15.
- [14] 张海红, 田洪芸, 毕婷婷. 分光光度法检测食品添加剂茶黄素含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(4): 761-766.
ZHANG H H, TIAN H Y, BI T T. Determination of theaflavin in food additive by spectrophotometer [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(4): 761-766.
- [15] 刘雪娜, 吴雪娇. 高效液相色谱法测定速溶滇红茶制品中茶黄素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021(9): 142-146.
LIU X N, WU X J. Determination of theaflavin in instant Yunnan black tea products by high-performance liquid chromatography method [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021(9): 142-146.