

# 阿月浑子中酚类物质提取方法与气相色谱-质谱分析

富丰珍<sup>1,2</sup>, 冷平生<sup>2</sup>, 蒋湘宁<sup>3</sup>, 丛者福<sup>1</sup>, 魏芳<sup>3</sup>

(1. 新疆农业大学 林学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 北京农学院 园林系, 北京 102206;

3. 北京林业大学, 北京 100083)

**摘要:** 用不同的提取方法对阿月浑子叶酚类物质的定性分析进行了研究, 通过比较确定用氢氧化钠水溶液提取阿月浑子叶中的酚类物质效果最佳, 经硅烷化后用气质联仪进行定性分析, 并与标准样品的气相色谱-质谱图对照, 可得到阿月浑子叶中含儿茶素, 没食子酸, 香豆酸, 邻苯二酚和邻苯三酚。

**关键词:** 阿月浑子; 酚类物质; 气相色谱-质谱分析

中图分类号: S71 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0207-03

## Gas Chromatographic and Mass Spectrometric Analysis of Phenolic Compound in *Pistacia vera* L.

FU Feng-zhen<sup>1,2</sup>, LENG Ping-sheng<sup>2</sup>, JIANG Xiang-ning<sup>3</sup>, CONG Zhe-fu<sup>1</sup>, WEI Fang<sup>3</sup>

(1. Xinjiang Agriculture of University, Urumuchi 830052, China; 2. Beijing University

of Agriculture, Beijing 102206, China; 3. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Qualitative analysis of phenolic compound in *Pistacia vera* L. with different extracted methods, NaOH in water is the best method of extracted of phenolic compound in *Pistacia vera* L. The trimethylsilylated phenolic compound identified by gas chromatographic and mass spectrometric that compared with the standard sample. The *Pistacia vera* L content catechin, gallic acid, coumaric acid, pyrocatechol, pyrogallol.

**Key words:** *Pistacia vera* L; Phenolic; Gas chromatographic and mass spectrometric

酚类物质是植物界中种类最多, 分布最广的次生代谢物质之一。酚类物质的共同结构特点是都含有带羟基的苯环结构。属于一种有毒的次生代谢产物, 是果实与植物组织培养中产生褐变的底物。近年发现, 酚类物质在植物的抗性生理中有重要的作用, 在低温锻炼后, 植物体内强还原性酚类物质的花青素苷含量显著增加, 可以明显提高苹果<sup>[1]</sup>、桃<sup>[2]</sup>、枣<sup>[3]</sup>及柿树<sup>[4]</sup>的抗寒性, 同时酚类物质具有抗病性, 苹果中的根皮苷能抑制真菌的扩散, 对黑星病有抵抗作用<sup>[5]</sup>。植物感病后新产生的植保素, 如绿原酸、香豆酸、豌豆素、菜豆素、大豆素等, 常被称为“植物免疫素”<sup>[6]</sup>。酚类物质还可以抵抗虫害, 从银杏叶中提取的酚酸类物质制备的生物农药可防治蚜虫、菜青虫、蓟马效果良好, 且对环境无影响<sup>[7]</sup>。同时发现板栗中酚类物质含量与栗瘿蜂抗性间有一定的相关

性<sup>[8]</sup>。阿月浑子中含有单宁较多<sup>[9]</sup>, 在组培过程中易产生褐变, 但含有的酚类物质种类的相关研究未见报道。本研究为以后阿月浑子酚类物质的研究提供了依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

采自北京农学院苗圃实生新疆阿月浑子树的叶片, 105℃杀青 15 min, 70℃烘至恒重。

### 1.2 主要仪器与试剂

气相色谱质谱联用仪(Trace GC-DSQ: 四极杆质谱仪)Thermo electron corporation; RE-52A 型旋转蒸发器; Anke GL-20L II 高速冷冻离心机。标准品: 儿茶素, 没食子酸, 邻苯二酚, 邻苯三酚, 香豆酸均购于美国 sigma 公司。

收稿日期: 2007-04-28

基金项目: 北京市自然科学基金(6072005); 与北京市人才基金项目资助(0347823)

作者简介: 富丰珍(1981-), 女, 新疆塔城人, 硕士生, 主要从事森林培育方面研究工作

通讯作者: 冷平生(1964-), 男, 江西修水人, 教授, 博士, 主要从事林学及生态学方面研究工作。

### 1.3 分析条件

气相色谱条件, 色谱柱: 弹性毛细管柱 30 m × 0.25 mm; 柱温: 起始温度 100℃, 4 min, 以 15℃/min 的速度升至 190℃, 再以 4℃/min 升至 200℃, 停留 3 min, 以 10℃/min 升至 240℃, 停留 5 min, 最后以 10℃/min 的速度升至 280℃, 保持 20 min。进样口的温度: 50℃, 以 145℃/min 的速度升至 300℃, 保留 8 min。进样量: 1 μL (乙酸乙酯溶液); 载气: He; 载气流速: 1.2 mL/min; 无分流比; 传输线温度: 280℃<sup>[10]</sup>。

质谱条件 EI 离子源; 离子源温度: 200℃; 电子能量: 70 eV; 电子倍增器电压:  $1.00 \times 10^5$  V; 质谱扫描范围 m/z: 50~600。

### 1.4 提取方法

方法一: 阿月浑子总酚最佳的提取方法取研磨粉碎的叶干样 0.5 g, 加 80% 的丙酮水, 按 1:50 的料液比, 在 60℃ 下浸提 2 次, 每次 60 min, 合并上清液, 低压旋转蒸干, 用 10 mL 50℃ 的蒸馏水溶出, 在 4℃ 下, 离心 4 000 r/min 15 min, 上清液用石油醚萃取 3 次, 取水相用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 为 5.0, 再用乙酸乙酯萃取 3 次, 取酯相, 低压蒸干, 以 5 mL 的甲醇溶出。旋转蒸干, 用 100 μL 的甲醇溶出, 吸取 60 μL 注入毛细管中, 真空干燥 30 min, 在室温下干燥 120 min, 加入 TMS (三甲基硅基) 衍生化 120 min。进样量: 1 μL。

方法二: 称取 0.5 g 干样, 加 20 mL pH 为 2 的蒸馏水, 浸提 30 min, 在 4℃ 下, 离心 4 000 r/min 20 min, 上清液加乙酸乙酯抽提 15 min, 共 3 次, 合并水相, 加 NaOH 调 pH 为 7.0, 加乙酸乙酯, 抽提 15 min, 合并酯相, 将酯相在 35℃ 下旋转蒸干, 加 5 mL 的甲醇溶出<sup>[11]</sup>。旋转蒸干, 用 100 μL 的甲醇溶出, 吸取 60 μL 注入毛细管中, 真空干燥 30 min, 在室温下干燥 120 min, 加入 TMS (三甲基硅基) 衍生化 120 min。进样量: 1 μL。

方法三: 称取 0.125 g 干样于 5 mL 离心管内, 加入 5 mL 混合提取液 (甲醇: 丙酮: 水为 7: 7: 6), 浸提 15 min, 在 4℃, 4 000 r/min 下离心 15 min, 移出上清液, 上述重复 3 次, 取残渣, 加入 2.5 mL, 4 mol/L 的 NaOH, 抽提, 用 6 mol/L 的 HCl 调 pH 值为 2, 上清液用乙醚萃取 3 次, 合并乙醚相, 在 40℃ 下旋转蒸干, 用 5 mL 的甲醇溶出<sup>[12]</sup>。再旋转蒸干, 用 100 μL 的甲醇溶出, 吸取 60 μL 注入毛细管中, 真空干燥 30 min, 在室温下干燥 120 min, 加入 TMS (三甲基硅基) 衍生化 120 min。进样量: 1 μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 3种提取方法的比较

方法一气相图见图 1, 通过与图谱软件进行检索可得到 5 个酚类物质, 其中与标样比较可确定 4 个酚类物质, 分别为邻苯二酚, 邻苯三酚, 没食子酸, 儿茶素, 保留时间分别是 7.65, 9.97, 15.03, 29.53 min。方法二气相图见图 2, 可检索到 4 个酚类物质, 与标样比较可确定 3 个酚类物质分别是邻苯三酚, 没食子酸, 儿茶素, 保留时间分别是 9.97, 15.03, 29.49 min。方法三气相图见图 3, 可检索到 6 个酚类物质, 与标样比较可确定 5 个酚类物质分别是邻苯二酚, 没食子酸, 儿茶素, 香豆酸与邻苯三酚, 保留时间分别是 7.66, 15.05, 29.57, 14.31, 9.97 min。标准样品邻苯二酚, 没食子酸, 儿茶素, 香豆酸与邻苯三酚色谱峰的保留时间分别是 7.79, 15.03, 29.53, 14.31, 10.04 min (图 4)。

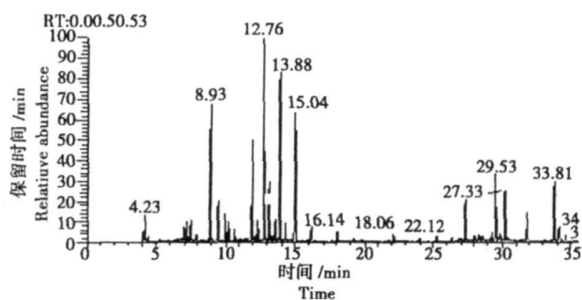


图 1 丙酮水提取阿月浑子气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatograms of *Pistacia vera* L. with acetone in water

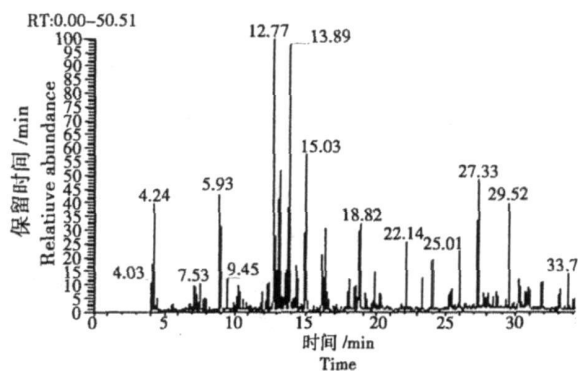


图 2 水提取阿月浑子气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatograms of *Pistacia vera* L. with water

### 2.2 样品、标样的质谱分析

研究还发现样品与标样各主要碎片离子峰一致。邻苯二酚 280.89, 178.88, 72.84 (279.95, 178.88, 72.84); 没食子酸 253.95, 238.92, 72.83 (254.04, 239.04, 72.94); 香豆酸 308.09, 293.05, 249.03, 219.01 (308.00, 293.00, 249.00, 219.00); 儿

茶素 368. 13, 355. 12, 72. 93( 367. 97, 354. 98, 72. 84) ;

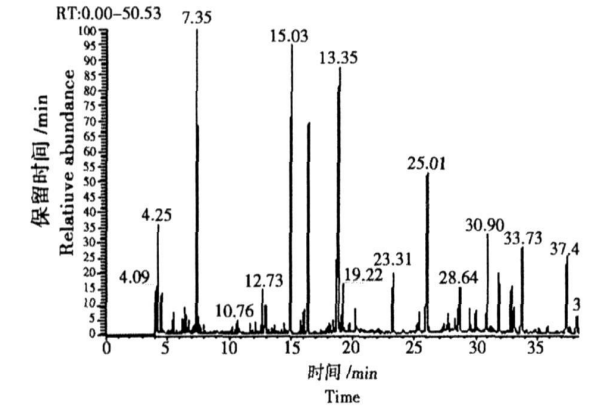


图3 NaOH 提取阿月浑子气相色谱图  
Fig 3 Gas chromatograms of *Pistacia vera* L. with NaOH

邻苯三酚 342. 10, 238. 98, 72. 95( 341. 92, 238. 79, 72. 78) , 由样品中各酚类物质与标样保留时间和离子峰一致, 可确定阿月浑子中含有邻苯二酚, 没食子酸, 儿茶素, 香豆酸和邻苯三酚。

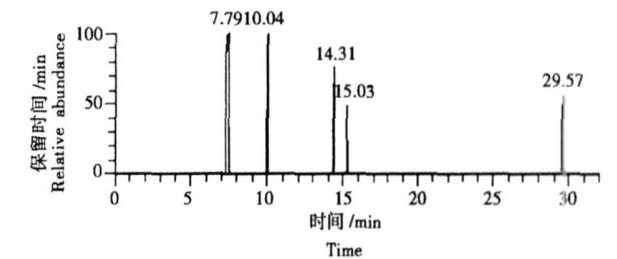


图4 标样的气相色谱图  
Fig 4 Gas chromatograms of standard sample

2. 3 样品中酚类物质含量的比较

根据标准曲线法计算得各酚类物质含量见表 1。

表 1 不同提取方法中各酚类物质的含量

Tab 1 Phenolic compound with different methods				
	邻苯三酚/( $\mu\text{g/g}$ ) Pyrogallol	没食子酸/( $\mu\text{g/g}$ ) Gallic acid	儿茶素/( $\mu\text{g/g}$ ) Catechin	邻苯二酚/( $\mu\text{g/g}$ ) Pyrocatechol
方法一	0. 96	3. 84	1. 32	1. 25
方法二	2. 40	4. 80	0. 30	
方法三	1. 68	7. 78	1. 72	2. 35
				2. 16

4 讨论

酚类物质多趋于水溶性, 以糖苷或脂质状态存在于液泡中, 有些只溶于有机溶剂, 有些是不溶性羧酸和糖苷, 有些是不溶的大分子多聚体。主要以莽草酸途径和丙二酸途径合成为主。

通过对阿月浑子叶中酚类物质不同提取条件的研究, 水虽然是酚类物质良好的溶剂, 但并非是最适合酚类物质的提取, 因为酚类物质多与蛋白质、多糖以氢键和疏水键形式形成稳定的分子复合物。提取溶剂不仅对酚类物质有很好的溶解性还要具有将氢键断裂的作用, 所以有机溶剂和水的复合溶剂有利于酚类物质的提取, 尤其是丙酮水体系。如方法一比方法二提取的效果好。加入碱液又加入酸可增加酚类物质的溶解性, 从而使酚类物质溶出, 但加入的碱和酸浓度不能过高, 防止破坏酚类物质的结构<sup>[13]</sup>。从提取的酚类物质的种类与含量中可知, 方法三提取酚类物质的效果最好。据此研究我们能够得到溶剂的提取效果氢氧化钠水溶液> 丙酮水> 水。

参考文献:

[1] Chalker scott L. Spectrophotometric measurement of leached phenolic compounds as a indicator of freeze damage[J]. J Amer Soc Horti Sei, 1989, 114(2) : 315- 319.  
[2] Leng P, Itamra H, Yamamura H. Changes of phenylalanine

amminiar lyase( PAL) activity in twig tissues of two diospy ros species during cold acclimation [ J]. Environ Control in Boil, 1995, 33( 1): 43- 48.  
[3] Leng P, Itamra H, Yatnamura H. Freezing tolerance of sever al diospy ros species, and kaki cultivars as related to ar thoean information[ J]. J Japan Horti Sci, 1993, 61( 4) : 795 - 804.  
[4] 郭晓军, 温秀军, 孙朝晖, 等. 抗枣疯病枣树品种酚类物质的薄层层析分析[ J]. 河北林业科技, 2006( 2) : 1- 2  
[5] Overcem J C. In Friend J, Thtelfall D Rset al. Biochemincal aspects of plant parasite relationships[ M]. Acaocmic Press New York, 1976: 134.  
[6] 薛应龙, 欧阳光察. 植物抗病的物质代谢基础[ C]//余淑文. 植物生理学和分子生物学. 北京: 科学出版社, 1992: 63- 83.  
[7] 石启田. 银杏酚酸类物质防治农业害虫的研究 [J]. 林业化学与工业, 2004, 24( 2): 83- 86  
[8] Hirotaka T, Shuichiro M. On the Polyphenolic Substances in the Chestnut Teww and the Contents of Them to the Re sistence to Chestnut Gall Wasps[ J]. J Japan Horti Sci, 1996, 35: 89 97.  
[9] 任宪威. 树木学[ M]. 北京: 中国林业出版社, 1997: 42  
[10] 赵艳玲. 正义, 反义和 RNA 干扰技术调控杨树木质素生物合成技术 [D]. 北京: 北京林业大学, 2005.  
[11] 王 强, 阮 晓, 马 艳, 等. 高效液相色谱紫外法测定葡萄中低分子量酚类物质[ J]. 新疆农业大学学报, 1999, 22( 3) : 193- 196  
[12] Kozłowska H, Sabir M A, Sosulski F W, et al. Phenolic constituents of rapeseed flour[J]. Can Inst Food Sci Technol J, 1975, 8: 160- 163.  
[13] 陈业高. 植物化学成分[ M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 42