高效液相色谱法测定成熟龙眼各部位游离鞣花酸含量

刘玉革，刘丽琴，刘胜辉，魏长宾
(中国热带农业科学院南亚热带作物研究所，广东 湛江 524091)

摘 要：采用高效液相色谱法测定石峡、储量两个品种成熟龙眼各部位游离鞣花酸含量。鞣花酸提取条件为80%甲醇溶液，70℃回流2h。色谱条件为：C_{18}色谱柱(250mm × 4.5mm，5μm)、柱温35℃、进样体积10μL、检测波长254nm、流速1mL/min，流动相为甲醇-水-冰乙酸(50:49.7:0.3，*V*/*V*)。鞣花酸在1～200μg/mL范围内与峰面积呈线性关系，相关系数为0.999。取5个样品瓶分别进样，得到样品保留时间相对标准偏差(RSD)值为1.0%，峰面积RSD值为0.8%。对同一瓶样品连续进样10次，保留时间和峰面积的RSD值分别为0.15%和0.2%。加标回收结果表明平均加标回收率为95.97%～101.9%。测定结果表明石峡和储量各部位鞣花酸的含量大小顺序均为果核＞果皮＞果肉，其中果皮和果核中鞣花酸远大于已报道的其他水果中的含量。

关键词：龙眼；鞣花酸；高效液相

Determination of Free Ellagic Acid in Different Parts of Mature Longan by HPLC

LIU Yu-ge，LIU Li-qin，LIU Sheng-hui，WEI Chang-bin
(South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Zhanjiang 524091, China)

Abstract: In this study, the contents of ellagic acid (EA) in different parts of mature longan cultivars Shixia and Chuliang were determined by HPLC. The sample extraction was achieved through hot reflux in 30 mL of 80% methanol aqueous solution for 2 h. The chromatographic separation was achieved on an Agilent C_{18} column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) using a mobile phase composed of methanol, water and glacial acetic acid (50:49.7:0.3, *V*/*V*) at a flow rate of 1 mL/min. The injection volume, column temperature and detection wavelength were set at 10 μL, 35 ℃ and 254 nm, respectively. The linear range for EA was 1－200 μg/mL with a regression coefficient of 0.999. HPLC results showed that the content of EA in different parts of longan cultivars Shixia and Chuliang decreased in the following order: stone fruit ＞ peel ＞ pulp. The EA levels in the peel and pulp measured in this study were much higher than those reported in other fruits.

Key words: longan; ellagic acid; high performance liquid chromatography(HPLC)
中图分类号：S667.4 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2012)14-0181-03

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)俗名桂圆，又名龙目、比目，属无患子科(Euphoraceae)龙眼属(*Dimocarpus* Lour.)植物[1]。其种植地主要分布在中国，以及包括泰国、越南和菲律宾在内的东南亚国家等。龙眼肉即可食用又可药用，被卫生部列入“既是食品又是药品”物品名单中。

鞣花酸是一种重要的多酚物质，主要存在于坚果和莓类果实，如草莓、黑莓和悬钩子等中[2-3]。鞣花酸在止血、抗衰老、增加肌体免疫力、降压、镇静等方面具有显著效果，还能抑制多种细菌、病毒[4-5]。因此，本品有“克癌之星”、“致癌物清除剂”之美称。目前市场上已有成品的鞣花酸产品出售[6]。

目前，龙眼研究主要集中在多糖[7-9]、苷类[10-11]等方面，对于龙眼鞣花酸含量的研究还非常少见。鞣花酸测定方法很多，如紫外分光光度法、薄层层析法等。高效液相法由于具有操作方便、定量速度快及检测限低等特点而被普遍用于鞣花酸的测定。本实验选取石峡和储良两个品种的成熟龙眼为对象，采用高效液相色谱法测定果皮、果肉和果核中鞣花酸的含量，以期为龙眼提高附加值，综合开发利用提供参考依据。

收稿日期：2011-07-04
基金项目：中央级公益科研院所基本科研业务费专项(SSCRI200901)
作者简介：刘玉革(1977—)，女，助理研究员，博士，研究方向为功能成分提取。E-mail：liuyugehb@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成熟石峡、储良品种的龙眼均采自中国热带农业科学院南亚热带作物研究所。对于新采摘的果实，将果皮、果肉、果核分离放入冰箱－20℃冷冻备用。

鞣花酸标准品(含量≥95%) 美国Fluka公司；甲醇(色谱纯) 美国Fisher公司；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LC-20A高效液相色谱仪(配SPD-20A紫外检测器、SIL-20A自动进样器及CTO-10A柱温箱) 日本岛津公司；Elix5超纯水仪 美国Millipore公司；C_{18}色谱柱(250mm×4.5mm，5μm) 美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

精确称取0.2g两个品种各部位样品于100mL单颈瓶中，加入80%甲醇溶液30mL，于70℃搅拌回流3h。冷却后用Whatman滤纸(No.4)过滤，去掉固体，剩余液体置4℃冰箱备用，每个样品3次重复测定。

1.3.2 标准溶液的配制

准确称取鞣花酸标准品40mg，转移至100mL容量瓶中，用甲醇定容至刻度，得到质量浓度均为400μg/mL的标准溶液，随后逐级稀释至0.5、1、5、10、20、50、100、200μg/mL。

1.3.3 色谱分析条件

色谱柱：C_{18}色谱柱(250mm×4.5mm，5μm)；柱温35℃；流动相为甲醇-水-冰乙酸(50:49.7:0.3，*V*/*V*)；检测波长254nm；进样体积10μL。

1.3.4 数据分析

数据分析采用软件SPSS v16.0处理。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制作

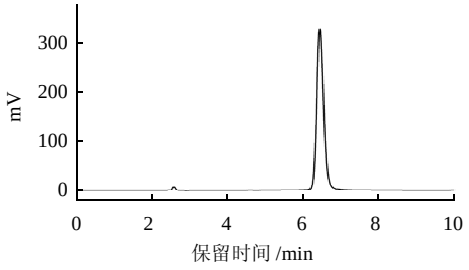

图1 鞣花酸标样色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of ellagic acid standard

由鞣花酸标准样品色谱图(图1)可知鞣花酸保留时间为6.43min。取各级标准溶液进样10μL进行分析，所得结果以标样质量浓度/(μg/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标，绘制标准溶液曲线方程为$Y=-7735.32976+102865.49541X$，结果表明线性范围为1～200μg/mL，相关系数为0.999。

2.2 样品分析

龙眼两个品种的果皮、果肉和果核色谱图见图2，3个部位分别在保留时间为6.43、6.41min和6.39min处出现吸收峰，与标准样品相对应，证明样品中存在鞣花酸。根据高效液相定量结果所得两个成熟龙眼品种果皮、果肉和果核中游离鞣花酸的含量见表1。

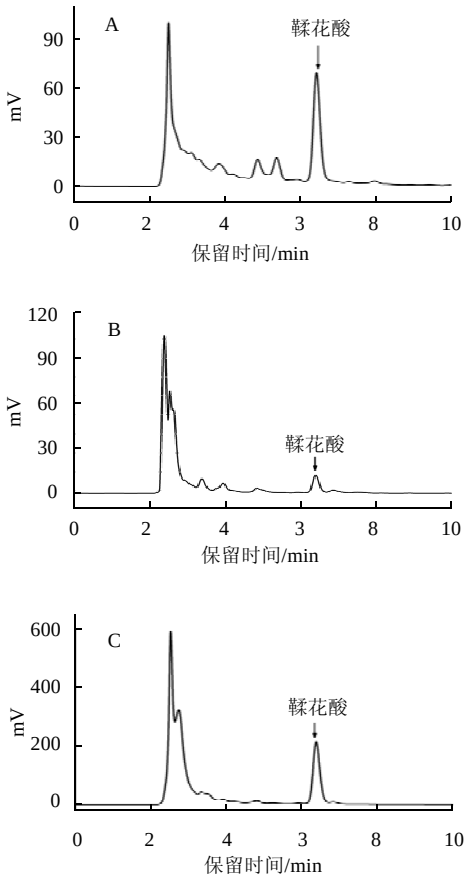

图2 石峡果皮(A)、果肉(B)和果核(C)的色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of EA in peel (A), pulp (B) and stone fruit (C)

表1 龙眼各部位鞣花酸的含量

Table 1 Contents of free ellagic acid in different parts of mature Shixia and Chuliang

品种	含量/(mg/g)		
	果皮	果肉	果核
石峡	1.242	0.455	6.231
储良	1.35	0.554	5.789

注：含量以鲜质量计算。

由表1可知，对于石峡和储良，各部位游离鞣花酸含量的大小顺序都是果核＞果皮＞果肉。数据分析结

果表明，对于这两个品种，果皮和果肉与果核之间鞣花酸的含量差异极显著，果皮和果核之间差异显著。本实验所测的石峡和储良果皮和果核中鞣花酸的含量远大于已经报道的叶下珠[12]、诃子[13]、红树莓[14]、蛇莓[15]等中鞣花酸的含量。这表明龙眼果核和果皮具有作为生产鞣花酸原料的潜力。

2.3 精密度实验

用石峡果皮提取液样品测定方法的精密度。将该提取液分装于5个样品瓶中。5个样品瓶分别进样，得到样品保留时间相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.0%，峰面积的RSD为0.8%。对同一瓶样品连续进样10次，保留时间和峰面积的RSD分别为0.15%和0.2%。这表明该方法比较稳定，适合于鞣花酸的测定。

2.4 回收率的测定

取石峡果皮提取液加入鞣花酸标准液测定加标回收率，每次加标平行测定3次，回收率实验结果见表2，平均加标回收率为95.97%～101.9%。

表2 测定方法的回收率

Table 2 Spike recovery rate of EA from Shixia longan peel extract

实际含量/mg	加标量/mg	平均测出量/mg	平均回收率/%
0.2484	0.0621	0.308	95.97
0.2484	0.1242	0.375	101.9
0.2484	0.2484	0.489	96.86

3 结 论

本实验结果表明，成熟石峡和储良各部位游离鞣花酸含量顺序为果核＞果皮＞果肉。其中，果核和果皮游离鞣花酸含量相当高，远大于一些已经报道的水果中该物质的含量，龙眼果皮和果核具有生产鞣花酸的潜力。在实际生活中，果核和果皮都是人们食用水果后产生的废弃物，一般都会被直接丢弃，对于富含各种营养成分的果皮和果核来说这是资源的极大浪费。因此，该研究还为果皮、果核等废弃资源的重新利用提供实验依据。

参考文献：

[1] 肖更生, 黄儒强, 曾庆孝, 等. 龙眼核的营养成分[J]. 食品科技, 2004(1): 93-94.

[2] AMAKURA Y, OKADA M, TSUJI S, et al. High performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits[J]. J Chromatogr A, 2000, 896(1/2): 87-93.

[3] VEKIARI S A, GORDON M H, GARCÍA-MACÍAS P, et al. Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit[J]. Food Chem, 2008, 109(3): 1007-1011.

[4] HAKKINEN S H, KARENLAMPI S O, MYKKANEN H M, et al. Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage[J]. Eur Food Res Technol 2000, 212(1): 75-80.

[5] SIGMAN C C, HELMES C T, FAY J R, et al. A study of chemicals in the wood and associated industries for the selection of candidates for carcinogen bioassay. 1. Naturally-occuring wood chemicals[J]. J Environ Sci Health A, 1984, 19(5): 533-577.

[6] LANSKY E P. Beware of pomegranates bearing 40% ellagic acid[J]. J Med Food, 2006, 9(1): 119-122.

[7] 李雪华, 龙盛京, 谢云峰, 等. 龙眼多糖、荔枝多糖的分离提取及其抗氧化作用的探讨[J]. 广西医科大学学报, 2004, 21(3): 342-344.

[8] 黄岛平, 陈秋虹, 陈建红, 等. 高效液相色谱法测定龙眼肉多糖的单糖组成[J]. 广西科学院学报, 2010, 26(3): 234-236.

[9] 林婧烨, 柯李晶, 鲁伟, 等. 高效液相色谱法测定龙眼果中水溶性单糖和寡糖[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 513-516.

[10] 胡涛, 马翠兰, 林挺兴, 等. 高效液相色谱法测定龙眼果实腺苷含量[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2009, 38(4): 361-365.

[11] 肖维强, 黄炳雄, 王晓容, 等. HPLC法测定龙眼肉中的几种核苷类物质[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 234-237.

[12] 袁永兵, 张兰珍, 郭亚健, 等. RP-HPLC法测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(1): 56-58.

[13] 贝玉祥, 杨阳, 郭英, 等. 高效液相色谱法测定诃子中鞣花酸的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2178-2179.

[14] 李小萍, 梁琪, 辛秀兰, 等. 高效液相色谱法测定红树莓中鞣花酸含量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(24): 11345-11346.

[15] 王予祺, 斯建勇, 刘新民, 等. 蛇莓中鞣花酸和短叶苏木酚羧酸的分离鉴定及含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 667-671.