

文章编号: 1001-1498(2009)05-0744-03

## 杜仲种仁桃叶珊瑚苷含量的测定及积累规律

杜红岩<sup>1</sup>, 李钦<sup>2</sup>, 李福海<sup>1</sup>, 孙彦超<sup>2</sup>, 杜兰英<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院经济林研究开发中心, 河南 郑州 450003; 2. 河南大学中药研究所, 河南 开封 475004)

关键词: 杜仲种仁; 桃叶珊瑚苷; 含量测定; 积累规律

中图分类号: S759.3

文献标识码: A

### Determination, Formation and Accumulation of Aucubin in *Eucommia ulmoides* Seeds

DU Hong-yan<sup>1</sup>, LI Qin<sup>2</sup>, LI Fu-hai<sup>1</sup>, SUN Yan-chao<sup>2</sup>, DU Lan-ying<sup>1</sup>

(1. Non-Timber Forestry Research and Development Center, CAF, Zhengzhou 450003, He'nan China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, He'nan University, Kaifeng 475004, He'nan China)

**Abstract:** To establish a HPLC method to determine the content of aucubin in *Eucommia ulmoides* seeds, to search for the formation and accumulation of aucubin in *Eucommia ulmoides* seeds, and to provide foundation for the suitable harvest season of aucubin in *Eucommia ulmoides* seeds, the Hypersil GLOD-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with temperature at 25 °C was used. The mobile phase was methanol-water (8:92), at a flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, and the detective wavelength was 206 nm. The results indicated that the method of HPLC was efficient, and the average recovery of the aucubin in *Eucommia ulmoides* seeds was 98.61%, RSD = 1.14% (n = 6). The determination of aucubin was gradually raised with the seed growth, while the formation and accumulation from June 25th to September 5th increased slowly, and the determination of aucubin from September 5th to 25th raised quickly, and then kept relatively stable. Considering the extraction and utilization of aucubin, the date from September 25th to October 25th was the most suitable period for collecting *Eucommia ulmoides* seeds.

**Key words:** seed of *Eucommia ulmoides*; aucubin; determination; formation and accumulation

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 是我国特有的名贵经济树种, 杜仲皮、叶、果实、雄花等都是我国十分珍贵的药用、工业原料和新材料资源, 具有很高的经济价值<sup>[1-3]</sup>。杜仲果实包括杜仲果皮和种仁, 果皮中富含杜仲胶和多糖等, 对杜仲果皮内杜仲胶的形成积累规律及其群体变异规律、个体变异规律均已进行了系统研究<sup>[4-8]</sup>。而杜仲种仁中富含油脂、蛋白<sup>[9]</sup>、亚麻酸和多种生物活性物质。杜仲桃叶珊瑚苷 (AU) 是杜仲种仁中含量最高的一种环烯醚萜类活性成分, 具有护肝解毒<sup>[10]</sup>、抗炎<sup>[11]</sup>、抗氧化及

延缓衰老<sup>[12]</sup>、抗骨质疏松<sup>[13]</sup>、神经营养<sup>[14]</sup>等药理活性。在所有植物中, 杜仲种仁中桃叶珊瑚苷含量最高, 达 8% ~ 11%<sup>[1, 15]</sup>。桃叶珊瑚苷还存在于山茱萸科 (Comaceae) 和车前草属 (*Plantago* L.) 植物中<sup>[15]</sup>, 但对植物中桃叶珊瑚苷积累规律鲜有报道, 仅有杜仲雄花桃叶珊瑚苷积累的初步研究<sup>[16]</sup>, 随着雄花的开放, 桃叶珊瑚苷含量呈逐步降低的趋势; 而对杜仲种仁中桃叶珊瑚苷的形成积累规律尚未见报道。本文拟建立杜仲种仁中桃叶珊瑚苷的 HPLC 测定方法, 同时测定不同采收期的杜仲种仁中桃叶珊

收稿日期: 2008-12-04

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD18B03); 国家 948 项目 (2008-4-66); 河南省教育厅自然科学基金 (2008A360003)

作者简介: 杜红岩 (1963—), 男, 河南中牟人, 研究员, 博士, 博士生导师。主要从事杜仲培育技术与综合利用的研究。

瑚苷的含量,为杜仲种仁中桃叶珊瑚苷的有效利用和确定果实的适宜采收期提供参考依据。

## 1 试验材料

### 1.1 仪器

LC-2010A型高效液相色谱仪(日本岛津),紫外检测器(日本岛津),CLASS-VP色谱工作站(日本岛津),AG135电子天平(METLER TOLEDO,精确至十万分之一);KQ5200DA型数控超声波清洗机(江苏省昆山市超生仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

桃叶珊瑚苷对照品(日本和光纯药业株式会社提供,供含量测定用);甲醇为色谱纯(天津四友精细化工试剂厂),水为重蒸水;其余所用试剂均为分析纯。

### 1.3 果实(种仁)样品采集

杜仲种仁均采自中国林业科学研究院经济林研究开发中心商丘梁园区国有林场杜仲研究基地,采集的果实均来自同一杜仲良种(华仲6号),选择典型样株6株,2007年6月5日—2007年10月25日每天采集杜仲果实1次,共采样15次,每次选择树冠中部外围结果枝随机采集杜仲果实各100g,采集后至室内干燥处自然风干,然后剥取杜仲种仁备用。

## 2 试验方法

### 2.1 色谱条件

Hypersil GLOD-C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(美瑞泰克科技有限公司);保护柱:JadeGuard(大连依利特分析仪器有限公司);流动相为甲醇-水(8:92);柱温为25℃;检测波长为206 nm;流速为1.0 mL · min<sup>-1</sup>;进样量:5 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取桃叶珊瑚苷对照品5.35 mg置10 mL的量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

杜仲种仁研细,取约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇溶液25 mL,称定质量,超声处理1.5 h,放冷至室温,再称定质量,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,再经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

## 3 结果与分析

### 3.1 线性关系考察

分别精密吸取桃叶珊瑚苷对照品溶液(0.535

mg · mL<sup>-1</sup>)1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 μL注入色谱仪中,以吸收峰面积为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为  $y = 1\ 180\ 604.99x + 83\ 644.77$ ,  $r = 0.999\ 9$ ,线性范围为0.535 ~ 8.56 μg。

### 3.2 精密度和稳定性

精密吸取对照品溶液5 μL,照上述色谱条件,重复进样6次,测定桃叶珊瑚苷峰面积,结果RSD(相对标准偏差)为1.17%。

精密称取杜仲种仁适量(批号:070925),照2.3项下的方法制备供试品溶液,按上述色谱条件,分别于0, 2, 4, 6, 8 h,进样5 μL,测定,桃叶珊瑚苷峰面积积分值RSD为1.63%,说明供试品溶液中桃叶珊瑚苷8 h内稳定。

### 3.3 重复性和加样回收率

精密称取已测含量的杜仲种仁(批号:070925)适量,6份,按2.3项下的方法制备供试品溶液,照上述色谱条件测定,按桃叶珊瑚苷的含量计算RSD为0.94%,表明重复性良好。

精密称取已知含量的杜仲种仁(批号:070925)适量,6份,分别加入一定量的对照品溶液,按2.3项下的方法制备供试品溶液,照上述色谱条件测定,计算桃叶珊瑚苷平均加样回收率为98.61%,RSD为1.14%。

### 3.4 种仁中桃叶珊瑚苷的含量测定及其积累规律

分别精取各样品溶液5 μL,按2.1色谱条件测定,以外标法按峰面积计算样品的含量,实验重复3次,取其平均值。结果见图1、图2和表1。测定结果表明,杜仲种仁中桃叶珊瑚苷含量随着果实的生长不断发生变化。由表1可以看出,从6月25日开始,杜仲种仁中桃叶珊瑚苷含量总体呈逐步增加的趋势,而从9月15日—9月25日有一个快速增长的过程,桃叶珊瑚苷含量从87.0 mg · g<sup>-1</sup>迅速提高到

表 1 不同采收期杜仲种仁桃叶珊瑚苷含量

采收期	种仁干粒质量/g	桃叶珊瑚苷含量/(mg · g <sup>-1</sup> )
2007-06-25	4.86	62.3
2007-07-05	6.52	81.7
2007-07-15	9.29	83.5
2007-07-25	11.37	73.6
2007-08-05	14.01	85.9
2007-08-15	14.95	79.5
2007-08-25	16.52	84.8
2007-09-05	19.07	84.4
2007-09-15	21.23	87.0
2007-09-25	23.75	113.0
2007-10-05	24.65	109.4
2007-10-15	23.29	111.2
2007-10-25	24.52	113.1

113.0 mg · g<sup>-1</sup>, 9月 25日—10月 25日桃叶珊瑚苷含量基本趋于稳定。而从杜仲种仁生长发育规律来看(表 1),种仁千粒质量随果实的生长稳步提高,9月 25日以后种仁千粒质量达到高峰并基本保持稳定,这与“杜仲种子的生长进入 9月中旬以后,果实千粒质量变化不大,果实(种仁)生长基本结束<sup>[4]</sup>”的结论一致。从提取和利用桃叶珊瑚苷的角度考虑,从 9月 25日开始就可以采集杜仲的果实。

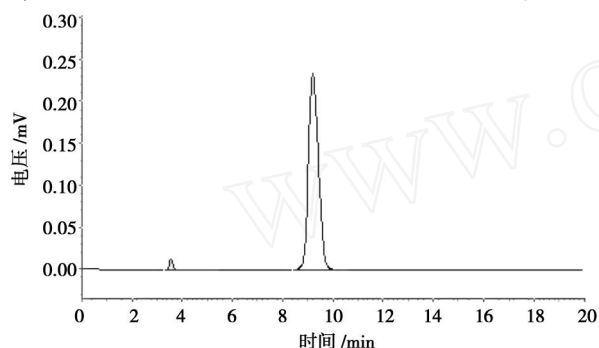


图 1 桃叶珊瑚苷对照品溶液 HPLC图

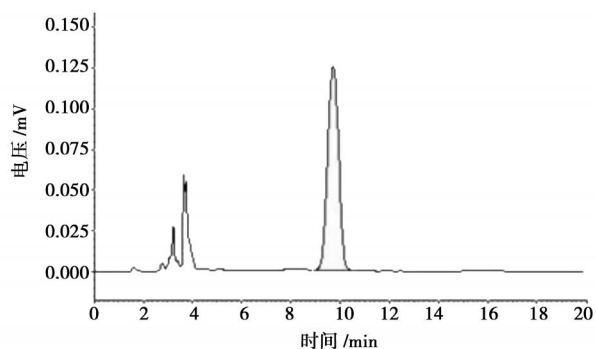


图 2 杜仲种仁供试品溶液 HPLC图

## 4 小结与讨论

本文建立的杜仲种仁中桃叶珊瑚苷的 HPLC 测定分析方法可行,供试品溶液中桃叶珊瑚苷可达到理想的分离。

杜仲种仁是杜仲中桃叶珊瑚苷含量最高的器官(部位),本研究测定的成熟杜仲种仁桃叶珊瑚苷含量高达 11%以上,具有较大的开发潜力和良好的应用前景<sup>[1,9,15]</sup>。实验结果显示,不同采收期的杜仲种仁桃叶珊瑚苷的含量有明显差异。杜仲种仁中桃叶珊瑚苷的含量从 9月 25日—10月 25日均保持较高的水平。根据杜仲果实和种仁的生长发育情况,在 9月中旬以后果实和种仁基本停止生长,产果量和种仁产量达到高峰并保持稳定<sup>[4]</sup>。从提取和利用桃叶珊瑚苷的角度考虑,9月 25日—10月 25日为采集杜仲果实的适宜时期,这与实际生产中杜仲种子的

的采收期吻合<sup>[1]</sup>。

在河南商丘,杜仲果实中胚的形成从 6月 5日以后开始,胚形成之初生长速度较慢,6月 5日和 6月 15日所采集的杜仲果实风干后没有能够取到种仁样品。因此,种仁样品中桃叶珊瑚苷的含量从 6月 25日开始测定。

桃叶珊瑚苷含量的变化是由桃叶珊瑚苷的特殊结构所决定的,易被氧化分解,与光照、温度等因素的相关性,有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 李芳东,杜红岩. 杜仲 [M]. 北京:中国中医药出版社, 2001: 232 - 256
- [2] 杜红岩,赵 戈,卢绪奎. 论我国杜仲产业化与培育技术的发展 [J]. 林业科学研究, 2000, 13(5): 554 - 561
- [3] 杜红岩,王俊鸿,杜兰英. 杜仲高技术产品产业化的研究与开发 [J]. 经济林研究, 2001, 19(2): 18 - 21
- [4] 杜红岩,杜兰英,李芳东. 杜仲果实内杜仲胶形成积累规律的研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(2): 185 - 191
- [5] 杜红岩,李芳东,杜兰英. 不同产地杜仲果实含胶量的差异及其相关性分析 [J]. 林业科学, 2006, 42(3): 35 - 39
- [6] 谢碧霞,杜红岩,杜兰英,等. 不同变异类型杜仲果实含胶量变异研究 [J]. 林业科学, 2005, 41(6): 144 - 146
- [7] 杜红岩,杜兰英,李芳东,等. 杜仲果实含胶特性的个体变异规律 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(6): 706 - 710
- [8] 杜红岩,乌云塔娜,杜兰英. 杜仲高产胶良种的选育 [J]. 中南林业学院学报, 2006, 26(1): 6 - 10
- [9] 朱莉伟,陈素文,蒋建新,等. 杜仲种仁化学成分研究 [J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(2): 41 - 42
- [10] Chang IM. Liver-protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1998, 102(2): 189 - 204
- [11] Egan L J, Tonuner NF-kappaB signaling: pros and cons of altering NF-kappaB as a therapeutic approach [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1072: 114 - 122
- [12] Ho J N, Lee Y H, Park J S, et al. Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(7): 1244 - 1248
- [13] Ha H, Ho J, Shin S, et al. Effects of *Eucommiae cortexon* osteoblast-like cell proliferation and osteoclast inhibition [J]. Arch Pharm Res, 2003, 26(11): 929 - 936
- [14] Yamazaki M, Chiba K, Mohri T, et al. Neurogenic effect of natural iridoid compounds on PC12h cells and its possible relation to signaling protein [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19(6): 791 - 795
- [15] 朱 媛,王亚琴. 桃叶珊瑚苷的研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 947 - 949
- [16] 董娟娥,梁宗锁,张康健,等. 杜仲雄花中次生代谢物合成积累的动态变化 [J]. 植物资源与环境, 2005, 14(4): 7 - 10