

固相萃取快速测定黑果枸杞果汁中酚酸类化合物

陈晨^{1,2}, 文怀秀¹, 赵晓辉¹, 陶燕铎¹, 邵赞^{1*}, 梅丽娟¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

[摘要] 目的:建立固相萃取-HPLC快速测定黑果枸杞果汁中6种酚酸(没食子酸、原儿茶素、儿茶素、绿原酸、咖啡酸、丁香酸)。方法:经过固相萃取后的黑果枸杞果汁在色谱条件为:C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.2%甲酸缓冲液,流速1 mL·min⁻¹时进行梯度洗脱。结果:6种酚酸类化合物在一定的范围内有良好的线性关系,相关系数均为0.999 9。平均回收率(n=5)分别为97.70%(RSD 2.3%),99.64%(RSD 1.8%),100.70%(RSD 2.1%),99.98%(RSD 2.6%),99.60%(RSD 2.2%),99.04%(RSD 2.4%)。结论:通过固相萃取技术以及HPLC法测定6种酚酸类成分的含量,为黑果枸杞果汁的质量控制和资源开发提供了切实可行的方法。

[关键词] 固相萃取;黑果枸杞果汁;酚酸

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 为茄科 Solanaceae 枸杞属 (*Lycium* L.) 多年生灌木植物。黑果枸杞味甘、性平、清心热,被收载于《晶珠本草》、《四部医典》等藏医药著作中^[1-3],用于治疗心热病、心脏病、月经不调、停经等病症。

目前,黑果枸杞的研究主要集中于多糖类成分。对于具有抗氧化,抗自由基,抗炎,抗癌,抗血小板,抑制低密度脂蛋白的氧化以及预防心血管疾病作用的酚酸类成分质量分析方法的文献报道较少^[4-6]。本文根据黑果枸杞中酚酸类化合物多为对羟基苯甲酸和对羟基肉桂酸的衍生物的特点,有目的建立了利用固相萃取技术和HPLC法测定没食子酸、原儿茶素、儿茶素、绿原酸、咖啡酸、丁香酸的含量。该方法简便快速,待测组分分离度好,为黑果枸杞果汁的质量控制和资源开发提供了参考。

1 材料

Agilent1200型高效液相色谱仪(四元梯度泵, DAD检测器, Agilent 1200色谱工作站);METELER TOLEDO-AG204电子分析天平(梅特勒-托利,瑞士)。甲醇(色谱纯,山东禹王试剂公司),甲酸(分

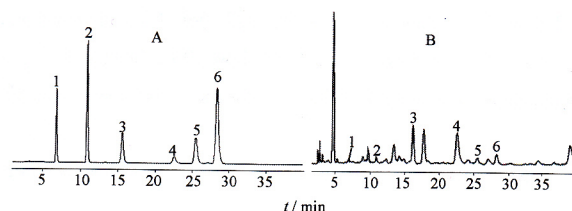
析纯,上海试剂一厂),固相萃取小柱(10 mL,美国菲罗门公司),实验室所用水均为超纯水。

对照品没食子酸,原儿茶素,儿茶素,绿原酸,咖啡酸,丁香酸(纯度均≥98%)均购于Sigma公司。

黑果枸杞果汁:黑果枸杞鲜果共十批(编号为HG1~HG10),随机采于青海省柴达木盆地,每批各采1000 g,鲜果经过榨汁机后,再经过超高温瞬时灭菌、灌装后既得黑果枸杞果汁。该样品经中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定为唐古特黑果枸杞。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 C₁₈色谱柱(416 mm×250 mm, 5 μm,菲罗门公司),流动相A为甲醇,流动相B为0.2%甲酸水溶液,采用梯度洗脱程序:0~10 min, 15%~20% A;20~25 min, 20% A;25~40 min, 20%~27% A。柱温为25℃,流速1.0 mL·min⁻¹检测波长280 nm。对照品及样品色谱图分别见图1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 没食子酸;2. 原儿茶素;3. 儿茶素;4. 绿原酸;5. 咖啡酸;6. 丁香酸。

图1 对照品与供试品HPLC图

[稿件编号] 20100830001

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2007BAI45B00)

[通信作者] * 邵赞, 副研究员, 从事天然药物化学研究, Tel: 13997144833, E-mail: shaoyun11@126.com

[作者简介] 陈晨, 硕士研究生, Tel: 15209781358, E-mail: chenchen19841014@163.com



2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取经五氧化二磷干燥过夜的没食子酸、原儿茶素、儿茶素、绿原酸、咖啡酸、丁香酸对照品 5.54, 5.49, 5.55, 3.03, 4.00, 3.66 mg, 定容于 10 mL 量瓶中, 既得 0.554, 0.549, 0.555, 0.303, 0.400, 0.366 g · L⁻¹ 的溶液, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取 5 mL 的黑果枸杞果汁装入事先活化的 SPE 小柱, 然后用 2 倍上样液体积的纯净水冲洗小柱, 弃去废液, 用 2 倍上样液体积的甲醇将酚酸类化合物洗脱下来, 洗脱液经旋转蒸发干燥后, 用色谱甲醇定容于 5 mL 量瓶中, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得样品待测液, 待用。

2.4 线性关系考察 分别精密量取对照品溶液 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 mL 于 25 mL 的量瓶中, 加入甲醇定容, 既得不同浓度的对照品混合液。各进样 10 μL 进行分析, 以标准品峰面积对浓度进行线性回归, 得到 6 种对照品的回归方程和相关系数见表 1。

表1 黑果枸杞果汁中6种酚酸化合物的线性范围

化合物	线性范围	相关系数
没食子酸	$Y=118.88X+1.4927$	0.9999
原儿茶素	$Y=234.68X+2.4632$	0.9999
儿茶素	$Y=100.34X+6.9293$	0.9999
绿原酸	$Y=52.444X+0.985$	0.9999
咖啡酸	$Y=164.86X-1.0463$	0.9999
丁香酸	$Y=505.36X+0.561$	0.9999

2.5 稳定性试验 取供试品待测液在 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 3, 6, 9, 12 h 测定, 结果表明没食子酸, 原儿茶素, 儿茶素, 绿原酸, 咖啡酸, 丁香酸含量的 RSD 分别是 1.5%, 1.2%, 1.9%, 1.5%, 1.4%, 1.4%, 表明样品在 12 h 稳定。

2.6 精密度实验 取供试品溶液, 连续进样 5 次, 结果没食子酸, 原儿茶素, 儿茶素, 绿原酸, 咖啡酸, 丁香酸的含量 RSD 分别为 0.94%, 0.97%, 0.96%, 0.94%, 0.98%, 0.95%, 该实验表明该方法精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批黑果枸杞果汁, 按照 2.3 项下方法重复制备供试品溶液 5 份, 在上述色谱条件进行测定, 计算含量, 结果没食子酸, 原儿茶素, 儿茶素, 绿原酸, 咖啡酸, 丁香酸的含量 RSD 分别是 0.96%, 0.93%, 0.98%, 0.92%, 0.94%,

0.93%, 该实验表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率实验 取一个供试品溶液, 加入适量的混合对照品溶液, 混合均匀后, 按照 2.1 项下色谱条件测定样品溶液中没食子酸, 原儿茶素, 儿茶素, 绿原酸, 咖啡酸, 丁香酸的加样回收率, 由表 2 可知样品的各组分加样回收率为 97.7% ~ 100.7%, RSD 为 1.8% ~ 2.6%。

表2 黑果枸杞果汁中6种酚酸化合物的回收率

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
没食子酸	0.0037	0.0050	0.0085	97.7	97.70	2.3
	0.0036	0.0050	0.0085	98.8		
	0.0040	0.0050	0.0092	102.2		
	0.0037	0.0050	0.0082	94.3		
	0.0038	0.0050	0.0084	95.5		
原儿茶素	0.0162	0.0100	0.0260	99.2	99.64	1.8
	0.0158	0.0100	0.0254	98.4		
	0.0163	0.0100	0.0266	101.1		
	0.0159	0.0100	0.0262	101.1		
	0.0164	0.0100	0.0260	98.4		
儿茶素	0.3346	0.1000	0.4349	100.1	100.7	2.1
	0.3342	0.1000	0.4338	99.8		
	0.3348	0.1000	0.4349	102.3		
	0.3340	0.1000	0.4343	100.1		
	0.3345	0.1000	0.4340	101.2		
绿原酸	0.4908	0.5000	0.9900	99.9	99.98	2.6
	0.4910	0.5000	0.9918	100.1		
	0.4916	0.5000	0.9913	99.9		
	0.4902	0.5000	0.9910	100.1		
	0.4911	0.5000	0.9904	99.9		
咖啡酸	0.0468	0.0500	0.0960	99.1	99.60	2.2
	0.0460	0.0500	0.0971	101.1		
	0.0472	0.0500	0.0962	98.9		
	0.0470	0.0500	0.0966	99.5		
	0.0467	0.0500	0.0962	99.4		
丁香酸	0.0110	0.0100	0.0202	96.1	99.04	2.4
	0.0113	0.0100	0.0208	97.6		
	0.0108	0.0100	0.0210	101.0		
	0.0106	0.0100	0.0212	102.9		
	0.0110	0.0100	0.0205	97.6		

2.9 样品含量测定 分别精密吸取 10 批样品待测液各 10 μL, 注入 HPLC 中, 按 2.1 项下色谱条件测定, 外标法计算样品溶液中没食子酸, 原儿茶素, 儿茶素, 绿原酸, 咖啡酸, 丁香酸的含量, 每个样品重复 3 次取平均值, 见表 3。

3 讨论

由于酚酸是弱酸, 流动相的 pH 对化合物的峰型、分离度和保留时间会产生影响, 加入甲酸能较好的改善峰型, 消除拖尾。随着甲酸的量的加大, 会对

表3 黑果枸杞果汁中6种酚酸化合物的测定 $g \cdot L^{-1}$

No.	没食子酸	原儿茶素	儿茶素	绿原酸	咖啡酸	丁香酸
HG 1	0.003 7	0.016 2	0.334 6	0.490 8	0.046 8	0.011 0
HG 2	0.003 9	0.016 0	0.332 2	0.491 4	0.045 5	0.011 9
HG 3	0.003 6	0.016 4	0.334 1	0.492 1	0.046 2	0.010 2
HG 4	0.003 7	0.015 2	0.335 7	0.490 0	0.047 2	0.011 3
HG 5	0.004 2	0.017 0	0.332 6	0.489 7	0.047 6	0.011 6
HG 6	0.003 9	0.015 8	0.331 9	0.486 9	0.045 6	0.010 1
HG 7	0.003 1	0.016 7	0.335 3	0.492 3	0.045 9	0.012 5
HG 8	0.003 5	0.017 0	0.334 6	0.492 7	0.046 1	0.013 2
HG 9	0.004 1	0.017 3	0.335 2	0.491 2	0.045 0	0.012 3
HG 10	0.003 2	0.016 5	0.334 8	0.489 4	0.044 8	0.009 8

色谱柱稳定性产生影响,所以采用0.2%的甲酸水溶液。

本实验采用固相萃取分离黑果枸杞中的多酚化合物,这样不仅操作简便,而且可以去除大部分的干扰物,并且可以起到了浓缩富集的作用。

天然酚酸类化合物具有清除自由基、抑制血栓、抗菌消炎形成等生物活性^[7]。如儿茶素具有延缓老化、抗菌、降低胆固醇、清除自由基等作用^[8];没食子酸有抗肿瘤和杀锥虫等作用^[9];绿原酸具有抗菌、抗炎、抗病毒、保肝利胆等方面的药理作用^[10]。黑果枸杞果汁中含有丰富的绿原酸和儿茶素,这可能是黑果枸杞果汁生物活性的物质基础之一。

本文建立了黑果枸杞果汁酚酸的测定的方法,该

方法简单实用,提高了黑果枸杞果汁中酚酸的定性和定量检测的精确度,该实验为柴达木盆地黑果枸杞的资源开发提供了帮助。

[参考文献]

- [1] 帝玛尔. 丹增彭措. 晶珠本草[M]. 呼和浩特:内蒙古科技出版社,1986:12.
- [2] 甘青梅,骆桂法,李普衍,等. 藏药黑果枸杞开发利用的研究[J]. 青海科技,1997,4(1):17.
- [3] 陈海魁,蒲凌奎,曹君迈,等. 黑果枸杞的研究现状及其开发利用[J]. 黑龙江农业科学,2008,(5):155.
- [4] 谢予明,李连新. 天然酚酸类化合物抑制 HIV 整合酶作用的研究进展[J]. 中国医药导刊, 2008, 10(9):1410.
- [5] 张宏崎,邹坤,刘闯,等. 苜蓿叶酚酸组分抗炎作用及其机理研究[J]. 中国民族医药杂志, 2009, 5(5):29.
- [6] Vatter D A. Cranberry synergies for dietary management of helicobacter Polori Infections[J]. Process biochem,2005,40:1583.
- [7] Revilla E, Ryan JM. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high performance liquid chromatography photodiode array detection with out sample preparation[J]. J Chromatogr A, 2000,881:461.
- [8] 贾之慎. 儿茶素对生物自由基的清除作用[J]. 中国茶叶, 1990, 12(4):17.
- [9] 李肖玲,崔岚,祝德秋,没食子酸生物学作用的研究进展[J]. 中国药师, 2004,(7)10:767.
- [10] 孙健,吴国娟. 绿原酸的研究进展[J]. 中兽医杂志, 2009,1:47.

Fast determination of phenolic acids in *Lycium ruthenicum* murr juice by solid phase extraction and HPLC

CHEN Chen^{1,2}, WEN Huaixiu¹, ZHAO Xiaohui¹, TAO Yanduo¹, SHAO Yun^{1*}, MEI Lijuan¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative method for determination of gallic acid, original catechins, catechins, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid in *Lycium ruthenicum*. **Method:** The sample was separated on an ODS column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), eluted with methanol and water containing 0.1% acid with detected wavelength at 280 nm, and flow rate at 1.0 mL · min⁻¹. **Result:** The linearity of six components were good (r = 0.999 9). The average recoveries (n = 5) of the six constituents were 97.70% (RSD 2.3%), 99.64% (RSD 1.8%), 100.7% (RSD 2.1%), 99.98% (RSD 2.6%), 99.60% (RSD 2.2%), 99.04% (RSD 2.4%), respectively. **Conclusion:** The method is rapid and precise. It can be used for quality control of *Lycium ruthenicum* juice.

[Key words] SPE; *Lycium ruthenicum*; phenolic components

doi:10.4268/cjcm20110716

[责任编辑 丁广治]