

HPLC法同时测定杜仲叶中8种成分的含量^Δ

张留记^{1,2*},李 宁¹,屠万倩²,李向阳³,王昌华⁴,邵战波⁴(1.河南中医药大学药学院,郑州 450008;2.河南省中医药研究院,郑州 450003;3.河南省食品药品检验所,郑州 450018;4.灵宝德汇生态科技有限公司,河南灵宝 472500)

中图分类号 R282;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)24-3383-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.24.12

摘要 目的:建立同时测定杜仲叶中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷等8种成分的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为203 nm(桃叶珊瑚苷、儿茶素)、239 nm(京尼平苷酸、车叶草苷)、220 nm(绿原酸)、354 nm(芦丁、异槲皮苷)、266 nm(紫云英苷),进样量为5 μL。结果:桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷的线性范围分别为0.812~6.090 μg($r=0.999\ 3$)、0.438~3.285 μg($r=0.999\ 2$)、0.045~0.336 μg($r=0.999\ 2$)、0.882~6.615 μg($r=0.999\ 3$)、0.097~0.726 μg($r=0.999\ 1$)、0.064~0.483 μg($r=0.999\ 3$)、0.048~0.360 μg($r=0.999\ 1$)、0.014~0.108 μg($r=0.999\ 7$);精密性、重复性和稳定性试验的RSD均小于3.5%($n=6$);平均加样回收率分别为101.60%、103.06%、99.77%、96.93%、98.17%、96.75%、98.97%、99.60%,RSD分别为1.42%、2.65%、2.78%、2.05%、2.26%、0.93%、2.79%、3.08%($n=6$)。不同采集时间、不同种植品种的12批杜仲叶样品中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷的含量范围分别为10.903~17.245、5.578~7.892、0.198~0.440、13.890~19.782、1.008~1.547、1.102~2.396、0.267~0.701、0.150~0.412 mg/g,含量波动较大;杜仲皮样品中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁、松脂醇二葡萄糖苷的含量分别为0.299、0.123、0.580、0.112、0.026、1.961 mg/g。结论:本方法操作简便、重复性好、准确度高,可用于评价杜仲叶的质量;不同采集时间、不同种植品种的杜仲的不同药用部位(皮、叶)中的成分组成及含量存在明显的差异。

关键词 杜仲叶;高效液相色谱法;桃叶珊瑚苷;京尼平苷酸;儿茶素;绿原酸;车叶草苷;芦丁;异槲皮苷;紫云英苷;含量测定

Simultaneous Determination of Contents of 8 Components in *Eucommia ulmoides* Leaves by HPLC

ZHANG Liuji^{1,2}, LI Ning¹, TU Wanqian², LI Xiangyang³, WANG Changhua⁴, SHAO Zhanbo⁴(1. College of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China; 2. Henan Academy of TCM, Zhengzhou 450003, China; 3. Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450018, China; 4. Lingbao Dehui Eco-technological Co., Ltd., Henan Lingbao 472500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish content determination method for simultaneously determining aucubin, geniposidic acid, catechin, chlorogenic acid, asperuloside, rutin, isoquercitrin and astragaloside in *Eucommia ulmoides* leaves. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 203 nm for aucubin and catechin, 239 nm for geniposidic acid and asperuloside, 220 nm for chlorogenic acid, 354 nm for rutin and isoquercitrin, and 266 nm for astragaloside. The sample size was 5 μL. RESULTS: The linear range of aucubin, geniposidic acid, catechin, chlorogenic acid, asperuloside, rutin, isoquercitrin and astragaloside were 0.812-6.090 μg ($r=0.999\ 3$), 0.438-3.285 μg ($r=0.999\ 2$), 0.045-0.336 μg ($r=0.999\ 2$), 0.882-6.615 μg ($r=0.999\ 3$), 0.097-0.726 μg ($r=0.999\ 1$), 0.064-0.483 μg ($r=0.999\ 3$), 0.048-0.360 μg ($r=0.999\ 1$) and 0.014-0.108 μg ($r=0.999\ 7$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3.5% ($n=6$). The average recovery rates were 101.60%, 103.06%, 99.77%, 96.93%, 98.17%, 96.75%, 98.97% and 99.60%, with RSDs of 1.42%, 2.65%, 2.78%, 2.05%, 2.26%, 0.93%, 2.79% and 3.08%, respectively ($n=6$). The contents of aucubin, geniposide, catechin, chlorogenic acid, plantain, rutin, isoquercetin and astragaloside in 12 batches of *E. ulmoides* leaves from different collection time and planting varieties were 10.903-17.245, 5.578-7.892, 0.198-0.440, 13.890-19.782, 1.008-1.547, 1.102-2.396, 0.267-0.701, 0.150-0.412 mg/g, respectively. The content fluctuated greatly. The contents of aucubin, geniposide, catechin, chlorogenic acid, rutin and pinoselin diglucoside in cortex of *E. ulmoides* were 0.299, 0.123, 0.580, 0.112, 0.026, 1.961 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, reproducible and accurate. It can be used to evaluate the quality of *E. ulmoides* leaves. There are obvious differences in composition and content of components in different medicinal parts (cortex, leaves) of *E. ulmoides*.

Δ 基金项目:河南省科技攻关计划项目(No.182102310281)

* 研究员,硕士生导师,博士。研究方向:药效物质基础、道地药材质量评价。电话:0371-66331598。E-mail:zlj666671@163.com

KEYWORDS *Eucommia ulmoides* leaves; HPLC; Aucubin; Geniposidic acid; Catechin; Chlorogenic acid; Asperuloside; Rutin; Isoquercitrin; Astragaloside; Content determination

杜仲叶为杜仲科植物杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 的干燥叶, 收载于2015年版《中国药典》(一部), 具有补肝肾、强筋骨的功能, 可用于肝肾不足、头晕目眩、腰膝酸痛、筋骨痿软等症的治疗^[1]。杜仲是我国传统名贵滋补药材, 传统药用部位为其树皮。由于杜仲从种植到剥皮通常需要10年以上时间, 周期较长, 且剥皮后若养护措施不当, 极易造成原植物死亡, 仅以皮入药会严重影响杜仲资源的可持续发展^[2-3]。据研究报道, 杜仲叶有与杜仲皮相似的化学成分和药理活性, 有望代替杜仲皮入药^[4]。

杜仲叶中的主要化学成分为京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷、车叶草苷等环烯醚萜类成分^[2,5], 咖啡酸、绿原酸等苯丙素类成分^[6], 以及儿茶素、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷等黄酮类成分^[7-8]。据文献报道, 京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷等环烯醚萜类成分具有肝脏保护作用, 京尼平苷酸可通过调节胆汁转运体功能起到保肝利胆的作用^[9], 桃叶珊瑚苷能够拮抗转化生长因子(TGF- β 1)诱导人肝星状细胞(LX-2)活化及细胞外基质成分的表达, 从而起到抗肝纤维化作用^[10]; 芦丁等黄酮类成分可改善绝经后骨质疏松的骨微结构, 增加骨密度, 发挥抗骨质疏松的作用^[11]; 绿原酸提取物则具有较强的抑菌和抗氧化作用^[12]。2015年版《中国药典》(一部)中杜仲叶项下收载有绿原酸的含量测定项目, 考虑到绿原酸并非杜仲叶专属活性成分, 同时为综合考察杜仲叶中其他具有药理活性的成分, 本研究采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定了不同种植品种的杜仲叶中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷等8种不同结构类别化学成分的含量, 旨在为更全面地评价杜仲叶的质量提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695型高效液相色谱仪, 配置2996型二极管阵列检测器、柱温箱、Empower II色谱工作站(美国Waters公司); LIBROR-160DPT型万分之一天平(日本岛津公司); AE240型十万分之一天平(瑞士Mettler Toledo公司); HH-S6型电热恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

桃叶珊瑚苷对照品(批号: 111761-200601, 含量: >98%)、京尼平苷酸对照品(批号: 111828-201604, 含量: >97.4%)、儿茶素对照品(批号: 110877-201604, 含量: >99.2%)、松脂醇二葡萄糖苷对照品(批号: 111537-201706, 含量: >91.7%)均为含量测定用对照品, 购自中国食品药品检定研究院; 绿原酸(批号: 2772, 纯度: \geq 98.0%)、车叶草苷(批号: 4883, 纯度: \geq 98.0%)、芦

丁(批号: 5718, 纯度: \geq 98.0%)、异槲皮苷(批号: 5650, 纯度: \geq 98.0%)、紫云英苷(批号: 3975, 纯度: \geq 98.0%)均购自上海诗丹德生物技术有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

1.3 药材

不同种植品种的杜仲叶和杜仲(皮)由灵宝德汇生态科技有限公司提供, 产地均为河南省灵宝市朱阳镇闫家驹基地(详见表1), 经河南省中医药研究院都恒青研究员鉴定分别为杜仲科植物杜仲(*E. ulmoides* Oliv.)的干燥叶和干燥树皮, 凭证标本存放于河南省中医药研究院中药室。

表1 样品来源信息

Tab 1 Source information of samples

样品编号	品种	药用部位	采集日期	凭证标本号
001	秦仲1号	叶	2018.05.12	201805001
002	秦仲1号	叶	2018.05.21	201805006
003	秦仲1号	叶	2018.05.30	201805010
004	秦仲3号	叶	2018.05.12	201805002
005	秦仲3号	叶	2018.05.21	201805007
006	秦仲3号	叶	2018.05.30	201805011
007	华仲1号	叶	2018.05.12	201805003
008	华仲1号	叶	2018.05.21	201805008
009	华仲1号	叶	2018.05.30	201805012
010	华仲5号	叶	2018.05.12	201805004
011	华仲5号	叶	2018.05.21	201805009
012	华仲5号	叶	2018.05.30	201805013
013	秦仲1号	皮	2018.05.12	201805005

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~7 min, 5% A; 7~9 min, 5% A→8% A; 9~28 min, 8% A; 28~30 min, 8% A→20% A; 30~42 min, 20% A; 42~43 min, 20% A→50% A; 43~63 min, 50% A; 63~64 min, 50% A→5% A); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 检测波长: 203 nm(桃叶珊瑚苷, 0~9.5 min); 儿茶素, 19.5~21 min)、239 nm(京尼平苷酸, 9.5~19.5 min); 车叶草苷, 25.0~32.5 min)、220 nm(绿原酸, 21~25.0 min)、227 nm(松脂醇二葡萄糖苷, 32.5~34.5 min)、354 nm(芦丁、异槲皮苷, 34.5~39.5 min)、266 nm(紫云英苷, 39.5~60 min); 进样量: 5 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷的对照品各适量, 置于同一量瓶中, 加甲醇溶解并配制成上述成分质量浓度分别为406、219、22.4、441、48.4、32.2、24.0、7.2 μ g/mL的混合对照品溶液, 即得。

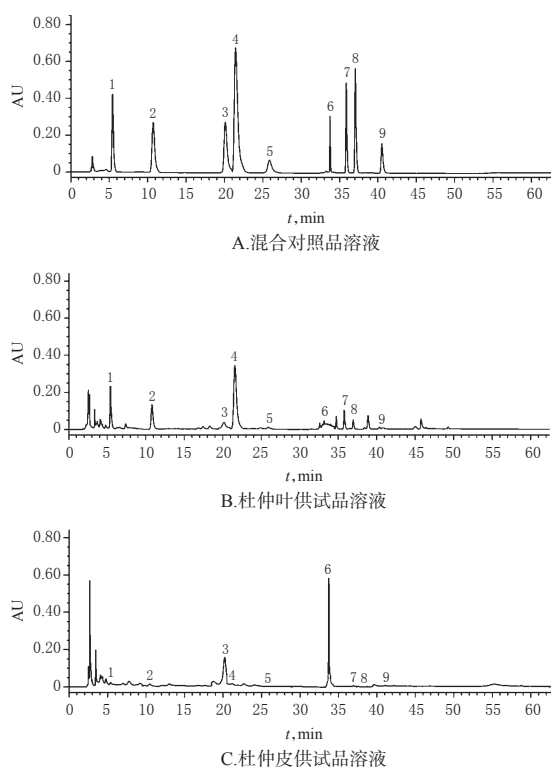
2.2.2 杜仲叶供试品溶液 取杜仲叶药材粉末(过三号

筛,下同)约1 g,精密称定,置具塞三角瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,称定质量,加热回流30 min,放冷后再次称定质量,用50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 杜仲皮供试品溶液 取杜仲皮药材约2 g,剪碎,精密称定,置具塞三角瓶中,加入三氯甲烷50 mL,加热回流1 h;取药渣,挥去三氯甲烷后连同滤纸再次置于三角瓶中,加甲醇50 mL,称定质量,加热回流1 h,放冷,用甲醇补足缺失的质量;滤过,精密吸取续滤液25 mL,水浴蒸干,残渣以甲醇溶解并定容至5 mL,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

分别吸取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液各适量,并以甲醇为空白对照,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,见图1。由图1可知,在该色谱条件下,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷分离良好,理论板数均超过3 000,空白溶剂无干扰(图略)。



注:1.桃叶珊瑚苷;2.京尼平苷酸;3.儿茶素;4.绿原酸;5.车叶草苷;6.松脂醇二葡萄糖苷;7.芦丁;8.异槲皮苷;9.紫云英苷

Note: 1. aucubin; 2. geniposidic acid; 3. catechin; 4. chlorogenic acid; 5. asperuloside; 6. pinoresinol diglucoside; 7. rutin; 8. isoquercitrin; 9. astragalinal

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液2、4、6、8、10、15 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面

积。以各待测成分进样量(x, μ g)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程和线性范围见表2。结果表明,各待测成分在相应的进样量范围内线性关系良好。

表2 回归方程和线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

成分	回归方程	线性范围, μ g	r
桃叶珊瑚苷	$y=6.36 \times 10^3x+8.13 \times 10^4$	0.812~6.090	0.999 3
京尼平苷酸	$y=1.40 \times 10^4x+1.79 \times 10^5$	0.438~3.285	0.999 2
儿茶素	$y=1.70 \times 10^3x+1.47 \times 10^4$	0.045~0.336	0.999 2
绿原酸	$y=2.27 \times 10^3x+4.90 \times 10^4$	0.882~6.615	0.999 3
车叶草苷	$y=1.01 \times 10^4x-1.10 \times 10^4$	0.097~0.726	0.999 1
芦丁	$y=2.06 \times 10^3x+2.27 \times 10^4$	0.064~0.483	0.999 3
异槲皮苷	$y=3.02 \times 10^3x+3.36 \times 10^4$	0.048~0.360	0.999 1
紫云英苷	$y=3.31 \times 10^3x-1.21 \times 10^4$	0.014~0.108	0.999 7

2.5 精密度试验

取杜仲叶药材(样品编号:001)粉末约1 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。结果,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷峰面积的RSD分别为0.65%、0.47%、2.13%、0.60%、0.89%、0.90%、1.16%、2.90%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取杜仲叶药材(样品编号:001)粉末约1 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后在室温下放置0、2、4、6、8、10 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷峰面积的RSD分别为0.65%、0.47%、2.13%、0.60%、0.89%、0.90%、1.16%、2.90%($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置10 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取杜仲叶药材(样品编号:001)粉末约1 g,平行6份,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并采用外标法计算样品含量。结果,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷的平均含量分别为11.32、6.45、0.25、13.90、1.35、2.35、0.45、0.12 mg/g, RSD分别为1.05%、1.59%、1.59%、0.87%、3.44%、1.43%、2.04%、3.15%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的杜仲叶药材(样品编号:001)粉末约0.5 g,平行6份,精密称定,分别精密加入混合对照品溶液(以50%甲醇为溶剂,按“2.2.1”项下方法配制成桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、

异槲皮苷和紫云英苷的质量浓度分别为518.6、310.4、14.7、560.6、55.6、121.6、22.6、8.4 μg/mL的混合溶液)10 mL和50%甲醇15 mL,按“2.2.2”项下方法制备加样回收供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

成分	已知样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
桃叶珊瑚苷	6.253	5.186	11.555	102.24	101.60	1.42
	6.287	5.186	11.645	103.32		
	6.296	5.186	11.560	101.50		
	6.272	5.186	11.405	98.98		
	6.270	5.186	11.560	102.01		
	6.285	5.186	11.550	101.52		
京尼平苷酸	3.540	3.104	6.590	98.26	103.06	2.65
	3.559	3.104	6.790	104.09		
	3.564	3.104	6.815	104.74		
	3.551	3.104	6.695	101.29		
	3.550	3.104	6.805	104.86		
	3.558	3.104	6.820	105.09		
儿茶素	0.130	0.147	0.270	95.24	99.77	2.78
	0.130	0.147	0.275	98.64		
	0.130	0.147	0.280	102.04		
	0.130	0.147	0.280	102.04		
	0.130	0.147	0.275	98.64		
	0.130	0.147	0.275	98.64		
绿原酸	7.659	5.606	13.160	98.13	96.93	2.05
	7.701	5.606	12.970	93.99		
	7.712	5.606	13.120	96.47		
	7.683	5.606	13.035	95.47		
	7.680	5.606	13.185	98.20		
	7.698	5.606	13.265	99.30		
车叶草苷	0.760	0.556	1.290	95.32	98.17	2.26
	0.765	0.556	1.305	97.12		
	0.766	0.556	1.320	99.64		
	0.763	0.556	1.325	101.08		
	0.762	0.556	1.315	99.46		
	0.764	0.556	1.300	96.40		
芦丁	1.321	1.116	2.415	98.03	96.75	0.93
	1.328	1.116	2.405	96.51		
	1.330	1.116	2.395	95.43		
	1.325	1.116	2.400	96.33		
	1.325	1.116	2.405	96.77		
	1.328	1.116	2.415	97.40		
异槲皮苷	0.257	0.226	0.480	98.67	98.97	2.79
	0.258	0.226	0.485	100.44		
	0.259	0.226	0.475	95.58		
	0.258	0.226	0.475	96.02		
	0.258	0.226	0.485	100.44		
	0.258	0.226	0.490	102.65		
紫云英苷	0.083	0.084	0.170	103.57	99.60	3.08
	0.083	0.084	0.165	97.62		
	0.083	0.084	0.165	97.62		
	0.083	0.084	0.165	97.62		
	0.083	0.084	0.170	103.57		
	0.083	0.084	0.165	97.62		

2.9 杜仲叶含量测定

取各批次杜仲叶药材粉末约0.5 g,平行3份,按

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算各待测成分的含量,结果见表4。

表4 杜仲叶药材样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 4 Results of content determination of *E. ulmoides* leaves(n=3,mg/g)

样品编号	桃叶珊瑚苷	京尼平苷酸	儿茶素	绿原酸	车叶草苷	芦丁	异槲皮苷	紫云英苷
001	11.340	6.420	0.235	13.890	1.379	2.396	0.466	0.150
002	11.190	6.841	0.316	15.670	1.224	2.022	0.701	0.195
003	11.530	6.859	0.356	16.785	1.354	2.330	0.500	0.188
004	15.903	7.154	0.198	15.009	1.466	1.204	0.267	0.164
005	17.100	7.805	0.263	16.828	1.500	1.102	0.298	0.188
006	17.245	7.892	0.286	17.236	1.547	1.186	0.294	0.197
007	10.903	5.578	0.251	17.177	1.135	1.757	0.365	0.222
008	11.100	6.190	0.284	17.488	1.282	1.903	0.512	0.235
009	11.245	5.895	0.293	18.210	1.378	2.005	0.534	0.240
010	13.697	7.007	0.419	18.802	1.008	1.447	0.324	0.336
011	14.886	6.964	0.376	19.400	1.347	1.550	0.569	0.375
012	15.000	6.955	0.440	19.782	1.506	1.788	0.471	0.412

2.10 杜仲皮含量测定

取杜仲皮药材样品(样品编号:013)约2 g,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算各待测成分的含量。结果显示,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁、松脂醇二葡萄糖苷的含量分别为0.299、0.123、0.580、0.112、0.026、1.961 mg/g;车叶草苷、芦丁、异槲皮素和紫云英苷因含量较低、误差较大,未能准确定量。

3 讨论

3.1 测定指标成分的确定

参照文献报道^[13-16],本研究前期分别以桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、芦丁、儿茶素、车叶草苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素、异鼠李素、山柰酚、山柰素、咖啡酸、紫丁香苷、松脂醇二葡萄糖苷等15种成分为指标,对杜仲叶中上述成分进行含量测定。结果显示,紫丁香苷、松脂醇二葡萄糖苷、咖啡酸、槲皮素、异鼠李素、山柰酚、山柰素等7种成分含量过低,与相邻的杂质峰分离度不理想,无法准确测定其含量,因此最后选择桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、芦丁、儿茶素、车叶草苷、异槲皮苷、紫云英苷等8个成分为杜仲叶的含量测定指标。

3.2 流动相的选择

本课题组先后采用甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-水和乙腈-0.4%磷酸水溶液等流动相系统进行考察。结果显示,甲醇-0.1%磷酸水溶液洗脱时,环烯醚萜类成分桃叶珊瑚苷峰与相邻色谱峰分离度较差;换用乙腈-水系统后,绿原酸峰有拖尾现象,在水相中加入磷酸调节流动相pH值可明显改善色谱峰的分离度和拖尾现象。经过反复调整梯度洗脱时间程序,最终确定了本文所采用

的流动相系统和梯度洗脱时间程序。在该流动相条件下,8种待测成分的峰形基本对称,与相邻的色谱峰可达基线分离,确保了测定的专属性和准确性。

3.3 供试品溶液制备方法考察

在进行供试品溶液制备时,为考察不同制备方法对含量测定结果的影响,本课题组取杜仲皮和杜仲叶样品,同时采用2015年版《中国药典》(一部)中杜仲(皮)和杜仲叶项下含量测定中的相关方法进行供试品溶液制备。结果显示,杜仲不同药用部位样品采用两种供试品溶液方法制备后,所测各种成分的含量结果基本一致。考虑到杜仲(皮)项下的供试品溶液制备方法需采用氯仿脱脂后再以甲醇回流提取,操作繁琐、费时,且误差较大;而杜仲叶项下方法直接采用50%甲醇超声制备,方法简便、快速,且8个待测成分含量测定精密性、重复性、准确度等均较好,故选择与药典一致的方法制备杜仲叶供试品溶液。

4 结语

2015年版《中国药典》(一部)中杜仲叶项下的含量测定仅以绿原酸为指标,而本研究建立了可同时测定杜仲叶中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、车叶草苷、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷等8个环烯醚萜类、苯丙素类或黄酮类成分含量的HPLC法。结果显示,各批次杜仲叶样品中绿原酸的含量均符合药典规定;所建立的8种不同成分的含量测定方法操作简便、重复性好、准确度良好,可为更科学、全面地评价杜仲叶质量提供方法基础。但本研究也同时发现,不同采集时间、不同种植品种的杜仲叶中上述8种成分含量波动较大,其原因是否与种植品种或采集时间的差异有关,尚有待收集更多样品进行比较研究并验证。此外,本研究对同一来源的杜仲(皮)进行了含量测定,发现杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷含量明显高于杜仲叶,杜仲叶中绿原酸、桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸含量则明显高于杜仲皮,提示杜仲的不同药用部位(皮、叶)中的成分组成及含量存在明显的差异,二者所含化学成分的差异是否对其药理作用、临床功效产生影响,有待今后进一步探索。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年

版.北京:中国医药科技出版社,2015:165.

- [2] 曾桥,韦承伯,吕生华.杜仲叶主要活性成分研究进展[J].安徽农业科学,2017,45(34):133-135.
- [3] 龚桂珍,宫本红,张学俊,等.杜仲叶和杜仲皮中化学成分的比较[J].西南大学学报(自然科学版),2010,32(7):167-172.
- [4] 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):41-42.
- [5] 左月明,张忠立,王彦彦,等.杜仲叶环烯醚萜类化学成分研究[J].中药材,2014,37(2):252-254.
- [6] 张忠立,左月明,李于益,等.杜仲叶苯丙素类化学成分研究[J].中药材,2014,37(3):421-423.
- [7] 唐芳瑞,张忠立,左月明,等.杜仲叶黄酮类化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(5):90-92.
- [8] 项丽玲,温亚娟,苗明三.杜仲叶的化学、药理及临床应用分析[J].中医学报,2017,32(1):99-102.
- [9] 陈浩.京尼平苷酸基于FXR抗ANIT诱导胆汁淤积大鼠保肝利胆机制研究[D].广州:广州中医药大学,2016.
- [10] 吕佩瑜.桃叶珊瑚苷对TGFβ1诱导人肝星状细胞活化及细胞外基质沉积的影响[D].长沙:中南大学,2014.
- [11] 袁真,闵珺,王恺,等.杜仲黄酮类3种药物成分治疗大鼠骨质疏松的比较研究[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(2):244-248.
- [12] 胡居吾,韩晓丹,付建平,等.三种绿原酸提取物的抑菌和抗氧化效果比较[J].天然产物研究与开发,2017,29(11):1928-1933.
- [13] 肖芳,黄勤挽,范润勇,等.HPLC法同时测定杜仲3个药用部位中8种成分[J].中成药,2016,38(8):1782-1786.
- [14] 王学军,梁旭华,徐恒.HPLC法同时测定杜仲叶中4种成分的含量[J].中医药信息,2017,34(1):33-35.
- [15] 张欣,张春风,祁东利,等.HPLC同时测定杜仲叶中7种成分的含量[J].中国药科大学学报,2012,43(5):435-437.
- [16] 刘荣华,唐芳瑞,陈兰英,等.不同产地杜仲叶中5种主要有效成分的含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(18):31-34.

(收稿日期:2019-06-13 修回日期:2019-11-01)

(编辑:段思怡)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅