

## RP-HPLC 测定杜仲叶活性成分的含量

李万红<sup>1</sup>, 徐靖宏<sup>2\*</sup>, 陈虹<sup>2</sup>, 林军<sup>2</sup> (1. 浙江省立同德医院, 杭州 310012; 2. 浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310003)

**摘要:**目的 建立同时测定杜仲叶中活性成分绿原酸、京尼平苷含量的反相高效液相色谱法。方法 采用 YMC-pack ODS-A 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水-冰醋酸(20:80:1.5)为流动相, 检测波长 237 nm, 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。结果 绿原酸在 0.041 6~0.624 0 μg 内, 有较好的线性关系( $r=0.999\ 2$ ), 绿原酸的加样回收率为 102.92%, RSD 为 1.49%; 京尼平苷在 0.081 6~1.224 0 μg 内, 有较好的线性关系( $r=0.998\ 9$ ), 京尼平苷的加样回收率为 102.35%, RSD 为 1.20%。杜仲叶中绿原酸含量为 2.801 mg · g<sup>-1</sup>、京尼平苷含量为 0.273 mg · g<sup>-1</sup>。结论 所建立的方法简便、准确、可靠, 可作为杜仲叶的质量控制方法。

**关键词:**反相高效液相色谱法; 杜仲叶; 含量测定; 绿原酸; 京尼平苷

中图分类号: R917.101; R284.1

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2009)02-0140-03

### Determination of Active Constituents in Folium Eucommiae by RP-HPLC

LI Wanhong<sup>1</sup>, XU Jinghong<sup>2\*</sup>, CHEN Hong<sup>2</sup>, LIN Jun<sup>2</sup> (1. Zhejiang Tongde Hospital, Hangzhou 310012, China; 2. The First Affiliated Hospital of Medicine College of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a new reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the determination of chlorogenic acid and geniposide, the active constituents in folium eucommiae simultaneously. **METHODS** YMC-pack ODS-A column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used and the mobile phase was methanol-water-acetic acid (20:80:1.5) at the flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 237 nm and the temperature of column was 30 ℃. **RESULTS** The linear range of chlorogenic acid and geniposide were 0.041 6~0.624 0 μg ( $r=0.999\ 2$ ) and 0.081 6~1.224 0 μg ( $r=0.998\ 9$ ). The average recoveries were 102.92% and 102.35%, respectively. The RSD were 1.49% and 1.20%. The content of chlorogenic acid and geniposide in folium eucommiae were 2.801 mg · g<sup>-1</sup> and 0.273 mg · g<sup>-1</sup>. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reliability, with good repeatability, and can be used for the quality control of folium eucommiae.

**KEY WORDS:** RP-HPLC; folium eucommiae; content determination; chlorogenic acid; geniposide

杜仲具有补肝肾、强筋骨等作用, 为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.) 的干燥树皮, 是我国特有的名贵中药, 中国药典规定其树皮作为中药杜仲入药。杜仲是国家二级珍惜树皮, 杜仲皮一般需生长 15~20 年, 而叶的资源相对丰富易得, 现代医学研究证实杜仲叶与皮的化学成分基本一致, 具有同等功效, 可以以叶代皮<sup>[1-2]</sup>。研究还发现杜仲叶的化学成分主要有绿原酸、京尼平苷等<sup>[3-4]</sup>。本研究建立了杜仲叶中绿原酸、京尼平苷的含量测定方法, 并对 3 批样品进行了含量测定<sup>[5-7]</sup>, 有效控制杜仲叶的内在质量, 为深层次开发利用杜仲叶提供质量控制方法。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

高效液相色谱仪(美国 Varian 公司, 包括 Prostar230 泵、Prostar410 自动进样器、Prostar330 二极管阵列检测器)、TC-15 套式恒温器(浙江新华医疗器械厂)、BP 211D 十万分之一电子天平(塞多利斯)、W-2001B 旋转蒸发器(上海申胜生物技术有限公司)、SHB-水浴锅(郑州长城科工贸有限公司)、PB201 pH 酸度计(HANNA)、隔膜过滤器、KQ3200DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

#### 1.2 试剂

甲醇(色谱纯)、冰醋酸(分析纯)、超纯水(自制)、绿原酸标准品(中国药品生物制品检定所, 批号 200212)、京尼平苷标准品(日本和光纯药工业株式会社产品)。

杜仲叶由华东医药股份有限公司中药材分公司提

基金项目: 浙江省中医药管理局资助项目(2005C064)

作者简介: 李万红, 女, 硕士, 副主任医师 Tel: 13858071728  
Tel: 13758229331 E-mail: junlin2@126.com

E-mail: yangdx@zju.edu.cn

\* 通信作者: 徐靖宏, 男, 博士, 主任医师

供,并经浙江省中医药研究院浦锦宝副研究员鉴定。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: YMC-pack ODS-A 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-水-冰醋酸(20: 80: 1.5)为流动相, 检测波长 237 nm, 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量 5 μL。

### 2.2 对照品溶液制备及供试品溶液制备

#### 2.2.1 对照品溶液制备

精密称取绿原酸 2.6 mg、京尼平苷 5.1 mg, 分别置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 分别得到 0.104 mg · mL<sup>-1</sup> 的绿原酸和 0.204 mg · mL<sup>-1</sup> 的京尼平苷标准储备液, 保存于 4 ℃ 冰箱中, 待分析时可按需要稀释成不同的浓度。

精密吸取上述绿原酸和京尼平苷标准储备液各 2 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 得到含绿原酸 20.8 μg · mL<sup>-1</sup> 和京尼平苷 40.8 μg · mL<sup>-1</sup> 的对照品混合储备液; 精密吸取 5 μL 进样分析, 见图 1。

#### 2.2.2 供试品溶液的制备

准确称取杜仲叶粉末 1.0 g, 加入 50% 乙醇 10 mL 超声提取 30 min, 提取液与残渣洗涤液合并, 过滤, 用 50% 乙醇定容至 100 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 得待测液。

取待测液 5 μL 进样测定, 以标准曲线计算样品中绿原酸和京尼平苷的含量, 见图 1。

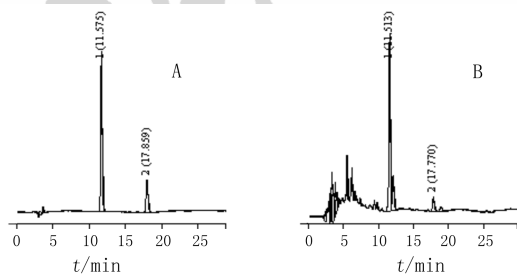


图 1 HPLC 色图谱

A-对照品; B-杜仲叶; 1-绿原酸; 2-京尼平苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standard; B-sample; 1-chlorogenic acid; 2-geniposide

### 2.3 系统适应性试验

柱子经充分平衡后, 精密吸取对照品溶液 5 μL, 进样, 记录色谱图, 理论板数以绿原酸计为 15 987, 以京尼平苷计为 19 314。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取对照品混合液 2, 4, 8, 12, 20, 30 μL, 按上述色谱条件注入液相色谱仪, 得绿原酸回归方程为:  $Y = 1.8282 \times 10^7 X - 1.6955 \times 10^5$ ,  $r =$

0.9992, 得京尼平苷回归方程为  $Y = 5.212 \times 10^6 X + 7.982 \times 10^4$ ,  $r = 0.9989$ 。表明绿原酸进样量在 0.0416 ~ 0.6240 μg 和京尼平苷进样量在 0.0816 ~ 1.2240 μg 内线性关系均良好。

### 2.5 仪器精密度试验

精密吸取对照品混合溶液 5 μL, 注入液相色谱仪, 连续 5 次, 测定峰面积, 结果绿原酸峰面积 RSD 为 0.71%, 京尼平苷峰面积 RSD 为 1.86%, 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

精密吸取对照品混合溶液 5 μL, 注入液相色谱仪, 分别在 0, 2, 4, 8, 16 h 时进样, 测定峰面积, 结果绿原酸的 RSD 为 1.47%, 京尼平苷的 RSD 为 0.86%, 表明样品在 16 h 内稳定。

### 2.7 重复性试验

准确称取杜仲叶粉末 1.0 g, 共 5 份, 按“2.2.2”项下方法处理, 精密吸取 5 μL 进样, 测定峰面积, 计算绿原酸和京尼平苷含量, 结果绿原酸含量 RSD 为 1.15%, 京尼平苷含量 RSD 为 1.47%, 表明该方法的重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取 6 份已知含量的杜仲叶粉末 0.5 g, 分别加入对照品混合储备液 1.0 mL (其中含绿原酸 1.248 mg, 含京尼平苷 0.102 mg), 按“2.2.2”项下方法处理, 过滤, 精密吸取 5 μL 进样, 测定含量, 计算加样回收率。

结果绿原酸和京尼平苷的加样回收率分别为 102.39% 和 102.35%, RSD 分别为 1.61% 和 1.17%。见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery test

| 组 分  | 加入量<br>/mg | 测得量<br>/mg | 回收率<br>/% | 平均回收<br>率/% | RSD/% |
|------|------------|------------|-----------|-------------|-------|
| 绿原酸  | 1.240      | 2.665      | 101.79    | 102.92      | 1.49  |
|      | 1.240      | 2.654      | 101.13    |             |       |
|      | 1.240      | 2.661      | 102.15    |             |       |
|      | 1.240      | 2.695      | 104.21    |             |       |
|      | 1.240      | 2.686      | 103.26    |             |       |
|      | 1.240      | 2.713      | 104.98    |             |       |
| 京尼平苷 | 0.102      | 0.240      | 102.68    | 102.35      | 1.20  |
|      | 0.102      | 0.241      | 103.92    |             |       |
|      | 0.102      | 0.238      | 101.51    |             |       |
|      | 0.102      | 0.238      | 100.72    |             |       |
|      | 0.102      | 0.241      | 103.39    |             |       |
|      | 0.102      | 0.240      | 101.88    |             |       |

2.9 样品中绿原酸与京尼平苷含量测定

准确称取杜仲叶适量,按“2.2.2”项下方法操作,精密吸取5 μL 进样,在上述色谱条件下测定峰面积,代入回归方程计算绿原酸、京尼平苷的含量。结果见表2。

表2 样品的含量测定结果( $n=3, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Tab 2 Determination results of samples( $n=3, \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

| 样品 | 绿原酸   | 京尼平苷    |
|----|-------|---------|
| 1  | 2.795 | 0.273 5 |
| 2  | 2.863 | 0.280 0 |
| 3  | 2.758 | 0.266 4 |
| 4  | 2.746 | 0.278   |
| 5  | 2.843 | 0.269   |
| 6  | 2.798 | 0.271   |

3 讨论

杜仲叶中绿原酸、京尼平苷溶于水、乙醇、氯仿等,采用70%乙醇提取不完全,而氯仿提取杂质较多,有干扰。用不同溶剂进行了比较,结果采用50%乙醇提取,提取率最高且可排除一些杂质干扰,获得较好的色谱分离效果。国内学者对杜仲化学成分提取进行了大量研究<sup>[8-9]</sup>。同时测定杜仲叶中绿原酸和京尼平苷的方法也有文献报道<sup>[5-6]</sup>,但整个测定工作需时较长,而在本实验所选定的色谱条件下,测定杜仲叶中绿原酸和京尼平苷时方法快速、简便,重复性、稳定性等指标也能达到测定要求。

REFERENCES

[1] ZHANG K J, WANG L, ZHANG F Y, et al. A comparison between active component contents in the bark and leaves of

*Eucommia ulmoides*[J]. Northwest Forest Univ J(西北林学院学报), 1996, 11(2): 42-46.

[2] ZHANG K J, DONG J E, MA B L, et al. Studies on the distribution differences of the secondary metabolites in *Eucommia ulmoides*[J]. Sci Sil Sin(林业科学), 2002, 38(6): 12-16.

[3] TAKAMURA C, HIRATA T, YAMAGUCHI Y, et al. Studies on the chemical constituents of green leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. J Nat Med, 2007, 61 (2): 220-221.

[4] XIN X M, FENG L, WANG H, et al. Study advancement about chemical composition and pharmacological actions of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Med Recapitulate(医学综述), 2007, 13 (19): 1507-1509.

[5] QI X Y, CHEN W J, ZHANG S H. A RP-HPLC method for the determination of geniposide, geniposidic acid and chlorogenic acid in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2000, 20(1): 22-24.

[6] WANG S C, HE L C, GAO J M, et al. A RP-HPLC method for simultaneous determination of 3 active component contents in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2002, 16(1): 15-16.

[7] DONG J E, MA XH. Determination of geniposidic acid and chlorogenic acid in male flowers and related products of *Eucommia ulmoides* by reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2007, 25(2): 217-220.

[8] XIA X L, CHEN Y. Comparative study on extracting of the active components of folium *Eucommiae* by the methods of alcohol extracting-water precipitating and water extracting-alcohol precipitating[J]. J Hubei Univ:Nat Sci Ed(湖北大学学报:自然科学版), 2003, 25(3): 267-270.

[9] XIA X L, CHEN Y. Study on extracting process of water-soluble active components of folium *Eucommiae* [J]. J Hubei Polytech Univ(湖北工学院学报), 2003, 18(3): 65-67.