



杨光,周双,孙兰英,等. HPLC 法测定秋果型树莓不同部位鞣花酸的含量[J]. 黑龙江农业科学, 2021(3):86-88,89.

HPLC 法测定秋果型树莓不同部位鞣花酸的含量

杨光¹,周双¹,孙兰英¹,段亚东¹,张静华¹,宋鹏慧¹,高媛²

(1. 黑龙江省农业科学院 乡村振兴科技研究所,黑龙江 哈尔滨 150028; 2. 黑龙江工商学院,黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要:为更合理地开发利用树莓资源,本文采用高效液相色谱法测定哈瑞太兹、秋福、波尔卡树莓叶片、果实和种子中鞣花酸的含量。测定条件为安捷伦 18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),进样量 10 μL,柱温 30 ℃,走样时间为 45 min,流速为 1.000 mL·min⁻¹,测定波长 254 nm。结果表明:鞣花酸浓度在 0.125~100 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系,回归方程为 $y=0.0173x+1.6235$ ($R^2=0.9985$)。鞣花酸的含量从 16.41~1364.99 μg·g⁻¹。哈瑞太兹叶片中鞣花酸含量最高,波尔卡果实中鞣花酸含量最低。树莓不同品种及同一品种不同部位中鞣花酸的含量有较大差异。

关键词:高效液相色谱法(HPLC);树莓;鞣花酸;含量

树莓(*Rubus idaeus* L.)为蔷薇科悬钩子属植物,灌木类果树,有木莓、马林果、覆盆子、托盘等俗称。树莓果实柔嫩多汁,风味独特,色泽宜人,可鲜食,更适宜加工,被誉为“第三代水果之王”和“黄金浆果”^[1-3],富含氨基酸、花青素、SOD、维生素 E、酶类自由基清除剂等抗衰老物质,树莓还含有咖啡酸、黄酮类和水杨酸等营养成分,这些营养成分具有抗心血管疾病的功能,特别是抗癌物质鞣花酸含量非常丰富^[4-5]。鞣花酸是一种植物多酚类化合物,广泛存在于自然界各种坚果、浆果等植物果实中,对化学物质诱导癌变及其他多种癌变有明显的抑制作用^[6]。自然界中主要以鞣花单宁的形式存在,经过酸水解后释放鞣花酸,以游离形式存在的鞣花酸较少,大量研究表明鞣花酸具有抗癌、抗氧化、抗炎等活性功能^[7-13]。因此有“致癌物清除剂”“克癌之星”的美称,可作为保健食品添加剂^[14]。红树莓是目前发现的天然鞣花酸含量最高的食物,远远超过越橘、核桃中的含量,在美国号称“近 10 年抗癌制品的唯一天然品种——鞣花酸”,对乳腺、结肠、胰脏和宫颈等癌细胞具有特殊疗效^[14],因此研究开发该物质具有较高的经济价值和广泛的应用范围。本文采用高效液相色谱法测定了秋果型树莓不同组织中鞣花酸

的含量,以期对树莓不同品种的合理开发利用提供依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

采用秋果型树莓,品种为哈瑞太兹、秋福和波尔卡,2018 年 8 月于黑龙江省农业科学院浆果研究所(现更名为乡村振兴科技研究所)绥棱基地树莓资源圃采摘成熟果实、叶片,冷冻于干冰中备用,采集成熟饱满种子风干备用。

鞣花酸标准品购自成都曼思特生物科技有限公司(批号 MUST-12110903),甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),水(杭州娃哈哈集团有限公司),其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 混合标准品溶液制备 精密称取鞣花酸标准品,配制质量浓度为 0.25 mg·mL⁻¹ 的标准品溶液,放入 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 供试品溶液制备 称取样本约 0.5 g 研磨碎,加入 80% 的甲醇溶液 1 mL,在 4 ℃ 条件下浸提过夜,8 000 g 离心 10 min,残渣中加入 80% 的甲醇溶液 0.5 mL 浸提 2 h,离心后将两次上清液合并,40 ℃ 氮吹至不含有机相,加入石油醚 60~90 ℃ 0.5 mL 萃取脱色 3 次,弃去上层石油醚相,下层 40 ℃ 氮吹至干,加入 1.5 mL 流动相震荡涡旋至完全溶解,采用针头式过滤器过滤后待测。

1.2.3 色谱条件 高效液相色谱仪:Agilent 1100 高效液相色谱仪。

收稿日期:2020-11-19

基金项目:黑龙江省农业科学院“农业科技创新跨越工程”项目(HNK2019CX11)。

第一作者:杨光(1983—),女,硕士,副研究员,从事树莓种质资源创新及利用研究。E-mail:1533954577@qq.com。

通信作者:孙兰英(1967—),女,硕士,研究员,从事树莓栽培及育种研究。E-mail:512275582@qq.com。

流动相的配制:取超纯水 600 mL,加入乙酸 6 mL 混匀溶解,再加入甲醇 400 mL,混匀。

HPLC液相条件:安捷伦 18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),进样量 10 μL,走样时间为 45 min,柱温 30 ℃,流速为 1.000 mL·min⁻¹,测定波长 254 nm。流动相过柱子,基线稳定后开始加样。

1.2.4 标准曲线的绘制 用标准品溶液,配制质量浓度分别为 100,50,25,5,1.25 和 0.125 μg·mL⁻¹ 的标准溶液,依次进样 10 μL,用高效液相色谱法测定峰面积。以鞣花酸质量浓度为纵坐标,鞣花酸峰面积值为横坐标,绘制回归方程和标准曲线。

1.2.5 重复性考察 称取 5 份同一批次样品,按 1.2.2 方法配制待测溶液,依照 1.2.4 样品测定方法进行鞣花酸峰面积的测定,计算 RSD。

1.2.6 稳定性考察 取同一批供试品原料,按 1.2.2 方法制备测试样品,分别在 0,2,4,6,8,10 和 12 h 进行样品中鞣花酸含量的测定,测得鞣花酸的峰面积值,计算 RSD。

1.2.7 精密度考察 吸取同一鞣花酸标准品溶液 10 μL,连续重复进样 5 次,测定鞣花酸的峰面积值,计算 RSD。吸取同一测试样品溶液,按 1.2.3 色谱条件连续重复进样 5 次,测定鞣花酸的峰面积值,计算 RSD。

1.2.8 加样回收率试验 取已知鞣花酸含量的样品 0.5 g,加入相当于样品中鞣花酸含量 80%、100%、120% 的标准品溶液,按 1.2.2 方法进行供试品溶液的 HPLC 测定。

2 结果与分析

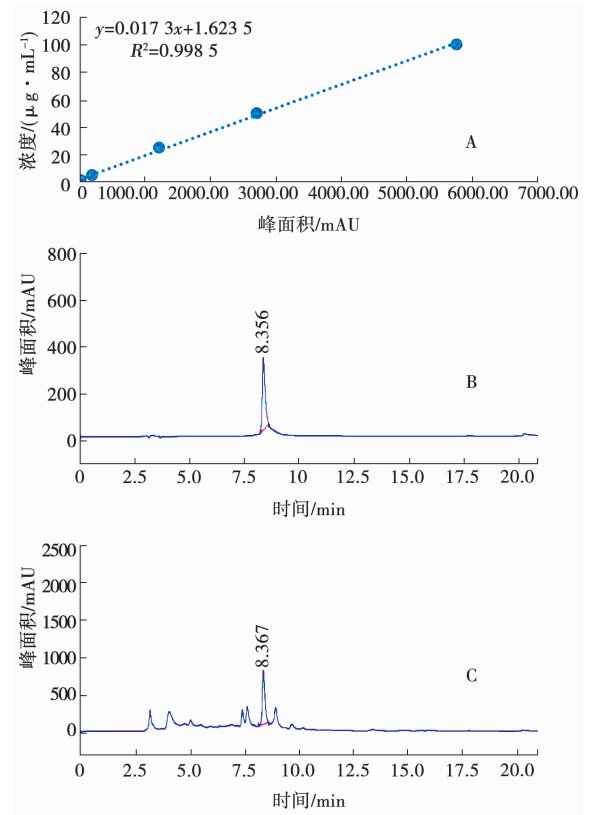
2.1 方法学考察

2.1.1 线性关系 将鞣花酸标准品溶液进样测试分析得标准品线性回归方程 $y=0.017\ 3x+1.623\ 5$ ($R^2=0.998\ 5$)。表明鞣花酸浓度在 0.125~100 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系(图 1A)。由图 1 可知,树莓标准品与供试品鞣花酸出现保留时间一致的两个峰,分别为标准品 8.356 min、供试品 8.367 min。

2.1.2 重复性 取同一样品 5 份,制备供试品溶液,测定鞣花酸峰面积,计算鞣花酸平均含量为 55.72 μg·g⁻¹,RSD 为 0.303%(n=5),表明仪器样品处理过程和测定方法均有良好的重复性。

2.1.3 精密度 精密吸取同一鞣花酸对照品溶

液 10 μL,连续重复进样 5 次,测定鞣花酸的峰面积值,RSD 为 0.651%(n=5);取同一鞣花酸供试品溶液 10 μL,连续重复进样 5 次,测定鞣花酸的峰面积值,RSD 为 0.372%,表明仪器精密度良好。



A. 标准品线性回归方程;B. 标准品;C. 供试品

图 1 树莓样品 HPLC

2.1.4 回收率 称取已知鞣花酸含量的树莓样品共 5 份,精密称定。分别加入鞣花酸对照品约 5.00 mg,按 1.2.2 方法制备加样供试品溶液,按 1.2.3 液相色谱条件测定鞣花酸含量,计算平均回收率为 100.13%,RSD 为 0.51%(表 1),所以该方法适用于鞣花酸的分析测定,结果准确可靠。可用于后续的试验。

表 1 回收率测定(n=5)

样品中含 量/mg	加入 量/mg	测得 量/mg	回收 率/%	$\bar{X}/\%$	RSD/%
4.998	5.002	9.986	99.86	100.13	0.51
5.003	4.998	10.112	101.11		
5.000	5.004	9.965	99.61		
5.002	5.011	10.010	99.97		
5.019	5.005	10.035	100.11		

2.2 样品测定结果

由表 2 可知,不同树莓品种、不同部位鞣花酸含量存在明显差异,含量在 16.41~1 364.99 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。哈瑞太兹叶片中鞣花酸含量最高,波尔卡果实中鞣花酸含量最低,前者是后者的 83.2 倍。鞣花酸在同一树莓品种不同部位含量均表现出明显差异。3 个品种果实中鞣花酸含量都低,是因为果实中水分含量高导致的。

表 2 不同组织样品含量测定

品种	组织	鞣花酸含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
波尔卡	果实	16.41 hH
	叶片	906.63 bB
	种子	55.74 eE
哈瑞太兹	果实	25.44 gG
	叶片	1364.99 aA
	种子	91.67 dD
秋福	果实	24.69 gG
	叶片	518.95 cC
	种子	43.87 fF

注:同列数据后不同小写和大写英文字母分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。

3 结论与讨论

鞣花酸作为红树莓中一种具有重要医疗、保健价值的天然活性物质,红树莓中鞣花酸含量非常高,是理想的天然鞣花酸来源,对其进行准确测定是开发利用的基础。目前测定鞣花酸的方法有很多种,如盐酸法^[15]、丙酮法^[16]等,高效液相色谱法因其快速、准确的特点被广泛运用于鞣花酸含量测定。高效液相色谱法对红树莓鞣花酸定量测定已有报道^[17],为本试验的开展提供了参考。本研究表明,采用高效液相色谱法测定树莓中鞣花酸含量,方法快速、简便、准确、测定结果可靠。哈瑞太兹叶片提取物中鞣花酸的含量最高,可达 1 364.99 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,不同品种之间鞣花酸含量存在明显差异,同一品种不同部位的鞣花酸含量也有明显差异。不同品种的鞣花酸含量分别为哈瑞太兹最高、波尔卡次之、秋福最低,不同部位的鞣花酸含量为叶片最高、种子次之、果实最低。树莓叶片具有生产天然鞣花酸的潜力,可作为提取鞣花酸的植物来源。实际生产中,修剪下来的树莓枝

叶作为废弃物造成了极大的浪费,因此本试验结果将为提高树莓附加值、合理开发利用树莓品种、提供参考依据。

参考文献:

[1] 韩加,新华·纳比,阿里木·帕塔尔,等.新疆树莓果实营养成分及其提取物抗氧化性研究[J].营养学报,2008(4):410-413.

[2] 郭军战,彭少兵,陈铁山.树莓和黑莓引种品种果实营养成分分析[J].西北林学院学报,2004(1):108-109.

[3] 延海莹,乔乐克,张京良,等.树莓营养及活性研究进展[J].食品工业,2018(7):281-284.

[4] 许奕华,张玉平,陈梅香.红树莓的国际市场现状及我国的发展机遇[J].中国果菜,2004(4):46.

[5] 刘宽博,王明力,万良钰,等.树莓中主要活性成分及产品研究进展[J].中国南方果树,2016(6):178-183.

[6] 李庆,姚开,谭敏,等.新型天然抗氧化剂-鞣花酸[J].四川食品与发酵,2001,37(4):10-14.

[7] Qiu Z,Zhou B,Jin L,et al. *In vitro* antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells[J]. Food and Chemical Toxicology,2013,59:428-437.

[8] Ou H,Lee S,Huang C,et al. Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Toxicology and applied pharmacology,2010,248(2):134-143.

[9] Corbett S,Daniel J,Drayton R,et al. Evaluation of the anti-inflammatory effects of ellagic acid[J]. Journal of Peri-Anesthesia Nursing,2010,25(4):214-220.

[10] Zhao M,Tanga S N,Marsh J L,et al. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice[J]. Cancer Letters,2013,337(2):210-217.

[11] Srigopalram S,Ilaivelil S,Jayraaj I A. Apoptosis associated inhibition of DEN-induced hepatocellular carcinogenesis by ellagic acid in experimental rats[J]. Biomedicine and Preventive Nutrition,2012,2(1):1-8.

[12] 郑建仙.植物活性成分开发[M].北京:中国轻工业出版社,2005.

[13] 陆晶晶,丁珂,杨大进.保健品功能因子鞣花酸研究进展[J].食品科学,2010(21):451-454.

[14] 范戎,肖荣贵.鞣花酸开发的可行性研究[J].中国中医药信息杂志,2001(9):41-43.

[15] 李海霞,王彩芳,张红岭,等.石榴皮中鞣花酸的提取工艺研究[J].中国医药导报,2008(24):50-51.

[16] 李小萍,辛秀兰,刘亚红,等.红树莓果实中鞣花酸的提取工艺研究[J].食品工业科技,2010(1):277-279.

[17] 刘丽娜,辛秀兰,崔丽娟.HPLC法测定红树莓籽中鞣花酸含量[J].安徽农业科学,2012,40(18):9659-9660.



梅林林,李霄汉,连翰伟.磺胺嘧啶对凤眼莲叶绿素和抗氧化酶的影响及其在植物体内的富集特征[J].黑龙江农业科学,2021(3):89-94.

磺胺嘧啶对凤眼莲叶绿素和抗氧化酶的影响 及其在植物体内的富集特征

梅林林¹,李霄汉²,连翰伟³

(1. 苏州市太仓环境监测站,江苏 太仓 215400;2. 中华环境保护基金会,北京 100062;3. 温州生态环境局乐清分局环境监测总站,浙江 温州 325000)

摘要:为促进水体抗生素污染治理,本文采用水培试验研究磺胺类抗生素磺胺嘧啶(SDZ)不同浓度(0,0.1,1.0,10.0,100.0和1 000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)对水生植物凤眼莲叶片叶绿素含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的影响及其在植物体内的富集规律。结果表明:SDZ各浓度胁迫下,凤眼莲叶片叶绿素含量较对照有所增加,但随着时间的延长与对照处理无显著差异;随着SDZ浓度的增加,凤眼莲叶片SOD活性整体呈降低趋势,CAT和POD活性整体呈增加趋势;说明凤眼莲叶片叶绿素含量初期对SDZ表现出应激效应。受到抗生素胁迫时,凤眼莲叶片抗氧化酶活性响应各不相同,而CAT和POD则表现出更强的活性,另外,凤眼莲根系对SDZ($>10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的富集浓度大于叶片,说明根系是主要的吸收部位。

关键词:磺胺嘧啶;凤眼莲;叶绿素;抗氧化酶;富集

抗生素被广泛应用于治疗水产和动物的疾病,同时也被添加至饲料中用于促进生长发育^[1-2],但仅有少量的抗生素会被生物体吸收利用,大部分抗生素以原药或代谢产物的形式经动物的排泄物进入环境,给生态环境造成严重的污

染^[3]。水环境中经常检测到抗生素存在,在水体中的浓度范围可从 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[4],沉积物中的浓度范围可从 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 至 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[4-5]。其中,磺胺类抗生素磺胺嘧啶(SDZ)经常在湖泊、养殖塘和污水处理厂等水体中被检出^[6-8],给水生态环境的安全带来了一定的影响。水体中的抗生素不仅影响生物的健康,也会富集在它们体内,并可通过食物链给人类健康带来潜在的危害^[7,9]。

收稿日期:2020-11-05

第一作者:梅林林(1980—),男,硕士,工程师,从事环境监测和管理研究。E-mail:jsnjzlm@sina.com。

Determination of Ellagic Acid in Different Part of Raspberry by HPLC

YANG Guang¹, ZHOU Shuang¹, SUN Lan-ying¹, DUAN Ya-dong¹, ZHANG Jing-hua¹,
SONG Peng-hui¹, GAO Yuan²

(1. Institute of Science and Technology for Rural Revitalization, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150028, China; 2. Heilongjiang College of Business and Technology, Harbin 150025, China)

Abstract: In order to develop and utilize raspberry resources more reasonably, the content of ellagic acid in the leaves, fruits and seeds of Heritage, Autumn Bliss and Porlka raspberries was determined by HPLC. The determination conditions were as follows, Agilent 18 chromatographic column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), injection volume 10 μL , sampling time 45 min, flow rate 1.000 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, column temperature 30 $^{\circ}\text{C}$, and determination wavelength 254 nm. The results showed that there was a good linear relationship between the concentration of ellagic acid and the peak area in the range of 0.125-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the regression equation was $y=0.0173x+1.6235$ ($R^2=0.9985$). The content of ellagic acid was 16.41-1364.99 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The content of ellagic acid was the highest in the leaves of Heritage and the lowest in the fruits of Porlka. The content of ellagic acid in different varieties of raspberry and different parts of the same variety was quite different.

Keywords: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC); raspberry; ellagic acid; content