

桑椹片中多酚及花青素含量的测定

林耀盛, 刘学铭, 杨荣玲, 陈智毅, 杨春英, 赵晓丽, 王思远

(广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 省部共建国家重点实验室培育基地-广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 采用Folin-Ciocalteu法测定桑椹片中总多酚含量, 通过HPLC法分析其中花青素的主要花青素单体及含量, 及运用pH示差法测定其总花青素含量。该桑椹片的总多酚含量63.76 mg GAE/g, 总花青素含量为6.63 mg/g; 从HPLC花青素谱图中主要检测到矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-3-芸香苷这两种单体, 其含量分别为2.91 mg/g和2.55 mg/g, 含量之比1.14:1。该方法在2~500 $\mu\text{g/mL}$ 有很好的线性关系1.0000~0.9999, 平均回收率102.5~97.8%, RSD为0.93~1.01%。研究表明, 该方法更为灵敏、准确、重现性好, 通过HPLC方法建立, 综合了多酚和花青素单体的含量及其比例的测定能够有效地对桑椹片的质量控制。

关键词: 桑椹片; 花青素; HPLC; 质量控制

文章编号: 1673-9078(2013)4-890-893

Determination of Polyphenols and Anthocyanins Contents in Mulberry Tablet

LIN Yao-sheng, LIU Xue-ming, YANG Rong-ling, CHEN zhi-yi, YANG Chun-ying, ZHAO Xiao-li, WANG Si-yuan
(The Sericulture & Agri-Food Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

Abstract: The Folin-Ciocalteu method was used to determine the total polyphenol content of mulberry tablet. The main monomer and contents of anthocyanins were determined by HPLC. The pH differential method was applied to determine the total anthocyanins content. The total polyphenol content of Lipid-lowering tablets was 63.76 mg GAE/g and the total anthocyanin content was 6.63 mg/g. The monomer of cornflower-3-glucoside and cornflower-3-rutin were the main anthocyanin compounds with thire contents being of 2.91 mg/g and 2.55 mg/g, respectively. And the ratio of the two compounds was 1.14:1. A better linear relation was found in the range of 2~500 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=1.0000\sim0.9999$) and the average recovery rate was in the range of 102.5~97.8% with the RSD of 0.93~1.01%. The method applied in this research was sensitive, accurate and reproducible, which can be effectively used in the quality control of mulberry tablet.

Key words: mulberry tablet; anthocyanins; HPLC; quality control

桑椹, 为桑树的果实, 俗名桑枣、桑果, 呈椭圆形深紫色或黑色^[1]。自古以来桑椹就是中医临床中常用的中药材, 《新修本草》有“单食, 主消渴”; 《本草纲目》有捣汁饮, 解酒中毒, 酿酒服, 利水气, 消肿等记载。桑椹具有较好的口感, 且含有丰富氨基酸、维生素、花青素及微量元素等, 自古以来就作为水果和中药材被运用^[2-3]。对心脑血管、肝脏和神经系统具有独到的保护作用^[4-6]。桑椹片就以桑椹为主要原料, 配与山楂提取物等, 桑椹片不仅在功能成分提供改善

心脑血管循环, 扩张心脑血管作用, 具有降血脂、血糖的功效; 此外, 山楂中含有多酚等物质也能较好的清除自由基以及对膳食结构的改善, 以桑椹为材料的营养和保健食品已经成为降脂产品开发不可或缺的首选原材料之一。近几年对桑椹中具有营养和保健功能的多酚类物质的含量及组成研究鲜有报道, 桑椹产品质量控制主要指标主要是卫生标准, 这为开发功能食品发展相对滞后。为了更好地控制桑椹片的产品质量, 并与其它同类片进行鉴别, 本文对该桑椹片的总酚物质测定及花青素单体等指标分别进行了检测分析, 旨在利用HPLC图谱技术控制其质量。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

收稿日期: 2012-09-24

基金项目: 广东省科技攻关项目(2010A030100014)、广州市难题招贤项目(2011J5100010)、广东省农科院院长基金项目(201106)

作者简介: 林耀盛(1985-), 男, 研究实习员, 主要从事农产品和食品检测分析研究

通讯作者: 刘学铭(1967-), 男, 研究员

桑椹品种, 由广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所提供, 山楂提取物, 实验室制备。

1.1.2 试剂

矢车菊素-3-葡萄糖苷(C3G)和矢车菊素-3-芸香苷(C3R)购自法国 Extrasynthese 公司; 甲醇(色谱纯) Fisher 公司;

1.1.3 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司, 包括 VWD 检测器、Waters XBridge C₁₈ 柱(5.0 mm×4.6 mm×25 mm); 电子天平 ALC210.4, 德国赛多利斯; SB25-12 DTD 超声波清洗器; 配制试剂所用的水为经 Milli-Q II 纯水处理装置处理过的超纯水。

1.2 方法

1.2.1 总酚含量测定

总酚含量的测定参考 Singleton 等^[7-8]人的方法并稍作改进。125 μL 酚类物质提取物加入 0.5 mL 蒸馏水和 125 μL Folin Ciocatieu's 试剂。6 min 后加入 1.25 mL 7% 的碳酸钠溶液和 1 mL 蒸馏水, 暗室反应 90 min 后于 760 nm 下测定其吸光值。以没食子酸为标准物质计, 作回归方程, 单位为 10⁻² mg GAE/g, 实验三次重复。

Folin Ciocatieu's 试剂配制: 称取 50.00 g 钨酸钠和 12.50 g 钼酸钠, 用 350 mL 蒸馏水溶于 1000 mL 回流瓶中, 加入 25 mL 磷酸和 50 mL 盐酸, 混匀煮沸回流 2 h, 加入 75 g 硫酸锂, 25 mL 蒸馏水和数滴溴水, 开口沸腾约 15 min, 冷却定容至 500 mL, 过滤置棕色瓶中保存, 使用时加入一倍蒸馏水稀释。

1.2.2 总花青素含量测定

提取方法: 桑椹片样品经粉碎后, 准确称取 0.1 g 用 10 mL 65% 的酸性乙醇(含 0.1% 盐酸)超声提取 30 min, 共提取 3 次, 然后将 3 次提取液混合抽滤, 45 °C 减压浓缩下回收乙醇, 用蒸馏水定容到 100 mL, 摇匀, 备测。含量测定参照 Wrolstad 等^[9]的 pH 示差法进行测定。分别用 pH 1.0 缓冲溶液(25 mmol/L KCl, 用浓 HCl 调 pH 至 1.0)和 pH 4.5 的缓冲溶液(400 mmol/L NaAc, 用浓 HCl 调 pH 至 4.5)按照相同的稀释倍数将提取液进行稀释。测定两种稀释后的溶液在 520 nm 和 700 nm 的吸光度值。总花青素含量计算方法如下:

$$\frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

式中: A: 吸光值; DF: 桑椹提取液的稀释倍数; MW: Cv-3-glu 的分子量, 449.2; ϵ -Cv-3-glu 的消光系数, 26900。A=(A₅₂₀-A₇₀₀)_{pH1.0}-(A₅₂₀-A₇₀₀)_{pH4.5}。

1.2.3 单体花青素测定

(1) 对照品溶液的制备: 精密称取减压干燥至恒

质量的矢车菊-3-葡萄糖苷(G3G), 矢车菊-3-芸香苷(G3R)各 10 mg, 用纯净水溶解后定容于 10 mL 容量瓶中, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

(2) 桑椹花色苷单体分析测定 色谱分析条件参照 Baj 等^[10]的方法并进行优化。各样品测试液在液相分析前过 0.22 μm 微孔滤膜。色谱柱 XBridge C₁₈ 柱(5.0 mm×4.6 mm×25 mm), 预柱 4.6 mm×20 mm, 检测波长 520 nm 进样体积 20 μL, 柱温 25 °C, 记录 20 min 色谱图。流动相: A: 10% 甲酸水溶液, B: 乙睛: 甲醇: 甲酸: 水=25:10:10:40。梯度洗脱: 0~8 min, 16~20% B; 8~11 min, 20~38% B; 11~20 min, 38%~46% B。

(3) 供试样品的制备: 称取 0.1 g 桑椹片样品, 加入纯净水定容至 50 mL 容量瓶中, 摇匀, 0.22 μm 滤膜过滤。

2 结果与分析

2.1 桑椹片的总多酚测定

按方法 1.2.1, 得出没食子酸回归方程:

$$Y = 0.0046X + 0.1056 \quad (R^2 = 0.9973)$$

从结果不难看出, 桑椹片中富含多酚成分。

2.2 桑椹片总花青素及单体花青素的测定

2.2.1 标准曲线、检出限及精密度

准确称取一定量的 Cy-3-glu 和 Cy-3-rut, 用超纯水配成不同浓度的标准混合溶液, 进样 20 μL, 分别进行 HPLC 分析。两种主要花色苷 HPLC 色谱图(如图 1)所示, 线性范围和检出限如表 1 所示。

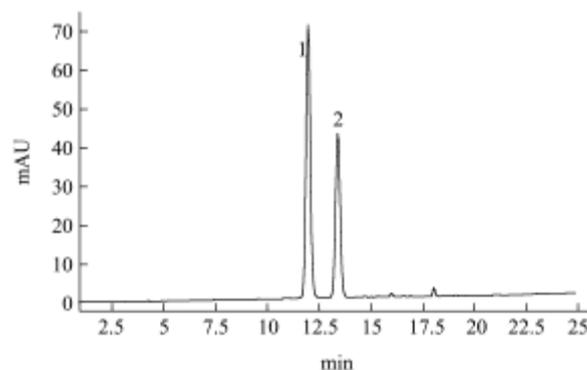


图 1 花色苷(1 C3G、2 C3R)标准品图谱

Fig.1 Chromatograms of C3G and C3R

注: Y 为吸光值, X 为没食子酸浓度(μg/mL)。总酚含量结果以每 100 g 样品所含的没食子酸当量(GAE)表示, 得到桑椹片总多酚含量为 6.376×10⁻² g GAE/g。

从表 1 中可看出, 将对照品溶液用 60% 酸化甲醇溶液稀释成 2、20、50、100、250、500 μg/mL 系列梯度混合标准溶液, 按 1.3.2 色谱条件进行检测, 记录各色谱峰峰面积, 以对照品峰面积对其浓度进行线性回归, 质量浓度 X (mg/L) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐

标, 0.9999~1.0000, 结果显示, 表明线性关系良好, 适用于定量分析。得系列化合物浓度分别在一定范围内呈良好的线性关系。根据方法 1.3.1 检测总花青素的含量为 6.63 mg/g; 在选定的条件下, 按照信噪比 ≥ 3 ($S/N=3$) 对最低检测限进行测定, 结果表明, 各物质最低检测限分别为 Cy-3-glu 15.3 ng/mL 和 Cy-3-rut 28.1 ng/mL。

表 1 回归分析、检出限

Table 1 Regression analysis and detection limits

花色苷	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	标准曲线	相关系数 R^2	检出限 (ng/mL)
Cy-3-glu	2~500	$y = 0.0158x + 0.4983$	1.0000	15.3
Cy-3-rut	2~500	$y = 0.0205x + 1.8691$	0.9999	28.1

2.2.2 花色苷测定的加标回收率

取同一桑椹降脂颗粒样品 2 份, 1 份作为空白, 另 1 份加入一定量的标准花色苷溶液, 对某一种浓度的花色苷混合标准溶液在所选色谱条件下做 HPLC 分析, 重复操作 6 次, 测定各有机酸的测定回收率和相对标准偏差(RSD)(表 2)。

表 2 回收率、相对标准偏差 ($\mu\text{g/mL}$, $n=6$)

Table 2 Recovery rate and relative standard deviation

花色苷 浓度	回收率 /%	平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	标准偏 差 S	RSD /%
Cy-3-glu	102.5	10.5	0.0984	0.93
Cy-3-rut	97.8	11.8	0.1191	1.01

由表 2 看出, 用高效液相色谱法测定桑椹降脂颗粒中花色苷的含量, 可操作性强, 该方法准确可靠, 回收率高达 97.8~102.5% 以上, RSD 为 0.93~1.01%, 结果精密度高重现性好。结果显示, 本法具有较好的重复性与灵敏度, 适用于定量分析, 该处理样品的方法具有较高的回收率。

2.2.3 桑椹片中花色苷的测定

分别准确称取桑椹降脂颗粒样品三份, 用 HPLC 法测定了其花色苷的种类及含量, 结果如图 2 和表 3 所示。

根据方法 1.2.2 检测, 总花青素含量为 6.63 mg/g; 按照方法 1.2.3 检测, 通过高效液相色谱图, 发现主要检测出矢车菊-3-葡萄糖苷, 矢车菊-3-芸香苷, 分别在 11.966 min 和 13.521 min 位置出峰, 得到主要的两种单体之和为总花色苷的 82.32%; 国外有关研究表明, 相关研究表明桑椹色素的主要成分是花青素。Liu 等^[1]经过 HPLC 分析表明桑椹色素提取物中有四种成分; Suh 等^[2]研究发现桑椹中的花青素成分主要是 C3G 和 C3R。这与研究的结果相符。该方法操作简单、快速、准确度灵敏高, 具有较高的回收率, 适用于定量分析,

可有效应用于桑椹片产品加工的质量安全控制。

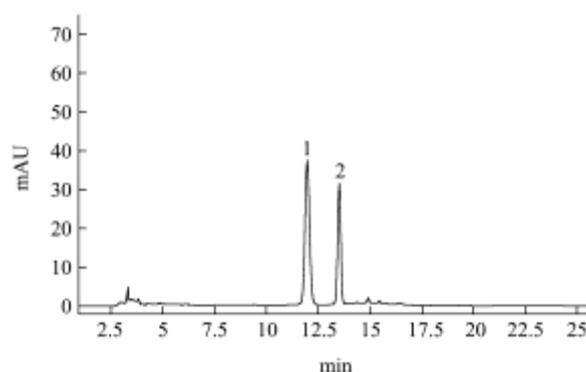


图 2 桑椹片样品花色苷 HPLC 图谱

Fig.2 Chromatograms of anthocyanin in mulberry tablet

表 3 花色苷的测定

Table 3 the determination of anthocyanin ($\times 10^{-2}$ mg/g)

编号	Cy-3-glu	Cy-3-rut	总花青素含量
桑椹	290.958 ± 0.003	254.839 ± 0.005	662.946 ± 0.004

3 结论

3.1 桑椹片具有较高的多酚成分及其他丰富的营养物质, 本文正利用总酚和总花青素控制桑椹片总体质量情况, 而我们知道, 不同物质花青素的差异性体现在花青素单体特异性; 桑椹中花青素单体主要以 C3G 和 C3R 为主, 我们原料中配以山楂等加深多酚的功能成份, 所以我们通过 HPLC 法进行检测, 进一步对桑椹片特有的两种主要的单体和总酚的含量确定, 这与刘学铭^[13]等运用 HPLC 方法检测这 C3G 和 C3R 两种单体的比例及含量来对桑椹红色素进行质量控制, 本文在此基础上综合总酚的含量测定, 为桑椹片的研究提供可行的鉴别方法。特别花青素是桑椹产品的特征营养成分, 适宜用作营养品的加工原料, 因此, 可以利用桑椹系列深加工可作为保健品等对人体有很好的保健功效。桑椹系列深加工产品的开发, 不仅能满足国内外广大消费者的需求, 而且可以大大提高桑椹的附加值, 增加地方经济和果农的收入, 市场消费前景广阔。

3.2 本文借鉴了国内外对桑椹花青素与多酚的含量测定方法, 为了更准确测定其中含量, 优化了方法, 建立 HPLC 法测定, 对花青素和多酚的 HPLC 图谱中的各主要花青素及多酚进行定量, 并将结果用于桑椹系列深加工产品的质量标准中, 构建新的质量标准体系。

参考文献

- [1] 刘学铭, 肖更生, 陈卫东. 桑椹的研究与开发进展[J]. 中草药, 2001, 6: 569-571
- [2] 吴祖芳, 翁佩芳. 桑椹的营养组分与功能特性分析[J]. 中国

- 食品学报,2005,5(3):102-107
- [3] 邹宇晓,吴娱明,施英.低糖桑椹红枣营养果酱的研制[J].现代食品科技,2008,24(11):1130-1132
- [4] Tsuda T, Horio F, Kitoh J, et al. Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Archives of Biochemical and Pharmacology, 1999, 368(2): 361-366
- [5] Chang C C, Li K L, Jeng D H, et al. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits [J]. Food Chemistry, 2005, 91: 601-607
- [6] Tong H K, Jin Y H, Hyun B K, et al. Neuroprotective effects of the Cyanidin-3-O-beta-D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia [J]. Neuroscience Letters, 2005, 53(8): 1-5
- [7] Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent [J]. Methods Enzymol, 1999, 299: 152-178
- [8] Dewanto V, Wu X, Adom K K, et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity [J]. Agric Food Chem, 2002, 50(10): 3010-3014
- [9] Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products [J]. Trends in Food Science Technology, 2005, 16: 423-428
- [10] Baj J, Bombardelli E, Gabetta B. Qualitative and quantitative evaluation of Vaccinium myrtillus anthocyanin high resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1983, 279: 365-372
- [11] Liu X M, Xiao G S, Xu Y J, et al. Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004, (5): 326-331
- [12] Suh H J, Noh D O, Kang C S, et al. Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract [J]. Nahrung Food, 2003, 47(2):132-135
- [13] 刘学铭,廖森泰,吴娱明.高色价桑椹红色素的研制及其质量控制研究[J].现代食品科技,2009,25(1):42-44