

HPLC测定不同产地山茶油中阿魏酸和没食子酸含量

盛颖霏

浙江树人学院交叉科学研究院, 浙江 杭州

收稿日期: 2024年10月29日; 录用日期: 2024年12月29日; 发布日期: 2025年1月3日

摘 要

目的: 建立了高效液相色谱同时测定山茶油中没食子酸、阿魏酸2种多酚类化合物的分析方法, 并对不同产地样品中这两种多酚类成分进行测定, 为评价其质量提供依据。方法: 样品经过两次萃取后, 合并上清液用甲醇定容; 萃取液过滤膜后进行色谱分析。色谱条件: ZORBAX SB-C18反相柱(4.6 mm × 150 mm, 5.0 μm); DAD检测波长280 nm; 柱温35℃; 流量1.0 mL/min; 进样量10 μL; 流动相为0.5%乙酸(A) + 乙腈(B)。结果: 没食子酸、阿魏酸在浓度范围为25~500 μg/mL都具有较好的线性关系, 其方程为: 没食子酸 $Y = 21.44X - 14.821$ ($R^2 = 0.9993$); 阿魏酸 $Y = 23.091X - 65.104$ ($R^2 = 0.9992$), 没食子酸、阿魏酸的检出限分别为0.2 μg/mL, 0.6 μg/mL ($S/N = 3$), 样品的加标回收率为96.94% (没食子酸)、92.56% (阿魏酸), 且相对标准偏差(RSD)均小于3%。该方法具有准确快速、灵敏度高, 满足山茶油中多酚类化合物的检测要求。

关键词

高效液相色谱法, 没食子酸, 阿魏酸, 多酚类化合物, 山茶油

Determination of Ferulic Acid and Gallic Acid in *Camellia* Oil from Different Regions by HPLC

Yingfei Sheng

Interdisciplinary Research Institute, Zhejiang Shuren University, Hangzhou Zhejiang

Received: Oct. 29th, 2024; accepted: Dec. 29th, 2024; published: Jan. 3rd, 2025

Abstract

Objective: To establish an analytical method using high-performance liquid chromatography (HPLC)

for the simultaneous determination of gallic acid and ferulic acid, two phenolic compounds, in *camellia* oil from different geographical origins, and to measure the contents of these two phenolic components in samples from different regions as a basis for evaluating their quality. **Methods:** After two extractions, the supernatants were combined and diluted to volume with methanol; the extract was then filtered through a membrane before chromatographic analysis. **Chromatographic conditions:** ZORBAX SB-C18 reversed-phase column (4.6 mm × 150 mm, 5.0 μm); DAD detection wavelength at 280 nm; column temperature at 35°C; flow rate of 1.0 mL/min; injection volume of 10 μL; mobile phase consisting of 0.5% acetic acid (A) and acetonitrile (B). **Results:** Gallic acid and ferulic acid showed good linearity in the concentration range from 25 to 500 μg/mL, with the equations: gallic acid $Y = 21.44X - 14.821$ ($R^2 = 0.9993$); ferulic acid $Y = 23.091X - 65.104$ ($R^2 = 0.9992$). The detection limits for gallic acid and ferulic acid were 0.2 μg/mL and 0.6 μg/mL, respectively ($S/N = 3$). Spike recoveries were 96.94% for gallic acid and 92.56% for ferulic acid, with relative standard variances (RSD) of less than 3% for both. This method meets the requirements for the detection of phenolic compounds in camellia oil by being accurate, rapid and highly sensitive.

Keywords

High Performance Liquid Chromatography, Gallic Acid, Ferulic Acid, Polyphenols, *Camellia* Oil

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

山茶油为山茶属油茶树种籽经压榨或浸出提取得到的高营养价值的优质木本食用油，是中国南方和东南亚广泛使用的最受欢迎的食用油之一[1]。茶油中不饱和脂肪酸高达 90%，其中油酸 75%~83%，亚油酸 7.4%~13%，茶油的脂肪酸组成与世界上公认的最好的木本食用植物油——橄榄油极为相似，因此，茶油被誉为“东方的橄榄油”[2]。山茶油中的多酚类化合物是油脂主要的天然抗氧化剂，所以多酚类物质对山茶油品质的保证有很大的作用[3]。

多酚类化合物是一类复杂的具有多个酚羟基的次生代谢产物，其分布非常广泛，如蔬菜、水果、花卉等[4]。具有去除自由基、抗氧化、抗衰老、抗癌等对人体十分有益的作用[5]。多酚类化合物是分子中具有多羟基化合物的总称，包括了低分子量的简单酚类到具有高聚合结构的大分子聚合物，多数情况下酚类化合物和单糖或多糖相结合，同时还以衍生物的形式存在，结构复杂[4]，山茶油中的多酚类化合物主要有儿茶素、没食子酸、阿魏酸等。本实验中主要研究山茶油中的没食子酸和阿魏酸。

没食子酸亦称“五倍子酸”、“鞣酸”。没食子酸既可溶于水，也可溶于有机溶剂如乙醚或丙酮，这一特性使其成为非常合适的交联剂[6]。由于丁基-4-羟基苯甲醚有致癌性，国外大部分水产加工品都改用浸渍或喷涂没食子酸作抗氧化剂[7]。李肖玲等[8]报道了没食子酸具有抗炎、抗突变、抗氧化、抗自由基等多种生物学活性。

阿魏酸的化学名称为 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸，是桂皮酸的衍生物之一。阿魏酸能清除自由基，促进清除自由基的酶的产生，增加谷胱甘肽转硫酶和醌还原酶的活性，并抑制酪氨酸酶活性，来调节人体生理机能[9]。近年来，有许多关于阿魏酸对感冒病毒(IV)、呼吸道合胞体病毒(RSV)和艾滋病病毒(HIV)都有显著抑制作用的报道。其中阿魏酸对艾滋病病毒有抑制作用，从而存在阿魏酸成为未来化学治疗剂的可能[10]。

由于现在人的生活水平日益提高,注重自身的保养,对于食品的要求也越来越高,特别是食品的营养成分的含量。而油又是中国饮食当中不可缺少的,所以油的质量对于我们来说就显得十分重要。山茶油是一种具有高营养价值的油,茶油里面的多酚类物质,对于人体更有抗衰老、抗癌等奇效,所以市场价值比较高,由于这种利益的驱动下,有些商人就容易去伪造相应的营养成分含量。因此,需要一种方法来快速、简单、精确地测量其含量。

本研究通过建立液相色谱法测定山茶油中没食子酸和阿魏酸多酚类化合物,并成功用于各地山茶油测定,为评估山茶油的质量提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 试剂与仪器

2.1.1. 实验试剂

阿魏酸($\geq 99\%$)、没食子酸($\geq 95\%$)、冰乙酸(AR)、正己烷(AR)、甲醇(AR)购于阿拉丁试剂有限公司;乙腈(色谱纯)购于美国 J.T.Baker 公司;水为超纯水;六种不同产地山茶油购于联华超市股份有限公司。

2.1.2. 实验仪器与设备

高效液相色谱仪(P230II, 大连伊利特有限公司);紫外分光光度计(L6S, 上海精密科学仪器有限公司);电子天平(ME204E, 瑞士苏黎世梅特勒-托利多公司);电热恒温鼓风干燥箱(DGG-9140A, 上海森信实验仪器有限公司);超声清洗器(KQ5200, 昆山市超声仪器有限公司);超纯水器(UPWS-1-60D)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 标准品的配制

分别称取阿魏酸和没食子酸两种标准品各 0.5000 g,用纯水溶解定容至 1000 mL 容量瓶中,摇匀,作为标准品储备液,溶液浓度为 0.5 mg/mL。吸取阿魏酸和没食子酸标准储备液 0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL,用去离子水定容至 10.0 mL,配置相当于 25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度标准曲线,低温避光冷藏待用。

2.2.2. 油样中多酚类化合物的测定

准确称取山茶油样品 20.0 g,置于具塞锥形瓶中,加入 50.0 mL 正己烷充分振摇 3 min,加入 20.0 mL 60%甲醇充分振摇 5 min,再于 250 mL 分液漏斗中静置 20 min 分液,向上层液体中加入 20.0 mL 60%甲醇重复提取 1 次,合并两次的下层滤液,加甲醇定容至 50.0 mL 得试样溶液。再将试样溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进行 HPLC 分析。

2.2.3. 最佳检测波长的确定

为确定没食子酸和阿魏酸的最佳检测波长,使用紫外可见分光光度计对稀释得到的 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸和 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的阿魏酸标准溶液进行 190~600 nm 波长扫描,得到各自的波长扫描图。

2.2.4. HPLC 分析条件

色谱柱为 ZORBAX SB-C18 反相柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5.0 μm);DAD 检测器,检测波长 280 nm;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流量 1.0 mL/min;进样量 10 μL ;流动相为 0.5%乙酸(A)+乙腈(B);梯度洗脱顺序为 0, 100% A; 0~4 min, 100%~95% A, 0~5% B; 4~7 min, 95%~80% A, 5%~20% B; 7~25 min, 80%~30% A, 20%~70% B; 25~30 min, 30%~0% A, 70%~100% B; 30~33 min, 0%~100% A, 100%~0% B。

3. 结果与分析

3.1. 最佳检测波长的确定

使用紫外可见分光光度计对 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸和 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的阿魏酸标准溶液进行波长扫描, 结果如图 1 所示。由图中可以看出, 阿魏酸的紫外波长是 215 nm 和 311 nm, 没食子酸的紫外波长是 212 nm 和 262 nm, 因为用 HPLC 时候需要综合两个样品, 由于阿魏酸最高的时候没食子酸很低, 没食子酸最高的时候阿魏酸很低, 所以在 280 nm 的时候阿魏酸和没食子酸都还可以, 因此在用 HPLC 的时候用 280 nm。

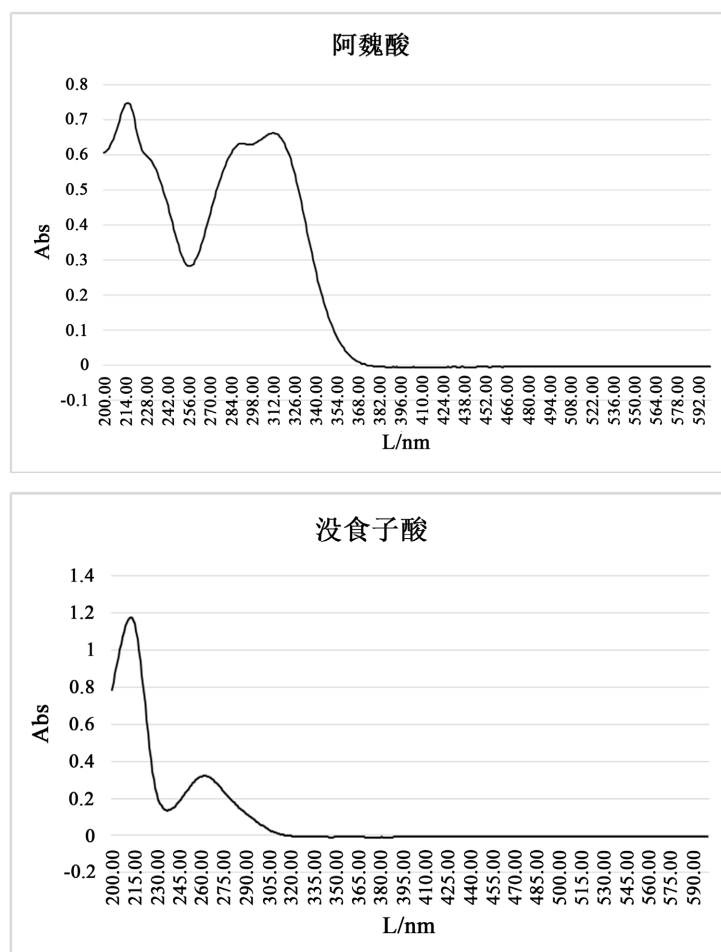


Figure 1. Uv full wavelength scan of ferulic acid and gallic acid

图 1. 阿魏酸与没食子酸的紫外全波长扫描图

3.2. 线性关系与检出限考察

以没食子酸、阿魏酸的浓度 C ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性绘制, 得到其方程为: 没食子酸 $Y = 21.44X - 14.821$ ($R^2 = 0.9993$); 阿魏酸 $Y = 23.091X - 65.104$ ($R^2 = 0.9992$); R 值都在 0.999 以上, 说明在该浓度范围内, 浓度与峰面积有良好的线性关系。将两标样最低浓度不断稀释进样, 测得两化合物的检出限(LOD, $S/N = 3$) 分别为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.6 $\mu\text{g/mL}$ 。没食子酸、阿魏酸标准品的色谱图如图 2 所示, 阿魏酸的保留时间是 15.2 min、没食子酸的保留时间是 8.9 min。

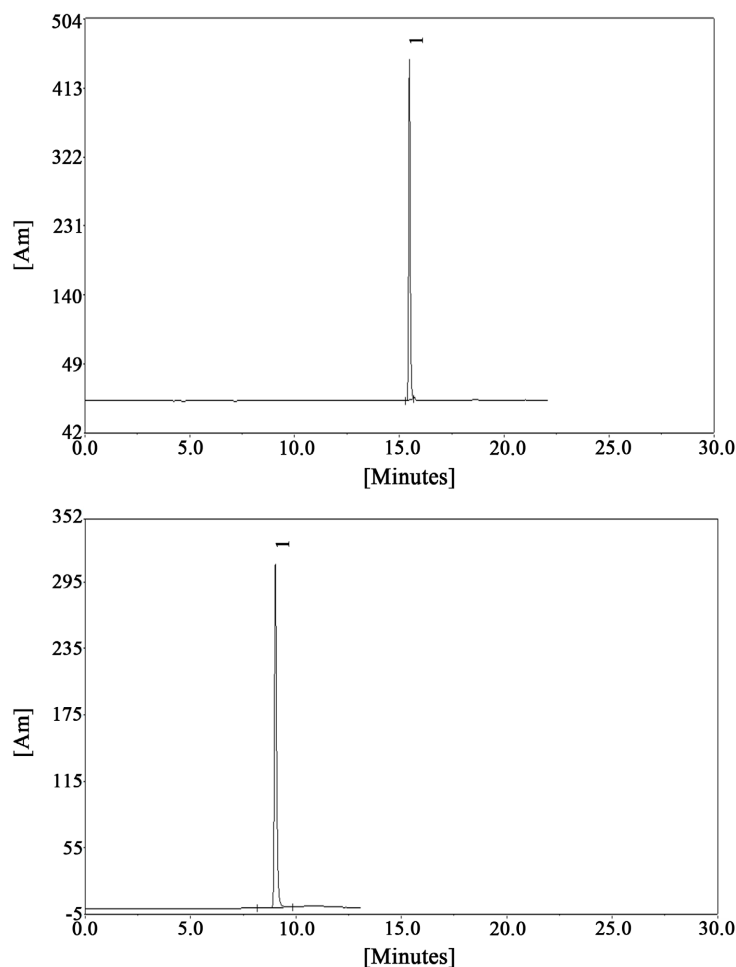


Figure 2. Standard chromatogram of ferulic acid and gallic acid
图 2. 阿魏酸和没食子酸标准色谱图

3.3. 精确度试验

分别将 50 $\mu\text{g/mL}$ 阿魏酸、没食子酸的标准溶液连续重复进样 5 次，测得各组分的峰面积，计算其相对标准偏差(RSD)，结果如表 1 所示。其相对标准偏差均小于 1%，说明其重现性好、精确度高。

Table 1. Result of precision of ferulic acid and gallic acid

表 1. 阿魏酸、没食子酸精密度试验结果

化合物	浓度($\mu\text{g/mL}$)					平均值($\mu\text{g/mL}$)	相对标准偏差(RSD)/%
没食子酸	48.00	48.83	48.12	48.41	48.22	48.32	0.76
阿魏酸	50.62	50.53	50.84	50.75	50.57	50.66	0.27

3.4. 日内精密度和日间精密度

取标准曲线制备项下 100 $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸、阿魏酸标准溶液，于日内不同时间，每相隔 2 h，分别在开机基线走平后的 0、2、4、6、8 h 进样分析，测定其日内精密度结果如表 2 所示。RSD 均低于 3%，表明其日内的精密度较好。

Table 2. Intraday precision of ferulic acid and gallic acid
表 2. 阿魏酸、没食子酸日内精密度

化合物	浓度(μg/mL)					平均值(μg/mL)	相对标准偏差(RSD)/%
阿魏酸	88.64	91.77	87.86	90.30	85.99	88.91	2.13
没食子酸	93.85	96.40	91.80	96.40	91.73	90.31	2.97

取标准曲线制备项下 100 μg/mL 的没食子酸、阿魏酸标准溶液，于日间同一时间，分别在开机基线走平后连续三日进样分析，测定其日间精密度结果如表 3 所示。RSD 均低于 4.5%，表明其日内的精密度较好。

Table 3. Intraday precision of ferulic acid and gallic acid
表 3. 阿魏酸、没食子酸日内精密度

化合物	浓度(μg/mL)			平均值(μg/mL)	相对标准偏差(RSD)/%
	Day1	Day2	Day3		
阿魏酸	89.89	98.96	95.68	94.98	4.20
没食子酸	93.96	98.60	102.40	98.40	3.84

3.5. 加标回收率试验

取样品 5 作为空白样品，进行加标回收试验。取 3 份分别加入如表 4 所示 50%、100%和 150%共 3 个水平的没食子酸和阿魏酸对照品，按照 2.3 色谱条件进行测定，计算加样回收率，结果见表 4。由表中可以看出，在山茶油中分别加入不同浓度的 2 种多酚类化合物，其平均回收率分别为 96.94% (没食子酸)、92.56% (阿魏酸)，且相对标准偏差(RSD)均小于 3%。

Table 4. Results of recovery test
表 4. 加标回收试验结果

化合物	本地值μg	加标量μg	测得量μg	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差(RSD)/%
没食子酸	62.88	30.23	92.49	98.06	96.94	1.60
	62.88	60.52	120.46	95.17		
	62.88	90.41	151.09	97.58		
阿魏酸	158.27	80.32	231.45	91.13	92.56	2.26
	158.27	161.43	306.11	91.60		
	158.27	240.62	386.70	94.96		

3.6. 实际样品分析

按所建立的方法对 6 种不同产地山茶油中没食子酸和阿魏酸的含量进行测定，结果如表 5 所示。从表中可以看出，因为没食子酸、阿魏酸的检出限分别为 0.2 μg/mL，0.6 μg/mL。所以在 6 种样品中检测到了不同浓度的没食子酸、阿魏酸，1-湖南号中的没食子酸含量最高，2-江西号其次。阿魏酸含量最高的是 2-江西号，但是阿魏酸 6 种山茶油中的含量都比较平均。

Table 5. Determination results of samples**表 5.** 样品测定结果

油样品产地及编号	1-湖南	2-江西	3-浙江	4-福建	5-广西	6-广东
没食子酸含量($\mu\text{g/g}$)	172.23	86.85	56.33	55.46	62.88	54.74
阿魏酸含量($\mu\text{g/g}$)	151.65	161.22	153.14	151.47	158.27	154.31

4. 结论

1) 通过紫外分光光度计对没食子酸、阿魏酸进行波长扫描,确定了采用高效液相色谱法(HPLC)测定山茶油中多酚类化合物含量的最佳检测波长为 280 nm。

2) 采用 HPLC 法测定了山茶油中 2 种多酚类化合物的含量,建立了标准曲线。浓度范围为 25~500 $\mu\text{g/mL}$ 的 2 种多酚类化合物(没食子酸、阿魏酸)都具有较好的线性关系,其方程为: 没食子酸 $Y=21.44X-14.821$ ($R^2=0.9993$); 阿魏酸 $Y=23.091X-65.104$ ($R^2=0.9992$), 没食子酸、阿魏酸的检出限分别为 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.6 $\mu\text{g/mL}$ ($S/N=3$), 精密度相对标准偏差(RSD)小于 1%和日内的精密度的相对标准偏差(RSD)都小于 3%,说明该方法重现性好,精密度高。样品的加标回收率为 96.94% (没食子酸)、92.56% (阿魏酸),相对标准偏差(RSD)都小于 3%。进一步表明该方法快速简便、灵敏度高、重现性好、适用性强。

3) 测定六种不同产地山茶油中没食子酸和阿魏酸的含量测定。在 6 种样品中检测到了不同浓度的没食子酸、阿魏酸组分,1-湖南号中的没食子酸含量最高,1-湖南号其次。阿魏酸含量最高的是 1-湖南号,但是阿魏酸 6 种山茶油中的含量都比较平均。

参考文献

- [1] 贺桂先, 李林松, 徐林初, 等. 油茶的生产特性及其功能价值[J]. 江西林业科技, 2007(4): 39-42.
- [2] 何新钟. 对油茶的开发利用及发展的研究[J]. 现代经济信息, 2010(10): 158, 187.
- [3] 谢婷婷, 林滢, 林秀, 等. 山茶油中主要功能性成分研究进展[J]. 粮食与食品工业, 2024, 31(3): 34-37.
- [4] 徐雨生, 廖川江, 申科, 等. 植物多酚的功效及其作用机理综述[J]. 普洱学院学报, 2021, 37(3): 6-9.
- [5] 叶沛铭, 梁雅慧, 吴颖研, 等. 柑橘水果中黄酮类物质的提取方法生物活性及应用研究进展[J]. 农产品加工, 2023(15): 78-80, 85.
- [6] 殷亮, 何瑞莲, 蒋达洪, 等. 没食子酸分子印迹聚合物的合成及识别性能研究[J]. 广东石油化工学院学报, 2018, 28(3): 39-44.
- [7] 黄甜, 孟勇, 张秀红, 等. 没食子酸的制备及应用研究进展[J]. 现代食品, 2023, 29(19): 24-26, 38.
- [8] 李肖玲, 崔岚, 祝德秋. 没食子酸生物学作用的研究进展[J]. 现代食品, 2004, 7(10): 767-769.
- [9] 毕建云, 刘善新, 靳光乾, 等. 阿魏酸透皮吸收研究综述[J]. 中药材, 2013, 36(6): 1028-1031.
- [10] 徐瑶. 中药复方 0326 的研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.