

枣果中酚类物质的高效液相色谱分析*

焦中高^{1,2}, 刘杰超², 周红平², 王思新², 杨公明^{1,3}

1(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨陵, 712100) 2(中国农业科学院郑州果树研究所, 河南郑州, 450009)

3(华南农业大学食品学院, 广东广州, 510642)

摘 要 建立了一种可同时测定 11 种酚类物质的高效液相色谱(HPLC)法,并对枣果中的酚类物质进行了分析测定。色谱条件为: Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇和磷酸水(pH 2.6), 280 nm 和 320 nm 双波长紫外检测, 柱温 30℃, 进样量 5 μL, 流速 0.6 mL/min, 梯度洗脱程序: 0 min 15% A, 15~25 min 25% A, 65 min 75% A, 70 min 15% A, 梯度线性变化。经测定, 新鲜梨枣果肉中含有儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、绿原酸和芦丁等酚类物质, 其中儿茶素和表儿茶素占检测到的酚类物质总量的 85% 以上, 未成熟果含量远高于成熟果。

关键词 枣, 酚类物质, 高效液相色谱, 分析

酚类物质是植物的次级代谢产物, 在高等植物组织中广泛存在。这些天然的酚类物质大多具有较强的抗氧化和清除自由基的能力以及其他重要的生理活性, 因此在人类营养保健与疾病防治方面具有十分重要的作用。

目前用于多酚的分析方法主要有分光光度法和高效液相色谱(HPLC)法。其中, 分光光度法主要用于同类结构酚类物质含量的测定, 但不能区分结构类似的单一酚类物质, 而且易受样品中其他物质的干扰。而 HPLC 法不仅具有使用方便、准确度高的优点, 而且可以区分结构类似的单一酚类物质, 因此近年来在分析测定果蔬等植物组织中的酚类组分方面得到了较快的发展^[1], 目前已成功应用于苹果^[2, 3]、梨^[3]、菠萝^[4]等多种水果中酚类物质组成的分析。红枣是我国传统的药食两用食物之一, 含有多种生物活性物质。其中的多糖、cAMP 等活性成分已有较多研究^[5~8], 但关于枣中酚类物质的研究却很少^[9, 10], 其中的酚类物质的组成与含量还不清楚。为了研究枣果中的酚类物质的组成与含量, 本文建立了一种可同时测定 11 种酚类物质的高效液相色谱(HPLC)法, 并对枣果中的酚类物质进行了分析测定。

1 材料与方

1.1 材 料

鲜枣: 梨枣, 采摘于中国农业科学院郑州果树研究所。分 2 次采摘, 时间分别为 8 月 14 日(未成熟

果)和 9 月 14 日(成熟果)。

1.2 试 剂

没食子酸(gallic acid)、原儿茶酸(protocatechuic acid)、绿原酸(chlorogenic acid)、咖啡酸(caffeic acid)、阿魏酸(ferulic acid)、儿茶素[(+)-catechin]、表儿茶素[(-)-epicatechin]、肉桂酸(cinnamic acid)、鞣花酸(ellagic acid)、槲皮素(quercetin)、芦丁(lutin)等 11 种酚类标准品, 购自 Sigma 公司, 纯度 95% 以上; 甲醇、磷酸为色谱纯试剂, 分别购自山东禹王集团和美国迪马公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器

Waters 高效液相色谱仪(含 1525 二元泵、2487 双通道紫外检测器、Breeze 色谱管理软件等)、SPECORD 50 型紫外/可见分光光度计(德国 Analytik Jena AG)、BS214D 电子天平(德国赛多利斯)、KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、RE52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、pHS-3C 型数字酸度计(上海精密科学仪器有限公司)等。

1.4 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 紫外检测波长 280 nm 和 320 nm, 柱温 30℃, 进样量 5 μL, 流速 0.6 mL/min, 流动相 A 为甲醇, 流动相 B 为超纯水(用磷酸调 pH 为 2.6)。

梯度洗脱程序: 0 min 15% A, 15~25 min 25% A, 65 min 75% A, 70 min 15% A, 梯度均为线性变化。

1.5 标准溶液的配制

准确称取一定量的没食子酸等 11 种酚类标准

第一作者: 博士研究生, 副研究员(杨公明为通讯作者)。

* 郑州市科技攻关计划资助项目(052SGYN12173)

收稿日期: 2007-09-21, 改回日期: 2008-01-28

品,用甲醇溶解并转移至 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容、封口,作为标准贮备液,−18℃ 保存备用。使用前,根据实验需要将此标准贮备液用甲醇稀释至适宜含量,配制标准工作液和混合标准工作液。

1.6 样品制备

准确称取鲜枣果肉 20g,用组织捣碎机打碎匀浆。加入 50 mL 乙酸乙酯,超声提取 30 min,过滤后滤渣再次加入 50 mL 乙酸乙酯,超声提取 30 min,共提取 3 次。合并滤液,38℃ 减压蒸干。然后用甲醇溶解并定容至 5 mL,−18℃ 保存备用。测试前用 0.45 μm 针头式过滤器过滤。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

分别用甲醇配置一定浓度的标准品溶液,用紫外/可见分光光度计在 190~400 nm 波长范围内扫描各标准品的紫外吸收情况。结果显示,各标准品在 280 nm 均具有较强的吸收。试验过程中发现,由于枣果样品中绿原酸含量较低,导致样品中绿原酸(保留时间 15.871 min)在 280 nm 波长处响应值太低,检测受杂质干扰较大(见图 2),而在 320 nm 波长(绿原酸最大吸收峰)处响应值可较 280nm 处响应值提高约 1 倍以上,且受杂质干扰较小。因此,为了提高检测准确度,对绿原酸采用 320 nm 波长检测。

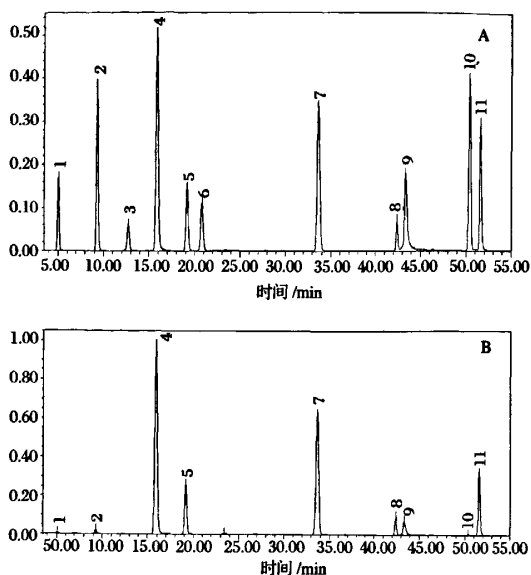
2.2 流动相的选择

酚类物质的 HPLC 分析一般采用甲醇-水或乙腈-水作流动相,进行梯度洗脱。同时为了防止酚酸类化合物电离而影响分离效果,常需在流动相中加入酸性抑制剂以抑制此类化合物的电离,增大其分布系数,从而改善各色谱峰的峰形和分离度^[14]。通过试验和对比分析,选用甲醇-磷酸水作流动相,可以得到较好的分离效果。提高水的酸度,可以进一步改善分离效果,但酸度过低会加速柱效的降低。因此综合考虑,用磷酸将超纯水调 pH 为 2.6。

试验了不同梯度对分离效果的影响,最终选定梯度洗脱程序为:0 min 15% A,15~25 min 25% A,65 min 75% A,70 min 15% A,梯度均为线性变化。在这一分离条件下,11 种标准酚类物质均达到了基线分离(见图 1)。

2.3 标准曲线和检测限的确定

分别配制一定浓度的 11 种酚类混合标准溶液,进样 5 μL,按上述确定的色谱条件测定,以浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,计算



A,检测波长为 280 nm;B,检测波长为 320 nm

1—没食子酸,2—原儿茶酸,3—儿茶素,4—绿原酸,
5—咖啡酸,6—表儿茶素,7—阿魏酸,8—芦丁,
9—鞣花酸,10—肉桂酸,11—槲皮素(图 2 同)

图 1 酚类标准物质在选定色谱条件下的色谱图

得到 11 条标准曲线和相关系数(见表 1)。从表 1 可知,没食子酸等 11 种酚酸标准品溶液浓度和检测响应值呈良好的线性关系,并且它们的最低检测限都较低,说明此方法灵敏度较高。

2.4 精密度和加标回收率实验

准确称取相同鲜枣样品 2 份,其中 1 份加入已知量的 11 种酚类物质标准品,另一份不加,分别进行 HPLC 分析,每份样品平行测定 6 次,根据测出的标准品的量与加入标准品的量的比值计算加标回收率,并根据平行测定结果计算相对标准偏差,结果见表 2 所示。由表 2 可以看出,11 种酚类物质的加标回收率均在 90% 以上,且相对标准偏差低(4% 以内)。说明此法精密度高,适合枣果中酚类物质的分析测定。

2.5 样品分析结果

按照 1.6 方法处理新鲜梨枣样品,在上述色谱条件下进行 HPLC 分析,样品色谱图见图 2,分析结果见表 3。

由图 2 和表 3 可以看出,无论是成熟梨枣还是未成熟梨枣果实中,儿茶素和表儿茶素均是最主要的酚类物质,分别占检测到的酚类物质总量的 89.00% 和 94.28%。未成熟果中酚类物质含量远高于成熟果,其检测到的酚类物质总量为成熟果的 3.16 倍。此外,二者均含有少量的没食子酸、原儿茶酸、绿原酸和

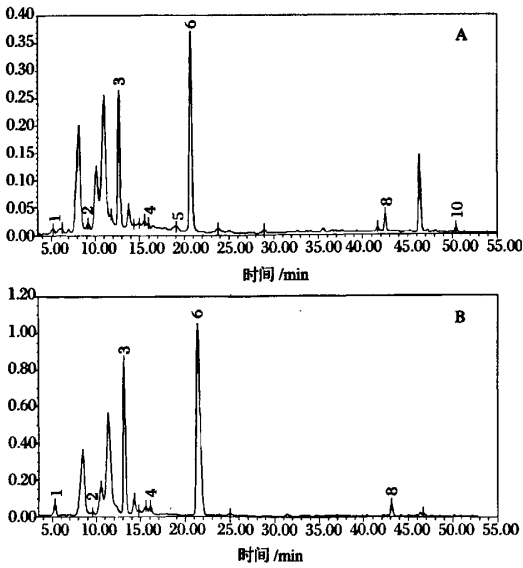
芦丁等。在成熟梨果果肉中还检测到了咖啡酸和肉桂酸,而在未成熟果中却没有检测到。二者均没有检测到阿魏酸、鞣花酸和槲皮素。

表 1 酚类物质在选定色谱条件下的保留时间、标准曲线和检测限

酚类物质	保留时间/min	标准曲线	相关系数	线性范围/mg · L ⁻¹	检测限/mg · L ⁻¹
没食子酸	5.045	y=22 392x-14 751	0.999 8	3.25~208	0.102 6
原儿茶酸	9.283	y=13 482x-10 278	0.999 3	4.88~156	0.163 2
儿茶素	12.736	y=7 315.7x-6 122.4	0.999 8	7.00~224	0.288 8
绿原酸	15.871	y=23 631x-22 846	0.999 7	4.00~128	0.119 7
咖啡酸	19.162	y=35 196x-23 895	0.999 8	5.75~184	0.079 7
表儿茶素	20.782	y=6 822.5x-5 280.7	0.999 9	6.25~200	0.316 7
阿魏酸	33.634	y=30 772x-27 319	0.999 8	3.63~116	0.084 1
芦丁	42.420	y=3 789.3x-2 452.1	0.999 9	3.63~116	0.282 1
鞣花酸	43.347	y=15 208x-55 600	0.998 2	5.52~184	1.650 4
肉桂酸	50.360	y=86 982x-58 384	0.999 8	3.75~120	0.023 5
槲皮素	51.552	y=9 236.9x-10 699	0.999 8	6.00~192	0.410 9

表 2 加标回收率和精密度

酚类物质	添加量/mg · L ⁻¹	实测值/mg · L ⁻¹	回收率/%	相对标准偏差/%
没食子酸	10.4	9.97	94.88	2.35
原儿茶酸	15.6	15.08	96.69	2.30
儿茶素	11.2	11.00	98.21	1.89
绿原酸	12.8	12.56	98.27	3.08
咖啡酸	9.2	9.04	98.23	2.39
表儿茶素	10.0	9.12	91.23	2.54
阿魏酸	11.6	11.37	97.99	2.33
芦丁	11.6	10.47	90.23	1.79
鞣花酸	18.4	19.75	107.34	3.63
肉桂酸	12.0	11.87	98.95	1.27
槲皮素	9.6	9.73	101.35	2.28



A:成熟梨枣样品 B:未成熟梨枣样品
图 2 梨枣样品分析色谱图

表 3 新鲜梨枣成熟果和未成熟果果肉中酚类物质含量 mg/kg(鲜重)

酚类物质	成熟果	未成熟果
没食子酸	2.72	10.97
原儿茶酸	7.85	7.68
儿茶素	147.54	433.07
绿原酸	1.64	0.65
咖啡酸	2.22	/
表儿茶素	259.31	929.12
阿魏酸	/	/
芦丁	35.25	62.32
鞣花酸	/	/
肉桂酸	0.59	/
槲皮素	/	/

3 结 论

本文建立了一种可用于枣果中酚类物质分析的同时测定 11 种酚类物质的高效液相色谱(HPLC)法,采用甲醇和磷酸水(pH 2.6)作流动相进行梯度洗脱,11 种酚类物质在 55 min 内得到了很好地分离,且回收率均在 90% 以上,最低检测限也较低。该方法简

单、实用,且准确度、灵敏度较高,重复性好。

对新鲜梨枣果肉中酚类物质的分析结果表明,新鲜梨枣果肉中含有儿茶素、表儿茶素、没食子酸、原儿茶酸、绿原酸和芦丁等酚类物质,其中儿茶素和表儿茶素占检测到的酚类物质总量的85%以上,未成熟果含量远高于成熟果。关于其他品种枣果实中酚类物质的组成与含量及其在发育过程中的变化,有待于进一步研究。

酚类物质在枣果贮藏加工与营养保健方面具有十分重要的作用,本文通过试验确定了枣果实中酚类物质的组成与含量,为进一步研究枣果贮藏加工中褐变的控制和枣果多酚的开发利用奠定了基础。

参 考 文 献

- 雷昌贵,陈锦屏,卢大新,等. 食品中多酚类化合物的测定方法及其研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 100~104
- 吴燕华,刘文力,阎红,等. 高效液相色谱法测定苹果中的酚类物质[J]. 分析化学, 2002, 30(7): 826~828
- Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apples and pear by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 910: 265~273
- 易湘茜,韦保耀,滕建文,等. 高效液相色谱法测定菠萝中多酚类化合物[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(2): 99~101
- 苗明三. 大枣多糖对免疫抑制小鼠白细胞介素2及其受体水平的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(30): 6 692~6 693
- Li J W, Ding S D, Ding X L. Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. Jinsixiaozao[J]. J Food Eng, 2007, 80: 176~183
- Zhao Z H, Li J, Wu X M, et al. Structures and immunological activities of two pectic polysaccharides from the fruits of *Zizyphus jujuba* Mill. cv. jinsixiaozao Hort[J]. Food Res Intl, 2006, 39: 917~923
- 李利峰,张锐,朱华,等. 冬枣环磷酸腺苷微波辅助萃取工艺研究[J]. 辽宁农业科学, 2006, (3): 24~26
- 张宝善,陈锦屏,吴丽花. 红枣芦丁提取工艺的研究[J]. 陕西师范大学学报. 2003, 31(1): 89~93
- 宗亦臣. 冬枣果实中酚类物质及其多酚氧化酶性质的研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(4): 21~23

High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Phenolic Compounds in Chinese Jujube Fruit

Jiao Zhonggao^{1,2}, Liu Jiechao², Zhou Hongping²,
Sixin Wang², Gongming Yang^{1,3}

1(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

2 (Zhengzhou Fruit Research Institute, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China)

3(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

ABSTRACT The phenolic compounds in Chinese jujube were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Chromatographic separation was performed by Waters Symmetry C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) using the mobile phase gradient elution of methanol-phosphoric acid mixture at 30 °C. The flow rate was 0.6 mL/min and the detection wavelength were 280 nm and 320 nm. Several phenolic compounds, including catechin, epicatechin, gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, and lutein, were found both in ripe or unripe fresh jujube fruits. Results also indicated that catechin and epicatechin were the predominate phenolic compounds in fresh jujube fruits, whose contents accounted for up to 85 percent or above of the total phenolics content as determined. Furthermore, the phenolics contents in unripe jujube fruits were found to be much higher than those in ripe ones. Thus the unripe jujube fruits may be a interesting resource for extracting natural phenolics.

Key words Chinese jujube, phenolic compounds, high performance liquid chromatography, analysis