

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.

# RP-HPLC 法测定不同产地杜仲叶和皮中 3 种活性成分的含量

姜晓芳<sup>1</sup>, 张翠利<sup>2</sup>, 李 钦<sup>1</sup>, 杜红岩<sup>3</sup>, 杜兰英<sup>3</sup>, 付建敏<sup>3</sup>

(1. 河南大学中药研究所, 河南开封 475004; 2. 黄河科技学院, 河南郑州 450006;

3. 中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 河南郑州 450003)

**摘要:**为了研究不同产地杜仲叶、杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量差异, 采用高效液相色谱法, 色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4.6 mm), 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(13: 87: 1.5), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 237 nm。结果显示, 京尼平苷酸在 0.109 2~7.644  $\mu\text{g}$ 、绿原酸在 0.051 6~3.612  $\mu\text{g}$ 、京尼平苷在 0.013 2~0.924  $\mu\text{g}$  范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.17%、98.84%、98.18%, RSD 分别为 1.92%、1.39%、1.40%。该方法操作简单、重复性好、专属性强, 可用于同时测定不同产地杜仲叶、杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸及京尼平苷的含量。

**关键词:** RP-HPLC; 京尼平苷酸; 绿原酸; 京尼平苷

**中图分类号:** R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0314-03

杜仲叶、杜仲分别为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmiodes* Oliv.) 的干燥叶和干燥树皮, 均载于《中国药典》2010 年版一部, 二者均具有补肝肾、强筋骨作用<sup>[1]</sup>。杜仲是我国特有的贵重中药材树种, 主要分布于贵州、陕西、四川等省区, 杜仲植物各部位化学成分相近<sup>[2]</sup>, 其中杜仲叶和杜仲皮中所含的主要成分为京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷等。京尼平苷酸、京尼平苷为环烯醚萜类成分, 具有抗肿瘤活性。研究发现京尼平苷酸还具有降压作用, 是杜仲降压的主要成分之一<sup>[3]</sup>。绿原酸为苯丙素类成分, 具有抗菌、抗病毒活性<sup>[4-5]</sup>。为了比较杜仲主产区杜仲叶和杜仲皮的质量, 本研究测定了不同产地杜仲叶和杜仲皮中这 3 种活性成分的含量, 并比较了其含量的差异。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

LC-2010A 高效液相色谱仪、UV 检测器、CLASS-VP 工作站(均为日本岛津公司产品), UV-1600 紫外可见分光光度扫描仪、Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4.6 mm)(迪马公司), JYZ-8B 型九阳榨汁机(山东九阳小家电有限公司), KQ5200DA 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), ABI35-S 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 仪器公司)。

### 1.2 试剂

收稿日期: 2013-01-10

基金项目: 国家公益性行业(林业)专项(编号: 201004029); 国家“948”计划(编号: 2008-4-66); 河南省科技攻关重点项目(编号: 102102310188)。

作者简介: 姜晓芳(1987-), 女, 河南平顶山人, 硕士研究生, 研究方向为中药质量评价与新药开发。E-mail: jx312@126.com。

通信作者: 李 钦, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量评价。Tel: (0378) 3880589; E-mail: liqin@henu.edu.cn。

京尼平苷酸对照品(日本和光纯药业株式会社, 批号 PER2862, 供含量测定用); 绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110753-200413, 供含量测定用); 京尼平苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110749-200714, 供含量测定用); 甲醇为色谱纯, 水为高纯水, 其他试剂均为分析纯。

杜仲叶、杜仲皮供试品产地分别为: 陕西略阳、贵州遵义、江西井冈山、河北安国、山东青岛、湖北郧西、湖南株洲、河南灵宝, 经河南大学中药研究所所长李钦教授鉴定为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmiodes* Oliv.) 的干燥叶和干燥树皮, 采集时间均为 2009 年 9 月下旬。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4.6 mm)(迪马公司生产), 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(13: 87: 1.5), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 237 nm, 柱温: 20  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.2 检测波长的选择

分别对京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的对照品甲醇溶液扫描, 3 种成分在 234~240 nm 均有较强的吸收。因此, 选择 237 nm 为紫外检测波长。

### 2.3 对照品溶液的制备

分别精确称取京尼平苷酸对照品 5.46 mg、绿原酸对照品 2.58 mg 及京尼平苷对照品 0.66 mg, 置同一个 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.4 供试品溶液的制备

分别取杜仲叶粉末、杜仲皮粉末(过 40 目筛)0.25 g, 精确称定, 置 25 mL 锥形瓶中, 精确加入 50% 甲醇溶液 25 mL, 称定重量, 超声提取(功率 160 W, 频率 40 kHz)40 min, 放至室温, 再称定重量, 用 50% 甲醇溶液补足失重, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 即得供试溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线的测定 分别精确吸取对照品溶液 0.2、2、4、8、12、14 μL 进样,测定其峰面积。分别以进样量(μg)为横坐标,色谱峰面积积分值为纵坐标,进行线性回归,得回归方

程(表 1)。结果表明:京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷对照品在表中的进样量范围内,进样量与色谱峰面积积分值线性关系良好。

表 1 3 种成分的回归方程(n=6)

对照品	回归方程	相关系数	线性范围(μg)
京尼平苷酸	$y = 709\ 730.54x + 20\ 666.44$	0.999 9	0.109 2 ~ 7.644
绿原酸	$y = 1\ 480\ 725.95x - 24\ 271.59$	0.999 9	0.051 6 ~ 3.612
京尼平苷	$y = 1\ 034\ 750.58x - 4\ 206.60$	0.999 9	0.013 2 ~ 0.924

2.5.2 精确度试验 精确吸取杜仲叶(河南灵宝)供试品溶液 20 μL,连续进样 6 次,京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的峰面积积分值的相对标准偏差分别为 1.82%、1.45%、1.64%,表明本方法精确度良好。

2.5.3 重复性试验 取杜仲叶(河南灵宝)0.25 g,6 份,按照“2.4”方法制备供试品溶液,按上述色谱方法进行测定,结果京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷含量的 RSD 分别为 1.76%、1.60%、1.53%,结果表明重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取杜仲叶(河南灵宝)粉末约 0.25 g,

精确称定,按照“2.4”方法制备供试品溶液,按上述色谱条件分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 进样 20 μL 测定,京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷峰面积积分值的 RSD 分别为 1.68%、1.28%、1.36%,说明这 3 种成分在 24 h 内稳定。

2.5.5 加样回收率试验 取杜仲叶(河南灵宝)粉末约 0.125 g,6 份,精确称定。分别精确加入京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷对照品 0.819、1.161、0.066 mg,按照“2.4”方法制备供试品溶液,测定,结果见表 2。结果表明:平均加样回收率达 98% 以上,RSD < 2%,符合有关规定。

表 2 加样回收率测定结果(n=6)

测定成分	样品量(g)	样品含量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
京尼平苷酸	0.125 0	0.85	0.819	1.621	97.98	99.17	1.92
	0.126 4	0.859	0.819	1.629	98.95		
	0.123 6	0.84	0.819	1.646	100.94		
	0.125 9	0.856	0.819	1.654	101.99		
	0.117 8	0.801	0.819	1.613	96.99		
绿原酸	0.119 9	0.815	0.819	1.622	98.15	98.84	1.39
	0.125 0	1.287	1.161	2.298	97.97		
	0.126 4	1.301	1.161	2.331	100.77		
	0.123 6	1.273	1.161	2.311	99.06		
	0.125 9	1.297	1.161	2.290	97.22		
京尼平苷	0.117 8	1.213	1.161	2.298	97.94	98.18	1.40
	0.119 9	1.235	1.161	2.323	100.08		
	0.125 0	0.057 4	0.066	0.129 3	95.97		
	0.126 4	0.058	0.066	0.131 3	98.97		
	0.123 6	0.056 7	0.066	0.130 7	98.04		
	0.125 9	0.057 8	0.066	0.132 1	100.17		
	0.117 8	0.054 1	0.066	0.130 0	97.01		
	0.119 9	0.055	0.066	0.131 2	98.91		

2.6 样品含量测定

取不同产地的杜仲叶、杜仲皮样品,按照“2.4”方法制备供试品溶液,按上述色谱条件,分别精确吸取对照品溶液 5 μL 和供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,按外标法计算样品中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量,结果见表 3、表 4。京尼平苷酸、绿原酸及京尼平苷的对照品溶液和样品溶液的液相色谱图见图 1、图 2、图 3。

3 结论与讨论

在有关京尼平苷酸、绿原酸和京尼平苷的文献研究中,有文献<sup>[6]</sup>采用了甲醇-水-冰乙酸(20:80:1.5)的流动相,本试验考虑到保留时间及所用色谱柱,在测定时采用了甲

表 3 不同产地杜仲叶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷含量测定结果(n=3)

不同产地	含量(%)		
	京尼平苷酸	绿原酸	京尼平苷
陕西略阳	—	0.756	0.073
贵州遵义	0.673	0.782	0.077 2
江西井冈山	0.077	0.876	0.056 6
河北安国	0.471	0.688	0.043 3
山东青岛	0.216	0.778	0.054 2
湖北鄖西	0.168	1.364	0.087 1
湖南株洲	0.388	0.644	0.057 0
河南灵宝	0.686	1.032	0.045 9

注:“—”表示含量太低没有检测出。表 4 同。

表 4 不同产地杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸、  
京尼平苷含量测定结果 (n=3)

不同产地	含量 (%)		
	京尼平苷酸	绿原酸	京尼平苷
陕西略阳	—	—	—
贵州遵义	0.903	—	0.092
江西井冈山	2.309	0.095	0.239
河北安国	1.994	0.221	0.294
山东青岛	3.242	0.082	0.380
湖北郧西	2.352	0.164	0.412
湖南株洲	1.453	0.299	0.122
河南灵宝	2.396	0.131	0.459

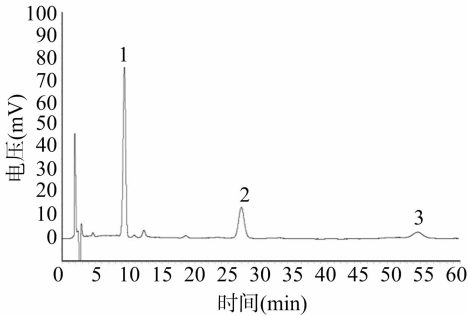


图3 杜仲皮供试品溶液HPLC图谱

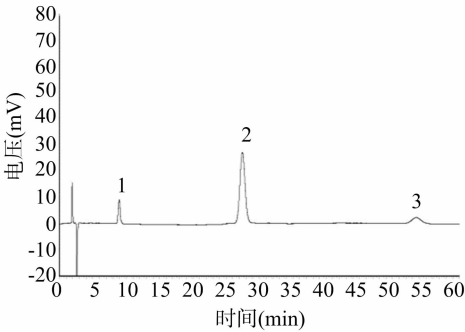
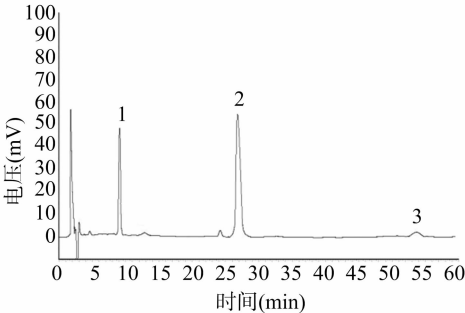


图1 对照品溶液HPLC图谱



1—京尼平苷酸；2—绿原酸；3—京尼平苷  
图2 杜仲叶供试品溶液HPLC图谱

0.087 1%、0.459%。本研究所用样品均为 2009 年 9 月下旬采自我国主要杜仲产区,采样具有代表性。结果表明,同一产地的杜仲皮中京尼平苷酸和京尼平苷的含量高于杜仲叶,而绿原酸的含量低于杜仲叶,京尼平苷酸、京尼平苷和绿原酸在杜仲皮和杜仲叶中的分布有较大差别。

与文献报道相比,杜仲叶中这 3 种活性成分的含量均比较低,尤其是绿原酸的含量。文献[7]、文献[8]绿原酸的含量范围为 1.38%~4.17%,本研究测得杜仲绿原酸的范围为 0.644%~1.364%,可能与采摘时间有关。试验所用杜仲叶样品均采自 9 月下旬,杜仲叶中这 3 种活性成分的含量可能受光照、空气中水分、氧气等因素的影响。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:154.  
[2] 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.  
[3] 罗丽芳,吴卫华,欧阳东生,等. 杜仲的降压成分及降压机制[J]. 中草药,2006,37(1):150-152.  
[4] 程光丽. 杜仲有效成分分析及药理学研究进展[J]. 中成药, 2006,28(5):723-725.  
[5] 杜红岩. 杜仲活性成分与药理研究的新进展[J]. 经济林研究, 2003,21(2):58.  
[6] 李万红,徐靖宏,陈 红,等. RP-HPLC 测定杜仲叶活性成分的含量[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(2):140-142.  
[7] 孙彦超,李 钦,杜红岩,等. RP-HPLC 测定杜仲叶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量[J]. 中成药,2009,31(10):1608-1609.  
[8] 田士林,李 莉. 杜仲叶皮内绿原酸含量的测定与比较[J]. 安徽农业科学,2006,34(13):3084-3086.

醇-水-冰乙酸(13:87:1.5)的流动相,3 种成分色谱峰均达到了很好的分离效果。

河南灵宝产杜仲叶和山东青岛产杜仲皮的京尼平苷酸含量较高,分别为 0.686%、3.242%;湖北郧西产杜仲叶和湖南株洲产杜仲皮的绿原酸 1.364%、0.299%,湖北郧西产杜仲叶和河南灵宝产的杜仲皮中京尼平苷含量较高,分别为

更正:《江苏农业科学》2013 年第 41 卷第 6 期 102-103 页所刊论文《抗水稻黑条矮缩病品种筛选》,作者更正为:

金桂秀,李相奎,张瑞华,刘德友,刘丽娟,王兰秋  
(山东省临沂市农业科学院水稻研究所,山东临沂 276012)

作者简介:金桂秀(1968—),女,高级农艺师,主要从事水稻遗传育种研究。E-mail:lysdsjgx@163.com。  
通信作者:张瑞华(1966—),男,高级农艺师,主要从事水稻遗传育种研究。E-mail:zhangrhshuidao@163.com。  
特此更正。