

HPLC 法同时测定杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷

刘 慧^{1,2}, 张 盛^{2,3*}, 刘仲华^{2,3*}

1. 长沙医学院 公共卫生系, 湖南 长沙 410219

2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128

3. 湖南农业大学园艺园林学院 植物资源工程系, 湖南 长沙 410128

摘要: 目的 HPLC法同时测定杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷4种有效成分的量, 为更好控制杜仲皮质量提供依据。方法 采用Kromasil C₁₈柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱, 0~7 min, 7% A; 7~35 min, 14% A; 35~45 min, 15% A。体积流量1.0 mL/min, 检测波长235 nm, 柱温30 ℃。结果 在该色谱条件下, 京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷分别在0.102 5~0.512 5 ($r=0.999\ 9$)、0.092 5~0.462 5 ($r=0.999\ 9$)、0.120 0~0.600 0 ($r=0.999\ 6$)、0.090 0~0.450 0 μg/mL ($r=0.999\ 8$)内与色谱峰峰面积呈现良好的线性关系, 加样回收率分别为98.97%、98.71%、98.20%、100.44%, RSD分别为1.54%、1.30%、0.76%、1.13%。结论 该分析方法快速准确、重现性好, 可为杜仲药材的质量控制与标准的完善提供可靠的检测依据。

关键词: 杜仲; 京尼平苷酸; 绿原酸; 京尼平苷; 松脂醇二葡萄糖苷; HPLC

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1547-03

Simultaneous determination of geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide, and pinoresinol diglucoside in *Eucommia ulmoides* by HPLC

LIU Hui^{1,2}, ZHANG Sheng^{2,3}, LIU Zhong-hua^{2,3}

1. Public Health College, Changsha Medical University, Changsha 410219, China

2. National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China

3. Department of Botanical Resources Engineering, College of Horticulture & Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; geniposidic acid; chlorogenic acid; geniposide; pinoresinol diglucoside; HPLC

杜仲*Eucommia ulmoides* Oliv.又称思仲、丝绵树, 是我国名贵中药, 被列为国家二类重点保护树种。杜仲具有调节血压血脂、降低血糖、补肝肾益肾、抗毒抑菌等药理作用^[1-2]。杜仲的主要化学成分有木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、黄酮类、多糖、氨基酸等有机化合物, 其中京尼平苷酸和京尼平苷属环烯醚萜类化合物, 是由植物中臭蚁二醛衍生而来的一大类天然产物, 具有保肝利胆、抗肿瘤、降低血压的功效; 松脂醇二葡萄糖苷属木脂素类化合物, 是一类在生物体内由双

分子苯丙素生物聚合而成的化合物, 具有降血压的功效, 且降压作用持续、平稳、无不良反应; 绿原酸属苯丙素类化合物, 是形成木脂素的先导化合物, 抑菌活性强^[3-5]。

国内外学者对杜仲药材活性成分分析检测研究报道较多^[6-9], 但是大部分文献根据《中国药典》2010年规定, 偏重于测定杜仲叶中绿原酸或杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷量^[10-11]。现代植物化学研究表明不同活性成分在杜仲叶、皮分布差异较大, 为更好地评价与开发我国杜仲药材资源, 使其天然活性成分

收稿日期: 2011-12-11

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD10B00)

作者简介: 刘 慧(1984—), 女, 硕士研究生, 湖南长沙医学院公共卫生系营养食品与卫生毒理学教研室, 助教, 研究方向为食品营养与卫生学。Tel: 13755072501 E-mail: liu-hui1022@163.com

*通讯作者 张 盛 E-mail: jason081124@hotmail.com

刘仲华 E-mail: larkin-liu@163.com

在药品、健康制品应用领域得到充分的发挥和利用。本实验以杜仲皮为研究对象,建立 HPLC 法同时测定杜仲皮中木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类三大类化合物京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷 4 种主要组分,为有效控制杜仲药材的质量提供准确、迅速的检测方法,并为后续产业化标准建立提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(岛津 LC-10ATVP), LC solution 色谱数据工作站; 4504MP 电子天平(万分之一); 超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司, KQ3200B 型,功率为 150 W); 纯水机(ThermoFisher 公司, Diamond TII 型)。

1.2 材料

京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷对照品购于北京北化恒信生物技术有限公司(质量分数均 $\geq 98\%$); 乙腈为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司),其余试剂均为分析纯(天津科密欧化学试剂有限公司),水为超纯水; 不同产地样品购于江西樟树药材市场,经湖南农业大学生物技术学院朱卫平副教授鉴定为杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 60 °C 烘干、粉碎过 20 目筛备用。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

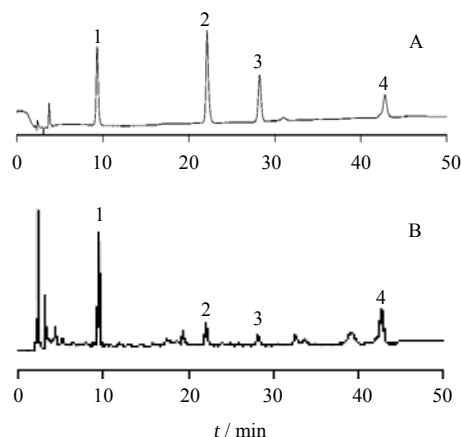
精密称取京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷对照品置棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得到京尼平苷酸 0.041 mg/mL、京尼平苷 0.037 mg/mL、绿原酸 0.048 mg/mL、松脂醇二葡萄糖苷 0.036 mg/mL 混合对照品溶液, 4 °C 保存备用。

2.2 供试品溶液的制备

准确称取杜仲皮药粉 1.0 g 置 50 mL 锥形瓶中,加入 25 mL 60% 甲醇超声提取 40 min,冷却定容至 50 mL,摇匀过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 柱温 30 °C; 进样量 5 μ L; 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱, 0~7 min, 7% A; 7~35 min, 14% A; 35~45 min, 15% A。体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 235 nm,此色谱条件下对照品与供试品分析图谱见图 1。



1-京尼平苷酸 2-绿原酸 3-京尼平苷 4-松脂醇二葡萄糖苷
1-geniposidic acid 2-geniposide 3-chlorogenic acid
4-pinoresinol diglucoside

图1 混合对照品(A)和供试品(B)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

2.4 线性关系考察

分别精密吸取对照品混合溶液 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 μ L,按照“2.3”项色谱条件进行分析,测定峰面积。以各对照品进样质量(μ g)为横坐标(X),其峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得到京尼平苷酸的回归方程为 $Y=52\,270X+5\,037$, $r=0.999\,9$,线性范围 0.102 5~0.512 5 μ g; 京尼平苷的回归方程为 $Y=44\,531X+3\,329.4$, $r=0.999\,9$,线性范围 0.092 5~0.462 5 μ g; 绿原酸的回归方程为 $Y=76\,580X+7\,788.8$, $r=0.999\,6$,线性范围 0.120 0~0.600 0 μ g; 松脂醇二葡萄糖苷的回归方程为 $Y=27\,193X+9\,373.7$, $r=0.999\,8$,线性范围 0.090 0~0.450 0 μ g。

2.5 精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液 5 μ L,连续进样 6 次,记录京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷峰面积, RSD 分别为 1.70%、1.13%、1.95%、1.67%。

2.6 重复性试验

精密称取同一批次杜仲皮样品 5 份,每份 1.0 g,依“2.2”项制备得供试品溶液,测定京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷的峰面积,计算质量分数, RSD 分别为 1.17%、1.45%、2.04%、1.54%。

2.7 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 5 μ L,分别于 0、2、4、8、12 h 进样,测定京尼平苷酸、京尼平苷、绿

原酸、松脂醇二葡萄糖苷的峰面积,其 RSD 分别为 1.51%、1.85%、1.31%、1.30%,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取 1.0 g 已测定的杜仲皮药粉 3 份,置于 3 个 50 mL 锥形烧瓶中,分别加入混合对照品溶液 1、2、3 mL,按“2.2”项制备供试品溶液,测定,计算加样回收率。京尼平苷、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸的加样回收率分别为 98.97%、98.71%、100.44%、98.20%,RSD 分别为 1.54%、1.30%、1.13%、0.76%。

2.9 样品测定

取 7 批不同产地杜仲皮样品,依“2.2”项制备得供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下对京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷进行分析,测定结果见表 1。

表 1 不同产地样品测定结果

Table 1 Determination of samples from different habitats

产 地	京 尼 平 苷 / %	绿 原 酸 / %	京 尼 平 苷 酸 / %	松 脂 醇 二 葡 萄 糖 苷 / %
四川广元	0.138	0.145	0.080	0.246
江西樟树	0.345	0.062	0.084	0.354
湖北武汉	0.130	0.139	0.049	0.214
浙江磐安	0.281	0.127	0.084	0.281
湖南张家界	0.158	0.184	0.130	0.262
贵州遵义	0.070	0.095	0.053	0.225
甘肃永靖	0.235	0.126	0.069	0.295

3 讨论

本实验在流动相选择过程中发现纯水分离时色谱峰拖尾严重,影响分析准确性,加入酸性溶剂后峰形得以改善,通过添加甲酸与磷酸后对比,发现 0.1%磷酸可提高杜仲有效成分的保留,因此确定 0.1%磷酸作为水相的添加剂以改善色谱分离效果。

京尼平苷酸、京尼平苷在 240 nm,绿原酸在 235 nm 和 325 nm,松脂醇二葡萄糖苷在 227 nm 波长下有较强的紫外吸收,低于 230 nm 波长时,京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸吸收峰小,分析准确

性较差,但松脂醇二葡萄糖苷在波长大于 240 nm 后基本无吸收峰,本实验选择 235 nm 的紫外条件下,稳定快,干扰小,为同时检测这 4 种物质的最佳波长。

本实验建立 HPLC 法同时检测杜仲皮中的京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷,并对不同产地来源的杜仲皮进行了分析,发现不同产地药材有效成分差异较大,受产地、采收季节等多因素影响^[12],本方法的建立可作为杜仲药材质量控制标准的有效补充。

参考文献

- [1] 赵玉英,成 军. 杜仲化学成分研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(3): 46-48.
- [2] 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.
- [3] 尉 芹,马希汉,张康健. 杜仲化学成分研究 [J]. 西北林学院学报, 1995, 10(4): 88-93.
- [4] 封锁民. 杜仲化学成分研究及两种新药制剂学研究 [D]. 西安: 西北大学, 2007.
- [5] 彭密军. 杜仲中高纯活性成分的分离制备新工艺研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2004.
- [6] 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.
- [7] Wang J L, Liu E W, Wu S, et al. Development of HPLC method to evaluate drug-processing technique of *Eucommiae Cortex* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 221-225.
- [8] 董娟娥,马希汉. 反相高效液相色谱法同时分离测定杜仲雄花及其产品中的京尼平苷酸和绿原酸 [J]. 色谱, 2007, 25(2): 217-220.
- [9] 赵骏铭,张紫佳,孙庆龙,等. 超高效液相色谱法测定杜仲中松脂醇二葡萄糖苷 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1896-1898.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [11] 王丽楠,杨美华. HPLC 法测定不同生长年限杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 651-653.
- [12] 张靛灵,马亚团,赵德义,等. 杜仲叶次生代谢物季节和地域差异性研究 [J]. 林产化学与工业, 2009, 29(5): 104-108.