

HPLC 法测定槟榔中的多酚类物质

王明月^{1,2*}, 罗金辉², 李建国²¹中国热带农业科学院热带生物技术研究所; ²中国热带农业科学院分析测试中心, 海口 571101

摘要: 采用高效液相色谱法对槟榔中的多酚类物质进行分析。用甲醇提取槟榔中的多酚类物质, 并依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 萃取物经抽真空浓缩, 流动相定容, 高效液相色谱法测定。分析结果表明: 槟榔幼果较槟榔成熟果中所含的多酚种类和数量少, 槟榔成熟果中果仁的多酚种类和数量都远较皮中多; 槟榔的甲醇提取物乙酸乙酯萃取部分中所含的多酚种类和数量相比石油醚和正丁醇萃取部分都是最多的; 槟榔仁的多酚含量最多的是儿茶素, 含量为 1610 mg/kg, 其次是单宁酸 622 mg/kg, 表没食子儿茶素 228 mg/kg, 表儿茶素 164 mg/kg, 表没食子儿茶素没食子酸酯 72 mg/kg, 没食子酸 13.6 mg/kg。而没食子儿茶素、绿原酸、和没食子儿茶素没食子酸酯没有检测到。

关键词: HPLC 法; 槟榔; 多酚类物质

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

Determination of Polyphenols in *Areca catechu* by HPLCWANG Ming-yue^{1,2*}, LUO Jin-hui², LI Jian-guo²¹Analysis and testing centre, Chinese Academic of Tropical Agricultural Sciences;²Biotechnology Research Institute of Tropical, Chinese Academic of Tropical Agricultural Sciences, Hainan 571101, China

Abstract: HPLC was used to determine polyphenols in *Areca catechu*. Polyphenols were extracted from betel nut with methanol, which were extracted with petroleum ether, ethyl acetate, and n-butanol, successively. Then, the extracts were concentrated and determined by HPLC after making constant volume using the mobile phase. The results showed that the kinds and quantities of polyphenols in mature young betel nut were fewer than in mature fruit, while those in nuts of mature fruit were more than in the skin. The kinds and quantities of polyphenols in the methanol extract were the most. The content of catechin was the highest reaching 1610 mg/kg in the polyphenols, tannic acid (622 mg/kg), epigallocatechin (228 mg/kg), epicatechin (164 mg/kg), epigallocatechin gallate (72 mg/kg), and gallic acid (13.6 mg/kg) were followed. However, catechin gallate, chlorogenic acid, and gallocatechin gallate were not detected.

Key words: HPLC; *Areca catechu*; polyphenols

多酚是在植物性食物中发现的, 因具有多个酚基团而得名, 是具有潜在促进健康作用的化合物。氧化损伤是导致许多慢性病, 如心血管病, 癌症和衰老的重要原因。多酚的强抗氧化功能可以对这些慢性病起到预防作用。槟榔(*Areca catechu* L.) 中的活性物质主要包括生物碱和多酚类^[1], 近期研究发现槟榔的 0 许多功效如抗细菌、真菌和病毒的作用^[2,4]; 抗老化作用^[5]; 降低胆固醇作用^[6,7]; 抗氧化作用^[8], 增强纤溶酶活性^[9], 抗凝血酶作用^[10] 等都与其所含的多酚有关系。目前对槟榔中生物碱的研

究很多, 而对槟榔中的多酚类研究较少。测定方法主要是用分光光度法^[11,12], 只能测定槟榔中多酚的总含量, 而无法测定是那种多酚, 这对于槟榔的深加工不利。我们利用高效液相色谱法测定了槟榔中的 9 种多酚类物质: 单宁酸、焦性没食子酸、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、绿原酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯。这对于槟榔的精深加工, 以及引导槟榔产业发展, 充分利用资源, 挖掘其药用价值, 具有重要意义。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, 配 1525 泵、717⁺ 自动进样器、2487 紫外检测器、EMPOWER 色谱工作站。

收稿日期: 2009-06-03

接受日期: 2009-09-15

基金项目: 2008 年中央级公益性科研院所基本科研业务费 (ITB-BKF083)

* 通讯作者 Tel: 86-898-66895011; E-mail: hkwm0815@163.com

单宁酸、焦性没食子酸、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、绿原酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯。乙腈为色谱纯,甲醇、乙酸乙酯、石油醚、正丁醇、冰醋酸为分析纯;水为超纯水,流动相经 0.45 μm 微孔滤膜减压过滤。

样品为样品海南产槟榔:5 月份采摘的嫩果、11 月份采摘的成熟果。

1.2 色谱条件

色谱条件:色谱柱:kromasil C_{18} 150 mm \times 4.6 mm (i. d),粒径 5 μm ,或相当者。流动相 A:2% 冰醋酸水溶液,流动相 B:乙腈,采用梯度洗脱程序:0 min,95% A;18 min,81.5% A;18.5 ~ 24.0 min,95% A;用前过 0.45 μm 滤膜。流速:0.80 mL/min。紫外检测波长:280 nm。进样量:10 μL 。

1.3 标准溶液的配制

槟榔多酚标准储备液:准确称取单宁酸、焦性没食子酸、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、绿原酸、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、没食子儿茶素没食子酸酯对照品 10 mg,分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容配成浓度为 1 mg/mL 的储备液。

槟榔多酚标准工作溶液的制备:准确量取适量槟榔多酚标准储备液,用流动相稀释成浓度分别为 5.00、10.00、20.00、40.00、80.00 和 160.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的槟榔多酚标准工作溶液。

1.4 样品处理

提取:称取 10 g(精确至 0.01 g)槟榔样品,置 250 mL 锥形瓶中,加 100 mL 甲醇,低温超声 15 min,滤出滤液后残渣再加入 50 mL 甲醇超声 10 min,合并滤液,45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴真空浓缩近干。

萃取:①将浓缩物加入 50 mL 水混匀,再加入 50 mL 石油醚萃取两次,合并石油醚萃取层,30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴真空浓缩近干。

②将①石油醚萃取完后的水层,用 50 mL 乙酸乙酯重复萃取两次,合并乙酸乙酯萃取层,45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴真空浓缩近干。

③将②乙酸乙酯萃取完后的水层,用 50 mL 正丁醇重复萃取两次,合并正丁醇萃取层,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴真空浓缩近干。

④将③正丁醇萃取完后的水层,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴真空浓缩近干。

将萃取物①、②、③和④,分别用乙腈:2% 醋酸

水溶液(50:50)定容至 10 mL,摇匀,经 0.45 μm 滤膜过滤后供高效液相色谱分析。样品中某种多酚的含量是①、②、③和④萃取部分的该多酚含量的总和。

2 结果和讨论

2.1 流动相的选择

根据多酚的性质和参考文献^[13-15],本实验对几种体系的流动相进行了考察:甲醇-水,乙腈-水,甲醇-乙酸-水,甲醇-磷酸-水,乙腈-磷酸-水,乙腈-乙酸-水,由于乙腈洗脱能力比甲醇强,而酸的加入抑制了多酚的酚羟基的电离,防止了峰的拖尾,从而使分离达到一个满意的程度;而且乙酸是弱酸,不会因为加入体积的微小变化,而导致流动相 PH 的较大变化,影响分离。比较了 0.3%、2%、5% 的乙酸水溶液,当乙酸浓度为 0.3% 时,各峰分离度很差;乙酸浓度为 5% 时,酸度偏大,对柱子有伤害;乙酸浓度为 2% 时,而 PH 约为 3.5,在柱子使用的 PH 范围之内。结果表明,以表 1 所示梯度表,乙腈-乙酸-水为流动相,乙酸的体积分数为 2% 时,分离槟榔中的多酚,不仅快速、简单而且分离度好。

表 1 流动相梯度表

Table 1 Gradient table of mobile phase

| 时间 Time (min) | 2% 冰醋酸溶液 2% CH_3COOH (%) | 乙腈 CH_3CN (%) | 流速 Flow rate ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) |
|------------------|---|-------------------------------------|--|
| 0 | 95 | 5 | 0.80 |
| 18 | 81.5 | 18.5 | 0.80 |
| 18.5 | 95 | 5 | 0.80 |
| 24 | 95 | 5 | 0.80 |

2.2 波长、流速和温度的选择

根据参考文献^[13-15],酚类物质大多在 280 nm 检测,可获得较大的灵敏度,而且不受流动相中其他物质的干扰,故选择 280 nm 为检测波长。

比较了几个流速:0.5 mL/min、0.8 mL/min、1.0 mL/min、1.2 mL/min 的分离效果,流速为 0.5 mL/min 时,各峰之间可以完全分离,但耗时太长;流速为 1.0 mL/min 及以上时,没食子酸和没食子儿茶素分离度较差;流速为 0.8 mL/min 时,18 min 已完成 9 种多酚的分离,而且分离度符合定量要求。

柱温为室温时,由于采集时间较长,后面洗脱出来的峰的保留时间容易漂移;而柱温太高(45 $^{\circ}\text{C}$ 以

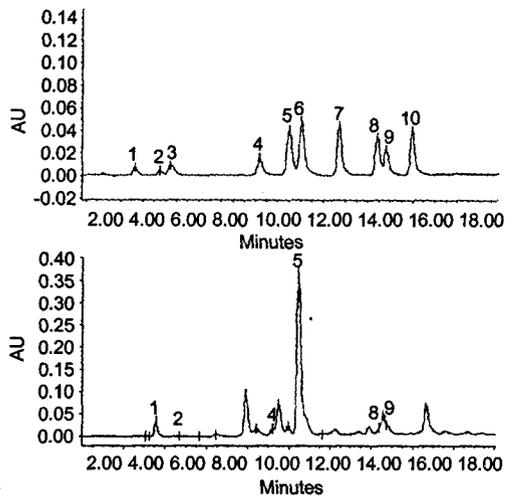


图1 多酚标准品和槟榔样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of polyphenols standard mixture and sample

1. 单宁酸; 2. 焦性没食子酸; 3. 没食子酸; 4. 表没食子儿茶素; 5. 儿茶素; 6. 绿原酸; 7. 为咖啡因; 8. 表没食子儿茶素没食子酸酯; 9. 表儿茶素; 10. 没食子儿茶素没食子酸酯

上时), 时间长了容易损伤柱子; 所以选择柱温为 30℃, 既保持了峰的保留时间的重复性, 又延长了柱子的寿命。

2.3 回归方程、相关系数及检测限

取 1.3 节系列浓度的槟榔多酚标准工作溶液, 按上述色谱条件每种浓度进样 10 μL, 以峰面积 Y 对标准溶液质量浓度 X (g/L) 进行线性回归分析, 得槟榔多酚回归方程和相关系数, 见表 2。根据 IUPAC 定义, 本方法的检出限为产生响应于 3 倍背景噪音的标准偏差分析信号的分析物浓度值。由此可得, 槟榔多酚的最小检出限, 见表 2。

2.4 方法准确度和精密度

准确称取槟榔果样品两份, 其中一份加入已知量的多酚标样, 另一份不加。在相同条件下测定乙酸乙酯萃取部分 6 次, 根据加标样品测出量减去未加标样品测出量再除以标准加入量回收率, 并用 6 次平行测定结果计算相对标准偏差。试验结果证明, 本方法有很好的准确度和精密度, 可以满足定量分析要求, 见表 3。

表 2 回归方程、相关系数、线性范围和检测限

Table 2 The regression equation, correlation coefficient and detection limit

| 酚类物质 Phenols | 回归方程 Regression equation | 线性范围 Linear range (μg/mL) | 相关系数 R ² Correlation coefficient | 检测限 (mg/kg) The detection limit (mg/kg) |
|-----------------|---|---------------------------------|--|--|
| 单宁酸 | $y = 1.27 \times 10^3 x + 7.35 \times 10^3$ | 0 ~ 100 | 0.9999 | 0.04 |
| 没食子酸 | $y = 8.94 \times 10^2 x + 6.31 \times 10^3$ | 0 ~ 100 | 0.9996 | 0.05 |
| 没食子儿茶素 | $y = 1.74 \times 10^3 x + 3.04 \times 10^3$ | 0 ~ 100 | 0.9998 | 0.04 |
| 表没食子儿茶素 | $y = 1.76 \times 10^3 x + 3.04 \times 10^4$ | 0 ~ 100 | 0.9999 | 0.03 |
| 儿茶素 | $y = 7.57 \times 10^3 x + 8.30 \times 10^3$ | 0 ~ 100 | 0.9998 | 0.02 |
| 绿原酸 | $y = 7.49 \times 10^3 x + 2.84 \times 10^3$ | 0 ~ 50 | 0.9994 | 0.02 |
| 表没食子儿茶素没食子酸酯 | $y = 1.37 \times 10^3 x + 5.66 \times 10^3$ | 0 ~ 50 | 0.9999 | 0.02 |
| 表儿茶素 | $y = 2.09 \times 10^4 x + 1.01 \times 10^5$ | 0 ~ 50 | 0.9997 | 0.03 |
| 没食子儿茶素没食子酸酯 | $y = 1.52 \times 10^4 x + 6.70 \times 10^4$ | 0 ~ 50 | 0.9996 | 0.02 |

表 3 方法准确度和精密度测定结果

Table 3 Determination results of recovery

| 酚类物质 Phenols | 加入量 Added (mg/kg) | 样品含量 Content (mg/kg) | 实际测得值 Measured (mg/kg) | 回收率 Recovery (%) | 相对标准偏差 RSD (%) |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------|-------------------|
| 单宁酸 | 400 | 未检出 | 372 ± 15 | 89.2 ~ 96.8 | 1.5 |
| 没食子酸 | 400 | 未检出 | 386 ± 21 | 91.2 ~ 102 | 3.1 |
| 没食子儿茶素 | 400 | 未检出 | 343 ± 13 | 82.5 ~ 89.0 | 2.6 |
| 表没食子儿茶素 | 400 | 未检出 | 358 ± 10 | 87.0 ~ 92.0 | 2.7 |
| 儿茶素 | 400 | 517 | 896 ± 12 | 91.8 ~ 97.8 | 2.3 |
| 绿原酸 | 400 | 未检出 | 363 ± 15 | 87.0 ~ 94.5 | 2.5 |
| 表没食子儿茶素没食子酸酯 | 400 | 11 | 406 ± 18 | 94.2 ~ 103 | 1.9 |

| | | | | | |
|-------------|-----|-----|----------|-------------|-----|
| 表儿茶素 | 400 | 未检出 | 408 ± 9 | 99.8 ~ 104 | 0.8 |
| 没食子儿茶素没食子酸酯 | 400 | 未检出 | 372 ± 19 | 89.2 ~ 97.8 | 2.9 |

2.5 样品分析结果

将槟榔样品按 1.4 节进行样品处理,并按照 1.2 节的色谱条件,测得样品结果为:幼果的石油醚萃取部分、正丁醇萃取部分、正丁醇萃取后的水溶液均不含这 9 种多酚,乙酸乙酯萃取部分含有儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯,含量分别为 517 mg/kg 和 11 mg/kg。而成熟果仁的石油醚萃取部分不含 9 种多酚;正丁醇萃取部分含有表没食子儿茶素 15 mg/kg 和表没食子儿茶素没食子酸酯 5.0 mg/kg;乙酸乙酯萃取部分含有单宁酸、没食子酸、表没食子儿茶素、儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素,含量分别为 622 mg/kg、13.6 mg/kg、228 mg/kg、1610 mg/kg、72 mg/kg、164 mg/kg。而成熟果皮中石油醚萃取部分、正丁醇萃取部分、正丁醇萃取后的水溶液均不含这 9 种多酚;成熟果皮中乙酸乙酯萃取部分含单宁酸和儿茶素,含量分别为 26.6 mg/kg 和 4.22 mg/kg。

3 结论

本实验用 HPLC 法测定槟榔中多酚类物质,有效的将 9 种多酚分离开,得到的结果:槟榔幼果较槟榔成熟果中所含的多酚种类和数量少,槟榔成熟果中果仁的多酚种类和数量都远较皮中多;槟榔中所含的多酚类成分主要存在于其甲醇提取物乙酸乙酯萃取部份,而其石油醚、正丁醇萃取部分及萃取后的水中没有检测到这 9 种多酚;槟榔仁的多酚中含量最多的是儿茶素,达到 1610 mg/kg,其次是单宁酸 622 mg/kg,表没食子儿茶素 241 mg/kg,表儿茶素 164 mg/kg,表没食子儿茶素没食子酸酯 77 mg/kg,没食子酸 13.6 mg/kg。而没食子儿茶素、绿原酸、和没食子儿茶素没食子酸酯没有检测到。

参考文献

- Zhang CJ(张春江),Lv FJ(吕飞杰),Tao HT(陶海腾). The research progress of active ingredient in betel nut and its functional role. *Food Nutr China*(中国食物与营养),2008, 6:50-53.
- Xiao PG(肖培根). *Modern Chinese Material Medica*(新编中药志). Beijing:Chemical Industry Press,2002:643-647.
- Huang BB(黄冰冰),Fan MW(樊明文),Yang XL(杨祥良),*et al.* The impact of Chinese herbal medicine on the growth of periodontal bacteria. *J Four Mil Med Univ*(第四军医大学学报),2003,24:424-426.
- Xiao Y(肖悦),Liu TJ(刘天佳),Huang ZW(黄正蔚),*et al.* The impact of 5 kinds of natural drugs on *Streptococcus mutans* in saliva of acquired membrane adhesion. *J Sichuan Univ,Med Ed*(四川大学学报,医学版),2004,35:687-689.
- Lee KK,Cho JJ,Choi JD. Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from areca catechu as new anti-ageing agent. *Int J Cosmet Sic*,2001,23:341-346.
- Jeon SM, Kim HS, Lee TG, *et al.* Lower absorption of cholesterylolate in rats supplemented with areca catechul extract. *Ann Nutr Metab*,2000,44:170-176.
- Byun SJ, Kim HS, Jeon SM, *et al.* Supplementation of areca catechu L. extract alters triglyceride absorption and cholesterol metabolism in rats. *Ann Nutr Metab*,2001,45:279-284.
- Guota PC, Wamaku lasuriya S. Global epidemiology of areca nut usage. *Addict Biol*,2002,(7):77-83.
- Yu WJ(俞文杰). Observation of 21 kinds of Chinese medicine on the role of fibrinolysis in vitro observation. *J Integr Tradit West Med*(中西医结合杂志),1986,6:484.
- Ou XC(欧兴长),Ding JX(丁家欣),Zhang L(张玲). *Journal of Integrated Traditional and Western Medicine. Chinese Tradic Herb Med*(中草药),1987,18(40):21.
- Wang JK(王进昆),Sun LX(孙路西). Betel quid in the analysis of phenolic compounds. *Chin Agric Chem Soc*(中国农业化学会志),1993,31:623-632.
- Zhang CJ(张春江),Lv FJ(吕飞杰),Tai JX(台建祥),*et al.* Fruit and nut products in the total phenol and tannin content determined. *Food Res Dev*(食品研究与开发),2008,6:119-121.
- Chen L(陈磊),Yang JL(杨建荣),Huang XS(黄雪松). Determination of 6 kinds of polyphenols in Fuji apple pomace by HPLC. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业),2008,34(8):158-161.
- Sun HF(孙海峰),Lv HT(吕海涛),Zhou SS(周莎莎),*et al.* Determination of polyphenols in apple juice concentrate by HPLC. *Food Sci*(食品科学),2008,29:314-317
- Zhang JF(张晋芬),Yuan B(袁冰),Leng P(冷平),*et al.* Determination of 8 kinds of Polyphenols in pears, apples and bananas with the microwave extraction and high-performance liquid chromatography. *J Anal Test*(分析测试学报),2008, 27:1371-1374.