

(三)流动相的不同 pH 对  $k'$  的影响如图 1。由图 1 可见,当  $\text{pH} > 5.5$  时,组分的  $k'$  值基本不受 pH 的影响;当  $\text{pH} < 5.5$  时,  $k'$  值( $V_{B_2}$  除外)均随 pH 的降低而增加。其中  $k'$  值较大的  $V_{B_1}$ 、 $V_{B_6}$  的变化尤为明显,而  $V_{B_2}$  稍有相反趋势的变化。这说明流动相的 pH 对该样品的分离起着重要的作用。我们可根据不同的分离要求控制适宜的 pH。

(四)流动相中微量三乙胺的变化对  $k'$  的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出,七种维生素的  $k'$  值均随三乙胺量的增加而降低,其中  $V_{B_2}$ 、 $V_{B_{12}}$  最为显著。另外,组分的流出顺序(与图 1 相比)也发生了较大改变, $V_{B_1}$ 、 $V_{B_6}$  的  $k'$  值大大提前( $V_{B_2}$ 、 $V_{B_{12}}$  则推迟),同时拖尾现象明显改善。该结果进一步证实了在流动相中加入三乙胺碱性调节剂,可以消除碱性物质的拖尾现象<sup>(6)</sup>,特别对于含有叔胺结构的  $V_{B_1}$  更有明显的作用。原因是流动相中加入三乙胺有消除固定相表面残余 Si—OH 基的吸附作用,从而使  $V_{B_1}$ 、 $V_{B_6}$  碱性组分的吸附作用减少,流出加快,峰形改善。

(五)综上所述,对于多种水溶性维生素在 Lichrosorb RP-18 柱上的分离而言,流动相体系以甲醇-醋酸盐缓冲液加微量三乙胺较为理想。其中,甲醇的量在 20—30%,HAc-NaAc 缓冲液的 pH 为 4.0~5.0(浓度 0.2mol/L),三乙胺的量在 0.02~0.03% 为宜。在该条件下,16 分钟内可分离出七种维生素(图 3)。由此可见,在  $C_{18}$  柱上甲醇-醋酸盐缓冲液加微量三乙胺分离多种水溶性维生素是一种理想的流动相体系,可以代替梯度洗脱或离子对色谱法,这不仅降低了成本,而且也避免了操作上的麻烦及重复性差给定量分析带来的困难。

参考文献

[1] 高速液体クロマトグラフデータ集 13, No. 2462, 2465.  
 [2] F. L. Lam, A. J. Lowande, Biomed. Anal., 6(1), 87(1988).  
 [3] 张 怡等,药物分析杂志,8(1),30(1988).  
 [4] 戴 军等,第七次全国色谱学术报告会文集,上册, P. 277, 北京, 1989.  
 [5] 马志超等,第七次全国色谱学术报告会文集,上册, P. 284, 北京, 1989.  
 [6] L. R. 斯奈德, J. J. 柯克兰,《现代液相色谱法导论》, 第二版, 高 潮等译, 化学工业出版社, 北京, P. 305, 1988.

(收稿日期:1992年1月13日,修回日期:7月5日)

Improved Separation of Seven Water-Soluble Vitamins on  $C_{18}$  Column with Methanol-Salts and Micro Amount of Triethylamine as Eluent Zhao Houmin, Zhou Xiaoping and Wang Peng, Physical & Chemical Test Technique Institute of Jiangsu Province, Nanjing, 210002

The condition of simultaneous separation of vitamins C,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_6$ ,  $B_{12}$ , nicotinic acid and nicotinamide by reversed-phase HPLC has been studied. Relations of  $k'$  and various eluting agents were given. A solution of methanol : 0.2mol/L<sup>-1</sup> HAc-NaAc buffer solution (pH 4.55) : triethylamine (25 : 75 : 0.02) was used as mobile phase with column temperature of 35°C and UV-254nm detection.

高效液相色谱法测定茶叶中儿茶素组分的含量

熊凤麒 袁吕江

(西南农业大学中心实验室,重庆,630716)

吕才有

(西南农业大学食品学系,630716)

儿茶素属于黄烷醇类化合物,在茶叶中含量较高。现代科学研究已证明儿茶素类物质除了具有直接的抗衰老作用外,还有诸多的保健作用:(1)可抑制亚硝酸胺的形成,亚硝酸胺被认为是一种强致癌物质;(2)能降低血浆中的总胆固醇;(3)有良好的抑菌效果和较强的抗氧化活性,其抗氧化效果优于维生素 E;(4)具有抗辐射和抗癌作用。对于儿茶素的测定方法的研究,国外特别是日本较多<sup>(1-3)</sup>。现已从

过去使用的纸色谱法、薄层色谱法转为气相色谱法和高效液相色谱法<sup>(4)</sup>。但国内对儿茶素组分的测定方法还未见报道<sup>(5)</sup>。本文采用反相液相色谱法测定了不同茶叶中儿茶素组分的含量,该方法分离效果令人满意,重现性及回收率均好。

实验部分

(一)仪器的色谱条件

1. 液相色谱仪 Waters 公司产品。

2. 色谱柱  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$  3.9mm i. d.  $\times$  300mm。

3. 流动相 乙酸: 甲醇: *N,N*-二甲基甲酰胺: 水=2: 3: 35: 160; 流量梯度洗脱: 0—16min 为 1.5ml/min; 16min 以后逐渐增至 2ml/min; 检测波长 280nm; 色谱分析时间为 46min。5 种儿茶素按 *L*-EGC (*L*-(-)-表没食子儿茶素)、*D*-C (*D*-(+)-儿茶素)、*L*-EC (*L*-(-)-表儿茶素)、*L*-EGCG (*L*-(-)-表没食子基儿茶素没食子酸酯)、*L*-ECG (*L*-(-)-表儿茶表没食子酸酯) 的顺序出峰。

(二) 试剂

丙酮、正戊烷、三氯甲烷、95%乙醇、甲醇、乙酸、*N,N*-二甲基甲酰胺等, 所有试剂均为分析纯。

(三) 标准溶液的配制

准确称取 5 种儿茶素组分标样(由日本三井农林株式会社食品综合研究所提供) 各 0.0100g 于同一 10ml 棕色容量瓶中, 用 95% 的乙醇定容至刻度, 此溶液用纯水经不同程度稀释后制作标准曲线。

(四) 样品处理过程

准确称取 1.0000g 茶样于烧杯中, 加 80% 的丙酮水溶液 90ml 浸泡 24 小时, 过滤, 滤液用 80% 的丙酮水溶液定容至 100ml。取该溶液 50ml 于 250ml 分液漏斗中, 加入 50ml 正戊烷, 振摇萃取, 弃去上层正戊烷, 下层液加 50ml 氯仿, 振摇萃取后弃去下层氯仿。上层溶液减压蒸发除去丙酮后用水定容至 25ml。离心后取上清液 30 $\mu$ l 注入 HPLC 仪, 用外标法测定儿茶素组分的含量。

结果与讨论

(一) 茶样经 80% 的丙酮水溶液浸泡 24 小时, 除儿茶素外, 叶绿素、咖啡碱等皆被提取。这些物质的存在对儿茶素的检出会有干扰。加正戊烷萃取时, 可除去叶绿素的干扰; 加氯仿萃取时, 可除去咖啡碱的干扰。

表 1 不同提取方法对儿茶素测定结果的影响

样品名称	水提结果 (mg/g)	丙酮提结 果(mg/g)	水提/丙酮提 (%)	未提出 (%)
康砖茶	15.18	24.39	62.28	37.72
云南七子饼	10.86	18.44	58.84	41.16
茯砖茶	4.72	8.56	55.84	44.16
云南砖茶	58.70	91.72	64.00	36.00

(二) 本试验选用固定相为  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$ , 流动相为乙酸-甲醇-*N,N*-二甲基甲酰胺-水的反相色谱

系统, 采取梯度洗脱, 在此条件下样品中的儿茶素组分峰能与杂质峰较好的分开(图 1、2), 色谱分析时间为 46 分钟。

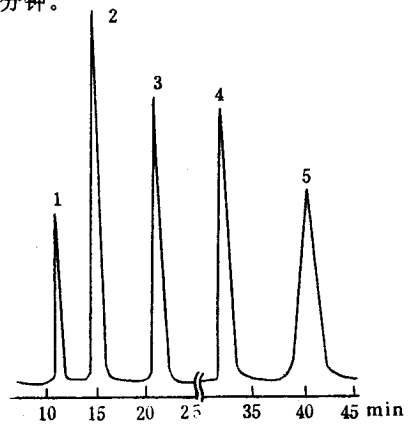


图 1 儿茶素组分标样色谱图

1. *L*-EGC, 2. *D*-C, 3. *L*-EC, 4. *L*-EGCG, 5. *L*-ECG.

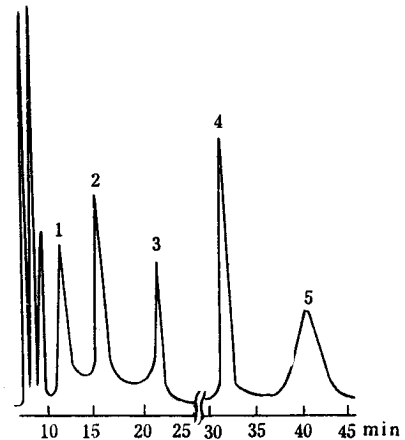


图 2 茶样分析色谱图

1. *L*-EGC, 2. *D*-C, 3. *L*-EC, 4. *L*-EGCG, 5. *L*-ECG.

(三) 茶样中的儿茶素可直接用沸水提取后上机分析, 此法不但简单易行, 而且代表了平时饮茶茶汤中儿茶素的含量, 可真实地反映茶叶中儿茶素对人体的药理保健功能及价值。但沸水提取法对茶叶中儿茶素的提取不完全, 约有儿茶素全量的 40% 左右不能被浸提出来(见表 1), 故沸水提取法不能用作茶叶中儿茶素的全量分析。

(四) 我们同时用纸质谱法分析了这几个样品, 纸质谱法时间长(30~40 小时), 灵敏度低, 准确性差, 且分析手段繁琐。

(五) 以儿茶素组分标样的进样量对峰面积作图, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 经直线回归, 线性关系良好(见表 2)。

(六) 向茶样中添加儿茶素组分标样后测定其回收率, 结果见表 2。

表2 峰面积\*与进样量的线性关系

进样量 ( $\mu\text{g}$ )	L-EGC			D-C			L-EC			L-EGCG			L-ECG		
	峰面积	S	CV%	峰面积	S	CV%	峰面积	S	CV%	峰面积	S	CV%	峰面积	S	CV%
1	698749	29208	4.2	2108953	79929	3.8	1989674	44768	2.2	4373429	117645	2.7	1100621	34890	3.2
2	812758	17637	2.2	3008201	129653	4.3	2876901	89759	3.1	5276740	267531	5.1	5136921	151025	2.9
3	1002385	50219	5.0	4707109	121443	2.6	4039847	109486	2.7	6387098	265703	4.2	10059277	488881	4.4
4	1198751	49389	4.1	5957999	179932	3.0	5876740	175127	3.0	7247824	194242	2.7	16787846	666477	4.0
5	1378241	54716	4.0	6910435	149956	2.2	7248371	301532	4.2	8381581	252316	3.1	225001326	39004	2.8
	$y=0.9963$			$y=0.9951$			$y=0.9909$			$y=0.9991$			$y=0.9958$		

\*峰面积为五次测定结果的平均值。

表3 添加儿茶素组分标样后的回收率

样品编号		L-EGC	D-C	L-EC	L-EGCG	L-ECG
1	未加标准测定值(mg)	0.302	0.303	0.285	0.365	0.379
	添加标准量(mg)	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
	实测结果(mg)	0.347	0.351	0.333	0.414	0.429
	回收率(%)	90.01	95.74	96.49	97.38	99.12
2	未加标准测定值(mg)	0.039	0.029	0.068	0.041	0.040
	添加标准量(mg)	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
	实测结果(mg)	0.084	0.077	0.117	0.086	0.089
	回收率(%)	90.13	95.46	97.14	94.09	98.73
3	未加标准测定值(mg)	0.080	0.033	0.080	0.123	0.053
	添加标准量(mg)	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
	实测结果(mg)	0.125	0.082	0.128	0.171	0.104
	回收率(%)	90.16	97.08	96.56	95.87	101.56
4	未加标准测定值(mg)	0.199	0.009	0.041	0.106	0.134
	添加标准量(mg)	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050
	实测结果(mg)	0.245	0.056	0.090	0.155	0.181
	回收率(%)	91.07	94.32	98.17	98.26	94.67
	平均回收率(%)	90.34	95.65	97.08	96.40	98.52

表4 不同茶样中儿茶素组分的含量  
(mg/g, 5次测定平均结果)

样品	L-EGC	D-C	L-EC	L-EGCG	L-ECG
云南七子饼茶	3.98	1.67	3.99	6.15	2.65
康砖茶	9.93	0.43	2.05	5.28	6.70
茯砖茶	1.44	0.23	1.06	3.35	2.48
云南砖茶	17.11	17.16	16.24	20.27	20.94
普洱方茶	6.17	7.98	4.19	36.97	26.47
普洱散茶	1.57	1.85	3.26	2.24	8.75

参考文献

[1] 永田中博, 茶叶技术研究, (61), 6(1981).  
 [2] 中川致之, 茶叶技术研究, (58), 38(1980).  
 [3] 池久谷贤次郎, 茶业研究报告, (71), 11(1990).

[4] 程启坤, 国外茶叶动态, (3)21, (1980).  
 [5] 商业部茶叶畜产局、商业部杭州茶叶加工研究所编著, 《茶叶品质理化分析》, 上海科学技术出版社, 32页, 1989.

(收稿日期: 1992年1月23日, 修回日期: 5月2日)

Determination of Catechin in Tea Products by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)  
 Xiong Fengqi, Yuan Lüjiang and Lü Caiyou,  
 Southwest Agricultural University, Chongqing, 630716

This paper describes an HPLC method for determining L-EGC, D-C, L-EC, L-EGCG, L-ECG in tea products. The operation conditions were:  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> column, Acetic acid : methanol : N,

*N*-dimethylformamide : water (2 : 3 : 35 : 160) as mobile phase, 1.5ml/min flow rate in the first sixteen minutes, then 2ml/min and UV-280nm detec-

tor. The coefficients of variation were less than 5%, and the recoveries were more than 90%.

## 高效液相色谱法测定赤霉素 A<sub>3</sub> 的含量

张 政 张 强\* 王转花

(山西大学分析测试中心,\* 分子科学研究所,太原,030006)

赤霉素(Gibberellins)是一族重要的植物生长调节剂,各种同系物中以赤霉素 A<sub>3</sub> 的生理活性为最强,农用赤霉素质量的高低也以 A<sub>3</sub> 的含量来确定。现通用的荧光比色法只能测定赤霉素各组分的总含量<sup>[1]</sup>,不能检测出各有效组分,特别是对其主要成分 A<sub>3</sub> 的含量不能准确测定。本文用 C<sub>18</sub> 径向加压短柱和甲醇-水溶剂系统对山西交城制药厂等厂家生产的农用赤霉素进行了测定,得到较为满意的结果。本法可用于农用赤霉素中主要成分 A<sub>3</sub> 含量的测定。

### 实验部分

(一)仪器与试剂 Waters 液相色谱仪,包括 510 泵、M441 紫外检测器、730 数据处理机、U6K 进样器。甲醇,液相色谱用溶剂,黄岩化学试剂厂产;乙酸,分析纯;赤霉素 A<sub>3</sub> 标准品, Sigma 产品;农用赤霉素,上海十八制药厂、山西交城制药厂产品。

(二)色谱条件 Radial-Pak C<sub>18</sub> 径向加压柱, 10cm × 6mm;流动相: 甲醇:水(1%乙酸)=34:66;流速:2ml/min;检测波长,254nm<sup>[2]</sup>;柱温 30℃;纸速:5mm/min。

(三)标准溶液 1. 精确称取赤霉素标准品 100mg,用甲醇溶解并定容至 50ml,配成 0.1mg/ml 至 2.0mg/ml 的标准溶液。2. 称取农用赤霉素结晶粉 100mg,用甲醇溶解并定容至 50ml,经 0.45μm Millipore 微孔滤膜过滤后配成 0.1mg/ml 至 2.0mg/ml 的样品溶液。

### 结果与讨论

(一)以甲醇-水为流动相时,色谱峰型不好,拖尾程度较严重。加入甲酸、乙酸、磷酸后可使峰型得到改善<sup>[3]</sup>。经对比试验,当甲醇:水(1%乙酸)=34:66 时可获得理想的色谱图(图 1),赤霉素 A<sub>3</sub> 组分的保留时间为 5.30min。

(二)取赤霉素 A<sub>3</sub> 系列标准溶液,各进样 5μl,以进样量(μg)对峰面积(μV · sec)作图,线性关系良好,相关系数  $r = 0.9984$ ,回归方程为  $Y = 1.095 \times 10^7 X - 2.668 \times 10^5$  ( $n = 10$ )。

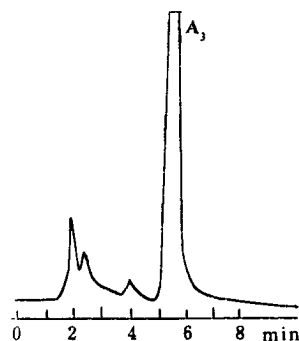


图 1 赤霉素结晶粉液相色谱图

(三)在样品溶液中加入已知量的标样溶液测定其回收率,结果见表 1。

表 1 回收率测定结果 (n=5)

编号	已知量 (μg/ml)	加入量 (μg/ml)	实测值 (μg/ml)	回收率 (%)	变异系数 (CV%)
1	180.0	100.0	281.7	100.6	0.92
2	200.0	100.0	309.9	103.3	1.80
3	220.0	100.0	325.0	101.6	1.65

(四)对同一样品 A<sub>3</sub> 含量重复 7 次测定,检验方法的精密性,结果  $\bar{X} = 82.64\%$ ,  $SD = 1.33$ ,  $CV = 1.8$ ,重现性较好。

(五)用反相 HPLC 方法可将农用赤霉素各组分较好地分开。由于缺少其它组分的标准品,未能确定其它组分的类型,但不影响对主要组分 A<sub>3</sub> 含量测定。Radial-Pak C<sub>18</sub> 径向加压短柱具有流速较快,出峰迅速的优点。但其柱效较低,连续工作时需用流动相每日洗柱 1 到 2 次,每次 30min,以保证分离效果。样品不纯时,每进样 60 至 80 次应更换 Guard-Pak 预柱,以延长柱使用寿命。赤霉素具有生理活性,在溶液状态下不稳定,样品应现用现配,一次测