

电导检测离子排斥色谱法测定绿茶中的没食子酸

许丽, 周光明*, 余娜, 张丽贤

(西南大学化学化工学院, 发光与实时分析教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 建立离子排斥色谱法测定绿茶中没食子酸的分析方法。采用 Metrosep Organic Acids(250mm × 7.8mm)分离柱和电导检测器, 对分离条件进行优化。结果表明: 最佳的色谱条件为以 0.006mmol/L H_2SO_4 溶液为淋洗液、50.0mmol/L LiCl 溶液为再生液、流速 0.5mL/min; 在优化的分离条件下, 绿茶中常见的 F^- 和 8 种酸对没食子酸的测定均无干扰, 总分析时间为 19min, 没食子酸的检出限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$; 连续 6 次进样, 峰面积相对标准偏差为 1.34%, 4 种绿茶中没食子酸的回收率为 87.1%~96.7%。该方法简单、快速, 结果令人满意。

关键词: 没食子酸; 离子排斥色谱; 抑制电导检测; 绿茶

Determination of Gallic Acid in Green Tea by Ion Exclusion Chromatography with Conductivity Detection

XU Li, ZHOU Guang-ming*, YU Na, ZHANG Li-xian

(Key Laboratory of Luminescence and Real-time Analysis, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: An ion exclusion chromatographic method for the determination of gallic acid in green tea was described. The optimal chromatographic separation was investigated on Metrosep Organic Acids (250 mm × 7.8 mm) column with conductivity detection. The optimal separation was achieved using 0.006 mmol/L sulfuric acid as the eluent, 50.0 mmol/L lithium chloride as the regenerated liquid at a flow rate of 0.5 mL/min. Fluoride and 8 common acids in green tea had no interference on the determination. The total analysis time was 19 minutes. The detection limit of gallic acid was 0.1 $\mu\text{g/mL}$. The RSD of peak area for six replicate determinations was 1.34%. The recovery percentages in 4 green teas were 87.1%—96.7%. So, the method has the advantages of simplicity, rapidity and satisfying results.

Key words: gallic acid; ion-exclusion chromatography; suppressed conductivity detection; green tea

中图分类号: TS272.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0253-03

绿茶是饮用最广泛的茶类之一, 在中国被誉为“国饮”。绿茶中含有多种活性成分, 如茶碱、儿茶素、黄酮醇、茶多酚等^[1-4]。没食子酸属于茶多酚, 是可水解单宁的一种, 化学名为 3,4,5-三羟基苯甲酸。没食子酸具有多种药理活性, 如抗菌、抗突变、抗癌等^[5-7]。绿茶中没食子酸的含量相对较高, 且已有研究表明没食子酸含量与绿茶品质有显著关系^[8]。因此, 分析测定绿茶中的没食子酸有十分重要的意义。

目前, 测定没食子酸的方法主要有分光光度法^[9-10]、高效液相色谱法^[11-13]、薄层扫描法^[14-15]。但是, 采用离子排斥色谱法测定没食子酸含量的方法未见有文献报道。离子排斥色谱法是离子色谱法的三大重要分支之

一, 是分离有机酸的一种有效方法。离子排斥色谱法常采用价格便宜且相对无毒的稀酸作为流动相, 对环境较友好。在离子排斥分离方法中, 有机酸的分离受 Donnan 平衡的支配, 根据各种有机酸离解的难易程度不同, 在树脂内部得以保留的时间不同而得以分离。本实验拟采用离子排斥色谱法测定市场上 4 种绿茶中的没食子酸含量。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

绿茶(西湖龙井、润东龙井、正清河银螺、翠玉竹) 市购。
没食子酸、苹果酸、草酸、柠檬酸、乳酸、丁二酸、

收稿日期: 2010-11-23

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(CSTC2007BB5370); 科技部重大专项(2008ZX07315)

作者简介: 许丽(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为离子色谱。E-mail: xuli1103@163.com

* 通信作者: 周光明(1964—), 男, 教授, 博士后, 研究方向为色谱及其联用技术。E-mail: gmzhou@swu.edu.cn

抗坏血酸(均为分析纯) 成都市科龙化工试剂厂; 酒石酸(分析纯; 氟化钠(分析纯); 冰乙酸(分析纯); 浓硫酸(分析纯); 超纯水(电阻率 18.2M Ω)。

861 Advanced Compact IC 离子色谱仪[配电导检测器、MSM II 抑制器、Metrosep Organic Acids(250mm \times 7.8mm) 分离柱、Metrohm IC-Net 2.3 色谱工作站] 瑞士万通公司; 隔膜真空泵 天津市腾达过滤器件厂; 0.45 μ m 微孔滤膜; 超声波清洗器 上海必能信超声波有限公司; DHT 型搅拌恒温电热套 金坛市金祥龙电子有限公司; 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 标准溶液和样品溶液的配制

1.2.1 标准溶液

精密称取各有机酸对照品(没食子酸 0.1000g、草酸 0.1000g、酒石酸 0.1000g、柠檬酸 0.1000g、苹果酸 0.1000g、琥珀酸 0.1000g、抗坏血酸 0.1000g、氟化钠 0.2200g), 用超纯水溶解并定容至 100mL, 配成 1000 μ g/mL 标准储备液。用移液管分别准确移取 1.0mL 乳酸、1.0mL 冰乙酸, 用超纯水定容至 100mL, 配成 1:100(V/V)的标准储备液。

用移液管分别移取 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0mL 没食子酸标准储备液于 100mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 得到没食子酸质量浓度为 5.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0 μ g/mL 的标准溶液。精确移取 1.0mL F⁻和各种酸的标准储备液于 100mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 配制成 10.0 μ g/mL F⁻和 9 种酸的混合标准溶液。

1.2.2 样品溶液

称取西湖龙井、润东龙井、翠玉竹、正清河银螺各 3.0g, 分别加入新沸后的超纯水 30mL, 室温浸泡 1h, 抽滤, 滤渣用适量超纯水洗涤 3 次, 合并滤液于 50mL 容量瓶中。用超纯水定容、摇匀, 分别用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤待测。

1.3 色谱条件

色谱柱: Metrosep Organic Acids(250mm \times 7.8mm) 分离柱; 淋洗液: 0.006mmol/L H₂SO₄ 溶液; 再生液: 50.0mmol/L LiCl 溶液; 流速: 0.5mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

2 结果与分析

2.1 淋洗液及再生液的选择

离子排斥色谱法分析有机酸常用水、稀有机酸和无机酸做淋洗液。用稀有机酸做淋洗液, 对环境污染较大; 用水做淋洗液时, 背景电导率低, 没食子酸在 12.21min 处出峰, 但峰形严重不对称, 且与绿茶中常见有机酸的峰重叠。稀无机酸常采用盐酸、硫酸、硝酸、磷酸作淋洗液, 因硫酸的阴离子当量电导最低, 所以采用稀硫酸做淋洗液。为改善峰形, 加入 5% 的丙酮作

为有机改进剂, 用 LiCl 溶液做再生液降低背景电导值。

固定淋洗液的浓度, 分别采用 50.0mmol/L 的 NaOH、LiOH、LiCl 溶液为再生液测定 10.0 μ g/mL 没食子酸标准溶液。实验表明, 采用 NaOH、LiOH 溶液为再生液时, 基线漂移严重, LiCl 溶液为再生液时基线较平稳, 且背景电导率大幅度降低, 因为 Li⁺ 的当量电导低于 H⁺。

2.2 淋洗液浓度及流速的选择

淋洗液浓度的改变对各种有机酸出峰的时间及分离度、灵敏度影响较大。在再生液不变的前提下, 分别采用 0.002、0.004、0.006、0.008、0.010、0.250、0.500、2.500mmol/L H₂SO₄ 溶液进行淋洗。发现当淋洗液浓度等于 0.008mmol/L 时, 没食子酸与丙酮中杂质的色谱峰部分重叠; 当淋洗液浓度大于等于 0.010mmol/L 时, 能同时分离出茶叶中常见的几种有机酸, 但没食子酸的出峰时间延长到 30min。当淋洗液浓度小于或等于 0.004mmol/L 时, 没食子酸与绿茶中常见有机酸的色谱峰部分重叠。综合考虑分析时间和分离度等因素, 选择 0.006mmol/L H₂SO₄ 为淋洗液。

调节流速分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7mL/min, 当流速增大时, 分析时间明显缩短, 但当流速大于 0.5mL/min 时, 没食子酸会与茶叶中其他常见有机酸的色谱峰部分重叠, 当流速小于 0.5mL/min 时, 没食子酸的出峰时间延长, 但对各种酸的分离度影响不大。因此, 选用 0.5mL/min 的淋洗液流速。

2.3 方法的线性范围与精密度

在优化的色谱条件下, 按照质量浓度由低到高的顺序, 测定 6 种不同质量浓度的没食子酸标准溶液。以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归, 没食子酸在 5.0~80.0 μ g/mL 质量浓度范围内线性关系良好。回归方程为: $Y = 1.066X - 2.064$, $r = 0.9986$ 。在优化的色谱条件下, 对 40.0 μ g/mL 的没食子酸标准溶液连续测定 6 次, 峰面积的相对标准偏差为 1.34%。

2.4 其他有机酸的影响

按 1.3 节的色谱条件测定 10.0 μ g/mL 没食子酸标准溶液, 以峰面积定量, 测定结果见图 1。

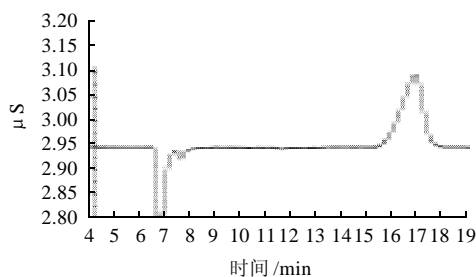


图1 10.0 μ g/mL 没食子酸色谱图

Fig.1 Chromatogram of gallic acid at the concentration of 10.0 μ g/mL

茶叶化学组成复杂, 含有多种无机阴离子和有机酸。为研究茶叶中可能存在的物质对没食子酸测定的影

响,在优化的色谱条件下测定由 F^- 和其他茶叶中常见的9种有机酸组成的混合标准溶液。结果(图2)表明, F^- 和其他8种酸都不会干扰没食子酸的测定。

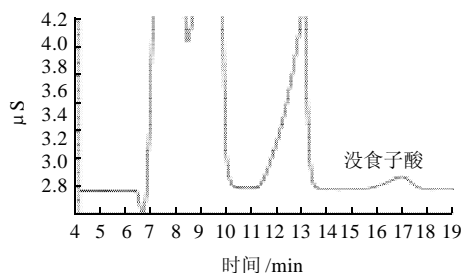


图2 10.0 μg/mL 混合标准溶液的色谱图

Fig.2 Chromatogram of mixed fluoride, gallic acid (10.0 μg/mL), 9 common organic acids standards

2.5 加标回收率实验

分别在4种不同的绿茶浸出液中添加与样品溶液等体积的标准溶液,按照优化的色谱条件进行测定,得到的加标回收率见表1。

2.6 实际样品测定

将处理好的样品按照1.3节色谱条件进行色谱分析,色谱图见图3,测定结果见表2。

表1 加标回收率实验结果

Table 1 Recoveries for gallic acid in 4 tea samples

样品	本底值/ (μg/mL)	加标值/ (μg/mL)	测定值/ (μg/mL)	加标 回收率/%
西湖龙井	40.49	40.00	76.98	91.3
翠玉竹	22.57	20.00	39.98	87.1
正清河银螺	18.16	20.00	36.32	90.8
润东龙井	14.28	15.00	28.79	96.7

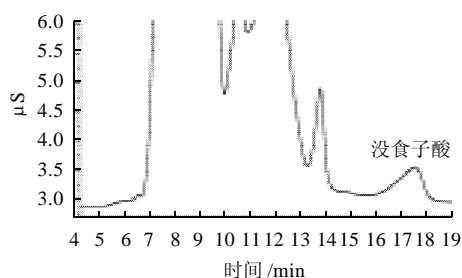


图3 实际样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of a real sample

由图3、表2可知,在所测定的4种绿茶样品中,均含有没食子酸,且茶叶中存在的其他物质不会对没食子酸的测定产生干扰。每种茶叶中没食子酸的含量不同,其中,西湖龙井茶中含量最高。样品平行取样3次,经测定,平行样品间的相对标准偏差在1.404%~5.439%之间。这表明,本方法可用于实际样品的测定。

表2 实际样品测定结果

Table 2 Determination results of real samples

样品	样品溶液中没食子酸 质量浓度/(μg/mL)	没食子酸 含量/(mg/g)	RSD /%
西湖龙井	80.976	1.350	5.439
	82.826	1.380	
	74.594	1.243	
润东龙井	28.553	0.476	2.665
	30.136	0.502	
	29.454	0.491	
正清河银螺	36.322	0.605	1.408
	37.204	0.620	
	37.184	0.620	
翠玉竹	45.139	0.752	1.404
	44.055	0.734	
	44.044	0.734	

3 结 论

本实验建立了离子排斥色谱法测定绿茶中没食子酸含量的方法。绿茶中含有多种有机酸,但常见有机酸的极性和离解的难易程度与没食子酸差异很大,所以对没食子酸的测定基本无影响。实验证明,该方法样品前处理简单,操作简便、快速,检测成本低,分析结果可靠。

参考文献:

- [1] 陈金娥,丰慧君,张海容. 红茶、绿茶、乌龙茶活性成分抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 62-66.
- [2] WANG Huafu, HELLIWELL K, YOU Xiaoping. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC[J]. Food Chemistry, 2000, 68(1): 115-121.
- [3] 赵洁,田庆伟. 绿茶儿茶素抗癌作用机理的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2003(2): 26-28.
- [4] 朱博,夏涛,高丽萍,等. 绿茶茶汤中黄酮醇及其苷类的测定方法以及对茶汤色度的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 146-150.
- [5] LU Yong, JIANG Feng, JIANG Hao, et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells[J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 641(2/3): 102-107.
- [6] YOU B R, MOON H J, HAN Y H, et al. Gallic acid inhibits the growth of *Hela cervical* cancer cells via apoptosis and/or necrosis[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(5): 1334-1340.
- [7] CHANWITHEESUK A, TEERAWUTGULRAG A, KILBUM D, et al. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk[J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 1044-1048.
- [8] 郭炳莹,阮宇成,程启坤. 没食子酸与绿茶品质的关系[J]. 茶叶科学, 1990, 10(1): 41-43.
- [9] 郭俊凌,寇鹏骐,卿钰,等. 离子萃取分离可见分光光度法测定茶叶中没食子酸含量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10354-10355.
- [10] 彭燕,苗爱东,王本富,等. 差示分光光度法测定西帕依固根液中没食子酸的含量[J]. 中成药, 2008, 30(5): 13-14.
- [11] ZUO Yuegang, CHEN Hao, DENG Yiwei. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector[J]. Talanta, 2002, 57(2): 307-316.
- [12] 董威严,牛凤兰,程舸. 高效液相色谱法测定菱角中的没食子酸含量[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 334-335.
- [13] 邓科君,张艺,王平,等. 反相高效液相色谱法同时测定藏药广枣中没食子酸和原儿茶酸的含量[J]. 色谱, 2006, 24(6): 652-653.
- [14] 李爱群,蔡葵花,林励. 薄层扫描法测定利喉乐含片中没食子酸的含量[J]. 分析测试学报, 1991, 18(1): 64-65.
- [15] SHARMA O P, BHAT T K, SINGH B. Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 822(1): 167-171.