

利用光学-电化学技术快速测定
茶多酚含量的方法和装置的研究



论文作者签名:

指导教师签名:

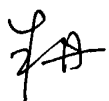
论文评阅人 1: 夏 涛 教授
评阅人 2: 周巨根 副教授
评阅人 3: 罗列万 研究员

答辩委员会主席: 陈 亮 研究员
委员 1: 王校常 教授
委员 2: 骆耀平 教授
委员 3: 须海荣 副教授
委员 4:

答辩日期: 2011-03-08

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名:  签字日期: 2011 年 2 月 25 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名:  导师签名: 

签字日期: 2011 年 3 月 25 日

签字日期: 2011 年 3 月 25 日

致谢

在论文完成和两年半的研究生生活即将结束之际，回顾在浙大的学习和生活，我收获颇多。有太多感谢想要给我的老师、亲人、同学们。

首先我要感谢导师须海荣副教授，在学业上，导师给予了我许多精心的指导，使我掌握了科学的思维方式和正确的研究方法；在思想上，导师也给予了诸多教诲，教我明白了许多做人的道理。借此机会我要向导师表示衷心的感谢！祝福导师及其家人身体健康，万事如意！

本论文是在导师须海荣副教授、Martial Geiser 教授、Wilfried Andlauer 教授的指导下完成的。本课题是在 09 年 9 月后我于瑞士西部应用科学大学(HES-SO) 为期 7 个月的交换学生时建立和开展起来的，受到过瓦莱州提供 HES-SO 和浙大合作项目的资助。

在实验和论文完成过程中，感谢 HES-SO 实验室研究员 Mario Bernabei, Frederic Truffer, Lucio Kilcher, Julien Héritier, Denis Prim 和 EPFL 电化学实验室 Hubert Girault 教授在技术方面的指导；感谢浙大茶学实验室，感谢冯海强师兄在实验设计中提出的宝贵建议，感谢林杰师兄、宋婷婷、韩丽萍、于翠平师姐在实验过程中无私的帮助；感谢浙大化学系微分析系统研究所王敏课题组温旭光同学在电化学技术的帮助；感谢中科院计璐艳同学在软件方面的帮助。

感谢同班的郭建华、吴命燕、潘志强、罗子华、敖存等，我们一起学习、一起奋斗、一起进步；感谢师弟师妹吴春燕、段玲靓、张兰兰、边金霖、刘小青、金恩惠、郭昊蔚等在实验和生活中的热心帮助和支持，使我度过了愉快和充实的研究生阶段。在此祝他们学业有成，前途似锦。

感谢华家池十舍 617 寝室的室友们——蔬菜所的刘自梅和刘娜、茶学的罗子华同学，我们互助互爱、亲如一家，给远离家人的彼此带去心灵的温暖。

衷心感谢我的父母，对我的养育之恩和无私的爱，他们是我在人生道路不懈努力的动力和永远的依靠，祝他们事事顺心、幸福安康！

最后感谢参与本论文评阅、答辩及对本论文提出宝贵建议的老师和同学们！

朱丹

2011 年 01 月于华家池

摘要

茶多酚是茶树酚类物质及其衍生物的总称。检测茶多酚含量在茶叶生产、品质控制中具有重要意义。传统的茶多酚测定方法如福林酚比色法和高效液相色谱法需由专业人员进行,步骤繁琐、时间长、检测成本高,难以适应生产、销售过程中快速、低成本测定的需要。本研究的目的是找到适合快速、简便、低耗测定茶多酚含量的方法,并开发以此方法为基础的测定装置模型。本实验根据茶多酚自身的理化性质,将直接紫外测量法的光学技术和基于循环伏安法的电化学技术相结合,快速测定茶汤中茶多酚含量。

直接紫外测量法研究表明:茶多酚溶液在紫外吸收峰 275nm 下吸光度与其含量有很好的线性相关, $y=0.0214x+0.0374$, $R^2=0.9961$ 。对 7 种绿茶样进行验证,测量结果值比国标福林酚分光光度法略高。近红外下的研究表明不易通过透射率方法找到适合测量茶汤中茶多酚含量的某近红外波长的光源。

循环伏安法研究表明:自制工作电极银电极不适宜检测茶多酚。通过分析茶多酚在所制碳糊电极、玻碳电极表面的氧化还原行为,发现氧化电流峰值与茶多酚含量有良好的线性关系。与该国标相比,碳糊电极平均测量偏差在 $\pm 7\%$ 以内;玻碳电极在 $\pm 5\%$ 以内;碳糊电极重复性不如玻碳电极。碳糊电极适合一次性使用,玻碳电极可以重复使用。电化学方法测量可在 40 秒完成扫描。

所制的快速测定绿茶茶汤中茶多酚总量的装置模型结合光学技术(LED 波长 $=275\pm 5\text{nm}$)和电化学技术(玻碳电极),能有效提高测定量程。所制装置可测茶多酚含量范围为 $1-1000\mu\text{g mL}^{-1}$,线性范围分为三段,1-100、100-450、450-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$,根据实际情况选择合适的标准曲线;该装置的回收率主要集中在 80-105%中,测定 15 个茶样所得 RSD 在三个测量范围内平均为 0.71%、6.94%、1.63%,重复性较好。该装置中光学方法与国标方法相比测量值偏高 5%左右,但可用于快速、低耗测定茶多酚含量;电化学方法与福林酚方法相比没有显著性差异。本文是对光学-电化学技术快速测定绿茶茶汤中茶多酚含量的方法和装置的初步探索,为便捷检测茶多酚提供一条新思路。本研究有助于指导茶叶生产实践,推动茶叶品质检测和茶制品标准化的发展。

关键词:茶多酚;光学;电化学;快速检测;含量;装置

Abstract

Tea Polyphenols (TP) are characterized by the presence of more than one phenol unit or building block per molecule in tea plants. The polyphenols content in tea infusion or related products is one of the most important quality indicators during the manufacture. Traditional methods for the determination of total polyphenols content rely on colorimetric methods using Folin-Ciocalteu (F-C) reagent or HPLC, which need be operated by trained researchers and cost much time, reagent and labor. These factors have created demands for a simple, rapid and low-cost analytical tool which could be easily used in the test for factory. In this research, a new compact opto-electrochemical sensor (OES) which was achieved by combining cyclic voltammetry (CV) on glassy carbon electrode and UV transmission at one precise wavelength ($\lambda=275\text{nm}$), was designed to determine polyphenols contents in green tea.

The absorption of TP at 275nm showed a linear response with concentration, $y=0.0214x+0.0374$, $R^2=0.9961$. The result obtained from the optical method was slightly higher than the Folin-Ciocalteu Assay through the assessment study of 7 different kinds of green tea. The result got from NIR indicated that it was not easy to find the light source at the dedicated wavelength for the determination of TP.

This article discussed the possibility of electrochemistry method CV applied on the fast measurement of green tea polyphenols content. The results revealed that the silver electrode was not suitable for the content determination. A linear relationship between the anodic current and the polyphenols concentration was obtained using the carbon paste electrode (CPE) or the glassy carbon electrode (GCE). Test results of green tea samples indicated that the repeatability of the GCE was better than the CPE. In the accuracy analysis, the deviation for GCE and CPE was less than $\pm 5\%$ and $\pm 7\%$ respectively compared with national standard with F-C reagent. The electrochemistry method cost 40s one time. The CPE was disposable, but the GCE could be used for many times and fixed on the sensor.

The sensor was developed by combining CV on glassy carbon electrode and UV

transmission at one wavelength with LED light source ($\lambda=275\pm 5\text{nm}$). This combination offered the possibility to improve the measurement range and obtain the value with greater certainty. The new sensor could achieve the measurement range from 1 to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and the calibration curve was established for 3 parts, ranging from 1-100, 100-450, and 450-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively. Before the measurement of OES, a suitable calibration curve needed to be chosen for the quantification. 15 different kinds of green tea were used in the assessment study. The recoveries of OES were in the range between 80 and 105%, and the RSD got from the measurement was 0.71%, 6.94% and 1.63% for optical (calibration curve 1), electrochemical (calibration curve 2 and 3) respectively. The result obtained from the optical system was 5% higher than the Folin-Ciocalteu Assay due to the influence of caffeine or other components, but it was acceptable for the fast and cheap measurement; the electrochemistry method has no significant differences with Folin-Ciocalteu Assay.

The presented OES is a rapid and inexpensive way based on optical and electrochemical technique for evaluating the amount of total green tea polyphenols. This preliminary research gave a new idea to detect polyphenols in tea conveniently, which is useful to the development of quality control of in process and standardization of tea products.

Key words: Tea polyphenols, optics, electrochemistry, fast measurement, concentration, sensor

图标索引

图 1.1: 主要儿茶素类物质结构	2
图 1.2: 主要黄酮及黄酮苷类物质结构	2
图 1.3: 主要花白素和花青素类物质结构	3
图 1.4: 主要酚酸和缩酚酸类物质结构	3
图 1.5: 多酚羟基氧化生成醌的过程	4
图 1.6: 循环伏安法中电位扫描图	10
图 1.7: 典型循环伏安图	10
图 2.1: 朗伯-比尔定律图解	15
图 2.2: 分光光度计示意图	15
图 2.3: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 98% 茶多酚提取液和稀释 50 倍的绿茶茶汤紫外-可见光 光谱图	17
图 2.4: 98%茶多酚提取物溶液与分光光度计 275nm 吸光度值关系	17
图 2.5: 不同波长 LED 吸光度理论值与茶多酚含量的关系	19
图 2.6: 不同浓度茶多酚提取物溶液近红外光谱图	20
图 3.1: 三电极测量系统	22
图 3.2: 八种不同形状的银电极设计	23
图 3.3: 碳糊电极测试系统设计	23
图 3.4: 玻碳电极测试系统设计	24
图 3.5: 银电极测试结果图	26
图 3.6: 碳糊电极和玻碳电极测试铁氰化钾溶液结果图	27
图 3.7: 碳糊电极和玻碳电极测试茶多酚溶液结果图	29
图 3.8: 富集时间对氧化电流峰值的影响	30
图 4.1: 光学-电化学装置示意图	33
图 4.2: 光学装置实物图	33
图 4.3: 紫外发光二极管光源光束示意图	34
图 4.4: Sapphire 蓝宝石透光性能曲线图	34
图 4.5: 平凸透镜透光性能曲线图	34
图 4.6: 光学 ZEMAX 软件模拟	35
图 4.7: 光学主板实物图	35
图 4.8: 光学系统软件主要设计结果图	36
图 4.9: 光学系统装置图	36
图 4.10: 电化学系统装置图	37

图 4.11: 装置机械部分图.....	37
图 4.12: 装置中光学系统线性回归图	40
图 4.13: 装置中电化学系统线性回归图	41
图 4.14: 装置中光学系统测量结果与国标福林酚法比较	43
图 4.15: 装置中电化学系统测量结果与国标福林酚法比较	44
表 2.1 绿茶茶汤茶多酚总量测量结果	18
表 3.1 循环扫描次数的影响	30
表 3.2 绿茶茶汤茶多酚总量测定结果	31
表 4.1 光学-电化学装置茶汤中茶多酚含量测定线性范围	41
表 4.2 光学-电化学装置回收率测定	42
表 4.3 装置测量方法与国标法测量结果方差分析表	44

目次

致谢	I
摘要	II
Abstract	III
图标索引	V
1 文献综述	1
1.1 茶多酚类物质理化性质介绍	1
1.2 茶多酚测量方法研究进展	4
1.2.1 光学原理在茶多酚测量方法的应用	4
1.2.1.1 紫外分光光度法	5
1.2.1.2 可见分光光度法	5
1.2.1.3 间接原子吸收分光光度法	6
1.2.1.4 化学发光法	6
1.2.1.5 荧光检测法	7
1.2.1.6 近红外检测法	8
1.2.2 高锰酸钾滴定法	8
1.2.3 电化学原理在茶多酚测量方法的应用	8
1.2.2.1 电位滴定法	9
1.2.2.2 循环伏安法	9
1.2.2.3 其他电化学方法	11
1.2.4 茶多酚检测器及装置研究现状	12
1.3 本研究的目的是和意义	13
2 利用光学技术快速测定茶多酚含量方法的研究	14
2.1 材料与方法	14
2.1.1 材料、试剂及主要仪器设备	14
2.1.2 检测原理	14
2.1.3 检测方法	16
2.1.3.1 全波段扫描	16
2.1.3.2 测定茶样	16
2.1.3.3 国标法测定茶多酚含量	16
2.2 结果与分析	16
2.2.1 紫外-可见分光光度法	16
2.2.1.1 茶多酚紫外-可见光谱性质及标线建立	16
2.2.1.2 市售 LED 光源的选择	18
2.2.2 近红外光谱法	19
2.3 小结	20
3 利用电化学技术快速测定茶多酚含量方法的研究	21

3.1 材料与方法	21
3.1.1 材料、试剂及主要仪器设备	21
3.1.2 电化学测试系统的设计及制作	21
3.1.2.1 设计及检测原理	21
3.1.2.2 银电极测试系统的设计	22
3.1.2.3 碳糊电极测试系统的设计	23
3.1.2.4 玻碳电极测试系统的设计	24
3.1.3 电极测试及测试参数的确定	24
3.1.4 实验验证	25
3.1.4.1 循环伏安法	25
3.1.4.2 国标法测定茶多酚含量	25
3.2 结果与分析	26
3.2.1 银电极	26
3.2.2 碳糊电极和玻碳电极	26
3.2.2.1 电极测试	26
3.2.2.2 电极测试参数的确定	29
3.2.2.3 茶多酚标线的建立及茶样验证	30
3.3 小结	31
4 利用光学-电化学技术快速测定茶多酚含量装置的研究	32
4.1 材料与方法	32
4.2 装置设计	32
4.2.1 装置主要参数	32
4.2.1.1 光学部分	33
4.2.1.2 电化学部分	36
4.2.2 装置机械部分简介	37
4.3 装置性能与测试	37
4.3.1 线性范围与检测限	38
4.3.2 回收率与重复性	38
4.3.3 与国标方法比较	39
4.4 结果与分析	39
4.4.1 线性范围与检测限	39
4.4.2 回收率与重复性	42
4.4.3 与国标方法比较	42
4.5 小结	44
5 结论和展望	46
作者简介	48
参考文献	49

1 文献综述

1.1 茶多酚类物质理化性质介绍

茶叶由于其风味独特,具有明显的营养价值和保健功效,倍受人们欢迎。茶多酚类(tea polyphenols)亦称“茶鞣质”、“茶单宁”,是茶树酚类物质及其衍生物的总称,约占茶叶干物质总量的18%-36%,是茶叶中有益于人体健康的主要生物活性成分之一。适量摄入茶多酚有利于降低心血管疾病的发病率、预防癌症、减肥等^[1];而喝茶是日常生活中多酚类物质摄入的主要来源之一^[2]。茶多酚与茶叶涩味有关^[3],其含量的多少还影响茶叶色泽和香气的品质。

到目前为止,茶叶中检测分离出的茶多酚类物质主要包括儿茶素类(图1.1)、黄酮及黄酮苷类(图1.2)、花白素和花青素类(图1.3)、酚酸和缩酚酸类(图1.4)^[4]。除酚酸及缩酚酸外,均具有2-苯基苯并吡喃为主体的结构,基本碳架为:C₆-C₃-C₆。其中,儿茶素类化合物含量最高,约占茶多酚总量的60%-80%,占茶叶干重12-24%;主要包括表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)、表儿茶素(EC)、没食子儿茶素(GC)和儿茶素(C)等,其中EGCG占儿茶素类化合物80%。黄酮及黄酮苷类约占茶叶干重3-4%,花青素约0.01-1.0%,花白素约2-3%,酚酸和缩酚酸类化合物约5%^[5]。

茶多酚中儿茶素类物质为白色固体,亲水性较强,易溶于水、乙酸乙酯、乙醇、丙酮等溶剂;黄酮及黄酮苷类物质多为亮黄色晶体,一般难溶于水,较易溶于甲醇、乙醇、冰醋酸等有机溶剂;茶多酚类物质不溶于石油醚和氯仿中。其酚羟基可游离出H⁺,故显酸性。

茶多酚由于其分子中所含有的苯环结构,在紫外光区有很强的吸收;主要组成部分儿茶素类紫外吸收主要出现在A环、B环中苯环的B带吸收,除了200nm附近苯环的E带吸收外,在紫外区以一个单峰形式出现,典型的儿茶素 λ_{\max} 通常在270-280nm处^[6];黄酮类和黄酮苷类的紫外吸收光谱相似,在320-380nm(吸收带I)和240-270nm(吸收带II)的两个区域有深度的吸收峰,其带I的区域由B环桂皮酰基系统的电子跃迁引起,带II区域则起因于苯甲酰基系统的电子

跃迁，它们的具体峰位由 A 环或者 B 环取代基的位置而定，例如槲皮素的甲醇溶液在 255, 269 (肩峰), 370nm 有紫外吸收峰，山柰素甲醇溶液紫外吸收光谱则发生在 266, 367nm 处^[7]；花白素苷元的紫外吸收光谱最大吸收峰多在 270-280nm；花色苷及其苷元则发生在 500-550nm 处；不同茶多酚的最大吸收峰位及其吸收强度能随着溶剂的性质^[8]和 pH 值^[9]而有所改变。茶多酚浓度在一定范围内符合比耳定律。茶多酚浓度较高时，可见光区有弱吸收带，其最大吸收波

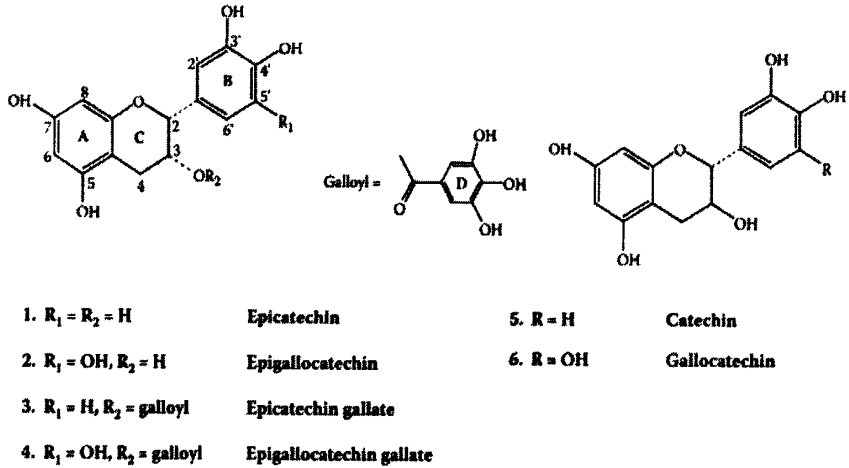


图 1.1：主要儿茶素类物质结构

Fig 1.1: Structures of major catechins

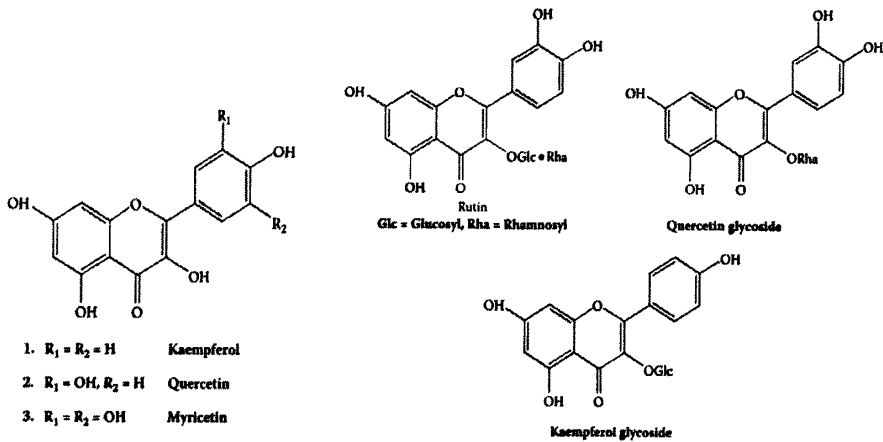


图 1.2：主要黄酮及黄酮苷类物质结构

Fig 1.2: Structures of major flavonols and flavonol glycosides

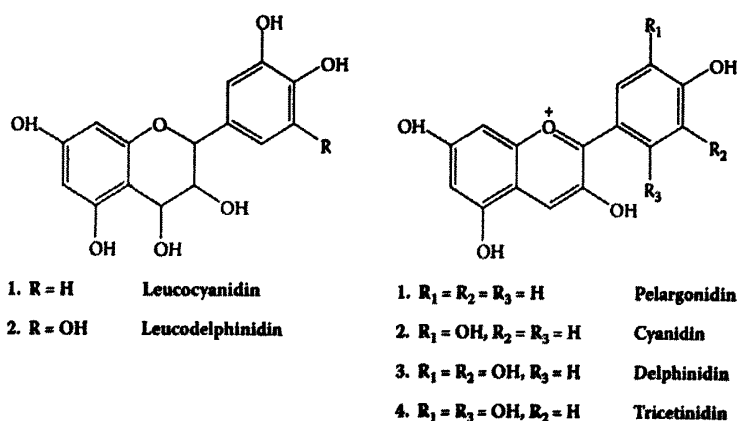


图 1.3: 主要花白素和花青素类物质结构

Fig 1.3: Structures of major leucoanthocyanidins and anthocyanidins

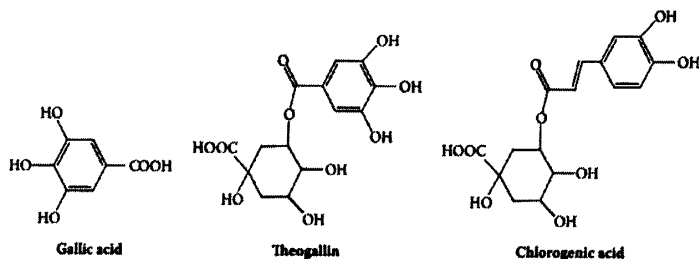


图 1.4: 主要酚酸和缩酚酸类物质结构

Fig 1.4: Structures of major phenolic acids and depsides

长在 669nm, 是少量茶多酚苯环上的邻羟基取代基被氧化成邻醌, 助色团变成生色团所致。在红外光谱范围, 1000-1100cm⁻¹ 区茶多酚有两个吸收峰, 其中 1037 cm⁻¹ 可能归属于结构中邻苯多酚的 C-O 伸缩振动; 1450-1609 cm⁻¹ 的特征吸收峰可能来源于苯环; 1700 cm⁻¹ 的特征吸收峰来源于羰基 C=O; 3200 cm⁻¹ 附近的特征吸收峰来源于羟基; 当苯环上有多个取代结构时, 900-650 cm⁻¹ 也会有多个吸收峰; 由于结构中有醚或醇产生的 C-O 伸缩振动, 1475-1450 cm⁻¹ 也会有多个吸收峰^[10]。

茶多酚的分子结构中具有多个反应活性基团和活性部位, 可发生多种化学反应。酚羟基是最具特征的活性基团, 可发生酚类反应; 醇羟基和羧羟基可发生醇、酸的反应; 吡喃环中的醚键也属于不稳定结构, 易于酸、碱的介质和酶的作用下发生变化等等。在结构单元的 A 环的 6,8 位属于亲核中心, 吡喃环的 4 位在强酸

下是亲电中心^[11]。

茶多酚能与金属类物质、咖啡碱、蛋白质等发生络合反应^[12]。由于茶多酚具有的多酚羟基结构有很强的还原性，可以通过还原一些金属离子，利用金属离子与有机试剂的络合，发生显色反应；也可以直接是茶多酚结构中的邻酚羟基与金属离子络合显色。显色反应有与铁盐络合产生蓝紫色，与氨性硝酸银、磷钼酸等生产黑色或蓝色物质，间位羟基与香荚兰素在强酸下生成红色物质等。这些特征都常被用于茶多酚的定性或定量检测^[13]。

茶多酚在光、高温、碱性或氧化酶等作用下，茶多酚易氧化、聚合、缩合，在空气中可自动氧化为黄棕色物质。茶多酚在氧化过程中，不同部位的酚羟基首先成为醌，如图 1.5 所示^[14]。然后醌进一步配对聚合形成茶黄素等物质。茶多酚在水溶液中的氧化速率主要受 pH 影响，氧化的最低 pH 约为 2.0-2.5。随着 pH 值提高，氧化速率增高，若 pH 大于 7，氧化作用迅速加速，这是因为分子中的吡喃环是结构中最薄弱的部位，在碱性条件下易发生降解反应，酯键和吡喃环中的醚键易被打开，生成苯酚酸等物质，所以生产过程中应避免碱性条件操作。^[10]

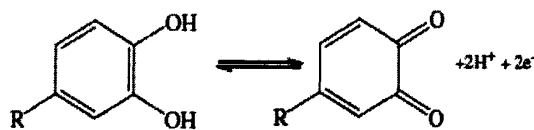


图 1.5: 多酚羟基氧化生成醌的过程

Fig 1.5: The oxidation from polyphenols to quinone

1.2 茶多酚测量方法研究进展

1.2.1 光学原理在茶多酚测量方法的应用

利用光学原理测量物质是一种常见的分析方法。例如用棱镜或光栅将光分出不同波长的入射光源或其他光源，物质吸收光能，然后通过检测器记录光学信号，从而对该物质进行定性和定量的分析。可以通过物质自身的吸收特性直接测量或者通过物质与其他物质反应物的吸收特性间接测量。利用光学原理或技术的常用茶多酚测量方法有紫外分光光度法、可见分光光度法、间接原子吸收分光光度法、化学发光法、荧光检测法、近红外检测法等。

1.2.1.1 紫外分光光度法

根据多酚的理化性质, 多酚绝大部分在 205nm 和 275nm 波长处有紫外吸收峰。有报道通过在 280nm 处测定紫外吸收程度, 发现其吸光度和多酚含量的有良好的线性关系, 从而用该法快速测定, 建立葡萄酒中多酚含量指数^[15]。根据该性质直接紫外测定可以认为是多酚总量测定的有用方法之一。但是茶汤里的一些物质在紫外也会发生吸收, 对测量结果的精确性有影响; 例如, 咖啡因在 272nm 处有吸收^[10], 有共轭结构的微量的氨基酸苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的紫外吸收峰分别在 260nm、275nm、278nm^[16]。若紫外分光光度法用于茶多酚总量的快速测定, 也是一种成本较低的方法。陆兰丽等人用紫外分光光度法测定绿茶和红茶中的茶多酚, 结果满意, 回收率达 96.4%-92.7%^[17]。

1.2.1.2 可见分光光度法

传统茶多酚测量方法技术主要依赖于可见分光光度法技术, 这主要由于茶多酚的显色反应^[18]。例如福林酚 (Folin-Ciocalteu) 试剂法^[19, 20], 该方法是利用福林酚试剂氧化茶多酚的羟基并显蓝色, 最大吸收波长为 765nm; 该方法可用于茶叶及茶制品中茶多酚测定, 被用作当今茶叶中茶多酚含量检测方法的国标方法 (GB/T 8313-2008), 也是国际标准化方法 (ISO 14502-1/2:2005)。常见方法还有酒石酸铁法^[21-23], 在 pH7.5 磷酸缓冲液环境下, 酒石酸铁与多酚类物质反应形成蓝紫色络合物, 在 540nm 下有最大光吸收, 此法曾作为福林酚法之前的国标方法 (GB/T 8313-2002), 适用于茶叶中茶多酚含量的测定, 不适用茶叶提取物制品中茶多酚测定。该法也根据实际情况改进测量技术, 如三波长分光光度法, 提高测量精确度^[24]。酒石酸铁法比福林酚法测定的茶多酚含量高 33%左右, 基本在 27-40%之间^[25]。

除此以外, 可利用高锰酸钾与茶多酚氧化还原反应, 在 500-520nm 处测定吸光度^[26]。利用茶多酚先定量还原铁离子为亚铁离子, 再使亚铁离子与邻二氮杂菲显色生成稳定的橙红色络合物, 用阳离子表面活性剂溴化十六烷基三甲胺可以增强显色反应的灵敏度, 络合物的最大吸收波长在 510nm, 茶多酚浓度在 4.00-32.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 范围服从比耳定律, 方法检测限为 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ^[27]。与该法相似, 茶多酚先还原铁离子为亚铁离子, 亚铁离子与铁氰化钾溶液反应, 可生成可溶性

深蓝色配位化合物 $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ，采用差示分光光度法在 703nm 间接测量茶多酚含量，线性范围为 $2\text{-}12\mu\text{g mL}^{-1}$ ，检出限为 $1.35\mu\text{g mL}^{-1}$ [28]。茶多酚在酸性条件下能与钼酸铵反应生成黄色钼酸酯，341nm 处最大吸收；廖晓玲通过该法在茶多酚 $4\text{-}360\mu\text{g mL}^{-1}$ 范围内建立了浓度与吸光度的线性关系，重复性较好， $\text{RSD}=1.3\%$ [29]。根据多酚的普遍性质，多酚可与普鲁士蓝试剂反应，然后根据 720nm 处的吸光度计算出多酚含量[30]；此外，亚硝酸法、正丁醇-盐酸法、香草醛法等[13]，也可指导茶汤中茶多酚的测定。

1.2.1.3 间接原子吸收分光光度法

原子吸收分光光度法本身并不能直接用于茶多酚的分析测定。该法是指先借助于茶多酚与金属离子的反应，然后通过原子吸收分光光度法测定生成物中金属离子或剩余的金属离子量，从而间接计算出茶多酚的含量[26]。目前利用该法的研究报道主要集中在是根据茶多酚分子结构中的邻酚羟基络合的金属铜离子和铅离子。研究了间接测定茶叶中茶多酚的原子吸收法。廖晓玲等人基于在中性条件下，茶多酚能与碱式乙酸铅发生络合反应，生成难溶于水的黄色沉淀，经离心后，用原子吸收分光光度法测定上清液中过量的铅离子，由此间接测定茶多酚含量，其线性范围为 $3\text{-}25\mu\text{g mL}^{-1}$ ， $\text{RSD}=1.3\%$ [31]。雷存喜等人也通过间接原子吸收法(铅离子)测定了黑茶样品中的茶多酚含量，测量结果与邻二氮菲分光光度法比较相关性良好[32]。王吉德等人先用甲基异丁酮和丁醇的混合溶剂萃取茶汤中的茶多酚，与氨基酸分离后，加入碱性 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 悬浮液反萃取并同茶多酚作用，生成水溶性的 Cu-茶多酚络合物，离心沉降未作用的 $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ 后，再用原子吸收法测定 Cu，可求得茶多酚的含量。回收率范围为 94%-104%，平均标准偏差为 3.1% [33]。

1.2.1.4 化学发光法

化学发光法不需要外部光源，消除了杂散光及因光源发光不稳定而导致波动的缺点从而降低了噪声，提高了信噪比，再加上灵敏的光电检测技术，使该方法具有灵敏度高、线性范围宽、仪器简单等优点。Edyta 用鲁米诺-碘化学发光法同时测定酚类和咖啡因含量以及抗氧化活性[34]。于海宁等人研究了不同金属离子对

茶多酚的化学发光性质的影响,并用鲁米诺试剂测定发光强度^[35]。李明静研究过用鲁米诺- H_2O_2 -铜(II)化学发光法测定儿茶素,得出该法与传统的高锰酸钾滴定法、酒石酸亚铁分光光度法相比,更能真实体现多酚含量的结论^[36]。廖晓玲等人用茶多酚还原 H_2O_2 ,抑制鲁米诺- H_2O_2 - KIO_4 体系的化学发光,在碱性条件下,其抑制程度的大小与茶多酚的含量成线性关系,通过流动注射化学发光仪检测光信号^[37]。余宇燕等人也用该法测定了乌龙茶饮料、红茶饮料、绿茶饮料中的茶多酚,采用鲁米诺- KMnO_4 化学发光体系,线性范围为 2.0×10^{-6} - 5.0×10^{-4} mg mL^{-1} ,检出限为 1.2×10^{-7} mg mL^{-1} ^[38]。化学发光法大都采用流动注射法,该装置以其高精度、高效率及装置简单等优点被人们广泛采用。该研究方法灵敏度高,检测光信号的化学发光仪的小型化有利于便携式测量茶多酚装置的研究开发。

1.2.1.5 荧光检测法

荧光检测法的最大优点是灵敏度高,它比紫外检测方法一般高约两个数量级,最小检测量可为 10^{-13} g。该方法在茶多酚的研究方面应用广泛。刘海龙等人得出茶多酚的激发/发射波长是494nm/515nm^[39]。Hiroaki等人发现大多数儿茶素在中性环境铁氰化物(III)存在下与1,2-二苯基乙二胺反应发生荧光;儿茶素类的激发波长大约在331nm,CA、EC和EGC的发射波长大约在457、459、457nm,其检测限可达 pmol 数量级^[40]。如今用荧光检测法直接或间接测定多酚含量也有所报道。例如,在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=450\text{nm}/556\text{nm}$,十二烷基苯磺酸钠存在下,吖啶橙-罗丹明6G(R6G)间能发生有效的能量转移,使R6G荧光大大增强;酸性条件下,茶多酚的加入能使体系R6G荧光发生猝灭;曹冬林等人利用能量转移猝灭程度定量测定茶多酚,提高灵敏度和选择性,线性范围为 0.75 - 60 mg L^{-1} ,方法检出限为 0.35 mg mL^{-1} ^[41]。国际上荧光检测法在葡萄多酚上应用较多,这对茶多酚的测量有借鉴作用。例如Giovanna等人用5(6)-羧基荧光素测量葡萄多酚,采用302nm光源下曝光30s,用照相机记录荧光强度^[42]。L.Campanella等人用荧光光谱法(氧自由基吸收能力ORAC)检测葡萄多酚,激发波长540nm,发射波长565nm^[43]。

1.2.1.6 近红外检测法

近年来,近红外光谱分析技术在茶叶上的应用研究报道相对较多,研究者通过运用各种数据统计方法建立不同茶叶内含物质含量的模型,对茶叶中茶多酚含量的测定也有所报道。近红外光谱波长范围为780-2526nm,其主要是分子中C-H、O-H、C-O等基团的倍频吸收和伸缩振动、弯曲振动的合频和差频引起的吸收峰,在特定波长处样品的吸收值差异反映出茶多酚含量的不同。芦永军等人通过对儿茶素的近红外光谱进行二阶导数光谱分析找到了其倍频及合频的吸收峰位;对儿茶素的近红外光谱特性与化学浓度在各个波长处进行相关分析,发现儿茶素1450、1920和2140 nm处的3个强吸收峰在对应的相关光谱中给出了较高的相关系数^[44]。Quansheng Chen等人用FT-NIR近红外光谱仪用PLS回归RMSECV方法研究得出茶多酚含量的测定模型,相关系数大于0.9^[45,46]。近红外的快速测定方法有利于快速测定茶叶茶多酚、咖啡碱、氨基酸等内含物成分,有利于对茶树的品种、地域特征进行鉴别^[47,48]。

1.2.2 高锰酸钾滴定法

利用茶多酚具有强还原性的经典方法是高锰酸钾滴定法。以靛红作指示剂,高锰酸钾和茶多酚的氧化还原反应之间具有一定的换算系数,据此及滴定消耗的高锰酸钾,可以计算出茶多酚含量,滴定终点是溶液从蓝色变为亮黄色^[11]。该方法沿用已久,是A.O.A.C法改进后的一种简便易行的方法。但该方法结果往往偏高,是由于茶叶中的Vc、咖啡酸等的烯链也可被氧化;而且滴定终点不敏锐和不易掌握,不同的人滴定误差较大。此法虽缺乏准确性,但因其方便而为一些人所采用,王文杰等人还研究过该方法中有关用剂的特征,并提出测量注意事项^[49]。

1.2.3 电化学原理在茶多酚测量方法的应用

电化学原理可以被应用在天然抗氧化剂中的定量分析^[50]。由于具有电化学检测器的商用仪器较少,与光学检测相比,电化学检测在茶多酚的研究中相对较少。但是电化学检测器具有高选择性、高灵敏度和低造价等优点;运用电化学的理论和方法,从数据中可以获知反应的可逆性,电子转移数、速率常数、交换电流密

度、传递系数等表观动力学参数,结合中间粒子和生成物的检测,可以获知反应历程的细节信息^[51]。因此,应用电化学原理测量茶多酚是一项有意义的研究。有关报道主要集中于电位滴定法、循环伏安法等。

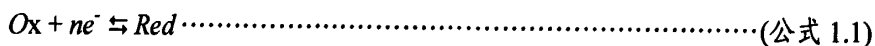
1.2.2.1 电位滴定法

电位滴定法是在滴定过程中通过测量电位变化以确定滴定终点的方法,和直接电位法相比,电位滴定法不需要准确的测量电极电位值,因此,温度、液体界面电位的影响并不重要,其准确度优于直接电位法^[52]。普通滴定法是依靠指示剂颜色变化来指示滴定终点,如果待测溶液有颜色或浑浊时,终点的指示就比较困难,或者根本找不到合适的指示剂;例如就用高锰酸钾进行氧化滴定茶多酚,在终点时由于靛红颜色由蓝变黄以及茶汤自身的颜色易产生终点误差。袁勇等人建立了电位滴定法测定茶叶中茶多酚含量的定量分析方法,仍以高锰酸钾为氧化剂,在硫酸强酸性介质中,用待测样品试液进行电位滴定,在电位滴定仪上,采用铂电极为指示电极,饱和甘汞电极为参比电极;用一阶微分法确定待测样品试液的滴定终点体积,方法的RSD为4.07%(n=5),平均回收率为99.6%^[53]。戴玲等人研究了自动电位滴定测定多酚类化合物的方法,以间苯二酚和间苯三酚为代表物质,用铁氰化钾滴定,实验结果的标准偏差约为0.027,加标回收率为89.9%^[54]。电位滴定法是靠电极电位的突跃来指示滴定终点。在滴定到达终点前后,滴液中的待测离子浓度往往连续变化n个数量级,引起电位的突跃,茶多酚含量通过消耗滴定剂的量来计算。该方法简便、灵敏、重现性好,可用于茶叶中茶多酚含量的测定。

1.2.2.2 循环伏安法

循环伏安法(Cyclic Voltammetry, CV)作为一种简便快速的电化学方法被许多研究者用于检测抗氧化剂。该法的原理是控制电极电势以不同的速率,随时间以三角波形一次或多次反复扫描,电势范围为使电极上能交替发生不同的还原和氧化反应的电势,扫描过程中记录电流-电势曲线。根据曲线形状可以判断电极反应的可逆程度,中间体、相界吸附或新相形成的可能性,以及偶联化学反应的性质等。常用来测量电极反应参数,判断其控制步骤和反应机理,并观察整个电

势扫描范围内可发生哪些反应，及其性质如何。以等腰三角形的脉冲电压（如图 1.6 所示）加在工作电极上，得到的电流电压曲线包括两个分支，如果前半部分电位向阴极方向扫描，电活性物质在电极上还原，产生还原波，那么后半部分电位向阳极方向扫描时，还原产物又会重新在电极上氧化，产生氧化波。可逆的氧化还原反应过程如下：



一次三角波扫描，完成一个还原和氧化过程的循环，故该法称为循环伏安法，其电流 - 电压曲线称为循环伏安图，如图 1.7 所示^[55]。

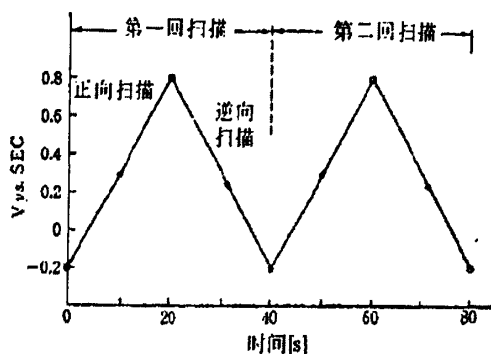


图 1.6: 循环伏安法中电位扫描图

Fig 1.6: Potential Sweep in Cyclic Voltammetry

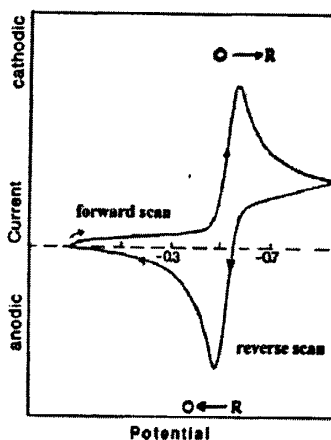


图 1.7: 典型循环伏安图

Fig 1.7: The introduction of Cyclic Voltammetry

采用循环伏安法对多酚类物质的研究也有相关报道。周园以碳糊电极(GWE)为工作电极，以含 KCl 的 Britton-Robinson 缓冲溶液为底液，采用循环伏安法测

试了儿茶素的电氧化还原行为,得到儿茶素在 GWE 表面有较强的吸附,在较低电势下得到儿茶素的一对准可逆的氧化还原峰和在高电势下的一个氧化不可逆峰;在此基础上用比循环伏安法更高灵敏度的微分脉冲伏安法得到儿茶素检测线性范围 $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ - $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$;并用循环伏安现场薄层光谱电化学测试得到在不同的恒电势下氧化,儿茶素的 UV/Vis 特征吸收峰的变化趋势^[56]。袁圣杰等人用循环伏安法研究了类黄酮化合物山奈酚的电氧化行为和机理^[57]。李静等人用循环伏安法研究了儿茶素在玻碳电极(GCE)和多壁碳纳米管修饰玻碳电极(MWCNT/GCE)上的电化学行为,探讨电极反应机理;表明 MWCNT/GCE 对儿茶素具有显著的电催化作用,氧化还原电位差比在 GCE 上明显减小,峰电流显著增加^[58]。陈伟等人研究儿茶酚在聚刚果红修饰电极上的电化学行为,以 0.5 mol L^{-1} 硫酸为底液,用循环伏安法扫描,发现该修饰电极测定儿茶酚的线性范围为 0.02 - 2 mmol L^{-1} ,并具有良好的稳定性^[59]。孙国禄研究了用聚灿烂甲酚蓝膜修饰电极循环伏安法对儿茶酚的电催化作用,氧化峰电流与儿茶酚在 5.0×10^{-6} - $1.2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 浓度范围内有良好的线性关系,相关系数 $r=0.9997$ ^[60]。Olga 用循环伏安法研究了儿茶素、咖啡酸、芦丁和槲皮苷在玻碳电极上于葡萄酒模拟液中的电氧化还原行为^[14]。Paul A 研究了多酚物质如儿茶素、没食子酸、桑黄素等在葡萄酒和血清基质中的循环伏安图,研究了电极测量状态(静止或旋转)、扫描速度、工作电极类型(铂、玻碳、石墨固体电极)等因素的影响^[50],还研究了所测葡萄酒系统中多酚类物质第一次电氧化大多发生在 400 mV 左右(vs. Ag/AgCl)^[61]。除此以外,他还测量过绿茶、乌龙茶、红茶和咖啡中主要儿茶素在碳电极、 $\text{pH}7.0$ 缓冲液中的电化学行为,发现带有连苯三酚基团的多酚在 90 - 120 mV 就能发生第一次电氧化,而带有联苯二酚的多酚发生在 180 - 220 mV 处(vs. Ag/AgCl)^[62]。Jian-Bo 等人采用循环伏安现场薄层光谱电化学研究了芦丁在氧化过程中的电化学和紫外吸收性质,对芦丁氧化时结构变化的基础研究具有指导意义^[63]。

1.2.2.3 其他电化学方法

除了上述方法,茶多酚还可以用其他电化学原理测定。杨梅等人构建了新型的顺序注射电化学发光系统,在该系统电解电压为 0.6 V ,利用碱性条件下茶多

酚对鲁米诺- H_2O_2 电化学发光行为的抑制原理, 发光值的降低程度与茶多酚浓度在 $2.5\text{-}25\text{mg L}^{-1}$ 范围内呈现良好的线性关系^[64]。

Andlauer 等人根据茶多酚的电化学性质, 发现 0.6V 处氧化峰电流和抗氧化活性的线性关系, 开发了电化学扫描快速测定茶汤抗氧化活性方法 (RESAC), 由于茶叶中抗氧化活性主要来源与多酚类物质, 此法也可应用于快速测定茶多酚含量^[65]。

为了提高灵敏度和准确性, 一些为茶多酚测量设计的酶电极随之出现。例如, 曾鑫等人从鲜茶叶中提取多酚氧化酶, 与氧电极偶合制成酶传感器, 以焦性没食子酸为底物, 研究了激活剂浓度、缓冲介质、体系 pH、操作温度等对响应性能的影响, 测得计算茶多酚响应的酶动力学方程, 得到线性范围为 $1.5\text{-}9.4\text{g L}^{-1}$, 从而为茶多酚含量的测定建立了一种生物传感新方法^[66]。Arkadi 等人用葡萄糖脱氢酶修饰的玻碳电极测量茶多酚的检测限可为 nM 级^[67]。Lucilene 等人基于 HRP 修饰的安培生物传感器测定了蔬菜中的多酚类物质, 以绿原酸为例, 线性浓度为 $1\text{-}50\mu\text{mol L}^{-1}$ ^[68]。

1.2.4 茶多酚检测器及装置研究现状

传统的茶多酚测量依赖于分光光度计, 所需的检测器为紫外或可见光检测器。由于光学技术的发展, 发现茶多酚多种光学性质, 测量中用到的仪器设备会有化学发光仪、原子吸收分光光度计、荧光分光光度计、傅里叶变换型近红外光谱仪等。由于电化学测量所需化学试剂少, 成本低, 针对多酚物质测定的电极也在不断地研究, 希望找到灵敏度高、测量范围广、正对性强的电极或传感器。

20 世纪 50-60 年代后, 色谱技术也应用于茶多酚的分析; 包括平板色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法等。该法是利用物质在不同的两相中溶解、吸附、分配、离子交换或其它亲和作用的差异, 使混合物中的各组分达到分离, 测量越精确要求混合物中的单体分离越好; 然后根据不同的待测样品配备不同的检测器, 如紫外可见吸收检测器、质谱检测器 (MS)、荧光检测器、电化学检测器 (ECD) 等。这些检测器的发展也离不开光学技术和电化学技术的发展。目前, 茶多酚分析主要以高效液相色谱法 (HPLC) 为主, 目的是测量茶多酚混合物中的单体如不同的儿茶素、黄酮及黄酮苷等, 以便精确分析; 采用紫外检测器的较多^[69-71],

也有 HPLC-MS^[72]、HPLC-ECD^[73, 74]、荧光检测器^[75]。除此以外,新的分离技术配备检测器如 GC-MS^[76]、HSCCC^[77]测量茶多酚也有所报道。

现在研究主要集中在精确分离和测定各种茶多酚单体,仪器精密昂贵,步骤繁琐,检测成本高,测量需要专门培训过的实验人员在实验室操作。现行国标法测量时间长,测定一个茶样中茶多酚含量需 1.5 个小时左右;测量试剂较多,也很难做到低碳环保。在现实生产过程中,茶多酚含量是指导产品质量的一个重要指标;测量要求很多时候没有必要精确到茶多酚单体及其含量;而是急需一个快速、低耗、简便测量的方法和装置。

如今针对快速简便测量茶多酚的仪器或装置报道较少,市场上销售几乎没有。经查资料,赵良贵等人发明了检测茶多酚的试纸及其标准比色卡,但因未见市售而鲜为人知。

1.3 本研究的目的是和意义

本研究的目的是找到适合快速、简便、低耗测定茶多酚含量的方法,开发以此方法为基础的测定装置模型。针对上述目的和前人的研究,根据茶多酚自身的理化性质,选择光学技术和电化学技术直接测定茶汤中茶多酚含量。

光学技术将采用茶多酚紫外吸收特性,电化学技术将采用循环伏安法。结合这两种测定方法,一是可以提高茶多酚测定量程,二是可以利用两种方法的优点,减少缺点,提高快速测定的准确度。

以降低成本、简便测量为原则,采用市售材料,设计基于这两种测量技术的装置,制作出模型。该研究有利于可便携式茶多酚测量装置的产生,有助于指导茶叶生产实践,推动茶叶品质检测的发展。

2 利用光学技术快速测定茶多酚含量方法的研究

本实验的目的在于探明用光学技术快速测定茶汤中茶多酚含量的方法。

根据茶多酚的理化性质，在紫外波段和红外波段有相应的吸收峰。紫外吸收峰大都发生在 205nm 和 275nm。茶多酚在近红外 1450、1920 和 2140 nm 处，中红外波段 3125nm 以上也会发生强吸收峰。根据实验结果选择合适的测量波段，找到茶多酚浓度与吸收度之间的线性范围，完成快速、简便、低耗测定的目的。

2.1 材料与方 法

2.1.1 材料、试剂及主要仪器设备

7 种市售绿茶茶样（云南绿茶、越南绿茶、黄山毛峰、日本绿茶、安吉白茶、汤记高山、浙江龙井）；98% 纯度茶多酚提取物（TP，浙江东方茶业科技有限公司）；福林酚试剂（Sigma-Aldrich，美国）、碳酸钠、氯化钾、磷酸二氢钾和磷酸氢二钠（国药集团化学试剂有限公司）均为分析纯。实验用水为超纯水（milliQ Gradient A10, Millipore AG, Zug, 瑞士）。

可见-紫外分光光度计（Ultrospec 2000, Pharmacia biotech，美国）；超声波清洗器（KQ2200DB，昆山市超声仪器有限公司）；N-200 傅里叶变换型近红外光谱仪（Buchi Labortechnik AG，瑞士）。

2.1.2 检测原理

分光光度法（spectrophotometry）测量浓度的基本原理为：当一束强度为 I_0 的单色光垂直照射某物质的溶液后，由于一部分光被体系吸收，因此透射光的强度降至 I_1 ，则溶液的透光率为：

$$T = \frac{I_1}{I_0} \dots\dots\dots (公式 2.1)$$

吸光度 A 与透光率 T 的关系为：

$$A = \lg \frac{1}{T} = \lg \frac{I_0}{I_1} \dots\dots\dots (公式 2.2)$$

朗伯(Lambert)-比尔(Beer)定律为:

$$A=alc \dots\dots\dots (公式 2.3)$$

式中 A 为吸光度, l 为溶液层厚度, c 为溶液的浓度, α 为吸光系数。其中吸光系数与溶液的性质、温度以及波长等因素有关。溶液中其他组分(如溶剂等)对光的吸收可用空白液扣除。由上式可知,当溶液层厚度和吸光系数一定时,吸光度 A 与溶液的浓度成线性关系。如图 2.1 所示。200-400nm 为紫外光区, 400-780nm 为可见光区, 780-3 μ m 为近红外光区, 2.5-25 μ m 为红外光区。

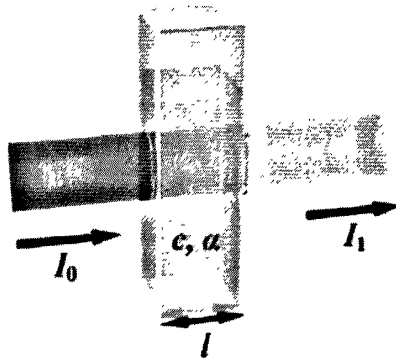


图 2.1: 朗伯-比尔定律图解

Fig 2.1: Representative schematic of the Beer-Lambert law

分光光度法 (spectrophotometer) 是利用单色仪或特殊光源提供的特定波长的单色光通过标样和被分析样品, 比较两者的光强度来分析物质成分的光谱仪器。主要构造如图 2.2 所示。市售分光光度计一般为紫外-可见光分光光度计, 也有可见光-近红外分光光度计^[78]。

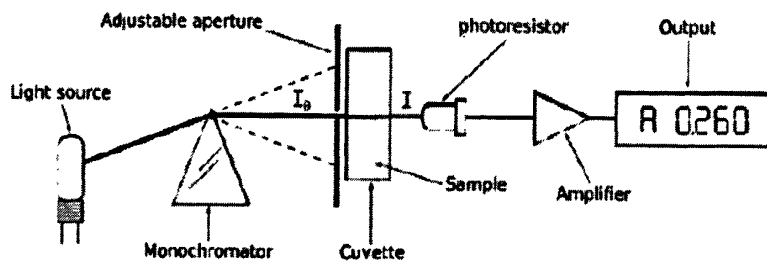


图 2.2: 分光光度计示意图

Fig 2.2: Simple schematic of a spectrophotometer

本实验中测定的是茶汤中的茶多酚的吸光度, 先进行紫外-可见-近红外波段的全波段扫描, 找到合适的波段, 使吸光度与浓度呈线性关系, 再与市售的光源相比较, 选取合适的光源。

2.1.3 检测方法

2.1.3.1 全波段扫描

将 98% 纯度茶多酚提取物在超声下用水配制成 0.5mg mL^{-1} 母液, 置于 4°C 冰箱储存。用水稀释母液至茶多酚浓度为 125、100、80、70、50、40、20、10、5、 $1\mu\text{g mL}^{-1}$, 用紫外-可见分光光度计进行 190-820nm 全波段扫描。用水稀释母液至茶多酚浓度为 500、250、100、50、30、20、10、5、 $2.5\mu\text{g mL}^{-1}$, 用近红外光谱仪透射装置进行 1-2.5 μm 全波段扫描。空白对照为水。每个样品测定 3 次。

2.1.3.2 测定茶样

称取 2.0g 绿茶样于 100mL 沸水中浸提 5 分钟, 过滤冷却后将茶样用水稀释 50 倍。用紫外-可见分光光度计将茶汤样品进行全波段扫描。重复三次。

2.1.3.3 国标法测定茶多酚含量

根据国标 GB/T 8313-2008 采用福林酚分光光度法。用 98% 纯度的茶多酚提取物建立标准曲线 ($y=0.0083x-0.1528$, $R^2=0.9993$, 线性范围 $20-150\mu\text{g mL}^{-1}$), 测定茶汤中茶多酚含量。重复三次。

2.2 结果与分析

2.2.1 紫外-可见分光光度法

2.2.1.1 茶多酚紫外-可见光谱性质及标线建立

$30\mu\text{g mL}^{-1}$ 的茶多酚提取物溶液和稀释 50 倍的绿茶茶汤紫外-可见光光谱图如图 2.3 所示。在 216 和 275nm 处茶多酚有明显的紫外吸收峰, 这归功于苯环的

紫外吸收。茶多酚在可见光波段几乎没有吸收。在 216nm 深紫外波段，吸收易饱和，不易找到吸光度与浓度的关系；而且该波长市售 LED 光源较少，价格较贵。该法集中研究 275nm 处的紫外吸收。

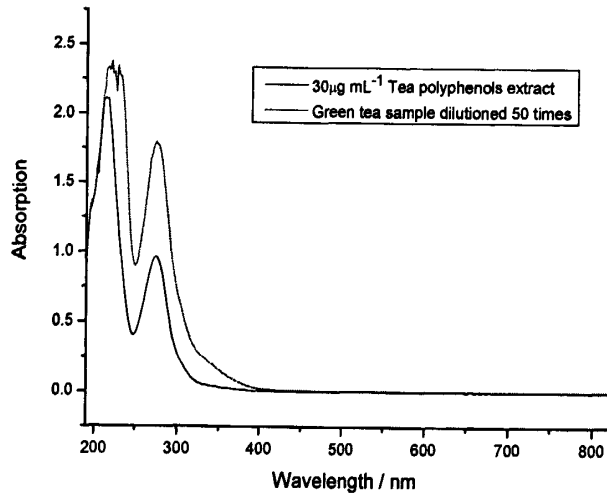


图 2.3: 30µg/mL 98% 茶多酚提取液和稀释 50 倍的绿茶茶汤紫外-可见光光谱图

Fig 2.3: UV-Vis absorbance spectrum of 30 µg/mL green tea polyphenols extract and green tea infusion diluted 50 times

不同浓度的茶多酚与 Ultrospec 2000 分光光度计 275nm 吸光度值的关系如图 2.4 所示。说明该方法测量茶多酚有较好的线性关系。

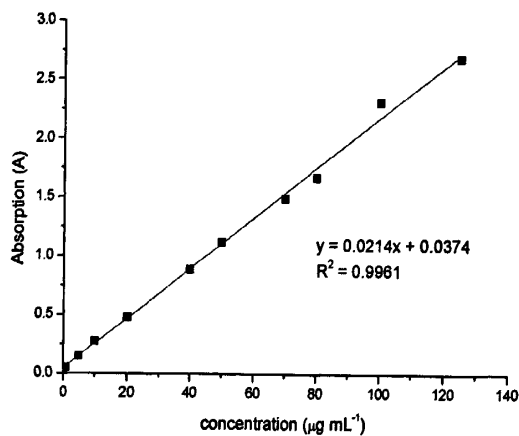


图 2.4: 98%茶多酚提取物溶液与分光光度计 275nm 吸光度值关系

Fig 2.4: The relationship of the 98% TP concentration and absorption values by spectrophotometer at 275nm

由国标法测定茶样的茶多酚含量测定值与 275nm 直接分光光度法测定值比较如表 2.1 所示。275nm 直接测定茶样的方法重复性较国标好。使用本法与福林酚分光光度法相比，测量值偏高，偏高 5%左右，受茶汤中咖啡碱和带苯环的氨基酸含量的影响。国标法测量一个样品大约需要 1.5 小时，而该方法测量时间小于 1 秒，大大缩短了测量时间，可应用在茶产品生产过程中的快速测定。

表 2.1 绿茶茶汤茶多酚总量测量结果

Table 2.1 Result of measuring tea polyphenols content in Green tea infusion

方法	项目	云南 绿茶	越南 绿茶	黄山 毛峰	日本 绿茶	安吉 白茶	汤记 高山	浙江 龙井
福林 酚分 光光 度法	含量(mg/mL)	2.675	1.623	1.247	2.014	0.960	1.390	1.213
		±0.082	±0.016	±0.023	±0.064	±0.060	±0.029	±0.087
	RSD%	3.064	1.033	1.812	3.194	0.627	2.105	7.212
275 nm 直 接测 定法	含量(mg/mL)	2.816	1.693	1.297	2.037	1.058	1.463	1.303
		±0.006	±0.011	±0.013	±0.011	±0.021	±0.043	±0.016
	RSD%	0.213	0.650	1.002	0.540	1.985	2.939	1.228
	与福林酚法比 较%	5.271	4.313	4.010	1.142	10.208	5.252	7.420

2.2.1.2 市售 LED 光源的选择

根据所有样品在分光光度计下的全波段图谱以及市售的多种紫外波段的 LED 光源的特性（如光源半峰全宽 FWHM，中心波长、实施电压等），参考高斯公式积分计算 LED 吸光度理论值。计算方法如下（ $\lambda=190-820\text{nm}$ ）：

$$\sum(Abs_{\lambda} \times LED_{\lambda}) = LED_{value} \dots\dots\dots (公式 2.4)$$

分析所有样品的 LED 吸光度理论值与茶多酚含量的关系。该紫外波段市售 LED 波长主要有 260±5nm, 270±5nm, 275±5nm, 280±5nm, 285±5nm。结果如图 2.5 所示。260±5nm, 270±5nm, 275±5nm, 280±5nm, 285±5nm 下拟合程度 (R^2) 分别为 0.8941, 0.7871, 0.8956, 0.871, 0.8801。所以可以取 275±5nm 下的 LED 光源制作装置。

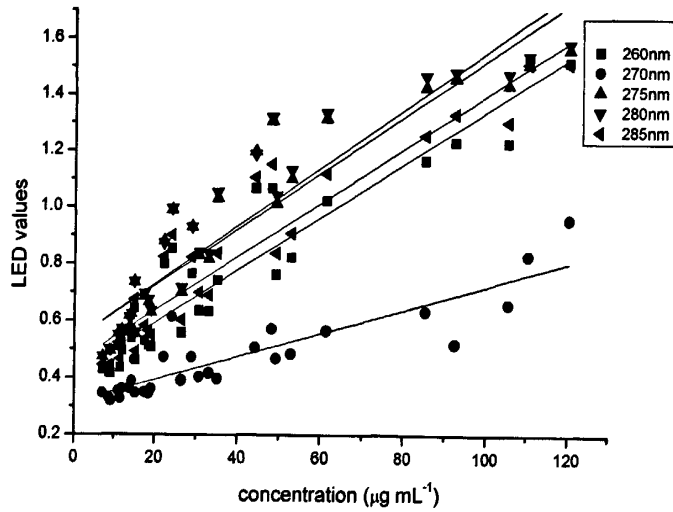


图 2.5: 不同波长 LED 吸光度理论值与茶多酚含量的关系

Fig 2.5: The relationship of the LED absorption theoretical values and TP concentrations

2.2.2 近红外光谱法

由图 2.4 所知, 茶多酚提取物水溶液的近红外吸收光谱与水的近红外光谱近似, 不同浓度的茶多酚提取物与水溶液光谱没有明显差异, 说明水在近红外的吸收峰较大^[79], 掩盖了茶多酚在该波长范围的光谱性质; 先前文献报道的采用近红外快速测定茶多酚含量是建立在对干茶的反射光谱上, 且该波段内与茶多酚浓度相关的特征峰还在研究中。该图表明不易找到某近红外波长的光源, 对茶多酚提取物水溶液或绿茶茶汤中茶多酚含量通过透射率方法测量。

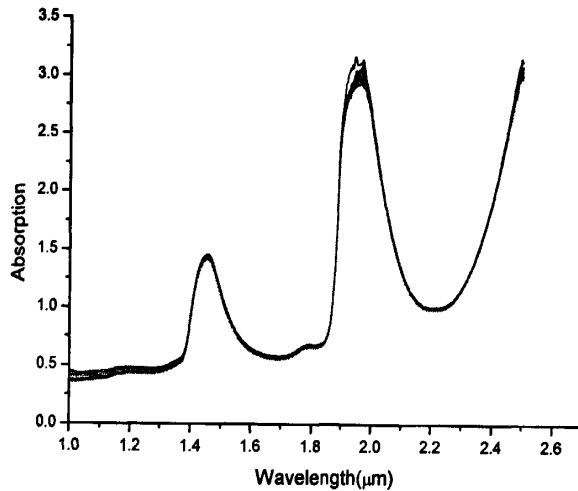


图 2.6: 不同浓度茶多酚提取物溶液近红外光谱图

Fig 2.6: NIR absorbance spectra of green tea polyphenols extract in different concentrations

2.3 小结

本实验研究了用光学技术快速测定茶汤中茶多酚含量的方法。探明茶多酚在紫外吸收峰 275nm 下吸光度与其含量有很好的线性相关, $y=0.0214x+0.0374$, $R^2=0.9961$ 。对 7 种茶样进行验证, 测量结果比国标福林酚分光光度法略高。直接测量紫外吸收度可以在 1 秒内完成, 有利于简便快速测定目的的实现。本实验计算了不同波长下市售的 LED 紫外光源理论测定值与茶多酚浓度之间的关系, 发现 $275\pm 5\text{nm}$ 下的光源较好, 该波长下的光源及检测器较易获得, 可以用在今后的装置制作中。近红外下的研究表明不易找到某近红外波长的光源, 对茶多酚提取物水溶液或绿茶茶汤中茶多酚含量通过透射率方法测量。

3 利用电化学技术快速测定茶多酚含量方法的研究

本实验的目的在于探明用电化学技术快速测定茶汤中茶多酚含量的方法。

基于电化学循环伏安法, 自制三种低成本工作电极——银电极、碳糊电极和玻碳电极, 研究该方法在茶多酚含量测定应用上的可行性。通过茶多酚在电极表面的氧化还原行为, 找到氧化电流峰值与茶多酚含量的线性关系, 从而为快速、低价、便捷检测茶多酚提供一条新思路。

3.1 材料与方 法

3.1.1 材料、试剂及主要仪器设备

7种市售绿茶茶样(云南绿茶、越南绿茶、黄山毛峰、日本绿茶、安吉白茶、汤记高山、浙江龙井); 98%纯度茶多酚提取物(TP, 浙江东方茶业科技有限公司); 福林酚试剂(Sigma-Aldrich, 美国)、无水乙醇、碳酸钠、铁氰化钾、氯化钾、硫酸钠、磷酸二氢钾和磷酸氢二钠(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯; 实验用水为超纯水(milliQ Gradient A10, Millipore AG Zug, 瑞士); 玻碳材料(HTW Hochtemperatur-Werkstoffe GmbH, 德国)。

电化学工作站(PalmSens, 荷兰); 烘箱(宁波海曙赛福实验仪器厂); 可见-紫外分光光度计(Ultrospec 2000, Pharmacia biotech, 美国)。

本实验采用的缓冲液为浓度0.05M、pH为7.0的磷酸缓冲液, 其中含有0.1M氯化钾作为支持电解质。

3.1.2 电化学测试系统的设计及制作

3.1.2.1 设计及检测原理

实验采用三电极系统如图3.1所示: 工作电极(Working Electrode, WE)、参比电极(Reference Electrode, RE)和对电极(Counter Electrode, CE)。三电极连接电化学工作站。采用循环伏安法对茶多酚的电化学行为进行测试。在工作电极和参比电极之间加上周期性的扫描三角波电势, 测量在不同电势下工作电

极的电流。从所得的循环伏安法图的氧化波、还原波的峰高和对称性中可判断茶多酚在电极表面反应的可逆程度及反应浓度。在外界影响因素如电解质、pH、扫描速度、电极状态等一致时，氧化电流峰值与所测物质的浓度成正比。

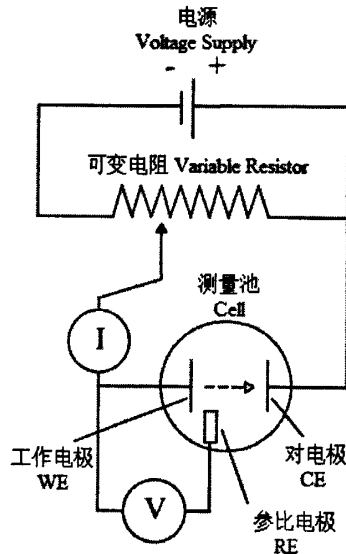
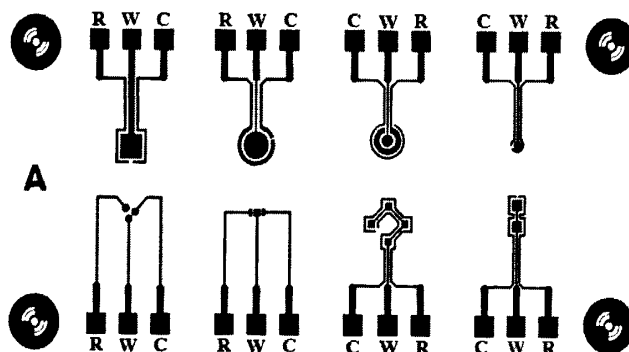


图 3.1: 三电极测量系统

Fig.3.1: Testing System with 3 electrodes

3.1.2.2 银电极测试系统的设计

按照图 3.2 所示，根据先前文献^[80-83]，设计不同形状的银电极探究茶多酚的电化学行为。制作方法采用丝网印刷技术，在 PCB 基片上先印刷铜条，再在铜上镀银。三电极材料均为银。电极间相隔 250 μ m。



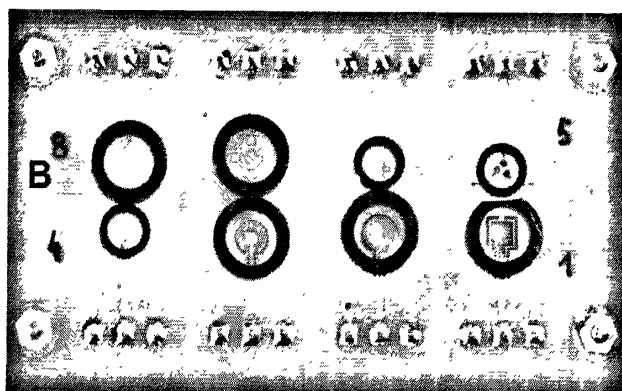


图 3.2: 八种不同形状的银电极设计

(A) 设计图; (B) 制作图; 图中标记: C: 对电极; W: 工作电极; R: 参比电极

Fig.3.2: Eight different shapes of silver electrode

(A) Design drawing; (B) Fabrication Picture; C: Counter electrode; W: Working electrode; R: Reference electrode

3.1.2.3 碳糊电极测试系统的设计

该测试系统中, 工作电极 (WE) 为碳糊电极, 参比电极 (RE) 是在碳糊表面滴加添加一滴 Ag/AgCl 浆烘干而成, 对电极是一根铂丝, 直径 0.5mm, 纯度 99.99+%。(图 3.3) 铂丝性质稳定, 不易氧化, 化学稳定性强。碳糊电极是用导电性的光谱纯石墨粉与粘合剂石蜡混合制成糊状物, 然后通过丝网印刷技术印制在 PVC 基片上而成^[84]。工作电极有效面积 4mm², 其余部分涂上绝缘硅膜, 如图 3.3 (B) 所示。由于碳糊电极制作成本较低, 除铂丝以外可一次性使用。碳糊电极的使用为插卡式, 其固定支架如图 3.3 (C) 所示。新碳糊电极测量样品前预处理方法为插入饱和 Na₂CO₃ 溶液在 1.2V 恒电位活化 5 分钟。

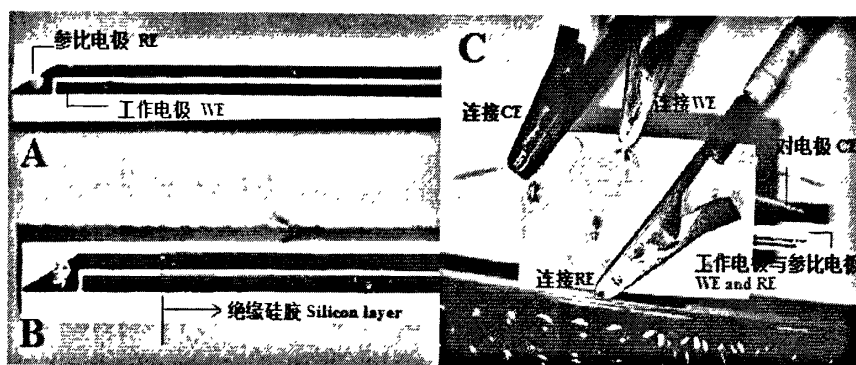


图 3.3: 碳糊电极测试系统设计

(A) 工作电极和指示电极图; (B) 碳糊电极有效面积 4mm×1mm 图; (C): 三电极及固定支架图

Fig.3.3: Design of Carbon paste electrode

(A) Working electrode and Reference electrode; (B) Carbon paste electrode with active area 4mm×1mm; (C) Electrodes and Support

3.1.2.4 玻碳电极测试系统的设计

该测试系统中，工作电极为玻碳电极，参比电极是在玻碳表面滴加一滴 Ag/AgCl 浆烘干而成，对电极是一根铂丝，直径 0.5mm，纯度 99.99%。(图 3.4) 工作电极有效面积 12mm^2 。玻碳材料需先在砂纸上打磨，然后依次用 0.5、0.1 和 $0.05\mu\text{m}$ 氧化铝在鹿皮上抛光成镜面^[85]，并用无水乙醇和超纯水超声洗涤 1 min 晾干。玻碳通过导电环氧胶与导电铜相连，再粘在 PCB 基片上。玻碳电极由于材质坚硬和微结构各向同性，化学稳定性高，污染后只需重复打磨后便可再次使用。其用作电极的主要原因是良好的机械和导电性能，电子传递各向同性，电压窗口范围较大，重复性较好，透气率 $10^{-10}\text{-}10^{-12}\text{cm}^2/\text{sec}$ ，电导性 $42\mu\text{ohm}\cdot\text{m}$ ，可以有效地收集电氧化过程中传递的电子。

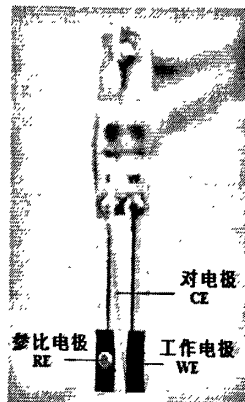


图 3.4：玻碳电极测试系统设计

Fig.3.4: Design of Glassy Carbon electrode

3.1.3 电极测试及测试参数的确定

将电极置于水和缓冲液中在 0-1V 的电压范围内以 50mV s^{-1} 速度进行循环伏安法扫描，判断电极表面是否洁净以及缓冲液是否对茶多酚含量测定产生影响。碳糊电极和玻碳电极用标准物质铁氰化钾试液进行循环伏安法扫描。条件根据两种电极的响应范围而定。对于碳糊电极，试液包括 $1\text{mM K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 与 $0.2\text{M Na}_2\text{SO}_4$ ，扫描范围 -0.4 至 1V；对于玻碳电极，试液包括 $5\text{mM K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 与 0.2M

Na_2SO_4 , 扫描范围为-0.4至0.1V; 扫描速度均为 100 mV s^{-1} 。试液用氮气脱氧15分钟。

将98%纯度茶多酚提取物在超声下用缓冲液配制成 0.5 mg mL^{-1} 母液, 置于 4°C 冰箱储存。根据所选电极用缓冲液稀释母液至合适浓度, 在0-1V内进行循环伏安法测试。记录茶多酚在各电极的循环伏安曲线, 判断氧化还原反应的可逆性。优化循环伏安法条件, 扫描前1V电位下的富集时间设为5个水平: 0、10、20、30、40s; 循环扫描次数取1至7次; 扫描速度设为5个水平: 20、50、100、150、200 mV/s 。每个样品重复3次。通过记录不同浓度茶多酚提取物的循环伏安法扫描图数据, 氧化电流峰值大小由软件 IDL Version 6.2 计算, 建立标准曲线, 确定测量范围, 测试重复性。所有测试时电极处于静态。每次测量后用棉签擦拭电极, 再用水或缓冲液进行测量, 发现无峰表示电极表面已无吸附的多酚造成影响; 若擦拭不净, 则用50%乙醇用相同速率在-2-0V进行循环伏安法扫描2次以保证电极表面清洁。实验操作在室温中进行。

3.1.4 实验验证

3.1.4.1 循环伏安法

称取2.0g绿茶样于100mL沸水中浸提5分钟, 过滤冷却后用缓冲液将茶样稀释50倍。在0-1V范围内对被测溶液进行循环扫描两次, 扫描速度为 100 mV s^{-1} 。实验操作在室温中进行。每个茶样重复3次。通过各电极标准曲线得出茶多酚含量预测值。

3.1.4.2 国标法测定茶多酚含量

为了测试本方法的计量性能, 测量结果与国标方法相比较。根据国标 GB/T 8313-2008 采用福林酚分光光度法。用98%纯度的茶多酚提取物建立标准曲线 ($y=0.0083x-0.1528$, $R^2=0.9993$, 线性范围 $20-150 \mu\text{g mL}^{-1}$), 测定茶汤中茶多酚含量。每个样品重复3遍。

3.2 结果与分析

3.2.1 银电极

将所设计的不同形状的银电极用循环伏安法测试 98%纯度茶多酚溶液和绿茶茶汤（稀释 50 倍）时，未发现有明显的氧化电流峰，以图 3.2（B）中银电极 1 为例，结果如图 3.5 所示。由于银化学性质活泼、表面较易毒化、电位窗较窄，在电化学测量上相对金、铂材料所制电极应用较少，所查文献上银电极作为工作电极在测量酚类物质的报道几乎没有^[86]。本实验中，所制银电极在测试茶多酚溶液中容易变黑，不适宜作为测量茶多酚含量的工作电极。

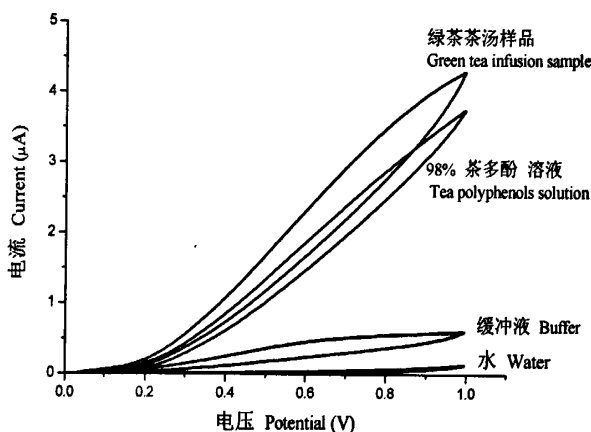


图 3.5：银电极测试结果图

Fig.3.5: Testing Result of Silver Electrode

3.2.2 碳糊电极和玻碳电极

3.2.2.1 电极测试

碳糊电极铁氰化钾测试结果如图 3.6（A）所示，阴极峰电位的差值 ΔE_p 为 600mV，阳极峰和阴极峰电流比为 1.025。玻碳电极测试结果如图 3.6（B）所示， ΔE_p 为 71 mV，电流比为 1.065。电流比均接近为 1，说明铁氰化钾在电极上表现为氧化还原可逆反应。两次扫描氧化还原峰都基本重合，可见稳定性较好。由标准物质铁氰化钾的测试结果表明两电极可以用于循环伏安法的测量。

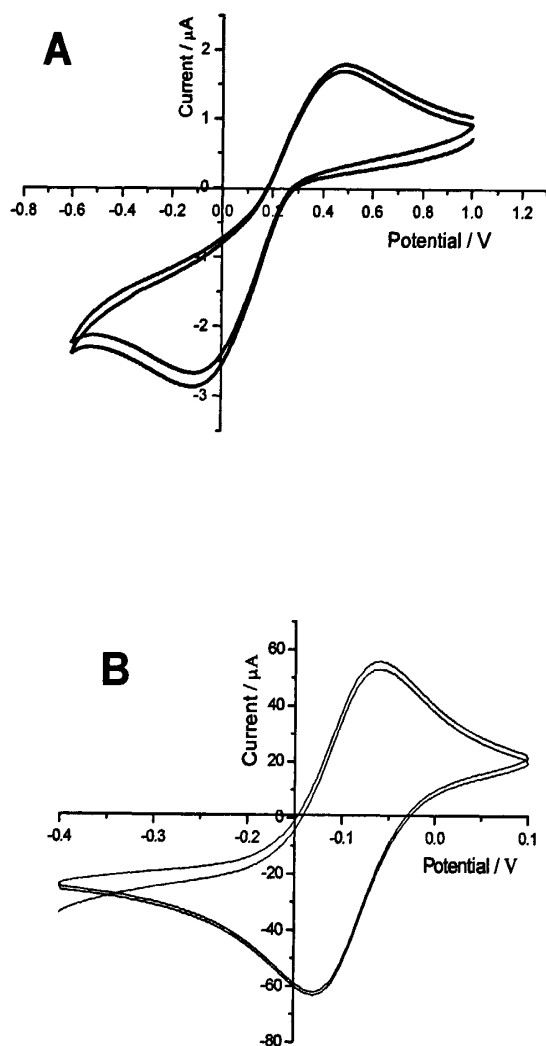


图 3.6: 碳糊电极和玻碳电极测试铁氰化钾溶液结果图

(A) 碳糊电极; (B) 玻碳电极

Fig.3.6: Testing Result of $K_3Fe(CN)_6$ solution on the carbon paste electrode and glassy carbon electrode

(A) Carbon electrode; (B) Glassy carbon electrode

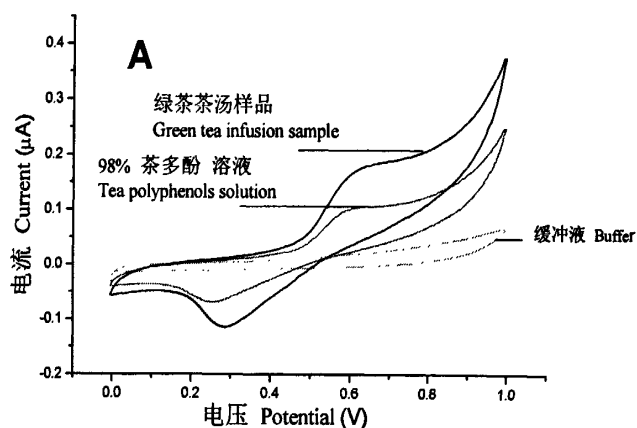
茶汤中具有还原性的物质主要为多酚类物质。在循环伏安法中,茶多酚的酚羟基达到反应电势时会氧化成醌从而产生氧化电流峰,醌在反向扫描中还原为原来的酚羟基产生还原电流峰^[14]。根据先前文献在儿茶素的报道^[56, 62, 87],氧化峰可能会出现三个;一般认为在低于 100mV 出现的第一个氧化峰来源于 B 环上 3',

4', 5'-三羟基供电子基团的氧化; 第二个氧化峰小于 200mV 是因为 B 环上 3', 4'-二羟基氧化产生对应的邻醌结构或者 C 环位置 3 上没食子酰基发生氧化; A 环上的 5,7-二羟基的氧化导致在 600mV 附近产生第三个氧化峰。如图 3.7 所示, 在茶多酚测定过程中, 缓冲液对测量没有影响。将扫描范围控制在 0-1V 可以确保茶汤溶剂水在扫描电势下不发生水解从而影响测量。将缓冲液设在 pH 为 7 为了防止出现茶多酚在酸性条件下不易氧化和在碱性条件下过易氧化的现象, 从而有利于控制茶多酚电氧化的进行。

本实验中, 0.01mg mL^{-1} 茶多酚在碳糊电极正向扫描时于 0.64V 出现一个氧化峰, 电流峰值约为 $0.14\mu\text{A}$, 反相扫描时于 0.25V 出现一个还原峰, 电流峰值约为 $0.11\mu\text{A}$; ΔE_p 为 390mV, 电流峰值比小于 1, 所以茶多酚在此发生的氧化还原反应为不可逆过程。

在玻碳电极上, 0.01mg mL^{-1} 茶多酚正向扫描出现两个氧化峰, 0.09V 第一个氧化峰, 电流峰值 $1.42\mu\text{A}$, 0.55V 第二个氧化峰, 电流值 $2.06\mu\text{A}$; 反向扫描只在 0.31V 出现还原峰, 峰值 $1.03\mu\text{A}$, 在此电氧化也为不可逆。

所制的玻碳电极较碳糊电极灵敏, 若要用该两电极研究茶多酚各结构氧化行为, 仍需进一步提高电极的灵敏度或进行电极表面修饰等。在此研究中, 玻碳电极主氧化电流峰发生在 0.6V 附近, 与文献^[65]报道相似。图 3.7 表明茶汤中的茶多酚物质与茶多酚标样的位置相同, 所以可通过循环伏安法检测茶汤中的茶多酚。本实验希望通过主氧化电流峰值大小与茶多酚含量建立关系, 探索用所制低成本电极快速测量绿茶茶汤中茶多酚含量的可能性。



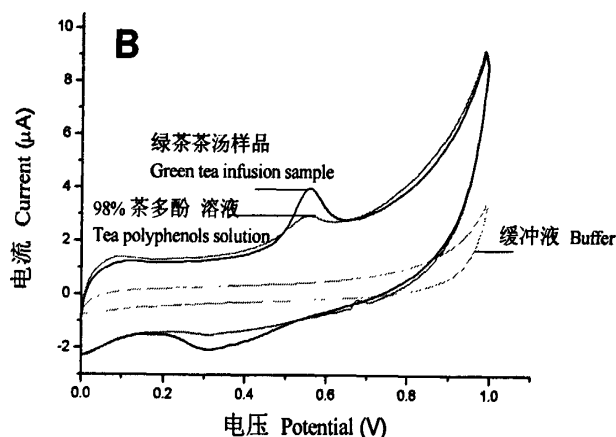


图 3.7: 碳糊电极和玻碳电极测试茶多酚溶液结果图

(A) 碳糊电极; (B) 玻碳电极

Fig.3.7: Testing Result of tea polyphenols solution on the carbon paste electrode and glassy carbon electrode

(A) Carbon electrode; (B) Glassy carbon electrode

3.2.2.2 电极测试参数的确定

在测量茶多酚含量中,富集时间 0-40s 对氧化电流峰值的影响如图 3.8 所示,说明短期的富集时间对循环伏安法中氧化电流峰值的影响不大,因此在样品扫描前不设富集时间。对一个样品扫描次数的影响如表 1 所示,第 1 次扫描会出现不稳定情况,第 2 次至第 7 次氧化电流峰基本稳定,为了有利于缩短测量时间,样品测量均取第二次循环扫描结果。扫描速度 v 在 20, 50, 100, 150, 200 mV s^{-1} 的范围内,氧化电流峰值与 $v^{1/2}$ 成正比: $y=0.0210x-0.0246$, $R^2=0.9394$ (碳糊电极); $y=0.3389x-1.1079$, $R^2=0.9740$ (玻碳电极)。在样品测量中考虑测量时间和测量效果,取扫描速度为 100 mV s^{-1} 。

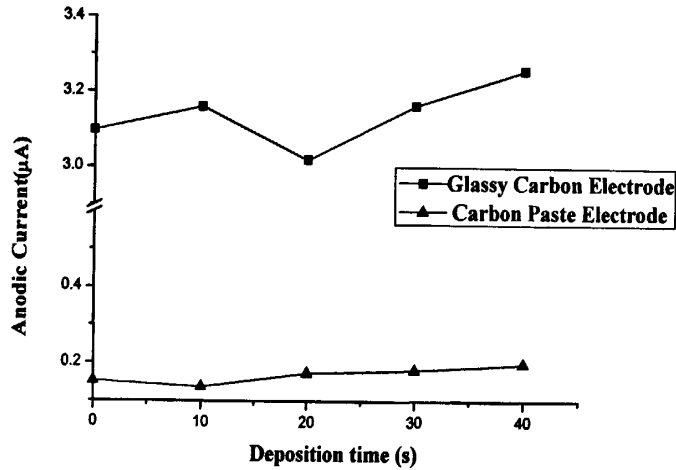


图 3.8: 富集时间对氧化电流峰值的影响

Fig.3.8: The influence of deposition time on the anodic current

表 3.1 循环扫描次数的影响

Table 3.1 The influence of cyclic voltammetry scan times

循环扫描次数	碳糊电极		玻碳电极	
	氧化峰电势 (V)	氧化峰电流值 (µA)	氧化峰电势 (V)	氧化峰电流值 (µA)
1	0.645	0.117	0.540	2.991
2	0.635	0.124	0.530	3.032
3	0.620	0.120	0.535	3.059
4	0.640	0.129	0.530	3.011
5	0.640	0.138	0.525	3.021
6	0.645	0.137	0.525	3.139
7	0.635	0.128	0.520	3.110
Average±SD	0.637±0.009	0.128±0.008	0.529±0.007	3.052±0.054
RSD%	1.348	6.178	1.271	1.791

3.2.2.3 茶多酚标线的建立及茶样验证

根据循环伏安法主氧化电流峰值与被测试液中茶多酚含量的关系,用茶多酚提取物溶液在所制电极上建立标准曲线。碳糊电极标准曲线为 $y=0.0037x+0.1001$, $R^2=0.9886$, 线性范围为 $5-100\mu\text{g mL}^{-1}$ 。玻碳电极标准曲线为 $y=0.0272x+1.7884$, $R^2=0.9926$, 线性范围为 $5-100\mu\text{g mL}^{-1}$ 。如表 3.2 所示,对于同一个绿茶茶汤样本,所制碳糊电极和玻碳电极的重复性不如国标方法。使用本法与国标方法相比较,碳糊电极平均测量偏差在 $\pm 7\%$ 以内;玻碳电极在 $\pm 5\%$ 以内。碳糊电极重复性不如玻碳电极。福林酚试剂分光光度法测量一个样品需要 1.5 小时,而电化学方法测量可在 40 秒完成扫描,大大缩短了测量时间。该测量方法

可应用在茶产品生产过程中的快速测定绿茶茶多酚含量。

表 3.2 绿茶茶汤茶多酚总量测定结果

方法	项目	云南 绿茶	越南 绿茶	黄山 毛峰	日本 绿茶	安吉 白茶	汤记 高山	浙江 龙井
福林酚 分光光度法	含量	2.675	1.623	1.247	2.014	0.960	1.390	1.213
	(mg/mL)	±0.082	±0.016	±0.023	±0.064	±0.060	±0.029	±0.087
	RSD%	3.064	1.033	1.812	3.194	0.627	2.105	7.212
碳糊电 极循环 伏安法	检测含量	2.455	1.643	1.215	2.201	0.849	1.250	1.271
	(mg/mL)	±0.219	±0.209	±0.118	±0.069	±0.142	±0.187	±0.054
	RSD%	8.929	12.728	9.749	3.135	16.722	14.961	4.249
	与福林酚法 比较 (%)	-8.242	1.252	-2.570	9.267	-11.599	-10.101	4.753
玻碳电 极循环 伏安法	检测含量	2.606	1.695	1.123	1.944	1.010	1.458	1.254
	(mg/mL)	±0.076	±0.113	±0.081	±0.082	±0.026	±0.103	±0.061
	RSD%	2.931	6.678	7.190	4.237	2.599	7.068	4.835
	与福林酚法 比较 (%)	-2.589	4.443	-9.965	-3.508	5.149	4.895	3.379

3.3 小结

研究表明,循环伏安法是快速测定绿茶茶汤中茶多酚总量的有效工具。银电极不适合测量茶多酚含量;碳糊电极和玻碳电极可以用作该用途。碳糊电极制作成本低,可一次性使用,方便大量生产,也可制成插卡式传感器。玻碳电极测试结果较稳定,电极可以重复使用,比较低碳环保,可制成固定式传感器。电化学方法测量可在 40 秒完成扫描,碳糊电极平均测量偏差在±7%以内;玻碳电极在±5%以内;碳糊电极重复性不如玻碳电极。本章是利用电化学方法测量茶多酚含量的初步研究,为了进一步提高测量的准确性和重复性,对所制电极的制作工艺、电极表面处理还有待深入。该法的实现将有利于便携式茶多酚检测装置的产生。

4 利用光学-电化学技术快速测定茶多酚含量装置的研究

根据上述光学和电化学两种技术可以快速测定绿茶茶汤中茶多酚的含量,本实验旨在结合这两种测量方法,以降低成本、简便测量为原则,采用市售材料,设计测量茶多酚含量的装置,并制作出装置模型。结合这两种测定方法,一是可以扩大茶多酚测定量程,二是可以结合两种方法的优点,减少缺点,提高快速测定的准确度。该研究有利于便携式茶多酚测量装置的产生,有助于指导茶叶生产实践,推动茶叶品质检测的发展。

4.1 材料与方法

15种市售绿茶茶样由上虞健茗茶叶有限公司提供(5种炒青绿茶,5种蒸青绿茶,5种烘青绿茶);98%纯度茶多酚提取物(浙江东方茶业科技有限公司);福林酚试剂(Sigma-Aldrich,美国)、无水乙醇、碳酸钠、铁氰化钾、氯化钾、硫酸钠、磷酸二氢钾和磷酸氢二钠(国药集团化学试剂有限公司)均为分析纯;实验用水为超纯水(milliQ Gradient A10, Millipore AG, Zug, 瑞士)。

玻碳材料(HTW Hochttemperatur-Werkstoffe GmbH, 德国); $\lambda=275\text{nm}\pm 5\text{nm}$ 紫外发光二极管UV LED光源(SET, 美国);Sapphire蓝宝石窗口材料(Edmund Optics, 美国);平凸透镜(Edmund Optics, 美国);碳化硅光电二极管检测器(Roither Laser Technik, 奥地利);蓝牙装置(Nolan Systems, 美国)。

电化学分析仪(CHI 824B, 上海辰华仪器公司);烘箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);可见-紫外分光光度计(Ultrospec 2000, Pharamacia biotech, 美国)。

4.2 装置设计

4.2.1 装置主要参数

本装置由两部分组成,分为电化学和光学两个部分。装置示意图如图4.1所示。横向箭头指示光学系统,竖向箭头指示电化学系统。

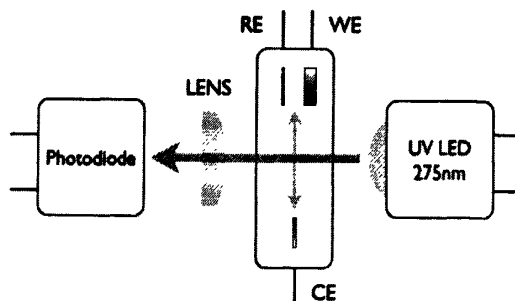


图 4.1: 光学-电化学装置示意图

Fig 4.1: Schema of opto-electrochemical sensor (OES)

4.2.1.1 光学部分

光学系统包括 UV LED 光源、Sapphire 蓝宝石窗口、平凸透镜、碳化硅光电二极管检测器。如图 4.2 所示。

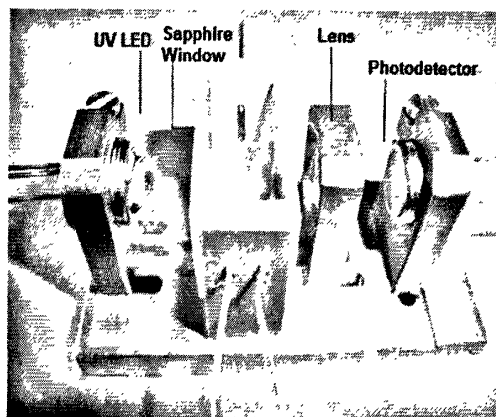


图 4.2: 光学装置实物图

Fig 4.2: Fabrication Picture of the optical part

光源带有 AlGaIn/GaN 基材料, 最大发射峰值波长为 275nm, 波长范围 270-279nm; 可在 -30 -55℃ 运行; 正常的操作正向电压为 6.2V, 最大 7.5V; 正常的半峰全宽 FWHM 为 12nm, 最大 15nm; 该光源自带半圆形透镜, 发射角 6-7°, 近似平行光; 如图 4.3 所示。

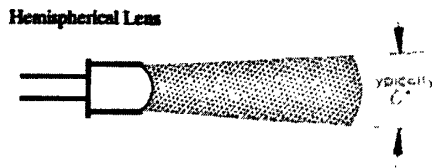


图 4.3: 紫外发光二极管光源光束示意图
Fig 4.3: Schema of beam emitted by UV LED

窗口材料为 Sapphire 蓝宝石, 主要成分为氧化铝, 可以透过紫外光; 该材料质地坚硬, 对所测样品表现为惰性; 该窗口会损失掉 20% 的光; 其特性如图 4.4 所示。

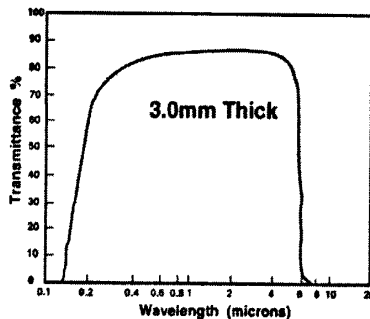


图 4.4: Sapphire 蓝宝石透光性能曲线图
Fig 4.4: Transmission Curve for Sapphire Windows

平凸透镜的直径为 9mm, 总厚度为 3mm, 焦距为 11.44mm; 材料为熔融石英片 (fused silica, SiO₂), 光损失率为 9%; 透光性能如图 4.5 所示。

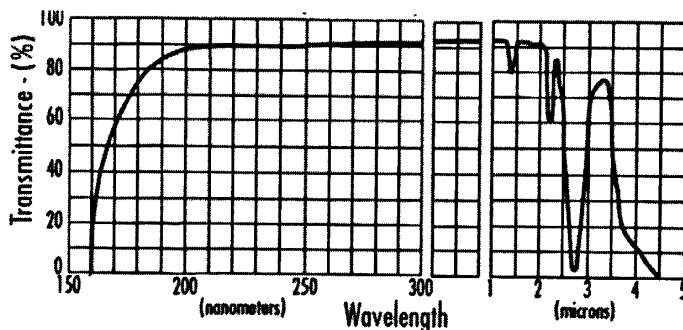


图 4.5: 平凸透镜透光性能曲线图
Fig 4.5: Transmission Curve for the lens

碳化硅光电二极管检测器检测波长范围为 100-280nm, 有效面积 0.22mm², 自身的石英 (quartz) 透镜直径 3.6mm, 尽可能透过紫外光; 该检测器收到光信

号后将其转化为电信号，并传导至主板的微控制器。

整个光学系统先用 ZEMAX 软件进行光路模拟和信号计算，如图 4.6 所示，结果表明，光信号在透过各固件的过程中，由于各固件自身特性，会有所损失；光路自身损失约 20%（折射率：Sapphire 1.82729，fused silica 1.49602，quartz 1.58745）。

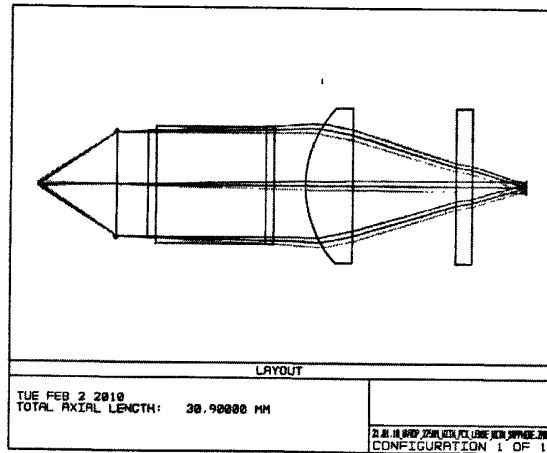


图 4.6：光学 ZEMAX 软件模拟

Fig 4.6: Simulation of ZEMAX

该主板为 HES-SO 所设计的 LabCard，如图 4.7 所示。LED 和检测器连接在主板上并由 PIC 控制，以 C++编程微控制器的软件驱动光学系统的运行，主板还包括 4MB 闪存，1.1 寸 OLED，蓝牙设备，电池供应。软件的主要设计结构如图 4.8 所示。

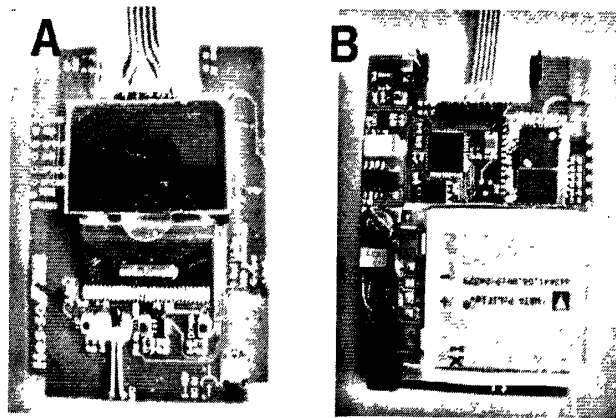


图 4.7：光学主板实物图

A：正面； B：背面

Fig 4.7: Fabrication picture of main board in optical system

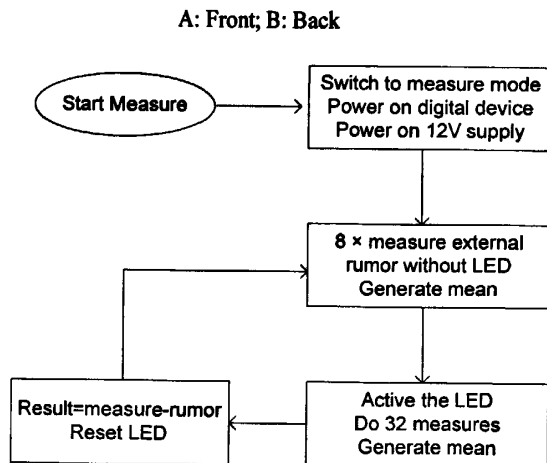


图 4.8：光学系统软件主要设计结果图

Fig 4.8: Diagram of the measuring steps in software for optical system

整个光学系统的实物图如图 4.9 所示。该部分测量数据获得形式为透射率。由 HES-SO 光学实验室用标准透光率片测试整个光学系统性能，其可作为测量用途。

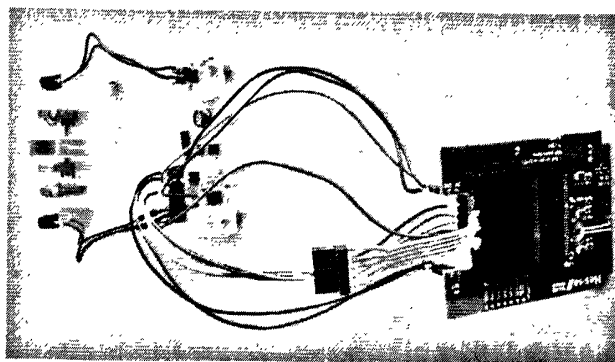


图 4.9：光学系统装置图

Fig 4.9: Fabrication picture of optical system

4.2.1.2 电化学部分

电化学系统中，工作电极为玻碳电极，对电极为铂电极，指示电极为 Ag/AgCl。该三电极可以重复使用，将其固定在测量池池壁上。如实物图 4.10 所示，工作电极（WE）有效玻碳面积 12mm^2 ，长 6mm，宽 2mm，厚 0.5mm；玻碳通过导电环氧胶与铜丝相连，再连电化学工作站。指示电极最初设计为在玻碳电极上固化一滴 Ag/AgCl，但由于其在清理过程中已脱落，且为了节约玻碳材料，

改进为：用 99.9% 纯度（直径 0.2mm）银丝表面打磨干净后，在 1M 盐酸中恒电位电解（0.4V），让银丝完全变黑为止。工作电极和指示电极镶嵌非光路系统池壁的一侧。对电极（CE）为铂丝，有效长度 4mm，镶嵌在非光路系统另一侧池壁。

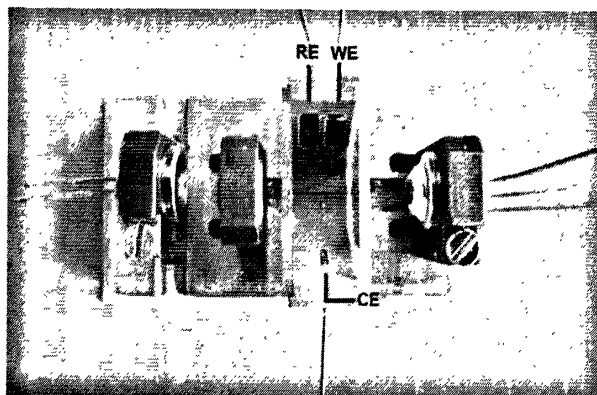


图 4.10：电化学系统装置图

Fig 4.10: Fabrication picture of electrochemical system

4.2.2 装置机械部分简介

机械部分通过 Autodesk Inventor 2010 软件设计，在 HES-SO 系统学院制作完成，主要包括底座、LED 光源和检测器支架、测量池壁。装置底座安装板材质为铝，上面用于固定各元件；两个支架材料为铜。安装电极的两个测量池为塑料。具体如图 4.11 所示。

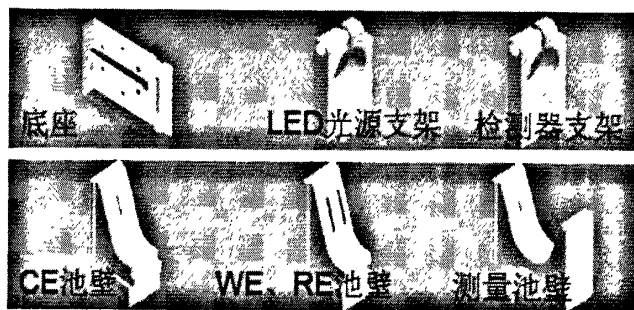


图 4.11：装置机械部分图

Fig 4.11: Mechanical part of the measurement sensor

4.3 装置性能与测试

玻碳电极预处理及用标准物质铁氰化钾试液进行循环伏安法扫描方法见

3.1.2.4 和 3.1.3. 铁氰化钾试液阴阳极峰电位的差值 ΔE_p 为 67mV, 阳极峰和阴极峰电流比为 1.034。由标准物质铁氰化钾的测试结果表明该电化学系统可以用于循环伏安法的测量。

样品测试时, 1.0mL 茶多酚提取物或者茶汤注入测量池内, 避免气泡产生。光学系统所需测量时间少于 1s, 同时记录紫外光线的透射率结果。电化学系统需进行 2 次 CV 扫描, 扫描速度 100 mV s^{-1} , 扫描电压 0-1V, 费时 40s。

为了保证该装置可以用作茶多酚含量的快速测定, 测定该装置的线性范围、检测限、回收率和重复性。

4.3.1 线性范围与检测限

线性范围的建立采用 98%纯度茶多酚提取物, 光学和电化学的线性范围和检测限分开测量。两系统采用的缓冲液均为浓度 0.05M、pH 为 7.0 的磷酸缓冲液, 其中含有 0.1M 氯化钾作为支持电解质。光学系统以缓冲液作为空白, 线性范围浓度设定为 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, 再将浓度为 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 茶多酚溶液稀释为低浓度的 25, 20, 15, 10, 7.5, 5, 2.5, 1.25, 1, 0.5, $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ 以测出检测限。

对于电化学系统, 高浓度线性范围设定为 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450; 低浓度线性范围设定为 450, 350, 250, 150, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$; 再将浓度为 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 茶多酚溶液稀释为低浓度的 25, 15, 7.5, 5, 2.5, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 以测出检测限。

4.3.2 回收率与重复性

光学系统中, 取 9.9mL 茶汤 (炒青 1 稀释 50 倍), 加 $100 \mu\text{L}$ 的 1mg mL^{-1} 的 98%茶多酚提取液 (TP) 标准工作溶液, 即 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平测定回收率; 加 $100 \mu\text{L}$ 的 2mg mL^{-1} 的 98%TP, 即 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平; 加 $100 \mu\text{L}$ 的 4mg mL^{-1} 的 98%TP, 即 $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平。

电化学系统中, 高浓度范围: 取 9.5mL 茶汤 (炒青 1 稀释 2 倍), 以 $500 \mu\text{L}$ 的 4mg mL^{-1} 的 98%TP, 即 $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平测定回收率; 取 9.3mL 该茶汤, 以 $700 \mu\text{L}$ 的 4mg mL^{-1} 的 98%TP, 即 $280 \mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平; 取 9.1mL 该茶汤, 以

900 μL 的4mg mL⁻¹的98%TP, 即360 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平。低浓度范围: 取9.75mL茶汤(蒸青1稀释10倍), 以250 μL 的4mg mL⁻¹的98%TP, 即100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平; 取9.60mL该茶汤, 以400 μL 的4mg mL⁻¹的98%TP, 即160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平; 取9.50mL该茶汤, 以500 μL 的4mg mL⁻¹的98%TP, 即200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 加标水平。

以浓度值计算加标回收率理论公式可以表示为

$$P = (c_2 - c_1) / c_3 \times 100\% \dots\dots\dots (公式 4.1)$$

式中 P 为加标回收率; c_1 为试样浓度; c_2 为加标试样浓度; c_3 为加标量。

每个样品均测量三遍, 以 Excel 调用公式计算 RSD%。

4.3.3 与国标方法比较

方法同 3.1.4.2 国标法测定茶多酚含量。将分析方法作为因素 A (装置法和国标法两个水平), 浓度作为因素 B (取样品中高、中、低浓度三个水平)。用 OriginPro7.5 进行双因素 ANOVA 分析, 比较有无显著性差异。

4.4 结果与分析

4.4.1 线性范围与检测限

用 98%纯度茶多酚提取物对光学和电化学的线性范围单独测量。在光学部分, 由装置获得的透射率计算成为吸光度, 茶多酚提取物浓度在 1-110 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 内有良好的线性关系, 如图 4.12 所示。该图表明即使茶多酚在低浓度 1-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 的情况下, 也能较好的符合线性关系, 决定系数 R^2 高于 0.99, 说明光学方法较灵敏, 可以检测出溶液中较低含量的茶多酚含量。该装置在茶多酚浓度高于 110 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 后, 超出该系统的测量量程, 透光率为 0; 若要提高测量量程, 需要减小溶液层厚度。若茶多酚浓度低于 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 测量结果较不稳定, 重复性差。

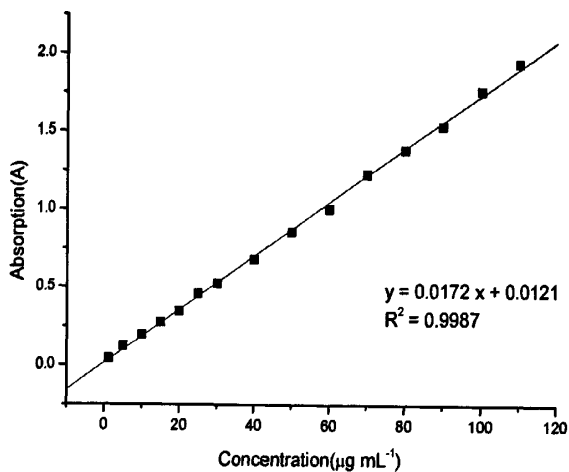


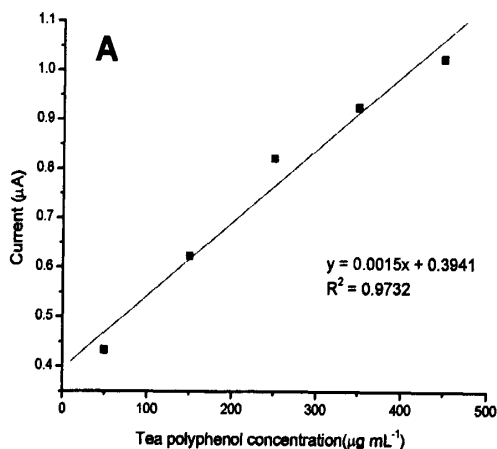
图 4.12: 装置中光学系统线性回归图

茶多酚提取物浓度范围: 1-110μg/mL

Fig 4.12: Calibration curve for optical system designed

Concentration of green tea polyphenols extract :1-110μg/mL

在电化学部分, 被测物在电极表面传递情况会受溶质浓度效应的影响, 考虑到线性关系的拟合度, 电化学上所建立的线性方程分为两部分。第一阶段 50-450μg mL⁻¹ 和第二阶段 450-1000μg mL⁻¹。这样两阶段的决定系数 R² 均高于 0.97, 如图 4.13 所示。在现今的研究中, 当茶多酚浓度低于 50μg mL⁻¹ 时, 电化学系统测量值不稳定, 不适合用其测定。



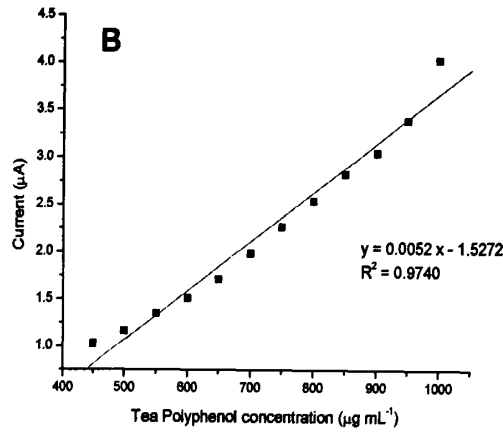


图 4.13: 装置中电化学系统线性回归图

A: 茶多酚提取物浓度范围: 50-450µg/mL; B: 茶多酚提取物浓度范围: 450-1000µg/mL

Fig 4.13: Calibration curve for electrochemical system designed

A: Concentration of green tea polyphenols extract : 50-450µg/mL; B: Concentration of green tea polyphenols extract : 450-1000µg/mL

因此, 光学-电化学快速检测茶多酚装置可以实现的测量范围为: 1-1000 µg mL⁻¹. 在较低浓度范围 1-100µg mL⁻¹ 时, 运行光学系统; 当浓度范围在 100-1000µg mL⁻¹ 时, 采用电化学系统, 见表 4.1.

表 4.1 光学-电化学装置茶汤中茶多酚含量测定线性范围

Table 4.1 Calibration curves of OES for tea polyphenols measurement

序号	浓度(µg mL ⁻¹)	线性回归	R ²
1	1-100	y=0.0172x+0.0121	0.9987
2	100-450	y=0.0015x+0.3941	0.9732
3	450-1000	y=0.0052x-1.5272	0.9740

4.4.2 回收率与重复性

回收率是反应待测物在样品分析过程中的损失的程度,损失越少,回收率越高;该指标能反映方法的准确度。不同水平的回收率结果如表 4.2 所示。回收率主要集中在 80-105%中,大部分 RSD 小于 3%,因此该装置具备良好的准确性和重复性。

表 4.2 光学-电化学装置回收率测定
Table 4.2 Trueness (Recovery, %) test of OES, n=3

系统	浓度 [*] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	加标水平($\mu\text{g mL}^{-1}$)	回收率(RSD) (%)
光学 (1-110 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	20.6065	10	90.90 (0)
	20.6065	20	94.59 (1.80)
	20.6065	40	98.72 (0)
电化学 (100-450 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	187.4065	100	82.56 (10.23)
	187.4065	160	91.87 (1.61)
	187.4065	200	102.18 (2.16)
电化学 (450 -1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	491.0071	200	93.43 (1.13)
	491.0071	280	82.97 (1.24)
	491.0071	360	97.34 (2.11)

* 浓度: 加标之前茶汤中茶多酚原始含量。

* Concentration: Original concentration of total green tea polyphenols in tea infusion before spiking GTPE.

4.4.3 与国标方法比较

该实验中采用了 15 种绿茶,将装置的测定值与国标福林酚法进行比较,以三遍重复的平均值计算。如图 4.14 和图 4.15 所示,高、中、低三个浓度区段分别比较,两种方法测量值有较好的线性关系($R^2>0.97$),斜率近似为 1。

ANOVA 分析结果如表 4.3 所示,光学系统与国标方法相比有显著性差异(光学系统测量范围: $p=0.00178$, $p<0.05$),测量结果偏高 5%左右,该差异很有可能来源于茶汤中的咖啡碱含量和一些能吸收紫外光的氨基酸。但是用于快速低耗测定茶多酚含量,该差异还能被接受。电化学方法与福林酚方法相比没有显著性差异(电化学系统测量范围 1: $p=0.75132$, $p>0.05$; 电化学系统测量范围 2: $p=0.32004$, $p>0.05$),说明电化学方法可以有效的测定茶多酚含量。

测定茶样时应根据茶汤中茶多酚含量的大致范围选择合适的标准曲线进行计算。茶样在三个浓度范围内的 RSD 分别为 0.71%、6.94%、1.63%。

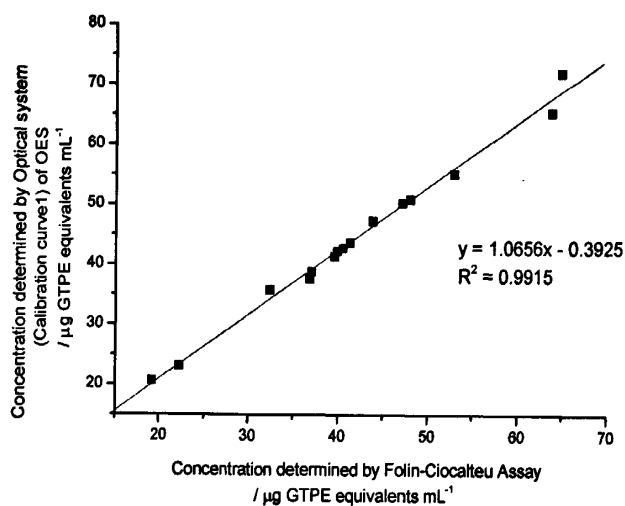
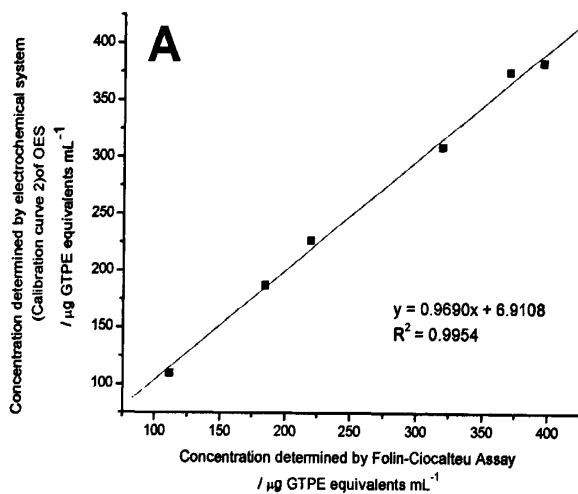


图 4.14: 装置中光学系统测量结果与国标福林酚法比较
测量浓度范围: 1-100 $\mu\text{g/mL}$

Fig 4.14: Comparison of the optical method in OES with Folin-Ciocalteu Assay.
Test concentration range: 1-100 $\mu\text{g/mL}$



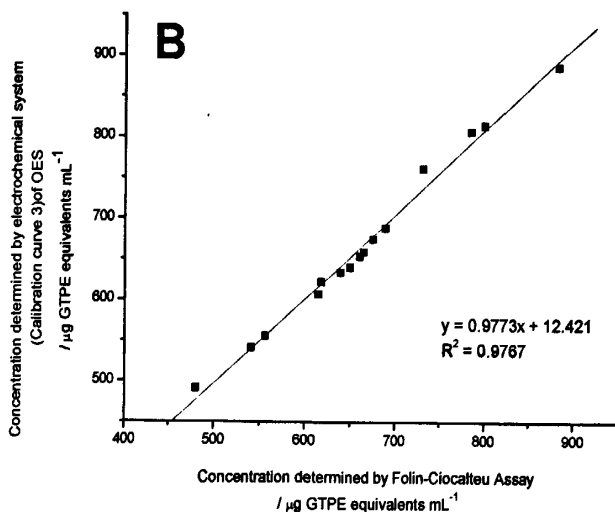


图 4.15: 装置中电化学系统测量结果与国标福林酚法比较
A 测量浓度范围: 100-450μg/mL; B 测量浓度范围: 450-1000μg/mL

Figure 4.15: Comparison of the cyclic voltammograms method in OES with Folin-Ciocalteu Assay.

A: Test range: 100-450μg/mL; B: Test range: 450-1000μg/mL

表 4.3 装置测量方法与国标法测量结果方差分析表

Table 4.3: Variance analysis of testing results on the polyphenols content by methods of sensor and GB

系统	Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
光学 (1-110 μg mL ⁻¹)	A	1	15589.78	15589.78	14.80	0.00178
	B	2	2937392.90	1468696.45	1394.75	0
	Error	14	14742.25	1053.02		
电化学 1 (100-450 μg mL ⁻¹)	A	1	15.88	15.88	0.10	0.75
	B	5	370106.68	74021.34	477.07	0
	Error	29	4499.63	155.16		
电化学 2 (450 -1000 μg mL ⁻¹)	A	1	178.27	178.27	1.00	0.32
	B	14	949306.34	67807.60	381.20	0
	Error	74	13162.99	177.88		

4.5 小结

研究表明,快速测定绿茶茶汤中茶多酚总量的装置可以实现。本实验采用光学系统(LED=275±5nm)和电化学系统(玻碳电极)相结合的技术制作出装置模型。所制的装置可测茶多酚含量范围为 1-1000μg mL⁻¹,线性范围分为三段,1-100、100-450、450-1000μg mL⁻¹,根据实际情况选择合适的标准曲线;该装置测量的回收率主要集中在 80-105%中,测定茶样的 RSD 在三个测量范围内平均

为 0.71%、6.94%、1.63%，重复性较好。该装置中光学方法与国标方法相比有显著性差异，测量结果偏高 5%左右，但是还可以用于快速低耗测定茶多酚含量；电化学方法与福林酚方法相比没有显著性差异。

5 结论和展望

茶多酚是茶树酚类物质及其衍生物的总称,它也是茶汤苦涩味形成和茶叶健康功效的主要物质,是茶叶的重要品质成分。检测茶多酚含量在茶叶生产、品质控制中具有重要意义。传统的茶多酚测定方法如福林酚比色法、高锰酸钾滴定法和高效液相色谱法需在实验室中由专业人员进行,步骤繁琐、时间长、检测成本高,难以适应生产、销售过程中快速、低成本测定的需要。

本研究的目的是找到适合快速、简便、低耗测定茶多酚含量的方法,开发以此方法为基础的测定装置模型。本实验根据茶多酚自身的理化性质,将光学技术和电化学技术相结合,快速测定茶汤中茶多酚含量。

光学技术方面,本实验探明茶多酚溶液在紫外吸收峰 275nm 下吸光度与其含量有很好的线性相关, $y=0.0214x+0.0374$, $R^2=0.9961$ 。对 7 种绿茶样进行验证,测量结果值比国标福林酚分光光度法略高。近红外下的研究表明不易通过透射率方法找到适合测量茶汤中茶多酚含量的某近红外波长的光源。本实验决定采用 $275\text{nm}\pm 5\text{nm}$ 的 LED 光源。

电化学方面,本实验采用循环伏安法,该法是快速测定绿茶茶汤中茶多酚总量的有效工具。本实验讨论了三种低成本自制工作电极——银电极、碳糊电极和玻碳电极在茶多酚含量测定应用上的可行性。通过分析茶多酚在电极表面的氧化还原行为,发现所制银电极不适宜检测茶多酚,碳糊电极、玻碳电极的氧化电流峰值与茶多酚含量有良好的线性关系。电化学方法测量可在 40 秒完成扫描,明显快于耗时 1.5h 的国标福林酚分光光度法。与该国标相比,碳糊电极平均测量偏差在 $\pm 7\%$ 以内;玻碳电极在 $\pm 5\%$ 以内;碳糊电极重复性不如玻碳电极。碳糊电极适合一次性使用,玻碳电极可以重复使用。

探明方法后,本研究以降低成本、简便测量为原则,采用市售材料,制作出快速测定绿茶茶汤中茶多酚总量的装置模型。采用光学系统 ($\text{LED}=275\pm 5\text{nm}$) 和电化学系统 (玻碳电极) 相结合的技术,该结合可以提高茶多酚测定量程,也可以利用两种方法的优点,减少缺点。所制的装置可测茶多酚含量范围为 $1\text{-}1000\mu\text{g mL}^{-1}$,线性范围分为三段, $1\text{-}100$ 、 $100\text{-}450$ 、 $450\text{-}1000\mu\text{g mL}^{-1}$,根据实际情况选择合适的标准曲线;该装置回收率主要集中在 $80\text{-}105\%$ 中,测定 15 个

茶样所得 RSD 在三个测量范围内平均为 0.71%、6.94%、1.63%，重复性较好。该装置中光学方法与国标方法相比有显著性差异，测量结果偏高 5%左右，但是还可以用于快速、低耗测定茶多酚含量；电化学方法与福林酚方法相比没有显著性差异。该装置的实现可以用于快速测量茶多酚含量，进而丰富改进装置中的标准曲线的数据库，有利于今后提高测量的准确度。

现在研究主要集中在精确分离和测定各种茶多酚单体，仪器精密昂贵，研究表明，检测消耗较大，很难做到低碳环保。在现实生产过程中，茶多酚含量是指导产品质量的一个重要指标，很多时候没有必要精确到茶多酚单体及其含量；所以该研究为快速、低价、便捷检测茶多酚提供一条新思路。

本实验是制作快速测量茶多酚含量装置的初步研究，还有很多地方需要在今后的研究工作中改进。例如，提高光学测量的范围，进一步提高测量电化学测量的准确性和重复性，对所制电极的制作工艺、电极表面处理还有待深入。本实验主要针对绿茶茶汤里的茶多酚测量，还可以进一步研究测定乌龙茶、红茶、普洱茶中的茶多酚含量的可能性。

本装置中未采用碳糊电极，其也是一种制作方便价格低廉的电极，方便大量生产，设计制成插卡式传感器。碳糊电极可重复使用，低碳环保，有利于固定在装置中，其也可以和光学系统分开，单独做成插笔式电极。光学系统小型化已经可以实现；电化学工作站小型化的研究正在进行之中，这会有利于制作出便携式茶多酚检测装置。装置可以加上 GPS，从而有利于野外试验和数据收集。

利用光学-电化学技术快速测定绿茶茶汤中茶多酚含量的方法和装置的研究，有助于指导茶叶生产实践，推动茶叶品质检测和茶制品标准化的发展。

作者简介

朱丹，女，汉族，出生于1985年12月18日，籍贯江苏省苏州市。从2004年起就读中国农业大学食品与营养工程学院食品质量与安全专业，获得学士学位。2008年开始于浙江大学农业与生物技术学院茶学专业攻读硕士，将于2011年3月毕业，师从须海荣副教授。研究生攻读期间，曾赴瑞士西部应用科学大学为期7个月的交换学生，是浙江省茶叶学会会员，并考取了高级评茶员资格证。主要从事茶叶品质控制及茶资源利用研究，参与完成快速检测茶多酚装置的开发、利用酶解技术改善茶饮料绿茶原料品质等项目。

硕士研究生期间以第一作者收录文章一篇。《电化学法快速测定茶多酚含量的研究》，收录于《茶叶科学》。

参考文献

- [1] Nagma Khan, Hasan Mukhtar. Tea polyphenols for health promotion[J]. *Life Sciences*, 2007, 81(7):519-533.
- [2] A. Escarpa, M. C. Gonzalez. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2001, 31(2):57 - 139.
- [3] Martha R. Bajec, Gary J. Pickering. Astringency: Mechanisms and Perception[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48(9):858 - 875.
- [4] Jen-Kun Lin, Chi-Tang Ho, Fereidoon Shahidi. Tea and Tea Products: Chemistry and Health-Promoting Properties (Nutraceutical Science and Technology) [M]. 2008, 320.
- [5] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 2003.
- [6] 沈生荣, 张玉艳, 唐德松, 陈勋, 许重阳. Cu^{2+} 与 EGCG 络合作用的研究[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2004, 30 (3):290-295.
- [7] 陈宗道, 周才琼, 童华荣等. 茶叶化学工程学[M]. 1999.
- [8] G. Le Nest, O. Caille, M. Woudstra, *et al.* Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies[J]. *Inorganica Chimica Acta*, 2004, 357(3):775-784.
- [9] Mendel Friedman, Hella S. Jurgens. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(6):2101-2110.
- [10] 张东明. 酚酸化学[M]. 2008
- [11] 杨贤强, 王岳飞, 陈留记等. 茶多酚化学[M]. 2003.
- [12] 梁靖. 茶多酚的络合作用研究进展[J]. *茶叶*, 2003, 29(2):72-74.
- [13] 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 2000.
- [14] Olga Makhotkina, Paul A. Kilmartin. Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2009, 633(1):165-174.
- [15] J. González-Rodríguez, P. Pérez-Juan, M. D. Luque de Castro. Method for the simultaneous determination of total polyphenol and anthocyan indexes in red wines using a flow injection approach[J]. *Talanta*, 2002, 56(1):53-59.
- [16] 管斌, 林洪, 王广策. 食品蛋白质化学[M]. 2005.
- [17] 陆兰丽. 直接固体相紫外分光光度法测定茶叶中的茶多酚[J]. *食品科技*, 2005, 5:71-73.
- [18] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 1997.
- [19] V. L. Singleton, Joseph A. Rossi, Jr. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents[J]. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, 16(3):144-158.
- [20] Nihal Turkmen, Ferda Sari, Y. Sedat Velioglu. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods[J]. *Food Chemistry*, 2006, 99(4):835-841.
- [21] Ping Li, Yanhui Wang, Runyu Ma, *et al.* Separation of tea polyphenol from Green Tea Leaves

- by a combined CATUFM-adsorption resin process[J]. *Journal of Food Engineering*, 2005, 67(3):253-260.
- [22] 蒋丽. 紫外分光光度法测定口香糖中的茶多酚[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(4):489.
- [23] 李自勇. 茶多酚含量与儿茶素含量关系研究[J]. *化学与生物工程*, 2007, 24(11):73-75.
- [24] 回瑞华. 三波长分光光度法测定沱茶中茶多酚的含量[J]. *分析测试学报*, 2003, 22(6):60-63.
- [25] 周卫龙. GB/T8313-2008 第二法茶叶中茶多酚测定的研究比较[J]. *中国茶叶加工*, 2009, 1:40-41.
- [26] 徐文峰, 廖晓玲. 茶叶中茶多酚的分析测定方法研究现状[J]. *重庆文理学院学报(自然科学版)*, 2008, 27(2):52-59.
- [27] 张淑芳. 一种测定茶叶中茶多酚的光谱新方法[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(7):1630-1632.
- [28] 郎惠云. 差分分光光度法测定茶多酚的含量[J]. *分析科学学报*, 2003, 19(2):151-153.
- [29] 廖晓玲. 钼酸铵分光光度法测定绿茶中的茶多酚[J]. *分析试验室*, 2003, 22(5):70-72.
- [30] Inigo Uriarte Pueyo, Maria Isabel Calvo. Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content[J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(8):465-467.
- [31] 郎惠云. 间接原子吸收法测定茶叶中茶多酚的含量[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2003, 33(6):683-685.
- [32] 雷存喜. 益阳黑茶中茶多酚含量测定研究[J]. *湖南城市学院学报(自然科学版)*, 2009, 18(4):45-47.
- [33] 王吉德. 原子吸收法在有机分析中的应用(III)——茶叶中茶多酚的测定[J]. *高等学校化学学报*, 1995, 16(4):536-539.
- [34] Edyta Nalewajko-Sieliwoniuk, Jolanta Nazaruk, Ewelina Antypiuk, *et al.* Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in *Erigeron acris* L. extracts and pharmaceutical formulation by flow injection analysis with inhibited chemiluminescent detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48(3):579-586.
- [35] 于海宁. 茶多酚的化学发光[J]. *茶叶科学*, 2003, 23(2):124-128.
- [36] 李明静. 鲁米诺-过氧化氢-铜(II)化学发光法测定儿茶素[J]. *分析化学*, 2001, 29(5):613.
- [37] 廖晓玲. 流动注射-抑制化学发光法测定绿茶中的茶多酚含量[J]. *药学报*, 2002, 37(12):996-998.
- [38] 余宇燕. 流动注射化学发光法测定茶饮料中的茶多酚[J]. *分析试验室*, 2006, 25(4):996-998.
- [39] 刘海龙. 荧光光谱检测技术在茶饮料成分分析中的应用[J]. *分析仪器*, 2007, 4:36-38.
- [40] Hiroaki Nagaoka, Satoshi Toyoshima, Ken Takeda. Spectrofluorometric Determination of Catechins with 1, 2-Diphenylethylenediamine[J]. *Analytical Sciences*, 2002, 18(8):951-953.
- [41] 曹冬林. 吡啶橙-罗丹明 6G 能量转移荧光猝灭法定量测定茶多酚[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(4):537-540.

- [42] Giovanna Fia, Caterina Dinnella, Mario Bertuccioli, *et al.* Prediction of grape polyphenol astringency by means of a fluorimetric micro-plate assay[J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(1):325-330.
- [43] L. Campanella, A. Bonanni, E. Finotti, *et al.* Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 19(7):641-651.
- [44] 陈华才, 卢永军, 吕进, 陈星旦. 茶多酚中总儿茶素的近红外光谱分析[J]. *分析化学*, 2005, 33(6):835-837.
- [45] Quansheng Chen, Jiewen Zhao, Xingyi Huang, *et al.* Simultaneous determination of total polyphenols and caffeine contents of green tea by near-infrared reflectance spectroscopy[J]. *Microchemical Journal*, 2006, 83(1):42-47.
- [46] Quansheng Chen, Jiewen Zhao, Muhua Liu, *et al.* Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 46(3):568-573.
- [47] Quansheng Chen, Jiewen Zhao, Hao Lin. Study on discrimination of Roast green tea (*Camellia sinensis* L.) according to geographical origin by FT-NIR spectroscopy and supervised pattern recognition[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 72(4):845-850.
- [48] Xiaoli Li, Yong He. Discriminating varieties of tea plant based on Vis/NIR spectral characteristics and using artificial neural networks[J]. *Biosystems Engineering*, 2008, 99(3):313-321.
- [49] 王文杰. 高锰酸钾滴定法测定茶多酚有关用剂的特性研究[J]. *福建茶叶*, 2002, 1:15-16.
- [50] Paul A. Kilmartin. Electrochemical Detection of Natural Antioxidants: Principles and Protocols[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2001, 3(6):941-955.
- [51] 何建波. 电化学方法研究天然抗氧化剂[J]. *化学与生物工程*, 2004, 21(5):10-12.
- [52] 腾岛昭. 电化学测定方法[M]. 1995.
- [53] 袁勇. 电位滴定法测定茶叶中茶多酚的含量[J]. *雁北师范学院学报*, 2007, 23(2):29-31.
- [54] 戴玲. 自动电位滴定测定多酚类化合物的方法研究[J]. *安徽化工*, 2006, 32(4):60-61.
- [55] Joseph Wang. 分析电化学[M]. 2009
- [56] 周园. 儿茶素的光谱电化学研究及 CE-ECL 检测[D]. 2007.
- [57] 袁圣杰. 循环伏吸法研究山奈酚的电氧化机理. 2009年第十五次全国电化学学术会议论文集[C], 2009.
- [58] 李静. 多壁碳纳米管修饰电极对儿茶素的电催化作用[J]. *河北科技大学学报*, 2006, 27(4):282-284.
- [59] 陈伟. 用聚刚果红膜电极对儿茶酚的伏安测定[J]. *中国生化药物杂志*, 2005, 26(2):90-92.
- [60] 孙国禄. 聚灿烂甲酚蓝膜修饰电极对儿茶酚的电催化作用[J]. *天水师范学院学报*, 2008, 28(2):70-72.

- [61] Paul A. Kilmartin, Honglei Zou, Andrew L. Waterhouse. A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(4):1957-1965.
- [62] Paul A. Kilmartin, Chyong F. Hsu. Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry[J]. *Food Chemistry*, 2003, 82(4):501-512.
- [63] Jian-Bo He, Yan Wang, Ning Deng, *et al.* Study of the adsorption and oxidation of antioxidant rutin by cyclic voltammetry-voltabsorptometry[J]. *Bioelectrochemistry*, 2007, 71(2):157-163.
- [64] 杨梅. 顺序注射-电化学发光体系研究茶多酚的抗氧化性[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 31(4):466-468.
- [65] Wilfried Andlauer, Julien Héritier. Rapid Electrochemical Screening of Antioxidant Capacity (RESAC) of selected tea samples[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125:1517-1520.
- [66] 曾鑫. 用茶叶多酚氧化酶生物传感器测定茶多酚[J]. *食品科学*, 2006, 27(7):95-98.
- [67] Arkadi Eremenko, Alexander Makower, Wen Jin, *et al.* Biosensor based on an enzyme modified electrode for highly-sensitive measurement of polyphenols[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 1995, 10(8):717-722.
- [68] Lucilene Dornelles Mello, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, Lauro Tatsuo Kubota. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2003, 96(3):636-645.
- [69] Huafu Wang, Keith Helliwell, Xiaqing You. 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.
- [70] Eisei Nishitani, Yuko M. Sagesaka. Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2004, 17(5):675-685.
- [71] Santosh Khokhar, Dini Venema, Peter C. H. Hollman, *et al.* A RP-HPLC method for the determination of tea catechins[J]. *Cancer Letters*, 1997, 114(1-2):171-172.
- [72] M. Pelillo, B. Biguzzi, A. Bendini, *et al.* Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins[J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(3):369-374.
- [73] Michiko Tabata Mitsuki Sano, Masazumi Suzuki, Masakuni Degawa, Toshio Miyase, Mari Maeda-Yamamoto. Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *Analyst*, 2001, 126:816-820.
- [74] 辛敏通. 高效液相色谱-电化学检测法测定金荞麦饮片中表儿茶素的含量[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(2):117-119.
- [75] Yih Ho, Yueh-Lin Lee, Kuang-Yang Hsu. Determination of (+)-catechin in plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1995, 665(2):383-389.
- [76] Devanand L. Luthria, A. Daniel Jones, Jennifer L. Donovan, *et al.* GC-MS determination of

- catechin and epicatechin levels in human plasma[J]. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1997, 20(11):621-623.
- [77] Andreas Degenhardt, Ulrich H. Engelhardt, Christiane Lakenbrink, *et al.* Preparative Separation of Polyphenols from Tea by High-Speed Countercurrent Chromatography[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(8):3425-3430.
- [78] 冯玉红. 现代仪器分析实用教程[M]. 2008.
- [79] Michael L. Whiting, Lin Li, Susan L. Ustin. Predicting water content using Gaussian model on soil spectra[J]. *Remote Sensing of Environment*, 2004, 89(4):535-552.
- [80] 郑建斌, 董社英, 宁艳利, 高鸿. 白藜芦醇在银电极上的吸附伏安行为及其应用[J]. *高等学校化学学报*, 2003, 24(3):428-430.
- [81] 张君. 用丝网印刷技术制备薄膜微电极的方法研究[J]. *分析化学*, 2005, 33(7):1045-1048.
- [82] Rashid O. Kadara, Norman Jenkinson, Craig E. Banks. Screen printed recessed microelectrode arrays[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, 142(1):342-346.
- [83] K. Twomey, E. Alvarez de Eulate, J. Alderman, *et al.* Fabrication and characterization of a miniaturized planar voltammetric sensor array for use in an electronic tongue[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, 140(2):532-541.
- [84] Joseph Wang. *Analytical Electrochemistry*[M]. 2000.
- [85] Greg M. Swain, G. Zoski Cynthia. *Solid Electrode Materials: Pretreatment and Activation*[M]. *Handbook of Electrochemistry*, 2007, 111-153.
- [86] 赵发琼. 银电极在电化学分析研究中的应用[J]. *分析科学学报*, 2001, 17(5):418-423.
- [87] Bin Yang, Akira Kotani, Kensuke Arai, *et al.* Relationship of Electrochemical Oxidation of Catechins on Their Antioxidant Activity in Microsomal Lipid Peroxidation[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 49(6):747-751.