

网络出版时间:2016-11-24 13:52 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.01.025
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161124.1352.050.html>

油橄榄鲜果中多酚化合物含量测定的 HPLC 法研究

邓俊琳^{1,2}, 李旭¹, 王寒冬¹, 丁春邦¹, 李天³, 杨泽身⁴

(1 四川农业大学 生命科学学院,四川 雅安 625014;2 四川省农业科学农产品加工研究所,四川 成都 610066;

3 四川农业大学 农学院,四川 成都 611130;4 凉山州中泽新技术开发有限责任公司,四川 西昌 615000)

[摘要] 【目的】建立测定油橄榄鲜果中没食子酸、羟基酪醇、对香豆酸、芦丁、橄榄苦苷和槲皮素 6 种多酚化合物含量的高效液相色谱(HPLC)法。【方法】以四川西昌引进的油橄榄品种“皮瓜尔”为材料,建立测定油橄榄鲜果中多酚化合物的 HPLC 方法,对该方法进行检验,并用该方法对四川西昌引种的不同成熟度的油橄榄鲜果的多酚化合物含量进行测定。【结果】建立 HPLC 法可使油橄榄鲜果中 6 种多酚化合物在 45 min 内得到较好分离,重复性好(相对标准偏差(RSD)≤4.42%),精密度高(RSD ≤0.59%),加标回收结果准确可靠(RSD ≤4.35%)。随着成熟度的增加,油橄榄鲜果中没食子酸、羟基酪醇、芦丁、橄榄苦苷的含量总体均呈下降趋势,其中橄榄苦苷含量变化幅度最大;对香豆酸含量呈小幅波动,槲皮素含量呈现先上升后下降的变化趋势;6 种多酚化合物总量总体呈下降趋势。【结论】建立了一种可同时检测油橄榄鲜果中 6 种多酚化合物的高效液相色谱方法,该方法准确、可靠。

[关键词] 油橄榄;多酚类化合物;成熟度;高效液相色谱法

[中图分类号] S565.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2017)01-0185-05

Determination of polyphenolic compounds in fresh olives by HPLC

DENG Junlin^{1,2}, LI Xu¹, WANG Handong², DING Chunbang¹,
LI Tian³, YANG Zeshen⁴

(1 College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China;

2 Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chengdu, Sichuan 610066, China;

3 College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China;

4 Liangshan Zhongze New Tech Development Co. Ltd, Xichang, Sichuan 615000, China)

Abstract: 【Objective】A High performance liquid chromatography (HPLC) method was established for determination the contents of gallic acid, hydroxytyrosol, p-coumaric acid, rutin, oleuropein, and quercetin in fresh olives. 【Method】A HPLC method to determination the polyphenolic compounds in fruits of olive variety Picual introduced in Xichang, Sichuan was established. After validation, the method was used to measure the polyphenol compounds of fresh olive fruits with different maturities. 【Result】Six polyphenolic compounds were simultaneously separated within 45 min, and the method had good repeatability (Relative Standard Deviation (RSD)≤4.42%), high precision (RSD ≤0.59%), and reliable recovery rate (RSD ≤4.35%). In fresh olive fruits, the contents of gallic acid, hydroxytyrosol, rutin, and oleuropein declined, and P-coumaric acid had slight float and quercetin declined after initial increase with the increase of maturity. The contents of total six polyphenols had a downward trend. 【Conclusion】The established HPLC method was accurate and reliable to simultaneously determine 6 polyphenolic compounds in olive fruits.

[收稿日期] 2015-08-20

[基金项目] 四川省科技厅科技支撑计划项目(2013NZ0047)

[作者简介] 邓俊琳(1988—),女,甘肃兰州人,硕士,主要从事油橄榄优良品种选育研究。E-mail:237251337@qq.com

[通信作者] 丁春邦(1966—),女,四川富顺人,教授,博士生导师,主要从事植物学研究。E-mail:dcb@scau.edu.cn

Key words: olives; polyphenolic compounds; maturity; HPLC method

油橄榄(*Olea europaea* L.)属木犀科木犀榄属常绿乔木,又名洋橄榄、齐墩果,与油茶、油棕、椰子并称为世界四大木本油料植物。原产于小亚细亚,后经引种大量种植于西班牙、意大利、希腊等地地中海国家,中国从1956年开始引种,主要分布于云南、甘肃、四川、陕西等省份。油橄榄是世界珍贵的常绿木本油料树种,已有4 000 多年的栽培和食用历史,有产量高、品质优、效益长等特点,是人类最早驯化并且栽培的果树之一^[1]。其主产品橄榄油,不仅具有抗氧化、抗菌、抗癌等多种功能,而且有保健、美容和烹调等诸多用途,享有“液体黄金”、“食用植物油皇后”等美誉^[2-3]。

多酚是植物体内复杂的次生代谢产物,广泛分布于植物界中,具有抗氧化、抗衰老、抗癌等多种生物活性^[4-5]。油橄榄中主要的多酚类化合物为橄榄苦苷、羟基酪醇、芦丁、对香豆酸、没食子酸、槲皮素、木犀草素、毛蕊花糖苷等^[6-8],对橄榄油的风味、稳定性、活性功能有重要影响,其含量是评价橄榄油品质的指标之一,因此被当作确定最佳采收期的重要指标^[9-11]。我国油橄榄产业正处于发展时期,对油橄榄的引种栽培及加工利用已有大量报道,但有关成熟度对油橄榄果中主要多酚类化合物的影响鲜有报道。本试验以第二成熟度的油橄榄品种“皮瓜尔”鲜果为材料,建立了测定油橄榄鲜果中没食子酸、羟基酪醇、对香豆酸、芦丁、橄榄苦苷和槲皮素6 种多酚化合物含量的HPLC 法,并用该法测定油橄榄鲜果中6 种多酚化合物含量随成熟度增加的动态变化,以期为油橄榄果的合理开发与利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

油橄榄鲜果:于2013年6—10月采自四川西昌的北河油橄榄基地,油橄榄品种为“皮瓜尔”。选取7个成熟度的油橄榄鲜果,成熟度按照国际橄榄油理事会(IOOC, 1984)的建议,以果皮、果肉色泽区分:第一成熟度果皮青绿,第二成熟度果皮黄绿,第三成熟度果皮少半紫,第四成熟度果皮多半紫,第五成熟度果皮全紫果肉白色,第六成熟度果肉少半紫,第七成熟度果肉多半紫^[12]。建立测定6 种多酚化合物含量的HPLC 法时,使用的材料是第二成熟度的“皮瓜尔”鲜果。将油橄榄果去核,液氮辅助研磨果肉至均匀粉末,−80 °C 储存备用。甲醇以及多酚化合物(没食子酸、羟基酪醇、对香豆酸、芦丁、橄榄

苦苷和槲皮素)标准品,均为色谱纯。

KQ-300GDV 恒温数控超声波清洗器,昆山舒美超声仪器有限公司;LGJ-10 冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;1200 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

1.2 方 法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm); DAD 检测器,检测波长:280 nm;柱温:35 °C;流速:1.0 mL/min;流动相:体积分数0.5%的冰醋酸水溶液(A)+甲醇(B);梯度洗脱程序:5 min,10% B;10~15 min,20% B;20~25 min,30% B;30~40 min,40% B;45 min,50% B。

1.2.2 标准品溶液的制备 分别准确称取适量的没食子酸、羟基酪醇、对香豆酸、芦丁、橄榄苦苷、槲皮素标准品,置于10 mL 容量瓶中,甲醇溶解并定容,得标准品溶液。分别吸取一定量的标准品溶液,用甲醇配制成标准品混合液,在该混合液中各化合物质量浓度分别为:没食子酸 5.92 μg/mL, 羟基酪醇 12.09 μg/mL, 对香豆酸 6.30 μg/mL, 芦丁 38.29 μg/mL, 橄榄苦苷 44.33 μg/mL, 槲皮素 8.06 μg/mL。

1.2.3 样品溶液的制备 取油橄榄鲜果粉末1 g 加22 mL 体积分数 80% 甲醇,用超声波在47 °C 提取 30 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 浓缩上清液, 定容至 10 mL, 用孔径 0.45 μm 的滤膜过滤, 待测。

1.3 数据处理

相对标准偏差(RSD) = $SD/X \times 100\%$, 其中 SD 为标准偏差, X 为测定平均值。加标回收率 = (测得质量—样品中质量)/加入质量 × 100%。

2 结果与分析

2.1 标准品混合液和油橄榄鲜果样品溶液中6 种多酚化合物的检测

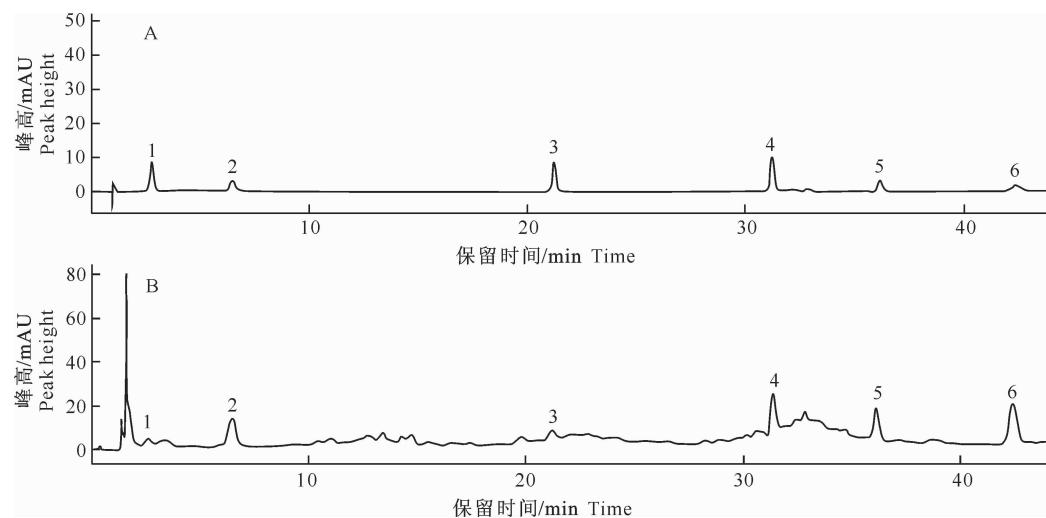
从HPLC图(进样体积5 μL, 图1-A)看出,在此色谱条件下,6 种多酚化合物的标准品可在45 min 内得到较好地分离;油橄榄鲜果样品溶液色谱图(图1-B)中也有6 个色谱峰,其保留时间与标准品溶液的6 个色谱峰保留时间一致。

2.2 多酚化合物含量测定的HPLC 方法检验

2.2.1 标准曲线和线性关系 在1.2.1 色谱条件下,分别依次进样2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40 μL 进行HPLC 分析,以进样质量($X, \mu\text{g}$)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得6 种多酚化合物

的线性方程和相关系数(表1),可知各种化合物的

峰面积与进样质量之间呈良好的线性关系。



1. 没食子酸 Gallic acid; 2. 羟基酪醇 Hydroxytyrosol; 3. 对香豆酸 P-coumaric acid;
4. 芦丁 Rutin; 5. 橄榄苦苷 Oleuropein; 6. 槲皮素 Quercetin

图1 标准品混合液(A)和油橄榄鲜果样品(B)中6种多酚化合物的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the reference substance (A) and 6 polyphenolic compounds of fresh olive fruits (B)

表1 油橄榄鲜果中6种多酚化合物的回归方程及线性范围($n=3$)

Table 1 Regression equations and linear ranges of six polyphenolic compounds of fresh olive fruits ($n=3$)

多酚化合物 Polyphenolic compound	回归方程 Regression equation	R^2	线性范围/ μg Linear range
没食子酸 Gallic acid	$Y=3528.30X+2.650$	0.999	0.01~0.24
羟基酪醇 Hydroxytyrosol	$Y=343.72X+56.406$	0.999	0.03~0.48
对香豆酸 P-coumaric acid	$Y=12327.00X-316.000$	0.997	0.02~0.25
芦丁 Rutin	$Y=233.46X+109.280$	0.998	0.10~1.53
橄榄苦苷 Oleuropein	$Y=288.67X-17.341$	0.994	0.11~1.77
槲皮素 Quercetin	$Y=1229.90X-3.556$	0.999	0.02~0.32

注:X为进样质量(μg),Y为峰面积($\text{mAU}\cdot\text{s}$)。

Note: X is the sample volume (μg) and Y is the peak area ($\text{mAU}\cdot\text{s}$).

2.2.2 重复性试验 按照1.2.3的方法,平行制备3份油橄榄鲜果提取液,按1.2.1的色谱条件进行HPLC测定(进样体积20 μL),计算没食子酸、羟基酪醇、对香豆酸、芦丁、橄榄苦苷、槲皮素6种多酚化合物提取量(提取质量/称取样品质量)的相对标准偏差(RSD)分别为3.13%,2.40%,3.34%,2.68%,0.76%,4.42%,表明试验方法重复性良好。

2.2.3 精密度试验 按照1.2.2的方法制备标准品混合液,按照1.2.1的色谱条件连续进样(进样体

积5 μL)3次,计算没食子酸、羟基酪醇、对香豆酸、芦丁、橄榄苦苷、槲皮素6种多酚化合物峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为0.51%,0.58%,0.59%,0.51%,0.18%,0.24%,表明仪器精密度良好。

2.2.4 回收率试验 称取油橄榄鲜果粉末1 g,加入22 mL体积分数80%甲醇,分别加入适量标准品混合液,之后按1.2.3的方法制备样品,再按1.2.1的色谱条件进行HPLC分析(进样体积5 μL),结果见表2。

表2 油橄榄鲜果中6种多酚化合物的加标回收率($n=3$)

Table 2 Recovery test for six polyphenolic compounds of fresh olive fruits ($n=3$)

多酚化合物 Polyphenolic compound	样品中质量/ μg Sample contents	加入质量/ μg Amount added	测得质量/ μg Contents measured	平均加标回收率/% Average recovery	相对标准偏差/% RSD
没食子酸 Gallic acid	2.57	5.19	7.43	94	0.70
羟基酪醇 Hydroxytyrosol	108.41	25.82	133.28	96	4.35
对香豆酸 P-coumaric acid	5.75	2.83	8.44	95	2.56
芦丁 Rutin	62.91	19.92	81.69	94	1.94
橄榄苦苷 Oleuropein	126.75	27.92	153.18	95	2.24
槲皮素 Quercetin	62.67	3.45	66.12	99	2.99

表 2 显示,6 种化合物的加标回收率在 94%~99%,RSD 均小于 5%,表明建立的 HPLC 方法有较好的回收率,回收结果准确、可靠。

2.3 多酚化合物含量随油橄榄果成熟度的变化

用建立的 HPLC 测定不同成熟度油橄榄鲜果中 6 种多酚化合物含量,结果见表 3。由表 3 可知,在整个成熟过程中,除了槲皮素,其他 5 种化合物含量在第一成熟度时均显著高于其他成熟度,最低含量集中在第五、六、七成熟度。总体而言,羟基酪醇、芦丁、橄榄苦苷、槲皮素的含量相对较高,没食子酸、

对香豆酸的含量相对较低。羟基酪醇、芦丁、橄榄苦苷含量随成熟度增加变化较大,变化幅度均超过 500 $\mu\text{g}/\text{g}$,其中橄榄苦苷变化幅度最高达到 2 303.63 $\mu\text{g}/\text{g}$;而对香豆酸含量变化幅度较小,最高仅为 2.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。没食子酸、羟基酪醇、芦丁、橄榄苦苷含量均随成熟度的增加而总体降低,对香豆酸含量在油橄榄鲜果成熟过程中小幅波动,槲皮素含量随成熟度的增加先上升后下降。6 种多酚化合物总量总体随成熟度的增加而显著降低。

表 3 油橄榄鲜果中 6 种多酚化合物含量随成熟度的变化

Table 3 Changes in contents of 6 polyphenolic compounds of fresh olive fruits as the maturity increases $\mu\text{g}/\text{g}$

多酚化合物 Polyphenolic compound	第一成熟度 First maturity	第二成熟度 Second maturity	第三成熟度 Third maturity	第四成熟度 Fourth maturity	第五成熟度 Fifth maturity	第六成熟度 Sixth maturity	第七成熟度 Seventh maturity
没食子酸 Gallic acid	56.86 \pm 2.84 a	30.23 \pm 1.51 b	9.17 \pm 0.46 c	9.19 \pm 0.46 c	3.33 \pm 0.17 d	3.11 \pm 0.16 e	2.87 \pm 0.14 f
羟基酪醇 Hydroxytyrosol	913.10 \pm 45.66 a	369.69 \pm 18.48 c	501.81 \pm 25.09 b	338.53 \pm 16.93 d	333.22 \pm 16.66 e	274.09 \pm 13.70 g	325.98 \pm 16.30 f
对香豆酸 P-coumaric acid	3.50 \pm 0.18 a	1.53 \pm 0.08 cd	3.32 \pm 0.17 b	1.74 \pm 0.09 c	0.70 \pm 0.04 e	1.46 \pm 0.07 d	1.58 \pm 0.08 cd
芦丁 Rutin	628.86 \pm 31.44 a	139.46 \pm 6.97 b	76.97 \pm 3.85 c	56.87 \pm 2.84 d	49.88 \pm 2.49 g	54.85 \pm 2.74 e	52.55 \pm 2.63 f
橄榄苦苷 Oleuropein	2 322.00 \pm 116.10 a	615.84 \pm 30.79 b	28.35 \pm 1.42 e	46.28 \pm 2.31 c	33.52 \pm 1.68 d	18.37 \pm 0.92 g	25.10 \pm 1.26 f
槲皮素 Quercetin	148.37 \pm 7.42 c	147.67 \pm 7.38 d	176.87 \pm 8.84 a	169.48 \pm 8.47 b	129.30 \pm 6.47 e	63.07 \pm 3.15 f	43.00 \pm 2.15 g
总量 Total	4 072.69 \pm 203.63 a	1 304.42 \pm 65.22 b	796.49 \pm 39.82 c	622.09 \pm 31.10 d	549.95 \pm 27.50 e	414.95 \pm 20.75 g	451.08 \pm 22.55 f

注:同行数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨 论

本试验结果表明,油橄榄鲜果中羟基酪醇、芦丁、橄榄苦苷、槲皮素含量均较高,这与前人研究结果^[12-14]相近。本研究中,第一成熟度时,羟基酪醇、芦丁、橄榄苦苷、对香豆酸、没食子酸含量均显著高于其他成熟度,此成熟度的油橄榄果实苦涩味重,推测这些化合物与苦涩味有关,Dağdelen 等^[15]和 Angerosa 等^[16]也提出多酚类化合物影响着油橄榄及其油脂的感官特性(包括苦涩味、色泽等)。随着成熟度的增加,没食子酸、羟基酪醇、芦丁、橄榄苦苷含量总体均呈下降趋势,对香豆酸含量略有波动,槲皮素含量呈先上升后略有下降的变化趋势。橄榄苦苷是油橄榄中含量较高的一种多酚类物质,但随成熟度的增加,其含量大幅下降。Esti 等^[17]认为,这是由于在油橄榄成熟过程中,橄榄苦苷在一系列酶的作用下发生降解所致。本研究中,随成熟度的增加,6 种多酚化合物的总量逐渐降低,在第六成熟度时达最低,之后又略有上升。高等植物中酚类化合物多经莽草酸途径、苯丙烷代谢途径合成,而合成过程

中的许多前体物质也参与糖代谢、脂质代谢以及氨基酸代谢^[18-20],这可能是导致多酚化合物含量在成熟过程中下降的主要原因。

4 结 论

本试验建立的 HPLC 法以甲醇和冰醋酸水溶液作为流动相,采用梯度洗脱的方式,较好地将 6 种多酚类化合物在 45 min 内进行了分离,且 HPLC 法测定结果的重复性好($RSD \leq 4.42\%$),精密度高($RSD \leq 0.59\%$),回收结果准确、可靠($RSD \leq 4.35\%$)。用此方法对四川西昌种植的 7 个成熟度的油橄榄鲜果中的 6 种多酚类化合物含量进行测定,结果表明,随着成熟度的增加,没食子酸、羟基酪醇、芦丁、橄榄苦苷的含量总体均呈下降趋势,对香豆酸含量呈小幅波动,槲皮素含量呈现先上升后下降的变化趋势,其中,橄榄苦苷含量变化幅度最大。

[参考文献]

- [1] 杨凤云,崔学云.油橄榄的栽培与加工利用 [M].北京:金盾出版社,2002:1-5.

Yang Y F, Cui X Y. Olive cultivation, processing and utilization

- [M]. Beijing: Shield Press, 2002: 1-5.
- [2] 李聚桢. 我国油橄榄产业发展概况及前景展望 [J]. 粮油食品科技, 2006, 14(4): 8-10.
- Li J Z. Industry development situation and prospects of olives in our country [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2006, 14(4): 8-10.
- [3] 于长青. 橄榄油的化学组成及对人体的营养价值 [J]. 食品科技, 2000(2): 59-60.
- Yu C Q. Chemical composition of olive oil and its nutrient value [J]. Food Science and Technology, 2000(2): 59-60.
- [4] Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants [J]. Food/Nahrung, 2000, 44(3): 158-163.
- [5] Weng C J, Yen G C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives [J]. Cancer Treatment Reviews, 2012, 38(1): 76-87.
- [6] Gómez-Rico A, Fregapane G, Salvador M D. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils [J]. Food Research International, 2008, 41(4): 433-440.
- [7] Flores M I A, Romero-González R, Frenich A G, et al. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food chemistry, 2012, 134(4): 2465-2472.
- [8] Franco M N, Galeano-Díaz T, López Ó, et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil [J]. Food chemistry, 2014, 163: 289-298.
- [9] Boskou G, Salta F N, Chrysostomou S, et al. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market [J]. Food Chemistry, 2006, 94(4): 558-564.
- [10] Servili M, Montedoro G F. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2002, 104(9/10): 602-613.
- [11] Bonoli M, Bendini A, Cerretani L, et al. Qualitative and semi-quantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(23): 7026-7032.
- [12] Salvador M D, Aranda F, Fregapane G. Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality: a study of four successive crop seasons [J]. Food Chemistry, 2001, 73(1): 45-53.
- [13] Morelló J R, Romero M P, Motilva M J. Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(19): 6002-6009.
- [14] Sousa A, Malheiro R, Casal S, et al. Optimal harvesting period for cvs. Madural and Verdeal Transmontana, based on antioxidant potential and phenolic composition of olives [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 62(2): 1120-1126.
- [15] Dağdelen A, Tümen G, Özcan M M, et al. Phenolics profiles of olive fruits (*Olea europaea* L.) and oils from Ayvalik, Domat and Gemlik varieties at different ripening stages [J]. Food Chemistry, 2013, 136(1): 41-45.
- [16] Angerosa F, Mostallino R, Basti C, et al. Virgin olive oil odour notes; their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds [J]. Food Chemistry, 2000, 68(3): 283-287.
- [17] Esti M, Cinquanta L, La Notte E. Phenolic compounds in different olive varieties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 32-35.
- [18] 欧阳光察,薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控 [J]. 植物生理学通讯, 1988, 24(3): 9-16.
- Ouyang G C, Xue Y L. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant [J]. Plant Physiology Communications, 1988, 24(3): 9-16.
- [19] 蒲飞. 柿果实酚类物质含量、生物活性及其相关酶的研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- Pu F. Study on content, biological activity and related enzymes of phenolics in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2014.
- [20] 王莉,史玲玲,张艳霞,等. 植物次生代谢物途径及其研究进展 [J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508.
- Wang L, Shi L L, Zhang Y X, et al. Biosynthesis and regulation of the secondary metabolites in plants [J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2007, 25(5): 500-508.