

doi:10.3969/j.issn.1672-5425.2017.02.015

苗芹, 叶明国, 刘苏静, 等. 高效液相色谱法测定菊芋叶和向日葵叶中绿原酸[J]. 化学与生物工程, 2017, 34(2): 63-67.

## 高效液相色谱法测定菊芋叶和向日葵叶中绿原酸

苗芹<sup>1,4</sup>, 叶明国<sup>2</sup>, 刘苏静<sup>1</sup>, 衣悦涛<sup>1</sup>, 夏传海<sup>3\*</sup>

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东烟台 264003; 2. 中国科学院山东综合技术转化中心烟台中心, 山东烟台 264003; 3. 鲁东大学资源与环境工程学院, 山东烟台 264025; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 采用 HPLC 法测定菊芋叶和向日葵叶中绿原酸含量, 并对收获期菊芋叶和向日葵叶中绿原酸的积累分布进行研究。色谱条件为: ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 检测波长 327 nm, 进样量 10 μL, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 流动相为乙腈-水(含体积分数为 0.05% 的甲酸), 梯度洗脱。提取条件: 甲醇-水(70:30, 体积比)回流浸提, 料液比 1:25(g:mL), 提取时间 1.5 h, 提取温度 60 °C。结果表明, 菊芋叶和向日葵叶中的绿原酸在收获期积累分布差异显著, 菊芋叶中绿原酸含量在 10 月下旬最高, 为 4.20%; 向日葵叶中绿原酸含量在 8 月下旬最高, 为 0.47%。因此, 10 月下旬的菊芋叶可以作为提取绿原酸的植物原材料。

**关键词:** 绿原酸; 菊科植物; 菊芋叶; 向日葵叶; 高效液相色谱

中图分类号: O 657.72 R 284.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-5425(2017)02-0063-05

## Determination of Contents of Chlorogenic Acid in *Helianthus tuberosus* L. Leaves and *Helianthus annuus* L. Leaves by HPLC

MIAO Qin<sup>1,4</sup>, YE Ming-guo<sup>2</sup>, LIU Su-jing<sup>1</sup>, YI Yue-tao<sup>1</sup>, XIA Chuan-hai<sup>3\*</sup>

(1. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. Yantai Center for Integrated Technology Transfer Center, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 3. College of Resources and Environmental Engineering, Ludong University, Yantai 264025, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The contents of chlorogenic acid(3-CQA) in *Helianthus tuberosus* L. leaves and *Helianthus annuus* L. leaves were determined by HPLC. The content accumulated distributions of 3-CQA in *Helianthus tuberosus* L. leaves and *Helianthus annuus* L. leaves at harvest time were investigated. The chromatographic conditions were as follows: a ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), column temperature of 30 °C, detection wavelength of 327 nm, injection volume of 10 μL, flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, gradient mobile phase of acetonitrile-water(containing 0.05% formic acid). The optimal extraction conditions were as follows: solvent refluxing extraction with methanol-water(70:30, volume fraction), material-liquid ratio of 1:25(g:mL), extraction time of 1.5 h, extraction temperature of 60 °C. The results demonstrated that the content accumulated distributions of 3-CQA in *Helianthus tuberosus* L. leaves and *Helianthus annuus* L. leaves were significant different at harvest time. The content of 3-CQA in *Helianthus tuberosus* L. leaves reached the highest level (4.20%) in late October. The content of 3-CQA in *Helianthus annuus* L. leaves reached the highest level (0.47%) in late August. Thus, *Helianthus tuberosus* L. leaves in late October could be used as the raw material

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划资助项目(2011BAC02B04), 山东省科技重大专项(2015ZDJS03002), 山东省高等学校优势学科人才团队培育计划“蓝黄两区滨海资源与环境团队”

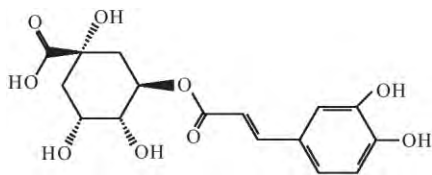
收稿日期: 2016-09-29

作者简介: 苗芹(1989-), 女, 山东滕州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源高值化利用, E-mail: qmiao@yic.ac.cn; 通讯作者: 夏传海, 教授, E-mail: chxia\_ldu@hotmail.com.

for extracting chlorogenic acid.

**Keywords:** chlorogenic acid; Compositae plant; *Helianthus tuberosus* L. leaf; *Helianthus annuus* L. leaf; HPLC

绿原酸(chlorogenic acid)是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸代谢途径产生的一种多羟基酚酸类化合物<sup>[1-2]</sup>,从蕨类植物到高等双子叶植物均有分布,其中含量较高的有杜仲皮、金银花、葵花籽、咖啡豆、沙棘果等<sup>[3-4]</sup>。绿原酸具有抗菌消炎、保肝利胆、抗氧化、降血压、抗癌、保护心脑血管、提高机体免疫力等多种功效<sup>[5-7]</sup>,广泛应用于医药、保健、食品、日用化工等领域<sup>[8]</sup>。目前,国外主要从咖啡豆中提取绿原酸<sup>[4]</sup>,但残留的咖啡因对人体有害;国内通常从杜仲皮和金银花中提取绿原酸<sup>[6]</sup>,但杜仲皮和金银花是重要的中药资源。因此,寻找资源充足、价格低廉、绿原酸含量丰富的替代植物势在必行。



绿原酸

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)为菊科向日葵属草本植物,具有耐寒、耐贫瘠、抗盐碱、抗虫害、繁殖能力强、保持水土等特性,被广泛种植<sup>[9]</sup>。菊芋地下块茎含有丰富的氨基酸、糖类营养物质,可熬粥、腌制,也可作为副食、调味品的加工原材料<sup>[10]</sup>。菊芋叶中含有大量的生物活性物质,具有健胃滋补、轻便利尿、消肿、抗癌、预防肿瘤等功效,可治疗糖尿病、高血压、骨折肿痛等<sup>[11]</sup>。因此,菊芋是一种极具环境保护和药用价值的经济植物。

向日葵(*Helianthus annuus* L.),又名葵花、向阳花等,与菊芋同为菊科向日葵属草本植物<sup>[12]</sup>,具有较强的抗旱、耐盐碱及适应能力。可有效改良沿海滩涂地区盐碱地的土壤肥力,提高农业经济<sup>[13]</sup>。药理学研究发现<sup>[14]</sup>,向日葵的叶和花具有清热解毒、益气补肾、降血压、预防肿瘤等功效,是一种值得开发和利用的药用植物。

目前,国内外对菊芋地下块茎和葵花籽研究较多,而对菊芋叶和向日葵叶研究较少。本课题组前期研究发现,菊芋不同部位绿原酸含量差异显著,其中菊芋叶中绿原酸含量(3.40%)明显高于其它部位(茎,0.5%;

花,0.25%;块茎,0.01%)。然而,对收获期菊芋叶中绿原酸的积累分布规律没有深入研究。作者在此采用稀醇溶剂回流浸提法提取菊芋叶和向日葵叶中的绿原酸,采用HPLC法测定绿原酸含量,并对收获期菊芋叶和向日葵叶中绿原酸的积累分布规律进行研究,为寻找合适的绿原酸植物原料及其最佳采集时间提供帮助。

## 1 实验

### 1.1 材料

菊芋叶和向日葵叶均于2015年采自烟台海岸带研究所种植基地,其采集时间与编号如表1所示。

表1 植物叶样品采集时间与编号

Tab. 1 Collection time and codes of plant leaf samples

菊芋叶采集时间	编号	向日葵叶采集时间	编号
9月2日	J-1	8月15日	X-1
9月15日	J-2	8月30日	X-2
9月29日	J-3	9月4日	X-3
10月4日	J-4	9月15日	X-4
10月15日	J-5	9月29日	X-5
10月28日	J-6	10月4日	X-6
11月4日	J-7	10月15日	X-7
11月15日	J-8		

将菊芋叶和向日葵叶样品分类存放,经烘干、粉碎、筛分后,避光室温(25℃)贮存,备用。

### 1.2 试剂与仪器

绿原酸标准品(98%)、三氟乙酸,阿拉丁有限公司;色谱级甲醇、乙醇、乙腈,上海星可高纯溶剂有限公司;超纯水,娃哈哈集团有限公司。

分析天平,赛多利斯科学仪器有限公司;干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;标准检验筛(40目),浙江上虞华丰五金仪器有限公司;中草药粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司;DF-101S型磁力搅拌器,上海翔雅仪器设备有限公司;Agilent 1200型高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;KQ5200E型超声清洗器,昆山超声仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 色谱条件

Agilent 1200型高效液相色谱仪;色谱柱为ZOR-

BAX Extend-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈-水(含体积分数为0.05%的甲酸);梯度洗脱:0~5 min(10%乙腈),5~15 min(10%~15%乙腈),15~25 min(15%~100%乙腈),25~35 min(100%~10%乙腈);柱温30℃;检测波长327 nm;流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量10 μL。

### 1.3.2 标准品溶液的配制

精密称取绿原酸标准品13.32 mg置于25 mL容量瓶中,用50%甲醇溶解并稀释定容,摇匀,作为绿原酸标准品溶液,4℃冷藏保存,备用。

### 1.3.3 标准曲线的绘制

准确量取绿原酸标准品溶液适量于10 mL容量瓶中,加入50%甲醇稀释定容,配制成浓度为159.84 μg·mL<sup>-1</sup>的绿原酸稀释溶液;取适量进一步稀释,得到梯度浓度(μg·mL<sup>-1</sup>)分别为159.84、63.936、31.968、15.984、6.3936、3.1968、1.5984的绿原酸标准品溶液,按色谱条件进样测定HPLC图谱,计算峰面积。以峰面积(*y*)为纵坐标、绿原酸浓度(*x*)为横坐标绘制绿原酸标准曲线,拟合线性方程。

### 1.3.4 样品溶液的制备

称取粉碎过筛后的植物叶样品约100 mg置于50 mL圆底烧瓶中,加入70%甲醇25 mL,称量;60℃下恒温加热回流提取1.5 h,室温放置冷却,称重;用70%甲醇补足失重,过滤;取上清液,用0.45 μm微孔滤膜过滤;重复提取2次,得绿原酸样品溶液。

### 1.3.5 绿原酸含量的测定

取适量绿原酸样品溶液置于棕色进样瓶中,按色

谱条件进样检测,计算峰面积,根据线性方程计算样品溶液中绿原酸浓度,按下式计算植物叶中绿原酸含量:

$$E = \frac{c \times V}{W \times 10^3} \times 100\%$$

式中:*E*为植物叶中绿原酸含量,%;*W*为植物叶样品的质量,mg;*c*为样品溶液中绿原酸浓度,μg·mL<sup>-1</sup>;*V*为样品溶液体积,mL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测波长的确定

取绿原酸标准品溶液,在190~400 nm波长范围内进行紫外光谱扫描,结果如图1所示。

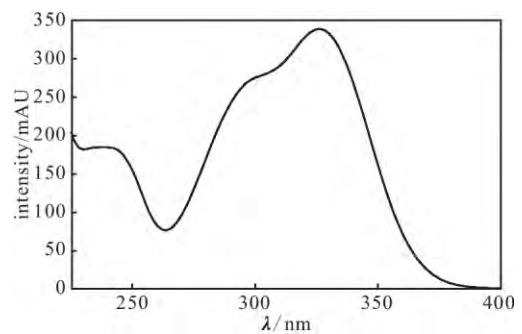


图1 绿原酸的紫外光谱

Fig. 1 UV spectrum of chlorogenic acid

由图1可以看出,绿原酸在327 nm处有最大吸收值。因此,确定绿原酸的检测波长为327 nm。

### 2.2 绿原酸的HPLC图谱分析(图2)

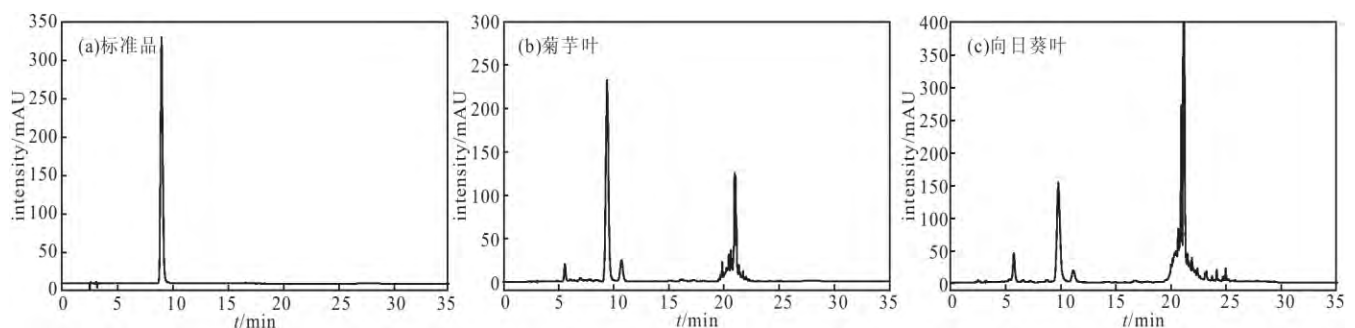


图2 绿原酸标准品(a)和植物叶绿原酸样品(b,c)的HPLC图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of standard(a) and samples(b,c) of chlorogenic acid in plant leaves

由图2b、2c可以看出,绿原酸样品的HPLC图谱的色谱基线稳定、峰形尖锐、对称性好,实现了绿原酸与其它成分基线分离,可用于绿原酸的检测和定量分析。

### 2.3 绿原酸的标准曲线(图3)

以峰面积(*y*)对浓度(*x*)线性回归,得绿原酸线性

方程  $y = 28.7409x - 6.0413$ , 相关系数  $R^2$  为0.9999。表明,当绿原酸浓度在1.59~159.84 μg·mL<sup>-1</sup>范围内时,与峰面积具有良好的线性关系。

### 2.4 精密度实验

取标准品溶液(159.84 μg·mL<sup>-1</sup>)适量于棕色进

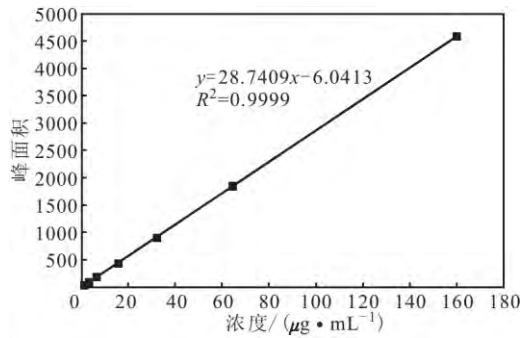


图3 绿原酸的标准曲线

Fig. 3 The standard curve of chlorogenic acid

样瓶中,重复进样5次,测定绿原酸峰面积,用外标法计算绿原酸浓度,结果如表2所示。

表2 精密度实验结果  
Tab. 2 The results of precision experiment

实验次数	1	2	3	4	5
绿原酸浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	160.49	160.40	160.07	160.63	160.42
平均值/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	160.40				
RSD/%	0.13				

由表2可知,RSD为0.13%。表明仪器的精密度和进样方法良好。

## 2.5 重现性实验

取X-2样品5份,每份约2.5g,按1.3.4方法制备样品溶液,分别取适量于棕色进样瓶中,进样测定绿原酸峰面积,用外标法计算绿原酸浓度,结果如表3所示。

表3 重现性实验结果  
Tab. 3 The results of reproducibility experiment

实验次数	1	2	3	4	5
绿原酸浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	50.61	51.56	50.43	51.84	51.94
平均值/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	51.28				
RSD/%	1.37				

由表3可知,RSD为1.37%。表明该方法具有良好的重现性。

## 2.6 稳定性实验

取J-5样品约0.2g,按1.3.4方法制备样品溶液,分别在0h、2h、8h、12h、24h进样测定绿原酸峰面积,用外标法计算绿原酸浓度,结果如表4所示。

由表4可知,RSD为0.52%。表明,置于棕色进样瓶4℃冷藏保存下的绿原酸样品溶液24h内稳定性良好。

表4 稳定性实验结果  
Tab. 4 The results of stability experiment

实验次数	1	2	3	4	5
绿原酸浓度/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	194.68	192.13	192.52	192.54	192.62
平均值/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	192.90				
RSD/%	0.52				

## 2.7 加标回收率实验

精密称取已知含量的J-5样品5份,每份0.1g,于每份样品中准确加入绿原酸标准品2.15mg,进样测定绿原酸峰面积,计算绿原酸含量,结果如表5所示。

表5 加标回收率实验结果  
Tab. 5 The results of recovery experiment

样品质量/g	绿原酸含量/mg	理论含量/mg	测定含量/mg	回收率/%
0.1004	4.01	6.16	6.23	101.14
0.1001	3.99	6.14	6.13	99.84
0.1007	4.08	6.23	6.35	101.93
0.1005	4.02	6.17	6.41	103.89
0.1005	4.03	6.18	6.22	100.65
平均回收率/%	101.49			
RSD/%	1.51			

由表5可知,平均回收率为101.49%,RSD为1.51%。

## 2.8 植物叶样品绿原酸含量的测定

按上述方法检测和定量分析,得收获期菊芋叶和向日葵叶绿原酸含量及积累分布规律如表6和图4所示。

表6 菊芋叶和向日葵叶中的绿原酸含量  
Tab. 6 The contents of chlorogenic acid in *H. tuberosus* L. leaves and *H. annuus* L. leaves

菊芋叶	采集时间	绿原酸含量/%	向日葵叶	采集时间	绿原酸含量/%
J-1	9月上旬	2.10	X-1	8月中旬	0.37
J-2	9月中旬	2.26	X-2	8月下旬	0.47
J-3	9月下旬	2.07	X-3	9月上旬	0.36
J-4	10月上旬	2.43	X-4	9月中旬	0.23
J-5	10月中旬	2.61	X-5	9月下旬	0.13
J-6	10月下旬	4.20	X-6	10月上旬	0.17
J-7	11月上旬	2.29	X-7	10月中旬	0.11
J-8	11月中旬	0.51			

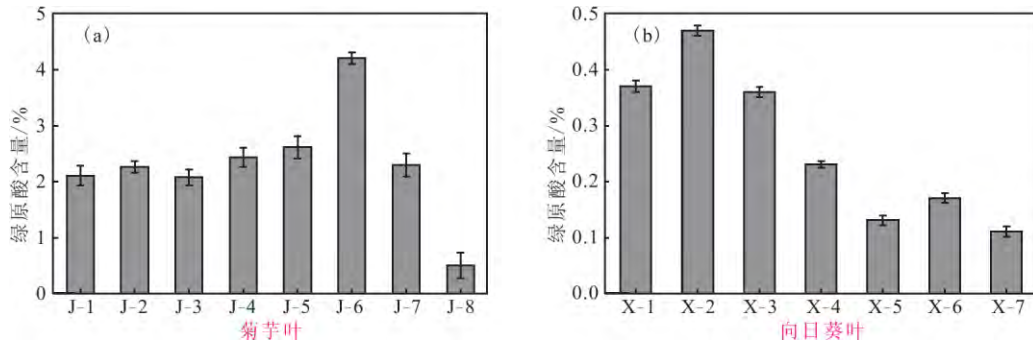


图4 菊芋叶(a)和向日葵叶(b)中的绿原酸积累分布

Fig. 4 The content accumulated distributions of chlorogenic acid in *H. tuberosus* L. leaves(a) and *H. annuus* L. leaves(b)

从表6和图4a可以看出,收获期菊芋叶中绿原酸的含量是不断变化的。10月份菊芋叶绿原酸平均含量(3.08%)高于9月份(2.14%)和11月份(1.40%);10月份不同时期菊芋叶绿原酸含量高低顺序依次为:下旬>中旬>上旬,下旬菊芋叶绿原酸含量达到最高(4.20%),而后急剧下降,至11月中旬达到最低(0.51%)。通常情况下,菊芋块茎的收获时间为10月下旬,在此时段采摘菊芋叶提取其中的绿原酸,不仅不会影响菊芋块茎的收益,而且还可以充分利用菊芋资源,实现植物的高值化利用,因此,菊芋叶的最佳采集时间为10月下旬。

从表6和图4b可以看出,收获期向日葵叶中绿原酸含量较低,呈先升高后降低的分布规律。8月下旬向日葵叶绿原酸含量达到最高(0.47%),而后逐渐下降,至10月中旬叶片变黑脱落,绿原酸含量急剧下降至最低(0.11%)。向日葵虽与菊芋同为菊科植物,但向日葵叶中绿原酸含量太低,不适宜作为提取绿原酸的植物原料。

### 3 结论

(1)建立了检测和定量分析菊科植物叶中绿原酸含量的HPLC方法,并对其进行了方法学验证。通过精密性、重现性、稳定性及加标回收率实验,证实仪器的进样方法良好,基线稳定,实现了绿原酸与其它成分的有效分离,绿原酸回收率高,精密性、重现性良好,样品溶液24h内稳定,因此可以作为菊科植物叶中绿原酸含量的检测和定量分析方法。

(2)研究了收获期菊科植物菊芋叶中绿原酸的积累分布规律。结果表明,菊芋叶中绿原酸含量丰富,10月下旬菊芋叶绿原酸含量最高。因此,10月下旬的菊芋叶可以作为提取绿原酸的植物原材料。

(3)研究了收获期向日葵叶中绿原酸的积累分布规律。结果表明,8月下旬向日葵叶中绿原酸含量达

到最高(0.47%);同为菊科植物的向日葵叶中绿原酸含量比菊芋叶中绿原酸含量低。因此,向日葵叶不适宜作为提取绿原酸的植物原材料。

#### 参考文献:

- [1] 陈绍华,王亚琴,罗立新.天然产物绿原酸的研究进展[J].食品科技,2008,33(2):195-198.
- [2] 王辉,田呈瑞,马守磊,等.绿原酸的研究进展[J].食品工业科技,2009,30(5):341-345.
- [3] LIU B Y, DONG B T, YUAN X F, et al. Enrichment and separation of chlorogenic acid from the extract of *Eupatorium adenophorum* Spreng by macroporous resin[J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1008: 58-64.
- [4] 刘颖,郭明晔,白根本.绿原酸的研究进展[J].中药材,2012,35(7):1180-1185.
- [5] LIU Q Q, ZHAO Y, PAN J F, et al. A novel chitosan base molecularly imprinted membrane for selective separation of chlorogenic acid[J]. Separation and Purification Technology, 2016, 164: 70-80.
- [6] 席利莎,木泰华,孙红男.绿原酸类物质的国内外研究进展[J].核农学报,2014,28(2):292-301.
- [7] 李燕婷,周文富.金银花中绿原酸的微波辅助提取工艺研究[J].化学与生物工程,2011,28(10):65-69.
- [8] 黄绍重.绿原酸的提取及应用[J].应用化工,2006,35(6):467-469.
- [9] 高教琪,袁文杰,陈丽杰,等.菊芋在生物工业中的应用[J].现代化工,2012,32(11):18-21.
- [10] 乌日娜,朱铁霞,于永奇,等.菊芋的研究现状及开发潜力[J].草业科学,2013,30(8):1295-1300.
- [11] SUN P C, LIU Y, YI Y T, et al. Preliminary enrichment and separation of chlorogenic acid from *Helianthus tuberosus* L. leaves extract by macroporous resins[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 55-62.
- [12] 李万林.向日葵叶中绿原酸的微波辅助提取研究[J].农产品加工(学刊),2013(8):21-24.
- [13] 李晓丽,张边江.油用向日葵的研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(27):13015-13017.
- [14] 苏晓琴,赵利民,王秉兰.向日葵的药用研究[J].黑龙江医药,1995,8(1):57-58.