

张荷丽. 毛细管区带电泳法研究杜仲叶中绿原酸含量的变化规律[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 279–281.

# 毛细管区带电泳法研究杜仲叶中绿原酸含量的变化规律

张荷丽

(河南牧业经济学院, 河南郑州 450046)

**摘要:**以豫西南地区不同生长期杜仲叶为研究对象, 建立了一种快速、简便、重现性好的毛细管区带电泳 (capillary zone electrophoresis, CZE) 方法测定杜仲叶中绿原酸的含量。毛细管区带电泳条件如下: 运行缓冲液为 20 mmol/L 硼砂体系 (pH 值 8.5), 压力进样 6 s, 分离电压为 20 kV, 紫外检测波长为 328 nm。该方法在 0.03 ~ 0.15 mg/mL 范围内线性良好, 样品的回收率为 98.74% ~ 100.15%, *RSD* 为 1.5% (*n* = 6)。不同采摘时间杜仲叶中绿原酸含量差异显著, 其中 6 月份含量最高。

**关键词:**毛细管区带电泳; 杜仲叶; 绿原酸; 含量; 变化规律

**中图分类号:** O657.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0279-03

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliver) 中含有苯丙素类等 40 多种化合物, 杜仲叶不仅与杜仲皮有大致相同的有效成分和药理作用<sup>[1-4]</sup>, 而且来源更丰富, 成本更低。绿原酸 (chlorogenic acid) 具有抗菌、消炎、解毒、利胆、降压等药理作用<sup>[5-6]</sup>, 是多种药材和中成药的主要有效成分和质量控制的重要指标<sup>[7]</sup>。绿原酸的测定方法主要有紫外分光光度法<sup>[8-9]</sup>、薄层色谱扫描法<sup>[10-11]</sup>、高效液相色谱法<sup>[12-16]</sup>、流动注射化学发光分析法<sup>[17-18]</sup>等, 这些方法存在干扰因素多、分析时间长、检测结果不稳定等缺点。高效毛细管电泳法 (high performance capillary electrophoresis, HPCE)<sup>[19-21]</sup>具有分离效率高、分离速度快、重现性好等特点, 已被广泛应用于中药材各类有效成分分析和中药复方制剂分析<sup>[22-23]</sup>。本研究应用毛细管区带电泳法 (capillary zone electrophoresis, CZE) 研究了河南省镇平县栽培的杜仲叶中绿原酸含量随生长期变化的规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

HP<sup>3D</sup>CE 毛细管电泳仪; 8823-B 紫外检测器; 未涂层弹性石英毛细管 (内径 50 μm, 柱长 58 cm, 有效长度 50 cm), 河北省永年县光导纤维厂; 绿原酸标准品由中国药品生物制品检定所提供; 内标物苯甲酸钠由北京化工厂生产; 杜仲叶采摘自河南省镇平县杜仲种植基地; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 电泳条件

毛细管在每次使用前分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液冲洗 2 min, 去离子水冲洗 2 min, 运行缓冲溶液冲洗 3 min, 以保证重现性。每 5 次进样后更换缓冲溶液。所有溶液在进样分析前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

从电泳缓冲体系、缓冲体系 pH 值、缓冲液浓度、分离电压、进样时间等方面考察电泳条件。

### 1.3 内标液的配制

精确称取 0.100 0 g 苯甲酸钠, 加 70% 乙醇超声助溶后定容至 100.0 mL 容量瓶中。

### 1.4 标准溶液的配制

精确称取绿原酸标准品 (质量浓度 > 98%) 适量, 加 70% 乙醇溶解, 配制标准样品贮备溶液。

### 1.5 样品制备

精确称取 0.500 0 g 干燥研磨的杜仲叶样品, 加 70% 乙醇, 超声提取 1 h, 过滤, 定容至 50 mL。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得样品贮备液。

### 1.6 线性关系的考察

将一系列不同浓度的绿原酸标准品溶液 (分取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 绿原酸标准样品贮备溶液于 10 mL 容量瓶内, 加 1.0 mL 内标物, 用 70% 乙醇超声助溶后定容), 在优化的试验条件下进行 CZE 分析, 每一溶液进样 2 次。以标准品浓度 *X* (mg/mL) 为横坐标, 以标准品与内标物峰面积之比 *Y* 为纵坐标, 绘制标准曲线。

### 1.7 精密度考察

取标准品溶液 3.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加内标物 1.0 mL, 用 70% 乙醇超声助溶后定容, 进样测定, 重复 6 次, 测定标准品与内标物峰面积比。

### 1.8 回收率试验

向杜仲叶样品提取液中准确加入绿原酸标准溶液 1.0 mL、内标物 1.0 mL, 在优化条件下测定。

### 1.9 样品中绿原酸含量测定

分别称取不同采集日期的杜仲叶, 按“1.3”节的方法制备样品溶液, 加入内标液, 按优化的电泳条件进样测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 毛细管区带电泳条件的优化

毛细管电泳仪的运行条件: 压力进样 6 s; 分离电压为 20 kV; 毛细管温度为 20 ℃; 紫外检测波长为 328 nm; 运行缓冲溶液为 20 mmol/L 硼砂-磷酸二氢钠 (pH 值 = 8.5)。

**2.1.1 缓冲体系的确定** 分别考察了硼砂、硼酸、磷酸氢二钠、硼砂-磷酸二氢钠等体系, 其中硼砂-磷酸二氢钠体系出

收稿日期: 2013-12-11

基金项目: 河南省骨干教师资助项目 (编号: 2009GGJS-128)。

作者简介: 张荷丽 (1971—), 女, 河南安阳人, 硕士, 副教授, 研究方向为分析化学。Tel: (0371) 86176306; E-mail: zhangheli712@163.com。

峰时间、峰形、分离效果均较理想(图 1)。

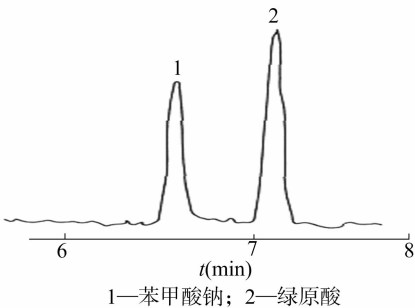


图1 标准电泳图谱

2.1.2 缓冲体系 pH 值的确定 采用硼砂-磷酸二氢钠体系,考察了 pH 值在 7.0~10.0 范围内绿原酸分离情况。维持其他电泳条件不变,对 pH 值 7.0、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 进行了考察。试验发现,当 pH 值在 8.0~9.5 之间时,内标物与绿原酸分离效果较好;但当 pH 值 >9.0 时,峰面积逐渐下降且迁移时间延长,不利于快速分离。综合考虑,选择缓冲液 pH 值为 8.5,样品峰形和分离度均较好(图 2)。

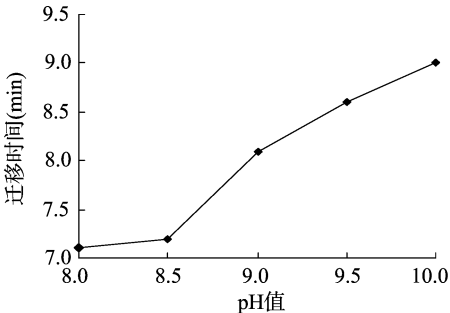


图2 缓冲体系 pH 值与迁移时间的关系

2.1.3 缓冲液浓度的确定 采用 pH 值为 8.5 的硼砂-磷酸二氢钠缓冲体系,在不同硼砂浓度下进行分离。试验表明,随着缓冲溶液浓度的增大,样品的迁移时间延长,区带增宽,浓度达大影响分离效果;浓度太低时,缓冲容量小,不利于体系 pH 值的稳定(图 3)。最终选择缓冲体系为 20 mmol/L 硼砂-磷酸二氢钠(pH 值为 8.5)。

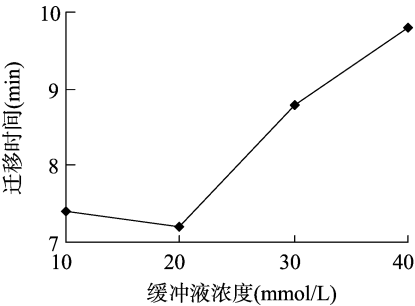


图3 缓冲液浓度与迁移时间的关系

2.1.4 分离电压的确定 采用 pH 值为 8.5 的 20 mmol/L 硼砂-磷酸二氢钠缓冲体系为运行缓冲液,分别考察了 15、20、25、30 kV 工作电压对分离的影响,结果表明,升高运行电压可以加快分析速度;但随着电场强度的增大,基线噪音升高,使分离度下降。有时由于电流过大,焦耳热大,还会引起缓冲溶液温度的升高。本试验选用 20 kV 作为分离电压,可保证良好峰形和较好分离度。

2.1.5 进样时间的确定 在进样时间分别为 2、4、6、8、10 s 时,测定峰高。结果表明,进样 6 s 后峰高增加幅度不大。进样时间延长,使得进样量太多,超出扩散控制的区带宽度,导致分离度下降,样品峰变宽;进样时间如果太短,会降低测定的精密度,因此本试验选择进样时间为 6 s(图 4)。

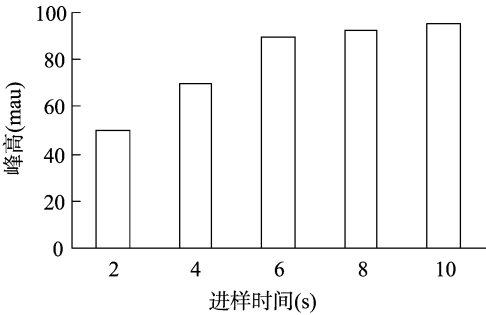


图4 进样时间与峰高的关系

2.2 线性关系的考察

试验结果表明,绿原酸浓度在 0.03~0.15 mg/mL 范围内线性关系良好。回归方程为:  $y = 15.476x + 0.0257$  ( $r = 0.9994$ )。

2.3 精密度的考察

精密度试验的 RSD 为 1.1%,表明精密度良好。

2.4 回收率试验

如表 1 所示,测定绿原酸平均回收率为 99.66%,RSD 为 1.5% ( $n = 6$ )。

表 1 杜仲叶中绿原酸含量的回收率

编号	样品中绿原酸含量 (mg/g)	加标量 (mg)	实测值 (mg/g)	回收率 (%)
1	32.14	0.3	32.49	100.15
2	32.14	0.3	32.38	99.82
3	32.14	0.3	32.37	99.78
4	32.14	0.3	32.03	98.74
5	32.14	0.3	32.35	99.72
6	32.14	0.3	32.35	99.72
平均值	32.14	0.3	32.33	99.66

2.5 样品中绿原酸含量测定

样品中绿原酸含量测定结果见表 2。由表 2 可见,不同生长发育时期杜仲叶中化学成分的变化与叶片结构有着密切的关系。4 月份叶片厚度最小,结构分化不明显,随着时间推移,叶片厚度增加,栅栏组织与海绵组织的比值逐渐增大,7 月份达到最大。杜仲叶中绿原酸的含量与栅栏组织/海绵组织的比值关系密切。在 4—7 月份,绿原酸含量随叶片的生长发育而增加,最大值出现在生长最旺盛的 6、7 月份,最高可达 32.14 mg/g,比年平均含量高出 30.7%;随着叶片生长进入衰老阶段,绿原酸含量逐渐下降,到叶落时降到最低的 11.25 mg/g,比年平均含量低 54.2%。

3 结论

本研究应用毛细管区带电泳,建立了简单、灵敏、快速的 CZE 方法测定杜仲叶中绿原酸的含量。杜仲叶用 70% 乙醇超声提取,以苯甲酸钠为内标物,在以 20 mmol/L pH 值为 8.5 的硼砂-磷酸二氢钠缓冲体系作为运行缓冲液、分离电

表 2 杜仲叶样品绿原酸测定结果

采摘时间(年-月)	绿原酸含量(mg/g)
2012-04	22.17
2012-05	28.46
2012-06	32.14
2012-07	31.08
2012-08	28.87
2012-09	24.53
2012-10	18.15
2012-11	11.25

压为 20 kV、压力进样为 6 s、毛细管温度为 20 ℃、紫外检测波长为 328 nm 的电泳条件下,测定方法的线性范围宽,可信度高。

测定结果表明,不同采摘时间杜仲叶中绿原酸含量差异显著。4 月份至 6 月份绿原酸含量呈上升趋势,7 月份至 11 月份绿原酸含量逐渐下降,其中 6 月份含量最高。本研究对杜仲叶的采收和有效利用提供了理论指导。

#### 参考文献:

- [1] 李家实,阎玉凝. 杜仲皮与叶化学成分初步研究[J]. 中药通报, 1986,11(8):41-42.
- [2] 赵玉英,耿 权,程铁民. 杜仲化学成分研究概况[J]. 天然产物研究与开发,1995,7(3):46-52.
- [3] 马 越,苏东海,曹奇光,等. 杜仲叶有效成分的提取[J]. 江苏农业科学,2008(6):249-251.
- [4] 张康健,王 蓝,张凤云,等. 杜仲叶与皮有效成分含量的比较研究[J]. 西北林学院学报,1996,11(2):44-48.
- [5] 范维衡,徐远祥,刘常五. 杜仲叶和皮的药理作用研究[J]. 中国药理学杂志,1979,14(9):404-405.
- [6] 管淑玉,苏薇薇. 杜仲化学成分与药理研究进展[J]. 中药材, 2003,26(2):124-129.
- [7] 郭朝晖,周学清,蒋生祥. 甘肃金银花中绿原酸含量与抑菌作用的实验考察[J]. 时珍国医国药,2005,16(12):66-67.
- [8] 孙 波,彭密军,于华忠,等. 紫外可见分光光度法测定杜仲绿原酸含量的方法研究[J]. 中国野生植物资源,1999,18(3):56-57.

(上接第 253 页)

- [14] 吴金凤. 重庆农家腊肉风味物质研究及其安全性评价[D]. 重庆:西南大学,2008.
- [15] 章建浩,朱健辉,王 莉,等. 金华火腿传统工艺过程挥发性风味物质的分析研究[J]. 食品科学,2004,25(11):221-226.
- [16] Du M, Ahn D U. Volatile substances of Chinese traditional Jinhua ham and Cantonese sausage[J]. Journal of Food Science,2001,66(6):827-831.
- [17] Baines D A, Mlotkiewicz J A. The chemistry of meat flavor[J]. Recent Advances in the Chemistry of Meat,1984:119-164.
- [18] Forss D A. Odor and flavor compounds from lipids[J]. Prog Chem Fats and Other Lipids,1972,13:181-258.
- [19] Nie X H, Lin S L, Zhang Q L. Proteolytic characterisation in grass carp sausage inoculated with *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*[J]. Food Chemistry,2014,145(145):840-844.

- [9] 肖文平,毛 威. 紫外-可见分光光度法测定福菊和杭菊中总黄酮及绿原酸含量[J]. 湖北农业科学,2011,50(6):1278-1280.
- [10] 朱 玉,张书胜,张西林,等. 薄层色谱法分析葵花仁粕中的绿原酸[J]. 色谱,2001,19(1):82-84.
- [11] 戈早川,余 倩. 胶束薄层色谱扫描法测定银黄片与银黄注射液中的黄芩苷与绿原酸[J]. 药物分析杂志,1999,19(5):348-350.
- [12] 全俊太,徐圣秋,李伟东,等. 高效液相色谱法测定苍耳草中绿原酸的含量[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(20):1739-1740.
- [13] 杨玉琴,张丽艳,刘 毅,等. 反相 HPLC 法测定杜仲皮、枝、叶及含杜仲中成药的绿原酸的含量[J]. 贵阳中医学院学报, 1995,17(3):45-46.
- [14] 赵红艳,李 慧,刘 洋,等. 甘薯不同器官中绿原酸总黄酮含量的测定[J]. 江苏农业科学,2012,40(10):299-300.
- [15] 彭支莲,张 丹,李业洪,等. 正交法优选续断中绿原酸的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):269-270.
- [16] 姜晓芳,张翠利,李 钦,等. RP-HPLC 法测定不同产地杜仲叶和皮中 3 种活性成分的含量[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):314-316.
- [17] 张红影,徐向东,石红梅,等. 流动注射-鲁米诺-Ag(Ⅲ)化学发光法测定金银花中绿原酸[J]. 光谱实验室,2011,28(1):401-404.
- [18] 贺彩霞,崔 华,赵晓宇,等. 流动注射化学发光分析法测定金银花中的绿原酸[J]. 中国科学技术大学学报,1999,29(5):20-24.
- [19] 陈 义,竺 安. 毛细管区带电泳[J]. 色谱,1990,8(3):154-158.
- [20] 刘志松,方肇伦. 高效毛细管电泳在药物分析中的应用[J]. 色谱,1996,14(5):364-368.
- [21] 汪雪雁,祁克宗,陈珂珂,等. 鸡肉中头孢类抗生素的 MISPE-HPCE 检测[J]. 江苏农业学报,2012,28(1):193-197.
- [22] 文志明,张金兰,徐礼燊. 高效毛细管电泳法在中药化学成分分析中的应用[J]. 中草药,2000,31(2):63-66.
- [23] 韩凤梅,程智勇,杨 新,等. 高效毛细管电泳法分离测定黄芩复方制剂中的黄芩甙[J]. 色谱,2000,18(3):280-282.

- [20] 李平兰,沈清武,孙成虎,等. 微生物酶与肉组织酶对干发酵香肠中游离氨基酸的影响[J]. 食品与发酵工业,2005,31(5):134-138.
- [21] Lorenzo J M, Montes R, Purriños L, et al. Effect of pork fat addition on the volatile compounds of foal dry-cured sausage[J]. Meat Science,2012(3):506-512.
- [22] Corral S, Salvador A, Flores M. Salt reduction in slow fermented sausages affects the Generation of aroma active compounds[J]. Meat Science,2013,93(3):776-785.
- [23] Ansorena D, Gimeno O, Astiasam I, et al. Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizode Pamplona[J]. Food Research International,2001,34(1):67-75.
- [24] 刘登勇. 气味指纹技术的建立及其在腌腊肉制品中的应用[D]. 南京:南京农业大学,2008.