

# 分散固相萃取-高效液相色谱法测定草莓中游离鞣花酸含量

杨 媛<sup>1</sup>, 石 磊<sup>1</sup>, 张 佳<sup>1</sup>, 李文生<sup>1</sup>, 张开春<sup>1</sup>, 冯晓元<sup>1,2</sup>

(1. 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093; 2. 北京农产品质量检测与农田环境监测技术研究中心, 北京 100097)

**摘 要:**建立了分散固相萃取-高效液相色谱法(DSPE-HPLC)测定草莓中游离鞣花酸含量的检测方法。在酸性条件下用甲醇提取,经 C<sub>18</sub> 分散固相萃取净化。采用 Agilent Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> 柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)分离,以乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液(15:85, V/V)为流动相,在 254 nm 下检测。该方法可以将鞣花酸与基质良好分离,在 0.1~20 μg/mL 浓度范围内线性良好( $r=0.99981$ );最低检出浓度为 0.0134 μg/g,回收率为 85.3%~95.1%,相对标准偏差小于 10%,可用于草莓中游离鞣花酸含量的检测。

**关键词:**分散固相萃取;高效液相色谱法;鞣花酸;草莓

**中图分类号:**Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)15-0025-03

鞣花酸为没食子酸的二聚衍生物,是一种多酚二内酯。它不仅能以游离的形式存在,而且更多的是以缩合

形式(如鞣花单宁、苷等)广泛存于黑莓、红莓、蓝莓、石榴等多种植物果实中<sup>[1]</sup>。研究表明,鞣花酸具有较强的抗菌、抗氧化、抗突变、抗癌变、凝血、降压、镇静等多种生理作用,其作用机制及相关应用的研究已经在食品、医疗、医药等领域深入开展<sup>[2]</sup>。

鞣花酸微溶于水、醇,溶于碱、吡啶,不溶于醚,其溶解度问题给定量分析带来一定难度<sup>[3]</sup>。目前,已见报道有高效液相色谱法<sup>[4]</sup>、反滴定法<sup>[5]</sup>、紫外分光光度法<sup>[3]</sup>、

**第一作者简介:**杨媛(1977-),女,博士,副研究员,现主要从事果品质量与安全等研究工作。E-mail: yangyuan@mail.nankai.edu.cn.  
**基金项目:**北京市优秀人才培养资助项目(2011D002020000006);北京市农林科学院科技创新能力建设专项资助项目(KJCX201103002)。  
**收稿日期:**2012-05-07

推广,“户太8号”在温室栽培中可提早上市,明显增加效益。同属欧亚种的早熟品种“矢富罗莎”以及晚熟品种“圣诞玫瑰”适宜在行走棚中避雨栽培。“巨玫瑰”有裂果现象,因此不适宜在杨凌等生态相似区推广。

## 参考文献

- [1] 张振文. 葡萄品种学[M]. 西安:西北农林科技大学,2000.
- [2] 张志成,夏建华. 陕西果树区划及品种结构建议[J]. 西北园艺,2003

- (2):5-6.
- [3] 葛尚生,徐澄,刘满存. 陕西关中地区如何栽葡萄[J]. 西北园艺,2006(2):51.
- [4] 王华. 葡萄与葡萄酒实验技术操作规范[M]. 西安:西安地图出版社,1999.
- [5] 刘崇怀,沈育杰,陈俊,等. 葡萄种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京:中国农业出版社,2006.

## Primary Reports on Introduction of Table-grape in Guanzhong Area of Shaanxi Province

GONG Qian<sup>1</sup>, WANG Hua<sup>1,2</sup>

(1. College of Enology, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Six grape cultivars were introduced from 2009 to 2010 in Guanzhong area of Shaanxi Province. The cultivation modes including open culture, shelter and greenhouse were adopted to observing their phenological period, growth performance, quality, storage property and resistance to diseases. The results showed that in outdoor cultivation, ‘Yellow Rose’ and ‘Hutai No. 8’ could adapt to the climate of Guanzhong area. Under shelter from rain, the introduction of the ‘Yatomi Rosa’ and ‘Christmas Rose’ were successful. The ‘Huai No. 8’ was suitable for greenhouse.

**Key words:** grape; protected cultivation; introduced species; grape quality; Shaanxi

可见分光光度法<sup>[6]</sup>、薄层层析法<sup>[7]</sup>、高效毛细管电泳法<sup>[8]</sup>等多种鞣花酸含量分析方法,其中高效液相色谱法因高准确性应用越来越广泛。目前国内报道的高效液相色谱法中,游离鞣花酸提取方法多采用丙酮溶液浸泡 6~8 h 后超声或回流提取,耗时长操作繁琐,且丙酮的挥发性较强,操作中容易产生误差;提取后未经净化直接测定,容易产生干扰,且对色谱柱有一定污染<sup>[4,9-11]</sup>。

该研究试图建立  $C_{18}$  分散固相萃取法-高效液相色谱法测定草莓中鞣花酸,该方法操作简便,准确性高,以期可以应用于其它水果中游离鞣花酸和总鞣质含量的测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),配有紫外检测器、自动进样器及 ChemStation 色谱工作站。乙腈和甲醇(色谱纯)、三氟乙酸(分析纯)、鞣花酸(Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度 98.5%)、 $C_{18}$  填料(Dikma 公司)。标准溶液的配制:鞣花酸标准储备液浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的乙腈溶液,避光存储于 4℃ 冰箱,用乙腈逐级稀释为 20、10、5、2.5、1、0.5、0.1  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理 准确称取 10.00 g 草莓匀浆样品置于 50 mL 具塞刻度离心管中,加入甲醇:水(0.1%三氟乙酸)=80:20 提取液定容至 20 mL,涡旋混匀 3 min,10 000 r/min 离心 5 min。取 10 mL 上清液加入 20 mg  $C_{18}$  粉末,涡旋振荡 3 min,5 000 r/min 离心 5 min。取上清液过 0.45 mm 有机滤膜,滤液上机测定。

1.2.2 检测 色谱柱:Agilent Poroshell 120 SB- $C_{18}$  柱(100 mm×4.6 mm,2.7  $\mu\text{m}$ );检测波长: $\lambda=254\text{ nm}$ ;柱温:40℃;流动相:乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液(15:85,V/V);流速:0.8 mL/min;进样量:3  $\mu\text{L}$ 。按上述条件采用自动进样方式取 3  $\mu\text{L}$  标样或试样溶液测定,记录色谱峰的保留时间和峰面积,用保留时间定性,根据峰面积结果外标法定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 分散固相萃取条件的优化

该试验选择 2 种吸附剂(PSA 和  $C_{18}$ )进行优化,结果表明,PSA 对目标化合物的吸附较大,标准样品的回收率仅为 50%左右;而  $C_{18}$  不仅能够去除样品中的干扰,而且对目标化合物吸附很小,标准品的回收率可达 95%。

### 2.2 提取溶剂的选择

根据目标化合物的性质,该试验比较了乙腈、甲醇、乙腈:水=80:20、甲醇:水=80:20、乙腈:水(0.1%三氟乙酸)=80:20、甲醇:水(0.1%三氟乙酸)=

80:20 的 6 种提取液提取效果,结果表明,鞣花酸在乙腈:水和甲醇:水溶剂中提取回收率明显高于前 4 种。样品经乙腈:水(0.1%三氟乙酸)=80:20 提取后,经  $C_{18}$  净化后含有较多杂质,导致检测分离时间更长;样品经甲醇:水(0.1%三氟乙酸)=80:20 提取后,经  $C_{18}$  净化可有效去除杂质,从而缩短了检测时间。

### 2.3 色谱条件的选择

试验中选择 Shim-pack VP-ODS  $C_{18}$ 、Poroshell 120 EC- $C_{18}$  和 Poroshell 120 SB- $C_{18}$  3 种色谱柱,在该试验采用的酸性流动相条件下,3 种色谱柱均能实现化合物的测定,但前 2 种色谱柱鞣花酸标准品的色谱峰峰型较宽,存在拖尾问题。而使用 Poroshell 120 SB- $C_{18}$  检测时,鞣花酸标准品的峰形尖锐,与杂质的分离更好,有利于准确定量。

### 2.4 结果计算

将配制的鞣花酸标准品系列溶液按上述方法检测,经 ChemStation 色谱工作站计算拟合得到浓度范围在 0.1~10  $\mu\text{g/mL}$  的工作曲线。试样溶液按上述方法提取并检测,鞣花酸总残留量计算公式如下: $X=(c \times V_t \times V_d)/(m \times V_f)$ 。式中: $X$ :样品中总鞣花酸含量,mg/kg; $c$ :上机溶液中鞣花酸的浓度, $\mu\text{g/mL}$ ; $V_t$ :提取溶剂的总体积,mL; $V_d$ :净化后的溶液定容体积,mL; $V_f$ :分取用于净化的溶剂体积,mL; $m$ :样品质量,g。

### 2.5 方法灵敏度

在选定的色谱条件下测定一系列鞣花酸标准溶液(20、10、5、2.5、1、0.5、0.1  $\mu\text{g/mL}$ ),分别以峰面积  $Y$  对鞣花酸浓度  $X$  作图(鞣花酸标准品色谱图见图 1),ChemStation 色谱工作站自动拟合回归方程为: $Y=23.69245X+1.65403$ , $r=0.99981$ 。结果表明,在 0.1~20  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内线性良好;以 3 倍信噪比计算,该方法对鞣花酸的最低检出浓度为 0.0134  $\mu\text{g/g}$ 。

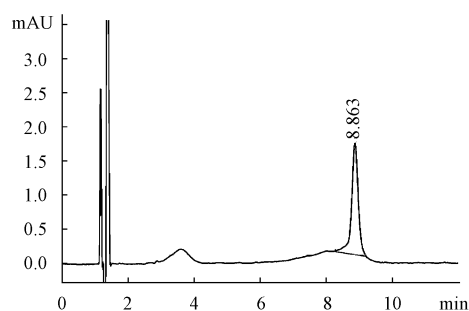


图 1 鞣花酸标准品色谱图

### 2.6 样品添加回收测试

选取草莓作为代表水果分别进行添加回收试验,准确称取 10.00 g 水果匀浆,分别按 3 个浓度水平添加鞣花酸标准品:1.0、5.0、20.0  $\mu\text{g/g}$ ,每个浓度设 6 平行。图 2 为草莓样品的典型色谱图,可知在上述色谱条件

下,鞣花酸与草莓基质中的杂质峰分离良好,有效保证了检测中鞣花酸定性的准确性和定量的灵敏度。添加回收试验表明,草莓中鞣花酸的添加水平为 1.0、5.0、20.0  $\mu\text{g/g}$ ,回收率分别为  $(93.4 \pm 2.69)\%$ 、 $(85.3\% \pm 3.02)\%$ 、 $(95.1 \pm 3.56)\%$ ,3 个浓度水平多次平行测定的精密度和准确度的 RSD 均小于 10%。

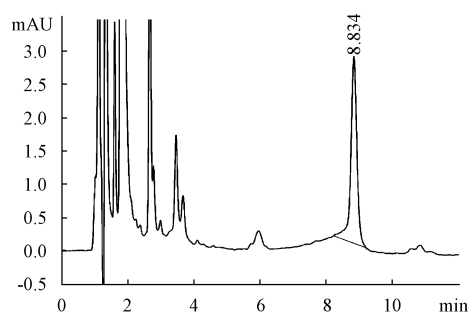


图 2 草莓样品的典型色谱图

### 3 结论

该试验在酸性条件下以甲醇溶液替代易挥发性有机溶剂提取鞣花酸,并用  $\text{C}_{18}$  粉末进行分散固相萃取净化,高效液相色谱法检测。该方法简化了试验步骤,可在 1~2 h 内完成样品前处理,提高了前处理的效率,具有简便快速、准确度较高的特点,适用于草莓中游离鞣花酸含量的分析。

### 参考文献

- [1] Angelika R, Ronald E W. Ellagic acid content of red raspberry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 1951-1960.
- [2] 李小萍,梁琪,辛秀兰,等. 红树莓果中鞣花酸提取物的抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(5): 182-185.
- [3] 陆晶晶,丁柯,杨大进. 保健品功能因子鞣花酸研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 451-454.
- [4] 李小萍,梁琪,辛秀兰,等. 高效液相色谱法测定红树莓中鞣花酸含量[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(24): 11345-11346.
- [5] 张强. 用溶剂法提纯工业单宁酸工艺的研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 1997, 27(4): 313-315.
- [6] 陈筋鸿,吴冬梅,汪咏梅,等. 紫外分光光度法测定鞣花酸含量的研究[J]. 生物质化学工程, 2007, 41(3): 18-20.
- [7] Lin T Y, Vine R P. Identification and reduction of ellagic acid in muscadine grape juice[J]. J. of Food Science, 1990, 55(6): 1607-1609.
- [8] 周本宏,吴振华,李小军,等. 高效毛细管电泳法测定石榴皮中鞣花酸的含量[J]. 中国药方, 2005, 16(24): 1893-1894.
- [9] 刘艳,宋立秋,范俊娟,等. HPLC 法测定蓝莓中鞣花酸含量[J]. 江苏农业科学, 2008(3): 217-219.
- [10] 周本宏,吴振华,刘春,等. 高效液相色谱测定石榴皮鞣花酸的含量[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(6): 693-694.
- [11] 晋艳曦. 葡萄汁中鞣花酸的定量与定性分析[J]. 饮料工业, 1999, 2(5): 33-36.

(该文作者还有王宝刚,工作单位同第一作者。)

## Determination of Ellagic Acid in Strawberry by Dispersive Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography

YANG Yuan<sup>1</sup>, SHI Lei<sup>1</sup>, ZHANG Jia<sup>1</sup>, LI Wen-sheng<sup>1</sup>, ZHANG Kai-chun<sup>1</sup>, FENG Xiao-yuan<sup>1,2</sup>, WANG Bao-gang<sup>1</sup>

(1. Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100093; 2. Beijing Research Center for Agrifood Testing and Farmland Monitoring, Beijing 100097)

**Abstract:** An analytical method was developed to extract and determine content of free ellagic acid in strawberry using dispersive solid phase extraction and high performance liquid chromatography (DSPE-HPLC). The free ellagic acid in strawberry was extracted under 0.1% trifluoroacetic acid-methane, and purified by  $\text{C}_{18}$  dispersive solid-phase extraction. Then strawberry sample was separated by column Poroshell 120 SB- $\text{C}_{18}$  (100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) and measured at UV wavelength of 254 nm with the mobile phase consisting of acetonitrile : water (0.1% trifluoroacetic acid) (15 : 85, V/V). The method could determine the free ellagic acid in strawberry and had fine linear relationship ( $r=0.99981$ ) when the range of ellagic acid was within 0.1~20  $\mu\text{g/mL}$ . Besides that, the minimum detection concentration was 0.0134  $\mu\text{g/g}$ , and average recoveries were 85.3%~95.1% with relative standard deviation (RSD, %) < 10%. In summary, this approach using DSPE-HPLC was capable to determine free ellagic acid in strawberry.

**Key words:** DSPE; HPLC; ellagic acid; strawberry