



中华人民共和国国家标准

GB/T 8313—2018
代替 GB/T 8313—2008

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 14502-1:2005, Determination of substances characteristic of green and black tea—Part 1: Content of total polyphenols in tea—Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent; ISO 14502-2:2005, Determination of substances characteristic of green and black tea—Part 2: Content of catechins in green tea—Method using high-performance liquid chromatography, NEQ)

2018-07-13 发布

2018-11-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 8313—2008《茶叶中茶多酚和儿茶素含量的检测方法》。与 GB/T 8313—2008 相比,主要技术变化如下:

- 化学试剂(见 3.3.6,2008 年版的 5.5);
- 修改了儿茶素标准品的缩写(见 3.3.10.3,2008 年版的 5.9.3);
- 增加了儿茶素、咖啡碱标准品液相色谱图(见图 A.1)。

本标准使用重新起草法参考 ISO 14502-1:2005《绿茶和红茶中特征物质的测定 第 1 部分:福林酚试剂比色法测定茶叶中茶多酚总量》、ISO 14502-2:2005《绿茶和红茶中特征物质的测定 第 2 部分:高效液相色谱法测定绿茶中儿茶素》编制,与 ISO 14502-1:2005 和 ISO 14502-2:2005 的一致性程度为非等效。

本标准由中华全国供销合作总社提出。

本标准由全国茶叶标准化技术委员会(SAC/TC 339)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、国家茶叶质量监督检验中心、泉州出入境检验检疫局综合技术服务中心、福建日春实业有限公司。

本标准起草人:周卫龙、徐建峰、黄伙水、刘相真、陆小磊、林锻炼、王启灿。

本标准历次版本发布情况为:

- GB/T 8313—1987、GB/T 8313—2002、GB/T 8313—2008。

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,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

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8302 茶 取样(GB/T 8302—2013,ISO 1839:1980,NEQ)

GB/T 8303 茶 磨碎试样的制备及其干物质含量测定(GB/T 8303—2013,ISO 1572:1980,MOD)

3 茶叶中儿茶素类的检测——HPLC 法

3.1 原理

茶叶磨碎试样中的儿茶素类用 70% 的甲醇水溶液在 70 ℃ 水浴上提取,儿茶素类的测定用 C_{18} 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 ISO 国际环试结果儿茶素类与咖啡碱的相对校正因子(RRF_{std})来定量。

3.2 仪器

3.2.1 分析天平:精度 0.000 1 g。

3.2.2 水浴:70 ℃ $\pm$ 1 ℃。

3.2.3 离心机:转速 3 500 r/min。

3.2.4 高效液相色谱仪(HPLC):包含梯度洗脱、紫外检测器及色谱工作站。

3.3 试剂

3.3.1 除非另有说明,在分析中所使用试剂均为分析纯,用水为 GB/T 6682 规定的三级水。

3.3.2 乙腈:色谱纯。

3.3.3 甲醇。

3.3.4 乙酸:色谱纯。

3.3.5 70% 甲醇水溶液。

3.3.6 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)溶液:10 mg/mL(现配)。

3.3.7 抗坏血酸溶液:10 mg/mL(现配)。

3.3.8 稳定溶液:分别将 25 mL EDTA-2Na 溶液(3.3.6),25 mL 抗坏血酸溶液(3.3.7),50 mL 乙腈(3.3.2)加入 500 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。

3.3.9 液相色谱流动相

3.3.9.1 流动相 A:分别将 90 mL 乙腈(3.3.2), 20 mL 乙酸(3.3.4), 2 mL EDTA-2Na 溶液(3.3.6)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(3.3.12)。

3.3.9.2 流动相 B:分别将 800 mL 乙腈(3.3.2), 20 mL 乙酸(3.3.4), 2 mL EDTA-2Na 溶液(3.3.6)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(3.3.12)。

3.3.10 标准储备溶液

3.3.10.1 咖啡碱储备溶液:2.00 mg/mL。

3.3.10.2 没食子酸(GA)储备溶液:0.100 mg/mL。

3.3.10.3 儿茶素类储备溶液:儿茶素(+C) 1.00 mg/mL,表儿茶素(EC) 1.00 mg/mL,表没食子儿茶素(EGC) 2.00 mg/mL,表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG) 2.00 mg/mL,表儿茶素没食子酸酯(ECG) 2.00 mg/mL。

3.3.11 标准工作溶液:用稳定溶液(3.3.8)配制。

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

3.3.12 0.45 μm 有机相滤膜。

3.4 操作方法

3.4.1 取样

按 GB/T 8302 的规定。

3.4.2 试样制备

按 GB/T 8303 的规定。

3.4.3 测定步骤

3.4.3.1 干物质含量测定

按 GB/T 8303 的规定。

3.4.3.2 供试液的制备

3.4.3.2.1 母液:称取 0.2 g(精确到 0.000 1 g)均匀磨碎的试样(3.4.2)于 10 mL 离心管中,加入在 70 $^{\circ}\text{C}$ 中预热过的 70%甲醇水溶液(3.3.5)5 mL,用玻璃棒充分搅拌均匀湿润,立即移入 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴(3.2.2)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%甲醇水溶液提取一次,重复以上操作。合并提取液定容至 10 mL,摇匀,用 0.45 μm 膜(3.3.12)过滤,待用(该提取液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下可至多保存 24 h)。

3.4.3.2.2 测试液:用移液管移取母液(3.4.3.2.1)2 mL 至 10 mL 容量瓶中,用稳定溶液(3.3.8)定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 膜(3.3.12),待测。

3.4.3.3 色谱条件

色谱条件如下:

——液相色谱柱: C_{18} (粒径 5 μm , 250 mm $\times$ 4.6 mm);

——流动相流速:1 mL/min;

——柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;

——紫外检测器： $\lambda=278\text{ nm}$ ；

——进样量： $10\text{ }\mu\text{L}$ ；

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。

3.4.3.4 测定

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

3.4.3.5 儿茶素、咖啡碱标准样品液相色谱图

色谱图参见附录 A。

3.5 结果计算

3.5.1 计算方法

以儿茶素类标准物质定量,按式(1)计算;以咖啡碱标准物质定量,按式(2)计算。

$$c = \frac{(A - A_0) \times f_{\text{Std}} \times V \times d \times 100}{m \times 10^6 \times w} \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$c = \frac{A \times \text{RRF}_{\text{Std}} \times V \times d \times 100}{S_{\text{Caf}} \times m \times 10^6 \times w} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

c ——儿茶素含量, %;

A ——所测样品中被测成分的峰面积;

A_0 ——所测试剂空白中对应被测成分的峰面积;

f_{Std} ——所测成分的校正因子(浓度/峰面积,浓度单位为微克每毫升 $\mu\text{g/mL}$);

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,浓度单位为微克每毫升 $\mu\text{g/mL}$);

V ——样品提取液的体积,单位为毫升(mL);

m ——样品称取量,单位为克(g);

w ——样品的干物质含量(质量分数), %;

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

3.5.2 校正因子

儿茶素类相对咖啡碱的校正因子见表 1。

表 1 儿茶素类相对咖啡碱的校正因子

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

3.5.3 儿茶素类总量

按式(3)计算:

$$c(\%) = c_{\text{EGC}}(\%) + c_{\text{C}}(\%) + c_{\text{EC}}(\%) + c_{\text{EGCG}}(\%) + c_{\text{ECG}}(\%) \dots\dots\dots(3)$$

3.5.4 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。

4 茶叶中茶多酚的检测

4.1 原理

茶叶磨碎样中的茶多酚用70%的甲醇水溶液在70℃水浴上提取,福林酚试剂氧化茶多酚中-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。

4.2 仪器

4.2.1 分析天平:精度0.001 g。

4.2.2 水浴:70℃ ± 1 ℃。

4.2.3 离心机:转速3 500 r/min。

4.2.4 分光光度计。

4.3 试剂

4.3.1 甲醇。

4.3.2 碳酸钠(Na_2CO_3)。

4.3.3 70%甲醇水溶液。

4.3.4 福林酚(Folin-Ciocalteu):1 mol/L。

4.3.5 10%福林酚试剂(现配):将20 mL福林酚试剂(4.3.4)转移到200 mL容量瓶中,用水定容并摇匀。

4.3.6 7.5%碳酸钠(Na_2CO_3)溶液:称取37.50 g ± 0.01 g碳酸钠(Na_2CO_3)(4.3.2),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)。

4.3.7 没食子酸标准储备溶液(1 000 $\mu\text{g/mL}$):称取0.110 g ± 0.001 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)。

4.3.8 没食子酸工作液:用移液管分别移取1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL的没食子酸标准储备溶液(4.3.7)于100 mL容量瓶中,分别用水定容至刻度,摇匀,浓度分别为10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 。

4.4 操作方法

4.4.1 供试液的制备

4.4.1.1 母液:按3.4.3.2.1制备。

4.4.1.2 测试液:移取母液(4.4.1.1)1.0 mL于100 mL容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,待测。

4.4.2 测定

4.4.2.1 用移液管分别移取没食子酸工作液(4.3.8)、水(作空白对照用)及测试液(4.4.1.2)各1.0 mL于

刻度试管内,在每个试管内分别加入 5.0 mL 的福林酚试剂(4.3.5),摇匀。反应 3 min~8 min 内,加入 4.0 mL 7.5%碳酸钠(Na_2CO_3)溶液(4.3.6),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 、 A_0)。

4.4.2.2 根据没食子酸工作液(4.3.8)的吸光度(A)与各工作溶液的没食子酸浓度,制作标准曲线。

4.5 结果计算

4.5.1 计算方法

比较试样和标准工作液的吸光度,按式(4)计算:

$$c_{\text{TP}} = \frac{(A - A_0) \times V \times d \times 100}{\text{SLOPE}_{\text{Std}} \times w \times 10^6 \times m} \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- c_{TP} —— 茶多酚含量, %;
- A —— 样品测试液吸光度;
- A_0 —— 试剂空白液吸光度;
- $\text{SLOPE}_{\text{Std}}$ —— 没食子酸标准曲线的斜率;
- m —— 样品质量,单位为克(g);
- V —— 样品提取液体积,单位为毫升(mL);
- d —— 稀释因子(通常为 1 mL 稀释成 100 mL,则其稀释因子为 100);
- w —— 样品干物质含量(质量分数), %。

4.5.2 重复性

同一样品茶多酚含量的两次测定值相对误差应 $\leq 5\%$,若测定值相对误差在此范围,则取两次测定值算术平均值为结果,保留小数点后一位。

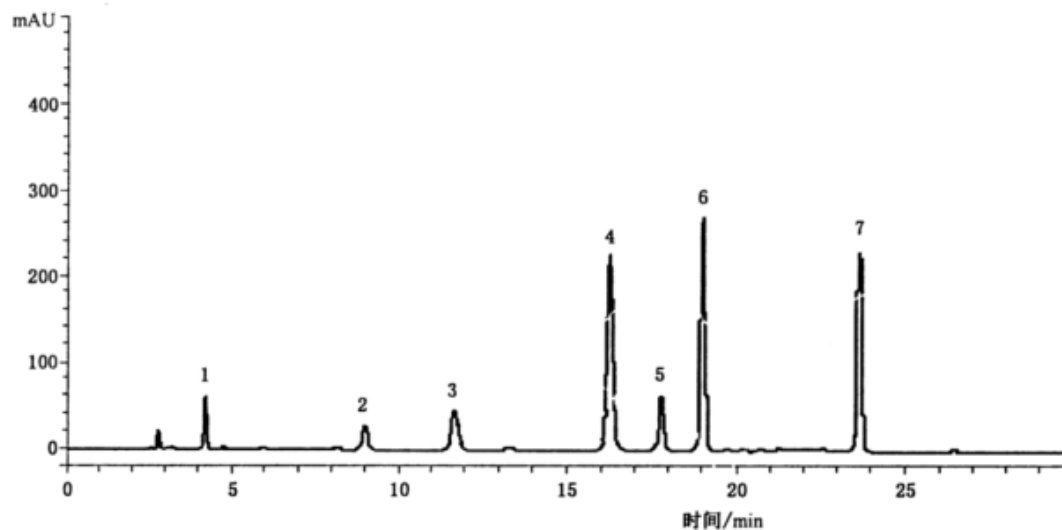
4.6 注意事项

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 $50 \mu\text{g/mL}$ 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。

附 录 A
(资料性附录)

儿茶素、咖啡碱标准样品液相色谱图

儿茶素、咖啡碱标准样品液相色谱图见图 A.1。



说明：

- 1——GA；
- 2——EGC；
- 3——C；
- 4——咖啡碱；
- 5——EC；
- 6——EGCG；
- 7——ECG。

图 A.1 儿茶素、咖啡碱标准样品液相色谱图