

密楝果实中绿原酸含量的测定

王星,张娜,赵桦

(陕西理工学院 生物科学与工程学院,陕西 汉中 723000)

摘要:为了进一步开发利用密楝资源,以50%甲醇溶液为溶剂,超声提取法从密楝果实中提取绿原酸,高效液相色谱法检测提取液中绿原酸含量。提取条件为:超声功率240 W,超声频率40 kHz,提取温度60℃,超声提取30 min。色谱条件为:色谱柱为Inertsil ODS-3C₁₈(4.6×150 mm,5 μm)柱,以乙腈-0.4%磷酸水溶液(8:92)为流动相,流速1.0 mL·min⁻¹,波长327 nm,柱温30℃。绿原酸在20.8~104 μg·mL⁻¹范围内与峰面积呈现良好的线性关系, $Y=32\,304X-44\,968$ ($R^2=0.999\,9$),平均加样回收率99.59%,RSD为1.69%($n=6$)。密楝果实中含有丰富的绿原酸成分,其含量随产地的变化有一定的差异,变化范围在15.34~11.91 mg·g⁻¹。建立的密楝果实中绿原酸含量检测方法简便、准确、重复性好,可用于密楝药材的质量控制。

关键词:密楝果实;绿原酸;含量测定

中图分类号:Q946.8 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2015)01-0112-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.01.0112

密楝(*Evodia lenticellata* Huang)为芸香科吴茱萸属植物,主要分布于我国陕西南部 and 四川等地^[1-4]。该植物近成熟果实在民间可入药,功效同吴茱萸果实。参照《中国药典》关于吴茱萸药材的标准对本品检验发现,密楝除果实形状与吴茱萸有所不同外,其余特征与药典对吴茱萸的规定相同,粉末显微鉴定、理化鉴别反应和薄层色谱鉴别结果均符合药典对吴茱萸的规定^[5]。

目前,关于密楝果实中药用成分的研究尚不多见,陕西理工学院生物科学与工程学院植物学实验室曾对其果实中脂溶性成分和多糖成分及其生物学活性进行了研究报道^[6-9],但有关其绿原酸成分的研究尚未见报道。

绿原酸(chlorogenic acid)又名3-咖啡酰奎宁酸,是许多中草药如金银花、杜仲和茵陈等的主要有效成分之一。绿原酸是一种重要的生物活性物质,具有抗菌、抗病毒、升高白细胞、保肝利胆、抗肿瘤、降血压、降血脂和兴奋中枢神经系统等多种药理活性。另外,绿原酸还具有很好的清除自由基作用,可抑制氧自由基对机体的损伤。近年来,绿原酸作为国际公认的“植物黄金”引起了广泛关注,其除大量用于医药外,还用于日用化工、食品等行业^[10-17]。

本文采用HPLC法,对密楝果实中绿原酸成分进行分析研究,建立密楝果实中绿原酸HPLC分析测定方法,以期对密楝资源的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

绿原酸对照品由中国食品药品检定研究院提供(批号:110753-201314)。密楝果实药材购自陕西省汉中市药材市场,分别产自陕西省汉中市汉台区、略阳县和南郑县。乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸为分析纯。水为自制超纯水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 Waters e2695 高效液相色谱仪;Inertsil ODS-3C₁₈(4.6×150 mm,5 μm)柱;2489 紫外检测器。流动相:乙腈-0.4%磷酸水溶液(8:92),流速1 mL·min⁻¹,检测波长327 nm,柱温30℃,进样量10 μL。

1.2.2 检测波长的选择 利用适当浓度的绿原酸对照品溶液,以超纯水做空白,在200~400 nm范围内扫描,在327 nm处有最大吸收。因此,选择327 nm作为检测波长。

1.2.3 样品溶液的制备 取密楝药材,在60℃条件下烘干,粉碎过65目筛。称取0.5 g,置于具塞250 mL锥形瓶中,加100 mL 50%甲醇溶液,准确称重。超声功率240 W,超声频率40 kHz,温度60℃,超声提取30 min,然后取出,过滤,并定容至100 mL容量瓶中,备用,进样前用0.45 μm的滤膜过滤。

1.2.4 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸标准品10.4 mg,用50%甲醇溶液定容至100 mL

收稿日期:2014-08-22

基金项目:陕西省教育厅专项科研计划资助项目(12JK0842);陕西理工学院研究生创新基金资助项目(SLGYCX1312)

第一作者简介:王星(1987-),男,陕西省商洛市人,在读硕士,从事植物资源开发利用研究。E-mail:1771089314@qq.com。

通讯作者:赵桦(1957-),男,陕西省汉中市人,硕士,教授,从事植物资源开发利用研究。E-mail:zhaohuahz@126.com。

棕色容量瓶中,得 $104\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿原酸标准品溶液,以备用,进样前用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤。

1.2.5 数据分析 采用 Microsoft Excel 统计软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

准确量取绿原酸标准品母液 2、4、6 和 8 mL, 分别用 50% 甲醇溶液定容至 10 mL 棕色容量瓶中,配制成浓度分别为 20.8、41.6、62.4、83.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿原酸标准品溶液,加上绿原酸标准品母液共五种不同浓度的溶液分别进样,每个浓度分别进样 3 次,每次 $10\text{ }\mu\text{L}$,进样前用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,测定峰面积,以绿原酸标准品溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得绿原酸的回归方程为 $Y=32\ 304X-44\ 968$ ($R^2=0.999\ 9$),在 $20.8\sim104\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时呈良好的线性关系。绿原酸曲线图见图 1,标准品色谱图见图 2。

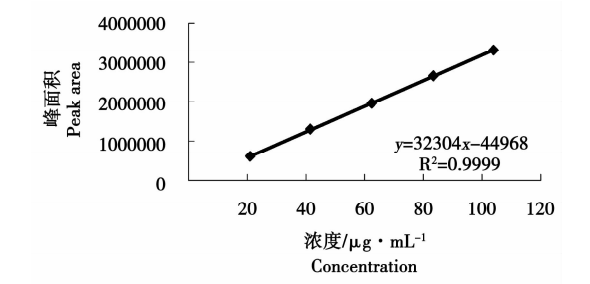


图1 绿原酸工作曲线图

Fig.1 The standard curve for chlorogenic acid

2.2 精密度试验

用绿原酸对照品溶液重复进样 6 次,每次进样 $10\text{ }\mu\text{L}$,绿原酸峰面积分别为:3287254、3312942、3297170、3312050、3304513 和 3315651,RSD 为 0.33%。

表 1 绿原酸加样回收率试验

Table 1 Spiked recovery of chlorogenic acid

序号 No.	取样量/g Sampling volume	样品中绿原酸含量/mg The content of chlorogenic acid	添加标品量/mg Quantity of additive standard sample	应测值/mg Expected value	实测值/mg measured value	回收率/% Recovery rate
1	0.1517	1.9208	1.3520	3.2728	3.2867	101.03
2	0.1519	1.9233	1.3520	3.2753	3.2627	99.06
3	0.1529	1.9360	1.3520	3.2880	3.2901	100.16
4	0.1533	1.9410	1.3520	3.2930	3.2666	98.05
5	0.1541	1.9512	1.3520	3.3032	3.2693	97.49
6	0.1543	1.9537	1.3520	3.3057	3.3294	101.76

2.6 样品含量测定

取产自秦巴山区陕西略阳、陕西汉中市汉台区和陕西南郑 3 个产地的密楝果实,按 1.2.3 项下样品制备方法制备密楝供试液,按 1.2 项下测定供试液中绿原酸含量,进样前用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜

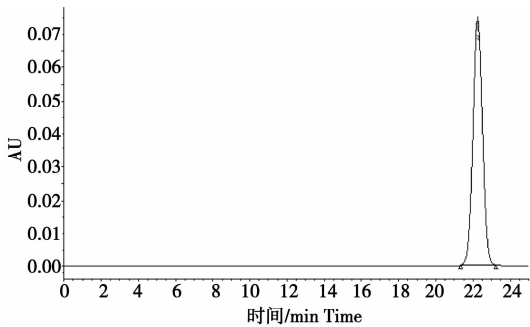


图2 标准品色谱图

Fig.2 Chromatogram of standard sample

2.3 重复性试验

称取密楝果实样品 5 份,每份约 0.5 g,均精密称定。按 1.2.3 项下方法制备供试液,按 1.2 项下方法测定,每份进样 3 次,每次进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。5 份样品中绿原酸的峰面积分别为 1611874、1583085、1579736、1572616 和 1613537,RSD 为 1.08%。说明该方法有较好的重现性。

2.4 稳定性试验

用某一份密楝果实样品制备供试液,供试液分别于提取后 0、2、4、8、12、24 和 48 h 进样。绿原酸的峰面积分别为:1601411、1615772、1618439、1632272、1622624、1620590 和 1618322,RSD 为 0.57%。说明密楝果实中绿原酸供试液在 48 h 内稳定。

2.5 加样回收率试验

精密称取密楝果实样品 6 份,各约 0.15 g。向 6 份样品中分别加入 1.352 mg 绿原酸对照品,制备供试液和测定绿原酸含量,并计算回收率(见表 1)。回收率平均值为 99.59%,RSD 为 1.69%。

过滤,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$,绿原酸含量分别为(每个产地样品各取 3 份)陕西略阳:15.34 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD=1.18%,陕西汉中市汉台区:12.66 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD=1.08%,陕西南郑:11.91 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD=0.58%。样品中绿原酸含量测定色谱图(见图 3,图 4,图 5)。

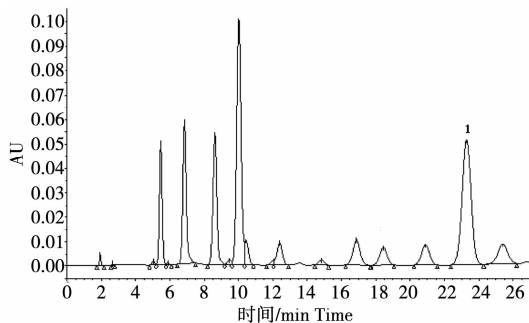


图3 陕西略阳产密楝果实药材供试品色谱图
Fig. 3 Chromatogram of tested sample from
Lueyang county in shaanxi province

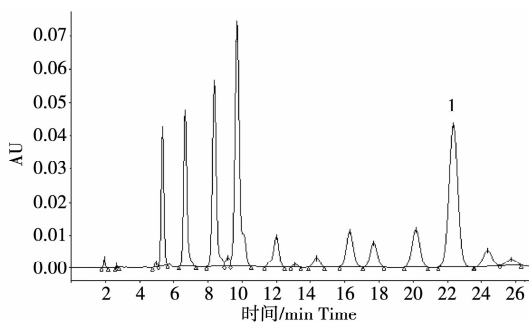


图4 陕西汉台区产密楝果实药材供试品色谱图
Fig. 4 Chromatogram of tested sample from
hantai county in shaanxi province

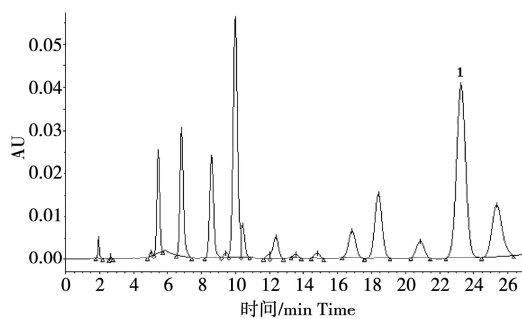


图5 陕西南郑县产密楝果实药材供试品色谱图
Fig. 5 Chromatogram of tested sample from
Nanzheng county in shaanxi province

色谱柱,乙腈-0.4%磷酸水溶液(8:92)为流动相,流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 327 nm ,柱温 30°C 。试验数据表明,该方法灵敏度高,重现性好,是检测密楝果实中绿原酸较为理想的方法。

研究结果表明,密楝果实中绿原酸含量较高,在本试验分析的3个产地样品中,绿原酸含量在 $11.91\sim 15.34\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。张万明^[19]等曾对不同产地吴茱萸中绿原酸的含量进行了分析测定,发现吴茱萸果实中绿原酸含量为 $4.20\sim 11.65\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。因此,密楝果实中绿原酸含量高于已有文献报道的吴茱萸果实中绿原酸的含量。研究结果也说明不同产地密楝果实中绿原酸含量有一定的差异,这可能与密楝生长的生态环境,气候条件等因素的影响有一定的关系。

参考文献:

- [1] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志 第一卷(第三册)[M]. 北京:科学出版社,1981:134-135.
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴补编(第二册)[M]. 北京:科学出版社,1987:153.
- [3] 四川植物志编辑委员会. 四川植物志 第九卷[M]. 成都:四川民族出版社,1989:124.
- [4] 牛春山. 陕西树木志[M]. 北京:中国林业出版社,1990:597-598.
- [5] 彭强,赵桦. 吴茱萸与小花吴茱萸的鉴别比较[J]. 中药材,2007,30(12):1507-1512.
- [6] 宫海明,赵桦. 不同产地吴茱萸挥发油成分的GC-MS的分析及与小花吴茱萸的比较[J]. 西北植物学报,2008,28(3):595-605.
- [7] 赵桦,田光辉,宫海明. 吴茱萸与密楝果实中脂肪酸成分的GC-MS分析[J]. 食品科学,2009,30(10):162-165.
- [8] 付娟,赵桦. 吴茱萸和密楝叶中挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J]. 时珍国医国药,2010,21(1):60-64.
- [9] 付娟,边静静,赵桦. 密楝和吴茱萸果实多糖的体外抗氧化和抑菌活性研究[J]. 食品科学,2010,30(11):69-72.
- [10] 邓良,袁华,喻宗沅. 绿原酸的研究进展[J]. 化学与生物工程,2005(7):4-6.
- [11] 张建华,姚素波,刘洁,等. 绿原酸对小鼠免疫功能的影响[J]. 华西药杂志,2009,24(4):343-344.
- [12] 吴江涛. 绿原酸的生物活性及其应用[J]. 现代农业科技,2009(19):349-350.
- [13] 陈少萍. 绿原酸药代动力学研究进展[J]. 中成药,2010,32(4):645-648.
- [14] 戚晓渊,史秀灵,高银辉,等. 绿原酸抗肝纤维化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):139-143.
- [15] 史秀玲,高银辉. 绿原酸对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):199-202.

3 结论与讨论

HPLC法测定不同植物中绿原酸含量时所用流动相不尽相同,多为乙腈-0.4%磷酸混合溶液,两种溶液的比例有一定的变化。《中国药典》在分析金银花中绿原酸含量时采用的流动相为乙腈:0.4%磷酸二者为13:87^[18]。该实验用乙腈-0.4%磷酸混合溶液作为流动相,对两种溶液的配比情况与绿原酸色谱峰的变化进行了比较分析。在乙腈:0.4%磷酸二者为13:87时不能将供试液中绿原酸色谱峰和其相邻杂质的色谱峰分开,在减少乙腈、增加磷酸比例时绿原酸色谱峰分离效果渐渐好转,当将流动相比比例调至8:92时,绿原酸和其相邻组分达到了很好的分离效果,分离度大于1.5,符合定量分析要求。若再继续减少乙腈比例时,分离效果又变的较差。故该实验在分析密楝果实药材中绿原酸使用的流动相最终确定为乙腈-0.4%磷酸(8:92),在此条件下供试液中绿原酸的色谱峰较为理想。

通过该研究,首次建立了密楝果实药材中绿原酸成分的提取方法及HPLC检测方法。密楝果实药材中绿原酸成分的提取方法为以50%甲醇溶液为溶剂,超声提取功率240 W,超声频率40 kHz,提取温度 60°C ,超声提取30 min。高效液相色谱法检条件为Inertsil ODS-3 C_{18} ($4.6\times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$)

- [16] 高茹,林以宁,梁鸽,高缘.绿原酸的吸收与代谢研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):316-320.
- [17] 丘秀珍,郭会时,王少玲等.百香果中绿原酸含量的高效液相色谱法测定[J].食品研究与开发,2013,34(6):80-83.

- [18] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2010:205-206.
- [19] 张万明,甄攀,白雪梅,等.RP-HPLC测定吴茱萸中绿原酸的含量[J].中成药,2006,28(1):130-132.

Determination of Chlorogenic Acid in *Evodia lenticellata* Huang

WANG Xing,ZHANG Na,ZHAO Hua

(College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000)

Abstract: In order to further develop and utilize *Evodia lenticellata* Huang resources, the chlorogenic acid were extracted from *E. lenticellata* Huang using 50% methanol, and the conditions of the ultrasonic wave as follows: extraction ultrasonic power of 240 W, ultrasonic frequency of 40 kHz, temperature of 60°C and ultrasonic treatment time of 30 min. Samples were analyzed on an Inertsil ODS-3C₁₈ column (4.6×150 mm, 5 μm) using acetonitrile-0.4% phosphoric acid (8:92) as mobile phase, speed of flow was 1.0 mL·min⁻¹, the examination wave length was 327 nm and the column temperature was 30°C. The chlorogenic acid showed a good linearity in the range of 20.8~104 μg·mL⁻¹, regression equation was $Y = 32\,304X - 44\,968$ ($R^2 = 0.999\,9$) and the average recovery was 99.59% (RSD=1.69%, n=6). The chlorogenic acid is richer in *E. lenticellata* Huang and there are some different in the content of chlorogenic acid in *E. lenticellata* Huang among different origins. The established method is simple, credible, accurate, repeatable and could be used for the quality control of *E. lenticellata* Huang.

Keywords: *Evodia lenticellata* Huang; chlorogenic acid; content determination

(上接第 49 页)

2.4 木霉拮抗菌株田间防治效果试验

田间防效试验的施用时期为移苗期、定植期及定植后 14 d, 移苗期每钵施用 5 g 木霉培养物, 定植期及定植后施用 15 g 木霉培养物, 浓度选择为 5×10^7 个·g⁻¹, 于 8 月中旬发病高峰期调查各处理的病情指数。M113 菌株处理的发病率 40.26%, M135 发病率为 41.57%, 与 0.3% 多菌灵发病率 40.69% 相近。2 个菌株病情指数分别为 32.14% 和 30.48%, 均略高于化学药剂多菌灵的 28.16%。结果表明, M135 的相对防效高于 M113, 木霉菌株 M113 和 M135 在田间防效试验中没有显著差异, 但均低于 0.3% 多菌灵的 41.93%, 但差异不显著, 两个供试菌株均有较好的防治效果。

3 结论与讨论

木霉菌株 M113 和 M135 在实验室抑菌试验和盆栽试验阶段均有较好的防治效果, 显著高于多菌灵的防治效果。在田间防效试验略低于多菌

灵, 但差异不显著。木霉菌株在实验室阶段和田间试验阶段防治效果存在差异, 主要原因可能是受到自然条件、天气状况、土壤条件、木霉制剂在土壤中的生长状况及使用量等方面的影响和制约^[5], 防效效果表现不稳定。如何克服外界环境条件对生防菌的影响是生防菌最大发挥防效的关键所在, 也是下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] 田黎, 王克荣, 陆家云. 柄锈菌对大丽轮枝菌生长及微菌核形成的影响[J]. 中国生物防治, 1998, 14(1): 14-17.
- [2] Rifai M A. A revision of the genus *Trichoderma*[J]. Mycology Papers, 1969, 116: 1-56.
- [3] 刘仪. 植物病害研究与防治[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1998.
- [4] 夏正俊, 顾本康, 吴嵩民. 植物内生菌及根际土壤细菌诱导棉花对大丽轮枝菌抗性研究[J]. 中国生物防治, 1996, 12(1): 7-10.
- [5] 周艳芬, 杜红方, 袁洪水, 等. 棉花黄萎病拮抗蛋白的分离与纯化[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 98-101.

Study on Separation and Screening of *Trichoderma* Strain and Control Effect of *Verticillium* Wilt

ZHAO Dan¹, QU Hong-yun¹, WEN Ling¹, PAN Feng-juan², LIN Mi¹

(1. Horticultural Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069; 2. Northeast Institute of Geography and Agroecology Chinese Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150081)

Abstract: Eggplant *Verticillium* wilt are widely distributed, the incidence are more than 50% commonly, it is a kind of important disease in eggplant production. In order to test the control effect of screening strains, the separation and screening of *Trichoderma* were conducted in the disease nursery for 13 years eggplant grafting and rotation field in rhizosphere soil, 15 strains were obtained, 2 strains with strong antagonism M113 and M135 were screened out, the bacteriostatic rate were 48.36% and 56.13% respectively. Indoor pot experiment results showed that the relative control effect were 70.53% and 74.68%, which were significantly higher than chemical prevention and control.

Keywords: biological control; *Trichoderma*; *Verticillium* wilt