

柴达木盆地不同生长期菊芋叶片绿原酸含量变化规律研究

岳会兰 毕宏涛 于瑞涛 张本印 陶燕铎*

(中国科学院藏药研究重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810008)

摘要: 本研究以柴达木盆地不同生长期菊芋叶片为研究材料, 建立了菊芋叶片绿原酸 HPLC 快速定量检测方法, 并对柴达木盆地菊芋叶片绿原酸含量随生长期变化规律进行研究。在选择流动相时, 本文对测定条件进行优化, 获得了较好的分离度, 并进行了标准曲线的绘制。对不同采集时间菊芋叶片绿原酸含量测定结果表明, 不同生长期菊芋叶片绿原酸含量差异显著, 最高月份含量可达到最低月份含量的 2 倍, 8 月 1 日至 10 月 15 日菊芋叶片绿原酸含量呈上升趋势, 至 10 月 15 日达到最高(叶片干重的 0.83%), 随后逐渐降低。以上实验数据表明, 柴达木地区作为绿原酸提取原料的菊芋叶片采收期以 10 月 15 日左右为宜。

关键词: 菊芋, 绿原酸, 含量, 变化规律

Research of the contents variation of chlorogenic acid in the leaves of *Helianthus tuberosus* L. during different growth stages in Chaidamu

YUE Hui-lan, BI Hong-tao, YU Rui-tao, ZHANG Ben-yin, TAO Yan-duo*

(Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract: In this study, the rapid HPLC quantitative detection method of chlorogenic acid, and the contents variation of chlorogenic acid in the leaves of *Helianthus tuberosus* L. during different growth stages in Chaidamu were studied. In the choice of the mobile phase, the determination conditions were optimized, and obtained a better resolution. In addition, the standard curve and was carried out. The results showed that the chlorogenic acid contents in the leaves of *Helianthus tuberosus* L. during different growth stages had significant differences. The chlorogenic acid contents in the leaves of *Helianthus tuberosus* L. during August 1st to October 15th had an upward trend, and the highest content was reached on October 15th. The above experimental data indicated that the harvest period of *Helianthus tuberosus* L. should be determined around the October 15th.

Key words: *Helianthus tuberosus* L.; chlorogenic acid; content; variation

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)01-0283-03

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.) 属菊科向日葵属多年生宿根草本植物, 因其地上似菊, 地下为芋而得名, 俗名洋姜、鬼子姜等。原产自北美洲, 于 17 世纪传入欧洲, 后传入伊朗、中国和日本。全球的热带、温带、寒带以及干旱、半干旱地区都有菊芋的分布^[1]。近几年, 我国对能源植物的开发和利用极大地促进了菊芋的大面积种植及开发项目的启动, 需求量日趋增大, 逐渐形成了很多较为规范化、规模化的菊芋种植园区和深度开发项目, 并形成了规模日趋扩大的较为完整的“菊芋块茎种植加工产业”链。但在菊芋产业链中, 菊芋地上部分的利用程度不高。绿原

酸(Chlorogenic acid) 类化合物广泛存在于植物中, 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, 是菊芋的重要生理活性成分^[2-3], 具有降压、利胆、清除自由基、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老等多种药理学功能^[4-5]。目前, 医药产业中所需的绿原酸主要来源于金银花和杜仲的叶片中^[6-7], 而菊芋叶片绿原酸的研究还处于起步阶段^[8-10]。因此, 为了明确菊芋叶片绿原酸含量变化规律, 更好的将其应用于医药领域, 本研究将建立 HPLC 菊芋叶片绿原酸快速定量检测方法, 并对柴达木盆地菊芋叶片绿原酸含量随生长期变化规律进行研究, 以为菊芋叶片中绿原酸的高效利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菊芋品种 J1 由兰州大学刘建全教授课题组提供; 菊芋叶片采集于青海省海西蒙古族藏族自治州

收稿日期: 2013-07-15 * 通讯联系人

作者简介: 岳会兰(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事药物化学及新药研发。

基金项目: 青海省科技厅“菊芋适宜性栽培技术研究”(2011-N-515)。

都兰县西河滩村菊芋种植基地(海拔 2830m; N36.386, E98.024), 分别于 2012 年 8 月至 11 月期间每月 1 日和 15 日采集 7 份样本(样本编号: QHDL-1、QHDL-2、QHDL-3、QHDL-4、QHDL-5、QHDL-6 和 QHDL-7) 洗净后低温烘干备用; 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 山东禹王; 其它试剂均为分析纯。

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; UPT-I-5 超纯水机 成都超纯科技有限公司; AG204 电子分析天平 梅特勒公司; 烘箱 上海一恒科学仪器有限公司; WP800SL23-2 微波实验仪 南京汇研微波系统工程技术有限公司。

1.2 色谱条件

色谱柱: Dikma SynerSi 4u Fusion-RP 80R 250 × 4.6mm 4 micron; 柱温: 30℃; 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 327nm; 流动相: 0.2% 磷酸: 乙腈 = 82:18; 进样量 10μL。

1.3 对照品溶液制备

用精密称取绿原酸对照品 10mg, 用 60% 乙醇溶解并定容于 50mL 容量瓶, 摇匀, 得到 0.2mg/mL 储备液。再分别稀释到 0.1、0.08、0.06、0.04、0.02mg/mL 和 0.01mg/mL, 用 60% 乙醇定容于 25mL 容量瓶摇匀待用。

1.4 菊芋叶片绿原酸待测溶液制备

各样品分别取菊芋叶片烘干、粉碎, 过 80 目筛。精密称取粉碎的菊芋叶片 1g(3 份), 加入 20mL 60% 乙醇, 微波回流提取 2 次, 每次 25min, 合并滤液, 定容至 50mL。将提取液过 0.45μm 滤膜, 作为样品溶液。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

精密吸取对照品溶液 10μL 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), 样品重量(μg) 为横坐标(X), 绘制标准曲线, 结果表明绿原酸在 0.1~1.0μg 范围内呈良好的线性关系。回归方程为 $y = 1503.3x + 183.62$, 相关系数 R^2 为 0.9994。

2.2 精密度实验

精密吸取对照品溶液 10μL 注入高效液相色谱仪, 重复进样 6 次, 测定其峰面积, RSD 为 0.291%, 精密度良好, 结果见表 1。

表 1 精密度实验

Table 1 Precision experiments

| 实验号 | 峰面积 | 绿原酸含量 (μg) | 平均含量 (μg) | RSD (%) |
|-----|----------|---------------|--------------|------------|
| 1 | 1704.960 | 1.012 | | |
| 2 | 1697.443 | 1.007 | | |
| 3 | 1694.437 | 1.005 | | |
| 4 | 1700.450 | 1.009 | 1.007 | 0.291 |
| 5 | 1692.933 | 1.004 | | |
| 6 | 1695.940 | 1.006 | | |

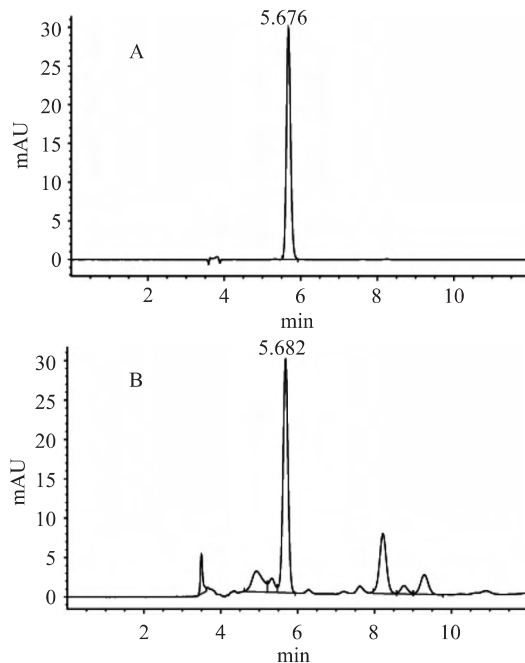


图 1 绿原酸对照品(A) 和菊芋叶样品(B) HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of chlorogenic acid standard(A) and leaf of *Helianthus tuberosus* L.(B)

2.3 稳定性实验

取上述对照品溶液, 每隔 4h 进样, 每次进样 10μL, 测定其峰面积, 结果表明在 24h 内绿原酸基本稳定, 结果见表 2。

表 2 稳定性实验

Table 2 Stability experiments

| 实验号 | 峰面积 | 进样时间(h) | RSD(%) |
|-----|----------|---------|--------|
| 1 | 1699.820 | 4 | |
| 2 | 1697.653 | 8 | |
| 3 | 1708.782 | 12 | |
| 4 | 1696.890 | 16 | 0.387 |
| 5 | 1690.540 | 20 | |
| 6 | 1691.665 | 24 | |

2.4 重复性实验

精密称取 QHDL-6 样品 6 份, 依 1.5 方法制备样品溶液, 每次进样 10μL, 分别在相同条件下测定绿原酸的含量, 结果见表 3, QHDL-6 样品的平均含量为 0.829%, RSD = 0.366%, 结果表明实验重复性良好。

表 3 重复性实验

Table 3 Repeatability experiments

| 实验号 | 称样量 (g) | 绿原酸含量 (%) | 平均含量 (%) | RSD (%) |
|-----|------------|--------------|-------------|------------|
| 1 | 1.006 | 0.829 | | |
| 2 | 1.002 | 0.826 | | |
| 3 | 1.005 | 0.830 | | |
| 4 | 1.000 | 0.833 | 0.829 | 0.366 |
| 5 | 1.008 | 0.831 | | |
| 6 | 1.010 | 0.825 | | |

2.5 加样回收率实验

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4,绿原酸的平均回收率为96.4%,RSD=0.871%。

表4 绿原酸回收率
Table 4 Chlorogenic acid recovery

| 实验号 | 样品含量(μg) | 加入量(μg) | 测得量(μg) | 回收率(%) | 平均回收率(%) | RSD(%) |
|-----|----------|---------|---------|--------|----------|--------|
| 1 | 200 | 100 | 289 | 96.3 | 96.4 | 0.871 |
| 2 | 200 | 100 | 285 | 95.0 | | |
| 3 | 200 | 200 | 389 | 97.3 | | |
| 4 | 200 | 200 | 387 | 96.8 | | |
| 5 | 200 | 300 | 479 | 95.8 | | |
| 6 | 200 | 300 | 485 | 97.0 | | |

2.6 样品含量的测定

分别称取菊芋叶片粉末,按“1.5”的方法制备供试液,测定含量,结果见表5。

表5 菊芋叶片材料编号与采集日期及其绿原酸含量

Table 5 The chlorogenic acid content determination of *Helianthus tuberosus* L. in different harvesting dates

| 材料编号 | 采集日期 | 绿原酸含量(%) | RSD(%) | p值(差异显著性分析) |
|--------|-------------|----------|--------|-------------|
| QHDL-1 | 2012年8月1日 | 0.42 | 3.03 | |
| QHDL-2 | 2012年8月15日 | 0.50 | 3.16 | 0.004 |
| QHDL-3 | 2012年9月1日 | 0.56 | 4.74 | 0.051 |
| QHDL-4 | 2012年9月15日 | 0.59 | 4.47 | 0.333 |
| QHDL-5 | 2012年10月1日 | 0.67 | 5.92 | 0.044 |
| QHDL-6 | 2012年10月15日 | 0.83 | 5.57 | 0.002 |
| QHDL-7 | 2012年11月1日 | 0.73 | 4.53 | 0.015 |

注:表中p值表示该采集日期与前一日期含量比较的差异显著性。

对样品绿原酸含量的测定结果显示,柴达木地区菊芋叶片绿原酸含量随其生长期变化明显。菊芋叶片绿原酸含量从8月1日干重的0.42%增长到10月15日的0.83%,随后下降至11月1日的0.73%。而10月1日至11月1日期间,正是菊芋块茎的关键膨大期,块茎增重明显,其中10月15日至11月1日期间,柴达木地区气温骤降,地上部分逐渐失水,至11月1日后,叶片完全失水变脆。地上部分绿原酸类化合物的合成可能与其块茎的膨大有一定的关系。

3 结论

本研究在选择流动相时,参照张海娟等^[10]的测定条件,并进行了优化,降低了甲醇-水-磷酸体系中

磷酸浓度。根据前期预实验结果,本实验选择0.2%的磷酸为流动相条件,不仅可以减少高浓度磷酸对柱填料的伤害,同时也能获得较好的分离度。此外,采用峰面积积分值为纵坐标(Y),样品重量(μg)为横坐标(X)做标准曲线,避免进样体积对含量测定的影响。

对不同采集时间菊芋叶片绿原酸含量测定结果表明,不同生长期菊芋叶片绿原酸含量差异显著,8月1日至10月15日菊芋叶片绿原酸含量呈上升趋势,至10月15日达到最高(叶片干重的0.83%),随后逐渐降低。以上实验数据说明,柴达木地区作为绿原酸提取原料的菊芋叶片采收时期以10月15日左右为宜。目前还没有文献报道过菊芋叶片中绿原酸随时间变化规律的研究,尤其是青海产菊芋叶片中绿原酸的相关研究尚未见报道。本研究对青海产菊芋叶片中绿原酸的采收和高效利用提供了重要的理论指导。

参考文献

- [1] Stanley JK, Stephen FN. Biology and Chemistry of Jerusalem Artichoke [M]. New York: CRC Press, 2008, 55.
- [2] Tchone M, Barwald G, Annemuller G, et al. Separation and identification of phenolic compounds in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) [J]. Science Des Aliments, 2006, 26(5): 394-408.
- [3] Jaiswal R, Deshpande S, Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids of *Rudbeckia hirta*, *Helianthus tuberosus*, *Carlina acaulis* and *Symphytotrichum novae-angliae* leaves by LC-MSn [J]. Phytochemical Analysis, 2011, 22(5): 432-441.
- [4] Zhao YY, Wang JK, Ballevre O, et al. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids [J]. Hypertension Research, 2012, 35(4): 370-374.
- [5] Mubarak A, Bondonno CP, Liu AH, et al. Acute effects of chlorogenic acid on nitric oxide status, endothelial function, and blood pressure in healthy volunteers: a randomized trial [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(36 SI): 9130-9136.
- [6] 兰小艳, 张学俊, 龚桂珍. 杜仲叶中绿原酸的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 86-89.
- [7] 罗磊, 郭晓园. 金银花中绿原酸的研究进展 [J]. 农产品加工, 2008, 8: 60-62.
- [8] 袁晓艳, 高明哲, 王锴, 等. 高效液相色谱-质谱法分析菊芋叶中的绿原酸类化合物 [J]. 色谱, 2008, 26(3): 335-338.
- [9] 张海娟, 刘玲, 郑晓涛, 等. 菊芋叶片绿原酸的提取工艺条件优化研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 261-265.
- [10] 张海娟, 黄增荣, 隆小华, 等. HPLC法测定不同品种不同产地菊芋叶片中绿原酸的含量 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(5): 1107-1109.