

高效液相色谱法考察木绣球不同部位中绿原酸含量

汤晶晶, 沈倩, 温沐榕, 施凯雁, 宣贵达*

浙江大学城市学院, 杭州 310015

摘要: 为比较木绣球不同部位中绿原酸的含量, 采用索氏提取法提取木绣球花、花托、茎、叶等四个部位的绿原酸并用 HPLC 法测定含量。色谱条件如下: Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(10:90), 检测波长为 327 nm, 流速为 1.0 mL/min。在上述色谱条件下, 绿原酸在 0.34 ~ 6.80 μg/mL 范围内线性良好。结果表明木绣球不同部位中绿原酸含量为: 花托(1.14%) > 花(1.02%) > 茎(0.51%) > 叶(0.45%)。木绣球中花托部位绿原酸含量最高, 木绣球整体均具有潜在的研究与开发价值。

关键词: 木绣球花; 绿原酸; 索氏提取; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

Determination of Chlorogenic Acid in Different Parts of *Viburnum macrocephalum* by HPLC

TANG Jing-jing, SHEN Qian, WEN Mu-rong, SHI Kai-yan, XUAN Gui-da*

Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China

Abstract: The contents of chlorogenic acid in flowers, torus, stems and leaves of *Viburnum macrocephalum* was determined by HPLC. *V. macrocephalum* was extracted by Soxhlet extraction method. The chromatographic condition was established as follows: Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, the mobile phase composed of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (10:90), the detection wavelength was 327 nm, the flow rate was 1.0 mL/min. Under the developed HPLC conditions, good linear relationship was established within the range of 0.34-6.80 μg/mL. The content of chlorogenic acid in different parts of *V. macrocephalum* was in following order; torus (1.14%) > flowers (1.02%) > stems (0.51%) > leaves (0.45%). The torus of *V. macrocephalum* had the highest content of chlorogenic acid. *V. macrocephalum* had the potential exploitation value.

Key words: *Viburnum macrocephalum*; chlorogenic acid; soxhlet extractor; HPLC

木绣球 (*Viburnum macrocephalum*) 为忍冬科荚蒾属, 别名绣球荚蒾, 木本植物。落叶或半常绿灌木, 花冠白色, 辐状, 形似绣球, 主要用于城市和园林的绿化树种, 原产于长江流域, 现分布于我国南北各地, 其花中含有较高的绿原酸。绿原酸具有抗菌、抗病毒、止血、抗氧化、消除自由基、抑制突变和抗肿瘤等多种生物活性效用^[1]。此外, 绿原酸具有广泛的生物活性, 现代科学对绿原酸生物活性的研究, 应用已深入到食品、保健、医药和日用化工等多个领域, 有植物“黄金”之美誉^[2]。目前, 对木绣球的药用价值的研究鲜有报道, 因此对木绣球不同部位绿原酸含量进行比较, 可以为进一步开发利用木绣球资源

提供科学依据。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

木绣球不同部位的样品均采自杭州萧山地区农业基地, 经浙江大学城市学院李林林老师鉴定为木绣球, 经阴干、低温烘干处理为干品。

1.2 仪器

Agilent G1322A 1260 型高效液相色谱仪 (Agilent 公司), Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); XS105 Dual Range 型电子天平 (梅特勒—托利多仪器有限公司); Eyela N-1100 型旋转蒸发仪 (日本 Eyela); 索氏提取器 (上海精宏实验设备有限公司); 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); KQ-700DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

收稿日期: 2013-10-29 接受日期: 2014-02-28

基金项目: 浙江大学城市学院 2013 年度大学生科研计划 (X2013562109)

* 通讯作者 Tel: 86-571-88015081; E-mail: xuangd@zucc.edu.cn

1.3 试剂

乙腈,色谱纯,购自上海凌峰化学试剂有限公司;磷酸,分析纯,购自上海凌峰化学试剂有限公司;甲醇,分析纯,购自上海振兴化工厂;绿原酸对照品,购自中山优诺生物科技发展有限公司(纯度 $\geq 99\%$)

2 方法与结果

2.1 绿原酸的提取

将干燥的木绣球中花、花托、茎、叶分别用粉碎机粉碎,各精密称取 2.000 g,用滤纸包好,置于索氏提取器中加 70% 的甲醇溶液 80 mL^[3],一部分加入索氏提取器中至与虹吸管相平,剩下的部分加入圆底烧瓶中,对样品浸泡 2 h,之后加热回流至无色。将回流液旋转蒸发干燥至恒重,记录重量。置于 5 °C 冰箱中待用。

2.2 色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm);柱温: 25 °C;流动相: 乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (10:90);流速: 1.0 mL/min;检测波长: 327 nm。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品 1.700 mg,置于 5 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇定容至刻度,并超声溶解,摇

匀,0.22 μm 滤膜过滤,取滤液即得,浓度为 0.34 mg/mL。

2.4 标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液 (0.34 mg/mL) 1.0、3.0、5.0、7.0、10.0、15.0、20.0 μL,注入高效液相色谱仪,以绿原酸对照品进样量 X (μg) 为横坐标,绿原酸峰面积大小 Y 为纵坐标,进行线性回归,得线性回归方程 $Y = 1451.5X + 6.6910$, $R^2 = 1.0000$ ($n = 7$)。绿原酸在 0.34 ~ 6.80 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.5 样品溶液的制备

准确称取 2.1 中的提取物各 20.0 mg,用 50% 甲醇定容至 4 mL 的棕色容量瓶中,超声溶解,置于 5 °C 冰箱中备用。

2.6 稳定性试验

取对照品溶液分别于配置后 0、2、4、8 h 和 12 h,取滤液 10 μL 注入色谱仪,记录色谱图,峰面积的 RSD = 0.06%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 加样回收率

精密称取木绣球花 4 份,每份 1.000 g,各精密加入绿原酸对照品 0.4 mg,按 2.1 方法提取后,经 0.22 μm 滤膜过滤,进样测定,每一水平测定 3 次,平均回收率为 98.93%,RSD = 2.85%。见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n = 4$)

Table 1 The recovery rate of chlorogenic acid in *V. macrocephalum* flowers ($n = 4$)

编号 No.	取样量 Sampling amount(g)	样品中绿 原酸含量 Chlorogenic acid content in sample(mg)	加入绿原酸 对照品量 Added amount of chlorogenic acid(mg)	测得量 Detected amount(mg)	回收率 Recovery(%)	平均回收率 Average recovery(%)	相对标准偏差 RSD(%)
1	1.0237	4.25	0.40	4.52	97.2		
2	1.0442	4.22	0.40	4.59	99.4	98.93	2.85
3	1.0811	4.10	0.40	4.62	102.7		
4	1.0121	4.34	0.40	4.57	96.4		

2.8 精密度的考察

取绿原酸对照品溶液,连续进样 6 次,日内精密度 RSD = 0.46%。连续进样 5 天,日间精密度 RSD = 2.63%。

2.9 样品含量的测定

将 2.5 制备的木绣球花、花托、叶、茎的提取液经 0.22 μm 滤膜过滤,各取 10 μL,平行进样 5 次,得色谱图,根据回归方程计算样品中绿原酸含量。

结果表明:木绣球不同部位中绿原酸含量为:花托 (1.14%) > 花 (1.02%) > 茎 (0.51%) > 叶 (0.45%)。

3 讨论

色谱条件的建立过程中,对于流动相乙腈-磷酸溶液的浓度配比,进行了条件摸索。结果表明,用乙腈-0.5% 磷酸水溶液 (10:90)^[3] 作为流动相,其出峰

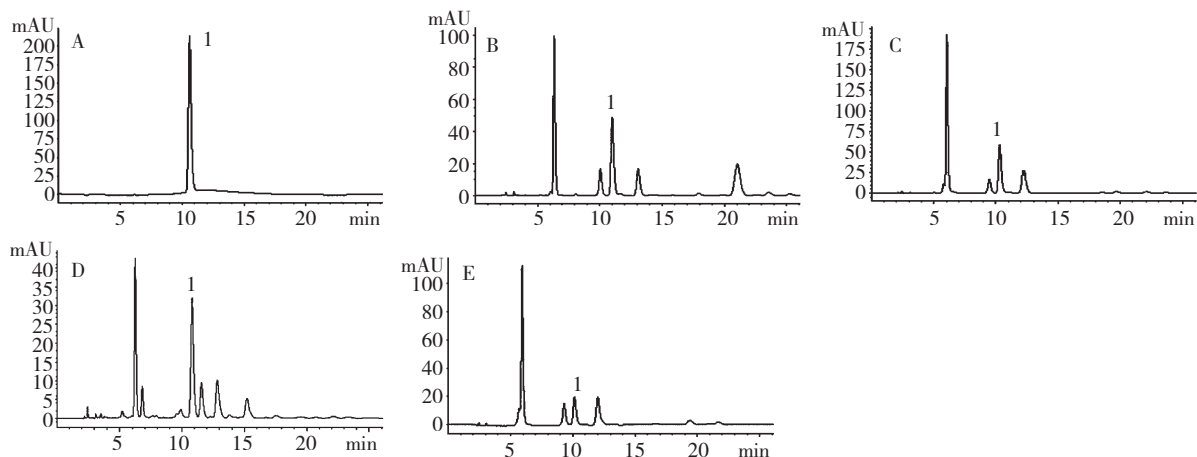


图1 绿原酸对照品(A)、木绣球花(B)、花托(C)、茎(D)和叶(E)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of chlorogenic acid (A), *V. macrocephalum* flowers (B), torus (C), leaves (D) and stems (E)

分离度不够,峰型不太理想,经过调整,最后确定使用乙腈-0.1%磷酸水溶液(10:90)作为流动相。

采用所建立的色谱条件进行样品测定,实验结果表明,木绣球不同部位中绿原酸含量为:花托(1.14%) > 花(1.02%) > 茎(0.51%) > 叶(0.45%),虽然木绣球花托以及花部位绿原酸含量较高,但我们认为木绣球的茎以及叶部位的开发价值比较高。原因如下:(1)花托以及花虽然绿原酸含量较高,但其受花期的限制,相比之下,木绣球的茎和叶的收集时间比较自由和灵活;(2)木绣球是木本植物,相比于花和花托,其茎和叶的数量比较多,可利用的绿原酸会更加可观。本实验测得木绣球花部位绿原酸含量为1.02%,与参考文献报道的1.50%^[3]存在差异,比较结果,我们分析可能存在以下几种原因:(1)木绣球花的原料收集地不同,不同地区的木绣球花中绿原酸的含量也会存在差异;(2)实验所使用的仪器不同,其灵敏度存在差异,可能造成结果差异;(3)与参考文献^[3]所建立的方法进行比较,提取方法以及色谱条件存在差异,也会造成结果差异。

本实验所建立的HPLC测定木绣球中绿原酸的含量的方法简便、快速、可靠,利用本方法测定了木绣球不同部位的绿原酸含量,结果表明木绣球不同部位的绿原酸含量与菊花^[4]、马铃薯块茎^[5]、茵陈^[6]、金银忍冬茎和果实^[7]等相比均较高,其中木绣球花托中的绿原酸含量最高。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 283.
- 2 Liu HJ (刘海军), Qiu AY (裘爱泳), Ren HL (任惠兰). Progress report on the methods of extraction and purification separation of chlorogenic acid. *Cereals & Oils* (粮食与油脂), 2007, 7:42-45.
- 3 Wang YC (王英臣), Chang X (常序), Xie XX (谢贤仙). Extraction and determination of chlorogenic acid in *V. Macrocephalum* Flowers. *Guizhou Agric Sci* (贵州农业科学), 2010, 8:175-176.
- 4 Li Z (李宗), Chen ZM (陈在敏), Liao LS (廖雷生), et al. The chlorogenic acid content in the chrysanthemum. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24:329-330.
- 5 Zhang JH (张建华), Jin LP (金黎平), Xie KY (谢开云), et al. The chlorogenic acid content in the chrysanthemum. *Chin Food Sci* (食品科学), 2007, 28:301-304.
- 6 Liu Y (刘影), Yu ZG (于治国), Yuan L (袁璐), et al. Determination of chlorogenic acid in *Herba Artemisiae Scopariae*. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2006, 21:207-209.
- 7 Qing M (青梅), Wang SW (王素巍), Yang H (杨慧), et al. Extraction and determination of chlorogenic acid in *Lonicera maackii* stem and fruit. *J Inner Mongolia Agric Univ* (内蒙古农业大学学报), 2011, 32:281-284.