

分光光度法测定茶制品中儿茶素含量的研究

黄河宁¹ 赖文忠¹ 周文富¹ 黄河清²

(1.三明高专 化工工程系,福建 三明,365004;2.厦门大学 生命科学院,福建 厦门 361005)

摘要:依据儿茶素与香草醛的显色反应原理,用分光光度法对茶制品中儿茶素含量进行测定,建立香草醛—盐酸法测定茶制品中儿茶素含量的方法.结果表明显色剂和催化剂的添加量及反应时间等因素对测定均有影响.该法检测波长为500nm,反应时间为15h,反应温度(20±1)℃,以儿茶素为标准样品,线性范围10~100ug/mL,线性关系良好(r=0.999),相对标准偏差<1%.该法操作简便,其它辅助材料无干扰,可用于原料药和制剂中儿茶素含量的测定.

关键词:儿茶素;香草醛—盐酸法;含量测定

中图分类号:O657.3

文献标识码:A

文章编号:1008-293X(2003)09-0025-04

茶多酚(TP)是从茶叶中提取的多酚类物质,具有广泛的药理作用^{[1][2]}.其主要有效成分为总儿茶素.儿茶素具有抗肿瘤、抗突变作用;有降压、降糖、降血脂和抗动脉粥样硬化作用;有抗菌消炎、抗病毒作用^[3].根据儿茶素与香草醛的羟醛缩合生成红色产物.以无机强酸为催化剂,研究了香草醛—盐酸分光光度法测定市售万应茶中儿茶素含量的分析条件,并应用于制剂的检测,结果令人满意.

1 仪器与材料

UV-1100型紫外—可见分光光度计,北京瑞利仪器公司产品;精密电子天秤,德国赛斯公司产品.儿茶素标准品为北京生化制品检定所产品,万应茶为永定采善堂制药有限公司产品.香草醛为中国科龙精细化工厂产品,其他试剂为市售分析纯试剂.

2 实验部分

2.1 标准样品液、样品液和显色剂的制备

用精密电子天平称取儿茶素对照样品20.00mg加适量水超声波溶解(20 min),置于100mL容量瓶内,稀释至刻度,摇匀,即得标准样品液(500ug/mL).

取市售万应茶一袋(3.0g)浸入250mL50℃水中浸泡8h,挤干,得浸提液.再将茶袋放入250mL50℃清水中浸泡一次,合并两次浸提液.加水稀释成1000mL,摇匀,即可得样品溶液,待测.

精确称取香草醛1.00g,置于250mL烧杯中加入环己醇103mL充分搅拌溶解,即得1%香草醛溶液.

2.2 最大吸收波长的确定^[4]

吸取标准样品液2.5mL,万应茶样品液1mL,分别置于10mL刻度试管中,加1%香草醛溶液和适量浓盐酸,再用环己醇稀释至刻度线,摇匀后,于(20±1)℃温度下避光反应5h,以环己醇代替试样或样品溶液作空白对照,于400~700nm扫描.结果最大波长均为499.5nm,故确定测定波长为500nm.

2.3 标准工作曲线的制备

分别准确吸取儿茶素标准样品液0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00、4.50、5.00mL于刻度试管中,同上法2.2操作,Abs测值如表1.

表1 不同浓度的儿茶素的吸光度值

conc(ug/mL)	10.0	20.0	30.0	40.0	50.0	60.0	70.0	80.0	90.0	100.0
Abs	0.023	0.078	0.131	0.166	0.221	0.268	0.316	0.365	0.413	0.461

• 收稿日期:2003-09-06

基金项目:三明高等专科学校科研资助项目[BO302]

作者简介:黄河宁(1958-),男,福建安溪人,高级讲师,主要从事药物分析和微量元素有机物的合成.

测得数值用最小二乘法拟合得标准曲线方程:

$A = 0.004762C - 0.019533$ ($r = 0.999$). 如图 1 所示.

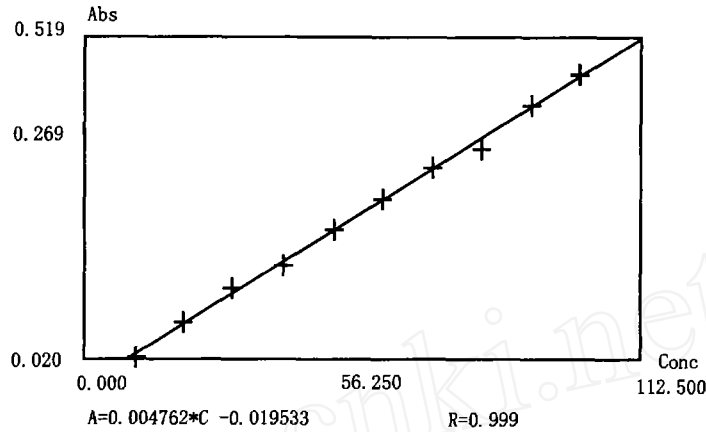


图 1 儿茶素标准样品浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.4 样品儿茶素含量测定

准确吸取万应茶样品液 1mL 置于 10mL 刻度试管中,按 2.2 法操作,测得 500nm 处的吸光度值.由标准工作曲线求得儿茶素的含量.其计算按下式进行:^[5]

$$P\% = \{(A + B)/K\} \times V \times 100/W \times 10^3$$

式中:K——回归方程斜率,A——待测成分的吸光度,B——回归方程截距,W——样品重 mg,V——稀释体积 mL,P%为被测成分百分含量.

2.5 显色剂用量的试验

在显色反应中,显色剂的用量是关键要素之一.相关文献报道^[6],显色剂必须过量.经实验验证,取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的儿茶素 1mL,加入 1% 的香草醛—环己醇溶液 6mL 时,反应液颜色比较深,吸光度大且较稳定,实验重现性好.

2.6 盐酸添加量的确定

盐酸的添加量,对测定结果有直接的影响.将盐酸的添加量控制在 2.0~5.0mL 范围进行实验,儿茶素均可以进行羟醛缩合生成红色化合物.取万应茶的浸提液 1mL,在同样条件下进行三次平行实验,结果表明随着盐酸加入量的增大,吸光度有一定变化,并影响测定结果的精确度.当 1mL 万应茶的浸提液,盐酸的添加量为 3.5mL 时,1% 香草醛为 6mL 时,相对偏差较低,试验结果见表 2.

表 2 盐酸的添加量对测定结果的影响

浓盐酸添加量(mL)	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
万应茶的含量(%)	13.23	13.57	14.28	14.67	14.31	13.95	13.1
相对标准偏差(%)	1.1	0.95	0.83	0.65	0.78	0.90	1.2

2.7 反应时间的确定

实验中发现,随着反应时间的延长,儿茶素与香草醛形成的有色化合物会使反应液颜色加深,但随着又逐渐变浅,吸光度降低.图 2 是 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1)和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2)的儿茶素的反应液吸光度随时间变化的曲线.实验表明当反应时间为 15h 时,反应液具有较大的吸光度.

表 3 不同反应时间的儿茶素的吸光度值

反应时间(h)	3	6	9	12	15	18
吸光度(1)(Abs)	0.092	0.153	0.245	0.315	0.365	0.353
吸光度(2)(Abs)	0.025	0.043	0.081	0.125	0.166	0.155

3 结果与讨论

3.1 显色反应机理

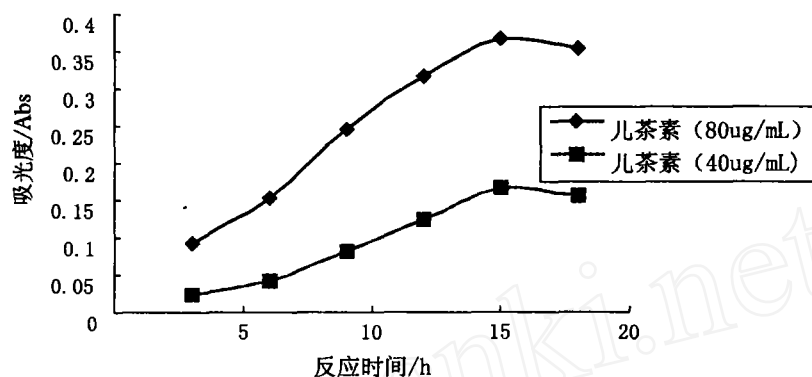
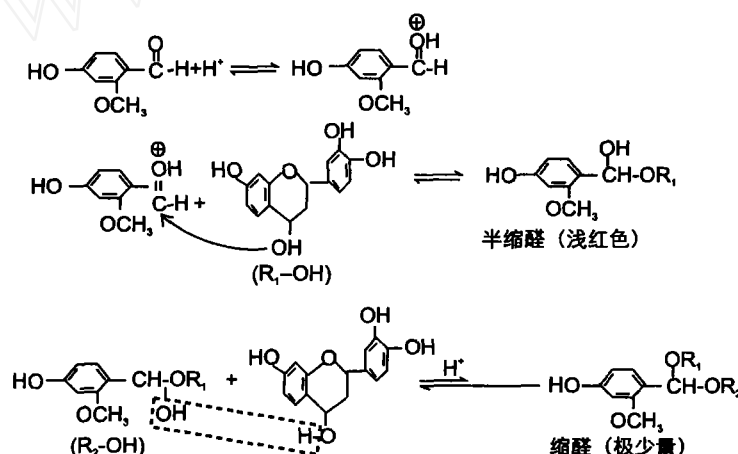


图2 反应液吸光度随时间的变化



从以上显色反应机理可以看出,儿茶素同显色剂的反应,为一亲核加成反应,由于仲醇羟基亲核性大于酚羟基,其主要反应为羟醛缩合,故有明显的选择性。

3.2 显色剂用量的影响

根据反应机理,香草醛与儿茶素的羟醛缩合反应分两步进行,当香草醛与儿茶素物质的量之比为1:1时,反应产物为半缩醛和缩醛;当香草醛与儿茶素的物质的量比2:1时,由于显色剂大大过量,反应主要停留在生成半缩醛阶段。从理论上分析,只有显色剂过量才能确保儿茶素充分反应,提高测试结果的精确度。根据相关文献的报道^[6]对于显色剂用量主要取决于有色化合物的稳定性,对稳定性较好的化合物,显色剂一般过量30%~50%,对稳定性较差,显色剂一般过量10倍以上。本实验中采用过量的显色剂和略低于室温(20 ± 1) $^{\circ}C$ 条件下进行反应,有利提高测定结果的准确性。

3.3 浓盐酸添加量的影响

从反应机理上分析,主要原因为 H^+ 两步催化作用所致,第一步 H^+ 同香草醛的羟基形成羰基正离子。当 H^+ 用量增大时,则羰基正离子增加同儿茶素形成半缩醛的百分率提高。若 H^+ 的含量进一步提高,浓盐酸加入体积 $>4ml$ 时,因 H^+ 极度过量,可以同儿茶素中的仲-OH反应,生成质子醇,失去亲核能力,导致儿茶素测得含量降低,故测得结果曲线变化呈V形态。见图2。实验表明,1mL万应茶提取液,添加3.5mL浓盐酸,在同样条件下测定其相对标准偏差最小。

3.4 反应时间的控制

有机反应速度较慢,反应需要一定过程,随着反应时间的延长,儿茶素与香草醛形成有色化合物会使

反应液颜色逐渐加深,吸光度随之增加,但随后又逐渐减弱,吸光度降低.这说明反应生成羟醛缩合产物缓慢且不够稳定,有重新发生结构变化的可能^[8].实验证明在温度控制在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的条件下,测定液放置 15h 时,显色效果最好见表 3 和图 2.

3.5 试样测定的结果

本实验选择永定采善堂制药有限公司生产的万应茶,对其中儿茶素含量进行测定.其结果如表 4 所示

表 4 万应茶儿茶素含量的测定结果

试样	儿茶素含量				加标回收率 %	相对标准偏差 %
	1	2	3	平均值		
万应茶	14.71	15.60	14.82	15.04	97.6	0.49

4 结论

运用香草醛——盐酸分光光度法以儿茶素作为标准样品,当盐酸的添加量为 3.5mL 反应温度控制在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 反应液在避光条件下储存 15h,测定茶制品中儿茶素的含量,具有较高精确度.其标准工作曲线的线形范围为 10 ~ 100ug/mL,加标回收率为 97.6%,测定效果良好.

参考文献:

- 1 杨贤强,曹明富等.茶多酚生物学活性的研究[J].茶叶科学,1993,13(1):51.
- 2 陈为均,万圣勤.茶多酚药效研究概况[J].中草药,1993,24(9):493.
- 3 方芳等.茶儿茶素的药效研究概况[J].中草药,2000,5(31):245.
- 4 魏毅,王娟等.香荚兰素比色法测定茶多酚口含片中儿茶素的含量[J].中国中药杂志,1999,24(6):13.
- 5 许海琴,许列琴.常见天然提取物质量标准参考手册[M].北京:化学工业出版社,2003,290-291.
- 6 魏毅,王娟等.香荚兰素比色法测定茶多酚口含片中儿茶素的含量[M].中国中药杂志,1999,24(6):14.
- 7 王秀萍.仪器分析技术[M].北京:化学工业出版社,2003,194.
- 8 曾昭琼.有机化学[M].北京:高等教育出版,1993,319.

Studies on Content Measurement of Tea Catechins of Tea Produces by Spectrophotometry

Huang Hening¹ Lai Wenzhong¹ Zhou Wenfu¹ Huang Heqing²

(1. Department of Chemical and Biological Engineering, College of Samming, Samming, Fujian, 365004; 2. Department of Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen Fujian, 361005)

Abstract: A spectrophotometry is used to determine the content of tea catechins of tea produces according to the principle of display reaction between tea catechins and vanillin. In addition, a method of vanillin - hydrochloric acid is established to determine the content of tea catechins from the produces. The results show that the additive quantity of display reagent, catalyst and reactive time, etc. are able to affect the determining data. Determining wavelength of 500nm, reaction time of 15h, and reaction temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$ are adopted in determining content of tea catechins. Moreover, the linear ranging from 10 to 100 (g/mL), the favorable linear relation having $r = 0.999$ and the relative standard deviation that is lower than that of 1%, are observed while the tea catechins are employed as a standard. This analyzing method has the features of easy operation and no interference with other assisted materials, which is suitable to measure the content of tea catechins from the material drug and the preparation.

Key words: tea catechins; method of vanillin - hydrochloric acid; content measurement