

中华人民共和国国家标准

GB/T 8313—2008
代替 GB/T 8313—2002

茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的 检测方法

Determination of total polyphenols and catechins content in tea

(ISO 14502-1/2:2005, Determination of substances characteristic of green and black tea—Part 1: Content of total polyphenols in tea—

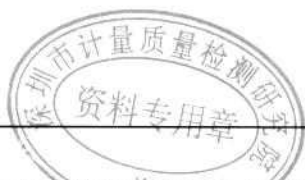
Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent/

Part 2: Content of catechins in green tea—Method using high-performance liquid chromatography, MOD)

2008-05-04 发布

2008-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布



前 言

本标准修改采用 ISO 14502-1:2005《福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂比色法测定茶叶中茶多酚总量》和 ISO 14502-2:2005《高效液相色谱法测定绿茶中儿茶素》。本标准与 ISO 14502-1:2005 和 ISO 14502-2:2005 的技术内容相同,主要差异为:供试液制备时用玻璃棒充分搅拌均匀湿润代替用混匀器搅拌均匀湿润,增加实用性;标准结构上稍有调整,即将两项标准合并为一项,将 ISO 14502-2:2005 作为本标准的方法一,将 ISO 14502-1:2005 作为本标准的方法二。

本标准是对 GB/T 8313—2002《茶 茶多酚测定》的修订。本标准与 GB/T 8313—2002 的主要差异为:以 70% 甲醇提取茶叶中的茶多酚、Folin-Ciocalteu Phenol 试剂显色、没食子酸(GA)作标准工作曲线定量茶多酚总量。

本标准由中华全国供销合作总社提出并归口。

本标准起草单位:中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院。

本标准主要起草人:周卫龙、徐建峰、许凌。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 8313—1987、GB/T 8313—2002。

MACY 美析仪器
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686

茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的 检测方法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱法(HPLC)测定茶叶中儿茶素类含量和用分光光度法测定茶叶中茶多酚含量的方法。

本标准适用于茶及茶制品中儿茶素类及茶多酚含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 8302 茶 取样

GB/T 8303 茶 磨碎试样的制备及其干物质含量测定

方法一 茶叶中儿茶素类的检测——HPLC 法

3 原理

茶叶磨碎试样中的儿茶素类用70%的甲醇溶液在70℃水浴上提取,儿茶素类的测定用C₁₈柱、检测波长278 nm、梯度洗脱、HPLC分析,用儿茶素类标准物质外标法直接定量,也可用儿茶素类与咖啡碱的相对校正因子RRF_{Std}(ISO国际环试结果)(见7.2)来定量。

4 仪器

- 4.1 分析天平:感量0.000 1 g。
- 4.2 水浴:70℃±1℃。
- 4.3 离心机:转速3 500 r/min。
- 4.4 混匀器。
- 4.5 高效液相色谱仪(HPLC):包含梯度洗脱及检测器(检测波长278 nm)。
- 4.6 数据处理系统。
- 4.7 液相色谱柱:C₁₈(粒径5 μm,250 mm×4.6 mm)。

5 试剂

本标准所用水均为重蒸馏水,除特殊规定外,所用试剂为分析纯。

- 5.1 乙腈:色谱纯。
- 5.2 甲醇。
- 5.3 乙酸。
- 5.4 甲醇水溶液(体积比):7+3。
- 5.5 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液:10 mg/mL(现配)。
- 5.6 抗坏血酸溶液:10 mg/mL(现配)。

5.7 稳定溶液:分别将 25 mL EDTA 溶液(5.5)、25 mL 抗坏血酸溶液(5.6)、50 mL 乙腈(5.1)加入 500 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。

5.8 液相色谱流动相

5.8.1 流动相 A:分别将 90 mL 乙腈(5.1)、20 mL 乙酸(5.3)、2 mL EDTA (5.5)加入 1 000 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。溶液需过 0.45 μm 膜。

5.8.2 流动相 B:分别将 800 mL 乙腈(5.1)、20 mL 乙酸(5.3)、2 mL EDTA (5.5)加入 1 000 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。溶液需过 0.45 μm 膜。

5.9 标准储备溶液

5.9.1 咖啡碱储备溶液:2.00 mg/mL。

5.9.2 没食子酸(GA)储备溶液:0.100 mg/mL。

5.9.3 儿茶素类储备溶液:+C 1.00 mg/mL,+EC 1.00 mg/mL,+EGC 2.00 mg/mL,+EGCG 2.00 mg/mL,+ECG 2.00 mg/mL。

5.10 标准工作溶液:用稳定溶液(5.7)配制。

标准工作溶液的浓度:没食子酸 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、咖啡碱 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+C 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+EC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+EGC 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+EGCG 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、+ECG 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

6 操作方法

6.1 取样

按 GB/T 8302 的规定。

6.2 试样制备

按 GB/T 8303 的规定。

6.3 测定步骤

6.3.1 干物质含量测定

按 GB/T 8303 的规定。

6.3.2 供试液的制备

6.3.2.1 母液:称取 0.2 g(精确到 0.000 1 g)均匀磨碎的试样(6.2)于 10 mL 离心管中,加入在 70 $^{\circ}\text{C}$ 中预热过的 70%甲醇溶液(5.4)5 mL,用玻璃棒充分搅拌均匀湿润,立即移入 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,浸提 10 min (隔 5 min 搅拌一次),浸提后冷却至室温,转入离心机在 3 500 r/min 转速下离心 10 min,将上清液转移至 10 mL 容量瓶。残渣再用 5 mL 的 70%甲醇溶液提取一次,重复以上操作。合并提取液定容至 10 mL,摇匀,过 0.45 μm 膜,待用(该提取液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下可至多保存 24 h)。

6.3.2.2 测试液:用移液管移取母液(6.3.2.1)2 mL 至 10 mL 容量瓶中,用稳定溶液(5.7)定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 膜,待测。

6.3.3 色谱条件

流动相流速:1 mL/min。

柱温:35 $^{\circ}\text{C}$ 。

紫外检测器: $\lambda=278$ nm。

梯度条件: 100%A 相保持 10 min

↓

15 min 内由 100%A 相→68%A 相、32%B 相

↓

68%A 相、32%B 相保持 10 min

↓

100%A 相

6.3.4 测定

待流速和柱温稳定后,进行空白运行。准确吸取 10 μL 混合标准系列工作液注射入 HPLC。在相同的色谱条件下注射 10 μL 测试液。测试液以峰面积定量。

7 结果计算

7.1 计算方法

7.1.1 以儿茶素类标准物质定量,按式(1)计算:

$$\text{儿茶素含量}(\%) = \frac{A \times f_{\text{Std}} \times V \times d}{m_1 \times 10^5 \times m} \times 100 \quad \text{.....(1)}$$

式中:

A ——所测样品中被测成分的峰面积;

f_{Std} ——所测成分的校正因子(浓度/峰面积,浓度单位“ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ”);

V ——样品提取液的体积,单位为毫升(mL);

d ——稀释因子(通常为 2 mL 稀释成 10 mL,则其稀释因子为 5);

m_1 ——样品称取量,单位为克(g);

m ——样品的干物质含量, %。

7.1.2 以咖啡碱标准物质定量,按式(2)计算:

$$\text{儿茶素含量}(\%) = \frac{A \times RRF_{\text{Std}} \times V \times d}{S_{\text{Caf}} \times m_1 \times 10^5 \times m} \times 100 \quad \text{.....(2)}$$

式中:

RRF_{Std} ——所测成分相对于咖啡碱的校正因子;

S_{Caf} ——咖啡碱标准曲线的斜率(峰面积/浓度,浓度单位“ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ”)。

7.2 儿茶素类相对咖啡碱的校正因子表

见表 1。

表 1 儿茶素类相对咖啡碱的校正因子表

名称	GA	+EGC	+C	+EC	+EGCG	+ECG
RRF_{Std}	0.84	11.24	3.58	3.67	1.72	1.42

7.3 儿茶素类总量计算公式

见式(3)。

$$\text{儿茶素类总量}(\%) = \text{EGC 含量} + \text{C 含量} + \text{EC 含量} + \text{EGCG 含量} + \text{ECG 含量} \quad \text{.....(3)}$$

7.4 重复性

同一样品儿茶素类总量的两次测定值相对误差应 $\leq 10\%$,若测定值相对误差在此范围,则取两次测得值的算术平均值为结果,保留小数点后两位。

方法二 茶叶中茶多酚的检测

8 原理

茶叶磨碎样中的茶多酚用 70% 的甲醇在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上提取,福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂氧化茶多酚中—OH 基团并显蓝色,最大吸收波长 λ 为 765 nm,用没食子酸作校正标准定量茶多酚。

9 仪器

9.1 分析天平:感量 0.001 g。

9.2 水浴:70 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

9.3 离心机:转速 3 500 r/min。

9.4 分光光度计。

10 试剂

本标准所用水均为重蒸馏水,除特殊规定外,所用试剂为分析纯。

10.1 乙腈:色谱纯。

10.2 甲醇。

10.3 碳酸钠(Na_2CO_3)。

10.4 甲醇水溶液(体积比):7+3。

10.5 福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂。

10.6 10%福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂(现配):将 20 mL 福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂(10.5)转移到 200 mL 容量瓶中,用水定容并摇匀。

10.7 7.5% Na_2CO_3 (质量浓度):称取 $37.50 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$ Na_2CO_3 (10.3),加适量水溶解,转移至 500 mL 容量瓶中,定容至刻度,摇匀(室温下可保存 1 个月)。

10.8 没食子酸标准储备溶液($1\ 000 \mu\text{g}/\text{mL}$):称取 $0.110 \text{ g} \pm 0.001 \text{ g}$ 没食子酸(GA,相对分子质量 188.14),于 100 mL 容量瓶中溶解并定容至刻度,摇匀(现配)。

10.9 没食子酸工作液:用移液管分别移取 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 的没食子酸标准储备溶液(10.8)于 100 mL 容量瓶中,分别用水定容至刻度,摇匀,浓度分别为 10,20,30,40,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

11 操作方法

11.1 供试液的制备

11.1.1 母液:按 6.3.2.1 制备。

11.1.2 测试液:移取母液(11.1.1)1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,待测。

11.2 测定

11.2.1 用移液管分别移取没食子酸工作液(10.9)、水(作空白对照用)及测试液(11.1.2)各 1.0 mL 于刻度试管内,在每个试管内分别加入 5.0 mL 的福林酚(Folin-Ciocalteu)试剂(10.6),摇匀。反应 3 min~8 min 内,加入 4.0 mL 7.5% Na_2CO_3 溶液(10.7),加水定容至刻度、摇匀。室温下放置 60 min。用 10 mm 比色皿、在 765 nm 波长条件下用分光光度计测定吸光度(A)。

11.2.2 根据没食子酸工作液(10.9)的吸光度(A)与各工作溶液的没食子酸浓度,制作标准曲线。

12 结果计算

12.1 比较试样和标准工作液的吸光度,按式(4)计算:

$$\text{茶多酚含量}(\%) = \frac{A \times V \times d}{SLOPE_{\text{Std}} \times m \times 10^6 \times m_1} \times 100 \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

A——样品测试液吸光度;

V——样品提取液体积,10 mL;

d——稀释因子(通常为 1 mL 稀释成 100 mL,则其稀释因子为 100);

$SLOPE_{\text{Std}}$ ——没食子酸标准曲线的斜率;

m——样品干物质含量,%;

m_1 ——样品质量,单位为克(g)。

12.2 重复性

同一样品的两次测定值,每 100 g 试样不得超过 0.5 g,若测定值相对误差在此范围,则取两次测定

值的算术平均值为结果,保留小数点后一位。

13 注意事项

样品吸光度应在没食子酸标准工作曲线的校准范围内,若样品吸光度高于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的没食子酸标准工作溶液的吸光度,则应重新配制高浓度没食子酸标准工作液进行校准。

 **美析仪器**
MACY INSTRUMENT
专业光度计系列生产厂家
HTTP://www.macylab.com TEL:400-616-4686