

# 高效液相色谱法测定杜仲叶中的绿原酸

赵永成

(昭通地区药品检验所, 云南 昭通 657000)

**摘要:**采用高效液相色谱法测定杜仲叶中绿原酸的含量。所用色谱柱为 Shim-pack CLC-ODS 柱,以巯嘌呤为内标,以甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(体积比为 25 : 75;pH 3.9)为流动相,UV 检测波长为 328 nm。在上述色谱条件下,当绿原酸质量浓度为 25~300 mg/L 时,以绿原酸对照品溶液与内标液的峰面积比为纵坐标(Y),绿原酸的质量浓度为横坐标(X),二者呈良好的线性关系,线性方程为  $Y=8.0368X+1.275\times 10^{-3}$ ,  $r=0.9999$ ;平均回收率为 99.89%,RSD=1.45%( $n=6$ )。

**关键词:**高效液相色谱法;绿原酸;巯嘌呤;杜仲叶

中图分类号:O658;R93

文献标识码:B

文章编号:1000-8713(2000)03-0263-02

## 1 前言

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.),传统以皮入药,但因生长缓慢,需 20 年左右才能剥皮供药用,故药源远远不能满足需要。近来的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]</sup>。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>[2,3]</sup>。绿原酸是杜仲叶中的重要成分<sup>[4]</sup>,具有抗菌、利胆和降压的活性。测定杜仲叶中的绿原酸含量可以作为评价杜仲叶品质的依据。为此,我们以巯嘌呤为内标物质,建立 HPLC 测定杜仲叶中绿原酸含量的方法。该方法可用于对杜仲叶及其中成药制剂的质量控制。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

日本岛津 LC-10Avp 液相色谱仪,SPD-10Avp 紫外检测器,Class-vp 数据处理系统,CTO-10Avp 柱温箱。绿原酸、巯嘌呤对照品(中国药品生物制品检定所),甲酸(色谱纯),甲醇(优级纯),其它试剂为分析纯试剂。杜仲叶于 1998 年 8 月采自云南省昭通市,经云南省药物研究所张人伟高级工程师鉴定为 *Eucommia ulmoides* Oliv。

### 2.2 色谱条件

色谱柱:Shim-pack CLC-ODS 柱(6.0 mm i. d.  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m),流动相为甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(体积比为 25 : 75;pH 3.9),流速 1 mL/min,柱温 40  $^{\circ}$ C,检测波长 328 nm,进样量 10  $\mu$ L。

### 2.3 内标物的选择

在选定的色谱条件下,对内标物进行了筛选,结果采用巯嘌呤为内标物较为合适,内标物与绿原酸的保留时间分别为 3.9 和 5.2 min。样品色谱图中绿

原酸峰形对称,且在內标峰位置未出现杂质峰的干扰,内标峰与绿原酸峰之间的分离度均大于 3.0,理论塔板数大于 3 000/m。分离色谱图见图 1。

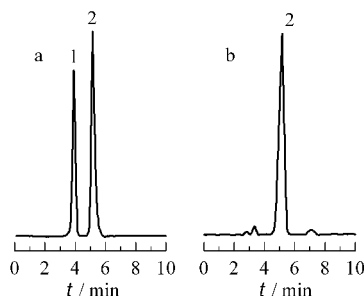


图 1 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram

a. 标准品与内标物(standard and internal standard), b. 样品(sample)。

1. 巯嘌呤(mercaptopurine), 2. 绿原酸(chlorogenic acid)。

### 2.4 标准溶液的制备

(1)对照品溶液:准确称取绿原酸 25 mg(精确至 0.01 mg),置于 25 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解后稀释到刻度(含绿原酸 1 g/L)。

(2)内标溶液:准确称取巯嘌呤 5 mg(精确至 0.01 mg),置于 25 mL 的容量瓶中,用甲醇微温溶解,待冷至室温后加甲醇至刻度(含巯嘌呤 0.2 g/L)。

### 2.5 线性关系及校正因子的测定

精确量取对照品溶液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL,分别置于 10 mL 的容量瓶中,各精确加入内标溶液 2.0 mL,再加入甲酸-甲醇溶液(体积比为 5 : 95)5 mL,用甲醇稀释至刻度,摇匀。在“2.2”项所示色谱条件下,分别进样 10  $\mu$ L,测定峰面积。以峰面积比为纵坐标,以对应的绿原酸的质量浓度为横坐

标,进行回归,绘制标准曲线,结果绿原酸的质量浓度为 25~300 mg/L 时呈良好的线性关系,回归方程为:  $Y = 8.0368X + 1.275 \times 10^{-3}$ ,  $r = 0.9999$ 。根据 5 种质量浓度的溶液进样后得到的峰面积,可计算出校正因子为 2.5436,  $RSD = 0.25\%$  ( $n = 5$ )。

## 2.6 样品的测定

取 50℃ 下干燥并粉碎、过 100 目筛的栽培 20 年的杜仲的雌株叶(样品 1)、雄株叶(样品 2)及栽培 3 年的杜仲幼株叶(样品 3)粉末 0.5 g,分别置于 25 mL 的容量瓶中,加入甲酸-甲醇溶液(体积比为 5:95)至刻度,摇匀,于室温下浸渍 2 h,超声提取 30 min,过滤。精确吸取续滤液 5 mL 置于 10 mL 的容量瓶中,精确加入内标溶液 2.0 mL,用甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤。在选定的色谱条件下进样 10  $\mu\text{L}$ ,根据色谱峰面积计算绿原酸的质量分数( $n = 3$ ),则样品 1,2,3 中绿原酸的质量分数分别为:1.63%( $RSD$  为 1.52%),1.73%( $RSD$  为 1.42%),3.16%( $RSD$  为 1.24%)。

## 2.7 稳定性试验

取“2.6”项已测定的样品溶液 3 份,分别于 0,24,48 h 进行分析。实验结果表明,在室温(15℃)下绿原酸与内标的峰面积比值基本不变。

## 2.8 回收率试验

精确称取 3 份已知含量的同一样品 0.25 g,分别置于 25 mL 的容量瓶中,各准确加入对照品溶液 5 mL(含绿原酸 5 mg),3.75 mL(含绿原酸 3.75 mg),2.5 mL(含绿原酸 2.5 mg),按照“2.6”项下操作,进行加样回收测定,计算回收率,结果平均回收率为 99.89%, $RSD = 1.45\%$  ( $n = 6$ )。

## 3 结语

(1)建立的高效液相色谱法可使杂质、内标物和绿原酸实现良好的分离。本法简便、可靠、准确,为测定杜仲叶中绿原酸提供了一个新方法。

(2)绿原酸分子具有邻苯二酚及羧基结构,常以盐的形式存在于植物体中<sup>[5]</sup>,提取时以含甲酸的甲醇溶液为酸性提取液,使绿原酸呈分子状态而被甲醇提取出。

(3)样品含量测定结果表明,栽培 3 年的幼树叶中绿原酸含量比栽培 20 年的老树叶的含量高。

## 参 考 文 献

- 1 Wang Jing-xiang, Zhang Li-ming, Chu Wan-zhao(王景祥,张黎明,楚万照). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药),1987,18(3):11-12
- 2 The Pharmacopeia Commission of the Ministry of Public Health PRC(卫生部药典委员会). National drug standards (Preparations of Chinese traditional patent medicine), Vol. V (卫生部药品标准(中药成方制剂)第 5 册). 1992. 191
- 3 The Pharmacopeia Commission of the Ministry of Public Health PRC(卫生部药典委员会). National drug standards (Preparations of Chinese traditional patent medicine), Vol. XI (卫生部药品标准(中药成方制剂)第 11 册). 1996. 81
- 4 Li Jia-shi, Yan Yu-ning(李家实,阎玉凝). Bull Chin Med(中药通报),1986,11(8):41-42
- 5 Qi Xiang-yang, Zhang Sheng-hua, Lu Cai-ling(戚向阳,张声华,陆彩玲). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药),1998,29(11):741-742

# Quantitative Determination of Chlorogenic Acid in Eucommia Leaf by High Performance Liquid Chromatography

ZHAO Yong-cheng

(Zhaotong Institute for Drug Control, Zhaotong 657000, China)

**Abstract:** An HPLC method for the quantitative determination of chlorogenic acid in Eucommia leaf was investigated. The sample was extracted with methanol solution containing 5% formic acid and then analyzed by HPLC. The operating conditions were Shim-pack CLC-ODS column (6.0 mm i. d.  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) at 40℃, mobile phase of methanol-0.01 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (25:75, V/V; pH 3.9) at 1 mL/min and UV detection at 328 nm. Mercaptopurine was selected as the internal standard. There was a good linear relationship between the response (area ratio of chlorogenic acid to mercaptopurine) and the concentration of sample in the range of 25-300 mg/L for chlorogenic acid. The corresponding regression equation was  $Y = 8.0368X + 0.001275$ ,  $r = 0.9999$ . The average recovery was 99.89% and  $RSD$  was 1.45% ( $n = 6$ ). The results showed that this method is simple, specific and accurate.

**Key words:** high performance liquid chromatography; chlorogenic acid; mercaptopurine; Eucommia leaf