

# 苹果多酚的固相萃取纯化研究

贺金娜<sup>1</sup>, 曹 栋<sup>1\*</sup>, 史苏佳<sup>2</sup>

(1.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;

2.江南大学理学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:**研究了用固相萃取法纯化, 高效液相色谱法测定苹果中多酚类物质的方法。以苹果冻干粉为原料, 加标回收率为指标, 从四种固相萃取小柱中筛选出分离效果较好的Waters Oasis HLB固相萃取小柱对提取液进行预处理。以phenomenex Luna C<sub>18</sub>色谱柱(150mm×4.6mm, 5μm)为固定相, 以0.1%的甲酸溶液(v/v)和乙腈为流动相梯度洗脱, 紫外双波长扫描280、320nm条件下检测。结果: 检测出七种中性多酚, 三种酸性多酚。加标回收率为95%~104%, 相对标准偏差均小于2.2%。结论: 该方法快速、灵敏、简便、准确, 杂质干扰少, 10种多酚类物质峰分离度好。

**关键词:** 高效液相色谱, 固相萃取, 苹果, 多酚

## Study on solid phase extraction in the purification of apple polyphenols

HE Jin-na<sup>1</sup>, CAO Dong<sup>1\*</sup>, SHI Su-jia<sup>2</sup>

(1.School of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.School of Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** A method of solid phase extraction combined with HPLC determination of polyphenols in apple was studied. Taking apple lyophilized powder as raw material, recovery of the polyphenols as the measure indicators, Waters Oasis HLB was screened out from four kinds of solid phase minicolumns to purify the apple extract. Gradient elution was carried out on the chromatographic column phenomenex Luna C<sub>18</sub> (150mm×4.6mm, 5μm) with the mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution(v/v) and acetonitrile. Under these conditions, the components of apple polyphenols can be perfectly separated. An UV-detector was used for recording the chromatographic peaks of the apple polyphenols at 280nm and 320nm. The results showed that polyphenols in apple were seven kinds of neutral polyphenols and three kinds of acidic polyphenols, the recovery of the polyphenols was in the range of 95%~104% and RSD were lower than 2.2%. This method was rapid, sensitive, simple, accurate and less impurity interference, and ten kinds of polyphenols peaks were separated well.

**Key words:** high performance liquid chromatography; solid phase extraction; apple; polyphenols

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)16-0290-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.16.055

苹果多酚是苹果中具有苯环并结合多个羟基的化学物质的总称。研究表明, 苹果多酚具有清除自由基、抗氧化、预防癌症、降血压、预防心脏病、抗龋齿、抗过敏、抗病毒等80多种生理功能, 因此在医药、食品、日用化工等领域具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。

苹果中的多酚物质主要包括黄烷-3-醇类、黄酮醇类、羟基苯甲酸类、二氢查尔酮类、花色苷类等五类<sup>[2-4]</sup>。苹果中多酚类物质的测定方法主要采用高效液相色谱法, 但有机溶剂萃取得到的粗提物中苹果多酚的纯度较低, 影响检测结果。传统的液相色谱法样品前处理方法, 费时费力, 纯化效果不理想, 而且过程中容易造成多酚类物质的损失。固相萃取技术

是近年来兴起的一项广泛应用的样品前处理技术<sup>[5-6]</sup>, 通过选择不同的固定相与流动相进行多种搭配组合, 实现对目标组分与杂质之间的高选择性分离。

本研究从Strata C<sub>18</sub>-E、Waters Oasis HLB、DIKMA ProElut PWA、Strata-X-AW四种固相萃取小柱中筛选出预处理效果最好的固相萃取小柱对苹果多酚提取液进行纯化, 高效液相色谱方法分离测定苹果多酚, 取得满意结果。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与amp;仪器

(+)-儿茶素、对香豆酸、鞣花酸、咖啡酸、异槲皮素、阿魏酸 购于Sigma公司; 根皮素、根皮苷、(-)-表儿茶素、绿原酸、没食子酸、槲皮素、槲皮苷、芦丁、原花青素B 购于北京北纳创联生物技术研究院; 甲醇、乙腈、甲酸、氨水、醋酸铵 均为色谱纯; 乙醇、乙酸乙酯、盐酸、氢氧化钠 均为分析纯; 红富士苹果

收稿日期: 2013-12-03 \* 通讯联系人

作者简介: 贺金娜(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事苹果多酚方面的研究。

市售。

Waters 1525 高效液相色谱仪、Waters 2489 紫外检测器 Waters 公司；phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱 (150×4.6mm, 5μm) Phenomenex 公司；日本日立 CR21GIII 高速低温冷冻离心机 日立公司；Forma-86C 超低温冰箱 美国 Thermo 公司；LGJ-18 型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂；ND100-1 氮气吹干仪 杭州瑞诚仪器有限公司；JJ-2 组织捣碎匀浆机 常州国华电器有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 标准溶液的配制** 准确称取儿茶素、表儿茶素、芦丁、异槲皮素、鞣花酸、根皮苷、槲皮素、槲皮苷、根皮素、原花青素 B<sub>2</sub>、没食子酸、绿原酸、对香豆酸、阿魏酸、咖啡酸各 10mg，用甲醇分别溶解并定容至 10mL，得到 1000μg/mL 标准品溶液。分别移取儿茶素 2.5mL、表儿茶素 2.5mL、芦丁 2.5mL、异槲皮素 7.5mL、根皮素 0.25mL、根皮苷 0.25mL、槲皮素 1.25mL、槲皮苷 0.75mL、原花青素 B<sub>2</sub> 0.25mL 混合定容至 25mL，得到中性多酚混合标准溶液。分别移取鞣花酸 2.5mL、没食子酸 0.625mL、绿原酸 0.75mL、对香豆酸 0.625mL、阿魏酸 0.5mL、咖啡酸 0.25mL 混合定容至 25mL，得到酸性多酚混合标准溶液。标准品溶液 4℃ 冰箱中冷藏备用。

**1.2.2 样品的制备** 将新鲜的苹果去核切块，按 100mL NaF (5g/L) 对应 1kg 水果的配比将 NaF 水溶液加入其中<sup>[7]</sup>，而后加入到组织捣碎匀浆机中打浆 1min，将苹果浆置于 -72℃ 下冷冻一夜，之后进行冷冻干燥。干燥后的苹果粉末真空包装放置在 -18℃ 下保藏待用。

准确称取 10g 苹果冻干粉两份分别置于两个 250mL 平底烧瓶中——加标瓶和空白瓶，加标瓶中加入中性多酚混合标准溶液、酸性多酚混合标准溶液各 5mL，空白瓶中都不加。两瓶中各加入 100mL 70% 的乙醇，在 60℃ 超声下浸提 20min，过滤得到苹果渣，重复一次上述浸提步骤。分别合并浸提液后冷却，将冷却后的浸提液在 9000r/min 下离心 10min，取上清液备用。

**1.2.3 色谱条件** phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱 (150×4.6mm, 5μm)；柱温：30℃；流动相：A 为 0.1% 甲酸溶液，B 为乙腈，线性梯度洗脱，0~5min：流动相 A=85%，5~25min：流动相 A：85%~50%，25~35min：流动相 A：50%~0%，35~40min：流动相 A=0%，40~41min：流动相 A：0%~85%，41~45min：流动相 A=85%。流速：中性多酚 1mL/min，酸性多酚 0.8mL/min；进样量：10μL；检

测波长：中性多酚 280nm，酸性多酚 320nm。

**1.2.4 标准曲线和检测限** 在已经确定的色谱条件下，分别将不同浓度梯度的各种中性多酚的标准溶液：儿茶素、表儿茶素、原花青素 B<sub>2</sub>、槲皮素、异槲皮素、槲皮苷、根皮素、根皮苷、芦丁，以及不同浓度梯度的各种酸性多酚的标准溶液：绿原酸、咖啡酸、没食子酸、鞣花酸、阿魏酸、对香豆酸进行 HPLC 分析，根据标准物质的浓度和峰面积的关系进行线性回归，同时根据信噪比 S/N=3，测得各组分最低检测浓度。

**1.2.5 固相萃取小柱筛选** 从加标瓶、空白瓶中各取出四份相同体积的苹果多酚提取液进行纯化处理，方法见表 1。得到八种洗脱液氮吹至干。分别进行如下操作：加入蒸馏水 20mL 溶解，用 1mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0，转移到分液漏斗中，加入 20mL 乙酸乙酯，摇动 10min，分离出酯相和水相，酯相氮吹至干溶于 1mL 甲醇中，此为中性多酚。水相用 6mol/L 的 HCl 溶液调节 pH 至 2.0，再加入 20mL 乙酸乙酯萃取。分离出酯相和水相，酯相氮吹至干，重新溶解于 1mL 的甲醇中，此为酸性多酚。在已经确定的色谱条件下，对于以上操作得到的 16 个多酚样品进行 HPLC 分析。加标样扣除相对应空白样基准后得到加入标准的测出量，加入标准的测出量除以标准加入量计算加标回收率，平行测定三次取平均值，计算标准偏差和相对标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线和检测限

按 1.2.4 方法得到标准曲线和检测限，结果见表 2。

### 2.2 固相萃取小柱筛选

按 1.2.5 方法得到四种固相萃取小柱对于各种多酚的加标回收率，结果见表 3、表 4。

由表 3、表 4 结果可以看出，对于中性多酚而言，Strata C<sub>18</sub>-E 和 Waters Oasis HLB 回收率要远高于 DIKMA ProElut PWA 和 Strata-X-AW，Strata C<sub>18</sub>-E 和 Waters Oasis HLB 回收率结果不相上下。而对于酸性多酚而言，DIKMA ProElut PWA 和 Strata-X-AW 的回收率则高于前面两种小柱，Strata C<sub>18</sub>-E 和 Waters Oasis HLB 比较的话，前者对于酸性多酚的回收率要略低一点。综合考虑中性多酚和酸性多酚两大类，Waters Oasis HLB 固相萃取小柱对于苹果多酚的处理效果更好，故选择 Waters Oasis HLB 固相萃取小柱作为苹果多酚粗提取液纯化处理柱。

### 2.3 Waters Oasis HLB 固相萃取小柱纯化效果

酸性多酚和中性多酚的标准溶液的色谱图见图 1。

表 1 四种固相萃取小柱处理样品方法

Table 1 Sample processing method of four kinds of solid phase extraction minicolumn

|    | Strata C <sub>18</sub> -E | Waters Oasis HLB | DIKMA ProElut PWA    | Strata-X-AW          |
|----|---------------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| 活化 | 甲醇 5mL                    | 甲醇 5mL           | 甲醇 5mL               | 甲醇 5mL               |
| 平衡 | 70% 乙醇 5mL                | 70% 乙醇 5mL       | 2% 甲酸水溶液 5mL         | 2% 甲酸水溶液 5mL         |
| 上样 | 提取液 10mL                  | 提取液 10mL         | 提取液 10mL             | 提取液 10mL             |
| 淋洗 | 蒸馏水 5mL                   | 蒸馏水 5mL          | 2% 甲酸水溶液 5mL, 甲醇 5mL | 25mM 醋酸铵 5mL, 甲醇 5mL |
| 洗脱 | 甲醇 10mL                   | 甲醇 10mL          | 5% 氨水甲醇溶液 10mL       | 5% 氨水甲醇溶液 10mL       |

表2 回归方程、相关系数及检测限

Table 2 Regression equation, correlation coefficient and detection limit

| 组分                 | 回归方程              | 相关系数   | 最低检出限 (ng/mL) |
|--------------------|-------------------|--------|---------------|
| 儿茶素                | A=2824.2C+1.34    | 0.9991 | 110           |
| 原花青素B <sub>2</sub> | A=27140.46C+3.18  | 0.9993 | 18            |
| 表儿茶素               | A=6429.86C+2.58   | 0.9991 | 44            |
| 芦丁                 | A=3812.67C+2.18   | 0.9998 | 81            |
| 异槲皮素               | A=1001.9C+0.478   | 0.9996 | 366           |
| 槲皮苷                | A=15228.61C+2.29  | 0.9999 | 24            |
| 根皮苷                | A=21616.10C+0.721 | 0.9999 | 18            |
| 槲皮素                | A=8121.93C+0.462  | 0.9998 | 45            |
| 根皮素                | A=17613.12C+4.61  | 0.9996 | 15            |
| 没食子酸               | A=10985.79C+0.193 | 0.9999 | 24            |
| 绿原酸                | A=10264.79C+2.17  | 0.9999 | 49            |
| 咖啡酸                | A=38778.10C+3.21  | 0.9995 | 27            |
| 对香豆酸               | A=18248.52C+2.16  | 0.9990 | 18            |
| 阿魏酸                | A=28513.31C+5.81  | 0.9995 | 13            |
| 鞣花酸                | A=4562.13C+1.91   | 0.9998 | 110           |

注: A: 峰面积; C: 浓度 (μg/mL)。

未加标原提取液经真空浓缩至干,用甲醇重新溶解后的色谱图见图2。未加标提取液经Waters Oasis HLB固相萃取小柱预处理后的色谱图见图3。对比图2和图3可知,未经处理的苹果多酚提取液的色谱图中杂质峰很多,无法确定有哪些多酚物质。固相萃取小柱处理之后,大部分杂质峰不再出现,不会干扰检测。对比图3(A)与图1(A),可知苹果中中性多酚有表儿茶素、原花青素B<sub>2</sub>、芦丁、异槲皮素、槲皮苷、根皮苷、根皮素。对比图3(B)与图1(B),可知苹果中酸性多酚有咖啡酸、绿原酸、对香豆酸。

### 3 结论

3.1 本实验采用固相萃取处理样品,考察了不同种类固相萃取小柱的预处理效果。从中筛选出预处理效果较好的Waters Oasis HLB作为苹果多酚纯化柱。采用高效液相色谱法0.1%甲酸水溶液(v/v)-乙腈梯

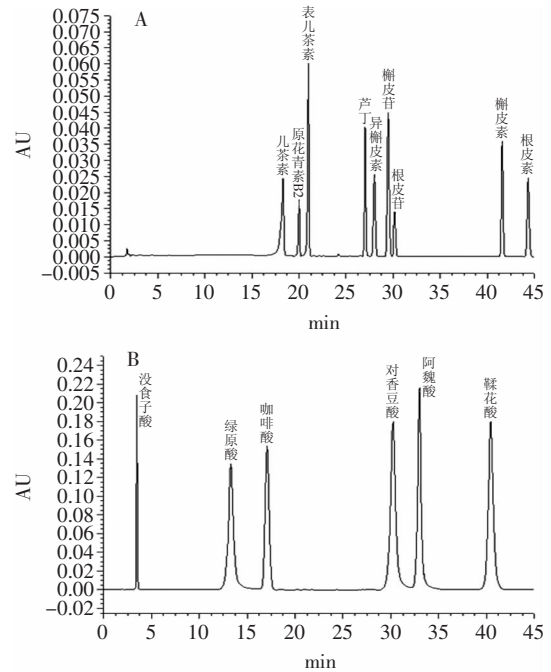


图1 多酚标准溶液HPLC图谱

Fig.1 Chromatogram of polyphenols standards

注: A: 中性多酚标准溶液; B: 酸性多酚标准溶液。

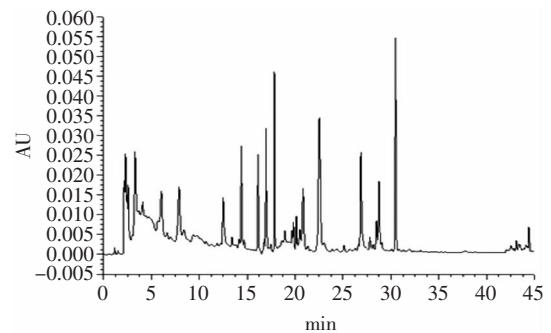


图2 未经固相萃取样品HPLC图谱

Fig.2 Chromatogram of sample without solid phase extraction processing

度洗脱。中性多酚、酸性多酚分别进行分析,两类多酚都得到了很好的分离。本方法简单快速、结果可

表3 中性多酚回收率(%)

Table 3 Recoverys of neutral polyphenols (%)

| 处理方法                      | 儿茶素      | 表儿茶素     | 原花青素B <sub>2</sub> | 槲皮素     | 异槲皮素    | 槲皮苷     | 根皮素     | 根皮苷     | 芦丁      |
|---------------------------|----------|----------|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Strata C <sub>18</sub> -E | 104±1    | 93±0.2   | 98±0.5             | 102±2   | 97±1.2  | 98±1.6  | 96±0.5  | 101±1   | 92±0.2  |
| Waters Oasis HLB          | 101±0.01 | 104±0.02 | 99±0.2             | 101±1   | 95±0.01 | 101±2.1 | 104±1.5 | 96±0.09 | 98±1    |
| DIKMA ProElut PWA         | 51±0.06  | 77±0.5   | 59±1.75            | 76±0.05 | 71±0.2  | 89±0.5  | 81±0.75 | 60±0.02 | 95±0.01 |
| Strata-X-AW               | 62±0.2   | 51±0.01  | 74±0.25            | 90±0.5  | 87±0.01 | 87±1.5  | 76±0.2  | 82±0.5  | 85±0.8  |

表4 酸性多酚回收率(%)

Table 4 Recoverys of acidic polyphenols (%)

| 处理方法                      | 绿原酸     | 咖啡酸     | 没食子酸     | 鞣花酸     | 阿魏酸      | 对香豆酸     |
|---------------------------|---------|---------|----------|---------|----------|----------|
| Strata C <sub>18</sub> -E | 90±1    | 84±0.3  | 99±0.25  | 92±0.4  | 89±0.01  | 91±1.2   |
| Waters Oasis HLB          | 99±0.8  | 96±0.05 | 97±0.5   | 98±0.5  | 101±0.01 | 104±0.6  |
| DIKMA ProElut PWA         | 101±0.5 | 99±0.15 | 108±0.01 | 99±1.25 | 102±0.5  | 101±0.03 |
| Strata-X-AW               | 104±1.5 | 107±0.4 | 104±0.15 | 98±0.5  | 99±0.2   | 104±1    |

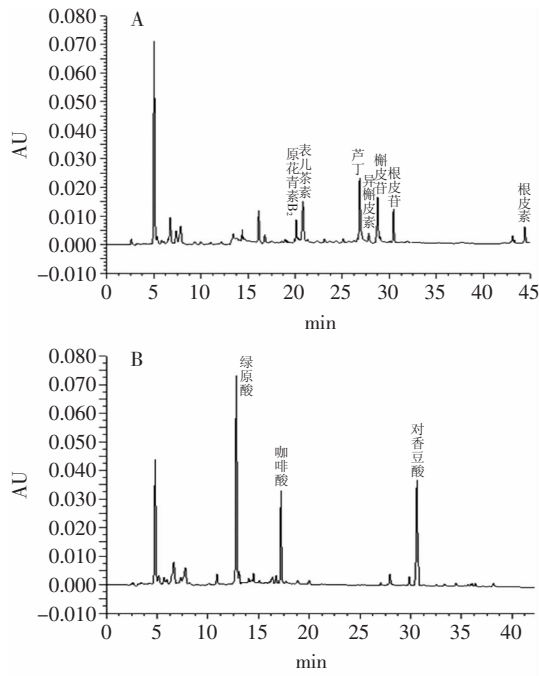


图3 经固相萃取样品HPLC图谱  
Fig.3 Chromatogram of samples with solid phase extraction processing  
注:A:中性多酚样品溶液;B:酸性多酚样品溶液。

靠,在一定程度上为苹果中多酚类物质研究提供了

依据。

3.2 红富士苹果中主要的多酚物质为原花青素B<sub>2</sub>、表儿茶素、芦丁、异槲皮素、槲皮苷、根皮苷、根皮素、绿原酸、咖啡酸、对香豆酸。

参考文献

[1] 杨薇,张旭,李景明. 苹果多酚功能及其作用机理的研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(1):193-196.  
[2] 庞伟,徐抗震,宋纪蓉. 苹果多酚结构及褐变研究进展[J]. 四川食品与发酵,2006,42(2):9-13.  
[3] Chagne D, Krieger C, Rassam M, et al. QTL and candidate gene mapping for polyphenolic composition in apple fruit[J]. BMC Plant Biology,2012,12(1):12-27.  
[4] Guyot S, Le Bourvellec C, Marnet N, et al. Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity[J]. Food Science and Technology,2002,35(3):289-291.  
[5] 周强,杨国荣,杨亚玲,等. 微柱高效液相色谱法测定苦荞中芦丁的研究[J]. 云南化工,2004,31(1):28-29.  
[6] 张海霞,朱彭龄. 固相萃取[J]. 分析化学,2000,128(9):1172-1180.  
[7] Bureau S, Scibisz I, Le Bourvellec C, et al. Effect of sample preparation on the measurement of sugars, organic acids, and polyphenols in apple fruit by mid-infrared spectroscopy[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2012,60(14):3551-3563.

(上接第289页)

参考文献

[1] 郑玉玺. 提高速溶红茶品质的技术研究[J]. 广州城市职业学院学报,2010,4(4):60-62.  
[2] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 第三版. 北京:中国农业出版社,2003.  
[3] Smith PF, Smith A, Miners J, et al. Report from the expert working group on the safety aspects of dietary caffeine[Z]. Australia:2000.  
[4] Rachima-Maoz C, Peleg E, Rosenthal T. The Effect of caffeine on ambulatory blood pressure in hypertensive patients[J]. American Journal of Hypertension,1998,11(12):1426-1432.  
[5] 周书,黄晶,鲍冲,等. 咖啡因致胎儿宫内发育迟缓机制的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2010,24(1):77-80.  
[6] Williams JH. Caffeine, neuromuscular function and high-intensity exercise performance[J]. The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness,1991,31(3):481.  
[7] Limadr. Caffeine and Health[M]. Brazil:Record Pub,1989:130.  
[8] 孙成,权启爱,金寿珍. 低咖啡因茶加工关键技术及设备的研究[J]. 茶叶科学,2003,23(6):68-72.  
[9] 陈正武译. 用Kangra地方茶树品种的鲜叶生产速溶茶及其品质评估[J]. 贵州茶叶,1995(1):37.  
[10] Sinija VR, Mishra N, Bal S. Process technology for production of soluble tea powder[J]. Journal of Food Engineering,2007,82

(3):276-283.

[11] 周琦. 鲜叶试制速溶茶初探[J]. 福建茶叶,1995(4):24-28.  
[12] 刘仲华,黄建安,王增盛,等. 儿茶素提制工艺技术研究[J]. 湖南农业大学学报,1997,23(6):537-542.  
[13] 施兆鹏,黄建安. 茶叶审评与检验[M]. 第四版. 北京:中国农业出版社,2010:159-160.  
[14] 黄椿鉴,傅虬声,李志达,等. 乌龙茶在浸提中温度和时间最佳决策研究[J]. 农业工程学报,1995(4):180-184.  
[15] 唐臣朝. 浅析高级绿茶的冲泡水温标准[J]. 城市技术监督,1991(3):32-33.  
[16] 刘淑娟,钟兴刚,李维,等. 绿茶三种冲泡方法及其特色的研究[J]. 茶叶通讯,2010,37(2):42-49.  
[17] 李洁. 白茶饮料加工中浸提工艺技术研究[D]. 福州:福建农林大学,2012.  
[18] 方元起,杨柳,白小佳. 茶饮料生产中茶乳酪形成因素的探讨[J]. 食品工业科技,1999,20(4):35-37.  
[19] 徐懿,屠幼英,钟小玉. 茶儿茶素异构化研究现状[J]. 中草药,2008,39(7):1106-1109.  
[20] 武永福,胡强,朱金山. 速溶茶浸提工艺研究进展[J]. 中国茶叶,2009(5):15-17.  
[21] 徐仲溪,王坤波,周跃斌,等. 沱茶生化成分与品质形成的关系[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2005,31(1):53-56.  
[22] 郭桂义. 信阳毛尖茶化学成分与品质关系初探[J]. 茶叶,2000,26(4):228-233.