

HPLC法测定不同品种苹果中原花青素B2的含量

王 皎^{1,2}, 宋新波¹, 刘成航³, 刘岱琳^{2,*}

(1.天津中医药大学, 天津 300193; 2.中国人民武装警察部队医学院生药教研室, 天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室, 天津 300162; 3.天津市科曼思特医药科技发展有限公司, 天津 300457)

摘 要: 目的: 建立苹果中原花青素B2含量的测定方法, 测定5个不同品种苹果果皮和果肉中原花青素B2的含量。方法: 采用HPLC法测定苹果果皮和果肉中原花青素B2的含量, 色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈柱 (250mm×4.6mm, 5μm); 流动相: A相: 0.5%磷酸溶液, B相: 水-乙腈(50:50, V/V); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 280nm。结果: 原花青素B2进样量在2.399~9.596μg范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.9998$), 回收率97.72%, RSD=1.98%。经测定几种苹果果皮和果肉中原花青素B2的含量分别在275.24~548.42μg/g和90.19~247.06μg/g范围中。结论: 本法简便、易行, 可用于苹果质量控制。

关键词: 高效液相色谱; 苹果; 原花青素B2; 含量测定

HPLC Determination of Proanthocyanidin B2 in Different Varieties of Apples

WANG Jiao^{1,2}, SONG Xin-bo¹, LIU Cheng-hang³, LIU Dai-lin^{2,*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Department of Pharmacognosy, Tianjin Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China;

3. Tianjin Chroma-standard Medical Science & Technology Development Co. Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: Objective: To determine the proanthocyanidin B2 content of five apple cultivars by HPLC. Methods: The chromatographic separation was performed on a Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase comprised water containing 0.5% H₃PO₄ (A) and acetonitrile-water (50:50, V/V, B) at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength was set as 280 nm. Results: There was a good linear relationship between peak area and concentration over the range of 2.399–9.596 μg ($R^2 = 0.9998$). The average spike recovery of proanthocyanidin B2 was 97.72% with a RSD of 1.98%. The procyanidins B2 contents of the peel and pulp of several apple varieties were 275.24–548.42 μg/g and 90.19–247.06 μg/g, respectively. Conclusion: This method is simple, fast and reproducible and can be used for the determination of proanthocyanidin B2 in apple.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); apple; proanthocyanidin B2; determination

中图分类号: R151.3; TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)24-0293-03

苹果是我国产量最大的水果之一, 资源十分丰富。苹果多酚是苹果中的主要功效成分, 具有抗氧化、抗衰老、抗癌^[1-5]、防治心血管疾病、防辐射^[6]和防治龋齿等多种保健作用^[7]。苹果多酚主要由原花青素、花青素、黄酮类和绿原酸等酚酸类成分构成^[8], 其中原花青素占苹果多酚含量的71%~90%^[9-10], 是最主要的活性成分^[11]。原花青素是由儿茶素或表儿茶素或儿茶素和表儿茶素形成的二聚体, 此外还有三聚体、四聚体等直至十聚体。按聚体度的大小通常将二至四聚体称为低聚体(pracyanidolic oligomers, OPC), 将五聚体以上的称为高聚体(procyanidolic

polymers, PPC)。我国目前市面上销售的苹果品种较多, 多采用紫外检测的方法测定单个品种不同时期及各品种中总原花青素的含量^[12-13], 或者用HPLC法测定儿茶素、表儿茶素以及绿原酸等单体类成分的含量差异^[14-18], 目前尚未见到采用原花青素单体成分监测各品种间不同部位的含量差异的文献报道。

原花青素B2是一种原花青素二聚体, 通过前期研究发现其在苹果多酚中含量相比较其他原花青素单体较高, 且易于识别, 是苹果多酚中易于检测的原花青素单体成分。目前也有很多关于原花青素B2的功效研究报道, 其

收稿日期: 2011-09-19

作者简介: 王皎(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物活性成分。E-mail: wj4330411@126.com

*通信作者: 刘岱琳(1973—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然产物活性成分。E-mail: dailinlch@163.com

能抗氧化^[19], 抗肿瘤^[19], 还能明显降低糖尿病大鼠血糖, 对体内外非酶糖基化反应具有明显的抑制作用^[20]。说明原花青素B2也是苹果多酚中的重要功效成分, 因此本实验采用高效液相色谱法, 对不同品种苹果果皮、果肉中原花青素B2的含量进行了研究, 为国内各品种苹果中苹果多酚的质量控制以及产品开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苹果(嘎啦、青苹果、红富士、黄香蕉、美国8号)市售。

原花青素B2对照品(纯度98%) 天津市科曼思特医药科技发展有限公司; 甲醇、乙腈(均为色谱纯试剂) 天津市康科德科技有限公司; 磷酸(分析纯) 天津化学试剂有限公司; 纯净水(液相用水) 杭州娃哈哈集团。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(泵为LC-20AT, 检测器是SPD-M20A) 日本Shimadzu公司; MT5百万分之一电子天平 瑞士梅特勒公司; FA1204B电子天平 上海精密科学仪器有限公司; HH-2数字显示电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器厂; R-124型旋转蒸发器 瑞士步琪公司; SHB-III循环水式多用真空泵 郑州长城科工贸有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

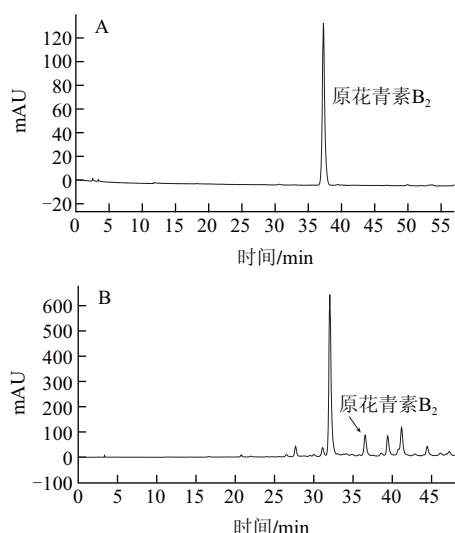


图1 原花青素B2对照品(A)和供试品(B)的色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of proanthocyanidin B2 standard (A) and sample (B)

色谱柱为Phenomenex Luna C₁₈ 柱(250mm×4.60mm, 5μm)。紫外检测波长280nm; 柱温30℃; 流

速1.0mL/min; 进样量: 20μL; 流动相: A相: 0.5% 磷酸溶液, B相: 水-乙腈(50:50, V/V); 梯度洗脱: 0min(0%B)、15min(10% B)、28min(18% B)、33min(25% B)、60min(30% B)、80min(50% B)、85min(0% B)、95min(stop)。图1为标准品与供试品的液相色谱图。

1.3.2 对照品溶液的制备

精密称取原花青素B2纯品, 置于25mL棕色容量瓶中, 用色谱甲醇定容, 摇匀, 配制成质量浓度为0.59975mg/mL的对照品溶液, 于冰箱中冷藏保存备用。

1.3.3 样品溶液的制备

苹果洗净切碎, 在切碎过程中为防止酶促褐变将苹果浸泡在3%柠檬酸和亚硫酸溶液中, 经冷冻干燥后用组织粉碎机粉碎至100目, 真空包装, 放于0~4℃冰箱中备用。分别称取果皮干粉5.0g、果肉10.0g, 精密称定, 按料液比1:8(g/mL)加入乙酸乙酯, 加热回流提取30min, 然后用布氏漏斗抽滤, 滤液转移至圆底烧瓶, 将滤渣重复上述操作, 合并2次滤液, 在旋转蒸发器中蒸干, 用甲醇溶解并定容至10mL容量瓶中, 得到样品, 备用^[19]。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

分别精密吸取上述对照品储备液1.0、2.0、3.0、4.0mL, 置于5mL棕色容量瓶中, 用色谱甲醇定容至刻度并摇匀, 作为标准曲线的4个测试点, 选取对照品储备液作为第五个测试点。按1.3.1项色谱方法, 进行HPLC测定。以峰面积(Y)与对照品质量浓度(X, mg/mL)进行线性回归。结果原花青素B2的回归方程为 $Y=1 \times 10^7 X - 185304$ ($R^2=0.9998$), 实验表明, 原花青素B2进样量在2.399~9.596μg范围内线性关系良好。

2.2 精密度实验

精密吸取同一浓度对照品溶液20μL, 在高效液相色谱上连续进样5次, 按1.3.1节色谱条件进行测定, 峰面积的RSD为0.41%, 结果表明, 测定方法精密度良好。

2.3 稳定性实验

取同一供试品溶液, 分别于0、2、4、8、12h进样, 按1.3.1节色谱条件测定, 所测峰面积的RSD为1.80%, 表明供试品溶液在12h内稳定性良好。

2.4 重复性实验

取红富士苹果果肉干粉5份, 每份10.0g, 按1.3.3节方法提取样品, 含量按1.3.1节方法重复测定, 求得RSD值为1.38%, 结果表明, 本方法重复性良好。

2.5 加样回收实验

精密称取黄香蕉苹果果肉干粉10.0g, 共5份, 分别加入标准品溶液, 按1.3.3节制备测试溶液, 经一次稀释定容至10mL容量瓶中并测定, 计算回收率, 结果见表1。计算得原花青素B2的平均回收率为97.72%, RSD=1.98%。

表1 原花青素B2回收率实验

Table 1 Average recovery and RSD of proanthocyanidin B2 in spiked sample

序号	加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1.1995	2.3391	101.3		
2	1.1995	2.407	95.8		
3	1.1995	2.3654	99.1	97.72	1.98
4	1.1995	2.4189	94.9		
5	1.1995	2.3853	97.5		

2.6 样品测定

取不同品种的苹果干粉,精密称定,按1.3.3节方法进行制备,按1.3.1节色谱条件进行含量测定,结果见表2。如表2所示,在此条件下测定几种苹果果皮和果肉中原花青素B2的含量分别在275.24~548.42 $\mu\text{g/g}$ 和90.19~247.06 $\mu\text{g/g}$ 。苹果果皮中的原花青素B2的含量高于苹果肉中的含量。不同品种苹果中原花青素B2的含量各异,按果皮中原花青素B2含量由高到低的顺序是美国8号(548.42 $\mu\text{g/g}$)、嘎啦(526.71 $\mu\text{g/g}$)、黄香蕉(497.16 $\mu\text{g/g}$)、红富士(393.23 $\mu\text{g/g}$)、青苹果(275.24 $\mu\text{g/g}$)。品种间原花青素B2含量的差异与其物种品种差异及其生长环境具有密切关系。同一种苹果中,其不同部位原花青素B2的含量也有差异,果皮较高,果肉次之,这一结果也反映了苹果果皮中苹果多酚(原花青素)的含量相对较高,与人们日常食用苹果时苹果皮会有酸涩口感的现象相一致。

表2 5种苹果中原花青素B2含量

Table 2 Contents of proanthocyanidin B2 in five different apples

	品种	嘎啦	青苹果	红富士	黄香蕉	美国8号
		$\mu\text{g/g}$				
果肉		246.45	90.19	163.87	247.06	201.69
果皮		526.71	275.24	393.23	497.16	548.42

3 结论

本实验首次报道了HPLC方法测定不同品种苹果的果肉和果皮中原花青素B2的含量,采用条件A相:0.5%磷酸水溶液,B相:水-乙腈(50:50);流速:1.0mL/min、柱温30℃、检测波长280nm处分离效果较好,方法快速、简便、易行,重复性好。本实验研究结果显示苹果果皮中原花青素B2含量是果肉的2~3倍,是天然保健物质的很好膳食来源。而人们在日常生活中通常习惯于在食用时被除去,造成生物活性物质的浪费,未能进行很好的加工利用,因此从保健的角度出发,应倡导食用果皮或将苹果皮开发成保健品或果汁,以提高生物活性物质的综合利用率。

参考文献:

- [1] HE Xiangjiu, LIU Ruihai. Phytochemicals of apple peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(21): 9905-9910.
- [2] WOLFE K, Wu Xianzhong, LIU Ruihai. Antioxidant activity of apple peels[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(3): 609-614.
- [3] HE Xiangjiu, LIU Ruihai. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(11): 4366-4370.
- [4] 武长柱. 苹果多酚的功效研究及应用展望[J]. 彭城职业大学学报, 1999(4): 92-93.
- [5] 唐传核, 彭志英. 苹果多酚的开发及应用[J]. 中国食品添加剂, 2001(2): 41-44.
- [6] 戚向阳, 陈维军, 彭光华. 苹果提取物抗辐射效应的研究[J]. 营养学报, 2003, 25(4): 397-399.
- [7] 王皎, 李赫宇, 刘岱琳, 等. 苹果的营养成分及保健功能研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(1): 164-168.
- [8] 也兰春, 孙建设. 不同品种苹果果实主要酚类物质含量的研究[J]. 中国食品学报, 2005, 5(3): 118-121.
- [9] VRHOVSEK U, RIGO A, TONON D, et al. Quantitation of polyphenols in different apple varieties[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(21): 6532-6538.
- [10] YANG Jingyu, LI Yan, WANG Fang, et al. Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl₄-induced acute liver damage in mice[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(10): 6525-6531.
- [11] SHOJI T, MASUMOTO S, MORIICHI N, et al. Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(3): 884-892.
- [12] 戚向阳, 陈仲球, 陈志远, 等. 苹果中原花青素的测定及对果汁质量的影响[J]. 湖北农业科学, 2001(6): 74-77.
- [13] 也兰春, 孙建设, 吕霞. 苹果不同品种果实原花青素含量及其动态变化[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 16-18.
- [14] 孙承锋, 姜竹茂, 杨建荣. 反相高效液相色谱法测定苹果多酚的含量[J]. 食品工业科技, 2006, 27(4): 185-187.
- [15] 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.
- [16] 吕海涛, 孙海峰, 曲宝涵, 等. 高效液相色谱法同时测定苹果汁中6种酚类物质[J]. 分析化学, 2007, 35(10): 1425-1429.
- [17] 吕海涛, 邓锐. 高效液相色谱法测定苹果汁中8种酚类化合物[J]. 分析化学, 2009, 45(2): 125-127.
- [18] 杨建荣, 孙承锋. 高效液相色谱法同时测定苹果中9种多酚物质[J]. 食品与机械, 2008, 24(1): 127-129.
- [19] SAKANO K, MIZUTANI M, MURATA M, et al. Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2005, 39(8): 1041-1049.
- [20] 谢文利, 万宗明, 李玲, 等. 原花青素-B2对体内外蛋白质非酶糖基化反应的影响[J]. 中草药, 2011, 43(4): 749-751.