

HPLC 法测定苹果浓缩汁中的多酚类物质

孙海峰¹, 吕海涛², 周莎莎¹, 代庆海¹, 周亚平¹, 戴洪义^{1,*}

(1. 青岛农业大学园艺学院, 山东 青岛 266109 2 青岛农业大学理学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 利用高效液相色谱法(HPLC)分析了儿茶素、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸、阿魏酸等六种酚类物质在鲁加1号和鲁加5号苹果浓缩汁中的含量。色谱条件: 色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(150mm×4.6mm id, 5μm), 以甲醇-1%乙酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱。柱温30℃, 流速为1.0ml/min, 检测波长为280nm。在此色谱条件下, 各组分均得到很好的分离。经测定鲁加1号苹果浓缩汁中含有儿茶素、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸、阿魏酸等六种酚类物质; 鲁加5号苹果浓缩汁中含有较少的绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸、阿魏酸等五种酚类物质。

关键词: 高效液相色谱; 鲁加1号; 鲁加5号; 酚类物质; 苹果浓缩汁

Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Apple Juice Concentrate by High Performance Liquid Chromatography

SUN Hai-feng¹, LÜ Hai-tao², ZHOU Sha-sha¹, DAI Qing-hai¹, ZHOU Ya-ping¹, DAI Hong-yi^{1,*}

(1. College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. College of Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: The contents of phenolic compounds in apple juice concentrate of Lujia 1 and Lujia 5 were studied by high performance liquid chromatography (HPLC) on an Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm id, 5 μm). Liner gradient elution composed of methanol and 1% acetate acid solution at 30 °C with flow rate 1.0 ml/min and 280 nm wavelength detection by diode array detector. The compositions were separated completely under these chromatogram conditions. The determination results showed that there are six phenolic compounds in apple juice concentrate of Lujia 1, namely catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, coumaric acid, and ferulic acid. However, the apple juice concentrate of Lujia 5, contains less chlorogenic acid, caffeic acid, epicatechin, coumaric acid and ferulic acid.

Key words: HPLC; Lujia 1; Lujia 5; phenolic compound; apple juice concentrate

中图分类号: TS207.3

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0314-04

在苹果汁加工过程中, 酚类物质与果汁中的蛋白质结合, 形成大分子的聚合物, 从而使苹果汁产生沉淀, 影响苹果汁的产品质量。苹果多酚是苹果中所含多元酚类物质的通称, 是果实在生长发育期间的次生代谢产物。苹果多酚与新鲜苹果及其加工制品(如苹果汁、苹果酒等)的色泽、风味及稳定性密切相关^[1-2]。另外研究证明, 苹果多酚是一种优良的食品抗氧化剂和保鲜剂^[3-4], 同时苹果多酚还具有多种生理活性^[5-7], 如抗氧化、延缓衰老、降血压、防龋齿、防辐射、抗过敏等, 具有很好的开发前景。

苹果多酚的种类繁多, 可分为羟基肉桂酸类(如咖

啡酸、绿原酸)、黄烷醇类(如(+)-儿茶素、(+)-表儿茶素)、黄酮醇类(如槲皮素、芦丁)和二氢查耳酮类(如根皮素、根皮苷)等^[8]。本实验针对苹果中主要的多酚物质, 确立用甲醇和1%的乙酸作流动相测定苹果浓缩汁中多酚物质的HPLC检测方法, 采用反相C₁₈柱, 并测定鲁加1号和鲁加5号苹果浓缩汁中的多酚含量, 为苹果浓缩汁产品的质量控制以及苹果多酚的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2007-06-16

基金项目: 山东省良种农业工程资助项目(S0208)

作者简介: 孙海峰(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为果汁加工。E-mail: sunhaifeng0629@163.com

*通讯作者: 戴洪义(1956-), 男, 教授, 硕士, 研究方向为果树育种。E-mail: hydai@qau.edu.cn

鲁加1号、鲁加5号苹果均采于蓬莱市湾子口园艺实验站。

儿茶素、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸、阿魏酸标准品 Sigma公司; 甲醇、乙酸为色谱纯; 乙酸乙酯、盐酸、氢氧化钠均为分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(由四元低压泵、柱温箱、光电二极管阵列检测器、自动进样器以及Agilent 色谱工作站组成) 美国安捷伦公司; Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150mm × 4.6mm id, φ 5μm); Milli-Q超纯水仪(18mΩ/cm) 美国Millipore公司; 针头过滤器(0.22μm膜过滤)。

1.3 样品前处理

取适量的鲁加1号和鲁加5号的苹果浓缩汁, 用经超纯水仪处理过的三重水稀释到11.5Brix, 取25ml果汁用1mol/L的NaOH调pH值为7.0, 加入25ml的乙酸乙酯, 用混合摇床振动10min, 然后转移到分液漏斗中分离出酯相和水相, 水相再用25ml的乙酸乙酯萃取一次, 合并酯相, 此为中性酚。水相用6mol/L的HCl调pH值为2.0, 再分别用25ml的乙酸乙酯萃取2次, 合并酯相, 此为酸性酚, 将中性酚和酸性酚合并后真空浓缩至干, 残渣溶于25ml的超纯水中, 放入4℃冰箱中冷藏保存、备用。

1.4 测定方法

在确定好的色谱条件下取一定量配制好的标准溶液进行测定, 得到标准品的色谱图及回归曲线方程。经前处理的样品用0.22 μm的针头过滤器过滤后, 进行HPLC分析, 进样量为20 μl。根据测得各组分保留时间及紫外吸收光谱图与标准图谱比较, 对所含酚类物质进行定性分析, 依据峰面积, 根据利用外标法得到的各标准品的回归方程, 可以计算出每种酚物质在样品中的含量。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 最佳检测波长的选择

利用光电二极管阵列检测器, 可以获得吸光度(A)、波长(λ)和时间(t)的三维空间的立体色谱图, 在200~400nm波长范围得到几种酚类物质的紫外吸收光谱图, 并与其标准品的色谱图进行对照, 进行纯度检验。根据紫外得到儿茶素的吸收最大吸收波长为227、278nm, 绿原酸为325nm, 表儿茶素为227、278nm, 咖啡酸为325nm, 香豆酸227、310nm, 阿魏酸为235、325nm。在各种物质其最大吸收波长下进行检测, 可获得最高检测灵敏度。但鉴于各种物质在280nm左右均有较大的吸

收, 且不受流动相中其它物质的干扰, 操作方便, 重复性好。因此, 选择检测波长为280nm。

2.1.2 流动相的选择

文献报道可以使用甲醇-水、乙腈-水等作为流动相分离酚类物质^[10], 但由于酚羟基、羧基在水溶液中容易发生电离, 极性增强, 在固定相表面形成双重保留机制, 色谱峰脱尾严重, 很难分离苹果汁中的酚类物质, 定量分析误差较大。如果加入少量酸性调节溶液, 如磷酸缓冲溶液, 可使多酚的电离受到抑制, 以中性分子的形态存在, 极性减弱, 有利于增强在固定相上的保留, 使分离效果和峰形得到改善。本实验采用醋酸调节流动相的酸性, 醋酸的浓度对绿原酸等的出峰时间和峰形有一定的影响, 最终确定酚类物质分离的最佳梯度洗脱条件, 流动相由甲醇(A)和1%的乙酸水溶液(V/V)(B)两部分组成, 溶剂A在40min内由5%上升到30%, 对多酚类物质进行分离, 然后变为100%, 并维持5min, 将残留在色谱柱内的一些难分离物质洗脱, 最后再返回到初始状态, 平衡色谱柱, 准备下一次进样分析。

2.1.3 流速对分离度的影响

根据速率理论 $H=Au^{1/3}+B/U+Cu$ (式中, H为理论塔板高度; U为流动相流速; A、B、C为常数), 在一定的流速范围内, 流速减少, 柱效提高, 分离度变大, 但若流速过慢, 分析时间延长, 纵向扩散的影响变大, 柱效降低。虽然提高流速可缩短分析时间, 但若流速过高, 物质来不及分离就被洗出, 分离效果差, 而且会破坏泵头和色谱柱^[9]。因此, 流速的选择对分离度的影响也是很大的, 最终流速确定为1.0ml/min。

2.1.4 温度对分离度的影响

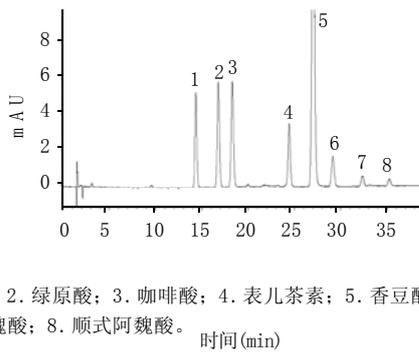
柱温会影响被测物质在固定相和流动相中的分配系数, 因此温度也是影响分离度的重要因素。实验发现, 随着柱温在一定的温度范围内的升高, 被测物质的保留时间减少, 分离度增大, 但柱温太高会破坏色谱柱, 因此为了使温度条件不受环境、季节变化的影响, 柱温可选择为30℃且保留时间可提前, 分析速度提高, 分离度和峰形无明显变化。

2.2 定性分析

2.2.1 标准溶液的配制

精确称取标准品各约20mg, 用三重水分别溶解定容到25ml, 得到每个标准品的标准溶液, 浓度分别为儿茶素52.0mg/L、表儿茶素44.0mg/L、绿原酸40.0mg/L、阿魏酸44.0mg/L、咖啡酸44.0mg/L、香豆酸60.0mg/L。使用时稀释成不同浓度梯度的标准使用液。标准溶液不使用时放于4℃冰箱中冷藏保存。

2.2.2 标准品的测定



1. 儿茶素; 2. 绿原酸; 3. 咖啡酸; 4. 表儿茶素; 5. 香豆酸; 6. 杂质; 7. 反式阿魏酸; 8. 顺式阿魏酸。

图1 新配混合酚类标准溶液的分离子谱图

Fig.1 Chromatogram of phenolic compounds of fresh standard solution

分别取 1ml 的标准溶液混合后, 准备进样分析, 得到其标准溶液的分离子谱图, 如图。

从色谱图 1 可以看出, 儿茶素、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸、反式阿魏酸和顺式阿魏酸的保留时间分别为 14.317、16.753、18.289、24.428、27.048、32.391、35.398min。而且由 2.1 确定的色谱条件能很好的把几种标准品给分开, 分离效果好并且峰形也比较好。

2.3 回归方程、相关系数及检出限的确定

根据信噪比 $S/N=3$, 测得各组分最低检测浓度, 以最低检测限的 4 倍浓度作为回归曲线的第一点, 加倍选取浓度测定 7 个点, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制曲线进行线性回归, 计算相关系数, 结果见表 1。从表 1 中可见, 在此测定条件下, 每种物质在其线性范围内都有很好的线性关系, 相关系数 R^2 均大于 0.9999, 检测限也比相关的文献值低^[10-11]。

表 1 回归分析、相关性系数、线性范围和检测限

Table 1 Regression analysis, linear range, correlation coefficient and detection limit

酚类物质	回归方程	相关性系数(R^2)	线性范围(mg/L)	检测限(mg/L)
儿茶素	$A=24.33C+0.23$	0.9999	0.09~34.7	0.02
绿原酸	$A=8.33C-0.14$	0.9999	0.07~26.7	0.03
咖啡酸	$A=32.83C+0.17$	0.9999	0.07~29.3	0.01
表儿茶素	$A=25.00C-0.04$	0.9999	0.07~29.3	0.02
香豆酸	$A=65.82C-1.13$	0.9999	0.10~40	0.007
阿魏酸	$A=24.58C-0.43$	0.9999	0.07~29.3	0.015

2.4 回收率实验及精密度

准确量取 2 份相同的果汁, 其中一份加入多酚类标准物质, 按确定的色谱条件进行分离, 每份样品平行测定 3 次, 由标准工作曲线计算样品的浓度并与标准比较得到回收率和精密度, 结果见表 2。由表 2 可知, 本法的回收率在 94.3%~104% 之间, RSD 为 0.7%~1.7%, 比相关文献中的值要小的多^[9], 精密度更高, 结果更准确。因此, 本方法用于同时测定苹果浓缩汁中流中酚类物质的含量, 简单、快速、可靠, 可行性高。

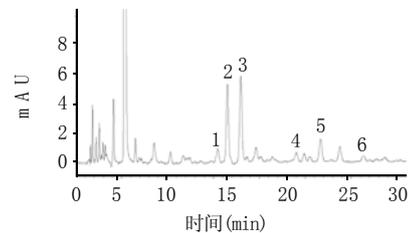
表 2 精密度及回收率的测定

Table 2 Determination of precise and recovery

酚类物质	加入量 (mg/L)	样品含量 (mg/L)	检出量 (mg/L)	回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD) (%)
儿茶素	8.66	0.276	9.20	103	0.9
绿原酸	6.66	11.3	17.6	94.3	0.8
咖啡酸	7.32	1.30	8.92	104	1.7
表儿茶素	7.32	2.01	9.42	101	0.7
香豆酸	10	0.756	10.7	99.8	0.7
阿魏酸	7.32	0.114	7.60	102	1.1

2.5 实际样品的分析结果

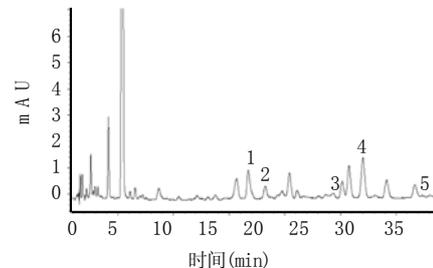
按照 1.3 中样品的前处理方法处理待测样品, 按照 1.4 的测定方法进行进样分析, 鲁加 1 号和鲁加 5 号苹果的浓缩汁样品的色谱图如图 2 和图 3 所示, 分析结果见表 3。



1. 儿茶素; 2. 绿原酸; 3. 咖啡酸; 4. 表儿茶素; 5. 香豆酸; 6. 阿魏酸。

图 2 鲁加 1 号苹果浓缩汁的色谱分离图

Fig.2 Chromatograms of apple juice concentrate of Lujia 1 samples



1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 表儿茶素; 4. 香豆酸; 5. 阿魏酸。

图 3 鲁加 5 号苹果浓缩汁的色谱分离图

Fig.3 Chromatograms of apple juice concentrate of Lujia 5 samples

表 3 鲁加 1 号、5 号苹果的浓缩汁中酚类物质含量

Table 3 Content of phenolic compounds in apple juice concentrate of Lujia 1 and Lujia 5

品种	儿茶素	绿原酸	咖啡酸	表儿茶素	香豆酸	阿魏酸
鲁加 1 号	0.048	10.704	2.745	1.986	0.792	0.036
鲁加 5 号	未检出	2.805	0.293	0.168	0.479	0.0277

结果显示, 鲁加 1 号苹果浓缩汁中含有儿茶素、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸、阿魏酸六种酚类物质, 而鲁加 5 号苹果浓缩汁中不含有儿茶素或者其含量非常的少, 在本实验中没有检测到其存在, 只检

测到绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸、阿魏酸五种酚类物质。并且,这六种酚类物质在鲁加1号苹果浓缩汁中的含量均大于其在鲁加5号苹果浓缩汁中的含量,尤其是鲁加1号苹果浓缩汁中绿原酸、咖啡酸和表儿茶素三种酚类物质的含量远远大于其在鲁加5号苹果浓缩汁中的含量。但是,从色谱图中可以看出两种样品在5~6min之间都出现了一种含量非常高的物质的色谱峰,但具体是哪种物质在本实验中并未作具体的研究,还有待进一步的研究。

3 结论

3.1 本实验建立了一种利用高效液相色谱法测定苹果浓缩汁中酚类物质的方法,采用甲醇-1%乙酸水溶液为流动相,进行梯度洗脱,能将几种酚类物质完全分离,该方法准确、可靠、重现性好。

3.2 在此条件下测定,得出鲁加1号苹果浓缩汁中含有六种酚类物质,即儿茶素、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸和阿魏酸,含量均比较高;而鲁加5号苹果浓缩汁中主要含有绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、香豆酸和阿魏酸五种酚类物质,且含量均比鲁加1号苹果浓缩汁中的含量低。

3.3 本实验确定了鲁加1号、鲁加5号苹果浓缩汁种酚类物质的种类和含量,为进一步分析其在加工及贮藏过程中酚类物质对混浊和褐变等的影响奠定了一定的基础

数据。

3.4 在鲁加1号和鲁加5号样品中出现的含量非常高的未知物质,有待研究人员进行更深入的分析研究。

参考文献:

- [1] SOCHOBINGER U, BARBIC I, DUERR P, et al. Phenolic compounds in apple juice-positive and negative effects [J]. *Fruit Processing*, 1995, 5(6): 171-172.
- [2] 郝慧英, 赵光鳌. 苹果酒中多酚及其褐变[J]. *酿酒*, 2002, 29(2): 63-65.
- [3] 戚向阳, 陈福生, 陈维军. 苹果多酚抑菌作用的研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(5): 33-36.
- [4] 孙承锋, 杨建荣, 贺红军. 苹果多酚对鲜肉类色泽稳定性及脂肪氧化的影响[J]. *食品科学*, 2005, 26(9): 153-157.
- [5] LUY, FOOLY. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace [J]. *Food Chem*, 2000, 68: 81-85.
- [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): 397-400.
- [7] 宋冰冰, 金立德, 刘明, 等. 苹果提取物抑制肝癌细胞系生长的实验性研究[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2003, 17(2): 94-96.
- [8] PODESEDEK A, WILSKA-JESZKA J, ANDERS B, et al. Compositional characterization of some apple varieties [J]. *Eur Food Res Technol*, 2000, 210(4): 268-272.
- [9] 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): 185-191.
- [10] 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.
- [11] 易湘西, 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.
- [12] 杨建荣. 苹果多酚的高效液相色谱检测方法的建立[D]. 济南: 山东大学, 2006.