

HPLC 法测定不同品种不同产地菊芋叶片中绿原酸的含量

张海娟 黄增荣 隆小华 刘 玲 刘兆普*

南京农业大学资源与环境科学学院 江苏省海洋生物学重点实验室 南京 210095

摘要:为建立同时测定大丰地区3个菊芋品种及大庆地区2个菊芋品种叶片绿原酸含量的方法,采用高效液相色谱法对不同品种不同产地菊芋叶片中绿原酸含量进行测定。结果表明:1)在检测条件流动相为1%磷酸溶液、乙腈(87:13)、流速1 mL/min和检测波长327 nm时,绿原酸在0.01~0.1 mg/mL呈良好的线性关系,精密度良好,平均回收率为98.21%,RSD=0.68%;2)大丰地区南芋1号、青芋2号、南芋10号叶片中绿原酸含量分别为干重的0.431%、0.040%和0.933%;3)大庆地区南芋1号、南芋9号叶片中绿原酸含量分别为干重的1.245%、2.139%。研究结果表明菊芋叶片中绿原酸含量在不同品种不同生态区域间有差异,HPLC方法简便、快速、准确,可用于菊芋叶片中绿原酸含量的测定。

关键词:高效液相色谱;菊芋;绿原酸;品种;产地

中图分类号:Q949.783.5

文献标识码:A

Determination of Chlorogenic Acid of Different Varieties of *Helianthus tuberosus* Leaves from Different Areas by HPLC

ZHANG Hai-juan, HUANG Zeng-rong, LONG Xiao-hua, LIU Ling, LIU Zhao-pu*

Jiang Su Provincial Key Laboratory of Marine Biology, College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The aim of this study is to develop a method for determining the content of chlorogenic acid in 3 varieties of *Helianthus tuberosus* in Dafeng area and 2 varieties of *Helianthus tuberosus* in Daqing area. Accordingly, HPLC technology was used to determine the chlorogenic acid content in the leaves of the *Helianthus tuberosus* in different varieties from different areas. The results showed: 1) The calibration curve showed a good linear relationship in the range of 0.01-0.1 mg/mL for chlorogenic acid under the conditions of 1% water-phosphoric-ACE (87:13) as the mobile phase, a flow rate of 1.0 mL/min and detection wavelength of 327 nm. The precision was fine and the average recovery rate of chlorogenic acid was 98.21%, RSD was 0.68%. 2) In Dafeng area, the chlorogenic acid contents in the leaves of the dry weight of Nanyu No. 1, Qingyu No. 2, Nanyu No. 10 were 0.431%, 0.040%, 0.933%. 3) In Daqing area, the chlorogenic acid contents in the leaves of the dry weight of Nanyu No. 1, Nanyu No. 9 were 1.245%, 2.139%. These results suggested that chlorogenic acid content in *Helianthus tuberosus* leaves was dependent on the variety differences and ecological region differences. This method of HPLC is simple, rapid and accurate and thus is suitable for measuring the chlorogenic acid content in *Helianthus tuberosus* leaves.

Key words: HPLC; *Helianthus tuberosus*; Chlorogenic acid; variety; experimental place

菊芋(*Helianthus tuberosus* Linn.) 俗称洋姜、地环、鬼子姜,原产于北美,为菊科(Compositae)向日葵属多年生草本植物^[1]。菊芋叶片中含有大量的化学成分,主要是酚类和倍半萜内酯类化合物。绿原酸类化合物广泛存在于植物中,是菊芋中的重要

生理活性成分^[2],具有降压、利胆、清除自由基、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老等功能,此外还能抗过敏、抗艾滋病毒、预防心血管疾病和糖尿病等功能^{[3][4]}。绿原酸(Chlorogenic acid)是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类化合物,为多酚类化合物,是由咖啡酸(Caffeic acid)与奎尼酸(Quinic acid)组成的缩酚酸,异名咖啡单宁酸,化学名3-O-咖啡酰奎尼酸(3-O-caffeoylquinic acid),分子式: C₁₆H₁₈O₉,分子量:345.30。绿原酸主要存在

收稿日期:2010-04-26 接受日期:2010-07-30

基金项目:国家“863”计划重点资助项目(2007AA091702);公益性行业(农业)科研专项经费项目(200903001-05)

* 通讯作者 E-mail: sea@njau.edu.cn

于金银花和杜仲中^[5,6]。

近年来对绿原酸的研究主要集中于金银花和杜仲叶中绿原酸的提取纯化、含量测定、结构鉴定及药理作用等方面^[7]。菊科向日葵属植物菊芋中富含绿原酸类化合物^[2]。本文探索采用 HPLC 检测方法检测菊芋叶片中绿原酸条件,并对大丰地区 3 个菊芋品种叶片及大庆地区 2 个菊芋品种叶片绿原酸的含量进行比较,以期对菊芋叶片中绿原酸的测定及提取提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪,紫外检测器,Agilent 化学工作站(美国安捷伦公司);超声波清洗器(KH2200,昆山禾创);万分之一电子分析天平;烤箱;微型粉碎机(FZ102,天津泰斯特)。

1.2 试剂

绿原酸对照品,购于中国药品生物制品检测所;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

1.3 试验材料

试验材料共计 5 份(表 1),分别于 2009 年 9 月采于大丰试验基地,2009 年 8 月采于大庆试验基地,洗净后低温烘干,备用。

表 1 菊芋叶片品种及产地

Table 1 Varieties and producing area of the leaves of *H. tuberosus*

编号 No.	品种 Varieties	试验基地 Experimental base
1	南芋 1 号	江苏大丰
2	青芋 2 号	江苏大丰
3	南芋 10 号	江苏大丰
4	南芋 1 号	黑龙江大庆
5	南芋 9 号	黑龙江大庆

1.4 色谱条件

色谱柱: Agilent C₁₈(4.6 × 150 mm, 5 μm); 流动相: 1% 磷酸溶液: 乙腈 = 87: 13, 流速: 1 mL/min; 检测波长: 327 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL。

1.5 对照品溶液制备

用万分之一天平精密称取绿原酸标准品 0.01 g,用 60% 乙醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶,摇匀,作为原液。再分别稀释到 0.06、0.04、0.02 mg/mL 和 0.01 mg/mL,用 60% 乙醇定容于 50 mL 容量瓶,

摇匀待用。

1.6 样品测定溶液的制备

各样品分别取菊芋叶片烘干、粉碎,过 40 目筛。精密称取粉碎的菊芋叶片 1 g(3 份),加入 20 mL 甲醇,超声提取 2 次,每次 45 min,合并滤液,定容至 50 mL。将提取液过 0.45 μm 滤膜,作为样品溶液。

2 结果

2.1 线性关系的考察

精密吸取对照品溶液 5 μL 注入高效液相色谱仪,测定其峰面积,见图 1。以峰面积积分为纵坐标(Y),样品浓度(mg/mL)为横坐标(X),绘制标准曲线,结果表明绿原酸在 0.01 ~ 0.1 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。回归方程为 $Y = m \cdot X + b$, $m = 20156.59087$, $b = -6.61778$, 相关性: 0.99998。

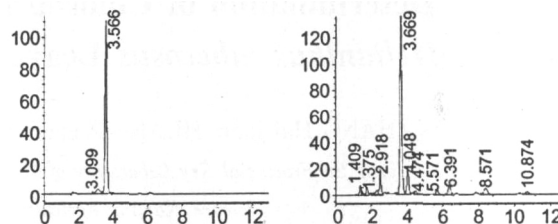


图 1 绿原酸对照品(A)和菊芋叶样品(B) HPLC 图谱

Fig. 1 The HPLC Chromatogram of chlorogenic acid standard (A) and sample of *H. tuberosus* leaves (B)

2.2 精密度实验

精密吸取对照品溶液 5 μL 注入高效液相色谱仪,重复进样 5 次,测定其峰面积, RSD 为 0.155%, 精密度良好,结果见表 2。

表 2 绿原酸含量测定的精密度实验

Table 2 Precision experiment of chlorogenic acid content determination

序号 No.	含量 (mg/mL) Content	平均含量 (mg/mL) Average content	RSD (%)
1	0.1001		
2	0.1005		
3	0.1003	0.1002	0.172
4	0.1002		
5	0.1001		

2.3 稳定性实验

取上述对照品溶液,每隔 2 h 进样,测定其峰面积,结果表明在 24 h 内基本稳定。

2.4 重复性实验

精确称取同一样品 5 份,依 2.3 方法制备样品溶液,分别在相同条件下测定绿原酸的含量,结果表

明重复性良好。

2.5 加样回收率实验

表 3 绿原酸回收率

Table 3 Recovery of chlorogenic acid

序号 No.	样品含量 Content (mg)	加入量 Adding (mg)	测得量 Determining (mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average (%)
1	0.205	0.100	0.302	98.54	
2	0.205	0.100	0.303	99.02	
3	0.205	0.200	0.401	98.05	98.21
4	0.205	0.200	0.402	98.54	
5	0.205	0.300	0.499	97.07	
6	0.205	0.300	0.501	98.05	

在样品中加入一定浓度的绿原酸对照品溶液,按“样品测定溶液的制备”项下操作,在上述色谱条件下进行测定,分别计算加样回收率,结果见表 3,绿原酸的平均回收率为 98.65%,RSD=0.68%。

2.6 样品含量的测定

分别称取大丰地区 3 个菊芋品种叶片粉末及大庆地区 2 个菊芋品种叶片粉末,按“1.6”的方法制备供试液,测定含量,结果见表 4。

表 4 不同产地不同品种菊芋叶片绿原酸含量测定结果
Table 4 Content of chlorogenic acid from different artichoke varieties in different producing area

产地 Experimental place	品种 Varieties	绿原酸含量 (%) Content of chlorogenic acid
大丰地区	南芋 1 号	0.431
	青芋 2 号	0.040
	南芋 10 号	0.933
大庆地区	南芋 1 号	2.139
	南芋 9 号	1.245

对大丰地区菊芋叶片绿原酸含量的测定,菊芋 10 号叶片的含量达到干重的 0.933%,明显高于南芋 1 号的 0.431% 和青芋 2 号的 0.040%,差异较大,表明大丰地区不同品种菊芋叶片绿原酸含量有较大差异。由于青芋 2 号成熟较早,采样时部分已经枯萎,所以含量不高,有待来年采样继续研究。对大庆地区菊芋叶片绿原酸含量的测定,南芋 1 号叶片的含量达到干重的 2.139%,高于菊芋 9 号的 1.245%,大庆地区 2 个品种菊芋叶片绿原酸含量也有较大差异。采自大庆基地的样品中绿原酸含量明

显高于大丰地区,可能与当地气候、光照、水分等因素有关。

3 结论

3.1 在选择流动相时,比较了甲醇-水-磷酸和乙腈-水-磷酸系统,以甲醇-水-磷酸为流动相时,样品的保留时间较长,且分离度不是很好。而以乙腈-水-磷酸为流动相时,绿原酸与杂质能得到较好的分离,加酸后能够抑制拖尾现象。

3.2 试验结果表明,不同品种及不同产地菊芋叶片的主要活性成分-绿原酸含量的分布范围是 0.040%~2.139%,差异较大。

3.3 试验表明菊芋叶片中绿原酸含量在不同品种不同生态区域间有差异,可根据菊芋不同用途选择不同菊芋品种在不同区域进行种植。

参考文献

- 1 Stanley JK, Stephen FN. *Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke*. New York: CRC Press, 2008: 55.
- 2 Yuan XY(袁晓艳), Gao MZ(高明哲), Wang K(王锴) et al. Analysis of chlorogenic acids in *Helianthus tuberosus* Linn leaves using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Chin J Chrom(色谱)* 2008 26: 335-338.
- 3 Chen JJ(陈娟娟), Fang JG(方建国), Wan J(万进) et al. An in vitro study of the anti-cytomegalovirus effect of chlorogenic acid. *Herald Med(医药导报)* 2009 28: 1138-1141.
- 4 Liu JH(刘军海), Qiu AY(裘爱泳), Ren HL(任惠兰). Research on extraction and purification progress of chlorogenic acid in *Flos Lonicerae*. *J Tradit Chin Veter Med(中兽医医药杂志)* 2007 6: 32-35.

(下转第 1159 页)

组 尤其是 TBHQ 组的 POV 与空白对照组的差异显著 是比较理想的抗氧化剂。 V_E 是一种公认的抗氧化剂 但其对植物油的抗氧化效果表现不一 如果油脂中 V_E 含量低 添加 V_E 后则抗氧化效果显著。本试验中可能是石榴籽油中 V_E 含量比较丰富 所以 V_E 对其抗氧化效果不明显。PG 对石榴籽油的抗氧化效果也不如 TBHQ。对于这三种抗氧化剂的抗氧化效果强弱顺序依次为: TBHQ > PG > V_E 。由图 3 可以看出 V_C 对三种抗氧化剂均有良好的协调作用 对 TBHQ 的抗氧化协同作用最强 0.2 g/kg TBHQ + 0.1 g/kg V_C 能将杏仁油的贮藏期从 27 个月延长到 40 个月以上 是良好的抗氧化剂及增效剂。

3 结论

3.1 气相-质谱分析石榴籽油组分的谱图显示 水酶法提取的石榴籽油主要脂肪酸组成有 8 种 分别为: 石榴酸 82.314%、亚油酸 4.881%、油酸 4.188%、棕榈酸 2.231%、硬脂酸 1.813%、花生酸 2.569% 等 不饱和脂肪酸含量达 94%。

3.2 根据 Arrhenius 经验公式 Schaal 烘箱法中油脂存放的 1 d 相当于 20 °C 条件下贮藏 1 个月的货架寿命 计算货架寿命以 pov 值低于 10 来计算。温度对石榴籽油的氧化作用比较明显 光线对石榴籽油氧化作用的影响不大。所以 室温条件下无论见光或者避光 石榴籽油放置 3 年其过氧化值仍低于 2.0 meq/kg 具有很好的氧化稳定性。

3.3 添加抗氧化剂可明显提高石榴籽油的贮藏稳定性 随着存放时间的延长 效果愈显著。 V_E 和 PG 对石榴籽油抗氧化效果不大显著 TBHQ 对石榴籽油表现出显著的抗氧化效果。 V_C 是 TBHQ 的有效增效剂 200 mg/kg TBHQ + 100 mg/kg V_C 作为石榴籽油的抗氧化剂 可使石榴籽油的贮藏期从 27 个月延长到 40 个月以上 抗氧化效果显著。

参考文献

- 1 Zhao YR(赵云荣), Wang WL(王文领), Wang Y(王勇), et al. Analysis of fatty acid in pomegranate seed. *Chem Res (化学研究)* 2005, 16(2): 72-74.
- 2 Kim ND, Mehta R, Yu W et al. Chemopreventive and adjuvant pomegranate (punicagranatum) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002, 71: 203-217.
- 3 Van Elswijk DA, Schobel UP, Lansky EP et al. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry* 2004, 65: 233-241.
- 4 Ma Q(马齐), Qin T(秦涛), Wang LE(王丽娥) et al. Research on nutritional content and application of pomegranate. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)* 2007, 28: 237-241.
- 5 Chen J(陈晶), Xu SY(许时婴). Study on extraction process of Linseed oil by aqueous enzymatic method. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)* 2007, 28: 151-154.
- 6 Chen YG(陈业高), Lu Y(卢艳), Liu Y(刘莹), et al. Study on fatty acids extracted from pomegranate seed oil. *Food Sci (食品科学)* 2003, 24: 111-112.
- 7 Kaufman M, Wiesman Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *J Agr Food Chem* 2007, 55: 10405-10413.
- 8 Miao LL(苗利利), Deng H(邓红), Qiu NX(仇农学). Ultrasonic wave auxiliary extraction technology for pomegranate seeds oil and analysis of fatty acid by GC-MS. *Sci Tech Food Ind(食品工业科技)* 2008, 29: 226-231.
- 9 Wang H(王惠), Li ZX(李志西), Li YP(李彦萍). Fatty acid composition and application of Punica granatum L. Seed Oil. *China Oil Fat(中国油脂)*, 1998, 23(2): 54-56.
- 10 Miao LL(苗利利), Qiu NX(仇农学), Pang FK(庞福科), et al. Effect of different extraction method on the content of punicic acid in pomegranate seed oil. *China Oil Fat(中国油脂)* 2009, 34(3): 6-8.

(上接第 1109 页)

- 5 Wang LN(王丽楠), Yang MH(杨美华). Comparison of the content of main effective constituents among different parts of *Eucommiae ulmoides*. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)* 2009, 21: 108-110.
- 6 Liu JH(刘军海), Qiu AY(裘爱泳). The extraction and purification of chlorogenic acid from leaves of *Eucommia ul-*

moides. *Shandong Med J(山东医药)* 2004, 44(32): 7-9.

- 7 Li LJ(李利军), Hao XC(郝学超), Cheng H(程昊) et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid and caffeic acid by sweeping micellar electrokinetic capillary chromatography. *Chin J Anal Lab(分析实验室)*, 2008, 28: 119-122.