

杜仲翅果桃叶珊瑚苷高效液相色谱分析方法的建立

崔丽^{1,2}, 龚志华^{1,2}, 刘仲华^{1,2}, 张盛^{1,2}, 傅冬和^{1,2}, 肖文军^{1,2*}

(1.湖南农业大学 园艺园林学院,湖南 长沙 410128 ;2.国家植物功能成分工程技术研究中心,湖南 长沙 410128)

摘 要: 为建立检测杜仲翅果桃叶珊瑚苷含量的 HPLC 法,以杜仲翅果为原料,采用溶剂浸提法,用 85%乙醇在提取温度 50 ℃、料液比 1:20、提取时间 30 min 的条件下提取 2 次,浓缩提取液至无醇味,综合分析检测波长、流动相、流速、检测温度 4 个因素对 HPLC 图谱的影响。结果表明:在 C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、检测波长 208 nm、柱温 20 ℃、流速 0.8 mL/min 的条件下,用 1%~10%的乙腈梯度洗脱 30 min,杜仲翅果桃叶珊瑚苷含量在样品进样量 0.30~1.50 μg 与峰面积呈良好的线性关系, R²=0.999 6,平均回收率为 84.3%,相对标准差为 1.97%(n=5)。该方法可准确检测杜仲翅果乙醇提取物中桃叶珊瑚苷含量,具有样品处理简单、稳定性强、重现性好、精密度高的优点。

关 键 词: 杜仲翅果;桃叶珊瑚苷;高效液相色谱

中图分类号: S131.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)06-0086-05

Detection of aucubin in samara of *Eucommia ulmoides* by high performance liquid chromatography

CUI Li^{1,2}, GONG Zhi-hua^{1,2}, LIU Zhong-hua^{1,2}, ZHANG Sheng^{1,2}, FU Dong-he^{1,2}, XIAO Wen-jun^{1,2*}

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. National Research Center of Engineering and Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China)

Abstract: In order to detect the content of aucubin in samara of *Eucommia ulmoides* by high performance liquid chromatography(HPLC), *Eucommia ulmoides* samara was taken as raw materials, 85 percent ethanol was used at the condition of temperature 50 ℃, liquid ratio 1:20, extraction for 2 times and 30 min for each time to extract aucubin till there is no alcohol taste in the concentrated extracts. The purpose of this research is to develop a set of useful HPLC analysis approach of *Eucommia ulmoides* aucubin from the detection wave length, mobile phase, flow velocity and temperature. The results showed that optimal separation was achieved on a C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) column, when its mobile phase ranged from 1 to 10 percent acetonitrile, gradient elution, and its flow rate was 0.8 mL/min, its column temperature was 20 ℃ and its wavelength was set at 208 nm. The calibration curve was linear within the range of 0.30~1.50 μg, R²=0.999 6, the average recovery for aucubin was 84.3%, RSD was 1.97%(n=5). This analysis method could be used to detect the content of *Eucommia ulmoides* aucubin with simple samples, stability, good repeatability and high precision.

Key words: samara of *Eucommia ulmoides*; aucubin; high performance liquid chromatography(HPLC)

杜仲(*Eucommia ulmoides* Olive)是杜仲科杜仲属植物,是中国特有的名贵中药材^[1],富含油脂、蛋白以及桃叶珊瑚苷、绿原酸、多聚环烯醚萜苷等多种天然活性成分,其中桃叶珊瑚苷是杜仲翅果中

含量最高的一种环烯醚萜类活性成分。桃叶珊瑚苷易溶于水、甲醇,可溶于乙醇、丙酮等有机溶剂,在酸性和碱性条件下极易水解、聚合而被破坏^[2-3],具有护肝解毒、抗炎、抗氧化、抗衰老、抗骨质疏

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 国家“十二·五”科技支撑计划项目(2011BAD10B00); 国家农业科技成果转化资金项目(2011GB2D200010)

作者简介: 崔丽(1988—),女,四川广元人,硕士研究生,主要从事茶及植物功能成分化学研究; *通信作者, xiaowenjun88@sina.com

松及营养神经元细胞等药理活性^[4-7],具有广阔的开发应用前景。目前,关于桃叶珊瑚苷的分析方法主要有薄层层析法、紫外分光光度法、RP-HPLC法和HPLC法^[8-12]。胡江宇等^[13]建立了高效液相色谱测定杜仲翅果桃叶珊瑚苷的方法(以甲醇作为提取剂,检测波长208 nm,柱温40℃,流动相为甲醇-水(20:80),流速为1.0 mL/min),获得了较好的分离检测效果。李伟等^[14]采用流动相甲醇-水(10:90)、检测波长203 nm、流速1 mL/min、柱温25℃的检测方法,对不同采收期的杜仲不同部位桃叶珊瑚苷的含量进行了测定。裴云萍等^[15]采用流动相甲醇-水-磷酸(30.0:969.5:0.5)、柱温35℃、检测波长203 nm、流速1.0 mL/min的高效液相色谱方法,较准确地测定了荔枝草颗粒中桃叶珊瑚苷的含量。上述HPLC法分析杜仲桃叶珊瑚苷含量时,其流动相为传统方法中的提取溶剂甲醇。随着对植物功能成分提取物质量要求的提高,提取溶剂除水和乙醇外,甲醇等具有一定毒副作用的溶剂不能使用。以甲醇为流动相分析杜仲翅果桃叶珊瑚苷含量,桃叶珊瑚苷难以与其他物质分开,分离度不高,保留时间也较短^[13-15]。笔者拟从色谱柱、检测波长、流动相、流速等因素入手,建立快速、准确、实用的杜仲桃叶珊瑚苷高效液相色谱分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料

杜仲翅果购于湖南张家界恒兴生物科技有限公司。桃叶珊瑚苷标准品购于SIGMA公司。

1.2 主要试剂与仪器

95%乙醇(分析纯,恒兴试剂有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,恒兴试剂有限公司);电子天平FA2104S(上海精科天平有限公司);高速万能粉碎机FW100(北京中兴伟业仪器有限公司);超声波清洗机3300H(上海科导超声仪器有限公司);岛津-10A高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.3 供试溶液制备

标准溶液制备:用电子天平精确称取9.3 g桃叶珊瑚苷标样,用100%甲醇定容至25 mL,取2 mL用10%甲醇定容至10 mL,即得0.074 4 mg/mL的桃叶珊瑚苷标准溶液。

杜仲翅果溶液制备:取5 g杜仲翅果粉碎,以

料液比1:20,85%乙醇超声提取30 min,过滤。滤渣在上述条件下再提取1次,过滤。合并滤液,浓缩至无醇味,用100%甲醇定容至25 mL,取2 mL用10%甲醇定容至10 mL,即得杜仲翅果溶液。

1.4 检测方法的建立

1.4.1 检测波长的选择

在紫外分光光度计上,将标准溶液于190~800 nm波段扫描,确定最大吸收波长。

1.4.2 流动相的选择

对甲醇-水、乙腈-水两种流动相的不同配比进行比较,根据桃叶珊瑚苷的分离情况确定最佳溶剂体系。

1.4.3 柱温、流速的选择

在其他色谱条件不变的情况下,分别在20、25、30、35、40℃柱温下,测定杜仲翅果桃叶珊瑚苷含量,确定最佳柱温。

在其他色谱条件不变的情况下,分别以0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL/min流速测定杜仲翅果桃叶珊瑚苷含量,考察其在不同流速下的分离效果。

1.5 方法学考察

1.5.1 标准曲线绘制

分别量取4、8、12、16、20 μL质量浓度为0.074 4 mg/mL的桃叶珊瑚苷标准溶液,按1.4中建立的较优色谱条件进行高效液相色谱检测,以标样进样量(μg)为横坐标(x),以峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,绘制标准曲线。

1.5.2 精确度、稳定性和重复性试验

精确度试验:重新提取供试液,按1.4中建立的色谱条件连续进样6次,每次进样量20 μL,测定峰面积,计算相对标准差。

稳定性试验:按1.3中杜仲翅果溶液制备法制备供试溶液,在制备后0、1、2、4、8、12、24 h进样,测定峰面积,计算相对标准偏差。

重复性试验:重新提取供试液,按1.3中杜仲翅果溶液制备法制备供试液6份,按1.4建立的较优色谱条件进样20 μL,5次重复,测定峰面积,计算相对标准偏差值。

1.5.3 加标回收试验

准确测定4份样品中的桃叶珊瑚苷含量,加入

设计量的桃叶珊瑚苷标准液,按样品测试操作,分别测定样品本值和加标样品值,测定峰面积,计算杜仲翅果桃叶珊瑚苷含量,由测定量与加入量计算平均回收率和相对标准偏差。

1.5.4 样品含量的测定

于 1.4 中建立的较优色谱条件下,将供试杜仲翅果液重复进样 3 次,计算杜仲翅果中桃叶珊瑚苷含量。

2 结果与分析

2.1 检测波长的确定

扫描结果表明,桃叶珊瑚苷的最大吸收峰所对应波长为 208 nm。

2.2 流动相的确定

对照标准品,根据出峰时间对样品进行定性分

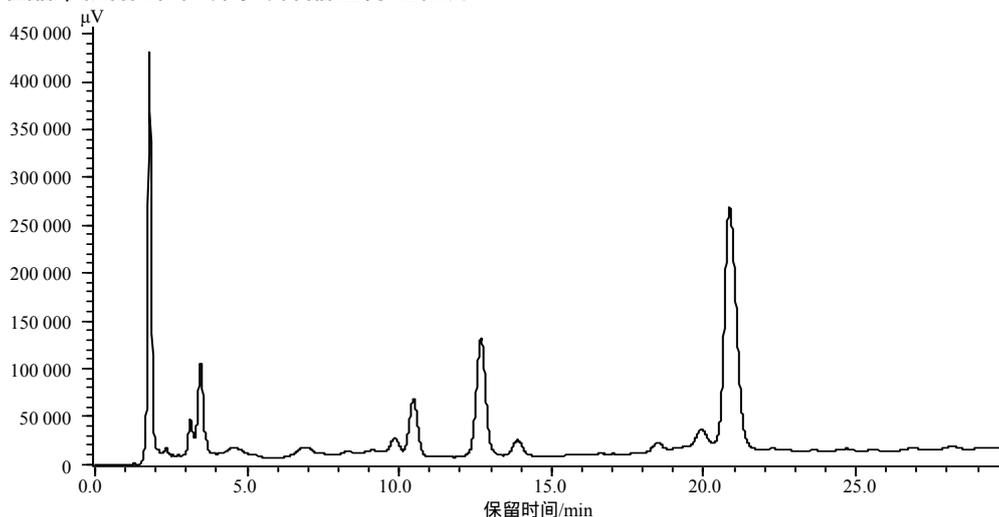


图 1 甲醇检测样品色谱分析结果

Fig.1 Chromatograms of sample by meoh

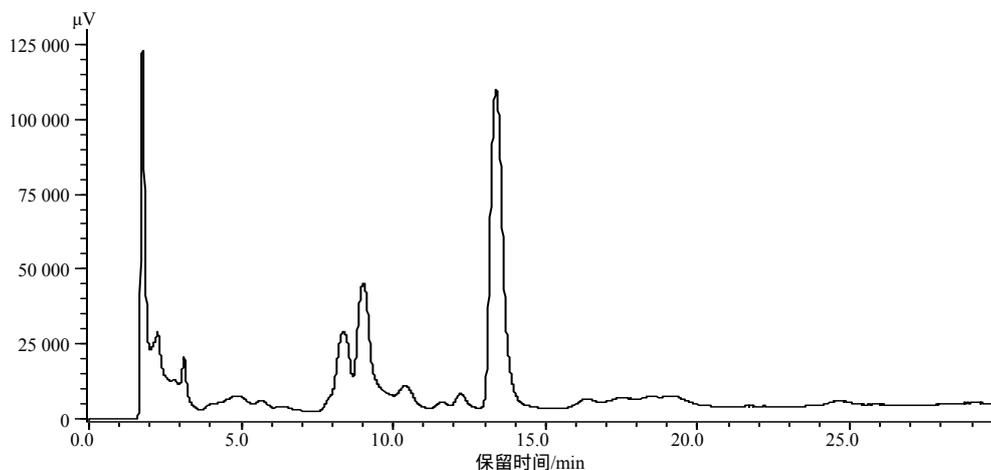


图 2 乙腈检测样品色谱分析结果

Fig.2 Chromatograms of sample by acetonitrile

析,根据峰面积对样品进行定量分析,根据分辨率 ($RS > 1.5$)对溶剂体系进行筛选,从而确定最佳溶剂体系。

2.2.1 流动相 B 的确定

分别以甲醇和乙腈作为流动相 B,在检测波长 208 nm、流速 1 mL/min、柱温 30 °C、流动相 A 为高纯水的条件下对杜仲翅果桃叶珊瑚苷含量进行检测,比较分离效果,从而确定流动相 B 种类。图 1、图 2 结果表明,以甲醇为流动相 B 时,桃叶珊瑚苷与其他物质无法分开,且出峰比以乙腈为流动相出峰晚;以乙腈为流动相 B 时,桃叶珊瑚苷能与其他物质很好地分开,出峰较早,且峰形较好,所以,选取乙腈为流动相 B。

2.2.2 流动相 B 洗脱梯度的确定

以乙腈为流动相 B, 分别考察不同洗脱梯度(1%~40%、1%~20%、1%~10%、1%~5%、5%、10%、3%~7%等)对杜仲翅果桃叶珊瑚苷分离效果的影响。

综合比较桃叶珊瑚苷与其他物质分离以及出峰时间、峰形等因素后, 发现采用 1%~10% 的乙腈梯度洗脱 30 min 的分离效果较佳, 保留时间长, 峰形对称性好, 峰面积也较大(图 3)。

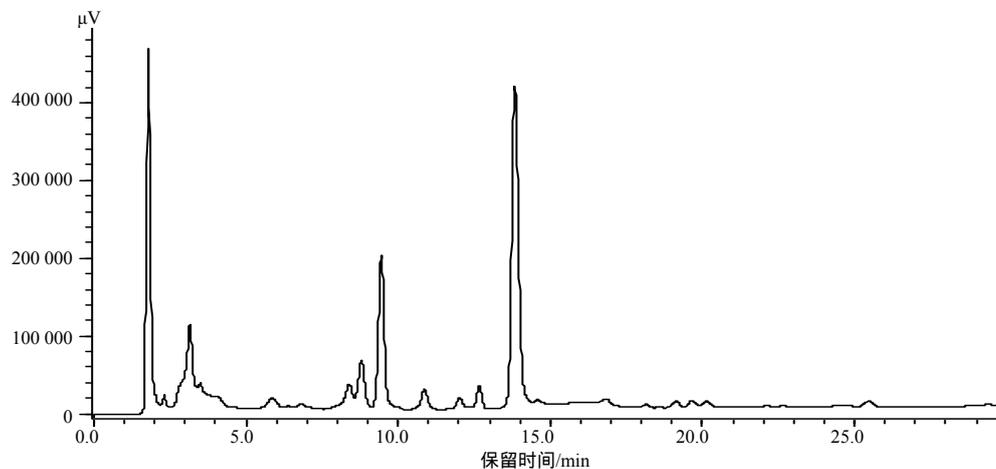


图3 1%~10%乙腈梯度洗脱样品 30 min 的色谱分离效果

Fig.3 HPLC chromatogram of the sample at 1%~10% within 30 min

2.3 柱温、流速的确定

以乙腈为流动相, 以 1%~10% 的乙腈梯度洗脱 30 min, 比较不同柱温(20、25、30、35、40 °C)下杜仲翅果桃叶珊瑚苷的分离效果, 发现柱温主要影响分离压力和出峰时间, 对分离效果影响不大, 当柱温为 20 °C 时的峰形较好。

在柱温 20 °C 条件下, 以 1%~10% 的乙腈梯度洗脱 30 min, 比较不同流速(0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL/min)下杜仲翅果桃叶珊瑚苷的分离效果, 发现

流速主要影响柱压力及出峰时间, 对分离效果影响不大, 且流速为 0.8 mL/min 时的效果较好。

依据以上试验结果(以水和乙腈分别作为流动相 A 和流动相 B, 以 1%~10% 乙腈梯度洗脱 30 min, 检测波长为 208 nm, 柱温为 20 °C, 流速为 0.8 mL/min, 保留时间为 16.027 min)对杜仲桃叶珊瑚苷进行 HPLC 高效液相色谱分离, 桃叶珊瑚苷的分离度较优, 峰型对称度好(图 4)。

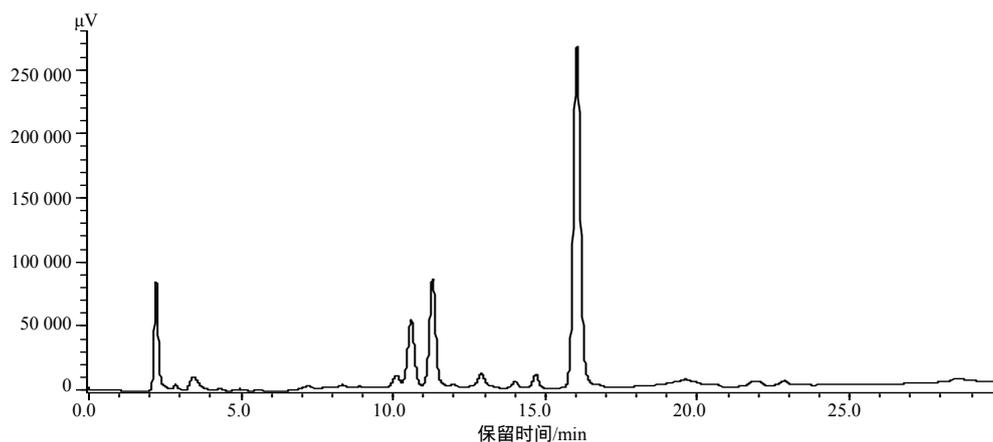


图4 杜仲桃叶珊瑚苷 HPLC 高效液相色谱分离结果

Fig.4 HPLC chromatogram of accubin

2.4 方法学考察结果

2.4.1 标准曲线的线性拟合度

在较优色谱条件下绘制标准曲线, 获得标准曲

线方程 $y=2.0 \times 10^{-6}x - 0.0283$, $R^2=0.9996$ ($n=5$), 表明桃叶珊瑚苷在标样进样量 0.30~1.50 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.2 精确度、稳定性及重复性试验结果

精确度试验结果(相对标准偏差为 2.12%, < 10%)表明, 该分析方法精确度较高。

稳定性试验结果(相对标准偏差为 1.72%, < 10%)表明, 该样品在 24 h 内稳定。

重复性试验结果(相对标准偏差为 0.66%)表明, 该方法的重现性较好。

2.4.3 加标回收试验结果

表 1 结果表明 4 个回收率均在允许范围 80%~120% 内, 平均回收率为 84.3%, 相对标准差为 1.97%, 表明该分析方法准确。

表 1 桃叶珊瑚苷的加标回收试验结果

Table 1 Results of recovery test of aucubin			
样品含量/ μg	加入样量/ μg	检出量/ μg	回收率/%
19.412	90	94.636	83.582
19.474	90	97.054	86.200
19.561	135	130.832	82.423
19.499	135	134.382	85.100

2.4.4 样品含量

在 1.4 中建立的较出色谱条件下检测, 杜仲翅果中桃叶珊瑚苷的平均含量为 5.01%。

3 结论与讨论

以杜仲翅果为原料, 用 85%乙醇在提取温度为 50 °C、料液比为 1:20、提取时间为 30 min 的条件下提取 2 次, 浓缩提取液至无醇味, 选取 C_{18} 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 和检测波长 208 nm、柱温 20 °C、流速 0.8 mL/min, 用 1%~10%乙腈梯度洗脱 30 min, 在此条件下检测杜仲翅果桃叶珊瑚苷具有分离度高、峰形好、保留时间长等优点。对该方法进行精确性、稳定性和重复性试验分析, 结果表明该方法具有精密度高、稳定性强、重现性好等优点。

本试验中的提取溶剂是 85%的乙醇。提取液如果不浓缩至无醇味时进样, 目标峰很难与其他物质较好地分开, 并且有很严重的拖尾现象。这可能是由于 HPLC 分离目标物质的溶剂体系是甲醇-水或乙腈-水, 与提取桃叶珊瑚苷的溶剂乙醇不一致, 导致目标物质与其他杂质无法分开, 峰形不独立。本试验中将 1%~10%的乙腈最终确定为 HPLC 分离杜仲翅果桃叶珊瑚苷的溶剂体系。当乙腈的比例为 1%, 亦即纯水的比例为 99%时, C_{18} 色谱柱承受的压力很大, 柱子甚至有塌陷的可能。由于桃叶珊

瑚苷的极性较大, 所以, 当乙腈的体积分数太大时, 目标物质无法更好地与其他物质分开。只有当乙腈的体积分数为 1%~10%时, 桃叶珊瑚苷才能与其他物质较好地分开, 呈现出较优的峰形。

参考文献:

- [1] 孙兰萍, 马龙, 管清美, 等. 超声波辅助提取杜仲籽油的工艺优化[J]. 资源开发与市场, 2009, 25(2): 97-99.
- [2] JIN Lei, XUE Hong-yu, JIN Li-ji, et al. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 582(1/3): 162-167.
- [3] 朱学文, 吴龙奇, 易军鹏. 杜仲中桃叶珊瑚苷的含量及提取分离工艺分析[J]. 食品科学, 2005, 26(增刊1): 70-71.
- [4] 康楨, 吴卫华, 王俊杰, 等. 桃叶珊瑚苷及其苷元的药理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24): 2585-2587.
- [5] 杜红岩, 李钦, 李福海, 等. 杜仲种仁桃叶珊瑚苷含量的测定及积累规律[J]. 林业科学研究, 2009, 22(5): 744-746.
- [6] 杨小梅, 尚平平, 侯西凤. 桃叶珊瑚苷的稳定性初步考察[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(3): 167-169.
- [7] Ho J N, Lee Y H, Park J S, et al. Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB2 induced oxidative stress in human skin fibroblasts[J]. Biol PharmBul, 2005, 28(7): 1244-1248.
- [8] 丁雪娇, 魏屹, 李静, 等. 不同季节3种桃叶珊瑚中桃叶珊瑚苷的比较[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2197-2198.
- [9] 立冰, 超燕. 大孔吸附树脂对桃叶珊瑚苷吸附效果的研究[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(9): 1-22.
- [10] 姜晓芳, 翠利, 李钦, 等. RP-HPLC法测定不同产地杜仲皮中桃叶珊瑚苷的含量[J]. 河南大学学报: 医学版, 2011, 30(1): 14-16.
- [11] 李静, 赵勇, 孙文基. RP-HPLC制备色谱法分析玄参中的桃叶珊瑚苷和哈帕苷[J]. 中药材, 2006, 29(11): 1189-1190.
- [12] 杨小梅, 尚平平, 刘建斌, 等. HPLC法测定杜仲仁中桃叶珊瑚苷的含量[J]. 中草药杂志, 2003, 34(10): 7-9.
- [13] 胡江宇, 张永康, 李辉, 等. 高效液相色谱法测定杜仲种仁中的桃叶珊瑚苷[J]. 生命科学仪器, 2006(4): 39-41.
- [14] 李伟, 谢婷婷, 覃洁萍, 等. 杜仲不同采收期及不同部位中桃叶珊瑚苷的含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(2): 283-285.
- [15] 裴云萍, 方芸, 吴正红. 高效液相色谱法测定复方荔枝草颗粒中桃叶珊瑚苷的含量[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(9): 709-710.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: Edward ZHANG