

HPTLC 联用像素与光密度法快速定量茶饮料中的 EGCG

张延杰¹, 胡志高¹, 席兴军^{2*}, 卫晓³, 刘霏莎¹, 李汴生⁴, 陈益胜^{1,5*}

¹ 咀香园健康食品(中山)有限公司 广东中山 528414

² 中国标准化研究院 北京 100191

³ 江南大学食品学院 江苏无锡 214122

⁴ 华南理工大学食品科学与工程学院 广州 510641

⁵ 山西农业大学食品科学与工程学院 山西太谷 030801)

摘要 以 HPTLC 分析平台,分别用像素分析法和光密度法,建立并对比两种快速检测茶饮料中 EGCG 含量的方法。以 3 种市售茶饮料为代表性样品,对比两种方法的应用性能,评估像素分析替代仪器依赖的光密度检测作为茶饮料中 EGCG 含量检测的新方法的先进性。结果显示,HPTLC-像素分析方法、HPTLC-光密度方法检测的定量限分别为 6.8,5 mg/kg,均可以定量茶饮料中 EGCG。两种方法目标物在 200~1 200 ng/斑点浓度范围内线性相关系数相差不大,均在 0.999 以上。两种方法的回收率均满足要求,HPTLC-像素分析方法测定 3 种样品加标回收率分别在 102.4%~110.8%,102.3%~118.8%,100.3%~113.5%之间,HPTLC-光密度方法测定 3 种样品加标回收率分别在:103.5%~110.8%,95.3%~111.2%,99.3%~111.2%之间,表明两种方法具有良好的准确性。两种方法的精密性也相差不大,HPTLC-像素分析方法 RSD<6.7%,HPTLC-光密度方法 RSD<3.2%。结论:HPTLC 检测技术中,简单易用的像素分析可以较好地代替昂贵的仪器化光密度扫描,提高方法的性价比和实用性。

关键词 HPTLC; 像素分析; 光密度检测; 茶饮料

文章编号 1009-7848(2023)09-0306-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.032

茶鲜叶中富含多酚类物质,其含量约占茶鲜叶干质量的 18%~36%,其中儿茶素含量最高,约占多酚总量的 70%。儿茶素化合物属于黄烷醇类,其基本结构是 2-苯基苯并吡喃。从茶叶中分离鉴定的儿茶素多为表型儿茶素,主要有 4 种,表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(EGC)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),其中 EGCG 在儿茶素中含量最高^[1-4],占儿茶素总量的 50%~80%,具有重要的保健功效。

近年来,诸多研究证明绿茶的健康促进作用主要归因于 EGCG^[5-6]。EGCG 具有抗氧化、杀菌、抑病毒、消炎、减肥等多种功效^[7-12]。Azambuja 等^[13]研究表明,绿茶 EGCG 具有抗炎活性,其作用机制为儿茶素可以清除体内活性氧,调节炎症信号通路,抑制炎症发生。茶提取物尤其是绿茶提取物和茶

多酚可以抑制动物模型中不同器官肿瘤的形成和发展。有研究表明,茶多酚特别是 EGCG,可抑制酶活性和信号转导途径,从而抑制细胞增殖和增强细胞凋亡,并抑制细胞入侵^[14]。Suzuki 等^[15]研究表明,绿茶具有抗癌、抗肥胖、抗动脉粥样硬化、抗糖尿病、抗菌、抗病毒等活性,这些活性与 EGCG 的功效密切相关。Al-Basher 等^[16]研究表明,EGCG 可以通过抑制肝脏铁蓄积来改善铁超负荷引起的大鼠肝毒性、细胞凋亡和氧化应激,改善肝脏抗氧化能力^[17]。此外,通过测定 EGCG 含量,可以进行茶叶分级,茶叶处理工艺合理性判断,茶饮料质量辨析等^[18],具有重要的应用意义。

目前,已有多种方法用于测定茶叶及茶饮料中的儿茶素,如高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-DAD)^[19]、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)^[20],衍生后的气相色谱-质谱(GC-MS)^[21]等。最常用的方法始终基于 HPLC 分离^[22-25],然而,基于 HPLC 的方法存在分析时间长和溶剂浪费的局限性。需要建立一种通量和性价比高的方法来直观地表征茶产品中的 EGCG。

收稿日期: 2022-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(21804058)

第一作者: 张延杰,男,硕士,教授级高级工程师

通信作者: 席兴军 E-mail: xixj@cnis.ac.cn

陈益胜 E-mail: cheniyisheng@sxau.edu.cn

在前期研究中,曾提出以 HPTLC 为平台,结合光密度检测对显色结果进行扫描定量分析的方法^[26-27]。然而,此方法在实际应用中存在仪器(光密度扫描仪)单价昂贵和通用性差的问题。使用数码相机对 HPTLC 色谱结果进行数字化成像,是其它色谱工具不具备的独特优势。这一分析方法不仅为分析者提供了直观的视觉定量结果,而且使得基于像素分析定量替代昂贵的光密度扫描定量成为可能^[28-29]。

本文以 HPTLC 为分离检测平台,经 FeCl_3 原位衍生显影和薄层成像后将衍生后的色谱板联用光密度扫描定量建立以 HPTLC 为分离-分析一体化平台的检测方法,此外再联用数字化处理软件 ImageJ 对薄层成像后的图片进行模拟扫描定量,建立一种高效、经济、可视化薄层色谱像素分析筛检方法,并将两种方法进行对比。具体操作:将样品进行点样、展开和分离;使用光密度或成像系统和 ImageJ 进行平行定量分析,采用目测检视法进行定性分析;最后使用 3 种茶饮料来验证方法的实际应用能力。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茶饮料样品,无锡欧尚超市。EGCG(纯度 98.0%),阿拉丁公司;无水乙醇、氯仿、丙酮、甲酸、甲醇、三氯化铁(均为分析纯),Sigma 公司;薄层色谱板,G60 F254 硅胶板,硅胶层厚 0.2 mm,规格 10 cm×20 cm,德国 Merck 公司。

1.2 仪器与设备

ChromaSpray I 型点样仪;薄层色谱半自动点样仪、薄层色谱全自动展开仪、薄层色谱浸渍器、薄层色谱扫描仪,瑞士 CAMAG 公司;ProVidoc System-DD70 薄层成像系统,德国 Biostep 公司;电子天平(MB104E 型),瑞士 Mettler-Toledo 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液及衍生溶液制备 EGCG 标准溶液:精确称取 10.0 mg(精确至 0.1 mg)EGCG 标准品于 10 mL 烧杯中,用适量甲醇溶解并转移至 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀,得到 1 mg/mL EGCG 标准储备液。在 4 °C 冰箱中恒温避

光保藏,使用时按比例稀释至所需倍数,有效期为 1 周。

FeCl_3 衍生溶液:准确称取 5 g 无水三氯化铁标准品,加入 100 mL 无水乙醇,混合均匀后,4 °C 冰箱中避光保存备用。

1.3.2 样品预处理 取 3 种茶饮料 10 mL 于离心管中,过 0.45 μm 水系滤膜后得到样品溶液,所得溶液可直接用于 HPTLC 点样,或将其放于 4 °C 冰箱中冷藏备用。

1.3.3 硅胶板预洗 试验用所有硅胶板,使用前均需进行预洗前处理。取 10 cm×20 cm 的硅胶板置于 ADC-2 薄层色谱全自动展开仪中,将 10 mL 色谱级甲醇从仪器上部两侧槽中注入展开缸,以其作为流动相进行展开预洗,展开至硅胶板顶端后取出,最后用 TLC 加热器 III 在 120 °C 条件下干燥 20 min,降至室温后,用锡纸包装,保存于密封袋中。

1.3.4 HPTLC 色谱展开 采用 0.5 MPa 氮气为载体,用 ChromaSpray I 型点样仪精确点样于 10 cm×20 cm 的薄层板上,点样参数为:点样的条带长度 6 mm,条带距离底部 10 mm,距离左端 25 mm,条带间距自动计算。具体操作:将 1~25 μL 标准溶液和 10 μL 样品溶液,以 100 nL/s 速度和 0.2 μL 预排体积于硅胶板上喷涂。每次取样前,注射器用甲醇和超纯水手动清洗 3 次。点样结束后用薄层色谱全自动展开仪展开,展开前需在仪器的两侧槽内分别注入 10 mL 相应的流动相,展开参数为:氯仿/丙酮/甲酸(12.5/7.5/2.2,体积比),预平衡 5 min,上行展开距离 80 mm,展开完成后系统自动结束。之后将展开完成的硅胶板置于 60 °C TLC 加热器 III 上充分干燥 5 min,以挥发去除薄层板上残留的有机溶剂,这对获得干净的背景至关重要。

1.3.5 FeCl_3 变色反应及色谱结果成像 将完成色谱分离的硅胶板通过自动浸渍装置浸入 FeCl_3 衍生液中,移动速度 3 mm/s,停留时间 3 s。然后,将蘸有 FeCl_3 衍生液的硅胶板置于薄层色谱加热器上 50 °C 加热。当硅胶板黄棕色背景出现明显的黑色斑点后,使用配备佳能 EOS 700D 相机的成像系统对衍生后的硅胶板进行成像记录,相机参数设定为:白光底部透射光源,自动对焦和校正。

1.3.6 荧光光密度扫描定量分析方法 使用 TLC Scanner 3 薄层色谱扫描仪进行光密度扫描定量,检测参数:吸光模式,氙灯和钨灯,激发波长 620 nm,光栅 4.00 mm × 0.30 mm (Micro),扫描速度 20 mm/s,分辨率 100 μm/step。色谱设备、数据采集和处理均使用 WinCATS 软件(1.4.4 版)。

1.3.7 图像数字化处理软件定量分析方法 对色谱分离结果的分析,使用 ImageJ 软件(1.52a 版)中像素灰度转化-积分功能对数字化图像进行模拟扫描定量。具体操作是:首先将目标条带区域裁剪并保存为 PC 兼容格式(.tif 文件),然后应用 ImageJ 软件中的“Image-Color-Split Channels”功能,将原始图片拆分为 3 个颜色通道(红色、蓝色、绿色),选出最佳颜色通道后,将该通道下载剪好的目标区域,使用“Analyze-Gels”功能定义一个覆盖目标条带起始线和结束线的矩形,然后提取这些矩形在垂直方向上的像素灰度值,并用“Plot Lanes”功能进行轮廓分析,然后将图形结果转换为可积分色谱图;最后通过“Straight option”选项绘制基线,使用积分工具“Wand tool”定义色谱图中峰的面积,所获取的数据峰面积可直接用于定量分析。

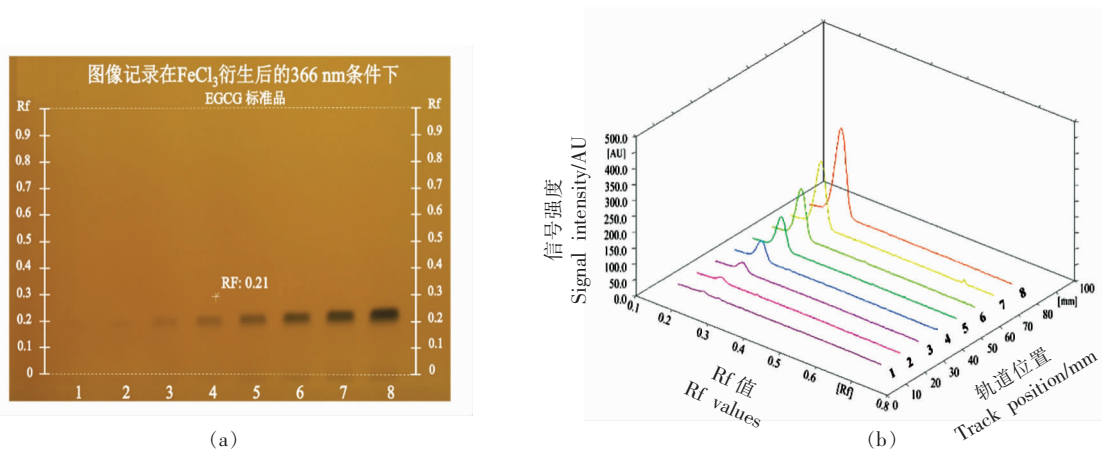
2 结果与讨论

2.1 HPTLC-光密度检测方法建立

在 HPTLC 分离中,对硅胶板分离效果评估的方法一般是目测检视法。使用 0.1 mg/mL EGCG 标准溶液依次点样 1.5, 2, 3, 5, 8, 12, 17, 25 μL,

EGCG 标准溶液经 HPTLC 分离,用 FeCl₃ 浸渍, FeCl₃ 均匀分布于整块薄层板上,含有 EGCG 的区域(图 1a 各轨道的变色区域)由黄棕色变为黑色,而其它区域保持黄棕色不变。使用不同流动相进行 HPTLC 分离条件优化,结果表明:流动相为氯仿/丙酮/甲酸时,EGCG 的比移值(Rf)为 0.21,同一轨道上的目标物质与干扰杂质能够实现良好的分离。将分离浸渍干燥后的结果图用薄层色谱扫描仪扫描 8 个轨道,结果见图 1b,发现视觉极限值为 2 号轨道分离斑点,因此标准曲线的制作舍弃 1 号轨道分离斑点,标准曲线见图 2 所示,选择 2~8 号轨道的 7 个点得到标准曲线为 $y=3.1762x-178.26, R^2=0.9974$ 。选择 2~6 号轨道的 5 个点得到标准曲线为 $y=3.5009x-358.67, R^2=0.9997$ 。最终选择 2~6 号轨道 5 个点制作的标准曲线,其线性关系好,能够满足定量要求。

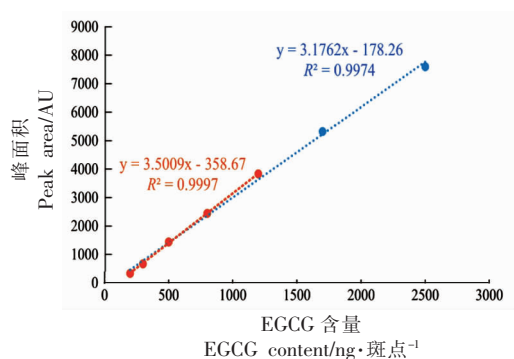
选取优化后的流动相进行色谱分离,得到分离结果见图 3a。将样品板分离结果在吸光模式下测量密度。为了确定最佳检测波长,预先分析 HPTLC 板上 EGCG 的全波长扫描光谱。如图 3b 所示,显然 EGCG 标准品在 620 nm 处有最大光吸收,同时样品轨道中的 EGCG 条带显示相同的光谱轮廓,表明潜在基质对 EGCG 吸光光谱的影响不显著。此外,评估了不同光源的性能,包括氙灯、钨灯、氙灯和钨灯及汞灯。通过比较,选择氙灯和钨灯,因为它不仅提供最高的峰强度,而且有助于色谱图平滑,如图 3c 所示。因此,将 620 nm 光(氙



注:1~8:EGCG 含量依次 150, 200, 300, 500, 800, 1 200, 1 700, 2 500 ng/斑点。

图 1 (a)薄层色谱分离衍生(b)光密度扫描结果图

Fig.1 (a)Thin layer chromatography separation derivation (b)optical density scan result graph



注:标曲 7 个点依次对应图 4-1 的 2~8 号轨道。

图 2 光密度扫描分析所得 EGCG 标曲图

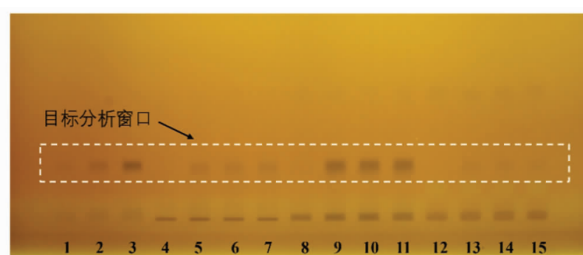
Fig.2 EGCG reticlegation obtained by optical density scanning analysis

灯和钨灯)用于定量测定。

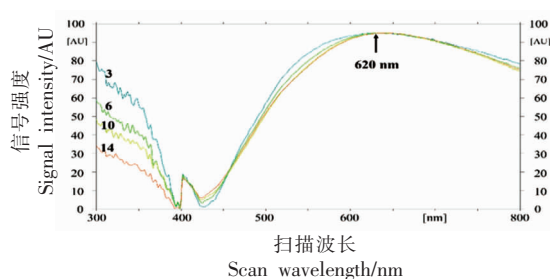
2.2 HPTLC-光密度方法验证

2.2.1 HPTLC-光密度方法的定量性能 为进一步评估优化后光密度的定量性能,在标准曲线的基础上确定方法的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。EGCG 在 200~1 200 ng/斑点范围具有良好的线性关系 ($R^2=0.9997$)。根据德国 DIN32645 方法^[30],以至少 95%的置信区间确定方法的 LOD 和 LOQ。通过计算得出 EGCG 的 LOD 和 LOQ 分别为 25 ng/斑点和 50 ng/斑点。将样品提取物的上样量固定在 10 mL,这相当于茶饮料样品中 EGCG 的 LOD 和 LOQ 分别为 2.5 mg/kg 和 5 mg/kg。如果需要,就可通过使用更大的上样量来增加检测能力。任何情况下,即使在极低水平下,该检测能力应足以定量检测 EGCG,因为茶饮料中茶多酚(儿茶素类约占 20%)的含量一般 50~80 mg/kg^[30]。同时该方法也取得非常高的精密度 ($RSD<8.2%$),因此建立的 HPTLC-光密度方法用于测定 EGCG 含量具有很强的实用性。

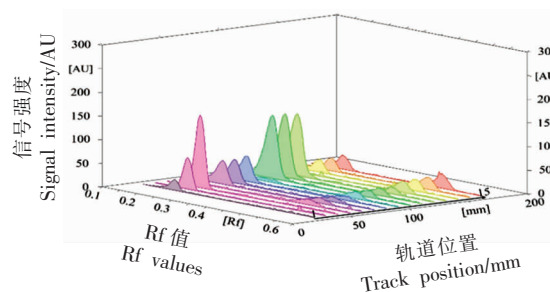
2.2.2 HPTLC-光密度方法的准确性 为进一步评估优化后 HPTLC-光密度方法的准确性,选取 3 种茶饮料进行加标回收率试验。在选取的茶饮料 1、茶饮料 2、茶饮料 3 样品中分别添加 20,40,80 mg/kg 的 EGCG 的标准溶液,结果见表 2。添加不同浓度的 EGCG 的标准溶液后,茶饮料 1、茶饮料 2、茶饮料 3 的回收率分别在 103.5%~110.8%, 95.3%~111.2%,99.3%~111.2%之间,表明 HPTLC-



(a)分离后 HPTLC 板的图像



(b)分析物在不同条件下的荧光激发光谱



(c)通过密度测量获得的相应色谱图
(氙灯和钨灯,620 nm 激发波长)

注:各轨道物质:1. 200 ng EGCG;2. 400 ng EGCG;3. 800 ng EGCG。4. 茶饮料 1;5~7. 茶饮料 1+400 ng EGCG;8. 茶饮料 2;9~11. 茶饮料 3+800 ng EGCG;12. 茶饮料 1;13~15. 茶饮料 3+200 ng EGCG。

图 3 没食子儿茶素没食子酸酯标准品
(200,400 和 800 ng/斑点)

和茶饮料样品提取物的 HPTLC 分离和密度测定

Fig.3 HPTLC separation and density determination of gallic catechin gallate standards (200, 400 and 800 ng/zone) and rice flour sample extracts

光密度方法测定样品中的 EGCG 具有较高的准确性。因此,以上结果证明所建立的方法可以用于筛选茶饮料中 EGCG 的含量,这对一款茶饮料价值的评估起到积极作用。

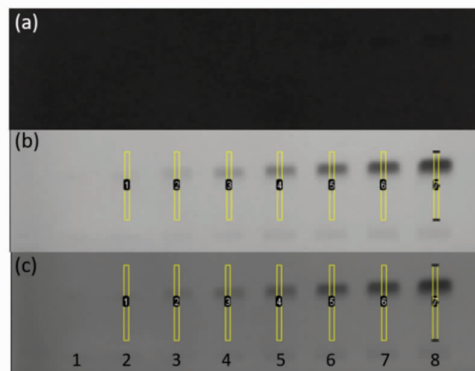
表 1 HPTLC-光密度的准确性和精密度评估

Table 1 Accuracy and precision evaluation of HPTLC-densitometric analysis

样品	添加量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	检测量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	绝对偏差/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	添加回收率/%	RSD/(n=3)
茶饮料 1	20	22.1	0.4	110.8	1.6
	40	41.4	2.2	103.5	5.2
	80	83.3	6.8	104.2	8.2
茶饮料 2	20	22.2	0.5	111.2	2.3
	40	42.3	1.4	105.8	3.5
	80	76.3	1.2	95.3	1.6
茶饮料 3	20	22.2	0.5	111.2	2.2
	40	42.6	1.5	106.6	3.5
	80	79.4	0.7	99.3	0.9

2.3 HPTLC-ImageJ 定量方法的建立

经 ImageJ 软件将 HPTLC 分离结果图拆分为“蓝、红、绿”3 个颜色通道,如图 4 所示,(a)“蓝色”通道下目标斑点不显现,于是,选择“红、绿”两种颜色通道制作标准曲线。如图 5 所示,取 2~6 轨道的 5 个点制作标准曲线,在“红色”通道下,200~1 200 ng/斑点范围内标准曲线为 $y=11.87x-1 961.2$, $R^2=0.9983$;在“绿色”通道下,200~1 200 ng/斑点范围内标准曲线为 $y=14.535x-1 619.9$, $R^2=0.9995$,因此选择相关性更高的绿色通道下得到的标准曲线做后续分析。



注:a. 蓝色,b. 红色,c. 绿色;1~8:EGCG 含量依次 150,200,300,500,800,1 200,1 700,2 500 ng/斑点。

图 4 经 ImageJ 拆分成 3 个颜色通道

Fig.4 Split into three color layers by ImageJ

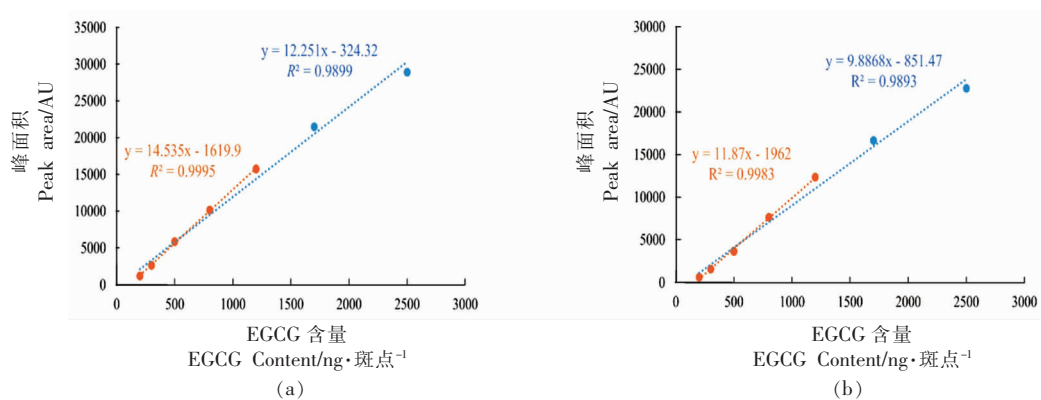


图 5 (a)红色和(b)绿色通道下的 EGCG 的标准曲线图

Fig.5 Standard curves of EGCG under the red layer (a) and the green layer (b)

2.4 HPTLC-ImageJ 方法验证

2.4.1 HPTLC-ImageJ 定量方法验证 在 200~1 200 ng/斑点范围,绿色颜色通道下,EGCG 具有良好的线性关系($R^2=0.9995$)。根据德国 DIN32645

方法^[31],以至少 95%的置信区间确定方法的 LOD 和 LOQ。通过计算得出 EGCG 的 LOD 和 LOQ 分别为 34 ng/斑点和 68 ng/斑点。将样品提取物的上样量固定在 10 mL,这相当于茶饮料样品中 EGCG

的 LOD 和 LOQ 分别为 3.4 mg/kg 和 6.8 mg/kg。如果需要,可使用更大的上样量来增加检测性能。

2.4.2 HPTLC-ImageJ 方法的准确性 在选取的茶饮料 1、茶饮料 2、茶饮料 3 样品中分别添加 20,40 mg/kg 和 80 mg/kg 的 EGCG 的标准溶液,结果见表 2。添加不同浓度的 EGCG 标准溶液后,茶

饮料 1、茶饮料 2、茶饮料 3 的回收率分别在 102.4%~110.8%,102.3%~118.8%,100.3%~113.5%之间,表明 HPTLC-光密度扫描对样品中 EGCG 的测定有较高的准确性。3 次平行分析所得 RSD<6.7%,证明所建方法具有良好的精密度。

表 2 HPTLC-ImageJ 的准确性和精密度评估

Table 2 Accuracy and precision evaluation of HPTLC-ImageJ

样品	添加量/mg·kg ⁻¹	检测量/mg·kg ⁻¹	绝对偏差/mg·kg ⁻¹	添加回收率/%	RSD/(n=3)
茶饮料 1	20	22.2	0.6	110.8	2.6
	40	41.0	1.3	102.4	3.1
	80	84.5	2.5	105.6	3.0
茶饮料 2	20	23.8	1.6	118.8	6.7
	40	40.9	1.3	102.3	3.2
	80	90.3	2.2	112.8	2.4
茶饮料 3	20	22.2	1.0	111.2	4.4
	40	40.1	1.1	100.3	2.6
	80	90.8	4.0	113.5	4.5

2.5 两种方法对比

HPTLC-ImageJ 和 HPTLC-光密度的线性相关系数相差不大且均在 0.999 以上。两种方法的回收率均满足要求,具有良好的准确性。两种方法

的精密度相差不大,HPTLC-ImageJ 略优于 HPTLC-光密度扫描。综上,HPTLC-ImageJ 可以代替 HPTLC-光密度扫描,其准确、经济、高效。

表 3 方法对比

Table 3 Method comparison

参数	HPTLC-ImageJ	HPTLC-光密度
回归方程	$y=14.535x-1619.9$	$y=3.5009x-358.67$
判定系数(R^2)	0.9995	0.9997
LOD/mg·kg ⁻¹	3.4	2.5
LOQ/mg·kg ⁻¹	6.8	5
回收率/%	100.3~118.8	95.3~111.2
精密度/%	<6.7	<8.2

3 结论

本章建立了 HPTLC-ImageJ 和 HPTLC-光密度两种快速检测茶饮料中活性物质 EGCG 含量的方法。HPTLC-ImageJ 方法中“蓝色”通道下像素分析得到的标准曲线相关性系数高于“红色”通道,因此,本试验分析在“绿色”通道下进行。对比两种方法,它们的线性、准确度和精密度非常接近,使用 ImageJ 图像数字化处理软件代替光密度扫描仪节省了成本,具有实际应用意义。

参 考 文 献

- [1] 陈琳. 抗坏血酸对儿茶素稳定性及二聚氧化途径影响机制分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
CHEN L. Mechanism of the effect of ascorbic acid on catechins stability and dimeric oxidation pathway [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.
- [2] 张素芬. 分析茶叶的生物活性成分与生物学作用[J]. 福建茶叶, 2021, 43(4): 78-79.

- ZHANG S F. Analysis of bioactive components and biological effects of tea[J]. *Fujian Tea*, 2021, 43(4): 78–79.
- [3] 杨延. 茶叶中活性成分分析[J]. *广东蚕业*, 2019, 53(2): 22–23.
- YANG Y. Analysis of active ingredients in tea[J]. *Guangdong Sericulture*, 2019, 53(2): 22–23.
- [4] 李斌. 茶叶中的活性成分及生物学作用[J]. *福建茶叶*, 2021, 43(1): 20–22.
- LI B. Active components and biological functions in tea[J]. *Fujian Tea*, 2021, 43(1): 20–22.
- [5] WANG S Z, LI Z L, MA Y T, et al. Immunomodulatory effects of green tea polyphenols[J]. *Molecules*, 2021, 26(12): 3755.
- [6] MUSIAL C, KUBAN-JANKOWSKA A, GORSKA-PONIKOWSKA M. Beneficial properties of green tea catechins[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(5): 1744.
- [7] RUCHIKA, SEHGAL A. An update on disease preventing potential of green tea in comparison with some tisanes[J]. *South African Journal of Botany*, 2022, 144: 92–96.
- [8] HUANG Q F, CHEN S H, CHEN H, et al. Studies on the bioactivity of aqueous extract of pu-erh tea and its fractions: *In vitro* antioxidant activity and alpha-glycosidase inhibitory property, and their effect on postprandial hyperglycemia in diabetic mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 53: 75–83.
- [9] AOSHIMA H, HIRATA S, AYABE S. Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas[J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(2): 617–622.
- [10] OH J, JO H, CHO A R, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas[J]. *Food Control*, 2013, 31(2): 403–409.
- [11] 申雯, 黄建安, 李勤, 等. 茶叶主要活性成分的保健功能与作用机制研究进展[J]. *茶叶通讯*, 2016, 43(1): 8–13, 65.
- SHEN W, HUANG J A, LI Q, et al. Research progress on the health-care function and action mechanism of the main active components of tea[J]. *Tea Newsletter*, 2016, 43(1): 8–13, 65.
- [12] 文祎, 蔡淑娴, 黄建安. 茶叶活性成分的抗炎作用及其机制研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3925–3930.
- WEN Y, CAI S X, HUANG J A. Research progress on the anti-inflammatory effect and mechanism of active ingredients in tea[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2017, 8(10): 3925–3930.
- [13] AZAMBUJA J H, MANCUSO R I, DELLA VIA F I, et al. Protective effect of green tea and epigallocatechin-3-gallate in a LPS-induced systemic inflammation model[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2022, 101: 108920.
- [14] S Y C, XIN W, GANG L, et al. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance[J]. *Nature reviews Cancer*, 2009, 9(6): 429–439.
- [15] SUZUKI Y, MIYOSHI N, ISEMURA M. Health-promoting effects of green tea[J]. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2012, 88(3): 88–101.
- [16] AL-BASHER G I. Green tea activity and iron overload induced molecular fibrogenesis of rat liver[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017, 26(3): 531–540.
- [17] 叶晴, 刘毅, 陈金鹏, 等. 绿茶化学成分及药理作用研究进展[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(12): 2711–2719.
- YE Q, LIU Y, CHEN J P, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of green tea[J]. *Drug Evaluation Research*, 2021, 44(12): 2711–2719.
- [18] DONLAO N, OGAWA Y. Impacts of processing conditions on digestive recovery of polyphenolic compounds and stability of the antioxidant activity of green tea infusion during *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2018, 89: 648–656.
- [19] VICTORIA S, ANASTASIOS T, IOANNIS S. Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek *Sideritis* species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography–diode array detection[J]. *Journal of Separation Science*, 2012, 35(4): 608–615.
- [20] STODT U, ENGELHARDT U H. Progress in the analysis of selected tea constituents over the past 20 years[J]. *Food Research International*, 2013, 53(2): 636–648.
- [21] KALINKE C, OLIVEIRA P R, EMETERIO M B S,

- et al. Voltammetric electronic tongue based on carbon paste electrodes modified with biochar for phenolic compounds stripping detection[J]. *Electroanalysis*, 2019, 31(11): 2238–2245.
- [22] MA B S, WANG J C, XU C C, et al. Interrelation analysis between phenolic compounds and in vitro antioxidant activities in Pu-erh tea[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2022, 158: 113117.
- [23] 贾雪峰. 高效液相色谱-荧光/紫外检测法分析测定茶叶和中药姜黄中的活性成分[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2016.
- JIA X F. Analytic determination of the active ingredients in tea and traditional Chinese medicine *Curcuma longa* L. by high performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet detection[D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2016.
- [24] 高智慧. 茶叶生物活性成分分析及其抗氧化作用研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2011.
- GAO Z H. Analysis of bioactive components of tea and research on antioxidant effect[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2011.
- [25] 徐玉春. 茶叶活性成分的荧光性质与分析方法研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2010.
- XU Y C. Fluorescence properties and analytical methods of active ingredients in tea[D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2010.
- [26] 王天楠, 张煌, 陈益胜, 等. HPTLC-DPPH 法定性定量分析保健品中芦丁[J]. *食品与机械*, 2019, 35(1): 92–96, 142.
- WANG T N, ZHANG H, CHEN Y S, et al. Reliable screening of rutin in healthcare products by hptlc-dpph assa[J]. *Food & Machine*, 2019, 35(1): 92–96, 142.
- [27] 黄彩虹. 基于 HPTLC+策略的食品筛检方法学研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- HUANG C H. Food screening methodology based on hptlc plus strategy[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [28] KOSURI T, NAYAK S, GUL M Z, et al. TLC-digital image-based fluorometric analysis of ergosterol and chitin content in food grains artificially infested with *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*[J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(5): 1267–1280.
- [29] SUN Y K, WANG H L, WANG W, et al. Changes in molecular structure of chickpea starch during processing treatments: A thin layer chromatography study[J]. *Food Chemistry*, 2018, 243: 186–191.
- [30] 赵志桑. 贵阳市售主要茶饮料中儿茶素含量比较[J]. *贵阳学院学报(自然科学版)*, 2019, 14(3): 88–89.
- ZHAO Z S. Comparison of catechin contents in main tea beverages sold in Guiyang City[J]. *Journal of Guiyang University (Natural Sciences)*, 2019, 14(3): 88–89.
- [31] SHRIVASTAVA A, GUPTA V B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods[J]. *Chronicles of Young Scientists*, 2011, 2(1): 21–25.

HPTLC Combines Pixel and Optical Density Method to Fast Quantitative EGCG in Tea Drinks

Zhang Yanjie¹, Hu Zhigao¹, Xi Xingjun^{2*}, Wei Xiao³, Liu Aisha¹, Li Biansheng⁴, Chen Yisheng^{1,5*}

¹*Tsui Xiangyuan Health Food (Zhongshan) Co., Ltd., Zhongshan 528414, Guangdong*

²*China Institute of Standardization, Beijing 100191*

³*School of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu*

⁴*School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641*

⁵*College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi*

Abstract This study by HPTLC analysis platform, use the pixels in a parallel analysis and optical density method, set up and compared two kinds of rapid detection of EGCG in tea drinks. With three kinds of tea drinks sold as representative samples, compare two methods of application performance, evaluate alternative instrument depend on the optical density of pixel analysis testing as tea drink. The results showed that the detection limits of HPTLC-pixel analysis method and HPTLC-optical density method were 6.8 mg/kg and 5 mg/kg, respectively, which were sufficient to quantify EGCG in

tea beverages; Two methods of target in 200–1200 ng/band concentration within the scope of the linear correlation coefficient were small and reached more than 0.999. The recoveries of the two methods meet the requirements, the spiked recoveries of the three samples determined by the HPTLC–pixel analytical method ranged from 102.4% to 110.8%, 102.3% to 118.8% and 100.3% to 113.5%, the spiked recoveries of the three samples determined by the HPTLC–optical density method ranged from 103.5% to 110.8%, 95.3% to 111.2%, and 99.3% to 111.2%, respectively. Indicating that the two methods have good accuracy. The precision of the two methods is also similar, HPTLC–pixel analytical method RSD<6.7%, HPTLC–optical density method RSD<3.2%. In conclusion, in HPTLC detection technology, simple and easy-to-use pixel analysis can better replace expensive instrumented densitometric scanning, improving the cost-effectiveness and practicability of the method.

Keywords HPTLC; pixel analysis; optical density detection; tea beverage