

HPLC 法测定杜仲雄花和杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸和京尼平苷

李 钦¹, 杜红岩², 杜兰英², 赫锦锦¹, 段经华²

(1. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004; 2. 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:目的 建立同时测定杜仲雄花及其制剂杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸和京尼平苷的方法。方法 采用反相高效液相色谱法。色谱条件为迪马公司 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水-冰醋酸(15 : 85 : 1.5)为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 25~27 °C, 检测波长为 237 nm, 灵敏度为 0.100 0 AUFS。结果 京尼平苷酸、绿原酸及京尼平苷进样量与色谱峰面积线性关系良好。结论 该方法简便、准确, 可用于杜仲雄花及杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸及京尼平苷的测定。

关键词:杜仲雄花; 杜仲雄花茶; 京尼平苷; 绿原酸; 京尼平苷酸; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)01-0071-02

杜仲 *Eucommia uimoides* Oliv. 为杜仲科杜仲属植物, 传统以皮入药。杜仲皮含有京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷等活性成分^[1]。杜仲叶已收载于《中国药典》2005 年版一部, 其中也含有上述 3 种有效成分^[2,3]。杜仲雄花中也富含与叶、皮类似的有效成分^[4,5]。京尼平苷酸、京尼平苷属环烯醚萜类, 具有抗肿瘤活性; 绿原酸为苯丙素类, 具有抗菌活性^[2]。京尼平苷酸有降压作用, 是杜仲降压的主要成分之一^[6]。杜仲为雌雄异株树种, 雌雄株各半。杜仲雄花簇生于当年生枝条基部, 容易采集^[7]。杜仲广泛分布在我国亚热带至温带的 26 个省(区、市), 目前国内杜仲栽培资源约 35 万公顷, 杜仲雄花资源十分丰富。采用优良无性系和果园化栽培技术, 杜仲雄花鲜花产量可达 2 500 kg/hm² 以上。以杜仲雄花为原料加工成的杜仲雄花茶已获得国家发明专利^[8]。为更好的控制杜仲雄花及杜仲雄花茶的质量, 本实验建立 RP-HPLC 法同时测定杜仲雄花及其制剂杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的方法, 有助于杜仲雄花质量控制和开发^[9]。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-10AT 高效液相色谱仪, Shimadzu SPD-10A 紫外检测器; 浙大智达 N2000 色谱工作站; UV-1600 紫外可见分光光度扫描仪; TP300 超声波清洗仪。

流动相用甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。京尼平苷、绿原酸、京尼平苷酸对照品由日本养命酒株式会社中央研究院 Deyama 先生赠送, 经归一化法测定质量分数分别为 98.6%、

99.2%、98.9%。杜仲雄花采自河南省灵宝市中国林业科学院经济林研究中心杜仲研究基地, 杜仲雄花茶由灵宝市天地科技生态有限公司提供, 杜仲雄花、杜仲雄花茶经河南大学药学院张保国教授鉴定均为杜仲科植物杜仲 *E. uimoides* Oliv. 的雄花和雄花加工成的茶。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 迪马公司 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水-冰醋酸(15 : 85 : 1.5)为流动相, 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 25~27 °C, 检测波长为 237 nm, 灵敏度为 0.1000 AUFS。

2.2 混合对照品溶液的制备: 精密称取京尼平苷酸对照品 4.50 mg、绿原酸对照品 3.95 mg、京尼平苷对照品 3.25 mg 置同一 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备: 分别准确称取干燥杜仲雄花及杜仲雄花茶粗粉各 0.25 g, 分别置 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液至刻度, 浸泡 1 h, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz) 30 min, 放冷, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察: 分别精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL 进样, 测定其峰面积。分别以进样量为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程。京尼平苷酸: $Y = 2.0 \times 10^6 X + 28\ 181$, $r = 0.999\ 9$, 线性范围: 0.18~3.60 μg; 绿原酸: $Y = 4.0 \times 10^6 X - 256\ 794$, $r = 0.999\ 9$, 线性范围: 0.16~3.16 μg; 京尼平苷: $Y = 2.0 \times 10^6 X +$

①收稿日期: 2008-05-09

基金项目: 国家十五科技支撑项目(2006BAD18B0303); 国家林业局重点攻关项目(2006-61)

作者简介: 李 钦(1965—), 男, 河南中牟人, 河南大学中药研究所所长, 教授, 博士, 硕士生导师, 长期从事中药质量评价和中药炮制工艺的教学和科研工作, 在该领域已发表论文 40 余篇, 出版本专业论著 4 部, 获省部级奖 4 项。

Tel: (0378) 3880589 E-mail: liqin@henu.edu.cn

54 368, $r = 0.9997$, 线性范围: $0.13 \sim 2.60$ g。结果表明, 京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷进样量与色谱峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验: 准确吸取含京尼平苷酸 0.18 mg/mL, 绿原酸 0.16 mg/mL, 京尼平苷 0.13 mg/mL 的混合对照品溶液 20 μ L, 重复进样 5 次, 测定京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷面积, 计算 RSD, 结果京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷峰面积积分值的 RSD 分别为 1.46% 、 1.58% 、 1.89% 。

2.6 稳定性试验: 分别称取杜仲雄花(批号 070416)粗粉及杜仲雄花茶(批号 070420)粗粉各 5 份, 每份约 0.5 g, 制备供试品溶液, 分别于制备后的 0 、 2 、 4 、 6 、 8 h 进样测定, 计算得杜仲雄花中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷质量分数的 RSD 分别为 1.23% 、 1.18% 、 1.40% 。杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷质量分数的 RSD 分别为 1.28% 、 1.36% 、 1.54% 。结果表明杜仲雄花及杜仲雄花茶溶液中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷在 8 h 内稳定。

2.7 重现性试验: 分别取杜仲雄花(批号 070416)及杜仲雄花茶(批号 070420)粉碎成粗粉, 分别取粗粉 0.25 g, 各 5 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得杜仲雄花中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷质量分

数的 RSD 分别为 1.57% 、 1.67% 、 1.85% , 杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷质量分数的 RSD 分别为 1.39% 、 1.60% 、 1.78% 。

2.8 回收率试验: 分别称取杜仲雄花(批号 070416)及杜仲雄花茶(批号 070420)粗粉约 0.13 g, 各 6 份, 每份分别加入含京尼平苷酸 0.18 mg/mL, 绿原酸 0.16 mg/mL, 京尼平苷 0.13 mg/mL 的混合对照品溶液 8 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果杜仲雄花中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的平均回收率分别为 98.3% 、 97.8% 、 98.0% , RSD 分别为 1.34% 、 1.50% 、 1.72% 。杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的平均回收率分别为 97.2% 、 97.4% 、 97.7% , RSD 分别为 1.40% 、 2.02% 、 1.38% 。

2.9 样品测定: 精密吸取杜仲雄花供试品溶液、杜仲雄花茶供试品溶液、混合对照品溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪中, 绘制液相色谱图, 见图 1。可以看出, 京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷分离良好。在选定色谱条件下, 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 20 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 计算杜仲雄花及杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的质量分数, 结果见表 1。

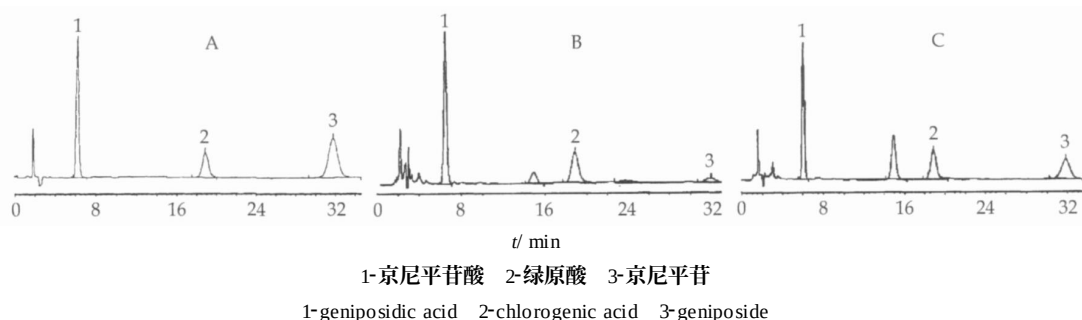


图 1 对照品(A)、杜仲雄花(B)、杜仲雄花茶(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A), *E. ulmoides* stamen (B) and *E. ulmoides* stamen tea (C)

表 1 杜仲雄花、杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Determination of geniposidic acid, chlorogenic acid, and geniposide in *E. ulmoides* stamen and *E. ulmoides* stamen tea ($n = 3$)

样品	批号	京尼平苷酸/ %	绿原酸/ %	京尼平苷/ %
杜仲雄花	070416	1.638 3	0.408 3	0.168 7
	070417	1.602 5	0.416 5	0.185 4
	070418	1.659 2	0.426 8	0.176 8
杜仲雄花茶	070420	1.957 1	0.519 2	0.984 3
	070421	1.862 8	0.508 3	0.953 7
	070422	1.895 4	0.517 4	0.979 5

3 讨论

检测波长的选择: 通过对京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷对照品溶液进行紫外波长扫描, 结果表明, 3 种成分在 $234 \sim 240$ nm 均有较强的吸收。因此选择 237 nm 为紫外检测波长。

流动相系统的选择: 根据京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷 3 种物质的结构, 选择 C_{18} 柱利用反相高效液相色谱法, 以甲醇-水作为流动相进行分离。杜仲雄花成分复杂, 京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷附近峰很多, 当溶剂极性较大时, 虽然出峰时间短, 但样

(下转第 143 页)

“2.3”项下方法操作,在上述色谱条件下进行测定,计算得平均加样回收率为 99.81%,RSD 为 2.38%($n=6$)。

2.9 样品的测定:分别精密吸取供试品溶液 10 μL ,注入色谱仪,在上述色谱条件下进行测定,计算川陈皮素的量,结果见表 1 和图 1。

表 1 不同产地枳壳药材的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of Fructus Aurantii from various habitats ($n=3$)

编号	样品来源	商品名称	川陈皮素/ %
1	2003-07-31 江西新干(香橙)采集	江枳壳	0.053
2	2003-07-25 江西樟树吴城乡采集	江枳壳	0.055
3	2003-07-31 江西樟树吴城乡采集	江枳壳	0.059
4	2004-07-31 江西新干(臭橙)采集	江枳壳	0.023
5	2002-10-02 购于重庆綦江县药材公司	川枳壳	0.013
6	2002-09-30 购于重庆江津药材公司	川枳壳	0.015
7	2002-11-15 购于湖南怀化药材公司	湘枳壳	0.120
8	2002-11-17 购于湖南沅江药材公司	湘枳壳	0.177
9	2002-11-08 购于江西樟树药材市场湖南沅江产	湘枳壳	0.182
10	2002-11-17 购于湖南沅江药材公司	湘枳壳	0.170
11	2002-12-04 浙江兰溪药农家购(大暑后)	苏枳壳	0.050
12	2002-12-04 浙江兰溪药农家购(大暑前)	苏枳壳	0.062
13	2002-10-29 购于武汉国药集团	枳壳饮片	0.069
14	2002-11-17 购于湖南沅江药材公司	(炒)枳壳	0.175
15	2002-10-29 购于湖北九州通购,沅江产	枳壳饮片	0.046
16	2002-11 购于南昌三店堂药房	枳壳饮片	0.137

3 讨论

3.1 流动相的选择:参考文献方法[5]结果分离不好,且流动相复杂。本试验选择了不同配比的流动相,结果表明,甲醇-水(55:45)分离效果较好。川陈皮素在 330 nm 处有最大紫外吸收。

3.2 提取方法的选择:通过超声提取、加热回流提取及索氏提取的比较,超声提取不完全,加热回流提

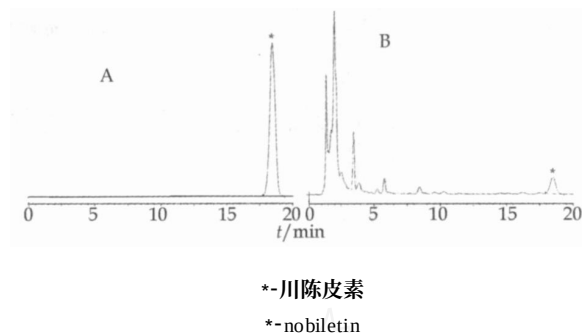


图 1 对照品(A)和样品(B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

取和索氏提取完全,但加热回流提取法提取时间相对较短,操作简便,故本实验采用加热回流方法。

3.3 提取溶剂的选择:实验中考察了甲醇、乙醇、氯仿、丙酮作为提取溶剂,结果表明,甲醇的提取效果好且完全,本实验采用甲醇为提取溶剂。

3.4 本试验首次采用 HPLC 法对不同产地的枳壳药材进行川陈皮素的测定,方法简便、准确、重现性好,可作为枳壳药材中川陈皮素测定的有效方法。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] Manthey J A, Guthrie N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines [J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50(21): 5837-5843.
- [3] Rodriguez J, Yanez J, Vicente V, et al. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines: relationship between structure and activity [J]. *Melanoma Res*, 2002, 2(12): 99-107.
- [4] Ka Waii S, Tomono Y, Katase E, et al. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation [J]. *Anticancer Res*, 1999, 2(19): 1261-1269.
- [5] 钱士辉,朱玲英,陈 廉. RP-HPLC 法测定陈皮药材中川陈皮素的含量[J]. *南京中医药大学学报*, 1998, 14(4): 219-220.

(上接第 72 页)

品中 3 种有效成分和杂峰难以分离,为此调小流动相的极性,最终选择甲醇-水(15:85)为流动相可使 3 种成分有较好的分离度。由于京尼平苷酸、绿原酸中有羧基、酚羟基,在中性溶剂中两种成分易电离,从而在色谱柱上存在“双保留”现象,为此,在流动相中加入少量冰醋酸,可抑制羧基、酚羟基的离解,从而使两峰的峰形得到改善。经实验测定优化,选择甲醇-水-冰醋酸(15:85:1.5)为流动相。

本实验同时测定杜仲雄花及杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷,为评定杜仲雄花及杜仲雄花茶的质量提供了快捷、可行的测定方法,可用于其质量控制,也适用于大量样品的快速处理。

参考文献:

- [1] 王俊丽,陈丕铃. 杜仲的研究与应用[J]. *中草药*, 1993, 24(12): 665-667.
- [2] 杜红岩. 杜仲活性成分与药性研究的新进展[J]. *经济林研究*, 2003, 21(2): 58-61.
- [3] 王嗣岑,贺浪冲,高锦明,等. RP-HPLC 法同时分离测定杜仲叶中 3 种有效成分[J]. *西北药学杂志*, 2001, 16(1): 15-16.
- [4] 李芳东,杜红岩. 杜仲[M]. 北京:中国中医药出版社, 2001.
- [5] 张康健,董娟娥,马柏林,等. 杜仲次生代谢产物差异性的研究[J]. *林业科学*, 2002, 38(6): 12-16.
- [6] Deyam T, Seinshibe S, Nakezawa Y. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and *Siberian Ginseng* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1057-1060.
- [7] 谢碧霞,杜红岩. 绿色食品开发利用[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003.
- [8] 杜红岩,李芳东,杜兰英. 杜仲雄花茶及其加工工艺[P]. 中国专利:CN1220096, 1999-06-23.
- [9] 戚向阳,陈 维,张声华. 反相高效液相色谱法测定杜仲中京尼平苷、京尼平苷酸及绿原酸的含量[J]. *药物分析杂志*, 2000, 20(1): 22-24.