

苹果多酚物质组分的高效液相色谱分析

曹 慧¹, 徐文娟¹, 陈志章¹, 王智玲¹, 邹岩梅², 束怀瑞²

(1. 山东高校生物化学与分子生物学重点实验室, 潍坊学院, 山东 潍坊 261061; 2. 国家苹果工程技术研究中心, 山东 泰安 271018)

摘 要:以“富士”苹果为试材, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定了限根节水条件下苹果果实生长发育过程中酚类物质组分及含量的变化。结果表明:限根节水处理对苹果多酚的影响随时期变化而不同, 整个发育期总酚含量处理与对照无显著差异, 但盛花后 175 d, 限根节水果皮中多酚总量高于对照, 且与对照之间的差异达显著水平; 未成熟期, 绿原酸在果皮和果肉中的含量在限根情况下均有不同程度提高, 但与对照之间的差异均达极显著水平; 而成熟期, 限根节水处理与对照相比显著提高了果肉中儿茶素和果皮中表儿茶素的含量。

关键词:限根节水; 苹果; 多酚; 高效液相色谱

中图分类号:S 661.101 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)07-0001-04

苹果除含有丰富的植物纤维、糖酸、维生素等营养成分外, 还含有较多的酚类物质^[1]。多酚作为苹果的次生代谢产物, 具有种类多、含量高、抗氧化能力强等生理功能, 特别是对人体具有多重营养和保健作用^[2]。其成分和含量因品种、成熟度以及组织部位的不同而不同, LANEASTER^[3]、LISTER 等^[4]研究表明, 苹果多酚物质含量还受外界生长条件的影响, 其中水分对果实品质的影响起关键作用。该研究以“富士”苹果为试材, 采用高效液相色谱法, 比较节水处理与正常灌溉条件下果实不同发育时期多酚物质组分和含量的变化, 该方法相比毛细管电泳法灵敏度高且精密准确、简便迅速^[5]。通过对苹果多酚物质组分的高效液相色谱分析研究^[6-8], 对苹果精深加工和深度开发应用具有重要的社会、经济和生态效益。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苹果均从潍坊市寒亭区果树站试验场果园采摘。选用健康、成熟度、栽培管理和树势基本一致, 树龄为 13 年的“长富 6 号”苹果为供试材料。

第一作者简介:曹慧(1966-), 女, 山西太谷人, 博士, 教授, 现主要从事果树逆境生理与分子生物学等研究工作。E-mail: hui5232@163.com.

责任作者:束怀瑞(1929-), 男, 山东淄博人, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 现主要从事果树栽培生理和生产的教学科研及推广工作。E-mail: hrshu@sdaa.edu.cn.

基金项目:国家现代苹果产业技术体系资助项目(CAR-28); 山东省科学技术发展计划资助项目(2011GNC11201)。

收稿日期:2015-12-23

仪器:Ultimate3000 分析型高效液相色谱仪(美国戴安公司); Allegrax-64R 型冷冻高速离心机(美国贝克曼库尔特公司); GM-0.33A 隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); R-210 旋转蒸发器(瑞士步琦有限公司 Buchi)。

试验所用试剂均为色谱纯, 水均用超纯水。

1.2 试验方法

以果园平时正常灌溉和管理为对照(CK), 即每年灌溉 6 次(萌芽期、新梢旺长期、幼果期、果实膨大期灌溉 2 次、封冻水)^[9]。限根节水处理, 采用在果树的行间挖一条宽、深各为 70 cm 的沟, 在沟内埋 4 层砖, 砖的两侧依次埋放固性碳素、有机肥、复合肥和田土^[9], 按灌溉期灌水, 即每年灌溉 4 次(萌芽期、新梢旺长期、幼果期、果实膨大期); 选择树干外围 4 个不同方向色泽相近、大小均匀、无机械损伤的果实用于试验。于花后第 110~170 天进行随机采样, 3 次重复, 采样间隔时间为 15 d。所采样品带回实验室保存于 -80℃ 超低温冰箱中用于指标测定。试验结果进行生物学统计分析。

1.3 项目测定

1.3.1 样品的前处理 参照冯娟等^[10]的方法, 并对其进行了改良。称取 5.0 g 苹果样品并用液氮迅速研磨成均匀粉状物, 用 70% 的乙醇于 60℃ 超声波清洗器中清洗 20 min, 并用真空泵抽滤, 然后在 40℃ 条件下真空旋转蒸发至粘稠状, 移至 10 mL 容量瓶甲醇定容, 在冷冻离心机 8 000 r/min 离心 15 min 后, 用注射器抽取上清液, 用 0.45 μm 滤膜过滤待测^[10]。

1.3.2 标准品的配制 准确称取绿原酸、儿茶素、表儿茶素、芦丁、槲皮素、根皮苷、对香豆酸各 2.5 mg, 用甲醇

定容到 5 mL, 摇匀得标准多酚混标母液。然后分别用甲醇逐级稀释 2、4、8、16 倍, 用于标准曲线的绘制。

1.3.3 色谱条件 液相色谱及测试条件: 液相色谱仪为戴安 U3000 HPLC, 检测器为 UV-3400 紫外检测器, 波长为 280 nm, 色谱柱为 C18 分析柱, 柱温 38℃。样品测定采用 HPLC 梯度洗脱方法。采用二元流动相, A: 乙腈, B: 高纯水。梯度洗脱方法如表 1。

表 1 流动相比例及流速

Table 1 The flow rate and proportion of mobile phase

时间 Time/min	乙腈 A/%	高纯水 B/%	流速 Flow/(mL·min ⁻¹)
0~15	95	5	1.0
15~25	65	35	1.0
25~32	95	5	1.0

1.3.4 样品定量测定 采用外标定量法对标准品和样品进行液相色谱分析。

1.4 数据分析

试验数据采用 SAS 统计软件进行分析, 用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱图

多酚标样出峰先后顺序如图 1, 各标准品保留时间分别为 9.893、11.002、12.789、14.691、15.912、18.963、21.989 min, 所有样品在 32 min 内出峰完毕。根据不同浓度标准品高效液相色谱图, 系统软件自动生成线性标准曲线。苹果样品色谱图对照标准图谱进行定性和定量分析。

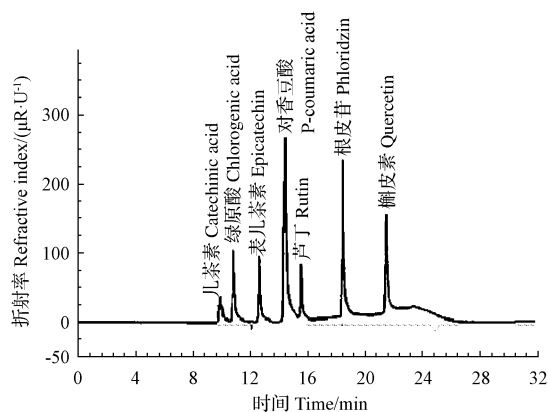


图 1 多酚物质混合标准品的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of polyphenols

2.2 节水处理下“富士”果实成熟时期果肉总酚含量的变化

由图 2 可以看出, 通过高效液相测定苹果果肉中总酚的含量随果实的生长发育呈逐渐下降的趋势, 直到果实接近成熟时含量才几乎趋于稳定。在盛花后 70~100 d 期间, 果肉中的总酚含量快速下降, 其中处理条件下含量由 2.8 mg/g 降至 1.8 mg/g, 降幅为 35.7%, 较对照下

降速度快, 差异极显著。此后, 盛花后的 115~175 d, 果肉的总酚含量下降缓慢, 而处理条件下的总酚含量基本稳定, 与对照相比差异不显著。

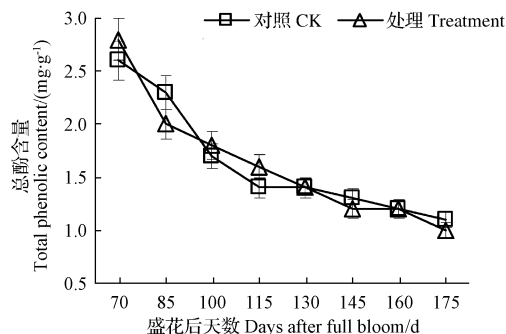


图 2 节水处理下果实成熟时期果肉总酚含量的变化

Fig. 2 Changes of total phenolic content of apple flesh on water-saving treatment

2.3 节水处理下“富士”果实成熟时期果皮总酚含量的变化

如图 3 所示, 通过高效液相测定苹果果皮中总酚的含量随果实的生长发育呈逐渐下降的趋势, 直到果实接近成熟的时候含量才几乎趋于稳定。“富士”果皮中的总酚含量变化基本同于果肉, 但总体来看果皮中总酚含量明显高于果肉, 盛花后 175 d, 处理条件下的果皮多酚总含量高于对照, 且具有显著性差异。

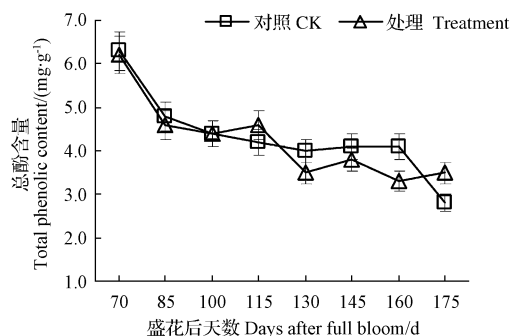


图 3 节水处理下果实成熟时期果皮总酚含量的变化

Fig. 3 Changes of total phenolic content of apple peel on water-saving treatment

2.4 节水处理下“富士”果实未成熟时期果肉和果皮单体酚类物质含量的变化

试验应用 HPLC 定性定量地测定出“富士”苹果中含有绿原酸、儿茶素、表儿茶素、芦丁和根皮苷 5 种单体酚类。该试验以前三者为研究对象, 以未成熟“富士”苹果为试材, 如表 2 所示, 果皮中的单体酚类含量明显高于果肉, 且各个单体酚类的比例有所不同。果肉中的单体酚类主要以绿原酸、表儿茶素和儿茶素为主, 而果皮中则以儿茶素、表儿茶素为主。

其中, 果肉中绿原酸含量最高, 果肉中绿原酸、儿茶

素在节水条件下的含量分别比对照高 46.5%、40.3%，且差异性显著。而果皮中儿茶素在单体酚类中含量最高，而绿原酸含量比对照高 243.8%，差异极显著；而果

皮在节水处理下的儿茶素和表儿茶素含量与对照相比无显著差异性。

表 2 节水处理下“富士”果实未成熟时期果肉和果皮单体酚类物质含量

Table 2 Concentration of phenolic compounds in the immature ‘Fuji’ flesh and peel on water-saving treatment mg/g

	处理 Treatment	绿原酸 Chlorogenic acid	儿茶素 Catechin	表儿茶素 Epicatechin
果皮	对照 CK	0.048Cc	0.576Aa	0.411Aa
Peel	节水处理 Water-saving	0.165Aa	0.579Aa	0.419Aa
果肉	对照 CK	0.101Bb	0.072Cc	0.050Bb
Flesh	节水处理 Water-saving	0.148Aa	0.101Bb	0.052Bb

2.5 节水处理下“富士”果实成熟时期果肉和果皮单体酚类物质含量的变化

由表 3 可以看出，与未成熟果实相比，成熟果实中的各单体酚类的含量显著降低。绿原酸和儿茶素在成熟果实果肉单体酚类中仍占主体，而果皮中表儿茶素含

量最高。其中，果肉中儿茶素含量最高，果肉中绿原酸、儿茶素在节水条件下的含量分别比对照高 50.0%、18.2%，差异显著。而埋砖条件下果皮中表儿茶素含量最高，比对照高 19.8%，差异显著；而绿原酸和儿茶素含量与对照均无显著性差异。

表 3 节水处理下“富士”果实成熟时期果肉和果皮单体酚类物质含量

Table 3 Concentration of phenolic compounds in the mature ‘Fuji’ flesh and peel of water-saving treatment mg/g

	处理 Treatment	绿原酸 Chlorogenic acid	儿茶素 Catechin	表儿茶素 Epicatechin
果皮	对照 CK	0.086Aa	0.081Aa	0.126Ab
Peel	节水处理 Water-saving	0.089Aa	0.079Aa	0.151Aa
果肉	对照 CK	0.014Bb	0.033Bb	0.012Bc
Flesh	节水处理 Water-saving	0.021Bb	0.039Bb	0.013Bc

3 讨论与结论

苹果优质高产是生产者的主要目标。研究表明，多酚物质成分和含量因成熟度以及组织部位的不同而不同^[6-8]，该试验通过对苹果多酚物质组分的高效液相色谱分析研究，限根节水处理一定程度上改善了果实品质。

该试验研究表明，“富士”果皮中的总酚含量变化基本同于果肉，但总体来看果皮中总酚含量明显高于果肉。限根节水对苹果中的绿原酸的含量随时期变化而不同，盛花后 175 d，处理条件下的果皮多酚总含量高于对照，且具有显著差异性。

未成熟果实中，果肉中的单体酚类主要以绿原酸、表儿茶素和儿茶素为主，而果皮中则以儿茶素、表儿茶素为主，且果皮中的单体酚类含量明显高于果肉。限根节水提高了果肉和果皮中的绿原酸含量，与对照差异极显著。

成熟果实中的各单体酚类的含量显著降低。绿原酸和儿茶素在成熟果实果肉单体酚类中仍占主体，而果皮中表儿茶素含量最高。其中，限根节水处理提高了果皮中表儿茶素的含量，较对照差异显著。

总体来说，“富士”果皮中的总酚含量变化基本同于果肉，但总体来看果皮中总酚含量明显高于果肉。限根节水一定程度提高了果实中多酚物质含量，对提高果实品质具有重要的意义。对“富士”酚类物质的试验表明，

限根节水处理提高了果实中的总酚含量，其中果肉中绿原酸、儿茶素和表儿茶素含量均升高，而果皮中绿原酸和表儿茶素含量均升高。限根节水一定程度上改善了果实品质，并且能提高了营养价值和保健功效。

参考文献

- [1] 高冬华. 土壤水分对红富士苹果果实品质的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [2] 贺金娜. 苹果多酚的制备、成分鉴定及其抗氧化性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [3] LANEASTER J E. Regulation of skin color in apples[J]. Crit Rev Plant Sci, 1992, 10: 487-502.
- [4] LISTER C E, LANCASTER J E, SUTTON K H. Development changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar[J]. Sci Food Agric, 1994, 64: 155-161.
- [5] 曹慧, 张玉宵, 王佳倩, 等. 苹果果实中阿魏酸和儿茶素的毛细管电泳分离测定研究[J]. 实验技术与管理, 2012, 29(1): 33-35.
- [6] PETRUS K, SCHWARTZ H, SONTAG G. Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 400(8): 2555-2563.
- [7] 成宇峰. 葡萄与葡萄酒单体酚分析测定方法的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [8] 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.
- [9] 曹慧, 姜倩倩, 张保仁, 等. 节水养根处理对苹果枝叶生长发育的影响[J]. 北方园艺, 2013(4): 1-5.
- [10] 冯娟, 任小林, 田建文. 不同产地富士苹果多酚、可溶性糖及有机酸的对比研究[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 125-130.

DOI:10.11937/bfyy.201607002

南北板栗品种授粉组合对结实特性的影响

梁 雪, 陈佳佳, 杨 柳, 赵志珩, 石卓功

(西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650024)

摘 要:连续3年以北方板栗品种“燕山红栗”和“燕龙”为父本,以南方板栗品种“云富”、“云良”、“云早”、“永丰1号”为母本进行授粉,测定了不同授粉组合板栗的结苞率、空苞率、出籽率、球苞直径和坚果重量等指标,以期改善板栗坚果品质和提高产量提供参考。结果表明:不同授粉组合对板栗结苞率、空苞率的影响较小;球苞的大小与母本的自身特性以及球苞内坚果个数相关;利用坚果大的品种花粉授粉比利用坚果小的品种花粉授粉所结的坚果要大,且坚果的大小也与球苞内坚果的个数相关。

关键词:板栗;授粉组合;结实特性

中图分类号:S 664.205⁺.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)07-0004-05

板栗(*Castanea mollissima* BL)属壳斗科栗属坚果类植物,种质资源丰富,栽培分布广泛,果实营养丰富,经济价值高,是我国最早驯化栽培的果树之一,也是我国重要的特色经济林干果树种^[1]。单位面积产量低是我国板栗当前的主要问题。关键因素在于管理粗放,授粉树配置不合理^[2]。板栗在花芽分化的过程中会形成两

性花序,即雌花序和雄花序。因此,板栗既可以自花授粉也可以异花授粉。自花授粉比异花授粉的结实率低^[3-5]。但即使是异花授粉,不同的授粉组合亦或是同一授粉组合的正反交对板栗的结实特性都有较大影响^[6-7]。因此,了解不同授粉组合板栗的结实特性,合理配置授粉树,可以有效提高板栗的产量和品质。

我国南北方板栗品种差异较大。该试验以4个云南本地品种和2个北方品种为父母本对不同授粉组合的结实特性进行研究。“云富”、“云良”、“云早”和“永丰1号”是云南省实生选育品种,其中“云良”2008年通过国家林业局品种审定;“燕龙”是1996年通过实生选种选育而成,2005年河北省科技厅组织的专家鉴定,2009年通

第一作者简介:梁雪(1991-),女,硕士研究生,研究方向为果树生殖生物学。E-mail:lx1239633936@163.com.

责任作者:石卓功(1957-),男,博士,教授,研究方向为经济林培育。E-mail:zgongshi@sina.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30860231)。

收稿日期:2015-12-18

Analysis of the Composition of Apple Phenolics by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

CAO Hui¹, XU Wenjuan¹, CHEN Zhizhang¹, WANG Zhiling¹, ZOU Yanmei², SHU Huairui²

(1. Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology in Universities of Shandong/Weifang University, Weifang, Shandong 261061;

2. National Research Center for Apple Engineering and Technology, Tai'an, Shandong 271018)

Abstract: ‘Fuji’ apple was used as test material, which was examined by high performance liquid chromatography (HPLC). The changes of the composition and content of phenolics during the process of fruit growth and development were studied, under the condition of root restriction and water-saving. The results showed that effect of water-saving and root-limiting treatment on apple polyphenols changed with different time period, 175 days after full bloom, pericarp total polyphenols was higher than the control and the condition of treatment was obviously different from control. In immaturity time, chlorogenic acid content of the pulp and peel was significantly increased at the condition of root restriction. In maturity time, water-saving treatment increased catechin and tables catechin content of the pulp and peel were significantly different compared with the control.

Keywords: water-saving; apple; photosynthesist; HPLC