

高效液相色谱切换波长法同时测定 葡萄组织中单体酚

张 昂 房玉林* 王 华 宋建强 张予林 宋士任

(西北农林科技大学葡萄酒学院, 杨凌 712100)

摘 要 建立了切换检测波长同时测定葡萄组织中单体酚含量的高效液相色谱方法,使得全部待测物质能够在其最大吸收波长下得到检测。应用 Zorbax C₁₈柱,以 1.3%的乙酸水溶液和乙腈为流动相,梯度洗脱,流速 0.8 mL/min,柱温 30。结果显示:各组分均得到很好分离,校准曲线的线性关系良好($r = 0.9990$);平均加标回收率 89.5%;保留时间及峰面积在日内($n = 10$)和日间($n = 10$)实验中的 RSD 分别 0.3%、2.9%和 0.3%、3.1%;与恒定检测波长的方法相比,该方法明显地降低了被测物质的检出限,并且在测定实际样品中得到了基线平稳、分离效果和峰形皆好的色谱图。该方法预处理简单、灵敏、重现性好。

关键词 高效液相色谱,切换波长,葡萄组织,单体酚

1 引 言

高效液相色谱法(HPLC)因其检测的有效性和准确性而被广泛应用于农药残留^[1]、激素^[2]、多酚类物质^[3-5]及有机酸^[6]等多个实际检测领域中。在通常情况下,利用高效液相色谱法测定样品时需要经过一系列复杂的提取和纯化程序,且大都是在恒定波长下进行检测。对单组分体系而言,在恒定波长下进行测定是行之有效的。但在对多组分体系进行测定时,由于各组分的最大吸收波长不尽相同,加之繁琐的提纯前处理过程会使待测物质有一定的损失,因此利用恒定波长法很难全面检测出多组分体系中各组分的真实含量。为了提高多组分体系检测的灵敏度并客观地反映多组分中被测组分的真实含量,应该尽可能地简化样品的提纯前处理步骤,并在各物质的最大吸收波长下进行检测,尤其是对微量、痕量物质。

植物多酚(plant polyphenol)是一类广泛存在于植物的皮、根、茎内,具有生物活性的天然化合物。它作为一种可再生的绿色资源,被广泛地应用在化工、医药、林业、农业等领域食品等领域^[7]。本实验利用高效液相色谱仪紫外二极管阵列检测器(HPLC-DAD)及紫外分光光度计对 6 种单体酚的混合标样进行全波长扫描,通过分析得到了每种组分的最大吸收波长。并在此基础上,分别以酿酒葡萄(*Vitis vinifera* L.)品种黑比诺(pinot noir)的果实、冬芽、一年生枝条的韧皮部和木质部为材料,经过简单的提纯前处理得到待测液后。通过在合适的保留时间点切换检测波长,建立了葡萄组织中单体酚类物质同时定量分析的精确方法,并将其成功地用于对上述材料中的 6 种单体酚含量进行测定。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

LC-2010A_{HT}型高效液相色谱仪(配备自动进样装置)、LC-6AD型高效液相色谱仪配备 SPD-10MA_{VP} 二极管阵列检测器(DAD),所有部件均由岛津 CLASS-VP 6.12 工作站控制;UV-1700 型紫外分光光度计(日本岛津公司);MLIPORE ZMQS 5001 型超纯水制备仪(法国 MLIPORE 公司);SORVAL RC-5C-PLUS 型高速冷冻台式离心机(美国 Kendro 公司);BÜCHI 旋转蒸发器(瑞士 BÜCHI 公司);KQ-300DE 型数控超声波机(昆山仪器有限公司)。

没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯和白藜芦醇等标样均购自 Sigma 和

2007-04-26 收稿;2007-07-25 接受

本文系国家重点成果推广项目(Na 2004EC000317),西北农林科技大学青年学术骨干支持计划(Na 01140302)资助

* E-mail: fangyulin1973@yahoo.com

Fluka公司;甲醇和乙腈为色谱纯(美国 TED A 公司);乙酸为国产分析纯。实验材料为成熟度良好的葡萄果实和休眠期一年生枝条的冬芽、韧皮部和木质部。

2.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为 1.3% 乙酸水溶液, B 为乙腈; 洗脱程序: 0.00 ~ 0.01 min, 0 ~ 14% B; 0.01 ~ 6.50 min 14% ~ 11% B; 6.50 ~ 10.00 min 11% B; 10.00 ~ 10.01 min 11% ~ 16% B; 10.01 ~ 30.00 min 16% ~ 30% B; 30.00 ~ 35.00 min 30% ~ 0 B。波长程序: 5.72 ~ 6.02 min, 272 nm; 7.17 ~ 7.60 min, 260 nm; 8.58 ~ 9.18 min, 12.82 ~ 13.74 min, 280 nm; 20.39 ~ 21.22 min, 275 nm; 29.59 ~ 30.4 min, 306 nm; 其余时间段的检测波长均为 360 nm。流速: 0.8 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C。

2.3 对照品溶液的配制

称取 6 种标样各 5 mg, 用甲醇定容在 10 mL 的棕色容量瓶中, 然后依次稀释 20、40、100、200 和 400 倍, 混标溶液密封保存于 -20 °C 冰箱中备用。

2.4 待测样品的提取

称取 1 ~ 2 g 样品, 用液氮研磨至粉末状, 加入 15 mL 95% 甲醇搅匀 (料液比为 1:10), 迅速转移至套有黑纸的离心管中, 于 4 °C 下在超声波机中低温 (4 °C) 密封提取 15 min, 以 10000 r/min 离心 10 min (4 °C)。再重复提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩至 15 mL, 即为待测液, 于 -20 °C 避光保存待测。

3 结果和讨论

3.1 色谱条件的优化

3.1.1 流动相的选择 对不同酸浓度的甲醇和乙酸水溶液、乙腈和乙酸水溶液作为流动相进行考察, 经过多次实验后, 发现以乙腈和 1.3% 乙酸水溶液作为流动相效果较佳。

3.1.2 检测波长的选择 利用紫外二极管阵列检测器对 6 种单体酚的混标溶液在 190 ~ 800 nm 范围内进行扫描, 得到各物质最大吸收波长带 (图 1 a)。然后用紫外分光光度计确定各物质的最大吸收波长 (图 1 b)。没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯及白藜芦醇的最大吸收波长分别为: 272、260、280、280、275 及 306 nm。根据相对保留时间选择合适的切换波长时间点, 其余检测时间段均为恒定波长 360 nm (在 360 nm 下可以避免溶剂峰及许多杂质峰的出现)。仪器运行过程中, 在 190 ~ 370 nm 以内任意切换检测波长, 波长的响应及稳定时间不超过 0.1 s (此数据为仪器的性能参数, 由日本岛津公司提供)。本实验选择在 0.01 min 内切换波长, 并得到很好的效果。

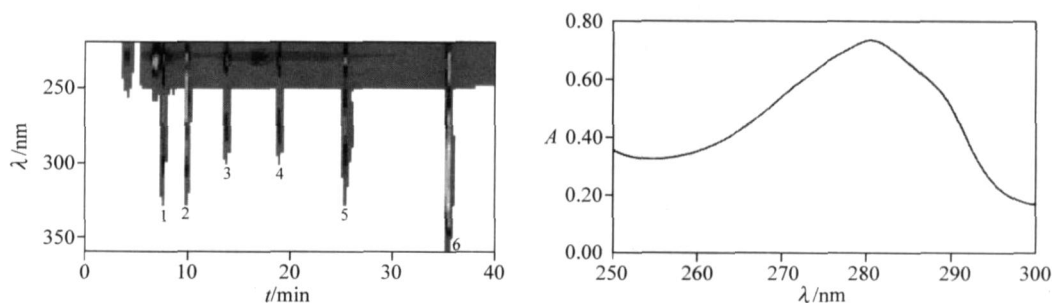


图 1 混标等高线图 (a) 和儿茶素的光谱图 (b)

Fig 1 Contour map of mixed standard substances (a) and spectrum of (+)-catechin (b)

峰序号 (serial number of peaks): 1. 没食子酸 (gallic acid); 2. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 3. 儿茶素 (3-(+)-catechin); 4. 表儿茶素 (4-(-)-epicatechin); 5. 表儿茶素没食子酸酯 ((-)-epicatechin-3-O-gallate); 6. 白藜芦醇 (trans-resveratrol)。

3.2 定性实验

利用相对保留时间法及标准加入法定性。对比混标溶液和各样品供试液在相同的色谱条件下进样的色谱图和相对保留时间;在样品中分别加入适量的各种标准物质,比较相同色谱条件下不加标样品及加标样品的色谱图。如图 2 所示,在样品中加入标样前后,白藜芦醇(trans-resveratrol, RES)出峰的位置是一致的。

3.3 分析方法的评价

3.3.1 标准曲线和相关系数

将混合标样溶液按浓度从由低到高在高效液相色谱仪中设置自动进样,每个浓度重复进样 3 次,以每种各单体酚的平均峰面积(A)对浓度(C, mg/L)绘制校准曲线,并计算相关系数(见表 1)。

表 1 6 种单体酚标准曲线的回归分析和检出限

Table 1 Regression analysis of calibration curves and LOD of 6 mono-phenolics

对照品 Marker compounds	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range (mg/L)	检出限 Detection limit (mg/L)	
				at 280 nm	切换波长 Switching wavelength
没食子酸 Gallic acid	$A = 0.0001C - 9.584$	0.9991	1.38 ~ 550	0.54	0.27
原儿茶酸 Protocatechuic acid	$A = 0.0002C - 6.093$	0.9990	1.42 ~ 568	0.66	0.33
儿茶素 (+)-Catechin	$A = 0.0005C - 10.051$	0.9990	1.31 ~ 523	0.61	0.62
表儿茶素 (-)-Epicatechin	$A = 0.0005C - 2.810$	0.9992	1.28 ~ 510	0.93	0.93
表儿茶素没食子酸酯 (-)-Epicatechin-3-O-gallate	$A = 0.0002C - 1.346$	0.9991	1.33 ~ 532	0.79	0.76
白藜芦醇 Trans-Resveratrol	$A = 0.00001C - 1.595$	0.9993	1.75 ~ 699	0.43	0.24

3.3.2 两种色谱条件下色谱图和检出限(LOD)的比较

在两种色谱条件下分析同样的样品,一种是切换检测波长的色谱条件;一种是 280 nm 的恒定波长条件。以信噪比(S/N)大于 3 时所检测出各种物质的量为最低检出限,色谱图见图 3,检出限见表 1。

3.3 加标回收率、精密度、准确度实验

准确称取葡萄果实和冬芽进行加标回收率实验,分别在样品中加入高、中、低 3 个水平的混合标样,每组重复进样 6 次,测定其回收率,并计算含量的相对标准偏差(RSD);对一定浓度的混标溶液进行日内和日间实验,日内连续进样 10 次,日间每隔 1 d 进样 1 次并持续 10 d,计算每一种单体酚的相对保留时间和峰面积的 RSD(见表 2)。

3.4 葡萄组织中单体酚的测定

利用上述方法对各种葡萄组织中的单体酚进行定量分析,每种葡萄组织设置 3 次重复,每个样重复测定 3 次,结果见表 3。结果表明:不同葡萄组织里的酚类物质分布存在较大的差异,枝条中含有丰富的酚类物质。

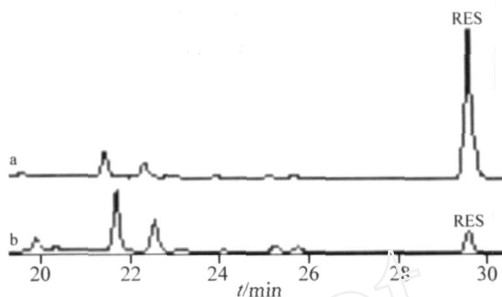


图 2 加入标准物质的样品(a)和未加入标准物质的样品(b)的色谱图

Fig 2 Chromatograms of sample added standard substance (a) and sample (b)

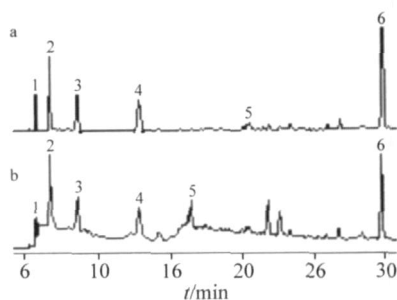


图 3 韧皮部的色谱图

Fig 3 Liquid chromatogram of individual phenolics in phloem

a 切换检测波长 (switching detection wavelength); b 恒定检测波长 (constant detection wavelength)。峰序号 (serial number of peaks): 1. 没食子酸 (gallic acid); 2. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 3. 儿茶素 ((+)-catechin); 4. 表儿茶素 ((-)-epicatechin); 5. 表儿茶素没食子酸酯 ((-)-epicatechin-3-O-gallate); 6. 白藜芦醇 (trans-Resveratrol)。

表 2 6种单体酚的加标回收率,方法的精密度

Table 2 Average recoveries, precisions and repeatabilities of 6 individual phenolics

单体酚 Individual phenolics	样品含量 Contents in samples (mg)		添加量 Added (mg)	测定量 Found (mg)		平均回收率 Average recoveries (%)		含量相对标准偏差 RSD of contents (%)		相对保留时间的 RSD RSD of retention time (%)		峰面积的 RSD RSD of peak area (%)	
	果实 Grape berry	冬芽 Winter bud		果实 Grape berry	冬芽 Winter bud	果实 Grape berry	冬芽 Winter bud	果实 Grape berry	冬芽 Winter bud	日内 Inter-day	日间 Intra-day	日内 Inter-day	日间 Intra-day
	没食子酸 Gallic acid	0.007	0.006	0.001	0.008	0.006	89.5	91.4	0.5	0.6	0.1	0.1	0.4
原儿茶酸 Protocatechuic acid	0.039	0.016	0.014	0.052	0.029	98.5	89.9	0.7	0.6	0.1	0.1	0.8	0.8
儿茶素 (+)-Catechin	2.08	0.23	0.131	2.206	0.360	96.2	99.1	1.0	1.3	0.1	0.1	2.9	3.1
表儿茶素 (-)-Epicatechin	1.10	0.708	0.128	1.227	0.824	99.5	90.9	0.9	1.0	0.3	0.3	1.0	1.2
表儿茶素没食子酸酯 (-)-Epicatechin-3-O-gallate	0.139	0.074	0.067	0.203	0.139	95.9	99.1	0.9	0.7	0.1	0.1	0.5	0.7
白藜芦醇 trans-Resveratrol	0.01	0.281	0.002	0.016	0.283	94.9	97.1	1.0	1.3	0.1	0.1	1.1	1.3

表 3 葡萄组织中 6种单体酚的平均含量 (mg/kg)

Table 3 Average content of 6 mono-phenolics in grape tissue (mg/kg)

单体酚 Individual phenolics	葡萄果实 Grape berry	冬芽 Winter bud	韧皮部 Phloem	木质部 Xylem
没食子酸 Gallic acid	15.11 ± 0.18	6.63 ± 0.05	41.49 ± 0.49	12.41 ± 0.09
原儿茶酸 Protocatechuic acid	13.02 ± 0.08	18.72 ± 0.12	162.3 ± 0.8	58.24 ± 0.11
儿茶素 (+)-Catechin	215.4 ± 0.7	220.4 ± 0.3	387.9 ± 0.2	128.6 ± 0.5
表儿茶素 (-)-Epicatechin	116.4 ± 0.3	669.3 ± 0.3	521.78 ± 0.03	169.2 ± 0.1
表儿茶素没食子酸酯 (-)-Epicatechin-3-O-gallate	15.87 ± 0.26	72.77 ± 0.02	27.27 ± 0.01	83.32 ± 0.09
白藜芦醇 trans-Resveratrol	10.38 ± 0.02	307.4 ± 0.4	324.28 ± 0.03	2005.1 ± 0.1

References

- Xia Yuan-Yuan(夏源源), Meng Zhao-Li(孟昭礼), Li Jian-Qiang(李建强), Zhang Wen-Hua(张文华), Hou Hong-Li(侯红利), Li Yong-Hong(李永红), Zhou Xiang-Yang(周向阳). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2007, 35(1): 79 ~ 82
- Zhao Mei-Ping(赵美萍), Li Yuan-Zong(李元宗). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2003, 31(1): 103 ~ 109
- Zhang Tian(张甜), Dong Xue-Chang(董学畅), Wu Fang-Ping(吴方评), Yang Guang-Yu(杨光宇), Qiao Yong-Feng(乔永锋). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2005, 32(3): 1645 ~ 1648
- Sun Jian-Ping(孙建平), Hou Xiao-Ge(侯小歌), Liang Feng(梁峰), Shi Tong-Hua(时同华), Duan Chang-Qing(段长青). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2006, 34(11): 1565 ~ 1569
- Bai Chang-Min(白长敏), Zhong Ke-Jun(钟科军), Huang Jian-Guo(黄建国), Cao Guo-Jun(曹国军), Xu Guo-Wang(许国旺). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2006, 34(11): 1619 ~ 1621
- Mou Ying(牟英), Wang Yuan-Hao(王元好), Xiu Zhi-Long(修志龙), Wang Long-Xing(王龙星), Xiao Hong-Bin(肖红斌). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2006, 34: S183 ~ S186
- Song Li-Jiang(宋立江), Di Ying(狄莹), Shi Bi(石碧). *Progress In Chemistry* (化学进展), 2000, 12(2): 161 ~ 170

Simultaneous Determination of Individual Phenolics in Grape Tissues by Switching Detection Wavelength in High Performance Liquid Chromatography

Zhang Ang, Fang Yu-Lin*, Wang Hua, Song Jian-Qiang, Zhang Yu-Lin, Song Shi-Ren
(College of Enology, Northwest Agriculture and Forest University, Yangling 712100)

Abstract A high performance liquid chromatographic method with switching detection wavelength was established for the simultaneous determination of individual phenolics in grape tissues. All phenolic compounds were detected under their maximal absorption wavelengths with a Zorbax C₁₈ column by gradient elution using CH₃CN-1.3% CH₃COOH as the mobile phase, the column temperature was controlled at 30 °C and the flow rate was 0.8 mL/min. The results showed that 6 phenolic compounds were separated well, and the linearity of calibration curves was good in the range of the test concentration ($r > 0.9990$). The average recoveries exceeded 89.5%, and the relative standard deviations (RSD) of retention time and peak area in the inter-day ($n = 10$) tests and the intra-day ($n = 10$) ones were below 0.3%, 2.9% and 0.3%, 3.1%, respectively. Compared with the constant wavelength method, this method obviously reduced LOD and obtained stable-baseline, fine-separation, good-peak-shape chromatogram. The validated method has the advantages of simple pretreatment, sensitivity and good repeatability.

Keywords High performance liquid chromatography, switching wavelength, grape tissues, individual phenolic

(Received 26 April 2007; accepted 25 July 2007)

中国化学会第 26 届学术年会 (第一轮通知)

中国化学会第 26 届学术年会定于 2008 年 7 月 13 ~ 16 日在天津举行。会议由中国化学会主办,南开大学承办,天津师范大学、天津理工大学协办。

大会主题:化学与和谐社会

会议内容包括:大会特邀报告、分会邀请报告、专题报告与讨论、论文墙报展讲,同时设置专题学术论坛。会议期间还将组织展览展示。欢迎广大科技工作者积极参加,踊跃投稿。热烈欢迎相关企业、高校、科研院所利用此次契机,扩大影响,参与会展。

本次学术年设置绿色化学、环境化学、化学生物学等 20 个学术分会;专题论坛 1 个及新技术新仪器专场展示。其中分析化学为第 9 分会。

分析化学分会的征文范围:(1)原子光谱分析方法;(2)分子光谱分析方法;(3)色谱法与分离技术;(4)电分析化学与传感器;(5)环境分析化学;(6)生物分析化学;(7)波谱法;(8)质谱分析;(9)分析仪器与联用技术。

征文联系及收集人:张毅

单位:南开大学化学系

地址:天津市卫津路 94 号

邮政编码:300071

电话:022 - 23506075

电子信箱:nkgcms@gmail.com