

Urol,2002,41:274-283.

[9] ANDRADE-ROZENTAL A F, ROZENTAL R, Hopperstad M G, et al. Gap junctions: the “kiss of death” and the “kiss of life” [J]. Brain Res Rev, 2000, 32:308.

[10] WILSON M R, CLOSE T W, TROSKO J E. Cell Population dynamics(apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis[J]. Exp Cell Res, 2000, 254:257-268.

[11] GROSSMAN H B, LIEBERT M, LEE I W, et al. Decreased connexin expression and intercellular communication in human bladder cancer cells[J]. Cancer Res, 1994, 54, 3062-3065.

[12] SUI G P, ROTHERY S, DUPONT E, et al. Gap junctions and connexin expression in human suburothelial interstitial cells[J]. BJU Int, 2002, 90:118-129.

[13] LAIRD D W, FISTOURIS P, BATIST G, et al. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors[J]. Cancer Res, 1999, 59:4104-4110.

[14] BERTRAM J S, PUNG A, CHURLEY M. Divers carotenoids protect from chemically- induced neoplastic transformation in IOTH2 Cells[J]. Carcinogenesis, 1991, 12:671-677.

[15] 朱俊东, 陈升, 糜漫天, 等. β-胡萝卜素对促癌剂抑制细胞间隙连接通讯的影响[J]. 第三军医大学学报, 1996, 4:324-326.

[16] 王强, 吕飞杰, 张涛, 等. 天然类胡萝卜素抑制细胞恶性转化机理的初步研究[J]. 食品科学, 2000, 12:46-47.

论著

欧洲越橘类保健食品中花色苷含量测定方法的研究

段玮, 唐荣华, 田青青, 吴青, 陈波

(湖南师范大学化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081)

摘要:目的 建立一种快速、简单测定欧洲越橘类保健食品中花色苷的方法。方法 将样品回流水解,使花色苷水解成花色苷元,用高效液相色谱法对苷元矢车菊素进行定性及定量分析,以矢车菊素含量表征花色苷含量。采用 Xtimate C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm),流动相 A:0.4% 三氟乙酸(TFA)水溶液,流动相 B:0.4% TFA 乙腈,梯度洗脱,流速 1 ml/min,检测波长 190 ~ 800 nm,柱温 35 °C。结果 矢车菊素在 2 ~ 100 μg/ml 范围内线性良好, r = 0.999 9,平均加标回收率为 95.1% ~ 97.2%,检出限为 0.005 μg/ml。结论 该法简便、准确、灵敏度高,是快速测定欧洲越橘类保健食品中花色苷含量较合适的方法。

关键词:保健食品;花色苷;矢车菊素;高效液相色谱;欧洲越橘类(蓝莓)

中图分类号:O657.72 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)04-0306-05

Determination of anthocyanins in fuction food containing European bilberry

Duan Wei, Tang Ronghua, Tian Qingqing, Wu Qing, Chen Bo

(Key Laboratory of Ministry of Education on Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Objective To establish a rapid and simple method for the determination of anthocyanins in fuction foods. **Methods** Samples, after being hydrolyzed, were separated on a Xtimate C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm × 5 μm) with gradient elution. The mobile phases were A, 0.4% trifluoroacetic acid (TFA) in water, and B, 0.4% TFA in acetonitrile. Other chromatographic conditions were as follows: flow rate 1ml/min; column temperate 35 °C; and detection wavelength 190 – 800 nm. **Results** The concentration of cyanidin over a range of 2 – 100 μg/ml was in a good linearity. The correlation coefficient of the calibration curve was 0.999 9. The average recovery was 95.1% – 97.2%; the lowest detection limit of cyanidin was 0.005 μg/ml. **Conclusion** The method was simple, fast, sensitive and could be used to determine the contents of anthocyanins in fuction food containing bilberry.

Key words: Fuction food; anthocyanins; cyanidin; high performance liquid chromatography(HPLC); European bilberry

收稿日期: 2010-01-10

基金项目: 国家自然科学基金 (20927005); 国家“863”课题 (2010AA023001)

作者简介: 段玮 女 硕士生 研究方向为色谱与药物分析

通信作者: 陈波 男 教授 E-mail: dr-chenpo@vip. sina. com

花色苷具有缓解视疲劳、增强记忆力、抗菌抗氧化作用,还可改善血液循环、预防心血管疾病、抗癌防癌^[1-4]。欧洲越橘(又名蓝莓)富含花色苷^[1],其作为抗氧化类保健食品的原料被广泛应用。目前,花色苷的测定方法尚无国家标准,而测定花色苷的常用方法主要为高效液相色谱法(HPLC)^[5-10]和分光光度法^[11-12],HPLC法通常采用花色苷标准品进行外标法定性、定量分析,但因花色苷种类繁多、标准品价格昂贵且许多花色苷标准品尚未商业化等问题限制了该方法的实用性。尽管分光光度法可简便测定总花色苷含量,但方法选择性差、抗干扰能力弱,其测定结果误差较大^[5]。

天然花色苷主要以矢车菊素、飞燕草色素、矮牵牛花色素、锦葵色素、芍药色素、天竺葵色素等少数几种花色素作为苷元,在与多种糖配基结合后形成了种类繁多的花色苷^[13]。若以苷元作为花色苷的指示成分进行测定,在定性及定量控制花色苷类保健食品的功效成分质量上将具有实际意义^[14]。欧洲越橘中的花色苷主要以矢车菊素为苷元,本文采用将样品中的花色苷酸水解为矢车菊素,再测定该成分含量,建立测定欧洲越橘类保健食品中花色苷含量的方法。结果证明方法可行、实用,可应用于欧洲越橘类保健食品中花色苷的质量控制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-20A自动进样高压液相色谱仪,配有PDA检测器(日本岛津公司),电子分析天平,超声波清洗器,集热式磁力加热搅拌器,pH计。

甲醇、乙腈、三氟乙酸、甲酸均为色谱纯;磷酸、浓盐酸,质量分数分别为85%、37%;其它试剂均为分析纯;二次蒸馏水,氯化矢车菊素标准品(购自Sigma公司,纯度大于95%)。

1.2 样品

欧洲越橘保健食品样品(蓝莓软胶囊,欧洲越橘软胶囊,越橘维生素A软胶囊,胡萝卜越橘复合软胶囊)由湖南省疾病预防控制中心提供。

1.3 溶液配制

(1)溶液A:17 ml 37%浓盐酸+83 ml 甲醇;(2)溶液B(2 mol/L 盐酸甲醇溶液):50 ml 甲醇+17 ml 37%浓盐酸+33 ml 二次蒸馏水;(3)溶液C:50 ml 甲醇+5.4 ml 37%浓盐酸+44.6 ml 二次蒸馏水。

1.4 校正曲线的绘制

精密称取氯化矢车菊素标准品适量,用溶液A配成浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准储备液;储备液再用溶液A稀释,配制成质量浓度为2、10、25、50、100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 的校正标准系列溶液。每个浓度的标准品分析3次,所得的峰面积的平均值对浓度作曲线,得到矢车菊素的校正曲线。

1.5 样品处理

1.5.1 样品酸水解处理

取蓝莓软胶囊样品20粒(0.5g/粒),倾出内容物,精密称取0.25g,置于50ml圆底烧瓶中,加入溶液B 20ml,超声提取20min,其后100℃回流水解样品1h,静置,冷却至室温后定容至25ml,过0.45 μm 滤膜,待分析。

1.5.2 样品非水解处理

另精密称取蓝莓软胶囊样品0.25g,置于50ml圆底烧瓶中,加入溶液C 20ml,超声提取20min,静置,冷却至室温后定容至25ml,过0.45 μm 的滤膜,待分析。

1.6 色谱条件

色谱柱为Welch Materials的Xtimate C₁₈柱(250mm×4.6mm×5 μm);柱温35℃;进样体积20 μl ;流速1 ml/min;检测波长190~800 nm。流动相A为0.4%三氟乙酸(TFA)水溶液,流动相B为0.4% TFA乙腈;梯度洗脱条件:起始为15% B,保持6 min, B相线性提高,在20 min时达到22% B,之后B相继续线性提高,在30 min时达到30% B,保持2 min,35 min时回复到起始比例15% B,平衡系统5 min。

2 结果

2.1 线性实验及检出限

由1.4绘制得到标准曲线方程为 $y = 69134x - 36.28$,式中 y 为峰面积, x 为矢车菊素质量浓度,在2~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度范围内,矢车菊素线性良好,相关系数 $r = 0.9999$ 。以20次空白基质的3倍噪声峰高对应的浓度为检出限,求得在本实验条件下矢车菊素的检出限为5 ng/ml。

2.2 精密度试验

取3个质量浓度(2、25、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)标准品溶液分别重复进样6次,结果测得矢车菊素的进样相对标准偏差(RSD)分别为0.89%、0.21%、0.28%,仪器精密度符合分析要求。取同一样品,按“1.5.1”平行处理6份,得到方法的RSD为1.16%。

2.3 稳定性和重现性

取同一批处理后的软胶囊样品水解液分别在室温下放置0、2、4、6、8、16、24 h后,在优化后的色谱条件下测定其矢车菊素含量,得到日内RSD为0.48%,由此知水解后的样品放置过程中24 h内十分稳定,能够满足一般的测定要求。

重现性则分别考察方法的日内重现性和日间重现性,日内重现性测定方法为:在同一天中平行称取2个不同样品各5份分别进行分析,得到2个样品的日内重现性的RSD分别为2.75%和2.47%;日间重现性测定方法为:取2个不同样品,在不同的5d中进行分析,将各天的测定结果进行处理,得到2个样品的日间重现性RSD分别为2.97%和2.86%。

2.4 加标回收率

计算出待测样品中矢车菊素含量,移取相当于待测样品矢车菊素含量一半、等量、两倍的矢车菊素标准品溶液,并称取计算量的待测样品,分别混合在一起,样品经酸水解等步骤处理,加标样品分

别平行处理3份,计算加标回收率,结果见表1。

2.5 样品测定

采用本方法测定了由湖南省疾病预防控制中心提供的4种欧洲越橘保健食品。对4种样品进行水解和非水解处理后进行色谱分析,测定其矢车菊素峰面积,由回归方程得矢车菊素浓度,计算出蓝莓软胶囊、欧洲越橘软胶囊、越橘维生素A软胶囊、胡萝卜越橘复合软胶囊中矢车菊素含量分别为1.30、1.76、5.26、5.57 mg/g;在样品分析测定过程中,样品中的复杂基质对样品目标物的测定并未产生干扰,测定结果准确可靠,为欧洲越橘类保健食品的质量控制提供了依据。

表1 加标回收率结果

Table 1 The recoveries of standard addition

样品名称	测定次数	本底值(μg)	加标量(μg)	测定值(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
蓝莓软胶囊	1	99.97	50.00	149.67	99.4	97.2	1.89
	2	99.97	50.00	147.42	94.9		
	3	99.97	50.00	148.62	97.3		
	1	99.97	100.00	199.17	99.2	96.6	2.49
	2	99.97	100.00	197.17	97.2		
	3	99.97	100.00	193.37	93.4		
	1	99.97	200.00	293.57	96.8	95.1	1.28
	2	99.97	200.00	288.97	94.5		
	3	99.97	200.00	287.97	94.0		

3 讨论

3.1 样品水解与非水解的差别

图1A为非水解蓝莓软胶囊色谱图,从图中可看出样品中除少量矢车菊素($t_R = 23.28$ min,图1C中矢车菊素标准品 $t_R = 23.29$ min)外,绝大部分色素是以苷的形式存在,且种类较多、极性大,保留时间大部分小于10 min,如果要对所有成分定量,所需标准品种类很多,定性定量分析的成本过高,通用性不强。经酸水解后,得到图1B,通过与标准品色谱图的对比可知,样品中的苷元成分主要以矢车菊素形式存在,经紫外可见光谱图判断,水解后的样品中,在0~25 min内,共有5个主要的花色苷元峰,经面积百分归一法计算可知,矢车菊素在此5种苷元的总量中占95%以上。以上信息证明以矢车菊素作为越橘类保健食品中花色苷的指示成分进行定性、定量分析具有明显的优势。因此,通过酸水解欧洲越橘样品后以矢车菊素含量来对花色苷功效成分含量进行质量控制是可行的。

花色苷的最大吸收波长一般在514 nm^[13],水解脱去糖配基形成苷元后,其最大吸收波长发生横移(524 nm)(图2)。利用该光谱特性,可以在保健

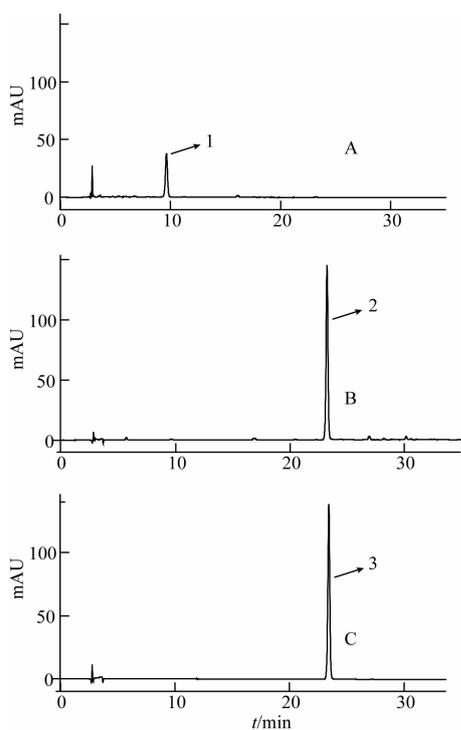
食品分析过程中进一步对花色苷及苷元成分进行部分定性,以防止保健食品复杂基质中的非花色苷和非苷元成分对测定结果产生干扰。

3.2 水解条件优化

由于盐酸浓度会影响花色苷及花色苷结构稳定性,盐酸浓度过小时,花色苷不足以完全水解;盐酸浓度过大时,花色苷水解速率大,但水解后的产物在酸浓度过高的环境中降解的速度也相对较快,影响测定的准确性。基于以上原因,确定样品水解时的盐酸浓度为2 mol/L,在此基础上比较了水解温度为100℃水解时间为0.5、1、2 h及水解时间为1 h时、水解温度为60、80、100℃的水解效率。结果表明,当水解温度为100℃时,水解0.5 h时约有90%的花色苷转化成了花色素;水解1和2 h效率基本相同,花色苷几乎全部水解为花色素(回收率>98%)。当水解温度为60、80℃时,水解不完全,回收率<70%。综合以上结果得到优化后的水解条件为:盐酸的浓度为2 mol/L,水解温度100℃,水解时间1 h。

3.3 色谱条件优化

由于花色素是一类具有相同苯并吡喃环、不同



A: 非水解样品色谱图; B: 水解样品色谱图;

C: 矢车菊素标准品色谱图

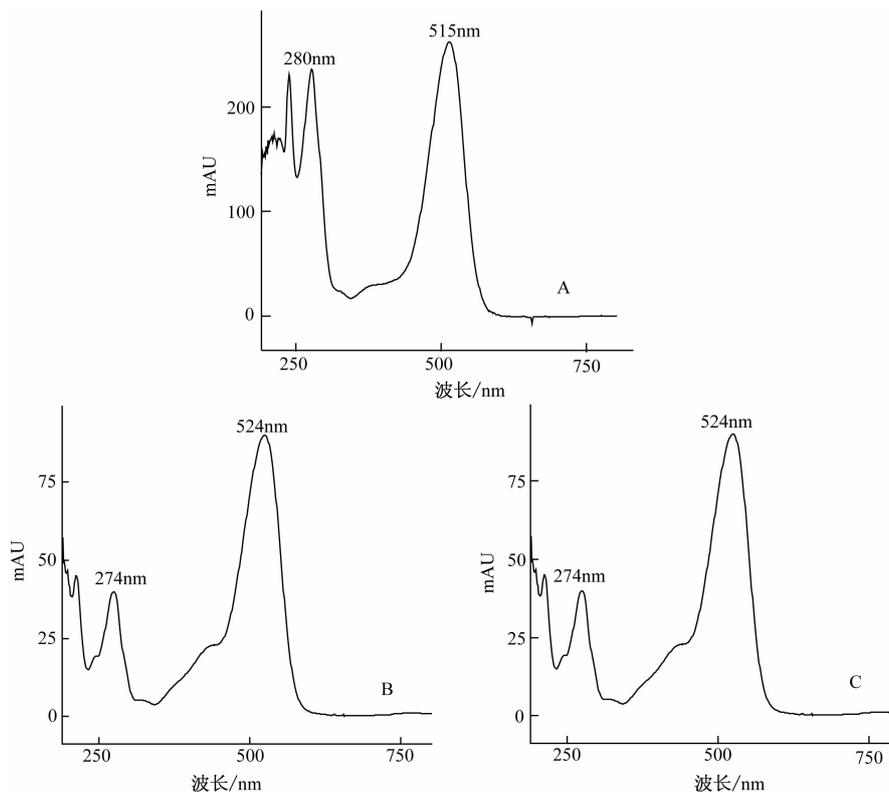
1: 未定性花色苷; 2: 矢车菊素; 3: 矢车菊素标准品

图 1 水解与非水解样品及矢车菊素标准品色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms for hydrolytic samples, non-hydrolytic samples and reference cyanidin

取代基、结构相似的物质,其在不同的酸碱条件下,会呈现出不同的结构形式,如:无色的查耳酮或甲醇假碱形式(中性或偏碱、偏酸性环境);红色黄烺盐形式(花色苷只有在强酸环境中才会保持这种状态),最大吸收波长在 524 nm 左右^[13]。因此,流动相的 pH 值在很大程度上影响花色苷分离测定结果的准确性。从测定准确性而言,流动相的酸性越强,花色苷稳定性越好,结构异变性越小。为此,考察了几种常用的酸(甲酸、磷酸、乙酸、三氟乙酸)以及不同浓度三氟乙酸(0.05%, 0.1%, 0.4%)添加到流动相对色谱保留行为的影响。结果表明,添加甲酸、磷酸、乙酸到流动相中且流动相的 pH 值为 1.5 时,这 3 种酸对花色苷色谱保留行为的影响几乎一样,色谱峰的保留并没有因为酸的种类不同而改变,这可能是因为 3 种酸在流动相中的作用只是释放 H⁺,稳定矢车菊素的结构,使其保持最稳定的红色黄烺盐状态。添加三氟乙酸时,矢车菊素的色谱保留时间相对滞后,但是峰形、分离度较前三者好,这可能是由于离子对试剂三氟乙酸能与花色苷结合形成中性分子,而该中性分子与疏水键合相以及残留的极性表面以多种模式相互作用,增强了色谱保留。

此外,流动相中添加不同浓度三氟乙酸对样品



A: 图 1 中峰 1 紫外可见光谱图; B: 矢车菊素标准品紫外可见光谱图; C: 图 1 中峰 2 紫外可见光谱图

图 2 图 1 中峰 1、峰 2 及矢车菊素标准品紫外可见光谱图

Figure 2 UV-Visible spectra of reference cyanidin and the peak (1), peak (2) in figure 1

分离的影响如下:流动相中含 0.05% TFA 时,矢车菊素的半峰宽超过 3 min,样品的分离不能达到要求;流动相中含 0.1% TFA 时,样品分离效果较前者(0.05% TFA)好,但仍不能达到分离要求;流动相中含 0.4% TFA 时,样品中花色苷分离完全,达到分离要求,峰形对称,矢车菊素的半峰宽仅为 0.5 min;以上结果说明流动相的酸度对花色苷的分离效果影响较大。综上所述,确定优化的流动相条件为水(含 0.4% TFA)和乙腈(含 0.4% TFA)梯度洗脱,在此优化后的色谱条件下,水解和非水解样品中的花色苷和花色苷素皆能达到分离要求,为测定欧洲越橘类保健食品中的花色苷进行质量控制提供了依据。

参考文献

- [1] 徐璐,郑建仙. 欧洲越橘花色苷研究概况[J]. 中国食品添加剂,2005,4:44-46.
- [2] NAVINDRA P S. Berry fruits for cancer prevention; current status and future prospects[J]. J Agric Food Chem,2008,56:630-635.
- [3] 陈介甫,李亚东,徐哲. 蓝莓的主要化学成分及生物活性[J]. 药学学报,2010,45(4):422-429.
- [4] 刘会灵,曹建新. 越橘属植物的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2009,21:905-911.
- [5] KERRY G P, CLYNTON W H, ANITA M, et al. Bilberry adulteration using the food dye amaranth[J]. J Agric Food Chem, 2006,54:7378-7382.
- [6] 骆军,张学英. HPLC 法测定果实中花色苷的含量[J]. 上海农业学报,2006,3:25-27.
- [7] 王贞强. HPLC 法测定梅鹿辄和黑比诺葡萄中的花色苷[J]. 酿酒科技,2007,5:99-101.
- [8] 杨桂霞,范海林. RP-HPLC 法测定栽培种越橘果中花色苷的含量[J]. 药物分析杂志,2005,10:1222-1224.
- [9] ZHANG Z H, KOU X L, KEN F. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts[J]. J Agric Food Chem,2004,52:688-691.
- [10] VALLS J, MILLAN S, MARTI M P, et al. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols[J]. J Chromatog A,2009,12(16):7143-7172.
- [11] 冯至彪,刘春红,张晓松. 可见分光光度法快速测定山桃稠李子总花色苷[J]. 食品工业科技,2008,8:285-288.
- [12] 毛建霏,付成平,郭灵安,等. 可见分光光度法测定紫甘薯总花青素含量[J]. 食品与发酵科技,2010,46(2):101-104.
- [13] 钟瑞敏. 花色苷结构与稳定性及其应用研究[J]. 韶关学院学报,2001,12:79-83.
- [14] 李桂兰,凌文华,高永清. 黑豆中花色苷水解工艺和定量研究[J]. 食品科学,2010,31(12):1-5.

论著

荔枝不同部位的体外抗氧化活性实验研究

林芳花,彭永宏,张启斌,曾令达

(惠州学院生命科学系,生物技术研究所,广东 惠州 516007)

摘要:目的 探讨荔枝不同部位的体外抗氧化活性。方法 采用单因素分析方法优选提取荔枝的合适的乙醇浓度;采用氧化时间法、超氧阴离子清除法、总还原力法评价荔枝的体外抗氧化活性。结果 荔枝的花、核、肉在 50% 乙醇中氧化时间最短,叶、根、壳在 80% 乙醇中氧化时间最短;荔枝的叶、花、根、壳、核、肉氧化时间分别为 5.18、4.59、7.39、11.46、6.23、19.21 s/g;超氧阴离子清除率分别为 0.88%、33.63%、36.55%、54.97%、52.63%、77.19%;与铁氰化钾反应后的光密度分别为 0.509、0.522、0.408、0.270、0.345、0.268。结论 50% 乙醇适宜作为提取荔枝抗氧化成分的溶剂。荔枝的叶、花、根、壳、核均具有较强的还原高锰酸钾和铁氰化钾活性,荔枝的花、根、壳、核、肉清除超氧阴离子的作用较强。

关键词:荔枝;抗氧化

中图分类号:R284 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2011)04-0310-04

收稿日期:2010-10-28

基金项目:广东省自然科学基金项目(915063201000018)

作者简介:林芳花 女 博士 讲师 研究方向为中药资源开发利用与新药研究 E-mail:lin73@sina.com