

## 参考文献:

- [1] Ferguson B S et al. Pesticide Testing by Enzyme Immunoassay at Trace Level in Environmental and Agricultural Samples. *Science of the Total Environment*, 1993, 132(2-3): 415-428.
- [2] 刘曙然. 九十年代农药残留分析新技术[J]. *农药*, 1998, 37(6): 11.
- [3] 郑允. 快速检验蔬菜农药残留分析[J]. *台湾农业试验所* 2.
- [4] 张雪燕等. 蔬菜中农药残留量的生物化学检测[J]. *西南农业学报*, 9(2): 62.
- [5] 高希武, Corun等改进的Ellan胆碱酯酶添生测定方法介绍[J]. *昆虫知识*, 1987, 24(4): 246-246.
- [6] 刘玲, 王多加. 果蔬农药残留快速检测方法比较实验[J]. *蔬菜*, 2001, 3: 26.

## 液质联用分析测定苦荞黄酮

徐宝才, 肖刚, 丁霄霖, 李丹  
(江南大学食品学院, 无锡 214036)

**摘要:** 本文采用RP-HPLC-DAD/MS在苦荞籽粒中发现了山奈酚; 并对苦荞中的总黄酮和其中的四种主要黄酮醇: 槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(I)、芦丁(II)、山奈酚-3-芸香糖苷(III)、槲皮素(IV)进行了定量。总黄酮含量为0.174%~4.614%, (I)、(II)、(III)、(IV)在壳、麸皮、外层粉、心粉、山西苦荞粉中的含量分别为0.0153%~0.0448%, 0.0816%~4.1054%, 0.0043%~0.1330%, 0.0062%~0.5332%。

**关键词:** 苦荞; 黄酮; 液质联用

**Abstract:** The flavanoids in *Fagopyrum tataricum* seeds, from Sichuan province were studied. The types of flavanoids were quercetin-3-rutinoglucoglucoside, quercetin-3-rutinoglucoside, rutin, kmaepferol-3-rutinoside, quercetin, kmaepferol. The contents of flavanoids in hull, bran, outer flour, inner flour of Sichuan *Fagopyrum tataricum* and flour of Sanxi *Fagopyrum tataricum* were 0.505%, 4.614%, 3.098%, 0.174% and 0.944%, respectively, among which rutin was the major constituent.

**Key words:** *Fagopyrum tataricum*; flavanoids; RP-HPLC MS DAD

中图分类号: 0657.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)06-0113-05

荞麦是一种适于在冷凉气候下生长的短季蓼科(Polygonaceae)作物, 植物分类学上主要有苦荞 [*Fagopyrum tataricum*(Linn) Gaench] 和甜荞 (*Fagopyrum esculentum* Moench) 二个食用品种。荞麦富含高生物价的蛋白质、维生素、矿质元素等, 最为重要的是含有极为丰富的生物活性成分—黄酮类化合物, 尤其是苦荞, 其黄酮含量比甜荞高10~100倍<sup>[1,2]</sup>, 它是黄酮的重要膳食来源, 苦荞(鞑靼荞麦)黄酮已获得美国“国家食品与药物管理局”FDA证书。

目前对于甜荞中的黄酮化合物研究较多, 而对苦荞中的黄酮研究报道较少。近年来, 高效液相色谱, 尤其是反相液相色谱(RP-HPLC)已广泛用天植物酚类物质的分析, 特别是液质联用(HPLC-MS)结合二极管阵列检测器(DAD)集分离与鉴定于一体, 在定向筛选某些结构的化合物时, 显示了强大的检测功能。

本文的目的是利用RP-HPLC-DAD/MS, 结合资料报道, 试图在苦荞中探寻尚未有报道过的黄酮种类, 并对籽粒各部分(壳、麸皮、外层粉、内层粉)的黄酮进行定量测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料、药品

苦荞麦籽粒(含水量16.0%)购自四川西昌, 经西德Brabander-880200型磨粉机碾磨、筛分后, 得壳、麸皮和全粉三部分(表1)。外层粉、心粉由四川凉山州提供。山西苦荞粉购自山西晋城。

芦丁、桑色素 生化试剂, 上海试剂二厂; 槲皮素 日本, 半井化学·品株式会社; 山奈酚 中国科学院植物化学研究室提供。

### 1.2 苦荞黄酮的提取

收稿日期: 2002-11-14

作者简介: 徐宝才(1973-), 男, 在读博士, 研究方向: 天然药食科学与技术。

表1 Brabander 制粉后各部分比例

部分	重量(kg)	百分比(%)
籽粒	1	
粉	0.62	66.67
壳	0.30	32.25
麸皮	0.01	1.08

表2 洗脱条件

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	65	35
2	100	0
5	65	35

分别准确称取四川苦荞样品(壳、麸皮、全粉、外层粉、心粉)2g,滤纸包好后置于索氏抽提器中,加入80ml 80%甲醇,85℃条件下提取6h,定容至100ml,待测定。

### 1.3 苦荞黄酮的HPLC-DAD/MS检测

苦荞麸皮提取液经0.45 μm微孔滤膜过滤后,5 μl直接进样分析。

Waters2690型高效液相色谱仪,Waters996型二级管阵列检测器(DAD)(200~600nm),色谱柱:symmetryC<sub>8</sub>柱(2.1×150mm,5 μm),甲醇为流动相A,1%乙酸为流动相B,洗脱条件:0→20min,流动相A15%→100%,流速:0.3ml/min。

MicroMass ZMD 400型电喷雾质谱(ESI)仪,色谱柱流出组份进入质谱仪的流速为10 μl/min,正离子质谱(ESI+/MS)条件:毛细管电压3.88KV,锥孔电压53V,离子源温度120℃,脱溶温度200℃。负离子质谱(ESI-/MS)条件:毛细管电压3.76KV,锥孔电压48V,离子源温度120℃,脱溶温度200℃。数据采集与分析软件为Masslynx data system(version 3.1,Micromass limited, UK)

### 1.4 苦荞黄酮的含量测定

#### 1.4.1 总黄酮含量

移取定量样品液于10ml容量瓶中,以1%AlCl<sub>3</sub>定容至刻度线,于420nm波长处进行比色测定,以芦丁标样计算总黄酮。试剂空白为参比。

#### 1.4.2 四种主要黄酮类化合物的含量

为提高分析效率,我们采用以下色谱条件进行定量分析:HP Agilent 1100高效液相色谱仪,色谱柱:Hypersil ODS(4.6×100mm,5 μm),可变波长检测器(VWD)波长354nm。流动相A:65%甲醇(含0.5%乙酸),流动相B:超纯水(含0.5%乙酸),洗脱条件(表2),流速:0.8ml/min。进样量:5 μl,10min内完成样品分析。以芦丁为标样,峰面积外标法定量。分析儿茶素时,波长选定为280nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 资料已报道的苦荞中的黄酮种类

目前对甜荞的黄酮研究报道较多。Sato H et al

从荞麦未成熟的种子中分离鉴定了芦丁、槲皮素、椴皮素、金丝桃苷等黄酮醇<sup>[3]</sup>。Watanabe M等从荞麦种壳中分离得到原儿茶酸、槲皮素、金丝桃苷、芦丁和3,4-二羟基苯甲醛以及牡荆葡基黄酮和异牡荆葡基黄酮,并从荞麦种子中得到了四种儿茶素:(-)-表儿茶素,(+)-儿茶素-7-O-(D-吡喃葡萄糖苷),(-)-表儿茶素-3-O-P-羟基苯甲酸盐,(-)-表儿茶素-3-O-(3,4-dl-O-甲基)桐酸盐<sup>[4,5]</sup>。Dietrych-Szostak, Dorota et al<sup>[6]</sup>在荞麦籽粒中分离、鉴定了6种黄酮类化合物:芦丁、orientin、isoorientin、槲皮素、牡荆葡基黄酮、异牡荆葡基黄酮。Samiya G C et al从荞麦籽粒中分离出两种新二氢黄酮醇糖苷:Aromadendrin 3-O-半乳糖苷和毒叶素3-木糖苷(taxifolin-3-O-xyloside)<sup>[7]</sup>。Jian-Ya Oian et al<sup>[8]</sup>发现了白藜芦醇,原儿茶酸/儿茶素。

相对于甜荞来说,目前对苦荞黄酮的研究还非常有限。李丹博士<sup>[9]</sup>在四川苦荞中发现四种主要黄酮类化合物:芦丁(610)、槲皮素(301)、槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(772)、山奈酚-3-芸香糖苷(594),他为了定量槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷而对其进行分离纯化,在收集水洗脱液时又发现了另外一种新的黄酮类化合物,经鉴定为槲皮素-3-芸香糖双葡萄糖苷(934),但他未发现山奈酚(286)的存在。

### 2.2 四川苦荞中的黄酮种类

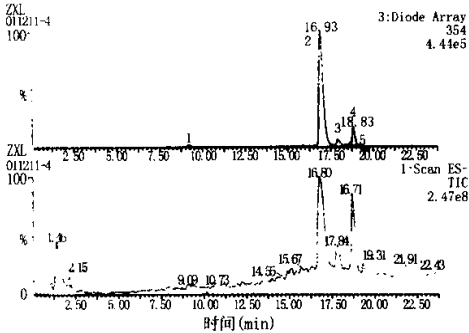
#### 2.2.1 已报道的黄酮种类

作者在分析黄酮过程中利用HPLC-MS,采用Masslynx data system(version 3.1,Micromass limited, UK)软件,通过由分子量构建选择离子(输入化合物的分子量减去1(M-1)后,如果样品中存在该化合物,则质谱中会产生对应的选择离子),并在李丹博士的工作基础上,在四川苦荞籽粒中检测到的黄酮类化合物如图1所示。其中槲皮素-3-芸香糖双葡萄糖苷的含量极少,很难在HPLC上看到色谱峰,可利用选择离子图鉴定其存在位置,其保留时间为(rt)为8.48min(图2)。

#### 2.2.2 山奈酚的检测

以上研究发现四川苦荞的黄酮苷元主要是由槲皮素和山奈酚,但山奈酚在荞麦中却鲜有报道。为此

我们试图探寻山奈酚的存在, 输入分子量  $M-1=285$  后, 我们发现了相应的选择离子(图3)保留时间为 19.31min 的选择离子暗示着山奈酚存在的可能性, 它对应于图1中的5, 可见其含量也较低。



1. 槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(I) 2. 芦丁(II)  
3. 山奈酚-3-芸香糖苷(III) 4. 槲皮素(IV) 5. unknown

图1 四川苦荞黄酮的高效液相色谱图(上)、总离子流图(下)

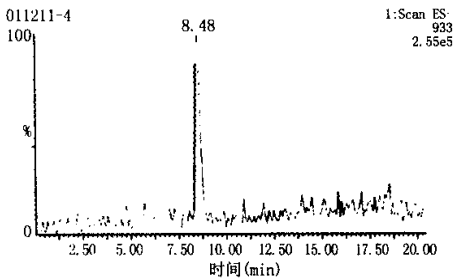


图2 由分子量构建的槲皮素-3-芸香糖双葡萄糖苷的选择离子图(934)

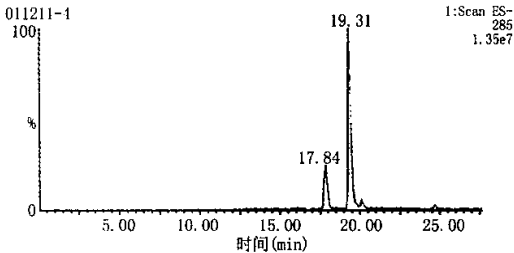


图3 5的选择离子图

本实验采用的是反相高效液相色谱(RP-HPLC), 极性较强的苷出峰较早, 羟基较多的苷元较羟基较少的苷元出峰早。5的出峰位置在槲皮素峰之后, 说明该物质的极性较槲皮素小或羟基较少。5的紫外吸收光谱[二极管阵列检测器(DAD)]的带I在352~382nm的范围中(图4), 我们知道黄酮的带I吸收在304~350nm之间, 黄酮醇的带I在352~382nm, 所以5为黄酮醇, 且其紫外吸收与文献报道山奈酚的266nm和367nm基本一致<sup>[10]</sup>。在质谱图上有明显的分子离子峰[M-H]<sup>-</sup>m/z285(图5)。最后通过与中科院植化所提供的山奈酚

标准对照, 发现两者的HPLC保留时间完全一致。另外在  $M-1=285$  的选择离子图(图3)上看到的两个响应峰, 其中17.84min处是山奈酚-3-芸香糖苷(已鉴定)裂解的山奈酚碎片。由此我们可以推断5为山奈酚。

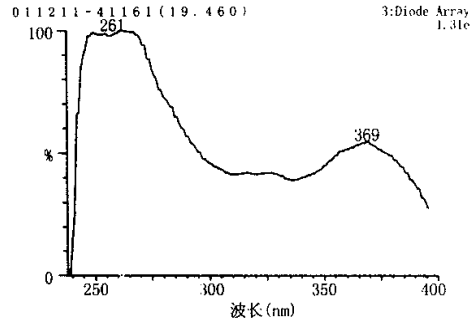


图4 5的紫外吸收光谱

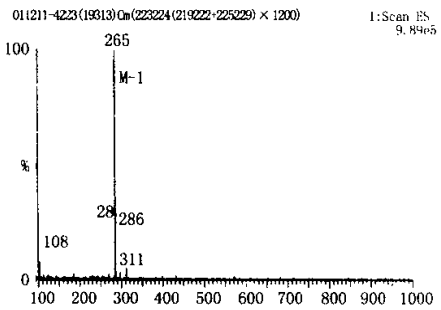


图5 5的MS图

但通过HPLC-MS未发现桑色素(318)、槲皮素(448)、金丝桃苷(364)、牡荆葡基黄酮(432)、异牡荆葡基黄酮、orientin(448)、isoorientin、儿茶素等黄酮的选择离子峰, 暗示着四川苦荞中不存在这些成分。所以四川苦荞黄酮种类主要为: 槲皮素-3-芸香糖双葡萄糖苷、槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(I)、芦丁(II)、山奈酚-3-芸香糖苷(III)、槲皮素(IV)和山奈酚6种黄酮醇。不同荞麦中的黄酮种类是由品种差异和环境因素造成的<sup>[1, 2]</sup>。

### 3 苦荞黄酮的含量

#### 3.1 总黄酮在苦荞籽粒各部分中的含量

表3数据表明苦荞中的黄酮含量较高, 尤其是四川苦荞, 其种皮中的黄酮含量高达4.614%, 依次是外层粉、壳及心粉。

#### 3.2 四种主要黄酮醇在苦荞籽粒各部分中的含量

苦荞黄酮的HPLC图谱上(图6), 从左到右依次可明显看到槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(I)、芦丁(II)、山奈酚-3-芸香糖(III)和槲皮素(IV)四种主

要黄酮醇的色谱峰。山西苦荞黄酮组成与四川苦荞相似，这也表明植物黄酮类化学成分在其化学分类学上有着重要意义<sup>[11]</sup>。四川苦荞籽粒各组分中的黄酮都以芦丁含量最高，但山西苦荞中槲皮素含量较高(表4)，这可能是品种间的差异，也可能是山西苦荞粉贮藏环境中的水分活度较高，芦丁分解产生槲皮素所致<sup>[12]</sup>。

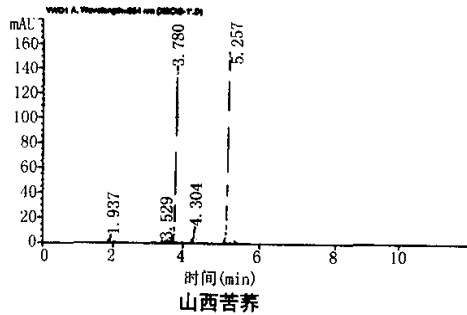
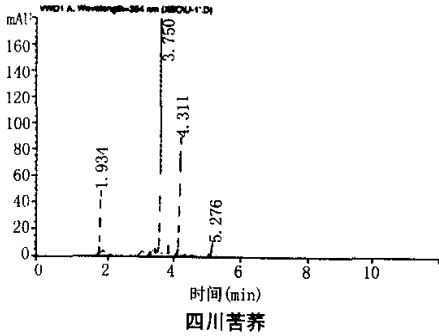


图6 苦荞四种主要黄酮的HPLC图谱

表3 四川苦荞籽粒各部分的黄酮含量

名称	百分含量(%)
壳	0.505
种皮	4.614
外层粉	3.098
心粉	0.174
山西苦荞粉	0.944

表4 四种黄酮醇在苦荞籽粒中的含量分布

名称	百分含量(%)				总量(%)
	I	II	III	IV	
壳	0.0168	0.4443	0.0168	0.0062	0.4841
种皮	0.1023	4.1054	0.1230	0.0704	4.4011
外层粉	0.0448	2.1605	0.1330	0.0187	2.3570
心粉		0.0816	0.0043	0.0313	0.1172
山西苦荞粉	0.0153	0.4383	0.0387	0.5332	1.0255

通过表3与表4的数据比较发现，用AlCl<sub>3</sub>比色

法测定的结果与HPLC测定的总黄酮含量基本一致，说明AlCl<sub>3</sub>比色法较适于苦荞黄酮总量的测定。而大家常用的NaNO<sub>2</sub>-Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>法的测定结果偏高。

4 小结

本文通过HPLC-ESI/MS，结合二极管阵列检测器(DAD)给出的光谱特性，在四川苦荞中检测出山奈酚。利用液质联用作为黄酮类化合物，尤其是微量组分定向检测的“探路石”，具有巨大优势。四川苦荞黄酮种类主要为：槲皮素-3-芸香糖苷双葡萄糖苷、槲皮素-3-芸香糖葡萄糖苷(I)、芦丁(II)、山奈酚-3-芸香糖苷(III)、槲皮素(IV)和山奈酚6种黄酮醇。

苦荞总黄酮含量在0.174%~4.614%。四种主要黄酮醇(I)、(II)、(III)及(IV)在壳、麸皮、外层粉、心粉和山西苦荞粉中的含量分别为0.0153%~0.0448%、0.0816%~4.1054%、0.0043%~0.1330%、0.0062%~0.5332%，四川苦荞以芦丁含量最高，而山西苦荞的槲皮素含量较高。

参考文献:

- [1] Naghski J, C F Krewson, W L Porter et al. Factors affecting the rutin contents of dried buckwheat meals[J]. J Amer Pharm Assoc, 1950, 29:696-698.
- [2] Naghski J, J F Couch, J W Taylor et al. Effects of agronomic factors on the rutin content of buckwheat. Technical bulletin in USDA, 1955, 1132:1-50.
- [3] Sato H Sakamura S. Isolation and identification of flavonoids in immature buckwheat seed (*Fagopyrum esculentum* Monch) [J]. Agric Chem Soc Jpn, 1975, 49: 53-55.
- [4] M Watanabe, Yasuo Ohshita, Tojiro Tsushida. Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls [J]. J Agric Food Chem, 1997, 45: 1039-1044.
- [5] M Watanabe. Catechins as Antioxidants from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 839-845.
- [6] Dietrych-Szostak Dorota, Oleszek, Wieslaw. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47 (10): 4384-4387.
- [7] Samaiya G C, Saxena V K. Two new dihydroflavonol glycosides from *Fagopyrum esculentum* seeds [J]. Fitoerapia, 1989, 60(1): 84.
- [8] Jian Ya Qian, Mayer, D, Kuhn M. Flavonoids in fine buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flour and

- their free radical scavenging activities. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 1999, 95(9):343-349.
- [9] 李月. 苦荞麦营养、生物活性和加工利用的研究[D]. 无锡轻工大学博士学位论文, 2000.
- [10] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海科学技术出版社, 1997. 289-292, 2971.
- [11] 段金彪, 周荣汉, 车镇涛. 中国蒺藜科植物黄酮类化学成分分析及其化学分类学意义[J]. 西北植物学报, 1999. 19(4):725-731.
- [12] Eskin N A M, et al. 杨斌译. 温度和水活度对贮藏荞麦芦丁、叶绿素及其色度的影响[C]. 第7届国际荞麦会议论文集III, 3-6.

## 山楂果中多元酸和高级脂肪酸的分析研究

张文叶<sup>1</sup>, 贾春晓<sup>2</sup>, 毛多斌<sup>1</sup>, 王石磊<sup>3</sup>, 张峻松<sup>1</sup>  
 (1. 郑州轻工业学院食品与生物工程系, 郑州 450002)  
 (2. 郑州轻工业学院化学工程系, 郑州 450002)  
 (3. 郑州市质量技术监督局, 郑州 450006)

**摘 要:** 采用硫酸甲酯化处理山楂果样品, 二氯甲烷作萃取剂, 用气相色谱-质谱联用法对山楂果中的多元酸和高级脂肪酸进行了全面分析。共分离、鉴定出25种酸性成分, 其中多元酸4种, 主要是柠檬酸、苹果酸和丁烯二酸; 高级脂肪酸21种, 主要是棕榈酸(C<sub>16:0</sub>)、亚油酸(C<sub>18:2</sub>)、油酸(C<sub>18:1</sub>)和亚麻酸(C<sub>18:3</sub>)、硬脂酸(C<sub>18:0</sub>)等。

**关键词:** 山楂果; 多元酸; 高级脂肪酸; 气相色谱-质谱联用; 分析

**Abstract:** A new method for the total analysis of the polybasic acids and higher fatty acids in hawthorn fruit by gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)was developed. The acidic components were esterified in 12.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>OH solution. The organic acid methyl esters were extracted by CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and analyzed by HP-UITRA 2 column(50m × 320μm × 0.17μm).25 acidic components were separated and the chemical structures were identified. There were 4 polybasic acids and 21 higher fatty acids in the acidic components. The main polybasic acids were citric acid, maic acid and 2-butendioic acid. The main higher fatty acids were hexadecanoic acid, linolenic acid, linoleic acid, oleic acid and octadecanoic acid etc.

**Key words:** hawthorn fruit; polybasic acid; higher fatty acid; gas chromatography-mass spectrometry; analysis

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)06-0117-03

山楂别名红果子、棠梨子。山楂果是卫生部第一批列入食药兼用的水果之一。山楂果作为中药使用更是有着悠久的历史, 具有消食化滞, 行气散瘀的功效<sup>[1]</sup>。山楂已被公认为加工保健食品的最佳原料之一。我国种植山楂的面积广泛, 河南辉县市是我国三大山楂生产基地之一, 年产量超过300万公斤<sup>[4]</sup>, 因此深入研究山楂原料基本特性, 对于开发多种营养保健功能的山楂类食品, 提高山楂原料的工业化转化率, 增加附加值, 为山楂开辟更广阔的加工途径, 提高果农种植经济效益, 带动地区的经济发展都具有较大的经济和社会效益。

山楂中富含有机酸, 其中多元酸和高级脂肪酸可以促进脂肪分解, 是山楂果中起消食导滞作用的有效成分<sup>[2,3]</sup>, 分析和研究山楂果中多元酸和高级脂肪酸

不仅能为科学评价山楂果的内在质量提供科学依据, 更重要的是能指导山楂加工过程中制定合理的工艺参数, 最大程度的保持山楂制品的有效活性成分。文献<sup>[2]</sup>曾对山楂果中的柠檬酸、苹果酸、酒石酸和琥珀酸四种多元酸进行了分析, 而对山楂果中多元酸和高级脂肪酸进行全面分析, 国内尚未见有文献报道。因此, 本文采用硫酸甲酯化处理山楂果样品, 二氯甲烷作萃取剂, 用气相色谱-质谱联用法分离并分析鉴定了其中多元酸和高级脂肪酸成分, 并用气相色谱面积归一化法测定了各成分的相对百分含量, 较全面的分析了山楂果的有机酸组成及含量。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

收稿日期: 2002-11-15

作者简介: 张文叶(1965-), 女, 工程师, 硕士, 研究方向: 食品生物技术。