

不同枫树叶片中酚酸类物质高效毛细管电泳检测方法的研究

唐燕平¹, 刘桂华¹, 沈虎琴², 田春秋²

(1. 安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

摘要: 采用正交试验的方法, 研究了缓冲液 pH、分离电压、运行温度等电泳参数对枫树叶片中酚酸类物质提取检测的影响, 建立了 4 种槭树科枫叶中绿原酸、原儿茶酸、没食子酸和咖啡酸 4 种酚酸类化合物检测分离的高效毛细管电泳 (HPCE) 方法。得出了最佳分离条件为: 紫外检测波长 214 nm, 缓冲液为 20 mmol·L⁻¹ 的磷酸-硼砂, pH 8.0, 电压为 22 kV, 温度 25℃。在此条件下, 4 种酚酸类化合物在 9 min 内完全分离, 且各组分浓度与峰面积呈良好的线性关系, r^2 为 0.974 8~0.996 5。迁移时间的 $RSD \leq 0.84\%$, 峰面积的 $RSD \leq 5.29\%$, 加标回收率为 80.38%~96.88%。4 种枫树叶片中均含有绿原酸, 其中蚜虫宿主三角枫中绿原酸含量最低。

关键词: HPCE; 同时分离; 酚酸类; 枫叶

中图分类号: Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0807-05

Determination of phenolic acids in different maple leaves by high-performance capillary electrophoresis

TANG Yan-ping¹, LIU Gui-hua¹, SHEN Hu-qin², TIAN Chun-qiu²

(1. School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In this paper, the effects of main parameters such as running buffer pH value, running voltage and column temperature on the extraction and detection of phenolic compounds from aceraceae leaves were investigated by orthogonal tests. A method was developed for the simultaneous determination of phenolic compounds in aceraceae maple leaves, including chlorogenic acid, protocatechuic acid, gallic acid, caffeic acid by high performance capillary electrophoresis (HPCE). At the condition of 20 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate-borax buffer solution (pH 8.0), separation voltage of 22 kV, temperature of 25℃, UV detection wavelength of 214 nm, the four phenolic acid compounds were rapidly separated in 9 min. The calibration curves showed good linearity and the correlation coefficients were 0.974 8~0.996 5. Migration time, $RSD \leq 0.84\%$, and peak area $RSD \leq 5.29\%$. The average recoveries were from 80.38% to 96.88%. Chlorogenic acid could be detected in the four kinds of maple leaves, and the content in buerger maple which is the host of aphid was the least.

Key words: high performance capillary electrophoresis; simultaneous separation; phenolic acids

酚酸类化合物属于植物次生代谢产物, 在植物中广泛分布, 主要协助植物防御病原等有害生物的危害。主要有绿原酸(chlorogenic acid)、原儿茶酸(protocatechuic acid)、没食子酸(gallic acid)和咖啡酸(caffeic acid)等。

目前, 在酚酸类物质的分离测定方面, 国内外主要有高效液相色谱 (HPLC) [1-3], 液质联用 (LC-MS) [4-5]等方法, 但 HPLC、LC-MS 需要较

多的流动相, 分析时间长, 成本高。高效毛细管电泳技术 (HPCE) 是近几年来发展迅速的一项分析技术, 具有高灵敏度、高分辨率、分析时间快、自动化程度高等优点[6-7], 可以满足许多复杂成分的分析要求[8], 已成为 20 世纪 90 年代以来发展最快的分析方法之一[9-10]。本研究采用高效毛细管电泳法同时对绿原酸、咖啡酸、没食子酸和原儿茶酸 4 种酚酸类物质进行分离, 研究了电压、pH 值、温度等

收稿日期: 2011-11-16

基金项目: 安徽省自然科学研究项目 (2006 KJ 207B) 资助。

作者简介: 唐燕平, 女, 高级实验师。E-mail: typoyy@ahau.edu.cn

电泳参数对分离的影响,并分析了4种枫叶(红枫、三角枫、元宝枫和鸡爪槭)中4种酚酸类化合物的含量,得到较为满意的分离、检测结果。

1 材料与方 法

1.1 标 样 与 试 剂

标准品:绿原酸、原儿茶酸、没食子酸和咖啡酸均购于中国药品生物制品检定所(纯度)99%)。

试剂:超纯水;甲醇(色谱纯);四硼酸钠(分析纯);磷酸二氢钾(分析纯)。

1.2 仪 器

MDQ型高效毛细管电泳仪(美国 BeckMan Coulter);毛细管:内径为50 μm 、长度50 cm、有效长度48 cm(河北永年仪器厂);SB25-12D超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);ANKE TGL-16C台式离心机(上海安亭科学仪器厂);PHS-3C精密PH计(上海雷磁);ALC-110.4电子分析天平(ACCVLAB)。

1.3 标准样品的配制

1.3.1 标准储备液的配制 准确称取绿原酸、没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸各5.00 mg,分别用80%甲醇溶解定容至5 mL,配制成 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 绿原酸、没食子酸、咖啡酸、原儿茶酸标准储备液,备用。

1.3.2 混合标准工作液的配制 准确量取绿原酸、没食子酸、咖啡酸及原儿茶酸储备液1 mL,混合配置成混合母液 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,再将混合母液用80%甲醇稀释得到6个浓度梯,100、75、50、25、12.5和 $6.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,置于冰箱中备用。

1.4 样 品 制 备

红枫、三角枫、元宝枫和鸡爪槭叶片均采自安徽农业大学校内,采后的样品擦洗干净后置入保鲜袋中,于冰箱冷藏室保存备用。

准确称取红枫、三角枫、鸡爪槭和元宝枫叶片各1.00 g,剪碎后放于研钵中,加入8 mL 80%的甲醇混合研磨,并将研磨碎的样品转移至离心管中,超声提取20 min,离心10 min($10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),取上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤,放入冰箱备用。

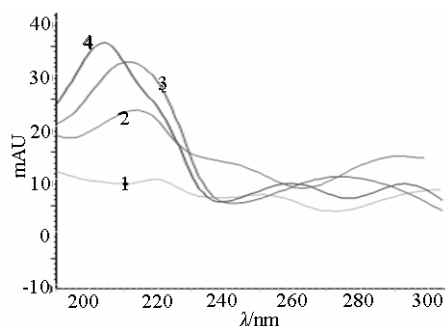
1.5 电 泳 方 法

电泳缓冲液为 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸-硼砂缓冲溶液(pH 8.0)、温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、电压为22 kV。2次进样之间依次用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液、水、缓冲液清洗3 min。毛细管在每次使用之前先用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液、水、缓冲液各清洗10 min。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

图1为4种酚酸类物质在190~300 nm紫外扫描图。结果表明,绿原酸的最大吸收波长为200~214 nm;没食子酸的最大吸收波长为200~220 nm;原儿茶酸与咖啡酸在200~220 nm均有较大吸收。综合考虑各因素,选择用214 nm作为最佳检测波长。



1.咖啡酸;2.原儿茶酸;3.没食子酸;4.绿原酸。下同
1. Caffeic acid; 2. Protocatechuic acid; 3. Gallic acid; 4. Chlorogenic acid. The same below

图1 4种酚酸类物质的紫外光谱图

Figure 1 Ultraviolet spectrogram of 4 phenolic compounds

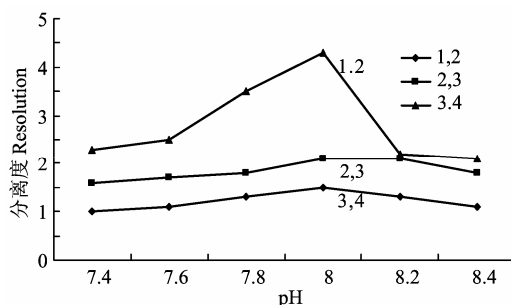


图2 缓冲液的pH值对4种酚酸类物质分离度的影响

Figure 2 Effects of pH value on resolution of 4 phenolic compounds

2.2 电泳分离条件的优化

2.2.1 电泳缓冲液类型的选择 在相同的离子浓度条件下,比较了磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、磷酸-硼砂缓冲体系。分析结果表明,磷酸盐缓冲液和硼酸盐缓冲液分离效果较差,迁移时间较长,峰拖尾明显,4组分不能完全分离,而磷酸-硼砂盐缓冲液体系分离效果较好。实验选择磷酸-硼砂盐缓冲液作为分离缓冲液。

2.2.2 电泳缓冲液离子浓度的选择 试验选择了10、20、30、 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4个离子浓度的磷酸-硼砂缓冲体系。结果表明,缓冲液离子浓度对峰形和迁

移时间有一定的影响, 但影响不明显, 故选定 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸-硼砂缓冲溶液为分析条件。

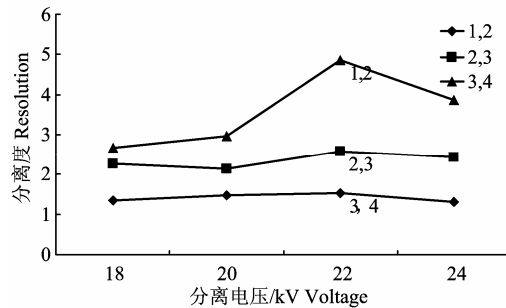


图 3 分离电压对 4 种酚酸类物质分离度的影响

Figure 3 Effects of separation voltage on resolution of 4 phenolic compounds

2.2.3 缓冲液 pH 对分离的影响 pH 是影响分离的因素之一。在离子浓度为 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸-硼砂缓冲溶液条件下, 考察了 pH 为 7.4、7.6、7.8、8.0、

8.2、8.4 对 4 组分分离度的影响, 结果见图 2。当 pH 为 7.8、8.0 和 8.2 时, 相邻两物质之间的分离度均达到 1.2 以上。因此选择 pH 作为正交试验因子。

2.2.4 电压对分离的影响 本试验考察了分离电压在 18~24 kV 围内对 4 种物质分离度的影响, 结果见图 5。当分离电压为 22 kV 时, 相邻两物质之间的分离度均达到 1.5 以上。所以试验选择分离电压, 20 kV、22 kV 和 24 kV 为正交试验因子。

2.2.5 分离温度的选择 温度变化不仅影响分离的重现性, 而且影响分离的效率。综合考虑各方面的因素, 选择 20°C 、 22°C 、 25°C 作为正交试验因子。

2.3 正交试验

为了进一步优化最佳分离分析条件, 将缓冲液 pH (7.8、8.0、8.2)、电压 (20 kV、22 kV、24 kV) 和温度 (20°C 、 22°C 、 25°C), 为 3 个因素, 每个因素选取 3 个水平, 即 3 因素 3 平正交试验确立最佳的毛细管电泳分离条件 (见表 1)。

表 1 正交试验 $L_9(3^3)$

Table 1 The list of $L_9(3^3)$ orthogonal experiment

编号 No.	pH	电压 Voltage	温度 Temperature	绿原酸-原儿 茶酸分离度 Resolution of chlorogenic acid and protocatechuic acid	原儿茶酸-没食 子酸分离度 Resolution of protocatechuic acid and gallic acid	没食子酸-咖啡 酸分离度 Resolution of gallic acid and caffeic acid	迁移时间/min Migration time
1	7.8	20	20	4.17	1.39	1.49	11.21
2	7.8	22	22	4.31	1.34	1.33	10.37
3	7.8	24	25	4.56	1.38	1.17	8.44
4	8.0	20	22	6.08	1.28	2.01	10.80
5	8.0	22	25	5.49	1.89	2.13	8.60
6	8.0	24	20	5.44	1.52	2.09	9.54
7	8.2	20	25	7.06	2.27	1.88	10.34
8	8.2	22	20	5.56	1.41	1.75	9.97
9	8.2	24	22	5.12	1.08	1.10	8.01

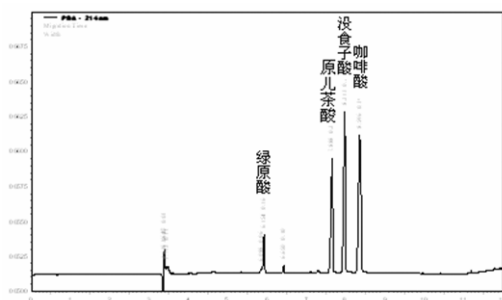


图 4 最佳优化条件电泳

Figure 4 Optimum condition for gel electrophoresis

由表 1 可得出试验 5 为最佳电泳分离条件: $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸-硼砂缓冲溶液 pH 8.0、分离电压为

22 kV、分离温度 25°C , 结果见图 4。

2.4 研究方法的评估

2.4.1 精密度 在最优电泳条件下, 将 $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准溶液重复进样 5 次, 考察各组分的校正峰面积和迁移时间的重复性(见表 2)。结果表明, 4 种酚酸的峰面积 $RSD \leq 5.29\%$, 迁移时间的 $RSD \leq 0.84\%$ 。

2.4.2 准确度 准确度实验采用添加回收率法进行试验。分别称取 2 份平行样品, 于其中 1 份加入标准品, 按本法对这 2 份样品同时进行测定, 实测添加量与标准添加量之比为回收率。通过实验, 测得回收率在 $80.38\% \sim 96.88\%$ 之间 (见表 3)。

2.4.3 线性关系 如表 4 所示, 在选定的条件下,

将混合标准样品稀释为6个浓度梯度,在最佳的电泳条件下进行HPCE测定,以浓度为横坐标,峰面

积为纵坐标来进行回归处理。结果表明,4种酚酸的相关系数均0.9748~0.9965。

表2 精密度试验

Table 2 Analysis of accuracy

组分 Element	峰面积 RSD/% Peak area	迁移时间 RSD/% Migration time
绿原酸 Chlorogenic acid	5.29	0.07
原儿茶酸 Protocatechuic acid	2.50	0.59
没食子酸 Gallic acid	2.76	0.84
咖啡酸 Caffeic acid	4.16	0.58

表3 方法的回收率

Table 3 Recovery of method for determination of HPCE

组分 Element	添加量/ μg Additive amount	实测添加量/ μg Determined amount	回收率/% Recovery
绿原酸 Chlorogenic acid	25	20.525 3	82.10
原儿茶酸 Protocatechuic acid	25	24.217 9	96.87
没食子酸 Gallic acid	25	20.095 0	80.38
咖啡酸 Caffeic acid	25	24.220 7	96.88

表4 线性范围和回归方程

Table 4 Regression equation and linear range

组分 Element	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Linear range	线性方程 Regression equation	相关系数 R^2
绿原酸 Chlorogenic acid	6.25~100	$y=533.05x+3468.9$	0.9815
原儿茶酸 Protocatechuic acid	6.25~100	$y=2701.8x+13709$	0.9965
没食子酸 Gallic acid	6.25~100	$y=3604x+30104$	0.9769
咖啡酸 Caffeic acid	6.25~100	$y=3751.5x+30608$	0.9748

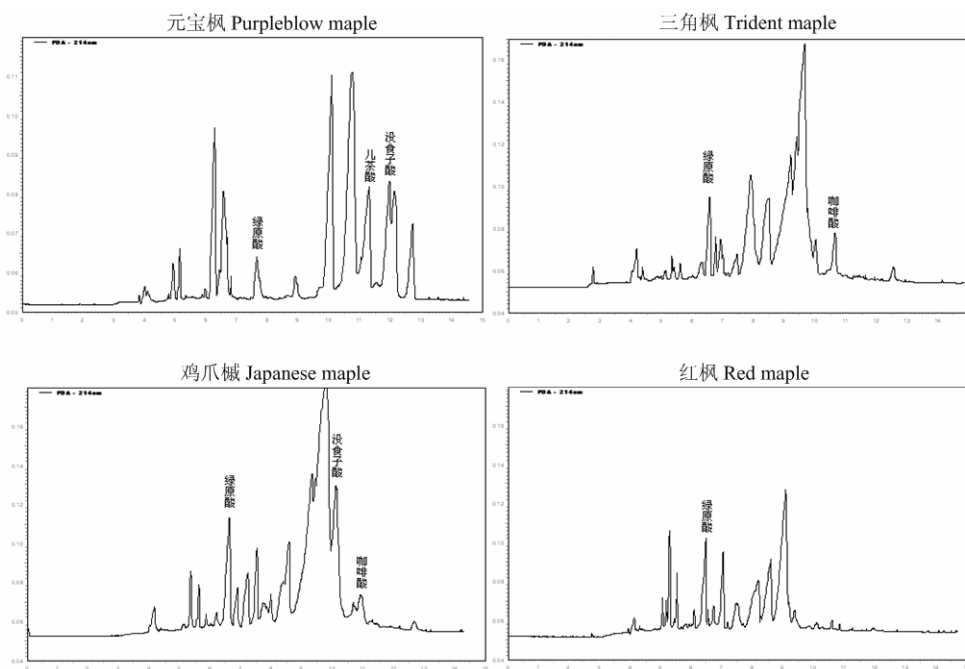


图5 样品分离色谱图

Figure 5 Separation of the sample chromatogram

表 5 各样品中 4 种酚酸类化合物含量
Table 5 Contents of four phenolic compounds in samples

树种 Trees	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$			
	绿原酸 Chlorogenic acid	原儿茶酸 Protocatechuic acid	没食子酸 Gallic acid	咖啡酸 Caffeic acid
红枫 Red maple	4 084.84			
三角枫 Trident maple	1 303.62			39.94
元宝枫 Purpleblow maple	2 837.66	3 242.88	577.85	
鸡爪槭 Japanese maple	4 911.53		43.32	34.66

2.5 样品的测定

在最佳分离条件下, 将按 1.5 处理好的样品经高效毛细管电泳分离并测定其含量, 测定结果如图 5 及表 5。结果表明, 4 种枫叶中均含有绿原酸, 其中红枫和鸡爪槭中绿原酸含量大于 $4\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 蚜虫宿主三角枫中绿原酸含量最低为 $1\ 303.62\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 原儿茶酸可在元宝枫枫叶中检出, 含量大于 $3\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 没食子酸可在元宝枫和鸡爪槭中检出, 含量较少; 咖啡酸可在三角枫和鸡爪槭中检出, 但含量较低。

3 结论

采用正交试验的方法, 研究了缓冲液 pH、分离电压、运行温度等电泳参数对叶片中酚酸类物质提取检测的影响, 建立了高效毛细管电泳分离测定枫叶中绿原酸、原儿茶酸、没食子酸、咖啡酸 4 种酚酸类物质的方法, 并检测了它们在红枫、三角枫、元宝枫和鸡爪槭 4 种枫叶叶片中的含量, 检测了 4 种酚酸在蚜虫的寄生宿主三角枫、元宝枫与非宿主红枫、鸡爪槭中的分布。该方法为同时分离检测枫叶中多种酚酸类物质提供了一个简便、准确、快速的检测方法。

参考文献:

- [1] 蒋乃翔, 刘志明, 任海青, 等. 不同竹龄毛竹细胞壁总酚酸和酚酸类物质的含量变化[J]. 竹子研究汇刊, 2010, 29(1): 24-28.
- [2] 刘艳芳, 马歌丽. 薄层色谱-分光光度法测定葵花籽粕中的绿原酸[J]. 现代食品科技, 2007(11): 80-82.
- [3] He Z F, Zhang D Q. Health food chemistry and detection technology [M]. Beijing: Chinese Light Industry Press, 1998: 124-125.
- [4] 刘丽梅, 李曼玲. HPLC 法测定秦皮中香豆素类成分的含量[J]. 中草药, 2004(7): 819-822.
- [5] 倪学文, 吴谋成. RP-HPLC 测定银杏外种皮中银杏酚酸的含量[J]. 食品工业科技, 2006, 27(11): 174-176.
- [6] 曹炜, 索志荣, 宋纪蓉, 等. 葡萄酒中种酚酸的色谱电化分析[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(2): 1424-1427.
- [7] 池玉杰, 闫洪波. 6 种白腐菌腐朽前后的山杨木材酚酸种类和含量变化的高效液相色谱分析[J]. 林业科学, 2008, 44(2): 116-123.
- [8] 李永库, 李晓静, 欧小辉, 等. 果汁中 9 种酚酸类化合物的 RP-HPLC-PDA 分析[J]. 食品工业发酵, 2007, 33(7): 135-138.
- [9] 于世锋, 符军放, 陈卫军, 等. 高效液相色谱法测定蜂胶中 4 种酚酸的含量[J]. 中国蜂业, 2007, 58(9): 8-10.
- [10] 沈晓春, 陈平, 郭伟强, 等. 用毛细管电泳方法分离有机酸的研究[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2002, 29(6): 679-684.