

HPLC 法分离鉴定樟子松树皮多酚研究

欧阳乐¹,王振宇^{1,2,*},刘冉¹,梁薇薇¹,邓心蕊¹

(1.东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040;

2.哈尔滨工业大学食品科学与工程学院,黑龙江哈尔滨 150086)

摘要:使用高效液相色谱法对樟子松树皮中多酚类化合物进行分离及鉴定,考察了高效液相最佳的检测波长,优化了洗脱剂、酸、流速、柱温、进样量对多酚分离效果的影响。结果表明,在波长为 280nm 条件下,流动相为甲醇-水(0.05% TFA),流速为 1.0mL/min,柱温为 30℃,进样量为 5μL 时,色谱峰的分离效果好,峰形最佳。通过与标准样品进行比对鉴定后发现,樟子松树皮中含有七个单体酚,分别为对香豆酸、儿茶素、咖啡酸、芦丁、绿原酸、没食子酸、肉桂酸,其中对香豆酸和儿茶素的含量较高。

关键词:HPLC,樟子松树皮,多酚

Study on separation and identification scotch pine bark polyphenols with HPLC method

OUYANG Le¹, WANG Zhen-yu^{1,2,*}, LIU Ran¹, LIANG Wei-wei¹, DENG Xin-rui¹

(1.College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;

2.College of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150086, China)

Abstract: The HPLC method was employed to separate and determine polyphenols in bark of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*. To optimize the separation conditions, detecting wavelength, mobile phase, mobile rate, column temperature and injecting volume were investigated. The optimal chromatographic separating condition was established; the detecting wavelength was 280nm, mobile phase was methanol-water (0.05% TFA), mobile rate was 1.0mL/min, column temperature was 30℃ and injecting volume was 5μL. Through comparison with standard sample chart, p-Coumaric acid, catechin, caffeic acid, rutin, chlorogenic acid, gallic acid, cinnamic acid was detected in bark of *Pinus sylvestris* var. *mongolica*. The high content of p-Coumaric acid and catechin in bark of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* were analyzed.

Key words: HPLC; scotch pine bark; polyphenol

中图分类号: TS207.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)13-0276-04

多酚类化合物是广泛分布于植物体内的次生代谢产物^[1],是一类具有苯环并结合有多个羟基化学结构的化合物总称,其大量存在于植物的皮、根、叶、壳和果肉中,是许多药用植物的主要活性成分^[2]。近年来以茶多酚为代表的植物多酚已经受到了国内外广泛的关注^[3]。对松科植物的研究表明,其体内含有大量的多酚类化合物,且这些化合物具有较强的生理功能^[4-7]。目前对松多酚的研究通常也只关注的是松树皮的抗氧化活性^[8-10]、抑菌活性^[11-13]等生理功能研究,而对樟子松树皮中多酚的高效液相分离及单体组成等的研究尚未见报道。HPLC 因其高速、高效、高灵敏度、重现性好等优点已经广泛应用于天然产物的分离鉴定^[14-16],樟子松树皮中多酚作为一种资源丰富、廉价易得的天然抗氧化多酚,必将有着更大

的应用前景。本论文以樟子松树皮为研究对象,采用 HPLC 方法,分析不同洗脱条件对多酚类化合物的分离的影响,确定最佳的分离条件,并与标准样品进行比对,确定多酚的基本组成,为樟子松中多酚资源的优选、构效关系以及高效利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

樟子松树皮 黑龙江省苇河林业局,采集时间为(2011 年)9 月份,按照山上和山下分为高低两种海拔,同一海拔条件下分别按南北两个坡面随机采集 10 个树皮样本,共计 40 个样本混合作为一个。树皮样品低温干燥后粉碎过 40 目筛后-20℃密封冷冻,备用;咖啡酸(CAS 号:331-39-5)、肉桂酸(CAS 号 140-10-3)、水杨酸(CAS 号 69-72-7)、对香豆酸(CAS 号 501-98-4)、儿茶素(CAS 号 7295-85-4)、金丝桃苷(CAS 号 482-36-0)、芦丁(CAS 号 153-18-4)、槲皮素(CAS 号 117-39-5)、没食子酸(CAS 号 149-91-7)、异槲皮苷(CAS 号 482-35-9)、绿原酸(CAS 号 327-97-9)、白藜芦醇(CAS 号 501-36-0)、

收稿日期:2012-12-10 *通讯联系人

作者简介:欧阳乐(1989-),男,在读硕士研究生,主要从事功能性食品开发。

基金项目:国家自然科学基金项目(31170510)。

根皮苷(CAS号60-81-1)标准品 中国药品生物制品检定所,以上对照品纯度均大于98.5%(HPLC法);乙腈(色谱纯)、三氟乙酸(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、磷酸(分析纯)、冰乙酸(分析纯)、甲酸(分析纯) 天津科密欧化学试剂有限公司;AB-8型大孔树脂 天津南开大学化工厂。

Agilent 1260型高效液相色谱仪 美国安捷伦科技有限公司,包括四元泵、自动进样器、柱温箱、VWD检测器检测器、DAD二极管阵列检测器和在线脱气机;Sino Chrom ODS-BP反向色谱柱(5 μ m,4.6mm $\times$ 150mm) 大连依利特;SHB-3循环水多用真空泵 郑州杜甫仪器厂;RE-52A旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;TDL-40B-W台式低速大容量离心机 湖南星科科学仪器有限公司;KQ-500DE型数控超声波清洗机 昆山市超声波仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 供试品溶液的制备 迅速称取5.00g样品,加入125mL浓度为40%的乙醇提取剂,在80 $^{\circ}$ C条件下超声波提取2.8h^[17]。然后将提取物在3500r/min转速下离心,取出上清液,下层沉淀物中再加入提取剂,摇匀浸提,重复上述操作,合并提取液,用旋转蒸发仪减压浓缩至无醇味,回收乙醇,浓缩后定容至100mL容量瓶中,用福林-酚法测定多酚的浓度。用AB-8大孔树脂对提取液进行纯化和富集多酚,径长为1:20,提取物样品液浓度为1.5mg/mL,上样量为15mL,进样速度为2.0BV/h,以40%乙醇作为洗脱剂,洗脱速度为1.5BV/h^[18]。接两倍柱体积以后真空浓缩至干,用2mL甲醇复溶,过0.45 μ m有机微虑膜,备用。

1.2.2 检测波长的选择 根据前期预实验的结果,采用二极管阵列检测器(DAD)对7个混合标样(对香豆酸、儿茶素、咖啡酸、芦丁、绿原酸、没食子酸、肉桂酸)进行全波长扫描,扫描波长段为200~700nm。最后选择一个检出色谱峰数尽量多,各色谱峰的响应值尽量大的检测波长作为多酚HPLC的检测波长。

1.2.3 流动相及梯度程序的选择 对提取物分别采用三个溶剂进行洗涤,分别为:a:溶剂A:在水中混入0.05%三氟乙酸(TFA),溶剂B:甲醇;b:溶剂A:水,溶剂B:为甲醇;c:溶剂A:水,溶剂B:乙腈。其中洗脱程序见表1。

表1 流动相系统配比及梯度洗脱程序

Table 1 Ratio of mobile phase and program of gradient elution

时间(min)	0	11	16	23	33	60	65	70
溶剂A(%)	95	85	83	78	70	50	50	5
溶剂B(%)	5	15	17	22	30	50	50	5

两次进样的平衡时间为10min,重复进样5次,检测波长280nm,流速1.0mL/min,进样量为5 μ L,柱温30 $^{\circ}$ C。

1.2.4 不同酸的选择 分别在溶剂A:水中混入0.05%的TFA、磷酸、甲酸、冰乙酸,溶剂B:甲醇。检测波长280nm,流速1.0mL/min,进样量为5 μ L,柱温30 $^{\circ}$ C,梯度程序不变。分别重复进样三次,选择分离最佳的酸作为洗脱剂。

1.2.5 柱温对分离效果的影响 分别在柱温为15、20、25、30、35、40 $^{\circ}$ C条件下,检测波长为280nm,流速1.0mL/min,进样量为5 μ L,重复进样三次,选择最佳的洗脱温度。

1.2.6 流速对分离效果的影响 流速分别在0.6、1.0、1.4mL/min条件下,检测波长为280nm,柱温30 $^{\circ}$ C,进样量为5 μ L,分别重复进样三次,选择最佳的洗脱流速。

1.2.7 进样量对分离效果的影响 在检测波长为280nm,流速1.0mL/min,柱温为30 $^{\circ}$ C时,分别在进样量为3、5、10、15 μ L条件下,重复进样三次。考察最佳的进样量。

1.2.8 标准样品的制备 精确称取咖啡酸、肉桂酸、水杨酸、对香豆酸、儿茶素、金丝桃苷、芦丁、槲皮素、没食子酸、异槲皮苷、绿原酸、白藜芦醇12种松科植物体内常见的12个标准样品0.0050g于5mL容量瓶中,加甲醇进行溶解、定容,配成1mg/mL的母液;根据前期预实验的结果,精确量取上述对香豆酸、儿茶素、咖啡酸、芦丁、绿原酸、没食子酸、肉桂酸七个单体酚的母液各1mL于10mL的容量瓶中,加甲醇定容,配成0.1mg/mL的混合标准溶液。每个样品重复进样三次。

2 结果与讨论

2.1 混合标样的波长扫描结果

采用二极管阵列检测器(DAD)对7种混合标样(对香豆酸、儿茶素、咖啡酸、芦丁、绿原酸、没食子酸、肉桂酸)进行了全波长扫描,扫描波长段为200~700nm,其DAD三维图,扫描结果如图1所示。

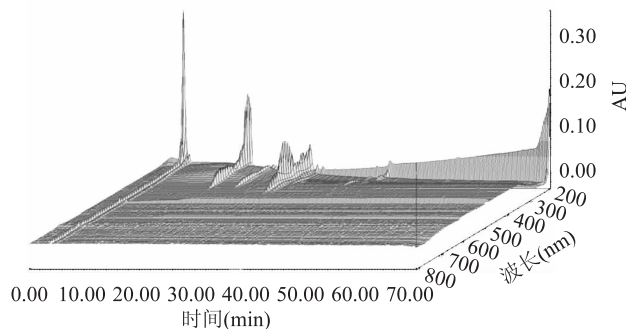


图1 DAD波长扫描三维图

Fig.1 The three-dimensional figure of DAD wavelength scanning

从图1可以看出,200~350nm波长段各个标样均有色谱峰,且响应值较大;超过350nm后基本上没有色谱峰,7种单体酚(对香豆酸、儿茶素、咖啡酸、芦丁、绿原酸、没食子酸、肉桂酸)在280nm条件下色谱峰响应值最大,因此,综合考虑选择280nm作为单体酚检测波长。此结果与韩国民^[19]的研究结果十分吻合。

2.2 流动相对多酚分离的影响

一共选择了三个不同的流动相,分别为甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(0.05% TFA),检测波长280nm,流速1.0mL/min,进样量为5 μ L,柱温30 $^{\circ}$ C。

如图2所示,甲醇-水的流动相对樟子松树皮多

酚的分离效果较好,加入 0.05% 的三氟乙酸以后进一步改善了峰型,在 25min 左右解决了峰的堆积问题;在 30min 左右改善了峰的拖尾问题;在水中添加三氟乙酸后 40min 之前的两个大峰出峰稍有并拢,但是解决了第一个大峰的拖尾问题,综合考虑后添加三氟乙酸使得整个分离的效果更加好;乙腈-水的流动相,多酚的出峰时间大为提前,峰主要集中在 10~20min 之间,分离的效果不佳,同时形成一个小的鼓包,不利于进行分析检测。从整个峰面积的角度考虑,甲醇-水(0.05% TFA)的流动相比乙腈-水流动相的峰面积要大,即甲醇-水(0.05% TFA)有利于对多酚进行分离。目前大量的研究均显示在流动相中加入一定量的酸能够起到较好的改善峰型作用。

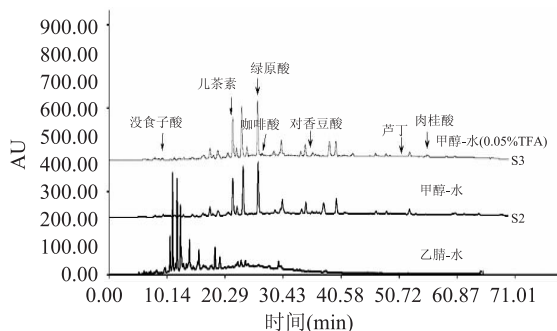


图2 流动相对多酚分离的影响

Fig.2 The activity of the polyphenol separation with flow

2.3 不同酸对多酚分离效果的影响

酸能够显著改善色谱柱的分离效果及峰型,目前已经广泛运用于色谱分离之中。但是流动相的 pH 过低,对机器的损伤程度大,会加速色谱柱的老化。实验检测波长为 280nm,流速 1.0mL/min,进样量为 5 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C。

由图 3 可知,在流动相中加入 0.05% 的三氟乙酸、甲酸、冰乙酸后能够显著地改善峰的分离效果及获得良好的峰型。但是在水中加入 0.05% 的磷酸以后,峰的分离效果反而变的更佳,可能由于磷酸对于多酚的分离没有效果有关,甚至改变了多酚的结构。三氟乙酸的沸点较低,易于挥发,且与其余其他几种酸相比,色谱柱平衡以后压力较小,对色谱柱的损伤小。综合考虑选择水中添加三氟乙酸到作为洗脱流动相。

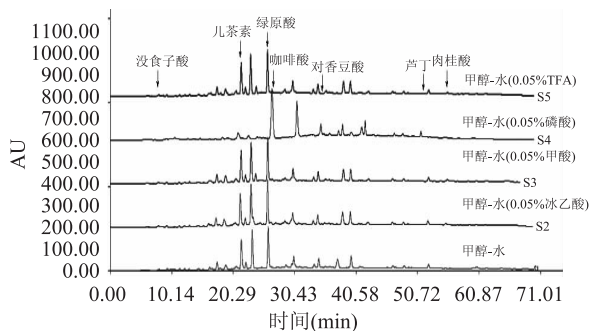


图3 不同酸对多酚分离的影响

Fig.3 The activity of the polyphenol separation with different acid

2.4 柱温对分离效果的影响

根据色谱分离原理,柱温对于色谱峰分离影响较为明显,洗脱程序不变时,洗脱溶剂为甲醇-水(0.05% TFA),检测波长为 280nm,流速 1.0mL/min,进样量为 5 μ L,柱温分别为 15、20、25、30、35、40 $^{\circ}$ C。

结果如图 4 所示,随着色谱柱温度的逐步升高,色谱峰的出峰时间逐步提前,色谱峰逐步进行堆积。而温度太低,分离时间加长,不利于分离效率的提高。15 $^{\circ}$ C 时,整体的峰型不佳,对称性不好。20 $^{\circ}$ C 及 25 $^{\circ}$ C 时,出现了峰堆积。35 $^{\circ}$ C 及 40 $^{\circ}$ C 时出现了峰的丢失,且温度过高会加速色谱柱的老化。综合峰型及色谱峰的分离效果,30 $^{\circ}$ C 为最佳的分离温度。

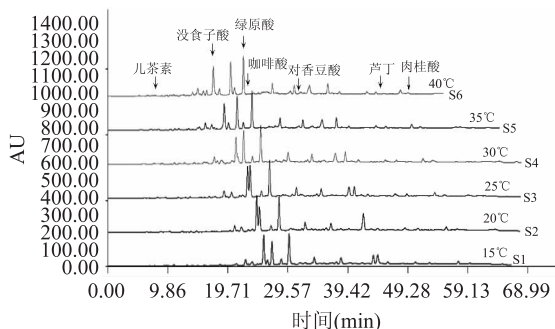


图4 温度对多酚分离的影响

Fig.4 The activity of the polyphenol separation with temperature

2.5 流速对分离效果的影响

在色谱柱已固定的情况下,流动相的流速也是影响分离效果的因素,流速过大会导致色谱峰的堆积,流速过慢又会使得分离的时间延长,因此需要确定一个适宜的流速,最大程度的吸附洗脱多酚。洗脱程序不变时,洗脱溶剂为甲醇-水(0.05% TFA),检测波长为 280nm,进样量为 5 μ L,柱温分别为 30 $^{\circ}$ C,流速分别为 0.6、1.0、1.4mL/min。

如图 5 所示,随着流速的增大,出峰时间逐步提前,色谱柱平衡时的压力也逐步增大。综合以上因素考虑,在流速为 1.0mL/min 时,各个色谱峰的分离效果好,峰型也较佳,故选择流速为 1.0mL/min。

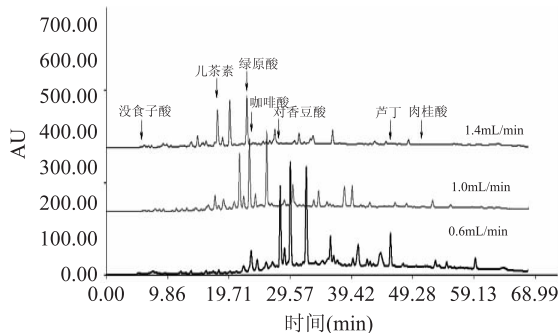


图5 流速对多酚分离的影响

Fig.5 The activity of the polyphenol separation with flow rate

2.6 进样量对分离效果的影响

进样量对色谱峰的分离也有一定的影响,在样品浓度一定时,进样量过大可能会造成色谱柱的体

积过载,出现一个较大的溶剂峰,同时出现峰的拓宽。洗脱程序和洗脱溶剂不变时,检测波长为280nm,柱温分别为30℃,流速为1.0mL/min,进样量分别为3、5、10、15 μ L。考察最佳的进样量。

结果如图6所示,进样量对色谱峰的影响较为明显,当进样量为3 μ L时,体积过小出现了谱峰的丢失;进样量达到10 μ L时,峰严重拓宽,峰型不佳,出现鸭舌峰。进样量继续加大达到15 μ L时,溶液出现过载,随溶剂峰一起出现。故综合考虑选择进样量为5 μ L。

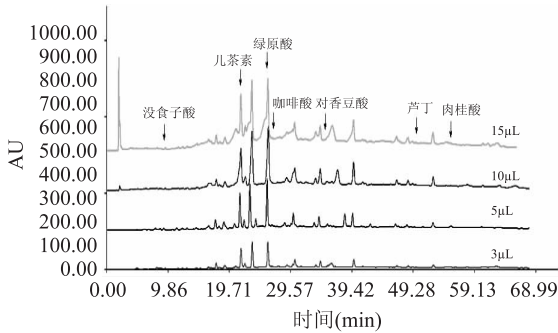


图6 进样量对多酚分离的影响

Fig.6 The activity of the polyphenol separation with injection volume

2.7 多酚标准样品的鉴定

高效液相色谱图显示了7种多酚标准样品的出峰时间(图7A),没食子酸、儿茶素、绿原酸、咖啡酸、对香豆酸、芦丁、肉桂酸的出峰时间为9.125、23.414、27.686、29.072、37.652、52.451、56.979min。

通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版软件,逐一将样品图谱与标准样品的图谱进行比对,确定了7个已知的标准样品。见图7B。

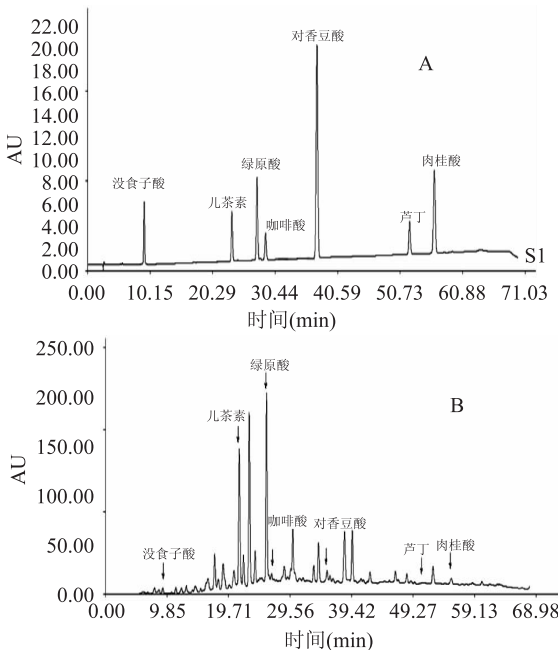


图7 多酚混合标准样品的高效液相色谱图及樟子松树皮多酚样品图

Fig.7 Chromatogram of polyphenols standard sample and Scotch Pine bark

3 结论

本实验通过使用高效液相色谱对樟子松树皮中多酚类化合物进行了分离研究,得出了最佳的检测波长、洗脱剂、不同酸、流速、柱温、进样量。通过与标准样品进行比对鉴定后发现,樟子松树皮中含有七个单体酚,分别为对香豆酸、儿茶素、咖啡酸、芦丁、绿原酸、没食子酸、肉桂酸。

参考文献

- [1] 谢久祥,林恭华,都玉蓉,等.油松不同部位多酚与单宁的含量比较研究[J].植物研究,2012,32(2):243-247.
- [2] 王雪飞,张华.多酚类物质生理功能的研究进展[J].食品研究与开发,2012,33(2):211-214.
- [3] GHISELLI A, NARDINI M, BALDI A, *et al.* Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(2):361-367.
- [4] Mara E M Braga, Rosa M S Santos, Inês J Seabra. Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark [J]. Journal of Supercritical Fluids, 2008, 47:37-48.
- [5] Anna Sokoł - Łętońska, Jan Oszmianski, Aneta Wojdyło. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap[J]. Food Chemistry, 2007, 103:853-859.
- [6] G Vfizquez, G Antorrena, J Gonzfilez, *et al.* Studies on the Composition of Pinus Pinaster Foliage [J]. Bioresource Technology, 1995, 51:83-87.
- [7] DANILA D M, MAURIZIO L G, SANTO G, *et al.* The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents[J]. Food Chemistry, 2008, 111:45-49.
- [8] 薄采颖,郑光耀,陈琰,等.松树皮多酚的亚临界水提取及抗氧化活性初探[J].林产化学与工业,2011,31(6):73-77.
- [9] 陈长武,昌友权,曲红光,等.松针提取物抗衰老氧化作用研究[J].食品科学,2005,26(9):465-467.
- [10] 苏晓雨,王振宇.红松种子壳多酚物质的提取及抗氧化特性[J].农业工程学报,2009,25(增刊):198-203.
- [11] 吴水华,刘艳红,李俊清,等.三种不同植物多酚提取物的抗真菌活性研究[J].科学技术与工程,2005,5(15):1073-1077.
- [12] 刘志芹.不同植物材料总多酚的测定及抑菌特性研究[D].北京:北京林业大学,2004.
- [13] 吴水华.几种森林植物的多酚含量及其抗菌效果研究[D].北京:北京林业大学,2005.
- [14] 刘锦文,李红玉,石瑞君,等.高效液相色谱法测定茶多酚中EGCG和ECG的含量[J].食品工业科技,2010,31(11):372-374.
- [15] Liqiong Sun, Xiaoping Ding, Jin qi, *et al.* Antioxidant anthocyanins screening through spectrum-effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China[J]. Food Chemistry, 2012, 132(2):759-765.
- [16] Lihu Yao, Yueming Jiang, Datta N, *et al.* HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (下转第288页)

大,缓冲液中的溶解度低,稳定性较差。

本研究采用紫外分光光度计以去淀粉麦麸为底物直接测定游离阿魏酸的含量,进而计算阿魏酸酯酶活性的方法是在前人方法的基础上加以改良得来^[22]。本研究的结果表明,在阿魏酸酯酶对底物作用之后,溶液的吸光度有较大的变化,很容易被测定出来,且方法学验证结果表明,分光光度法具有一定的准确性和精密度,其 RSD 都在 4% 以内,尤其是具有很好的加样回收率 99.86%,RSD 0.65%,说明紫外分光光度法用于测定阿魏酸酯酶活性具有一定的可行性。

去淀粉麦麸 UV 法测定阿魏酸酯酶活性所得酶活测定结果高于 HPLC 法测定的结果,但与 HPLC 法所得结果具有很好的相关性,可用于大量样品酶活的初步测定。

参考文献

- [1] Faulds CB, Aliwan FO, Vries RP, *et al.* Chemical and thermal stability of ferulic acid (feruloyl) esterases from *Aspergillus* [J]. *Biotechnology*, 1998, (15): 41–46.
- [2] 杨红建,岳群.一种阿魏酸酯酶活性的检测方法[P].中国,200710304762.0,2008–07–09.
- [3] Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. Production and characterization of the *Talaromyces stipitatus* feruloyl esterases FAEC in *Pichia pastoris*; identification of the nucleophilic serine [J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, (29): 176–184.
- [4] Mathew S, Abraham TE. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in Plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2004, 24(2): 59–83.
- [5] Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases [J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42(1): 497–509.
- [6] Ronald D Hatfield, Rechad F Helm, John Rulph. Synthesis of methyl 5-O-trans-feruloyl- α -L-arabino-furanoside and its use as a substrate to assess feruloyl esterase activity [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 194(1): 25–33.
- [7] Peter Biely, Maria Mastihubov, Willem H. van Zy, *et al.* Differentiation of feruloyl esterases on synthetic substrates in α -arabinofuranosidase-coupled and ultraviolet-spectrophotometric assays [J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 311: 68–75.
- [8] Barbe C, Dubourdieu D. Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation [J]. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 1998, 78(4): 471–478.
- [9] Borneman WS, Hartley RD, Morrison WH, *et al.* Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990, 33(3): 345–351.
- [10] 黄艳凤,周庆礼,李士炼,等.从黑麦麦麸中提取的阿魏酸的检测[J]. *药物生物技术*, 2004, 11(1): 49–51.
- [11] Donaghy J, McKay AM. Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum* [J]. *J Appl Microbiol*, 1997, 83(6): 718–726.
- [12] 周利茗,张志清.麦麸中阿魏酸检测方法及其提取工艺研究进展[J]. *粮油加工*, 2009, 11: 110–113.
- [13] 张璟,欧仕益,张宁,等.碱解麦麸制备低聚糖和阿魏酸的研究[J]. *广州食品工业科技*, 2003, 19: 17–22.
- [14] Shyamala Hegde, Pullabhatla Srinivas, Gudipati Muralikrishna. Single-step synthesis of 4-nitrophenyl ferulate for spectrophotometric assay of feruloyl esterases [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009(387): 128–129.
- [15] 欧仕益,张颖,张璟.碱解麦麸制备阿魏酸的研究[J]. *食品科学*, 2002, 23(8): 162–165.
- [16] 张帅兵,裴小琼,吴中柳.黑曲霉阿魏酸酯酶 A 的克隆、表达及快速酶活检测体系的建立[J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(2): 276–279.
- [17] 温度对酶活的影响 [EB/OL]. <http://wenku.baidu.com/view/49967592daef5e7ba0d3c63.html>
- [18] Q Yue, H J Yang, D H Li, *et al.* A comparison of HPLC and spectrophotometric methods to determine the activity of ferulic acid esterase in commercial enzyme products and rumen contents of steers [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, 153: 169–177.
- [19] Okamura S, Watanabe M. Measurement of hydroxycinnamic acid esterase activity by the change of UV absorption [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46(1): 297–300.
- [20] McCallum JA, Taylor IE, Toers GN. Spectrophotometric assay and electrophoretic detection of trans-feruloyl esterase activity [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196(2): 360–366.
- [21] Mastihubov V, Kremnický L, Mastihubova M, *et al.* A spectrophotometric assay for feruloyl esterases [J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 309(1): 96–101.
- [22] 欧仕益,张璟,汪勇,等.采用黑曲霉发酵制备阿拉伯木聚糖酶和阿魏酸酯酶的研究[J]. *食品科技*, 2004(4): 90–92, 95.

(上接第 278 页)

(*Camellia sinensis*) grown in Australia [J]. *Food Chemistry*, 2004, 84(2): 253–263.

[17] 苏晓雨,王振宇.红松子种皮中多酚成分的分离纯化研究[J]. *食品工业*, 2010(2): 24–25.

[18] 王吉昌.红松多酚分离鉴定及对辐射诱导氧化伤害的防护作用[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2011.

[19] 韩国民.葡萄酒多酚的 HPLC 指纹图谱的初步研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.