



朱艳,李先芝,毛琼丽,等. HPLC法测定杜仲雄花中绿原酸含量[J]. 黑龙江农业科学,2023(10):63-67.

# HPLC法测定杜仲雄花中绿原酸含量

朱艳<sup>1</sup>,李先芝<sup>1,2</sup>,毛琼丽<sup>1</sup>,严玲<sup>1</sup>,石豪<sup>1</sup>,刘洋<sup>1</sup>,胡杨<sup>1</sup>,陈彦和<sup>1</sup>

(1. 劲牌有限公司,湖北黄石 435100; 2. 中药保健食品质量与安全湖北省重点实验室,湖北黄石 435100)

**摘要:**为建立一种快速简便测定杜仲雄花中绿原酸含量的方法,采用 Agilent-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250.0 mm, 5 μm),乙腈-0.4%醋酸(10:90)等度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温箱温度 35℃,327 nm 单波长检测,通过试验对该方法的稳定性、精密度等进行优化。结果表明,杜仲雄花绿原酸在测定范围内呈良好的线性关系( $R^2=0.999\ 8$ ),平均回收率为 97.30%。供试品溶液处理方法为环境友好型方法,能更好地减少环境污染,对实验人员安全性更高,且该方法具有较高的精密度和重复性,可用作杜仲雄花中绿原酸含量的测定。

**关键词:**杜仲雄花;绿原酸;高效液相色谱法

杜仲是我国常用的特有药材,在我国已有两千年的历史,由于其生长周期较长,传统药用部位以皮部为主,所以导致大量野生杜仲遭到破坏,且具有不可再生性质,导致其资源紧缺<sup>[1]</sup>。

近年来研究发现,杜仲皮、叶、花其药理作用相似,但还是有一定的差异<sup>[2-4]</sup>,如杜仲不同部位水提取物的镇痛作用、抑菌作用效果中杜仲雄花明显优于其他部位<sup>[2]</sup>。同时也有研究表明杜仲皮、叶、花等不同部位成分含量不同,如杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷和京尼平含量较高,杜仲叶中绿原酸含量较其它部位高,杜仲雄花中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、等含量较高,导致这些含量差异的原因除了药用部位不同外还与其具体采收、提取方式也有较大关系<sup>[5-6]</sup>。

杜仲是一类雌雄双株的植物,雄花就是杜仲雄树开的花,其花粉是我国珍贵的药用资源<sup>[7]</sup>。根据杜仲雄花调节阴虚证、阳虚证动物模型,推测出其可能具有补肾及改善生殖的功能<sup>[8]</sup>。杜仲雄花含有丰富的蛋白质、氨基酸、矿质元素及多种维生素等,是一类营养丰富的保健饮品,不但可以改善睡眠、调节雌激素、镇痛等,而且其主要成分中绿原酸具有显著的药理活性<sup>[9-10]</sup>。绿原酸对血液系统、消化系统等均有疗效,其抗菌消炎作用最为突出<sup>[10-11]</sup>。近年来随着研究的深入,学者发现杜仲雄花茶中绿原酸对肿瘤预防也有着重要的意义<sup>[9]</sup>,而且对 II-型糖尿病及与衰老相关的疾病也

有一定的治疗作用<sup>[9-10]</sup>。

不同区域的杜仲雄花中绿原酸含量也有较大差别,如南北地域差异,海拔高度差异等影响,均会导致杜仲花中品质的差异<sup>[12]</sup>。不同的加工方式会使杜仲雄花茶呈现不同的绿色,更严重的是不当的加工提取方式会造成绿原酸等物质的损失。由于其本身含热敏性功能而导致绿原酸含量发生差异,另外在杜仲雄花处理杀青过程中,可能导致绿原酸在多酚氧化酶的作用下被氧化分解<sup>[13]</sup>,使其无法更有效地发挥其自身有效价值,降低杜仲雄花中绿原酸的利用率。作为判断杜仲雄花中重要功能成分之一的绿原酸,如何快速检测杜仲雄花中绿原酸含量至关重要,除可提高提取速度、保证提取率外,还可以减少实验过程试剂用量及试剂污染<sup>[14-15]</sup>。本研究通过试验对其稳定性、精密度等进行优化,为快速检测杜仲雄花中绿原酸含量提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器及材料

仪器设备:高效液相色谱仪(配紫外检测器或二极管阵列检测器,1260 Infinity II Binary LC,美国安捷伦科技有限公司)、十万分之一电子天平(AB135-S,上海精密科学仪器有限公司)。

材料及试剂:2022年5月采于陕西汉中偏深绿色杜仲雄花、绿原酸对照(中国食品药品检定研究院)、乙腈(色谱纯,弗顿科技有限公司)、醋酸(分析纯,默克公司)、乙醇(分析纯,国药)。

### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱选用 Agilent C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250.0 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.4%醋酸(10:90)等度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;

收稿日期:2023-04-07

第一作者:朱艳(1987—),女,学士,工程师,从事药材质量控制研究。E-mail:339526006@qq.com。

通信作者:李先芝(1978—),女,硕士,高级工程师,从事药材质量控制研究。E-mail:838097968@qq.com。

柱温箱温度 35 ℃;检测波长 327 nm;进样量 10  $\mu\text{L}$ <sup>[15]</sup>。

1.2.2 供试品溶液制备 精密称定 1.00 g 左右粉碎试样于 25 mL 棕色容量瓶中,加入 20 mL 50%乙醇,超声提取 45 min,用 50%乙醇定容至刻度,混匀,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,滤液作为待测样品备用<sup>[10-11]</sup>。

1.2.3 对照品溶液制备 精密称取绿原酸标准品 13.0 mg 至 10 mL 容量瓶中,加流动相溶解[0.4%醋酸-乙腈(90:10)]定容,摇匀,得到绿原酸标准溶液母液(浓度 1 330  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );分别精密量取绿原酸标准溶液母液 0.10,0.40,0.80,1.25 和 2.50 mL 至 5 mL 容量瓶中,加流动相溶解定容,摇匀,得到绿原酸标准样品 26.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (2#)、106.4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (3#)、212.8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (4#)、332.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (5#)、665.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (6#),再取 26.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (2#)标准溶液 1.0 mL 至 10 mL 容量瓶中,加流动相溶解定容,摇匀,得到绿原酸标准溶液 2.66  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (1#)。

1.2.4 提取时间的确定 分别精密称定 1.00 g 左右粉碎试样于 25 mL 棕色容量瓶中,分别加入 50%乙醇按 15,30,45 和 60 min 时间进行超声提取。超声冷却后,使用提取溶剂定容至刻度,混匀,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,按 1.2.1 色谱条件进行色谱分析,比较不同提取时间的绿原酸浓度差异。

1.2.5 提取溶剂的筛选 分别精密称定 1.00 g 左右粉碎试样于 25 mL 棕色容量瓶中,分别加入 20 mL 纯水、50%乙醇、70%甲醇超声提取 30 min,超声冷却后,分别使用提取溶剂定容至刻度,混匀,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,按 1.2.1 色谱条件进行色谱分析,比较不同提取溶剂处理的绿原酸浓度差异。

1.2.6 色谱峰面积与绿原酸浓度的关系 将上述标准溶液 1#~6#,在上述色谱条件下进行分析,得到各浓度的绿原酸色谱峰的峰面积,以浓度为横坐标,相对应的色谱峰面积为纵坐标建立曲线。

1.2.7 精密度试验 取某批次陕西汉中偏深绿色杜仲雄花按照 1.2.2 方法制备供试品溶液,并按 1.2.1 中色谱条件连续进样分析 6 次,得到各次分析时测得的绿原酸浓度,计算浓度的 RSD 值。

1.2.8 稳定性试验 取 1.2.3 中供试品溶液进行稳定性试验考察,按照 1.2.1 中液相色谱条件分别在 0.75,1.50,3.00,4.50,7.50 和 9.75 h 对供试品溶液中绿原酸进行检测,得到各次分析时

绿原酸浓度,计算浓度的 RSD 值。

1.2.9 重复性试验 取某批次陕西汉中偏深绿色杜仲雄花进行重复性试验,分别称取 6 份供试品 1.001 1,1.010 3,1.005 6,1.003 7,1.004 3 和 1.009 3 g,以 1.2.2 中样品制备方法,按照 1.2.1 中色谱方法进行分析,利用已建立的标准曲线计算样品中各目标成分的含量。

1.2.10 加标回收试验 标准溶液制备:精密称取绿原酸 25.73 mg,绿原酸含量 100%,用流动相定容到 20 mL 容量瓶中,摇匀,得到绿原酸标准溶液 1 286.500 0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

加标回收试验供试品制备:分别称取 9 份供试品(原则取样品量 1/2 进行加标试验,由于此样品含量较高,故取样品量约 1/4 进行加标试验) 0.100 4,0.100 9,0.107 2,0.100 8,0.100 8,0.100 3,0.106 1,0.100 0 和 0.105 6 g,分别加入 0.5,1.0 和 1.5 mL 浓度为 1 286.500 0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  标准溶液,按 1.2.2 进行样品前处理定容至 10 mL,再按照 1.2.1 中色谱方法进行色谱分析,利用已建立的标准曲线计算加标回收样品中绿原酸的加标量,与实际加入量进行比较,计算回收率。

2 结果与分析

2.1 供试品溶液制备考察

2.1.1 提取时间的确定 由表 1 可知,在提取 15,30,45 和 60 min 4 个时间段所测得浓度相近,而 30 min 提取浓度略高,综合考虑选择提取时间 30 min 较为合适。

表 1 不同提取时间对绿原酸浓度的影响	
时间/min	溶液浓度/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
15	309.7105
30	312.7313
45	309.7119
60	310.9823

2.1.2 提取溶剂的筛选 由表 2 可知,纯水超声提取所测得浓度略低,50%乙醇与 70%甲醇超声提取所测得浓度无明显差异,考虑到实验人员及环境污染等原因,选择 50%乙醇进行超声提取。

表 2 不同提取溶剂对绿原酸浓度的影响	
提取溶剂	溶液浓度/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
纯水	278.8962
50%乙醇	293.2025
70%甲醇	294.2005

2.2 检出限试验

精密称取绿原酸标准物质适量,加流动相溶解至适当浓度,在 1.2.1 色谱条件下进行色谱分析,使得绿原酸的色谱峰高与基线噪音的比值约

为 3,经试验,确定绿原酸浓度为  $0.0266\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时为最低检出浓度,最低检出浓度标准溶液色谱图见图 1。

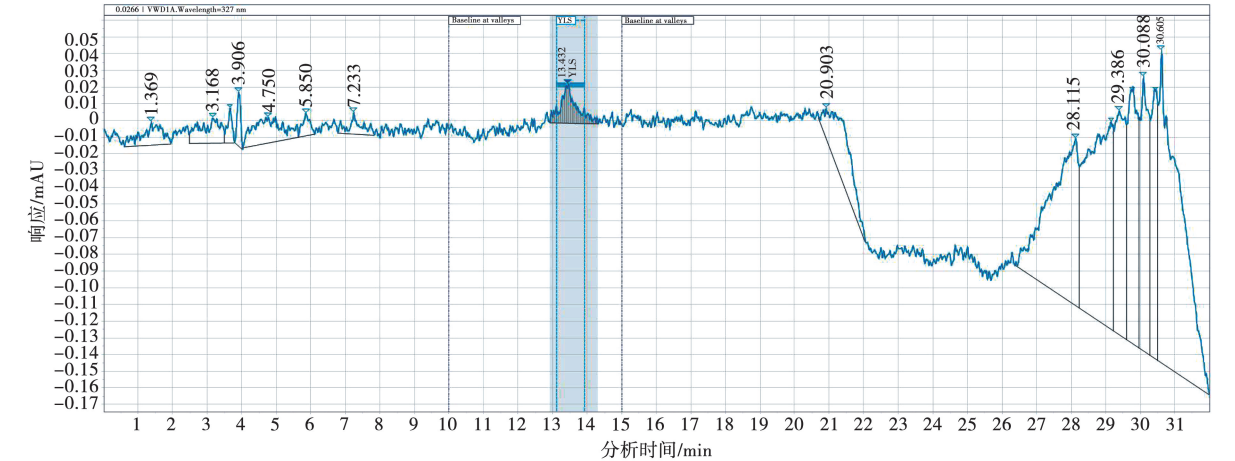


图 1 最低检出浓度的标准溶液色谱图

2.3 线性范围试验

不同浓度标准品与对应的色谱峰峰面积数据如表 3 所示,相关标准曲线为绿原酸( $y$ ) =  $29.95x - 140.02$ ,  $R^2 = 0.9999$ (图 2)。

表 3 标准曲线建立相关数据

序号	浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	峰面积/ $(\text{mAU})$
1	2.66	61.171
2	26.60	691.856
3	106.40	2959.897
4	212.80	6184.513
5	332.50	9720.694
6	665.00	19853.015

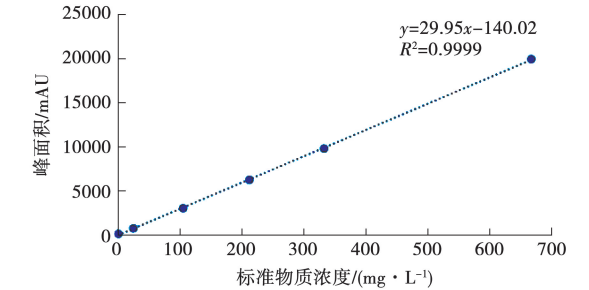


图 2 绿原酸标准曲线

2.4 精密度试验

由表 4 可知,绿原酸精密度试验 RSD 值均  $\leq 5\%$ ,满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》精密度试验要求,表明仪器方法性能稳定,检测结果的随机误差较小。

表 4 绿原酸精密度试验数据及 RSD 值

序号	测得浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
1	305.0140
2	306.1122
3	306.7303
4	306.7841
5	306.7134
6	307.3930
RSD/%	0.27

2.5 稳定性试验

由表 5 可知,绿原酸稳定性试验 RSD 值均  $\leq 5\%$ ,满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》稳定性试验要求,绿原酸在 9.75 h 内稳定性良好。

表 5 绿原酸稳定性试验数据及 RSD 值

序号	稳定性时间/h	测得浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
1	0.75	306.1122
2	1.50	306.7303
3	3.00	306.7134
4	4.50	307.2677
5	7.50	307.7281
6	9.75	307.9984
RSD/%	—	0.23

2.6 重复性试验

由表 6 可知,绿原酸重复性试验 RSD 值均≤5%,满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》稳定性试验要求,表明绿原酸检测方法重复性良好。

2.7 加标回收试验

由表 7 可知,绿原酸加标回收率在 97.35%~101.35%,满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》中回收率试验的技术要求,表明方法准确可靠。

表 6 重复性试验数据及 RSD 值

序号	样品质量/g	测得浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	样品含量/%
1	1.0011	307.3316	0.7675
2	1.0103	309.3932	0.7656
3	1.0056	308.4910	0.7669
4	1.0037	306.8188	0.7642
5	1.0043	307.0808	0.7644
6	1.0093	309.8235	0.7674
RSD/%	—	—	0.19

表 7 杜仲雄花中绿原酸加标回收率及 RSD 值

称样量/g	实际测得浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	样品理论含量/mg	加标后含量/mg	加标含量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.1004	139.5351	0.7691	1.3954	0.6433	97.35		
0.1009	142.4918	0.7729	1.4249		101.35		
0.1072	146.3826	0.8212	1.4638		99.90		
0.1008	205.6264	0.7721	2.0563	1.2865	99.82		
0.1008	205.4045	0.7721	2.0540		99.64	97.30	3.12
0.1003	203.6670	0.7683	2.0367		98.59		
0.1061	271.2533	0.8127	2.7125	1.9298	98.45		
0.1000	271.1085	0.7660	2.7111		100.79		
0.1056	273.3768	0.8089	2.7338		99.74		

2.8 不同采收批次成品杜仲雄花中绿原酸含量

由表 8 可知,不同采收批次杜仲雄花中绿原酸含量存在明显差异,同区域杜仲雄花中绿原酸含量无明显差异。

表 8 不同批次仲杜雄花中绿原酸含量

样品	样品含量/%
陕西汉中深色杜仲雄花茶	7.0452
陕西汉中绿色杜仲雄花茶	7.3687
杜仲雄花茶 1#	6.3823
杜仲雄花茶 2#	4.7384
张家界杜仲雄花茶	3.7716

3 讨论

杜仲雄花中绿原酸含量检测过程中,提取方式主要参考杜仲叶的提取方式,且方式也较为多样化,如以水为溶剂,可进行煎煮、热回流、超声、酶法提取等方法,其中热回流法绿原酸提取率高于其他提取方法<sup>[16-19]</sup>,通过水提法对提取过程中温度等参数进行了控制,其提取率可超过 80%,其他方法绿原酸提取率在 90%以上<sup>[18-19]</sup>。在医药、食品等其他行业中对原料有极高要求,或从提取步骤、耗时及提取有效成分的差异等各方面进

行综合考虑,可以根据需要选用更加合适的方法进行提取。任小宁等<sup>[20]</sup>在提取杜仲叶粉的时候选择使用不同工艺的酶提取法,可以提高提取效率且无污染。胡小祥等<sup>[21]</sup>在与芦丁同时提取时选择采用 70%甲醇作为提取溶剂。王燕等<sup>[22]</sup>从金银花粗产品中一次分离得到高纯度绿原酸时,选择采用微波辅助乙醇提取方法。

目前,研究提取金银花中绿原酸的报道较多,对杜仲雄花及杜仲叶中单一绿原酸的提取分离较少,且提取分离步骤较为繁琐,使用有毒有害试剂较多,试验过程可能会造成环境污染等。本实验室前期通过相关试验分析证明,不同溶剂对杜仲雄花进行提取后绿原酸含量差异性较小,纯水超声提取所得绿原酸浓度略低,50%乙醇与 70%甲醇超声提取所得绿原酸浓度无明显差异,故在无特殊含量要求的情况下可以选择 50%乙醇作为提取溶液更加安全可靠。本试验已通过方法学考察,验证该试验方法具有良好的精密度、稳定性和重复性。对单一研究杜仲雄花茶中绿原酸含量有较高的专属性,可以更加有效地分析研究不同品种杜仲雄花茶的品质。

另外也有文献记载同产地不同批次杜仲雄花茶绿原酸含量存在较大差异,如魏媛媛等<sup>[5]</sup>研究



表明,张家界不同采样点的绿原酸含量存在较大波动。而本试验主要采用陕西地区杜仲雄花茶,其绿原酸含量相较于文献报道的张家界产区中的绿原酸含量高<sup>[5]</sup>。本研究中绿原酸含量较高的原因可能是供试品溶液处理过程参数影响了最终绿原酸的含量。因此后续研究中应采用较为方便快捷的方法,分析研究不同品种杜仲雄花茶生产、采摘等方面的品质控制。

## 4 结论

研究结果表明本试验条件下 HPLC 法测定杜仲雄花中绿原酸含量最佳提取时间为 30 min,考虑实验室环境污染及实验人员安全,选择较为实用的 50%乙醇作为提取溶液。经过方法学考察,该试验方法具有良好的精密度、稳定性和重复性,可快速简便测定杜仲雄花中绿原酸含量。

## 参考文献:

[1] 刘锟,王健英,魏莉,等. HPLC 法测定杜仲皮、叶、雄花中 8 种成分[J]. 中成药,2021,43(3):686-691.

[2] 陈晓俊,王凤琛,袁颖,等. 杜仲皮、杜仲叶、杜仲雄花的药效学比较研究[J]. 甘肃中医药大学学报,2016,33(5):5-8.

[3] 刘星. 杜仲不同药用部位化学成分和含量的比较研究及在中成药中的应用[D]. 南京:南京中医药大学,2022.

[4] 张威鹏. 杜仲主要活性成分的时空分布特征及其血管舒张作用差异分析[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2020.

[5] 魏媛媛,李伟业,温晓,等. HPLC 法同时测定不同产地杜仲雄花茶中 3 种活性成分含量[J]. 安徽农业科学,2019,47(8):192-194,197.

[6] 郭洋静,丁艳霞,许兰波,等. HPLC 法同时测定杜仲雄花中 5 种活性成分[J]. 中成药,2014,36(10):2131-2134.

[7] 白喜婷,朱文学,罗磊,等. 杜仲雄花及花茶中绿原酸含量分析[J]. 食品工业科技,2007(6):216-217,127.

[8] 谭丹,曾丹,唐利东,等. 基于阴虚证、阳虚证及卵巢功能减

退小鼠模型 探讨杜仲雄花的补肾功效[J]. 时珍国医国药,2022,33(12):2875-2878.

[9] 魏媛媛. 杜仲雄花茶质量评价及其破壁咀嚼片的研制[D]. 吉首:吉首大学,2019.

[10] 郭佩佩. 杜仲叶中绿原酸的分离及其生物活性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2021.

[11] 王玲娜,姚佳欢,马超美. 绿原酸的研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(11):1121-1130.

[12] 魏媛媛,于华忠,温晓. 破壁技术及其在杜仲雄花茶中的应用进展[J]. 贵州农业科学,2018,46(10):109-111.

[13] 徐文洪,唐小兰,宋阳,等. 基于响应面法优化杜仲雄花茶中活性成分及加工工艺[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(7):2561-2568.

[14] 雷燕妮,张小斌,李多伟. 杜仲叶提取绿原酸的工业化生产工艺优化[J]. 商洛学院学报,2022,36(2):14-19.

[15] 中国林业产业联合会. 杜仲雄花茶: TLYCY010—2020[S]. 北京:中国林业产业联合会,2020.

[16] 黄广君,梁锦添,蒋小云. 金银花有效成分绿原酸的提取工艺研究[J]. 山东化工,2017,46(10):9-11.

[17] 李辉,逯桃桃,陈佳,等. 金银花绿原酸提取方法研究[J]. 分析测试技术与仪器,2022,28(4):416-421.

[18] 丁敏,王丽玲,秦玉川,等. 金银花中绿原酸的水提取工艺研究[J]. 浙江林业科技,2022,42(2):15-20.

[19] 黄琛斐,张哲,王茁,等. 不同采收时间下杜仲叶绿原酸含量的差异及绿原酸提取工艺的优化研究[J]. 饲料研究,2022,45(15):84-87.

[20] 任小宁,杨伟东. 正交试验优化杜仲叶中绿原酸酶法提取工艺研究[J]. 食品与发酵科技,2019,55(5):1-4,9.

[21] 胡小祥,何艳,张霞,等. 高效液相色谱变波长法同时测定杜仲平压片中绿原酸和芦丁的含量[J]. 甘肃中医药大学学报,2020,37(4):10-14.

[22] 王燕,卢恒,邹晓菊,等. 金银花中绿原酸提取分离纯化方法研究进展[J]. 中华中医药学刊,2022,40(8):186-189.

# Determination of Chlorogenic Acid in *Eucommia* Male Flowers by HPLC

ZHU Yan<sup>1</sup>, LI Xianzhi<sup>1,2</sup>, MAO Qiongli<sup>1</sup>, YAN Ling<sup>1</sup>, SHI Hao<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, HU Yang<sup>1</sup>, CHEN Yanhe<sup>1</sup>

(1. Jing Brand Co., Ltd., Huangshi 435100, China; 2. Hubei Key Laboratory of Quality and Safety of Traditional Chinese Medicine Health Food, Huangshi 435100, China)

**Abstract:** In order to establish a rapid and simple method for the determination of chlorogenic acid in male flowers of *Eucommia ulmoides*, the chromatography was performed on Agilent-C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250.0 mm, 5 μm) with isometric elution of acetonitrile-0.4% acetic acid (10:90) at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> at 35 °C, single wavelength detection 327 nm. The stability and precision of the method were optimized through experiments. The results showed that the chlorogenic acid showed a good linear relationship ( $R^2=0.999\ 8$ ) and the average recovery was 97.30%. The treatment method of the test solution is environment-friendly, which can better reduce environmental pollution and protect the experimenters. The method has high precision and repeatability, and can be used as the determination of chlorogenic acid content in *Eucommia* male flowers.

**Keywords:** *Eucommia* male flower; chlorogenic acid; High Performance Liquid Chromatography (HPLC)