

山茶油中儿茶素、表儿茶素的测定 高效液相色谱法

Determination of catechin and epicatechin content in camellia oil by HPLC

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

佛山市生物医学工程学会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂和材料 1

6 仪器和设备 2

7 样品 2

8 试验步骤 2

9 结果计算 3

10 方法灵敏度、准确度和精密度 4

附录 A（资料性） 表儿茶素、儿茶素混合标准溶液高效液相色谱图 5

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由佛山市生物医学工程学会提出并归口。

本文件起草单位：佛山市食品药品检验检测中心、珠海市食品药品检验所、江门市药品检验所、佛山大学、广东省博奥肌肤生命工程研究有限公司、广东省细胞医学研究院。

本文件主要起草人：张艳萍、黄婉锋、郭智聪、陈艺华、周宗洲、廖素媚、黄少宏、杨安平、陈鑫、刘辉、李泽希、朱明颂、刘晓庆。

山茶油中儿茶素、表儿茶素的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了山茶油中儿茶素、表儿茶素的测定方法。
本文件适用于不同生产工艺山茶油中儿茶素、表儿茶素的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品经正己烷提取，提取液经固相萃取净化后，采用液相色谱检测，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇（ CH_3OH ）：高效液相色谱级。
- 5.1.2 乙酸（ CH_3COOH ）：高效液相色谱级。
- 5.1.3 正己烷（ C_6H_{14} ）。
- 5.1.4 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ）。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 乙酸溶液（0.2%）：取乙酸（5.1.2）2 mL 用水稀释至1000 mL，混匀。

5.2.2 乙酸乙酯—正己烷（1:9）溶液：取乙酸乙酯(5.1.4)10 mL，用正己烷（5.1.3）稀释至 100 mL，混匀。

5.2.3 50%甲醇溶液：取甲醇(5.1.1)70 mL，用水稀释至 100 mL，混匀。

5.3 标准品

5.3.1 表儿茶素（ $C_{15}H_{14}O_6$ ，CAS 号：490-46-0）

5.3.2 儿茶素（ $C_{15}H_{14}O_6$ ，CAS 号：154-23-4）

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备溶液：准确称取表儿茶素、儿茶素适量（精确至 0.0001 g），用甲醇溶解，配制成浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液，4℃保存，有效期 3 个月。

5.5 材料

5.5.1 固相萃取柱：填料为二醇基化合物，500 mg/6 mL，或性能相当者。

5.5.2 微孔滤膜：孔径 0.45 μm ，有机系。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平：感量0.0001 g和0.00001 g。

6.3 固相萃取装置。

6.4 涡旋混合器。

6.5 水浴锅。

6.6 玻璃试管：10 mL；25 mL。

6.7 蒸发皿：30 mL。

7 样品

冷榨、热榨等不同加工工艺生产的山茶油。

8 试验步骤

8.1 样品提取

精密称取 2.5 g 山茶油（精确至0.001 g）于 25 mL 玻璃试管中，加入 8 mL 正己烷，在涡旋混合器上振荡2 min，待净化。

8.2 样品净化

固相萃取柱依次用甲醇 5 mL、正己烷 5 mL 活化，将 8.1 净化液全部过柱，再依次用正己烷 5 mL 和乙酸乙酯—正己烷（1:9）溶液 5 mL 洗涤，抽干后用洗脱液甲醇 8 mL 洗脱，收集洗脱液于 10 mL 玻璃试管，将洗脱液转入蒸发皿，置于 80 °C 水浴中蒸干有机溶剂，残渣加入 2 mL 50% 甲醇溶液，搅拌溶解，用 0.45 μm 滤膜过滤，滤液供高效液相色谱仪测定。

8.3 混合标准曲线的制备

分别准确移取表儿茶素、儿茶素标准储备溶液适量，用初始流动相稀释并制成浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合系列标准工作液，供高效液相色谱仪测定。以测得的峰面积为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，粒径 5 μm ），或相当者；
- b) 流动相：A 为甲醇（5.1.1），B 为 0.2% 乙酸溶液（5.2.1），梯度洗脱条件见表 1；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 检测波长：280 nm；
- e) 柱温：30 °C；
- f) 进样量：10 μL 。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间, min	A, %	B, %
0	10	90
5	10	90
10	20	80
30	50	50
31	10	90
40	10	90

8.4.2 测定法

取试样溶液和标准溶液，作单点或多点校准，按外标法以色谱峰面积定量。标准工作液及试样溶液中表儿茶素、儿茶素峰面积应在仪器检测的线性范围之内，在上述色谱条件下，混合标准溶液色谱图见附录 A。

8.5 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

9 结果计算和表述

试样中表儿茶素或儿茶素含量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times 1000}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X —样中表儿茶素/儿茶素的质量分数，单位为毫克每千克（mg/kg）；
 - A —试样中表儿茶素/儿茶素色谱峰面积；
 - C_s —标准工作液中表儿茶素/儿茶素的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；
 - A_s —标准工作液中表儿茶素/儿茶素色谱峰面积；
 - V —试样定容体积，单位为毫升（mL）；
 - m —试样取样量，单位为克（g）；
 - 1000 —换算系数。
- 计算结果保留两位有效数字。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法表儿茶素、儿茶素检测限为 0.10 mg/kg；定量限为 0.20 mg/kg。

10.2 准确度

表儿茶素、儿茶素在 0.2 mg/kg~2.0 mg/kg 添加浓度的回收率为 70%~120%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差≤15%，批间相对标准偏差≤15%。

附录 A

(资料性)

表儿茶素、儿茶素混合标准溶液高效液相色谱图见图 A.1。

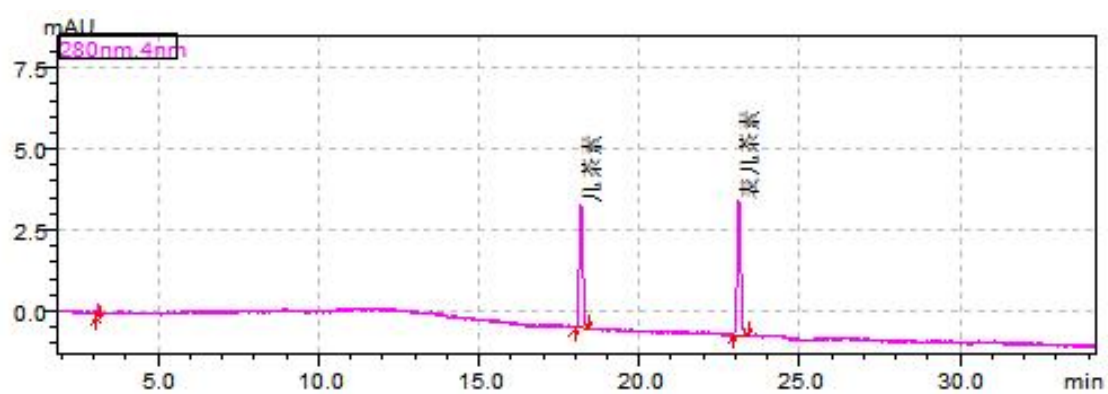


图 A.1 表儿茶素、儿茶素混合标准溶液高效液相色谱图 (5 μ g/ml)