

Определение химического состава чая методом ВЭЖХ

А. Я. Яшин, к. х. н.¹, Я. И. Яшин, д. х. н.¹

УДК 543.544

Чай известен человеку более 4500 лет, его потребляют 2/3 населения мира. В древности к чаю относились как к лекарству, затем стали употреблять как тонизирующий напиток. В последние десятилетия научно доказано, что чай, особенно зеленый, способен помочь человеку в защите от опасных болезней (сердечнососудистых, онкологических, нейродегенеративных и др.). Целебные свойства обусловлены его химическим составом, интерес к определению которого сильно возрос в последние годы. Определение химического состава чая, в основном, проводится методом ВЭЖХ с разными детектирующими системами. Обзор таких работ приведен в настоящей статье.

Ключевые слова: чай, химический состав, катехины, жидкостная хроматография, типы чая, детекторы

Введение

Чай – древнейший и самый употребляемый напиток в мире после воды (2/3 населения мира). Чай известен в Китае с 2700 года до н. э. Сегодня его выращивают в 50 странах, ежегодное производство более 4 млн тонн. Самые известные типы чая: черный (полностью ферментированный), зеленый чай (не ферментированный) и оолонг или улун (ферментированный на 20–50%). Чай оолонг производят только в Китае, Тайване и Таиланде, 80% всего выпускаемого чая – черный, 20% – зеленый. Промежуточные свойства имеют чай белый, желтый, пуэр, производство которых относительно невелико. Чай выращивают как на равнинах, так и на высокогорьях. Последний, как правило, содержит больше полезных антиоксидантов. Как говорят в Китае: высокие горы дают чай высокого качества. Чайное растение предпочитает теплый и влажный климат, рассеянный свет и слабокислую почву. Чайное дерево (*Camelliasinensis*) китайского происхождения, позднее обнаружили другие чайные растения в провинции «Ассам» в Индии. В Таиланде недавно обнаружены четырехсотлетние чайные деревья. Как и кофе, чай содержит кофеин, однако ученые открыли новую разновидность без кофеина. В Китае, в провинции Юньнань, производят специальный чай Shabbat – подарок еврейскому народу.

Чай в Европу из Китая завезли португальцы, голландцы и англичане в 17 веке. Большим любителем чая был Людовик XIV. В обзоре [1] проанализированы

публикации о чае (1991–2014). Всего изучено 31374 документов: число публикаций по зеленому чаю – 1319, черному – 391, полифенолам в чае – 690, антиоксидантам в чае – 627, катехинам в чае – 612, ВЭЖХ чая – 257. Приведены 10 самых цитируемых статей.

В заключение этого раздела – самые общие сведения о чае. Неофициальный праздник «День чая» (TeaDay) отмечается 15 декабря, в том числе и в России. В этот день проходят фестивали и ярмарки чая. Генеральная Ассамблея ООН 21 декабря 2019 года официально утвердила праздник «Международный день чая» (International Tea Day) на 21 мая. Издаются десятки журналов о чае, в том числе «Кофе и чай в России», опубликованы десятки книг по разным вопросам, связанным с чаем. В Индии, Шри Ланке и в Китае действуют исследовательские институты чая, в ряде стран есть специализированные магазины чая.

Основные методы ВЭЖХ, применяемые для определения химического состава чая

В связи с тем, что чай имеет сложный многокомпонентный состав, то, естественно, для его определения используют хроматографические методы, основной из которых – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В табл. 1 приведен список применяемых методов ВЭЖХ для анализа чая с помощью разных детектирующих систем, как универсальных (масс-спектрометрические, по светорассеиванию, рефрактометрические), так и селективных

¹ Группа компаний «Сайтерга», yashin@scietegra.com.

(флуориметрические, электрохимические, хемиллюминесцентные, ИКС, УФ). Наименьший предел детектирования при определении катехинов достигнут амперометрическим методом – аттог = 10^{-18} г [7]. Для разделения оптических изомеров в чае применяют хиральные методы ВЭЖХ [17]. Для выделения некоторых антиоксидантов чая в чистом виде, в частности, эпигаллокатехин галлата применяют препаративную ВЭЖХ и противоточную хроматографию. Для идентификации неизвестных компонентов чая используют ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС, ВЭЖХ с диодноматричным детектором и ВЭЖХ с кулонометрическим детектором с линейкой электродов, все они относятся к детекторам 3D. По определению катехинов в зеленом чае и теафлавинов в черном чае вышли Международные ГОСТы-ISO [22, 23]. Проведена валидация методик определения состава чая [27]. Анализ

состава необходим для оценки качества чая [28] и его коммерческой ценности [29]. В некоторых случаях регистрируются только профильные хроматограммы без расшифровки [30], оценка чая по типу отпечатков пальцев fingerprint [31]. Определение состава чая проводится с целью дифференциации [17] его географического происхождения [32]. Перед анализом применяют разные методы экстракции [33–36]. Результаты определения химического состава чая другими методами хроматографии приведены в обзорах [37–41].

Определение химического состава чая методами ВЭЖХ

В табл. 2 приведен список классов соединений, определяемых в чае методом ВЭЖХ. Это прежде всего катехины [70] и теафлавины [71]. Состав чая зависит от вида, времени сбора, листьев, климата и процесса обработки. Катехины – основные компоненты зеленого чая (ЭГКГ, ЭГК, ЭКГ, ЭК, ГК, ГКГ, К, ЭК). Эпигаллокатехин галлата (ЭГКГ) содержится больше всего – до 70% от общего содержания всех катехинов. Основные компоненты черного чая – теафлавины и теарубигины. Теафлавины: теафлавин, 2-теафлавин-3-галлат, 3-теафлавин-3-галлат, теафлавин-3,3-дигаллат. Теафлавины синтезируются из катехинов, они – первые продукты окисления катехинов и катехин галлатов в процессе ферментации. Содержание теафлавинов колеблется в пределах 0,29–1,25%. Содержание

Таблица 1. Основные методы ВЭЖХ для определения химического состава чая с разными детектирующими системами

Методы	Ссылки
Обращено-фазовая ВЭЖХ	2
ВЭЖХ с УФ	3
ВЭЖХ – диодноматричный детектор	4
ВЭЖХ – спектрофотометрический детектор	5
ВЭЖХ – масс-спектрометрический детектор (МС)	6–8
ВЭЖХ – МС / МС	9
ВЭЖХ – электрохимический детектор (ЭХД)	10
ВЭЖХ – инфракрасный детектор (ИКС)	11
ВЭЖХ – флуориметрический детектор	12
УльтраВЭЖХ (УВЭЖХ)	13
УВЭЖХ-МС	14
УВЭЖХ-МС / МС	15
УВЭЖХ-МС орбитрэп, МС высокого разрешения	16
Хиральная ВЭЖХ	17
Ион-парная ВЭЖХ	18
Капиллярная ВЭЖХ	10
Противоточная ВЭЖХ	19
Препаративная ВЭЖХ	20
Мицеллярная ВЭЖХ	21
ISO 14502-2-2015 Tea part 2 Content of catechins	22
ISO 18447:2021 Tea Determination of theaflavine	23
Двумерная ВЭЖХ	24
Ионная хроматография	25
Эксклюзионная хроматография	26

Таблица 2. Классы соединений, определяемых в чае методом ВЭЖХ

Классы соединений, соединения	Ссылки
Катехины	42–48
Теафлавины	48–54
Теарубигины	53, 54
Флавоноиды	55
Кверцетин	56
Кофеин	57
L-теанин	58
Аминокислоты	59–63
Витамины	61
Сапонины	62
Процианидины	64–66
Моносахара	67
Полисахариды	67
Циклодекстрины	68
Хлорофилл, каротиноиды	69

теарубигинов на порядок выше. По антиоксидантной активности теафлавины не уступают катехинам. Теарубигины – высокомолекулярные соединения с молекулярным весом до 40 000. Некоторые сорта чая содержат до 5% кофеина. Входящая в состав чая аминокислота L-теанин обладает успокаивающим действием и придает сладковатый, пикантный вкус. Поэтому содержание теанина – одно из важнейших показателей чая на мировых рынках. Лучшие китайские сорта и чай гуокуро в Японии содержат до 2% теанина. Всего 14 аминокислот (из них 5 незаменимых) присутствуют в чае в количестве около 11 мг/г. Суммарное содержание сахаров около 12 мг/г сухого листа чая, при этом наибольшее количество составляет сахароза. Из витаминов в чае присутствуют в небольших количествах С, Е (альфа-, бета-, гамма-токоферолы), рибофлавин. Сапонины, проантоцианидины, полисахариды, циклодекстрины, хлорофилл и каротиноиды присутствуют в чае в незначительных количествах. В чае обнаружены следующие флавоноиды: кемпферол (1,3–1,5 мг/г), мирацетин (0,4–1 мг/г) и кверцетин (2–2,6 мг/г).

Заключение

В кратком обзоре приведены основные методы ВЭЖХ, применяемые для определения химического состава чая и их аналитические возможности. Рассмотрены основные классы химических соединений, а также отдельные соединения, определяемые в чае методами ВЭЖХ. Особенное внимание уделяется определению катехинов в зеленом чае и теафлавинов в черном чае. По определению этих соединений методом ВЭЖХ вышли Международные ГОСТы. Именно эти соединения в основном обеспечивают оздоровительные эффекты чая, а также могут способствовать профилактике онкологических, вирусных, нейродегенеративных заболеваний (деменция, болезни Альцгеймера и Паркинсона). Катехины зеленого чая и теафлавины черного чая – сильные антиоксиданты.

Литература

1. Wambu E. W., Fu H. Z., Ho Y. S. Characteristics and trends in global tea research: a science citation Index expanded-based analysis. *Intern. J. Food Sci. Techn.* 2017;52:644–651.
2. Sobolev A. P., Lorenzo A. D., Circi S et al. NMR, RP-HPLC-PDA-ESI-MS and RP-HPLC-FD characterization of green tea and oolong teas. *Molecules.* 2021;26:5125–5131.
3. Roman M. C., Hildreth J., Bannister S. Determination of catechins and caffeine in tea raw materials, extracts and dietary supplements by HPLC-UV: single laboratory validation. *JAOC Int.* 2013;96:933–941.
4. Neilson, A.P., Green, R.J., Wood, K.V., Ferruzzi, M.G. High-throughput analysis of catechins and theaflavins by high performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A.* 2006;1132:132–140.
5. He Q., Yao K., Jia D. et al. Determination of total catechin in tea extracts by HPLC and spectrophotometry. *Natural Product Research.* 2009;23:93–100.
6. Masukawa Y., Matsui Y., Shimizu N., Kondou N., Endou H., Kuzukawa M., Hase T. Determination of green tea catechins in human plasma using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2006;834: 26–34.
7. Arayafarias M., Gaudreau A., Rozoy E., & Bazinet L. Rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of tea catechins and folates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2014;62:4241–4250.
8. Zeeb D.J., Nelson B.C., Albert K., Dalluge J.J. Separation and identification of twelve catechins I tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization - mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000;72:5020–5026.
9. Tao N., Zhou Z., Zhao B., Wai T. Simultaneous determination of eight catechins and four theflavin in green, black and oolong tea using new HPLC-MS/MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016;131:140–145.
10. Kotani A., Takahashi K., Hanamata H. et al. Attomole catechins determination by capillary liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Sci.* 2007;23:157–163.
11. Robb C. S., Geldort S. E. et al. Analysis components of green tea by HPLC-IMS. *J. Liq. Chrom. Relat. Techn.* 2002;25:787–801.
12. Kottiappan M., Anandham S. V. Determination and residues level of emameitin benzoate in tea using HPLC with fluorescence detection. *Food Public Health.* 2012;2:12–15.
13. Jiang H.Y., Engelhardt U.H., Thrane C., Maiwald B., Stark J. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. *Food Chemistry.* 2015;183:30–35.
14. Misaka S., Kawabe K., Onoue S., Werba J.P., Giroli M., Kimura J., Watanabe H., Yamada S. Development of rapid and simultaneous quantitative method for green tea catechins on the bioanalytical study using UPLC/ESI-MS. *Biomed. Chromatogr.* 2013;27:1–6.
15. Park J.-E., Kim T. E., Shin R.-H. Quantitative analysis of four catechins from green tea extracts in human plasma using UHPLC-MS/MS for pharmacokinetic studies. *Molecules.* 2018;23:984–987.
16. Lopez-Gutierrez N., Romero-Gonzalez R., Plaza-Bolanos P., Martinez-Vidal J.-L., & Garrido-Frenich A. Identification and quantification of phytochemicals in nutraceutical products from green tea by UHPLC-Orbitrap-MS. *Food Chemistry.* 2015;173:607–618.
17. Gotti R., Furianetto S., Lanteri S., Olma S. Differentiation of green tea samples by chiral CD-MEKS analysis of catechin content. *Electrophoresis.* 2009;30:2922–2930.
18. Narumi K., Sonoda J., Shiotani K. et al. Simultaneous detection of green tea catechins and gallic acid in human serum after ingestion of green tea tablets using ion-pair HPLC with electrochemical detection. *J. Chrom. B.* 2014;945–946:147–153.
19. Wang K. B., Liu Z. H., Huang J. A. et al. Preparative isolation and purification of theaflavins and catechins by high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromat. B.* 2008;867:282–286.
20. Hong S. B., Kim, Row K. H. Preparative separation of EGCG from Korean green tea by HPLC. *J. Sep. Sci. Techn.* 2002;37:1631–1640.
21. Friori J., Pasquini B., Caprini C., Orlandini S. Chiral analysis of theanine and catechin in characterization of green tea by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography and HPLC. *J. Chromat. A.* 2018;1562:115–122.
22. ISO. 14502-2-2015. Tea. Part 2. Content of catechins in green tea method using HPLC
23. ISO 14502-2-2015 Tea Part 2. Content of catechins in green tea.
24. Scoparo C. T., de Souza L. M., Dartora N., Sasaki G. L., Gorin P. A. J., Iacomini M. Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid-liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion reversed phase). *Journal of Chromatography A.* 2012;1222:29–37.
25. Michalski R. Simultaneous determination of common inorganic anions and black and herbal tea by suppressed ion chromatography. *J. Food Quality* 2006;29:607–616.
26. Kasai N., Nakatsubo G. Size-exclusion chromatography of tea tannins and intercepting potentials of peptides for the inhibition

- of trypsin – caseinolytic activity of tea tannins. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:5149–5156.
27. Ramankrishna V. V., Shyam S. R., Rajesh K. K. et al. Method development and validation of rapid identification of EGCG using HPLC. *PLoS ONE*. 2020;15: e0227569.
 28. Naldi M., Fiori J., Gotti R. et al. UHPLC determination of catechins for the quality control of green tea. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014;88:307–314.
 29. Kruhe J. C., Kruhe M. A., Roach P. D. Development of an objective measure of quality and commercial value of Japanese-styled green tea. Quality index tool. *J. Food Sci. Technol.* 2018;55:2926–2934.
 30. Zhao C. N., Teng G. Y., Cao S. Y. et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas. *Antioxidants* 2019;8:215–226.
 31. Me X. et al. Chemical finger print analysis for quality control and identification of Ziyang green tea by HPLC. *Food Chem.* 2014;171:405–411.
 32. Ye N. S. A minireview of analytical methods for the geographical origin analysis of teas. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2012;52:775–780.
 33. Chung M. G., Lee M. C. Optimal extraction conditions for simultaneous determination of catechin and caffeine in green tea leaves. *Food Sci. Biotechnol.* 2011;20:327–333.
 34. Friedman M., Levin C. E., Choi S. H., Kozukue E., Kozukue N. HPLC analysis of catechins, theaflavins, and alkaloids in commercial teas and green tea dietary supplements: comparison of water and 80% ethanol/water extracts. *Journal of Food Science.* 2006;71: C328–C337.
 35. Rahim A. A., Nofrizal S., Saad B. Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. *Food Chemistry.* 2014;147: 262–268.
 36. Unno T., Sagesaka Y. M., Kakuda T. Analysis of tea catechins in human plasma by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53:9885–9889.
 37. Finger A., Kuhr S., Engelhardt U. H. Chromatography of tea constituents. *J. Chrom. A.* 1992;624:293–315.
 38. Valentine D. A., Wiseman S. A., Bouwens L. C. M. The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1997;37:693–704.
 39. Robb C. S., Brown R. Catechins in tea. Chemistry and analysis. *Adv. Chrom.* 2001;41:379–410.
 40. Яшин Я. И., Яшин А. Я., Черноусова Н. И. Хроматографическое определение химического состава чая. Пивоинапитки. 2005;2:44–49. Yashin Ya. I., Yashin A. Ya., Chernousova N. I. Chromatographic determination of tea chemical composition. *Beer and drinks.* 2005;2:44–49.
 41. Yashin A. Y., Nemzer B. V., Combat E., Yashin Y. I. Determination of the chemical composition of tea by chromatographic methods. A review. *J. Food Res.* 2015;4:56–88. Yashin A. Ya. Determination of catechins in green tea samples by HPLC with amperometric detector. *Analytics.* 2020;10:204–211.
 43. Fernandez P. L., Martin M. J., Gonzalez G., Pablos F. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. *Analyst.* 2000;125:421–425.
 44. El-Shahami M. S., Homra A., Bahaffi S. O. et al. Analysis of some selected catechins and caffeine in greentea by HPLC. *Food Chem.* 2012;134:2268–2275.
 45. Sano M., Tabata M., Suzuki M. et al. Simultaneous determination of twelve tea catechins by HPLC with electrochemical detection. *Analyst.* 2001;126:816–820.
 46. Zhao Y., Chen P., Lin L. Z., Harnly J. M., Yu L. L., Li Z. W. Tentative identification, quantitation, and principal component analysis of green puerh, green, and white teas using UPLC/DAD/MS. *Food Chemistry.* 2011;126:1269–1277.
 47. Guillarme D., Casetta C., Bicchi C., Veuthey J. L. High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. *Journal of Chromatography A.* 2010;1217: 6882–6890.
 48. Lee B. L., Ong C. N. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by HPLC and capillary electrophoresis. *J. Chrom. A.* 2000;881:439–447.
 49. Zhang J., Gui H., Jiang H. et al. Rapid determination of theaflavins by HPLC with a new monolithic column. *Czech. J. Food Sci.* 2019;37:112–119.
 50. Rana A., Singh H. P. Rapid HPLC-DAD method for analysis of theaflavins using C12 as stationary phase. *J. Liq. Chrom. Relat. Techn.* 2012;35:2272–2279.
 51. Steinhilber B., Engelhardt U. H. Theaflavins in black tea. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1989;188:509–511.
 52. Kohler N., Chou E. F., Ito K., Winterhalter P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the separations of black tea theaflavins. *J. Liq. Chrom.* 2004;27:1893–1902.
 53. Robertson A., Bendall D. S. Production and HPLC analysis of black tea theaflavins and thearubigins during in vitro oxidation. *Phytochemistry* 1983;22:883–887.
 54. Menet M. S., Song S., Yang C. S. Analysis of theaflavins and thearubigins from black tea by MS-MALDI-TOT. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:2455–2461.
 55. Freeman J. D., Niemeyer D. Quantification of tea flavonoids by HPLC. *Chem. Educ.* 2008;85:957–962.
 56. Savic I. M., Nolic V. D., Savic I. M. et al. Development and validation of a new RP-HPLC method for determination of quercetin in green tea. *J. Anal. Chem.* 2013;68:906–911.
 57. Strestha S., Rejal S. K., Pokhrel P., Racia K. P. Simple HPLC method for determination of caffeine in tea and coffee. *J. Food Sci. Technol.* 2016;9:74–78.
 58. Ofitserova M., Sareeta N. Analysis of L-theanine in tea by HPLC with post-column derivatization. *LC GC* 2015;33:12–18.
 59. Liu M., Ma Y. P., Liu Y. Y. et al. Determination of amino acid content in tea. *Studies of trace element and health* 2016;33:51–52.
 60. Wang F. H. Analysis and determination of free amino acid in different tea by HPLC. *Food Res. Develop.* 2018;39:141–146.
 61. Kim B. S., Yang W. M., Choi J. Comparison of caffeine, free amino acid, vitamin C and catechins content of commercial tea in Bosung, Sunchou, Kuangyeng, Hadong. *J. Korean tea Soc.* 2002;8:55–62.
 62. Ahmad H. O. A., Wang C. Determination of tea saponin in camellia seed oil with UV and HPLC analysis. *World J. Eng. Techn.* 2015;3:30–37.
 63. Xu Y., Lin Z. et al. Identification of D-amino acids in tea leaves. *Food Chem.* 2020;317:126428.
 64. Lakenbrink C., Engelhardt U. H., Wray V. Identification of two new proanthocyanidins in green tea. *J. Agric. Food Chem.* 1999;47:4621–4624.
 65. Kiehke A., Lakenbrink O., Engelhardt U. H. Analysis proanthocyanidins in tea samples LS-MS results. *Zeit. Lebens. Untersuchung und forschung a food* 1997;205:153–157.
 66. Murakami I., Nakamura T., Iahibashi Y. et al. Simultaneous determination of catechins and procyanidins. *Chromatographia* 2006;27:27–33.
 67. Ai Y., Yu Z., Chen Y. et al. Rapid determination of the monosaccharide composition and content in tea polysaccharides from Yingshugreen tea by precolumn derivatization HPLC. *J. Chemistry* 2016;8:1–5.
 68. Kanno M. Analysis of cyclodextrins in green tea, using HPLC-ELSD. *Application Note. JASCO.*
 69. Susuki Y., Shiot Y. Chlorophyll and carotenoids analysis of tea by HPLC and its application for quality control. *Microgravity.* 2021;7:26–30.
 70. Wu C., Xu H., Heritier J. et al. Determination of catechins and flavonal glycosides in Chinese tea varieties. *Food Chem.* 2012;132:144–149.
 71. Яшин А. Я. Определение теафлавинов в черных чаях разных стран методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором. Сорбционные и хроматографические процессы. 2020;20:158–165. Yashin A. Ya. Determination theaflavins in black teas of the different countries by HPLC method with amperometric detector. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protssessy.* 2020;20:158–165.

Статья получена 15.06.2022
Принята к публикации 20.07.2022