

# 杜仲叶及其提取物中绿原酸的反相高效液相色谱法测定

谢敏<sup>1</sup>, 代雪平<sup>2</sup>, 司新花<sup>3</sup>, 许平辉<sup>1</sup> (1. 中原制药厂研究所 郑州市医药科技开发中心, 河南 郑州 450066; 2. 河南省药品检验所中药室; 3. 西安市第二人民医院药剂科)

**摘要:**目的 测定杜仲叶及其提取物中绿原酸的含量。方法 反相高效液相色谱法。色谱条件: Elite Hypersil C<sub>18</sub>柱, 以甲醇-0.5%醋酸(12:88)为流动相, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积 20 μL, 检测波长 327 nm, 柱温 35 °C。结果 绿原酸对照品在 0.64 μg ~ 20.5 μg 范围内线性关系良好 ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率为 99.86%。结论 本方法快速、准确, 重现性好, 可用于杜仲叶及其提取物的质量控制。

**关键词:** 反相高效液相色谱法; 杜仲叶; 杜仲叶提取物; 绿原酸

中图分类号: R931.5; R917.70.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2004)06-0483-03

## Determination of chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* leaves and its extract by RP-HPLC

XIE Min<sup>1</sup>, DAI Xue-ping<sup>2</sup>, SI Xin-hua<sup>3</sup>, XU Ping-hui<sup>1</sup> (1. Research Institute of Zhongyuan Pharmaceutical Factory Developing Center of Medical Science and Technology for Zhengzhou, Zhengzhou 450066, China; 2. Traditional Chinese Medicine Laboratory of Henan Provincial Institute for Drug Control; 3. The Second People's Hospital for Xi'an City)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To determine the content of chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves and its extract.

**METHOD** RP-HPLC was used. Chromatographic conditions: Elite Hypersil C<sub>18</sub> column, methanol-0.5% acetic acid(12:88) worked

作者简介: 谢敏(1965)女, 高级工程师, 执业药师, 主要从事新药研制和药物分析工作。TEL: (0371) 7981166-2191; (0371) 5223833

as mobile phase, flow rate was  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , injection volume was  $20 \mu\text{L}$ , detecting wavelength was at  $327 \text{ nm}$ , column temperature was  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of  $0.64 \mu\text{g} \sim 20.5 \mu\text{g}$  ( $r = 0.9999$ ), the average recovery was  $99.86\%$ . **CONCLUSION** This method is quick and accurate with good repeatability and can be used for the quality control of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves and its extract.

**KEY WORDS:** RP-HPLC; *Eucommia ulmoides* Oliv; extract of *Eucommia ulmoides* Oliv leaves; chlorogenic acid

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是中国传统的滋补药材,以皮入药,但因生长缓慢,且皮剥树死。近年来,研究证实杜仲叶与皮具有同样的化学成分和药理作用<sup>[1,2]</sup>,具有同等功效,可以以叶代皮。以杜仲叶为基础原料开发的“杜仲胶囊”和“杜仲平压片”已收载于卫生部药品标准<sup>[3,4]</sup>。绿原酸是杜仲主要成分之一,具有补中益气、镇痛强志、安胎轻身等功效,具有良好的降压作用。绿原酸分析方法有薄层-分光光度法<sup>[2]</sup>,纸层-紫外分光光度法<sup>[5,6]</sup>等,本实验采用反相高效液相色谱法测定杜仲叶及其提取物中绿原酸的含量。该方法简便易行,重现性好,准确度高,可以用于杜仲叶及其提取物的质量控制。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 试剂与样品

超纯水(Millipore 公司超纯水器自制),甲醇(色谱纯),醋酸(分析纯),绿原酸对照品(中国药品生物制品鉴定所)。杜仲叶购于郑州市药材公司,提取物由本所制备。

### 1.2 仪器

岛津 LC-10Avp 泵,SPD-10Avp 紫外检测器,7725i 手动进样器,大连 Elite Hypersil  $\text{C}_{18}$ ( $4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm} \ 5 \mu$ ) 色谱柱,浙江大学 N2000 双通道色谱工作站。

### 1.3 色谱条件

流动相:甲醇-0.5%醋酸(12:88),流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样体积  $20 \mu\text{L}$ ,检测波长  $327 \text{ nm}$ ,柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。对照品及杜仲叶提取物样品的色谱图见图 1。

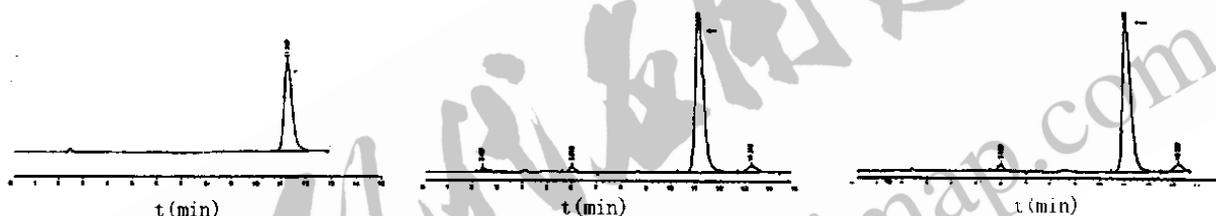


图 1 绿原酸对照品及样品色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance samples

a. 对照品色谱图;b. 提取物样品色谱图;c. 杜仲叶样品色谱图;l. 绿原酸

a. chlorogenic acid; b. extrale from leave of *Eucommia ulmoides* Oliv.; c. leave of *Eucommia ulmoides* Oliv.

### 1.4 样品的制备

**1.4.1 对照品贮备溶液的制备** 取绿原酸对照品约  $0.02 \text{ g}$ ,精密称定,用  $50\%$  甲醇溶解,配制成含  $1.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液,用  $\text{FA} 0.45 \mu\text{m}$  滤膜过滤,即得。

**1.4.2 杜仲叶的供试液制备** 精密称取杜仲叶约  $5 \text{ g}$ ,精密称定,置索氏提取器中,加乙醇回流  $20 \text{ h}$ ,回收乙醇至干。用  $50\%$  甲醇转溶于  $10 \text{ mL}$  量瓶中,定容至刻度即得。

**1.4.3 杜仲叶提取物的供试液制备** 取供试品约  $0.1 \text{ g}$ ,精密称定,用  $50\%$  甲醇溶解,定容至  $50.00 \text{ mL}$  即得。

## 2 结果

### 2.1 线性关系

将绿原酸配成  $0.032, 0.064, 0.128, 0.256, 0.512$  和  $1.025 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标样,按“1.3”色谱条件进样  $20 \mu\text{L}$ ,峰面积测量得  $446\ 424.135, 894\ 118.48, 1\ 788\ 241.954, 3\ 777\ 488.909, 7\ 118\ 089.288$  和  $14\ 404\ 970.64$ 。绿原酸在  $0.64 \sim 20.5 \mu\text{g}$  内进样量与峰面积呈良好的线性关系,线性方程为: $y = 701017.26x + 23063.31$ ,  $r = 0.9999$ ,  $x$  的进样量单位为  $\mu\text{g}$ ,  $Y$  为峰面积。

### 2.2 精密度测定

**2.2.1 对照品测量的精密度** 取绿原酸对照品按“1.3”色谱条件重复进样 5 次,进样量  $20 \mu\text{L}$ ,以其峰面积积分值测量精密度,结果为  $2\ 037\ 268.062, 2\ 040\ 263.625, 2\ 039\ 971.125, 2\ 029\ 398.875, 2\ 042\ 858.25$ ,  $\text{RSD} = 0.25\%$ 。

**2.2.2 样品测量的精密度** 取杜仲叶供试样品按“1.3”色谱条件重复进样 5 次,以其峰面积积分值测量精密度,结果为: $6\ 870\ 588, 6\ 863\ 707, 6\ 894\ 881, 6\ 884\ 788.625$  和  $6\ 873\ 528.125$ ,  $\text{RSD} = 0.18\%$ 。

取杜仲叶提取物供试样品按“1.3”色谱条件重复进样 5 次,以其峰面积积分值测量精密度,结果为: $595\ 608, 600\ 445, 598\ 835, 597\ 524$  和  $600\ 127$ ,  $\text{RSD} = 0.33\%$ 。

**2.2.3 样品测量的稳定性** 取杜仲叶供试样品按“1.3”色谱条件于放置 2, 4, 8 h 后,进样,测得峰面积积分分别为: $6\ 874\ 214, 6\ 859\ 318, 6\ 838\ 335$ ,  $\text{RSD} = 0.26\%$ 。

取杜仲叶提取物供试样品按 1.3 色谱条件于放置 2, 4, 8 h 后,进样,测得峰面积积分分别为: $690\ 124, 689\ 956$  和  $687\ 745$ ,  $\text{RSD} = 0.19\%$ 。

### 2.3 回收率测定

取已知绿原酸含量的杜仲叶提取物约  $0.02 \text{ g}$ ,精密称定,

精密加入浓度为  $0.6038 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的绿原酸对照品 50% 甲醇溶液 1 mL, 按“1.3”色谱条件测定加样样品中总绿原酸含量, 计算回收率, 结果见表 1。

### 2.3 空白试验

取处方中药材(不含芍药), 依法制成阴性对照品, 按前法分别测定, 结果未检出芍药苷吸收峰, 故可确定处方中其它药材成分对芍药苷的含量测定无干扰, 见图 4。

表 1 绿原酸加样回收率实验 ( $n=5$ )

Tab 1 The added recovery test of chlorogenic acid ( $n=5$ )

样品编号	添加标量 (mg)	测定总量 (%)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.6038	1.3804	99.7		
2	0.6038	1.4043	99.6		
3	0.6038	1.4484	100.7	99.86	1.13
4	0.6038	1.4240	101.1		
5	0.6038	1.4206	98.2		

### 2.4 样品测定

用上述方法测定了 3 批杜仲叶及其对应的提取物中绿原酸含量, 杜仲叶: 021002 为 0.91%, 021018 为 1.08%, 021101 为 1.11%, 均值为 1.03%; 杜仲叶提取物: 021002 为 5.64%, 021018 为 5.01%, 021101 为 5.78%, 均值 5.48%。

## 3 讨论

3.1 样品放置 2, 4, 8h 后, 进样, 测得的 RSD 为 0.26%, 表

明在测定时间范围内测定结果稳定可靠。

3.2 本实验用高效液相色谱法测定了杜仲叶及其提取物中绿原酸的含量, 提取物中绿原酸的含量约为叶子的 5 倍。建立的方法适合于杜仲叶及其提取物中绿原酸的测定, 该方法简便、准确、可靠, 为杜仲叶及制剂的质量控制提供一定的依据。

## 参考文献

- [1] 藏友维. 杜仲化学成分研究进展[J]. 中草药, 1989, 20(4): 42.
- [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.
- [3] 卫生部药品标准(中药成方制剂)[S]第 5 册. 1992, 191.
- [4] 卫生部药品标准(中药成方制剂)[S]第 11 册. 1996, 81.
- [5] 孟芹, 马克坚, 范兵. 纸层-紫外分光光度法测杜仲中绿原酸的含量[J]. 云南中医学院学报, 1994, 17(4): 21.
- [6] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1998, 2345.
- [7] 赵永成. 高效液相色谱法测定杜仲叶中绿原酸[J]. 色谱, 2000, 18(3): 46.
- [8] 杨玉琴, 张丽艳, 刘毅. 反相 HPLC 法测定杜仲皮、枝、叶及含杜仲中成药的绿原酸的含量[J]. 贵阳中医学院学报, 1995, 17(3): 46.