

半制备液相—高效液相色谱技术测定 红松树皮中多酚物质的研究

王吉昌¹, 王振宇^{1,2,*}, 文攀³, 樊梓鸾¹

(1. 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江哈尔滨 150090;

2. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 3. 琼州学院, 海南五指山 572200)

摘要: 采用超声波法提取红松树皮多酚, 对大孔树脂 AB-8 进行纯化, 半制备液相色谱技术进行二级纯化, 最后利用高效液相色谱技术对纯化的红松树皮多酚成分进行分析。鉴定出六种多酚化合物, 主要为酚酸类和黄酮类化合物, 分别为水杨酸、咖啡酸、香草酸、香豆酸、儿茶素和黄芩苷, 多酚含量分别为 (117.7 ± 3.1) 、 (54.2 ± 3.2) 、 (101.3 ± 2.8) 、 (321.4 ± 1.0) 、 (25.3 ± 1.9) 、 (8.05 ± 1.2) mg/100g, 相关系数 R^2 均大于 0.99。前期研究表明, 红松树皮多酚可以有效地清除自由基, 具有抗癌、抗辐射、抗疲劳等抗氧化生物活性, 主要和其中的多酚组成有密切关系, 为红松多酚进一步研究提供科学依据。

关键词: 红松树皮, 多酚化合物, 半制备液相, 高效液相色谱, 天然产物

Study on the polyphenols of *Pinus koraiensis* bark determined by semi-preparative liquid—high performance liquid chromatography

WANG Ji-chang¹, WANG Zhen-yu^{1,2,*}, WEN Pan³, FAN Zi-luan¹

(1. School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2. School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

3. Qiongzhou University, Wuzhishan 572200, China)

Abstract: The polyphenols of PKB was extracted by response surface optimizing ultrasonic method. Secondary, it was purified by macroporous resin AB-8 and semi-preparative liquid chromatography. And finally, the polyphenols component of PKB were analyzed by high performance liquid chromatography. There were more than six phenolic compounds identified in PKB, mainly phenolic acids and flavonoids, which were salicylic acid, caffeic acid, vanillic acid, coumaric acid, catechin and baicalin. Polyphenol content were (117.7 ± 3.1) , (54.2 ± 3.2) , (101.3 ± 2.8) , (321.4 ± 1.0) , (25.3 ± 1.9) , (8.05 ± 1.2) mg/100g respectively, correlation coefficient R^2 were more than 0.99. It had been showed that the polyphenol in PKB could eliminate free radicals effectively, owning anti-cancer, anti-radiation, anti-fatigue, anti-oxidation of biological activity, which were mainly related to the composition of polyphenols in PKB, that would provide the scientific basis for further research of red pine polyphenols.

Key words: red pine bark; polyphenol compounds; semi-preparative liquid; HPLC; natural products

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)02-0073-04

近年来药食同源的植物资源受到了广泛的重视, 开发自然界中具有生物活性的植物提取成分应用于保健食品和功能性植物制剂的研制具有巨大潜力及应用价值, 药用植物的开发及应用在人类疾病的预防和治疗中占有极其重要的地位。天然传统药物是创新药物研究开发的重要源泉, 与人工合成药物相比具有排异作用小、药效平稳持久、适用人群广泛等优点^[1]。红松亦称果松、海松。常绿乔木, 高达

40m。叶五针一束, 长 6~12cm, 松树皮丰富。红松是我国东北地区重要的松属树种, 分布于我国东北长白山到小兴安岭地区, 常与鱼鳞松、红皮云杉等组成混交林。研究表明, 松树植物中含有多酚类化合物, 具有抗氧化、抗肿瘤及抗菌等多种生物活性, 是天然的抗氧化剂^[2-3]。而红松树皮中含有大量的多酚类化合物, 为了寻找红松树皮的活性成分, 本文在国内外首次对小兴安岭红松树皮多酚组分进行了鉴定。通过本课题组对红松树皮多酚的药理活性和成分分析的研究^[4], 为红松树皮的综合利用、变废为宝提供科学依据。通过寻找其中的有效成分和活性先导化合物, 为新药的研究与开发奠定理论基础。

收稿日期: 2011-01-04 * 通讯联系人

作者简介: 王吉昌 (1985-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物分离纯化。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

儿茶素、黄芩苷、芦丁、肉桂酸、原花青素、异槲皮苷标准品 色谱纯;甲醇、三氟乙酸、乙腈 色谱纯, Sigma 公司;无水乙醇;实验用水 经 Milli-Q 净化系统(0.22 μ m 过滤膜)过滤的去离子水;其它试剂 均为分析纯;水杨酸,咖啡酸,香草酸,香豆酸。

1100 型高效液相色谱仪 配备 G1311A 型四元梯度泵, G1313A 型 100 位自动进样器, G13162A 型示差折光检测器, G1316A 型柱温箱, Agilent Zorbax carbo-hydrate 柱(4.6mm $\times$ 250mm, 5 μ m), Agilent 公司; LC3000 型半制备液相色谱仪 柱填料(Daisogel C₁₈-10u 100A), P3000 高压输液泵, UV3000 可变波长检测器, 层析柱(ϕ 50cm $\times$ 500cm), 北京创新通恒科技有限公司; 大孔树脂 AB-8 南开大学化工厂; KQ-5200 超声波清洗器, 高速万能粉碎机, Sp-752PC 型紫外可见分光光度计, R205 型旋转蒸发器, TGL-16G 高速离心机。

1.2 红松树皮多酚提取及纯化

1.2.1 红松树皮多酚样品提取 取 50g 红松树皮, 用万能捣碎机粉碎, 过 30 目筛置于 2000mL 烧杯中, 按料液比 1:30(g/mL) 加入 45% 乙醇, 置于超声波破碎仪中, 在 50℃, 超声功率 160W 条件下提取 30min, 以 4000r/min 转速离心 10min, 将残渣连续提取 3 次, 合并提取液。采用真空刮板式薄膜浓缩, 得到红松树皮多酚浓缩液^[5]。

1.2.2 红松树皮多酚纯化 用 AB-8 型大孔树脂富集红松树皮多酚, 乙醇进行梯度洗脱。再用真空刮板式薄膜浓缩设备浓缩, 最后使用真空冷冻干燥机真空冻干, 获得红松树皮多酚冻干粉末, 放置于 4℃ 冰箱中备用。

用半制备液相色谱进行二级纯化, 采用 Daisogel C₁₈-10u 100A 分析柱, 柱温(25℃) 下流量 10mL/min, 在紫外线探测器波长 280nm 下进行测定。对提取物分别采用三个非线性浓度梯度的混合溶剂洗涤, 溶剂 A: 在水中混入 0.02% 三氟乙酸(TFA), 溶剂 B: 在甲醇中混入 0.02% TFA。溶剂梯度体积比例如下 0~10min, 95A/5B; 10~30min, 50A/50B; 30~50min, 30A/70B; 50~60min, 95A/5B。两次进样的平衡时间为 10min, 重复进样 5 次, 根据出峰变化及时收集各段多酚组分, 然后用旋转蒸发器浓缩至 10mg/mL^[7]。

1.3 红松树皮多酚含量的测定

用 Folin-Ciocalteu 方法^[6] 测定提取物的总多酚含量。取 0.25mL 样品置于 25mL 容量瓶中, 容量瓶内预先放入 6mL 水, 加入 1.25mL Folin-Ciocalteu 试剂, 1min 后加入 20% 的碳酸钠水溶液, 最后用水定容至 25mL。对照组不加提取液, 其余试剂相同。25℃ 下水浴 2h, 测 760nm 的吸光值, 与没食子酸的标准曲线对比, 计算样品多酚含量, 数据处理为均值 $\pm$ 标准偏差(n=3)。

1.4 标准品溶液的配制

分别准确称取 5mg 水杨酸、咖啡酸、香草酸、香豆酸、儿茶素、黄芩苷、芦丁、肉桂酸、原花青素和异

槲皮苷, 用甲醇分别定容至 5mL, 得每个标准品的标准溶液。分别移取 1.00mL 各单个标准品, 混合定容至 25mL 得混合标准贮备液。使用时分别准确移取各标准贮备液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00mL, 用甲醇定容至 10mL。标准溶液不使用时置于 4℃ 冰箱中保存。

1.5 高效液相色谱分析条件

将红松树皮多酚化合物置于 250mm $\times$ 4.6mm, 颗粒尺寸 5 μ m, Zorbax carbo-hydrate 分析柱, 室温(22℃) 下流量 0.7mL/min, 在紫外线探测器波长 280nm 下测定。流动相条件同 1.2.2, 在两次注入之间可以有 10min 的平衡时间, 所有的提取物和标样都分别溶于浓度为 10mg/mL 和 0.5mg/mL 的甲醇溶液, 标样和样品溶液都分为三份^[7]。

2 结果与讨论

2.1 AB-8 大孔树脂富集红松树皮多酚结果

用 AB-8 型大孔树脂, 上样浓度 1.5mg/mL, 上样流速 2.0BV/h, pH 3.0, 乙醇为洗脱剂, 并采用 20%、40% 和 60% 乙醇进行梯度洗脱。洗脱流速 1.5BV/h, 洗脱程序为: 20% 乙醇洗脱 2.0BV, 40% 乙醇洗脱 2.0BV, 60% 乙醇洗脱 1.0BV, 每 5min 接一个管。采用福林酚法测定各管中多酚物质含量, 根据洗脱液各管中的多酚物质含量, 绘制洗脱曲线如图 1 所示。

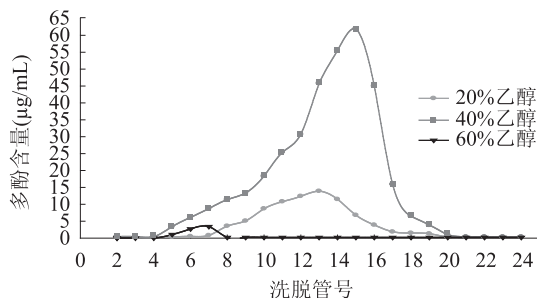


图1 AB-8 大孔树脂洗脱曲线图

Fig.1 Macroporous resin of AB-8 elution curve

由图 1 可以看出, 40% 乙醇洗脱液对 AB-8 大孔树脂的洗脱效果最明显, 最高达到 62.18 μ g/mL。合并 40% 乙醇洗脱液, 减压浓缩, 真空干燥获得红松树皮多酚粉末 1.85g, 置于 4℃ 冰箱中备用。

2.2 半制备液相色谱纯化红松树皮多酚结果

用半制备液相色谱进行二级纯化, 取 0.1g 冻干粉末置于 10mL 的甲醇溶液中, 用 0.45 μ m 有机膜过滤, 上样量 2mL, 根据出峰时间分别准确地收集洗脱液如图 2 所示, 反复进样 5 次, 合并洗脱液, 然后减压浓缩至 10mg/mL, 置于 4℃ 冰箱中备用。

2.3 标准样品的测定

2.3.1 标准样品色谱图 选用松属植物树皮中常见的水杨酸、咖啡酸、香草酸、香豆酸、儿茶素、黄芩苷、芦丁、肉桂酸、原花青素和异槲皮苷等标准品, 根据 1.5 的色谱条件进样, 经过和红松树皮多酚样品的比较, 鉴定出其中六种多酚的出峰时间和红松树皮多酚样品一致, 分别为 1: 水杨酸(salicylic acid), 2: 咖啡酸(caffeic acid), 3: 香草酸(vanillic acid), 4: 香豆

表1 回归方程和相关系数及检测限
Table 1 Regression equation, coefficient and detection limit

名称	标准曲线	相关系数 R ²	最低检测限(μg)	线性范围(μg·mL ⁻¹)
儿茶素	y = 13.279x - 8.664	0.9961	0.8	0.5~10
香豆酸	y = 44.726x - 46.063	0.9989	2.1	5~100
咖啡酸	y = 11.446x - 19.026	0.9999	0.6	40~200
香草酸	y = 24.358x - 22.086	0.9908	0.9	10~100
水杨酸	y = 3.293x + 85.636	0.9901	1.3	50~250
黄芩苷	y = 29.525x + 3.518	0.9962	0.2	0.5~10

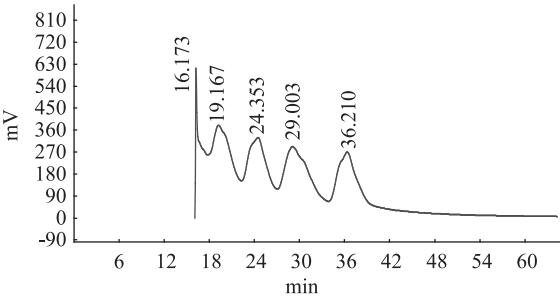


图2 半制备液相色谱图

Fig.2 Semi-preparative liquid chromatography
酸(coumaric acid), 5; 儿茶素(catechin), 6; 黄芩苷(baicalin)。多酚的标准样品色谱图如图3所示。

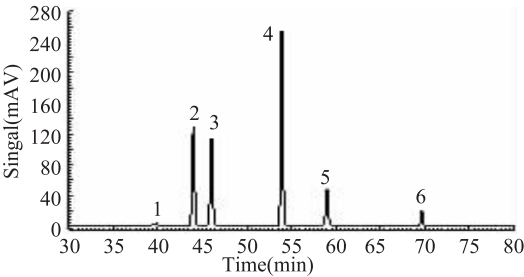


图3 多酚标准样品的高效液相色谱图

Fig.3 Chromatogram of polyphenols koraiensis standard sample
2.3.2 标准曲线和检测限的测定 根据 1.5 的色谱条件,分别将不同浓度的多酚标准溶液进样分析,根据峰面积与标准物质的含量关系进行线性回归,同时测得最低检出限,结果见表1。五种目标成分都在线性范围内,相关系数 R² 均大于 0.99,表明线性关系良好,能满足定量分析的要求。

2.4 红松树皮样品的测定

2.4.1 红松树皮样品中多酚物质的定性分析 在同样的分析条件下,根据 1.5 的色谱条件进样,将红松树皮多酚成分与标准品的保留时间进行对比,以及内部 PDA 紫外光谱进行鉴定。红松树皮样品的色谱图 4 与标准品色谱图 3 比较,鉴定其含有六种多酚化合物,分别为儿茶素(39.726min)、香草酸(44.092min)、咖啡酸(46.172min)、香豆酸(55.053min)、水杨酸(58.503min)和黄芩苷(85.332min)。

2.4.2 红松树皮样品中多酚物质的定量分析 样品中各酚类物质的含量以峰面积查相应的标准曲线求得,结果见表2。含量最丰富的是香豆酸(321.4 ± 1.0)mg/100g、水杨酸(117.7 ± 3.1)mg/100g 和香草酸(101.3 ± 2.8)mg/100g,其次是咖啡酸(54.2 ± 3.2)mg/100g 和儿茶素(25.3 ± 1.9)mg/100g,含量最少的

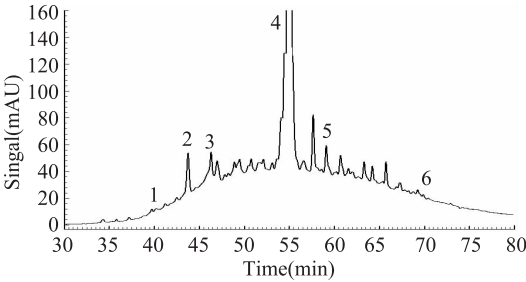


图4 红松树皮样品的高效液相色谱图

Fig.4 Chromatogram of polyphenols of *Pinus koraiensis* bark
成分是黄芩苷(8.05 ± 1.2)mg/100g。

表2 红松树皮中多酚物质的含量(mg/100g)

Table 2 The contents of polyphenol in *Pinus koraiensis* bark (mg/100g)

儿茶素	香草酸	咖啡酸	香豆酸	水杨酸	黄芩苷
25.3	101.3	54.2	321.4	117.7	8.05

3 结论

本实验利用半制备液相色谱-高效液相色谱技术研究红松树皮多酚化合物,在国内外首次鉴定出六种多酚化合物,主要为酚酸类和黄酮类化合物,分别为水杨酸、咖啡酸、香草酸、香豆酸、儿茶素和黄芩苷,多酚含量分别为(117.7 ± 3.1)、(54.2 ± 3.2)、(101.3 ± 2.8)、(321.4 ± 1.0)、(25.3 ± 1.9)、(8.05 ± 1.2)mg/100g。本课题组前期研究表明,红松树皮多酚具有多种药理活性成分,可以有效地清除自由基,具有抗癌、抗辐射、抗疲劳等多种抗氧化的生物活性,是一种具有较好前景的天然药用资源。本实验能为红松多酚进一步研究提供科学有效的理论依据。

参考文献

[1] Mahfuz E, Omer I, Ibrahim T, et al.Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms[J].Journal of Food Composition and Analysis,2007, 203:337-345.
[2] Ribeiro S M R, Barbosa L C A, Queiroz J H, et al.Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (Mangifera indica L.) varieties [J].Food Chemistry, 2008, 110: 620-626.
[3] Shikov A N, Makarov V G, Ryzhenkov V E.Plant fixed oils and oil extracts: Technology, standardization, properties [M]. Moscow:Publishing house Russian Doctor,2004:177-85.
[4] Xiao-Yu Su, Zhen-Yu Wang, Jia-Ren Liu.In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* bark extract containing phenolic compounds[J].Food Chemistry,2009, 117:681-686.

- [5] Wang Jichang, Wang Zhenyu, Fan Ziluan, et al. Optimization of ultrasonic extraction of polyphenol from pinus koraiensis bark using response surface methodology [J]. Advanced Materials Research, 2011, 183-185: 1874-1878.
- [6] Nunzia Cicco, Maria T Lanorte, Margherita Paraggio, et al. A reproducible, rapid and inexpensive Folin - Ciocalteu micro -

- method in determining phenolics of plant methanol extracts [J]. Microchemical Journal, 2009, 91: 107-110.
- [7] Tiina A Lantto, HJ Damien Dorman, Alexander N Shikov, et al. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a siberian pine (Pinus sibirica Du Tour) extract [J]. Food Chemistry, 2009, 112: 936-943.

(上接第 51 页)

的空间结构及前线轨道能量分布,结果显示半抗原连接到蛋白载体上未显著改变半抗原的前线轨道能量分布,为进一步制备高特异性抗体奠定了基础。

参考文献

- [1] 史志诚. 动物毒理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] McCracken R J, D Glenn Kennedy. Determination of furazolidone in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detection [J]. Journal of Chromatography A, 1997, 771 (1-2): 349-354.
- [3] Leitner A, Zöllner P, Lindner W. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Chromatography A, 2001, 939: 49-58.
- [4] 中华人民共和国农业部公告第 193 号. 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单 [S]. 2002.
- [5] European Commission. Commission Regulation (EC) No 1442/95 of 26 June 1995 amending Annexes II, III and IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin [S]. Off Eur Comm, 1995, L143: 26-30.
- [6] 林黎明, 林回春, 刘心同. 固相萃取高效液相色谱-质谱法测定动物组织中硝基呋喃代谢产物 [J]. 分析化学, 2005, 33 (5): 707-710.
- [7] Conneey A, Nugent A, Keefe M O, et al. Isolation of bound residues of nitrofurantoin drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 91-98.
- [8] Barbosa J, Moura S, Barbosa R, et al. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography - UV photodiode array detection and liquid chromatography - ionspray tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586 (1-2): 359-365.
- [9] Cooper K M, Mulder P P J, Van Rhijn J A, et al. Depletion of four nitrofurantoin antibiotics and their tissue-bound metabolites in porcine tissues and determination using LC-MS/MS and HPLC-UV [J]. Food Additives & Contaminants, 2005, 22 (5): 406-414.
- [10] Verdon E, Couedor P, Sanders P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major

- metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry - In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 86: 336-347.
- [11] Hartig L, Von Czapiewski K. Detecting nitrofurantoin metabolites in animal products using LC/MS/MS [J]. Spectroscopy Europe, 2005, 17 (3): 21-23.
- [12] Liu Y, Peng D P, Huang L L. Application of a modified enzyme-linked immunosorbent assay for 3-amino-2-oxazolidinone residue in aquatic animals [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 664: 151-157.
- [13] Cooper K M, Elliott C T, Kennedy D G. Detection of 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), a tissue-bound metabolite of the nitrofurantoin furazolidone, in prawn tissue by enzyme immunoassay [J]. Food Additives and Contaminants, 2004, 21: 841-848.
- [14] 常超, 伍金娥, 袁宗辉. 免疫化学方法测定动物组织中呋喃酮残留标示物 [J]. 分析化学研究报告, 2009 (4): 527-531.
- [15] 沈玉栋, 王宇, 孙远明, 等. 隐孔雀石绿半抗原与全抗原设计、合成及鉴定 [J]. 食品科学, 2008, 29 (7): 263-266.
- [16] Habeeb A F S A. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 14 (3): 328-336.
- [17] 袁利鹏, 孙远明, 雷红涛, 等. 沙丁胺醇人工抗原合成及鉴定研究 [J]. 食品科学, 2006, 27 (12): 276-280.
- [18] Vyskočil V, Labuda J, Barek J. Voltammetric detection of damage to DNA caused by nitro derivatives of fluorine using an electrochemical DNA biosensor [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397 (1): 233-241.
- [19] Shervington L A, Smith N, Norman E, et al. To determine the cytotoxicity of chlorambucil and one of its nitro-derivatives, conjugated to prasterone and pregnenolone, towards eight human cancer cell-lines [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009, 44 (7): 2944-2951.
- [20] Eck D L, Kurth M J, Macmillan C. Trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. Immunoassay methods [J]. ACS Symposium Series, 1990, 442: 79-94.
- [21] Xu Z L, Xie G M, Li Y X, et al. Production and characterization of a broad-specificity polyclonal antibody for O, O-diethyl organophosphorus pesticides and a quantitative structure-activity relationship study of antibody recognition [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 647 (1): 90-96.