

槟榔花提取物中没食子酸等 9 种 多酚类化合物的测定

张春梅^{1,2}, 黄玉林², 程芳芳^{2,3}, 王仁才^{1*}, 沈雁², 唐敏敏², 陈卫军^{2,4}

1 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128

2 中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339

3 桂林理工大学 化学与生物工程学院, 桂林广西 541004

4 海南省热带油料作物生物学重点实验室, 海南文昌 571339

摘 要 采用反相高效液相色谱-二极管阵列检测法(RP-HPLC-PAD)对槟榔花 3 种提取物中多酚类化合物的色谱分析条件进行优化, 分别探讨流动相的组成、流动相中醋酸浓度、醋酸与甲醇的比例和柱温对保留时间的影响, 确定梯度分离条件, 并对 3 种不同槟榔花提取物中多酚类化合物进行定量分析。结果表明, 3 种提取物中均含没食子酸、香豆酸、表儿茶素、阿魏酸、芦丁和柚皮素, 其中表儿茶素、没食子酸和香豆酸的含量相对较高。

关键词 反相高效液相色谱-二极管阵列检测法(RP-HPLC-PAD); 槟榔花提取物; 多酚

中图分类号 S567

文献标识码 A

Analysis of Nine Phenolic Compounds of Areca Inflorescence Extracts

ZHANG Chunmei^{1,2}, HUANG Yulin², CHENG Fangfang^{2,3}, WANG Rencai¹,
SHEN Yan², TANG Minmin², CHEN Weijun^{2,4}

1 College of Landscape and Horticulture, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128, China.

2 Institute of Coconut, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339, China

3 College of Chemistry and Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi 541004, China

4 Hainan Key Laboratory for Research of Tropical Palm Plants, Wenchang, Hainan 571339, China

Abstract The separation conditions of chromatography were optimized with a reversed-phase high performance liquid chromatographic photodiode array detection(RP-HPLC-PAD)method for the determination of nine polyphenols in three Areca inflorescences. The relationship of glacial acetic acid concentration in mobile phase and the retention time, the effects of mobile phase composition, flow phase and the proportion of methanol were discussed respectively. Then the influence of gradient separation conditions was established. At the same time, three Areca inflorescences extracts of phenolic compounds were quantitatively analyzed. The results showed that the three extracts all contained gallic acid, coumalic acid, epicatechin, fumatic acid, naringenin and rutin, in which the contents of epicatechin, gallic acid and coumalic acid were higher than others

Key words Areca inflorescences extracts; Polyphenols; Reversed-phase high performance liquid chromatographic photodiode array detection(RP-HPLC-PAD)

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2011.05.036

多酚类化合物是植物代谢过程中的产物, 广泛存在于水果、蔬菜中, 如葡萄、苹果、茶叶、葡萄柚、洋葱、茄子以及各种香辛料、谷物、豆类及果仁等^[1-4]中, 是人们每天从饮食中摄取的数量较多的抗氧化物质^[5]。大量研究结果表明, 植物多酚具有抗诱变、清除体内自由基、抗肿瘤、预防心血管疾病、抗癌、延缓机体衰老、抗氧化等生物活

性^[6-14], 因此, 在制药、生化、日化、食品以及精细化工等领域具有广阔的开发前景^[15]。

常用的酚类物质测定方法有紫外分光光度法^[16]、薄层色谱法^[17]、高效液相色谱法^[18]及毛细管电泳法等^[19], 其中高效液相色谱法以操作简单、准确度高、重复性好等优点被广泛用于多种多酚类化合物的含量^[18, 20]。槟榔位居中国四大南药之首, 槟榔花

收稿日期: 2011-02-25

修回日期: 2011-04-27

基金项目: 海南省自然科学基金(No. 310101), 海南省重点科技计划项目(090138)资助。

作者简介: 张春梅(1985年—), 女, 硕士。研究方向: 药用植物功能产品的开发与评价。*通讯作者: 王仁才, Email: wangrenc@163.com。

是槟榔的雄花蕾, 味淡, 性凉, 具有抑制脱氧核糖降解、调节免疫系统、抗炎降脂、延缓衰老等功效^[21-22]。目前, 国内外对槟榔花以及槟榔花中功效成分分离检测的研究未见报道。因此, 本文采用反相高效液相色谱-二极管阵列检测法(RP-HPLC-PAD)对槟榔花 3 种不同提取物中多酚类化合物的色谱条件进行优化, 旨在为槟榔花活性成分的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料及处理 槟榔花由海南省安定县翰林绿果槟榔专业合作社提供, 采收于 2010 年 4 月份, 60℃烘干备用。分别采用 100℃沸水浴提取 3 次, 每次 30 min; 超纯水常温提取 3 次, 每次 6 h; 95%的乙醇常温提取 3 次, 每次 6 h; 共 3 种不同的提取方法, 每种方法的提取液过滤后分别合并滤液, 15 000 r/min 离心 30 min, 旋转蒸发, 定容, 获得该方法提取物, 冷藏备用。

1.1.2 主要试剂与仪器 没食子酸、香豆酸、儿茶素、绿原酸、表儿茶素、芦丁、柚皮素、山奈素和阿魏酸等皆均购于美国 SIGMA 公司; 甲醇(HPLC 专用色谱纯试剂), 购于美国 TEDIA 有限公司; 纯净水(娃哈哈); 冰醋酸, 磷酸等均为分析纯。

5810R 冷冻高速离心机, 德国 Eppendorf 股份有限公司产品; UVLine 9400 紫外可见分光光度计, 德国 SCHOTT 仪器公司产品; HH-6 型数显恒温水浴锅, 上海康仪有限公司产品; R-210 旋转蒸发仪, 瑞士 BUCHI 公司产品; 超声波清洗机, 宁波海曙五方超声设备有限公司; 高效液相色谱仪(配二元泵和二极管阵列检测器), 日本岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS-SP 反相 C18 柱(0.5 μm, 4.6 mm×150 mm), 流动相为 3% 的冰醋酸水溶液(A)和甲醇(B), 采用多级线性梯度洗脱程序, 总流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30℃, 检测波长为 280 nm, 进样体积为 10 μL。洗脱程序: 0~6 min, B 为 10%~30%; 6~10 min, B 为 30%~70%; 10~15 min, B 为 70%~90%; 15~20 min, B 为 90%~100%, 20~25 min, B 为 100%~20%, 15~20 min, B 为 20%。

1.2.2 标准溶液的配制 将 9 种标准品用甲醇配制成 1 mg/mL 的标准品储备液, 4℃冷藏备用。取各储备液适量, 分别用甲醇配制成 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 系列的混合标准溶液。

1.2.3 提取物处理 分别量取 50 mL 槟榔花 3 种提取液, 旋转蒸发干后再分别用甲醇定容至 50 mL, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 4℃冷藏备用。

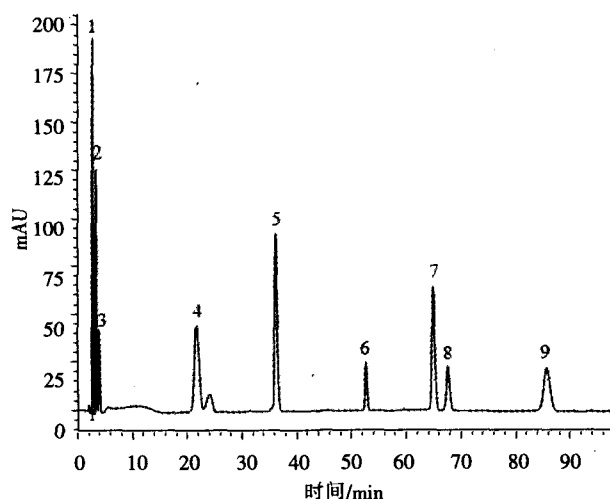
2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 流动相的选择 本试验对常用流动相甲醇-水进行考察发现峰拖尾现象比较严重, 可能是此条件下酚羟基易发生解离, 在固定相表面有双重的保留机制^[18, 20]。而在流动相中加入酸性抑制剂(如: 磷酸、冰醋酸)可以抑制酚酸的电离, 形成疏水缔合物, 能够改善分离效果和峰拖尾现象^[23-25]。因此, 选用磷酸水溶液-甲醇和醋酸水溶液-甲醇为流动相进行试验。

由于各组分之间极性差别较大, 等度洗脱无法达到分离要求。故采用梯度洗脱, 流动相甲醇从 5% 变化至 100%, 可使样品中各待测组分达到基线分离。

选用 2 mmol/L 的磷酸和甲醇作流动相, 洗脱程序为: 0~15~20~40~55~100 min, 甲醇浓度为 2%~10%~20%~30%~40%, 混合标准品分离图谱见图 1, 此种洗脱方法对标准品的分离效果较好, 但对提取物的分离效果不明显, 且此方法耗时过长, 故选用了其它流动相。



1. 没食子酸; 2. 香豆酸; 3. 儿茶素; 4. 绿原酸; 5. 表儿茶素; 6. 阿魏酸; 7. 芦丁; 8. 柚皮素; 9. 山奈素。

图 1 流动相为 2 mmol/L 磷酸-甲醇分离 9 种标准品色谱图

用 0.3%、1%、2%、3% 冰醋酸做流动相 A 进行试验(图 2 所示), 发现用 3% 冰醋酸-甲醇作流动相, 分离效果较好。因此, 选用 3% 冰醋酸-甲醇作流动相, 采用梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~6 min, B 为 10%~30%; 6~10 min, B 为 30%~

70%；10~15 min, B 为 70%~90%；15~2min, B 为 90%~100%，20~2 min, B 为 100%~20%，15~20 min, B 为 20%。

2.1.2 流动相流速 考察 0.5、0.8、1.0、1.2 mL/min 4 个流速，发现 1.0 mL/min 时出峰效果最好，故确定流速为 1.0 mL/min。利用优化后的条件所得标准品的 HPLC 图谱见图 2 所示，所有组分在 17 min 内得以完全分离。

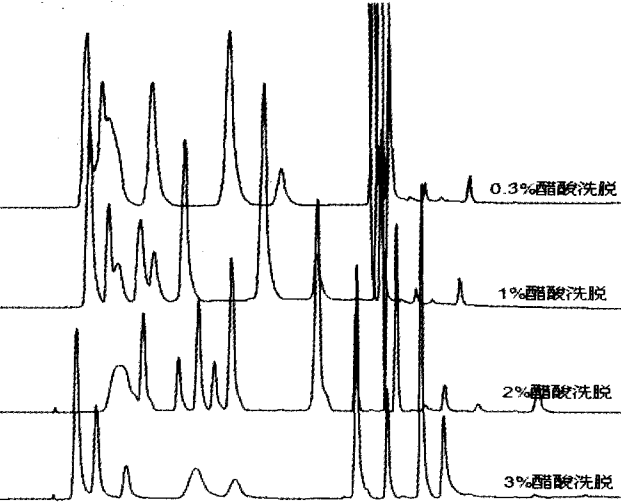


图 2 不同浓度冰醋酸作流动相分离 9 种标准品色谱图

2.1.3 测定波长的选择 9 种多酚类标准品用紫外二极管阵列检测器在 200~400 nm 波长扫描(图 3)发现，在 280 nm 处均有最大或较大吸收峰且 9 种标准品均达到了基线分离。因此，本试验选取 280 nm 作为检测波长。

2.2 线性关系和检测限

在上述色谱条件下，9 种待测化合物在 0.02~0.1 mg/mL 范围内的峰面积与其质量浓度之间的线性方程、相关系数(r)及检测限(LOD)见表 1，其中检测限以信噪比为3(S/N=3)的标准进行计算。可以看出，各组分的相关系数均在 0.999 以上，检测限

在 0.08~0.29 mg/L 之间。

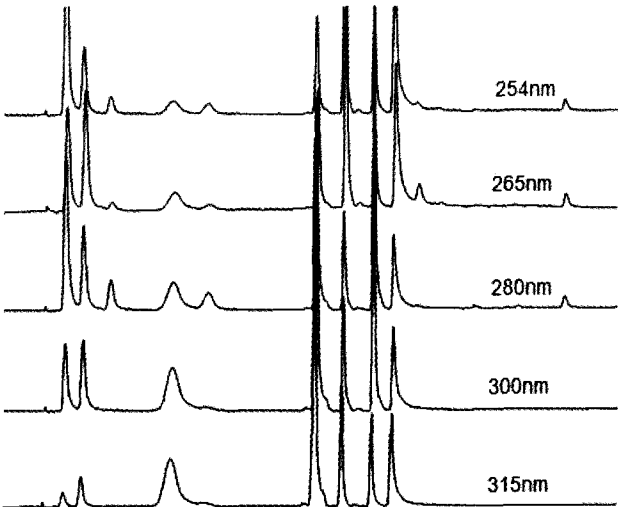


图 3 不同波长下 9 种标准品色谱图

2.3 回收率测定

向 3 种提取物中定量添加各标准品的混合标准溶液，依上述方法进行 HPLC 测定，按加标回收率的方法计算。由表 2 可知，各标准品的回收率在 87%~103% 之间。

加标回收率= (实测值-样品中含量)×100%/添加量。

2.4 提取物测定

用以上确定的 HPLC 条件对 3 种提取物中多类物质进行定性和定量检测，其图谱见图 4。将标准品与提取物比较可知，本试验检测出槟榔花沸水提取物(BWE)、冷水提取物(AWE)和乙醇提取物(EE)的总酚含量分别为：0.6236、0.5893、0.3146 mg/mL，3 种提取物中均含没食子酸、香豆酸、表儿茶素、阿魏酸、芦丁和柚皮素等 6 种多酚类物质，但其含量不尽相同，其中表儿茶素、没食子酸和香豆酸的含量相对较高(表 3)。3 种提取物中多酚类化合物组分

表 1 9 种标准品的线性方程、相关系数、线性范围和检测限

化合物	标准曲线(Y)	相关系数(r)	线性范围/(mg/mL)	检测限/(mg/L)
没食子酸	$2.9324 \times 10^{-5}X + 6.1922$	0.9991	0.02~0.1	0.1975
香豆酸	$5.2269 \times 10^{-5}X + 3.1838$	0.9994	0.02~0.1	0.2221
儿茶素	$1.2995 \times 10^{-4}X + 4.8765$	0.9995	0.02~0.1	0.2939
绿原酸	$6.1611 \times 10^{-5}X + 6.0348$	0.9996	0.02~0.1	0.2569
表儿茶素	$1.3560 \times 10^{-5}X + 5.1253$	0.9996	0.02~0.1	0.0844
阿魏酸	$2.5196 \times 10^{-5}X + 4.0405$	0.9998	0.02~0.1	0.1047
芦丁	$1.1416 \times 10^{-4}X + 3.9133$	0.9999	0.02~0.1	0.0581
柚皮素	$2.8698 \times 10^{-5}X + 3.8358$	0.9998	0.02~0.1	0.1067
山奈素	$4.7850 \times 10^{-5}X + 6.1912$	0.9991	0.02~0.1	0.0998

说明：线性方程中 Y 为峰面积，X 为浓度(mg/mL)。

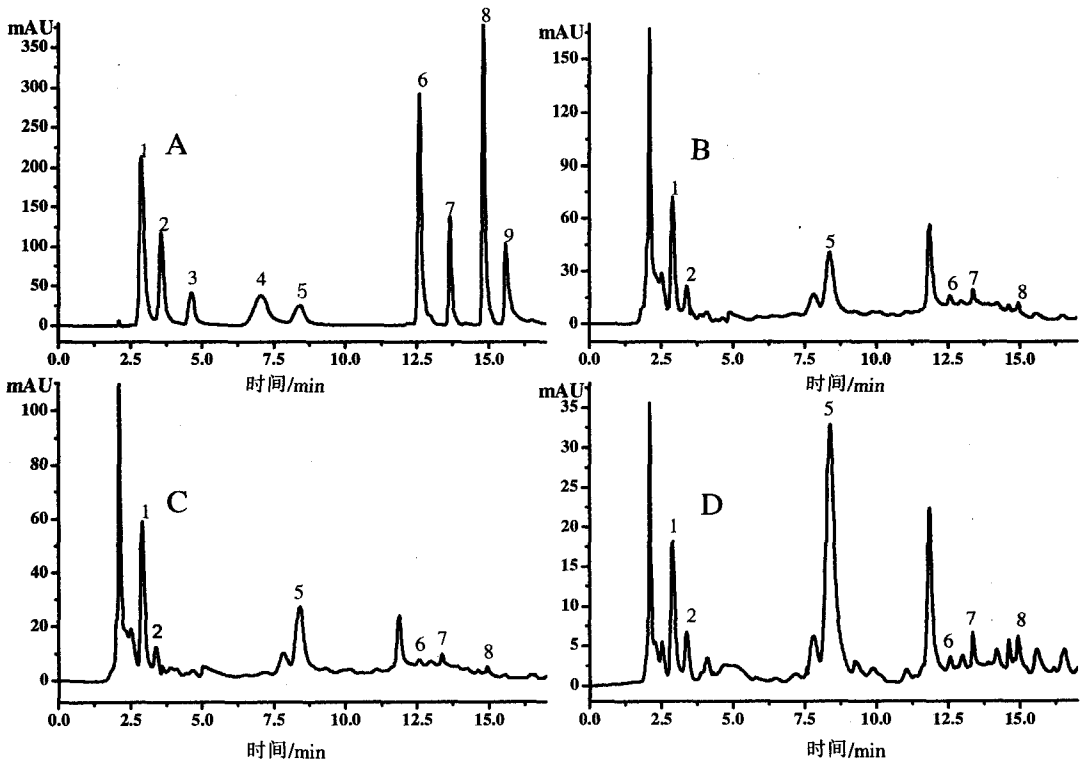
表 2 9 种标准品精密度和加标回收率

化合物	样品/(mg/mL)	添加量/(mg/mL)	回收量/(mg/mL)	回收率/%
没食子酸	0.040 5	0.1	0.137 3	96.81
香豆酸	0.038 0	0.05	0.089 5	103.02
儿茶素	—	0.1	0.096 0	96.02
绿原酸	—	0.1	0.087 2	87.25
表儿茶素	0.129 8	0.1	0.231 2	101.42
阿魏酸	0.006 8	0.1	0.105 5	98.65
芦丁	0.008 6	0.1	0.098 6	89.96
柚皮素	0.004 5	0.1	0.096 1	91.54
山奈素	—	0.1	0.091 8	91.76

表 3 槟榔花 3 种提取物中各组分含量 (mg/mL)

样品	没食子酸	香豆酸	表儿茶素	阿魏酸	柚皮素	芦丁
BWE	0.040 5±0.000 5 a	0.038 0±0.000 3 a	0.129 8±0.000 2 a	0.006 8±0.000 8 a	0.013 3±0.000 1 b	0.005 3±0.000 2 a
AWE	0.031 6±0.000 1 b	0.024 7±0.000 2 b	0.085 4±0.000 6 b	0.003 1±0.000 1 b	0.014 4±0.000 6 a	0.003 8±0.000 4 c
EE	0.008 6±0.000 6 c	0.009 2±0.000 2 c	0.127 7±0.002 3 a	0.001 8±0.000 8 c	0.008 2±0.000 4 c	0.004 4±0.000 7 b

说明：表中不同字母表示差异显著 ($p<0.05$)。



A. 标准品; B. 沸水提取物; C. 冷水提取物; D. 乙醇提取物
1. 没食子酸; 2. 香豆酸; 3. 儿茶素; 4. 绿原酸; 5. 表儿茶素; 6. 阿魏酸; 7. 芦丁; 8. 柚皮素; 9. 山奈素。

图 4 标准品和各提取物色谱图

和含量的不同可能与其提取方法有关, 槟榔花沸水提取物中主要酚类化合物表儿茶素、没食子酸和香豆酸的含量均高于冷水提取物和乙醇提取物的, 表明高温对槟榔花中多酚类化合物的影响较小, 因此沸水提取是一种经济有效的提取方法。

3 讨论

本试验采用梯度洗脱法建立了用高效液相色谱法测定槟榔花多酚类物质的方法, 采用 3% 冰醋酸-甲醇为流动相, 能将几种酚类物质完全分离, 该方法准确可靠, 且重现性好。

在此条件下测定槟榔花3种提取物中均含6种多酚类物质: 没食子酸、香豆酸、表儿茶素、阿魏酸、芦丁和柚皮素, 但其含量各不相同。其中除柚皮素外, 沸水提取物中其它各组分均高于冷水提取物和乙醇提取物; 在3种提取物中, 表儿茶素、没食子酸和香豆酸的含量都相对较高, 而阿魏酸和柚皮素的含量均较低。本研究发现, 槟榔花沸水提取物中主要多酚类物质均高于冷水提取物和乙醇提取物, 说明槟榔花中多酚类物质对高温不敏感, 沸水提取法是一种经济、行之有效、值得推广的槟榔花提取方法。

张兴等从槟榔果实中分离鉴定了异鼠李素、金圣草黄素、木犀草素、(±)-4', 5'-二羟基-3', 5', 7-三甲氧基黄烷酮和巴西红厚壳素5个酚类成分^[2]; Chin-Kun Wang等用交联葡聚糖法从槟榔果实中分离出单宁和非缩合单宁^[2]; 另有报道显示, 槟榔果实中含有较丰富的儿茶素、表儿茶素和花青素等酚类物质^[2], 本试验鉴定出了表儿茶素, 与上述研究结果一致, 但未能鉴定出儿茶素可能与试验条件有关。

由于试验条件限制, 提取物中还有几种含量较多的成分未能被鉴定, 推测可能为单宁或花青素中的一种或几种, 尚需进一步研究论证。本研究检测出的槟榔花中多酚类物质的种类和含量, 为评价槟榔花及槟榔花产品质量提供科学依据。

参考文献

- [1] Peter M, Abuja Michael Murkovic, Werner P fannhauser. Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in Low-Density Lipoprotein Oxidation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46: 4 091-4 096.
- [2] Debra A, Pearson Christine H, Tan J, *et al.* Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation[J]. *Life Sciences*, 1999, 21: 1 913-1 920.
- [3] Rosa M, Lamuela-Raventós. Detection of dietary antioxidant phenolic compounds in human LDL [J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45: 1 870-1 872.
- [4] Stephanie A, Dillon Rajpal S, Burmi Gordon M, *et al.* Antioxidant properties of aged garlic extract: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein [J]. *Life Sciences*, 2003, 7: 1 583-1 594.
- [5] Robert E C W. Handbook of nutraceuticals and functional foods[M]. CRC Press, 2001: 236-247.
- [6] Salah N, Miller N J, Paganga G, *et al.* Polyphenolic flavonols as scavenger of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1995, 2: 339-346.
- [7] Hertog M G L, Sweetnam P M, Fehily A M, *et al.* Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a welsh population of men: the Caerphilly study [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1997, 65: 1 489-1 494.
- [8] Hertog M G L, Hollman P C H, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41: 1 242-1 246.
- [9] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance [J]. *Nutrition Research*, 1998, 56: 317-333.
- [10] Saura-Calixto F. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46: 4 303-4 306.
- [11] Stampfer M J, Hennekens C H, Manson J E, *et al.* Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women[J]. *New England journal of medicine*, 1993, 328: 1 444-1 449.
- [12] Middleton E, Kandaswamy C, Theoharides T C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer[J]. *Pharmacol. Re.* 2000, 52: 673-751.
- [13] Hertog M G L, Potential health effects of the dietary flavonoid quercetin[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1996, 50:63-66.
- [14] Benavente-Garcia O. Use and properties of citrus flavonoids[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45: 4505-4515.
- [15] 宋立江, 狄莹, 行碧, 等. 植物多酚研究与利用的意义及发展趋势[J]. *化学发展*, 2000, 12: 161-170.
- [16] 张向前, 陈宗礼, 杨选文, 等. 陕北红枣中酚类物质的紫外光谱分析[J]. *中国农学通报* 2010, 26(24): 83-88.
- [17] 刘纪红, 严守莲. 藕多酚薄层层析分离鉴定研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(15): 6 307-6 308.
- [18] 李福娟, 蔡文生, 邵学广. 反相高效液相色谱法分离测定烟草中的多酚类物质[J]. *色谱*, 2007, 25(4): 565-568.
- [19] 傅亮, 楚清脆, 黄宝康, 等. 毛细管电泳-电化学检测法测定蜘蛛香中多元酚类化合物[J]. *分析化学*, 2003, 33(2): 161-164.
- [20] 李永库, 李晓静, 欧小辉. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定葡萄酒中没食子酸等8种多酚类化合物[J]. *食品科学*, 2008, 29(4): 283-286.
- [21] 何和明. 槟榔、益智、绞股蓝的生理生态[M]. 上海: 同济大学出版社, 1996: 240-257.
- [22] 张春梅, 沈雁, 葛畅, 等. 槟榔花提取物对羟基自由基诱导脱氧核糖降解的保护作用[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(6): 949-953.
- [23] 李永库, 李晓静, 欧小辉. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定葡萄酒中没食子酸等8种多酚类化合物[J]. *食品科学*, 2008, 29(4): 283-286.
- [24] 李忠, 王岚, 杨光宇, 等. 固相萃取和高效液相色谱法测定烟草中的苯酚和儿茶酚[J]. *分析化学*, 2001, 29(12): 1409-1411.
- [25] 庄亚东, 张映, 王芳, 等. 卷烟中多酚类物质的分析[J]. *烟草科技*, 2004(1): 23-26.
- [26] 张兴, 梅文莉, 戴好富, 等. 槟榔果实的酚类化学成分与抗菌活性的初步研究[J]. *热带亚热带植物学报*, 2009, 17(1): 74-76.
- [27] Chin-Kun Wang, Wen-Hsiu Lee. Separation, Characteristics, and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, 2 014-2 019.
- [28] Govindarajana V S., Mathew A G. Polyphenolic substances of arecanut I. Chromatographic analysis of fresh mature nut [J]. *Phytochemistry*, 1963, 2(4): 321-326.