

文章编号: 1004-4353(2020)02-0160-04

# HPLC 法测定黑果腺肋花楸不同形态果实中的原花青素含量

胡祺鹏, 赵鹏宇, 安仁波, 金莉莉\*

( 延边大学 药学院, 吉林 延吉 133002 )

**摘要:** 为比较不同形态黑果腺肋花楸果实中的原花青素含量,采用高效液相色谱(HPLC)法对黑果腺肋花楸新鲜果实、烘干果实和果实粉末中的原花青素含量进行了测定.测定结果显示:黑果腺肋花楸新鲜果实、果实粉末和烘干果实中的原花青素含量分别为 8.6、7.0、5.2 mg/g.新鲜黑果腺肋花楸果实中的原花青素含量最高的原因可能是原花青素在 40 ℃ 以下时其稳定性较好.该结果可为黑果腺肋花楸的开发利用提供理论依据.

**关键词:** 高效液相色谱法;黑果腺肋花楸;原花青素;不同形态果实

中图分类号: R917

文献标识码: A

## HPLC determination of procyanidins in different form fruits from *Aronia melanocarpa*

HU Qipeng, ZHAO Pengyu, AN Renbo, JIN Lili\*

( College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China )

**Abstract:** In order to compare the proanthocyanidin content in different fruit states of *A. melanocarpa*, high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of proanthocyanidins in fresh, dried and fruit powders of *A. melanocarpa*. The results show that the content of proanthocyanidins in fresh fruits, fruit powders and dried fruits of *A. melanocarpa* are 8.6, 7.0 and 5.2 mg/g. The reason for the highest content of proanthocyanidins in fresh fruits of *A. melanocarpa* may be that proanthocyanidins have better stability under 40 ℃. This result can provide a theoretical basis for the reasonable development and utilization of *A. melanocarpa*.

**Keywords:** high performance liquid chromatography; *Aronia melanocarpa*; proanthocyanidins; different form fruits

## 0 引言

黑果腺肋花楸(*Aronia melanocarpa*)为蔷薇科腺肋花楸属多年生落叶灌木,果实为球形,果皮呈紫黑色,果肉呈暗红色.黑果腺肋花楸原产于北美洲东北部,目前我国辽宁、吉林、黑龙江等地有引种栽培<sup>[1]</sup>.研究表明,黑果腺肋花楸含有黄酮、花青素和原花青素、糖类、挥发油、维生素类、

钙、铁等多种成分<sup>[2-4]</sup>,其中多酚类化合物(原花青素)具有抗氧化、降血糖、改善血液循环、保护心脏、抗肿瘤、减轻妇女经前综合征等功效<sup>[5-9]</sup>,因此黑果腺肋花楸具有良好的药食两用价值<sup>[10]</sup>.

原花青素是一类以黄烷-3-醇为主要结构单元的缩合多酚类化合物,这些黄烷醇单元之间通常以 4→8 位或 4→6 位的碳-碳键连接,生成聚合度不同的复合体.研究表明,在食品中的原花青

收稿日期: 2020-02-24

基金项目: 吉林省教育厅项目(612019069)

\* 通信作者: 金莉莉(1978—),女,副教授,研究方向为中药现代化.

素中,二聚体的有8种、三聚体的有32种、四聚体的有128种、五聚体的有512种<sup>[11]</sup>。目前,测定花青素的方法有紫外分光光度法、香草醛-盐酸法、铁盐催化比色法、正丁醇-盐酸法、高铁盐-铁氰化钾比色法、高锰酸钾分光光度法、HPLC法等<sup>[12]</sup>;但由于原花青素的组成较为复杂,难以使用同一种方法测定其每一组分的含量,因此对于原花青素的测定方法至今未有统一的标准。HPLC法是一种灵敏、高效的色谱技术<sup>[13]</sup>,目前已有学者采用正丁醇-盐酸-HPLC法、疏解-HPLC法等方法对原花青素的含量进行了测定,并取得了较好的结果<sup>[14-15]</sup>。本文选用HPLC法测定黑果腺肋花楸新鲜果实、果实粉末和烘干果实中原花青素的含量,旨在开发利用黑果腺肋花楸提供参考。

## 1 实验仪器、材料与方法

### 1.1 实验仪器

WZ-180SP 旋转蒸发器,上海申科技有限公司; Chromaster 5430 二极管阵列检测器,郑州长城科工贸有限公司; MP200B 电子天平,上海精科天平仪器厂; Chromaster 5310 柱温箱,上海宝山顾村电光仪器厂; LC-10A 日立高效液相色谱仪,日本岛津公司; FC-203B pH 调节计,德国赛多利斯科技有限公司; Chromaster 5210 自动进样器,瑞士 Bruker 公司。

### 1.2 实验材料

原花青素标准品( $UV \geq 95\%$ ),上海如吉生物科技发展有限公司(CAS:4852-22-6);黑果腺肋花楸果实,购于吉林省汪清县蓝莓基地,经延边大学药学院吕惠子教授鉴定为黑果腺肋花楸果实;黑果腺肋花楸烘干果实(新鲜果实在烘箱中 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干制得);黑果腺肋花楸果实粉末(新鲜果实自然风干粉碎后制得);无水乙醇(分析纯)、柠檬酸(分析纯),天津科密欧化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯),辽宁泉瑞试剂有限公司;超纯水,用超纯水机制备(吉林省新通州教仪有限公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 浸膏的制备** 将30 g新鲜的黑果腺肋花楸果实粉碎,使用经柠檬酸酸化的乙醇(体积分数为60%、 $\text{pH}=3$ )回流提取3次(提取温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

提取时间1 h);合并3次提取液后进行减压浓缩,获得浸膏10.4 g。使用同样的提取方法和提取条件对烘干果实及果实粉末进行提取,得到各浸膏9.2 g。

**1.3.2 对照品溶液的制备** 在室温下称取原花青素对照品5.0 mg置于5 mL容量瓶中,加入甲醇定容至5 mL,得到1 mg/mL对照品溶液;吸取1 mg/mL对照品溶液5 mL置于10 mL容量瓶中,再加入经柠檬酸酸化的超纯水( $\text{pH}=3$ )定容至10 mL,得到0.5 mg/mL对照品溶液。按上述方法依次配制0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 mg/mL对照品溶液。

**1.3.3 供试品溶液的制备** 在室温下称取各浸膏0.02 g,分别置于1 mL容量瓶中,加入经柠檬酸酸化的超纯水( $\text{pH}=3$ )定容至1 mL,得到20 mg/mL供试品溶液。根据对照样品溶液中的原花青素含量确定稀释倍数。

**1.3.4 HPLC 条件选择** 经过预实验确定HPLC的最佳条件,即:流动相中水和甲醇的体积比为75:25,柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,检测波长为280 nm,进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$ ,流速为1 mL/min。

**1.3.5 线性关系考察** 取对照品溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ ,按1.3.4确定的色谱条件进样分析,并测定其峰面积,然后以浓度( $x$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归分析。

**1.3.6 重复性实验** 取供试品溶液,按1.3.4所确定的最佳色谱条件连续进样6次(每次 $10\text{ }\mu\text{L}$ ),并测定进样中原花青素的峰面积和保留时间,计算RSD值。

**1.3.7 精密度实验** 取系列对照品溶液,按1.3.4所确定的最佳色谱条件连续进样6次(每次 $10\text{ }\mu\text{L}$ ),并测定进样中原花青素的峰面积和保留时间,计算RSD值。

**1.3.8 稳定性实验** 取供试品溶液,按1.3.4所确定的最佳色谱条件以0、2、4、8、12、24 h为间隔时间连续进样6次(每次 $10\text{ }\mu\text{L}$ ),并测定进样中原花青素的峰面积和保留时间,计算RSD值。

**1.3.9 加样回收率实验** 取供试品溶液6份,分别加入对照品溶液1 mL,然后按1.3.4所确定的最佳色谱条件进样,并计算进样中原花青素的平均加样回收率和RSD值。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 原花青素的测定结果

原花青素的测定结果见图 1. 由图 1 可知, 对照品和供试品溶液中的各成分分离状况良好. 以浓度( $x$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归, 得到原花青素的回归方程:  $y = 23\,470x + 241.12$ ,  $R^2 = 0.9989$  ( $n=6$ ), 如图 2 所示. 由图 2 可以看出, 进样量在  $0.06 \sim 1.1 \mu\text{g/mL}$  范围内与峰面积呈线性关系.

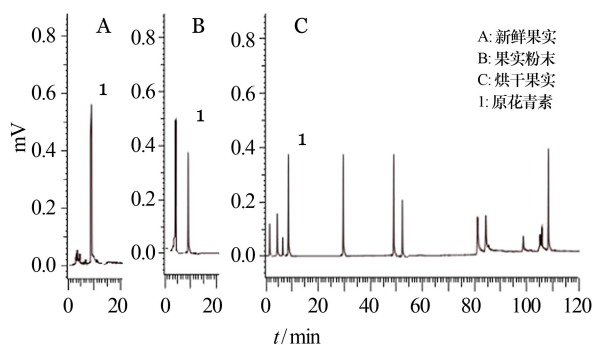


图 1 黑果腺肋花楸不同形态果实的 HPLC 图

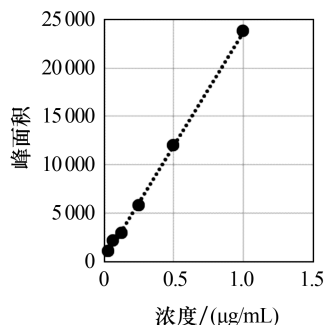


图 2 原花青素的标准曲线

按 1.3.4 确定的色谱条件对各批样品进行测定并计算原花青素的含量, 结果见表 1.

表 1 不同样品中原花青素的含量  $\text{mg/g}$

新鲜果实	8.6
果实粉末	7.0
烘干果实	5.2

### 2.2 方法学考察结果

**2.2.1 重复性考察** 取同一批新鲜黑果腺肋花楸果实浸膏  $0.02 \text{ g}$ , 平行 6 份(精密称定); 按 1.3.3 方法制备供试品溶液, 分别进行进样测定. 测定结

果显示, 原花青素峰面积的 RSD 值为  $0.78\%$  ( $<1\%$ ), 该结果表明方法的重复性良好.

**2.2.2 精密度考察** 取对照品溶液, 按 1.3.4 色谱条件连续进样 6 次, 以此考察各峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性. 结果显示, 原花青素峰面积的 RSD 值为  $0.99\%$  ( $<1\%$ ), 表明测定原花青素含量的仪器其精密度良好.

**2.2.3 稳定性考察** 取新鲜黑果腺肋花楸果实浸膏  $0.02 \text{ g}$ , 按 1.3.3 方法制备供试品溶液, 按 1.3.4 确定的色谱条件分别进样 0、2、4、8、12、24 h. 结果显示, 原花青素相对峰面积的 RSD 值为  $0.85\%$  ( $<1\%$ ), 该结果表明供试品溶液中的原花青素成分在 24 h 内稳定.

**2.2.4 加样回收率考察** 取新鲜黑果腺肋花楸果实浸膏  $0.02 \text{ g}$ , 平行 6 份(精密称定); 在浸膏中分别加入对照品溶液(按供试品中已知量的  $80\%$ 、 $100\%$ 、 $120\%$ ), 按 1.3.3 方法制备供试品溶液, 按 1.3.4 确定的色谱条件进样分析. 经计算, 原花青素的平均加样回收率为  $99.27\%$ , RSD 值为  $0.85\%$  ( $<1\%$ ), 该结果表明利用本文方法测定原花青素含量的准确度较好. 加样回收率的试验结果见表 2.

表 2 加样回收率的试验结果 ( $n=3$ )

序号	供试品中原花青素的质量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.172	0.14	0.308	98.718		
2	0.172	0.17	0.338	98.830	99.27	0.85
3	0.172	0.20	0.373	100.269		

## 3 结论

本文采用 HPLC 法测定了不同形态黑果腺肋花楸果实中的原花青素含量, 结果显示: 新鲜黑果腺肋花楸果实中的原花青素含量为  $8.6 \text{ mg/g}$ , 黑果腺肋花楸果实粉末中的原花青素含量为  $7.0 \text{ mg/g}$ , 黑果腺肋花楸烘干果实中的原花青素含量为  $5.2 \text{ mg/g}$ . 新鲜黑果腺肋花楸果实中的原花青素含量最高的原因可能是原花青素在  $40^\circ\text{C}$  以下时其稳定性较好<sup>[4]</sup>, 而黑果腺肋花楸果实粉末和黑果腺肋花楸烘干果实中的原花青素含量相对较低的原因可能是在烘干( $60^\circ\text{C}$ )和加工(粉末)果

实过程中破坏了果实中的原花青素成分. 本文研究结果可为黑果腺肋花楸的开发利用提供参考.

### 参考文献:

- [1] 张衡锋,汤庚国. 黑果腺肋花楸的植物学研究进展[J]. 天津农业科学, 2018, 24(6): 5-9.
- [2] 滕飞,李丽,皮子凤. 黑果腺肋花楸原花青素分离纯化工艺研究[J]. 长春师范大学学报, 2019, 38(4): 67-72.
- [3] 宋健刚. 黑果腺肋花楸果实活性成分的提取、纯化及体外活性研究[D]. 吉林: 吉林化工学院, 2019.
- [4] 冯彬彬. 莲房原花青素提纯分离工艺条件及优化研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [5] KURT A, PETER M, ESTRELLA M, et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF- $\kappa$ B and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages [J]. *Fitoterapia*, 2015, 105: 73-82.
- [6] MARIE B, RUNE S, HELLE W, et al. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors [J]. *Nutrients*, 2013, 5(3): 663-678.
- [7] DUMITRITA R, ZORITA S, LOREDANA L, et al. Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on HeLa human cervical tumor cells [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15(8): 700-706.
- [8] MARIE B, HEGE C, SIRI J, et al. *In vitro* inhibition of cytochrome P450 3A4 by *Aronia melanocarpa* constituents [J]. *Planta Medica*, 2013, 79(2): 137-141.
- [9] CAO P, ZHANG Y, HUANG Z, et al. The preventative effects of rocyanidin on binge ethanol-induced lipid accumulation and ROS overproduction via the promotion of hepatic autophagy [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63(18): 55.
- [10] ESATBYOGIU T, RODRÍGUEZ-WERNER M, WINTERHALTER P. Fractionation and isolation of polyphenols from *Aronia melanocarpa* by countercurrent and membrane chromatography [J]. *European Food Research and Technology*, 2017, 243(7): 1261-1275.
- [11] 滕飞. 黑果腺肋花楸原花青素类成分分析及功能食品的研制开发[D]. 长春: 长春师范大学, 2019.
- [12] 格日勒, 元伟, 刘淑娟. 原花青素 HPLC 测定方法研究进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(6): 6-9.
- [13] 朱月, 张海平, 侯亚男, 等. 黑果腺肋花楸原花青素的纯化及表儿茶素和原花青素 B<sub>2</sub> 含量测定[J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 240-244.
- [14] 张文君, 张国锋, 王立, 等. UPLC 法同时测定黑果腺肋花楸浆果中原花青素 B<sub>1</sub>、原花青素 B<sub>2</sub>、原花青素 B<sub>4</sub>、芦丁、槲皮素 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4452-4455.
- [15] JAN O, SABINA L. Effect of the production of dried fruits and juice from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds [J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 1098.