

杜仲板皮和枝皮中 4 种有效成分差异性比较

杨林军^{1,2}, 黄文平², 吴永忠³, 欧阳辉^{1,2}, 吴柳瑾², 李艳¹, 杨世林^{1,2}, 冯育林^{1,2*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

3. 江西普正制药有限公司, 江西 吉安 331409

摘要: 目的 采用 RP-HPLC 法测定杜仲板皮和枝皮中桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷的量。方法 采用 Cosmosil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液进行梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 检测波长 208 nm, 柱温 25 °C。结果 杜仲板皮中桃叶珊瑚苷、松脂醇二葡萄糖苷量大于枝皮, 枝皮绿原酸、京尼平苷量大于板皮; 在不同产地来源上, 杜仲板皮和枝皮中桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷平均质量分数有一定差异性。结论 该方法简便、快速、准确可靠, 为更全面合理科学地对杜仲药材质量的评价提供了技术支持。

关键词: 杜仲; 桃叶珊瑚苷; 绿原酸; 京尼平苷; 松脂醇二葡萄糖苷

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)04-0584-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.024

Comparison on contents of four active constituents between slab and branch barks of *Eucommia ulmoides*

YANG Lin-jun^{1,2}, HUANG Wen-ping², WU Yong-zhong³, OU YANG Hui^{1,2}, WU Liu-jin², LI Yan¹,
YANG Shi-lin^{1,2}, FENG Yu-lin^{1,2}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. National Engineering Center of Solid Preparation of Chinese Materia Medica Manufacturing Technology, Nanchang 330006, China

3. Jiangxi Puzheng Pharmaceutical Co., Ltd., Ji'an 331409, China

Abstract: Objective To determine the contents of aucubin, chlorogenic acid, geniposide, and pinoresinol diglucoside in the slab and branch barks of *Eucommia ulmoides*. **Methods** The separation was performed on a Cosmosil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with the gradient elution acetonitrile-0.1% phosphoric acid; The flow rate was 0.8 mL/min; The detection wavelength was 208 nm; The column temperature was at 25 °C. **Results** The average content of aucubin: slab bark > branch bark; The average content of chlorogenic acid: branch bark > slab bark; The average content of geniposide: branch bark > slab bark; The average content of pinoresinol diglucoside: slab bark > branch bark. In different origins, the average contents of the above four constituents are more certain differences. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, and there are significant differences in the contents of aucubin, chlorogenic acid, geniposide, and pinoresinol diglucoside from the different parts of *E. ulmoides*, which would provide the better technique support for the quality control of *E. ulmoides*.

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

杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 别名思仲、丝连木。《神农本草经》将杜仲列为上品, 具有补中益精气、强筋骨、

强志、安胎、久服轻身耐老之功效。主要用于治疗肾虚腰痛、筋骨无力、妊娠漏血、胎动不安、高血压症。杜仲的主要化学成分有木脂素类、环烯醚萜

收稿日期: 2015-01-02

基金项目: 江西省青年科学家培养对象项目 (20142BCB23022); 江西创新药物与高效节能降耗制药设备协同创新中心项目 (赣教高字 [2012]89 号)

作者简介: 杨林军, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药活性成分研究。Tel: (0791)87119632 E-mail: yanglinjun89@yahoo.com

*通信作者 冯育林, 男, 教授, 研究方向为中药活性成分研究。Tel: (0791)87119632 E-mail: fengyulin2003@hotmail.com

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、桃叶珊瑚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^[1-3]。

国内外学者对杜仲药材活性成分分析检测研究报道较多^[4-7]，但是大部分文献根据《中国药典》2010 年版规定，偏重于测定杜仲叶中绿原酸^[8]或杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷量^[9-10]。现代植物化学研究表明不同活性成分在杜仲板皮、枝皮分布有一定的差异，为更好地评价杜仲药材资源，使其天然活性成分在药品、健康制品应用领域得到充分的发挥和利用，同时为杜仲相关产品在生产中质量控制指标的多样性，本实验以杜仲板皮和枝皮为研究对象，建立 HPLC 法同时测定杜仲皮中环烯醚萜类、苯丙素类、木脂素类化合物中桃叶珊瑚苷、京尼平苷、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷 4 种主要成分，为有效控制杜仲药材的质量提供准确、迅速的检测方法，并为后续产品开发研究提供可靠的依据。

1 材料

安捷伦 LC-1260 高效液相色谱仪，AUW220D 型电子天平（十万分之一，日本岛津公司）；BS224S 型电子天平（万分之一，Sartorius 公司）；KQ250DB 型数控超声波清洗器（巩义市予华仪器有限责任公司）；KQ5200 型水浴锅（昆山市超声仪器有限公司）。

桃叶珊瑚苷（批号 T06-20131022）、绿原酸（批号 L11-20130502）、京尼平苷（批号 J04-20130113）、松脂醇二葡萄糖苷（批号 S21-20130811）对照品均由中国食品药品检定研究院提供。乙腈、甲醇为色谱纯；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。

杜仲样品采自 10 个不同产地（表 1），经南昌市食品药品检验所吴蓓主管药师鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 植物枝皮和板皮，干燥、粉碎，过三号筛备用。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取本品 0.3 g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入 25 mL 甲醇，称质量，超声处理 30 min，用甲醇

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	产地	编号	产地
1	陕西安康汉阴	6	江西吉安峡江
2	陕西汉中勉县	7	江西九江修水
3	湖南张家界慈利双云村	8	湖北襄阳
4	湖北恩施来凤	9	江西吉水八都
5	四川旺苍	10	江西井冈山

补足减失质量，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得。

2.2 对照品溶液的制备

分别取桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷对照品适量，精密称定，加甲醇分别制成各含 0.321、0.052、0.072、0.084 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

Cosmosil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；波长 208 nm；体积流量 0.8 mL/min；柱温 25 ℃；流动相为乙腈（A）-0.1%磷酸水溶液（B），梯度洗脱，0~40 min，6%~16% A；40~75 min，16%~30% A，此色谱条件下桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷和其他相关峰均能达到基线分离，对照品与供试品分析图谱见图 1。

2.4 线性关系考察

取 0.321 mg/mL 桃叶珊瑚苷、0.052 mg/mL 的绿原酸、0.072 mg/mL 京尼平苷以及 0.084 mg/mL

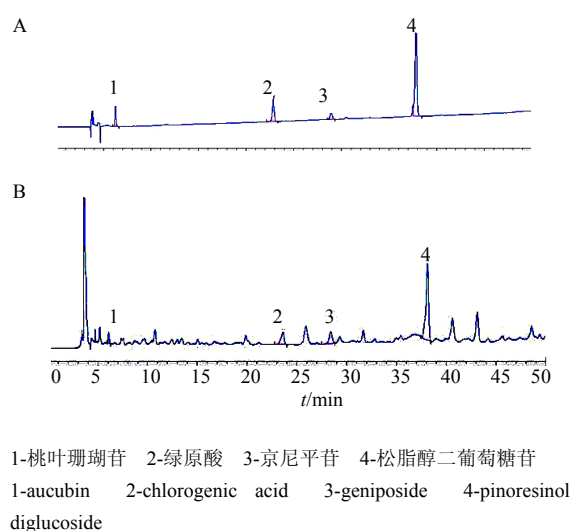


图 1 混合对照品 (A) 和供试品溶液 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and test solution (B)

的松脂醇二葡萄糖苷对照品, 分别加甲醇稀释, 作为不同系列对照品溶液, 按上述色谱条件测定对照品峰面积, 分别以对照品量 (μg) 为横坐标 (X),

峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线并进行回归计算, 得各对照品的标准曲线回归方程及线性范围(表 2), 表明各化合物在相应范围内线性关系良好。

表 2 桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷线性关系

Table 2 Linear relationship of aucubin, chlorogenic acid, geniposide, and pinoresinol diglucoside

成分	线性方程	r	线性范围/ μg
桃叶珊瑚苷	$Y=290.79 X-4.373\ 8$	0.999	0.066 0~1.320 0
绿原酸	$Y=1\ 090.3 X-14.66$	0.998	0.015 6~0.520 0
京尼平苷	$Y=664.4 X+0.763\ 7$	0.999	0.014 4~0.720 0
松脂醇二葡萄糖苷	$Y=2\ 410.6 X-105.62$	0.998	0.042 0~1.260 0

2.5 精密度试验

取混合对照品, 连续进样 6 次, 按照“2.3”项下条件规定进行测定, 计算桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD。结果表明, 桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD 分别为 2.39%、1.42%、1.32%、2.05%, 显示仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

按“2.1”项下制备方法制备供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、24 h 后进样, 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 计算桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD。结果表明, 桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.29%、1.38%、1.26%、1.17%, 表明供试品溶液中桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷在 24 h 内较稳定。

2.7 重复性试验

取同一批次样品(陕西汉中勉县)6 份, 按“2.1”项下方法, 制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 计算桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷

和松脂醇二葡萄糖苷的质量分数。结果桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷质量分数的 RSD 分别为 1.10%、1.64%、1.90%、1.86%, 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测定的杜仲(陕西汉中勉县)6 份, 分别置 25 mL 量瓶中, 按 80%、100%、120% 的量各加入桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷对照品, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 计算加样回收率, 桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷平均加样回收率分别为 100.88% (RSD 为 1.03%)、99.98% (RSD 为 1.53%)、100.62% (RSD 为 1.75%)、100.75% (RSD 为 0.62%)。

2.9 样品的测定结果

取不同产地不同部位的杜仲样品, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件对桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷进行分析, 根据线性方程计算质量分数, 测定结果见表 3。

表 3 杜仲 4 种成分的测定结果

Table 3 Determination of four constituents in *E. ulmoides*

编号	桃叶珊瑚苷/%		绿原酸/%		京尼平苷/%		松脂醇二葡萄糖苷/%	
	枝皮	板皮	枝皮	板皮	枝皮	板皮	枝皮	板皮
1	0.147 8	0.169 0	未检出	0.064	0.062 9	0.282 4	0.606 7	0.660 3
2	0.205 9	0.054 1	0.082 2	未检出	未检出	0.037 7	0.486 9	0.475 6
3	0.151 8	0.079 8	未检出	0.141 0	未检出	0.029 4	0.111 9	0.241 8
4	0.169 7	0.806 1	0.256 7	0.246 7	0.260 9	0.035 6	0.793 3	0.945 2
5	0.087 1	0.131 6	0.101 6	0.048 0	0.057 9	0.241 1	0.596 8	0.418 7
6	0.121 4	0.110 4	0.213 4	0.172 3	0.095 0	0.086 2	0.433 4	0.595 3
7	0.166 2	0.204 8	未检出	未检出	未检出	未检出	0.530 2	0.216 0
8	0.366 7	0.099 5	未检出	未检出	0.105 0	未检出	0.288 3	0.158 1
9	0.234 0	0.306 8	0.136 8	0.044 0	0.013 9	0.024 0	0.591 2	0.451 3
10	—	0.362 1	0.063 9	0.041 4	未检出	0.362 8	0.539 2	0.575 9

由表3可见,江西九江修水(7号样品)和湖北襄阳(8号样品)的板皮和枝皮中均未测出绿原酸,陕西安康汉阴(1号样品)和湖南张家界慈利双云村(3号样品)的枝皮中未测出绿原酸,陕西汉中勉县(2号样品)的板皮中未测出绿原酸,药材供试品溶液的配制过程相同,可能和植物产地有关。另外其他产地中的板皮和枝皮中均测出有绿原酸,但枝皮中质量分数大于板皮。根据现有研究表明,绿原酸主要存在于植物的叶、花、茎和果实等鲜嫩部位;《中国药典》2010年版中以杜仲药材中松脂醇二葡萄糖苷为指标性成分,质量分数不得低于0.1%。由表3可见,10个产地的杜仲药材中板皮和枝皮的松脂醇二葡萄糖苷质量分数均达到药典标准,板皮中的量大于枝皮,这与植物生长不同部位成分的积累差异有关;环烯醚萜类化合物广泛分布于植物的各个部位且结构不稳定,由表3可见,桃叶珊瑚苷平均质量分数板皮稍大于枝皮,而京尼平苷的平均质量分数则为枝皮稍大于板皮。因此,在未来开发降压药物的时候可以提供更多药材部位的选择。

3 讨论

本实验在流动相选择过程中发现纯水分离对色谱峰有拖尾现象,加入酸性溶剂后得以改善,通过添加不同体积分数甲酸与磷酸后进行对比,发现加入0.1%磷酸的流动相系统中色谱峰分离效果较佳;在波长的选择中,根据4种对照品吸收波长差异,综合考虑后选择208 nm为同时检测这4种成分的最佳波长。

桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷为杜仲药材的主要有效成分,根据现有文献,

大部分研究者主要考察杜仲药材的单一成分或者2个成分,同时考察主要是杜仲的叶,对板皮和枝皮研究较少,本实验采用RP-HPLC方法同时考察杜仲板皮和枝皮中4种主要有效成分,各成分峰形良好,分离度高,重复性好,为后续杜仲药材质量标准的建立提供参考价值。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 吕沅珊,李棣华,刘俊红.HPLC-ELSD法测定杜仲中绿原酸和鹅掌楸苷[J].现代药物与临床,2013,28(3):344-346.
- [9] 中国药典[S].一部.2010.
- [10] 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.