

亲水性 C₁₈ 硅胶反相色谱柱同时分离测定 红茶中的有机酸

张 静¹, 蒋华军¹, 刘仲华^{1,2*}, 陈金华¹, 林 勇^{1,2}, 邹文敏¹

(1. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 长沙 410128; 2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 长沙 410128)

摘要: **目的** 使用亲水性 C₁₈ 硅胶反相色谱柱同时分离测定红茶中 11 种有机酸。 **方法** 经 ACCHROM XAqua C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)分离, 以 0.1% 三氟乙酸-乙腈为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 214 nm。 **结果** 11 种有机酸在 13 min 内实现基线分离, 平均回收率为 92.07%~101.64%, 相对标准偏差为 0.54%~1.93%, 各有机酸线性相关系数 $r > 0.9986$ 。对不同产地 6 个红茶样品进行测定, 云南凤庆红茶样品有机酸含量最高(668.62 mg/L), 锡兰红茶样品含量最低(386.67 mg/L); 红茶有机酸以草酸为主, 含量范围在 119.67~193.18 mg/L; 乳酸(0~193.43 mg/L)和乙酸(36.62~193.98 mg/L)含量在不同产地红茶样品中相对差异较大。 **结论** 本实验建立了一种较准确、高效、简便的茶叶有机酸检测技术与方法, 运用此方法测定不同产地红茶有机酸含量并分析与比较不同红茶的有机酸组分差异性, 并为红茶品质风味的审评及加工工艺改良提供一定数据参考。

关键词: 亲水性 C₁₈ 硅胶反相色谱柱; 有机酸; 红茶

Simultaneous separation and determination of organic acids in black tea by high performance liquid chromatography using polar-enhanced C₁₈ column

ZHANG Jing¹, JIANG Hua-Jun¹, LIU Zhong-Hua^{1,2*}, CHEN Jin-Hua,
LIN Yong^{1,2}, ZOU Wen-Min¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Tea Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
2. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous separation and determination of 11 kinds of organic acids in black tea by reversed-phase high performance liquid chromatography on a polar-enhanced C₁₈ column. **Methods** Separation was achieved using an ACCHROM XAqua C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), under the gradient elution with the mobile phase of acetonitrile and 0.1% (v:v) formic acid/water, 1.0 mL/min, 25 °C and detection at 214 nm. **Results** The separation was easily completed in 13 min and the recoveries of 11 kinds of organic acids were from 92.07% to 101.64%, with the relative standard deviation between 0.54%~1.93%, and the coefficients of correlation were not less than 0.9986. Six black tea

基金项目: 国家茶叶产业技术体系项目(茶叶功能成分利用 CARS-23-10B)

Fund: Supported by the Project of National Tea Industry Technology System (Utilization of Tea Functional Ingredient CARS-23-10B)

*通讯作者: 刘仲华, 教授, 博士, 主要研究方向为茶叶功能成分化学。E-mail: larkin-liu@163.com

*Corresponding author: LIU Zhong-Hua, Professor, Ph.D, College of Horticulture and Landscape Architecture, Hunan Agricultural University, the eleventh teaching building of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China. E-mail: larkin-liu@163.com

samples from different districts were determined, the organic acids contents of the sample from Fengqing, Yunnan was the highest (668.62 mg/L), while Ceylon tea sample was the lowest (386.67 mg/L); the oxalic acid occupied the highest ratio in black tea organic acids and varied from 119.67~193.18 mg/L in 6 samples, and the contents fluctuation of lactic acid and acetic acid were relatively larger in 6 samples as 0~193.43 mg/L and 36.62~193.98 mg/L, respectively. **Conclusion** This experiment has established a relatively accurate, efficient, convenient detection technology and method of organic acids in tea, using the method to detect organic acid contents in black tea from different regions. It provided some reference data for sensory evaluation of black tea quality and flavor and improving the processing technology by analyzing and comparing the differences of organic acid group in different black tea.

KEY WORDS: polar-enhanced C₁₈ column; organic acids; black tea

1 引 言

有机酸是茶叶香气和滋味的主要成分之一, 同时, 有机酸能有效增强茶多酚抗氧化性能, 对茶多酚激活 α -淀粉酶、胰蛋白酶酶活性具有协同效应, 促进儿茶素在人体中吸收以及调节妇女经期、减轻关节炎、痛风等生理功能^[1-5]。目前茶叶中发现的有机酸有 40 余种, 其中, 茶汤中有 10 余种, 香气成分中有 30 余种^[6]。红茶发酵是其品质特征形成的关键工序, 发酵过程中有机酸含量逐渐增加并对红茶风味品质产生重要影响^[7-8]; 不同产地红茶因原料品种、制作工艺等因素不同, 其有机酸组成与含量可能存在差异。食品中现行有机酸分析方法主要有气相色谱法、离子色谱法、反相高效液相色谱法等, 但是本课题组在采用前人^[9-11]建立的高效液相色谱法应用于茶叶中有机酸测定时, 发现现有方法存在以下不足: 方法色谱体系平衡稳定时间过长, 一般为目标有机酸实际进样检测所需时间的四倍左右;

流动相中有机相与无机相的比例过高, 易导致保留时间漂移, 检测重复性较差; 柱温要求一般为非室温条件, 实验过程中难稳定控制。为解决上述问题, 本研究采用创新亲水键合相 C₁₈ 反相色谱柱材料, 构建了亲水反相高效液相色谱法同时分离测定红茶中 11 种有机酸的方法, 并对锡兰红茶(斯里兰卡)、宁红(江西)、凤庆红茶(云南)、大唐英红(广东)、祁门红茶(安徽)以及石门红茶(湖南)中的有机酸种类和含量进行了测定, 以期为后续我国红茶制品风味评价与综合质量控制体系的构建提供相关化学参考依据。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

草酸、酒石酸、甲酸、乳酸、乙酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸、丙酮酸和抗坏血酸标准品(购自 Sigma 公司, 乳酸: 纯度 88%; 其他有机酸: 纯度 98%); 乙腈(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 三氟乙酸(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 水为超纯水。

红茶样品由湖南省茶业集团股份有限公司提供, 分别产自斯里兰卡(锡兰红茶)、江西修水(宁红)、云南凤庆(滇红)、广东英德(大唐英红)、安徽祁门(祁红)、湖南石门(石门红茶)。

2.2 仪器与设备

LC-10ATVP 高效液相色谱仪(日本岛津公司); ACCHROM XAqua C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm 华谱新创科技有限公司); Millipore 超纯水机(美国 Millipore 公司); Mettler AE240 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); SHZ-C 型循环水式多用真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); KQ-3200B 型超声波清洗机(上海昆山市超声仪器有限公司); DSY-2-8 恒温水浴锅(北京国华医疗器械厂); 101-3AB 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司); FE20/EL20 型 pH 计(瑞士梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 标准溶液配制

分别准确称取草酸、甲酸、乳酸、乙酸、酒石酸、丙酮酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸和

抗坏血酸标准品,用水溶解并定容至50 mL棕色容量瓶中,配制成单标母液,浓度分别为115.8、131.6、148、1248、205.8、3681、214.2、319.2、340.2、2.78和36.72 $\mu\text{g/mL}$,将上述有机酸溶液配制成混合标准品溶液,标准品溶液用0.45 μm 滤膜过滤后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.3.2 样品前处理

准确称取4.00 g茶叶粉碎样置于500 mL带塞锥形瓶中,加沸水250 mL,在沸水浴中浸提45 min(每隔10 min振摇一次),趁热过滤,并用热水洗涤茶渣并过滤2~3次,冷却后加水定容至250 mL,滤液置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.3.3 色谱条件

色谱柱:ACCHROM XAqua 亲水性 C_{18} 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm);流速:1.0 mL/min;进样体积:20 μL ;检测波长:214 nm;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流动相:A-0.1%三氟乙酸,B-乙腈;梯度洗脱程序:0~12 min,0% B;12~15 min,0%~28% B。

3 结果与分析

3.1 色谱柱的选择及分离条件的优化

常规烷基键合相主要依靠疏水作用实现对化合物的保留和分离,但对极性化合物保留较弱,极性选择性不足;同时,常规的烷基键合相在高水流动相条件下易发生“疏水塌陷”,在分离极性小分子样品时效果不理想,本课题组在应用前人建立

常规高效液相色谱方法检测茶叶中有机酸类化合物时发现到上述方法缺陷。本实验采用的创新材料亲水性ACCHROM XAqua C_{18} 色谱柱使用独特的“极性共聚”专利技术,调控和优化表面键合相中的极性基团与疏水基团,结构上的特点既保证了反相色谱的疏水选择性,又提高了其极性选择性和填料表面浸润性;另一方面,亲水性 C_{18} 填料可以使用100%水溶液作为流动相,并对酸性和碱性化合物具有优异的分选性能,为极性化合物提供了良好的保留与分离选择性。

在2.3.3色谱条件下,11种有机酸进行了良好分离(见图1)。目标有机酸在前13 min中已经全部出峰,基本是在纯水相的条件下分离,样品测试的重复性高,样品测试时间短,为执行批量样品序列分析提供了保障;同时,柱温维持在室温条件下即能有效实现目标有机酸的分离。通过新型亲水反相色谱柱的选择和分离条件筛选,有效解决了文献已报道方法在茶叶有机酸类化合物检测实践中遇到的问题。

3.2 线性范围和检出限

精密量取2.3.1节所述取标准品母液,逐级稀释2、4、6、8倍及母液配制成五种不同浓度的混合对照品工作标准溶液,按2.3.3的色谱条件分别进样20 μL ,记录峰面积。以各对照品质量浓度 $X(\text{mg/L})$ 为横坐标,其峰面积 Y 为纵坐标,每个浓

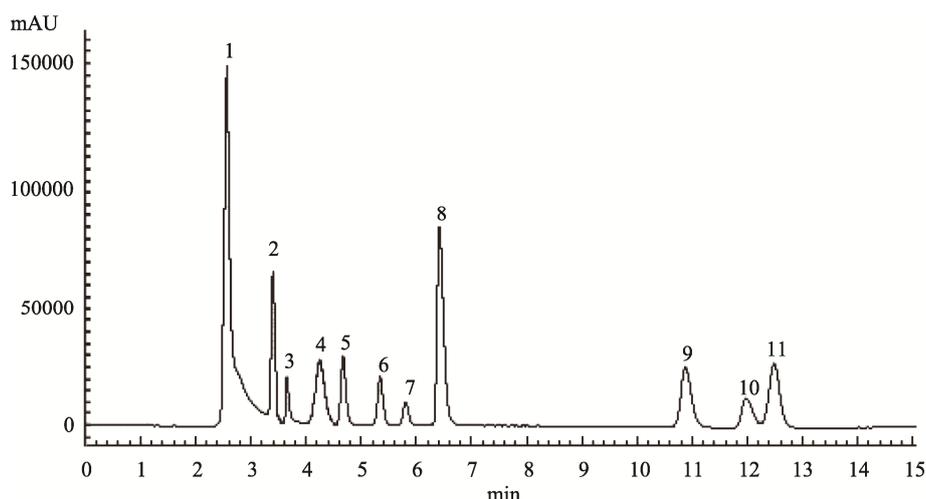


图1 11种有机酸混合标准溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of a mixture of 11 organic acids standards

1. 草酸; 2. 酒石酸; 3. 甲酸; 4. 丙酮酸; 5. 苹果酸; 6. 抗坏血酸; 7. 乳酸; 8. 乙酸; 9. 柠檬酸; 10. 琥珀酸; 11. 富马酸。

度进两个平行样, 以峰面积平均值 Y 对质量浓度 X 作图, 绘制标准曲线, 得到 11 种有机酸类物质的线性范围、线性回归方程及相关系数。以仪器信噪比(S/N)确定有机酸的最低检出限(LOD, $S/N = 3$), 结果见表 1。

3.3 稳定性实验

取标准品储备液, 室温条件下放置, 分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 进样分析($n=3$), 计算并确定其稳定性。除抗坏血酸和酒石酸外, 其他有机酸峰面积 RSD 均小于 1.00%, 在 12 h 内含量保持相对稳定。抗坏血酸稳定性明显较差, 为 4.22%, 因此, 实验中抗坏血酸应尽量现配现用并严格在低温避光条件下保存较好, 结果见表 1。

表 1 11 种有机酸的线性方程、相关系数、检测限及稳定性

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, limits of detection and stability of 11 kinds of organic acids

有机酸	回归方程	相关系数 (r^2)	检测限 (μg)	稳定性 RSD (%)
草酸	$Y=6324.6X-40245$	0.9992	0.010	0.31
酒石酸	$Y=1342.8X-9501.1$	0.9995	0.024	1.39
甲酸	$Y=747.94X-12599$	0.9986	0.018	0.89
丙酮酸	$Y=0.4957X+31.600$	0.9999	0.083	0.56
苹果酸	$Y=831.16X+513.37$	1.0000	0.167	0.53
抗坏血酸	$Y=15538X-15262$	0.9998	0.021	4.22
乳酸	$Y=423.27X+1164.7$	0.9996	0.108	0.56
乙酸	$Y=553.84X+1932.1$	0.9999	0.122	0.34
柠檬酸	$Y=1016.6X-863.50$	0.9995	0.435	0.61
琥珀酸	$Y=472.99X+248.04$	0.9998	1.562	0.24
富马酸	$Y=137747X-563.26$	0.9995	1×10^{-5}	0.61

3.4 精密度及加标回收率实验

取已知各有机酸含量的同一品种红茶样品 2 份, 分别添加一定量的 11 种有机酸标准品溶液后测定各成分含量, 每份样品连续进行 6 次平行测定, 计算本实验测定方法的回收率和相对标准偏差, 表 2 结果表明本方法加标回收率较高, 稳定性好, 可满足实际样品的检测要求。

表 2 11 种有机酸的加标回收率和精密度($n=6$)
Table 2 Spiked recoveries and precisions of 11 kinds of organic acids ($n=6$)

有机酸	原始量 (mg/L)	添加量 (mg/L)	测得量 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
草酸	129.09	50	175.29	97.88	0.54
		100	224.89	98.17	0.65
酒石酸	51.40	5	53.42	94.72	1.13
		10	58.14	94.69	1.16
甲酸	42.69	5	45.32	95.03	0.77
		10	50.05	94.99	0.79
丙酮酸	1.24	2	3.04	93.83	1.07
		4	4.96	94.66	1.31
苹果酸	13.29	5	17.53	95.84	0.66
		10	22.49	96.57	0.74
抗坏血酸	4.90	2	6.43	93.19	1.77
		4	8.25	92.70	1.93
乳酸	193.43	50	226.27	92.95	1.00
		100	273.48	93.20	1.04
乙酸	135.28	50	170.58	92.07	1.66
		100	216.88	92.18	1.47
柠檬酸	54.70	5	57.06	95.58	0.64
		10	62.09	95.97	0.72
琥珀酸	22.94	5	26.01	93.09	0.88
		10	31.06	94.29	0.97
富马酸	0.27	2	2.29	100.88	0.82
		4	4.34	101.64	0.90

3.5 样品含量测定

利用上述建立的测定有机酸的分析方法, 对不同产地 6 个红茶样品中有机酸进行测定, 结果见表 3, 样品液相色谱图谱见图 2。

由表 3 可知, 从不同产地红茶中检测到草酸、酒石酸、甲酸、丙酮酸、苹果酸、抗坏血酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸和富马酸 11 种有机酸。从整体上看, 草酸和乙酸为检测红茶样品中主要的有机酸, 以草酸含量最高(119.67~193.18 mg/L), 平均值为 144.21 mg/L, 占总有机酸含量 19.31%~30.95%, 而且变异系数较小, 为 18.23%; 乙酸含量次之(36.62~193.98 mg/L), 平均值为 138.37 mg/L,

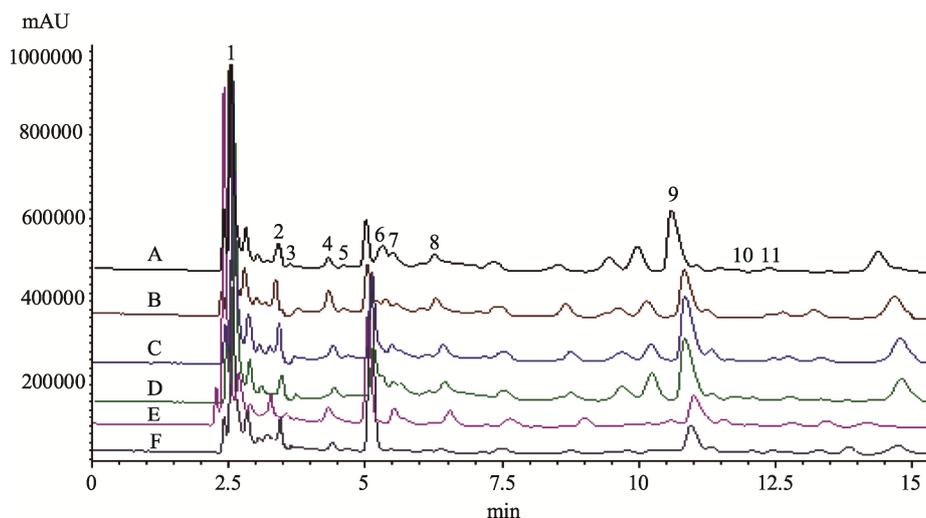


图2 6个红茶样品有机酸色谱图

Fig. 2 Organic acids chromatograms of 6 black tea samples

A 凤庆红茶, B 江西宁红, C 祁门红茶, D 大唐英红 E 石门红茶 F 锡兰红茶

1. 草酸; 2. 酒石酸; 3. 甲酸; 4. 丙酮酸; 5. 苹果酸; 6. 抗坏血酸; 7. 乳酸; 8. 乙酸; 9. 柠檬酸; 10. 琥珀酸; 11. 富马酸.

表3 不同产地6个红茶样品中有机酸含量

Table 3 Content of organic acids in 6 kinds of black tea samples (mg/L)

有机酸	草酸	酒石酸	甲酸	丙酮酸	苹果酸	抗坏血酸	乳酸	乙酸	柠檬酸	琥珀酸	富马酸	有机酸总量
凤庆红茶	129.09	51.40	42.69	20.62	13.29	4.90	193.43	135.28	54.70	22.94	0.27	668.62
石门红茶	193.18	71.64	39.68	14.36	9.42	7.28	11.55	193.98	43.64	69.63	0.31	654.66
祁门红茶	137.81	95.54	36.22	22.11	20.07	3.49	19.77	156.59	47.45	61.86	0.33	601.22
江西宁红	133.18	80.98	24.85	27.71	20.62	2.59	36.18	148.65	65.11	57.42	0.34	597.62
大唐英红	152.33	59.06	37.29	20.56	10.98	2.19	0.00	159.09	55.53	23.03	0.39	520.45
锡兰红茶	119.67	63.63	24.14	13.68	23.86	1.48	6.03	36.62	39.61	57.87	0.09	386.67
平均值	144.21	70.38	34.14	19.84	16.37	3.66	44.49	138.37	51.01	48.79	0.29	571.54
最小值	119.67	51.40	24.14	13.68	9.42	1.48	0.00	36.62	39.61	22.94	0.09	386.67
最大值	193.18	95.54	42.69	27.71	23.86	7.28	193.43	193.98	65.11	69.63	0.39	668.62
标准偏差	26.29	16.00	7.80	5.22	5.91	2.13	74.03	53.52	9.27	20.46	0.11	104.58
变异系数/%	18.23	22.74	22.85	26.31	36.10	58.33	166.40	38.68	18.18	41.94	36.87	18.30

占总有机酸含量 9.47%~30.57%，变异系数为 38.68%；红茶中次要有机酸为酒石酸、柠檬酸、琥珀酸、乳酸和甲酸，其中乳酸含量(范围 0~193.43 mg/L)变化范围较大，变异系数为 166.40%，其他有机酸含量变化相对较小；红茶中抗坏血酸、富马酸和丙酮酸含量较低，其中抗坏血酸变异系数相对较高，为 58.33%，抗坏血酸可能由于具有易被氧化分解的不稳定性造成含量较低且变化较大。

不同产地红茶中有机酸总量差别较大，云南凤庆红茶(668.62 mg/L)和石门红茶(654.66 mg/L)有机酸总量较高，祁门红茶和江西宁红次之，大唐英红和锡兰红茶相对较低，其中锡兰红茶含量(386.67 mg/L)最低，仅为云南凤庆红茶有机酸总量的 57.83%。各有机酸组分在不同产地红茶中也存在一定差异，其中乳酸和乙酸的差异相对较大，草酸和琥珀酸次之。

4 结 论

本实验建立了一种使用亲水性 C₁₈ 硅胶反相色谱柱同时分离测定红茶中 11 种有机酸的方法。较已报道的常规烷基键合相应用实例, 该方法对于茶叶中有机酸类化合物具有良好的分离性能, 操作简便快捷, 灵敏度较高, 测定结果准确可靠。

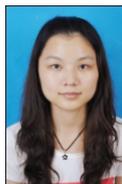
不同产地红茶因原料品种及加工工艺等条件不同使红茶中内含成分及品质存在差异, 其中酸代谢作用对红茶香气的形成与转化有较大影响, 本文所建立分析方法及测定的不同产地红茶有机酸总含量及组分差异性可为红茶品质及风味的审评提供一定的化学物质依据, 同时, 对于如何利用酸代谢作用来优化红茶香气, 改良红茶加工工艺也具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] E Mani-López, HS García, A López-Malo. Organic acids as antimicrobials to control salmonella in meat and poultry products [J]. *Food Res Int*, 2012, 45(2): 713–721.
- [2] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 等. 茯砖茶不同萃取物对消化酶活性的影响[J]. *茶叶科学*, 2008, 28(1): 62–66.
Fu DH, Liu ZH, Huang JH, *et al.* Different effects of Fuzhuan tea extracts on digestive enzyme activities [J]. *J Tea Sci*, 2008, 28(1): 62–66.
- [3] 屠幼英, 须海荣, 梁惠玲, 等. 紧压茶对胰酶活性和肠道有益菌的作用[J]. *食品科学*, 2002, 23(10): 113–116.
Tu YY, Xu HR, Liang HL, *et al.* Effects of three kinds of pressed teas compounds on the activities of three enzymes and two microorganisms [J]. *Food Sci*, 2002, 23(10): 113–116.
- [4] 陈文峰, 王漪, 等. 黑茶紧压茶浸提物对胰蛋白酶活性的影响[J]. *中国茶叶*, 2002, 24(3): 16–17.
Chen WF, Wang Y, *et al.* Influence of extracts of compressed tea on the trypsin activity [J]. *China Tea*, 2002, 24(3): 16–17.
- [5] C. Dufresne, E. Farnworth. Tea, kombucha, and health: A review [J]. *Food Res Int*, 2000, 33(6): 409–421.
- [6] 谭和平, 叶善蓉, 陈丽, 等. 茶叶中有机酸的测试方法概述[J]. *中国测试技术*, 2008, 34(6): 77–80.
Tan HP, Ye SR, Chen L, *et al.* Determination overview of organic acids in tea [J]. *China Meas Urement Technol*, 2008, 34(6): 77–80.
- [7] R. Jayabalan, S. Marimuthu, K. Swaminathan. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation [J]. *Food Chem*, 2007, 102(1): 392–398.
- [8] 陈以义, 江光辉. 红茶变温发酵的理论探讨[J]. *茶叶科学*, 1993, 13(2): 81–86.
Chen YY, Jiang GH. Theoretical approach on the temperature-variable fermentation of black tea [J]. *J Tea Sci*, 1993, 13(2): 81–86.
- [9] 丁玲, 屠幼英, 陈晓敏. 高效液相色谱测定紧压茶中有机酸条件研究[J]. *茶叶*, 2005, 31(4): 224–227.
Ding L, Tu YY, Chen XM. Simultaneous determination of various organic acids in compressed tea by high performance liquid chromatography [J]. *Tea*, 2005, 31(4): 224–227.
- [10] 袁玲, 黄建安, 龚志华, 等. 茯砖茶有机酸反相高效液相色谱分析方法建立及其应用[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(30): 246–252.
Yuan L, Huang JA, Gong ZH, *et al.* Study on development and application technology of analysis method for organic acid in Fu-brick tea by RP-HPLC [J]. *Chin Agric Sci Bulletin*. 2011, 27(30): 246–252.
- [11] 刘盼盼, 钟小玉, 许勇泉, 等. 茶叶中有机酸及其浸出特性研究[J]. *茶叶科学*, 2013, 33(5): 405–410.
Liu PP, Zhong XY, Xu YQ, *et al.* Study on organic acids contents in tea leaves and its extracting characteristics [J]. *J Tea Sci*, 2013, 33(5): 405–410.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



张 静, 博士研究生, 主要研究方向为茶叶功能成分化学。
E-mail: 992203313@qq.com



刘仲华, 教授, 博士, 主要研究方向为茶叶功能成分化学。
E-mail: larkin-liu@163.com