

不同产地初加工方式处理杜仲叶的 HPLC 指纹图谱研究

严瑞娟^{1,2}, 张水寒^{2*}, 罗跃龙^{1*}, 蔡萍², 肖娟², 万丹²

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中医药研究院 中药新药研究与开发重点实验室, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 对不同产地初加工方式处理杜仲叶进行 HPLC 指纹图谱的比较研究, 阐明不同初加工方式对杜仲叶化学成分的影响, 以期筛选出适合杜仲叶的产地初加工方式。方法 对所采集的杜仲鲜叶以不同的产地初加工方式进行加工处理, 并采用 HPLC 法, 建立用以评价初加工方式优劣的指纹图谱体系。色谱条件: 以 Promosil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 扫描波长 200~400 nm, 检测波长 208 nm, 柱温 25 °C, 体积流量 0.8 mL/min。结果 系统研究了杜仲叶的不同产地初加工方式, 并建立了评价其优劣的杜仲叶 HPLC 指纹图谱, 确定了 22 个主要共有峰, 但是各共有峰峰面积相差较大, 绿原酸、京尼平苷酸等主要有效成分的量有明显差异。结论 建立的 HPLC 指纹图谱分析法可同时用于有效成分的定量测定, 该方法重复性好、可操作性强, 可较全面地反映不同产地初加工方式处理的杜仲叶间的差异。

关键词: 杜仲叶; 初加工; 绿原酸; 京尼平苷酸; HPLC 指纹图谱

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)15-2085-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.012

Comparison on HPLC fingerprint of *Eucommiae Folium* obtained from different habitats and by various original processing techniques

YAN Rui-juan^{1,2}, ZHANG Shui-han², LUO Yue-long¹, CAI Ping², XIAO Juan², WAN Dan²

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Laboratory of Chinese Materia Medica Research and Development, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To illustrate the influences of various original processing techniques on chemical composition of *Eucommiae Folium* from different habitats by comparing HPLC fingerprint profiles, so as to select the suitable techniques for processing *Eucommiae Folium*. **Methods** To evaluate the quality of *Eucommiae Folium* with the various processing techniques by HPLC fingerprint. The analysis was performed on the Promosil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. Acetonitrile-0.1% H₃PO₄ was used as the mobile phase with gradient elution. The scanned wavelength was from 200 to 400 nm, and the detection wavelength was at 208 nm. The flow rate was set at 0.8 mL/min. The column temperature was set at 25 °C. **Results** The HPLC fingerprint profiles of *Eucommiae Folium* by the various processing techniques which were systematically researched were investigated. A total of main 22 common peaks were found, but the areas of the peaks were significantly different. The contents of chlorogenic acid and geniposidic acid obtained by the various processing techniques had the evident differences. **Conclusion** HPLC fingerprint technique with the application to the content determination of the active ingredients has the good reproducibility and maneuverability. It is one of the potential process analytical techniques to explore the ingredient differences in the processed *Eucommiae Folium* from different habitats.

Key words: *Eucommiae Folium*; original processing; chlorogenic acid; geniposidic acid; HPLC fingerprint

收稿日期: 2013-02-27

基金项目: 国家科技支撑计划课题 (SQ2010BAJY1411-08)

作者简介: 严瑞娟 (1987—), 女, 河南周口人, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂及分析。Tel: 13787103294 E-mail: yanruijuan52162@126.com

*通信作者 张水寒, 女, 研究员, 研究方向为中药制剂及分析。E-mail: zhangshuihan0220@126.com

罗跃龙, 男, 副教授, 研究方向为中药炮制。

网络出版时间: 2013-07-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130715.1338.002.html>

杜仲叶 *Eucommiae Folium* 为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥叶, 具有补肝肾、强筋骨的功效^[1], 是药食两用的中药材, 富含绿原酸等苯丙素类, 京尼平苷酸、京尼平苷、桃叶珊瑚苷等环烯醚萜类, 松脂醇二葡萄糖苷等木脂素类, 芦丁等黄酮类等多种有效成分^[2-7]。但杜仲叶采摘鲜运困难, 因此其产地初加工方式, 直接影响到药材的质量及深度开发, 其初加工方式的选择也成为 GAP 实践中的关键问题之一。《中国药典》2010 年版一部中规定杜仲叶的产地初加工方式为晒干或低温烘干。但其理论依据是什么, 以上 2 种技术是否为最佳初加工方式, 不同初加工方式对杜仲叶有效成分的影响究竟有多大, 这些问题都亟待解决。鉴于此, 本实验以杜仲叶为研究对象, 通过 HPLC 指纹图谱的建立和绿原酸、京尼平苷酸分量及醇浸出物量的测定, 首次系统比较分析了不同初加工方式对杜仲叶品质的影响, 以期筛选出适于杜仲叶药材的产地初加工技术, 为提高和控制杜仲叶的质量奠定理论和技术基础。

1 仪器与材料

LC—10ATVP 高效液相色谱仪 (配备 SPD—M10AVP 光电二极管阵列检测器和 CLASS-VP 色谱工作站, 日本岛津); AE240 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); KQ3200 型超声波清洗器 (江苏昆山市超声仪器有限公司); SQ2119B 型多功能食品粉碎机 (上海帅佳电子科技有限公司); 格兰仕 G8023YSL—V1 型微波炉 (佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司); DHG—9240A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精密实验设备有限公司); SK2103 电磁炉 (美的集团)。

对照品绿原酸 (批号 110753-200413, 质量分数 >98%)、京尼平苷 (批号 110749-200613, 质量分数 >98%)、咖啡酸 (批号 110885-200302, 质量分数 >98%) 均购自中国药品生物制品检定所, 桃叶珊瑚苷 (批号 MUST-11091601, 质量分数 >98%)、松脂醇二葡萄糖苷 (批号 MUST-12021001, 质量分数 >98%)、京尼平苷酸 (批号 MUST-11121502, 质量分数 >98%)、芦丁 (批号 MUST-11040302, 质量分数 >98%) 均购自成都曼思特生物科技有限公司。乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 磷酸 (色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心); 水为双蒸水; 其余试剂均为分析纯。杜仲叶鲜品于 2012 年 7 月采自湖南省长沙市含浦镇, 经湖南省中医药研究

院中药研究所谢昭明研究员鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的新鲜叶。

2 方法

2.1 不同初加工方式处理杜仲叶样品的制备

通过参考文献方法^[8]及预试验筛选, 本实验采用了下述几类初加工方式。

2.1.1 自然阴干、晒干 取杜仲叶鲜品 2 份, 每份 50 g, 分别于室内通风处自然阴干、日光下晒干, 备用。

2.1.2 蒸制 于直径 56 cm 不锈钢锅内加 1.5 L 蒸馏水, 开始沸腾后 5 min, 取杜仲叶鲜品 3 份, 每份 50 g, 平铺于不锈钢制篦子上分别蒸 5、10、20 min, 取出擦干, 再自然阴干备用。

2.1.3 烫制 取杜仲叶鲜品 5 份, 每份 50 g, 分别于沸水中烫漂 1、2.5、5、10、20 min, 取出擦干, 再自然阴干备用。

2.1.4 炒制 取杜仲叶鲜品 9 份, 每份 50 g, 置于直径为 56 cm 的炒锅内, 在电磁炉上分别于 100、130、160 °C 下炒制, 每个温度下各炒 1、3、5 min, 取出, 自然阴干备用。

2.1.5 烘制 取杜仲叶鲜品 9 份, 每份 50 g, 分别平铺于瓷托盘上, 放入电热鼓风干燥箱内, 分别于 80、100、120 °C 下加热, 每个温度下各加热 10、20、30 min, 取出, 自然阴干备用。

2.1.6 微波制 取杜仲叶鲜品 9 份, 每份 50 g, 分别平铺于微波炉玻璃托盘上在低、中、高火力加热, 不同火力下各加热 1、2.5、5 min, 取出, 自然阴干备用。

将以上不同初加工方式制得的样品及杜仲叶鲜品进行编号, 具体见表 1。

2.2 不同初加工处理的杜仲叶样品 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Promosil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱时间为 75 min: 0~40 min, 6%~16%乙腈; 40~75 min, 16%~28%乙腈; 扫描波长 200~400 nm, 检测波长 208 nm, 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷、咖啡酸、松脂醇二葡萄糖苷和芦丁对照品适量, 制成对照品储备液冷藏备用; 再分别吸取一定量对照品储备液, 加甲醇制成质量浓度分别为桃叶珊瑚苷 0.61 mg/mL、

表1 不同初加工方式处理的杜仲叶样品
Table 1 Various original processing techniques for *Eucommiae Folium* samples

编号	初加工方式	编号	初加工方式
S1	自然阴干	S20	80℃烘 10 min
S2	晒干	S21	80℃烘 20 min
S3	蒸 5 min	S22	80℃烘 30 min
S4	蒸 10 min	S23	100℃烘 10 min
S5	蒸 20 min	S24	100℃烘 20 min
S6	烫 1 min	S25	100℃烘 30 min
S7	烫 2.5 min	S26	120℃烘 10 min
S8	烫 5 min	S27	120℃烘 20 min
S9	烫 10 min	S28	120℃烘 30 min
S10	烫 20 min	S29	低火力微波 1 min
S11	100℃炒 1 min	S30	低火力微波 2.5 min
S12	100℃炒 3 min	S31	低火力微波 5 min
S13	100℃炒 5 min	S32	中火力微波 1 min
S14	130℃炒 1 min	S33	中火力微波 2.5 min
S15	130℃炒 3 min	S34	中火力微波 5 min
S16	130℃炒 5 min	S35	高火力微波 1 min
S17	160℃炒 1 min	S36	高火力微波 2.5 min
S18	160℃炒 3 min	S37	高火力微波 5 min
S19	160℃炒 5 min	S38	新鲜叶 (无处理)

京尼平苷酸 0.62 mg/mL、绿原酸 0.62 mg/mL、京尼平苷 0.62 mg/mL、咖啡酸 0.49 mg/mL、松脂醇二葡萄糖苷 0.60 mg/mL 和芦丁 0.64 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 参照文献所述方法^[9], 分别取不同初加工方式制得的杜仲叶样品适量, 粉碎后过 3 号筛。取过筛粉末约 1 g, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 40 min, 放冷。再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。新鲜杜仲叶取约 4.1 g (以干燥品计 1 g), 直接剪碎后同法处理。

2.2.4 精密度考察 精密吸取 S31 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算 22 个主要共有峰保留时间的 RSD 均小于 0.37%, 峰面积的 RSD 均小于 2.65%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 精密称取 S31 样品 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 计算 22 个主要

共有峰保留时间的 RSD 均小于 0.55%, 峰面积的 RSD 均小于 3.15%, 表明该实验采取的分析方法和提取工艺具有可靠性和稳定性。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取 S31 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录色谱图, 计算 22 个主要共有峰保留时间的 RSD 均小于 0.46%, 峰面积的 RSD 均小于 2.82%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3 绿原酸、京尼平苷酸的定量测定

2.3.1 色谱条件 同“2.2.1”项所述色谱条件。

2.3.2 线性关系考察 分别精密量取“2.2.2”项下绿原酸、京尼平苷酸对照品储备液适量, 加甲醇制成质量浓度分别为京尼平苷酸 0.62 mg/mL、绿原酸 0.62 mg/mL 的对照品溶液。分别精密吸取绿原酸对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定。分别精密吸取京尼平苷酸对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定。以对照品进样量为横坐标 (X), 相应色谱峰峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程: 绿原酸 $Y=2 \times 10^6 X+854 174$, $r=0.999 5$; 京尼平苷酸 $Y=600 050 X+267 178$, $r=0.999 3$, 表明绿原酸和京尼平苷酸均在 1.24~12.4 μg 与峰面积成良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 精密吸取 S31 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算绿原酸、京尼平苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.05%、1.32%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 精密称取 S31 样品 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 计算绿原酸、京尼平苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.25%、1.87%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 精密吸取 S31 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录峰面积, 计算绿原酸、京尼平苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.12%、1.46%, 表明供试品溶液中绿原酸、京尼平苷酸在 24 h 内基本稳定。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已测定的 S31 样品 6 份, 每份 0.8 g, 分别精密加入绿原酸对照品 6.0 mg 和京尼平苷酸对照品 5.2 mg, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 结果绿原酸、京尼平苷酸的平均回收率分别为 98.2%、102.3%, RSD 分别为 1.17%、1.04%。

2.3.7 样品测定 分别精密吸取各批杜仲叶的供试品溶液 10 μL , 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 计算样品中绿原酸和京尼平苷酸的量。

2.4 醇溶性浸出物的测定

取各批杜仲叶样品, 粉碎, 过 3 号筛, 精密称定供试品约 2 g (杜仲叶鲜品取约 8 g, 直接剪碎), 置 250 mL 锥形瓶中, 精密加水 100 mL, 按《中国药典》2010 年版一部附录 XA 醇溶性浸出物测定法(热浸法)测定, 用稀乙醇作溶剂, 以干燥品计算样品中醇溶性浸出物量。

3 结果

3.1 HPLC 特征指纹图谱的建立及其相似度评价

取 38 批杜仲叶样品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 得到的 HPLC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)版》软件, 以 S1 号样品图谱作为参照, 进行图谱匹配, 对各样品色谱图的原始数据文件进行分析, 确定了 22 个主要共有色谱峰, 并进行了相似度计算, 38 批杜仲叶样品的色谱图见图 1。混合对照品和杜仲叶样品的共有模式的 HPLC 色谱图见图 2-A、B。指认其中 7 个共有峰, 分别为桃叶珊瑚苷(1

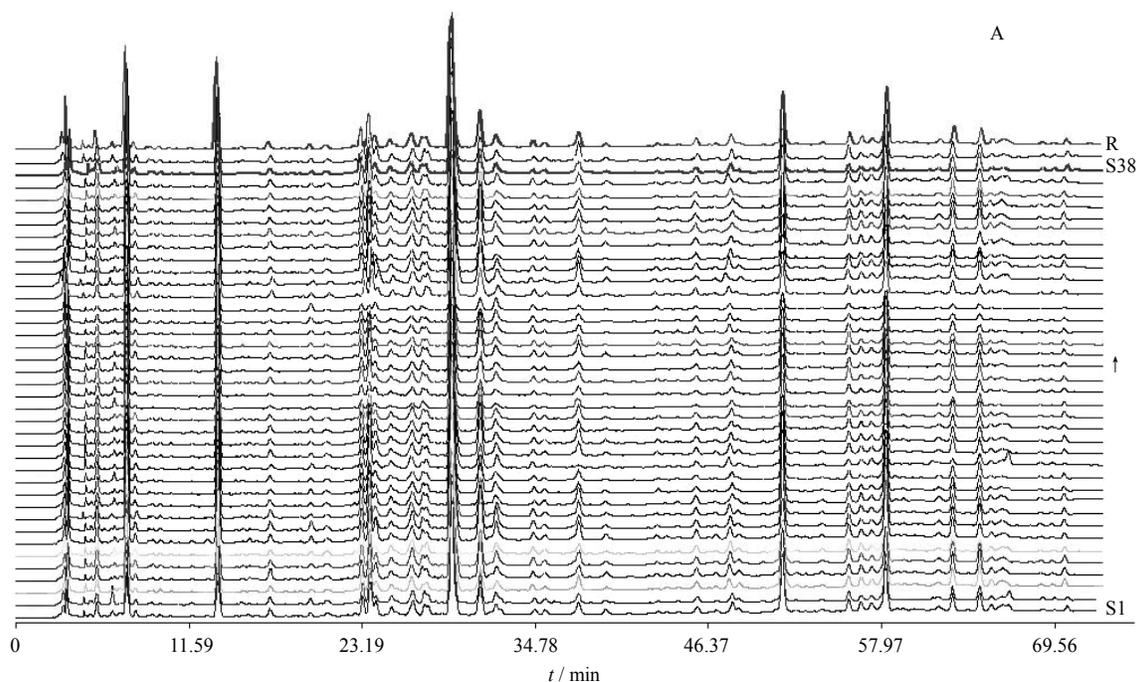
号峰)、京尼平苷酸(2 号峰)、绿原酸(7 号峰)、京尼平苷(10 号峰)、咖啡酸(11 号峰)、松脂醇二葡萄糖苷(14 号峰)和芦丁(17 号峰)。

3.2 聚类分析

利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)版》软件将得到的 38 批杜仲叶样品的 22 主要共有色谱峰的峰面积导入 SPSS 16.0 软件, 然后采用层次聚类分析方法中的 Q 型聚类法, 可将样品划分为 3 大类(图 3), 即 S38 为 1 类, S9、S10、S20、S21、S22 为 1 类, 余下的其他样品为 1 类。

3.3 绿原酸、京尼平苷酸的量及醇溶性浸出物量的测定

取 38 批杜仲叶样品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算绿原酸和京尼平苷酸的量; 按照“2.4”项下方法对各批样品中醇溶性浸出物的量进行测定。为便于对数据进行分析, 根据 3 组数据指标的重要性给出指标的权重系数, 综合评分后再比较。依据 3 指标的相对重要性构成的两两比较判断优先矩阵见表 2。对比打分“1”代表同等重要(即两者对综合评分贡献相同); “2”代表同等重要与略为重要程度的中间值; “3”代表略为重要(即其中 1 个比另 1 个

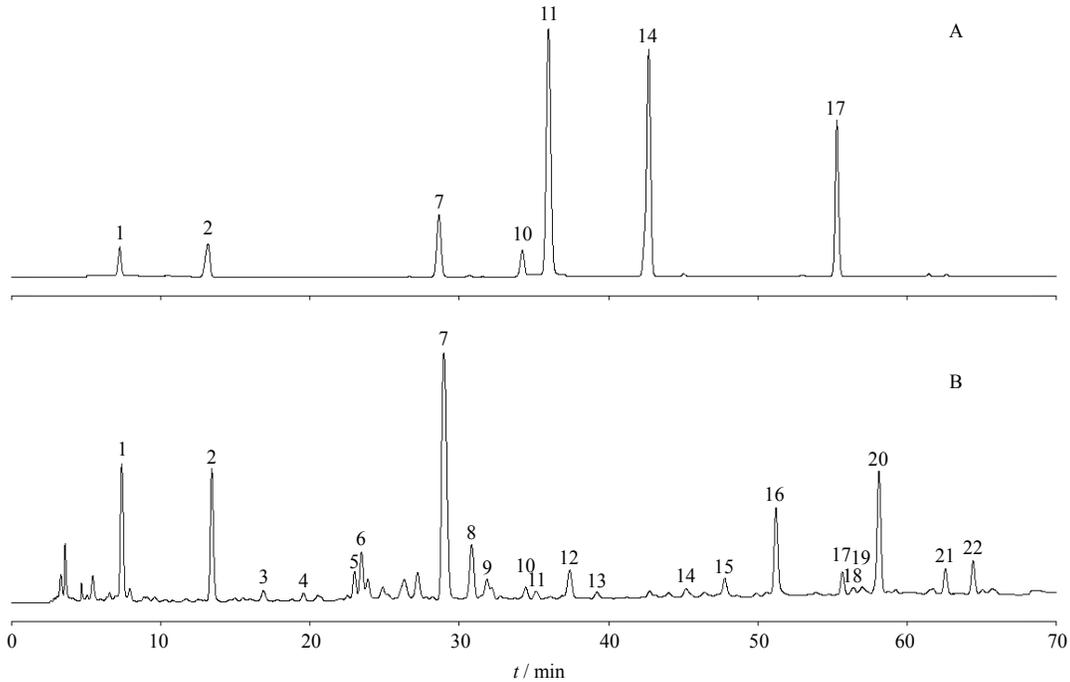


R-38 批杜仲叶样品共有模式

R-common mode of 38 batches of *Eucommiae Folium* samples

图 1 38 批杜仲叶样品的 HPLC 特征指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints for 38 batches of *Eucommiae Folium* samples



1-桃叶珊瑚苷 2-京尼平昔酸 7-绿原酸 10-京尼平昔 11-咖啡酸 14-松脂醇二葡萄糖苷 17-芦丁
1-aucubin 2-geniposidic acid 7-chlorogenic acid 10-geniposide 11-caffeic acid 14-pinoresinol diglucoside 17-rutin

图2 混合对照品 (A) 和杜仲叶样品共有模式 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms for mixed reference substances (A) and common mode of *Eucommiae Folium* samples (B)

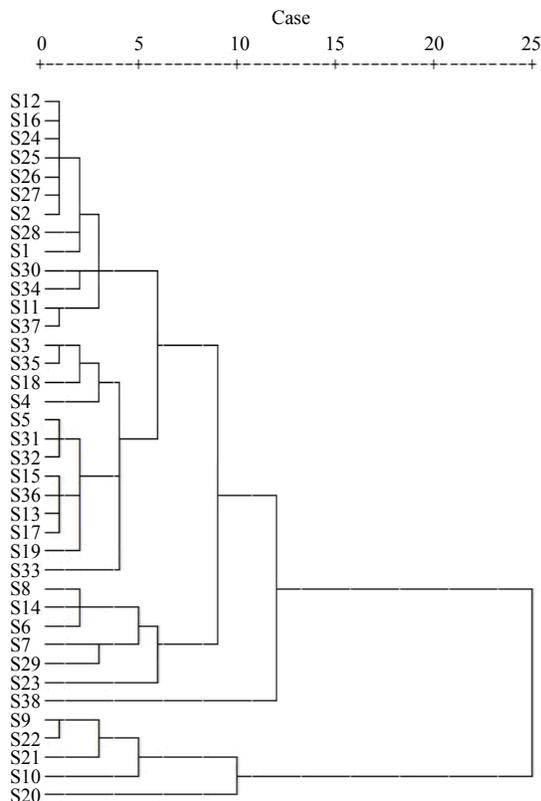


图2 38批杜仲叶样品聚类图

Fig. 2 Cluster analysis for 38 batches of *Eucommiae Folium* samples

对综合评分贡献稍大)。权重系数计算公式如下：

$$w_i' = (a_{i1}a_{i2}a_{i3} \cdots a_{im})^{1/m}$$

$$w_i = w_i' / \sum_{i=1}^m w_i'$$

$$\lambda_{\max} = 1/m \sum_{i=1}^m \left(\sum_{j=1}^m a_{ij} w_j / w_i \right)$$

$$CI = (\lambda_{\max} - m) / (m - 1)$$

$$CR = CI / RI$$

a_{im} 为两两比较矩阵第 i 行第 m 列的元素值, m 为指标数目, 此处 $m=3$; w' 为初始权重系数, w 为归一化权重系数; λ_{\max} 为矩阵的最大特征根; a_{ij} 为两两比较矩阵第 i 行第 j 列的元素值; CR 为随机一致性比例, CI 为一致性指标, RI 为平均随机一致性指标, 此处 RI 为 0.58

确定的权重系数分别为绿原酸 0.539 6、京尼平昔酸 0.297 0、醇浸出物 0.163 4。经一致性检验, 判

表2 两两比较判断优先矩阵

Table 2 Prior matrix based on pairwise comparison

评价指标	绿原酸	京尼平昔酸	醇溶性浸出物
绿原酸	1	2	3
京尼平昔酸	1/2	1	2
醇溶性浸出物	1/3	1/2	1

别矩阵的一致性比例 $CR=0.008<0.10$, 表明权重系数的确定合理^[10]。综合评分 = $100 \times [(样品绿原酸量/绿原酸最大值) \times 0.539 6 + (样品京尼平苷酸量/京尼平苷酸最大值) \times 0.297 0 + (样品浸出物量/浸出物量最大值) \times 0.163 4]$ 。综合评分结果见表 3。综合评分较高的, 说明样品质量较好, 反之则较差。

通过表 3 显示结果可以看出, 80 °C 烘 10 min (S20)、20 min (S21)、30 min (S22) 及烫 10 min (S9)、20 min (S10) 的综合评分均较低, 尤其是绿原酸的量普遍较低, 说明这几种初加工方式处理的杜仲叶样品质量较差, 图 2 聚类分析结果也显示归为 1 类。而蒸制效果普遍较好; 烘制方式中, 100、120 °C 较好, 炒制和微波制方法的综合评分均较高。

表 3 38 批杜仲叶样品的特征指纹图谱相似度和绿原酸、京尼平苷酸、醇溶性浸出物的量

Table 3 Similarity and contents of chlorogenic acid, geniposidic acid, and ethanol-soluble extracts in 38 batches of *Eucommiae Folium* samples

编号	相似度	绿原酸 / %	京尼平苷酸 / %	浸出物 / %	综合评分	编号	相似度	绿原酸 / %	京尼平苷酸 / %	浸出物 / %	综合评分
S1	0.979	2.60	2.90	41.32	75.68	S20	0.972	2.09	1.51	41.32	58.64
S2	0.989	2.80	2.85	42.12	79.03	S21	0.978	1.68	2.15	40.90	55.78
S3	0.991	2.85	3.93	43.18	86.82	S22	0.927	1.20	1.92	37.91	45.30
S4	0.985	3.11	3.15	44.10	86.63	S23	0.966	2.51	4.32	43.48	83.74
S5	0.989	3.13	2.50	44.53	83.14	S24	0.996	2.67	3.07	44.86	79.10
S6	0.978	2.28	3.44	40.25	73.34	S25	0.995	2.67	3.02	44.73	78.81
S7	0.946	2.28	4.40	37.37	78.26	S26	0.992	2.67	2.81	43.63	77.17
S8	0.969	1.93	3.07	29.89	61.55	S27	0.992	2.61	3.01	44.15	77.52
S9	0.958	1.44	2.08	26.89	46.31	S28	0.988	2.53	3.25	44.00	77.61
S10	0.922	0.92	1.50	18.99	31.23	S29	0.956	2.10	4.67	43.26	79.11
S11	0.994	2.22	2.67	39.62	67.42	S30	0.986	2.61	2.56	42.30	74.11
S12	0.993	2.63	2.82	40.76	75.45	S31	0.987	3.04	2.61	44.85	82.44
S13	0.994	2.99	2.96	43.40	83.33	S32	0.989	3.09	2.96	44.62	85.30
S14	0.964	1.97	3.23	40.32	67.00	S33	0.965	2.64	2.51	41.83	74.17
S15	0.993	2.84	3.11	43.83	81.95	S34	0.992	2.64	2.42	42.34	73.82
S16	0.994	2.66	2.93	43.72	77.80	S35	0.991	2.65	3.62	44.37	82.06
S17	0.993	3.07	3.02	44.25	85.37	S36	0.991	2.81	3.23	44.91	82.52
S18	0.974	3.00	4.20	42.21	90.71	S37	0.982	2.41	2.55	40.96	70.25
S19	0.981	2.85	2.58	41.30	77.84	S38	0.994	3.26	4.81	45.73	100.00

4 讨论

本实验在首次系统全面考察杜仲叶不同产地初加工方式的基础上, 建立了可同时用于构建 HPLC 指纹图谱和定量检测的高效液相色谱分析方法, 对不同初加工方式的优劣进行了比较。实验结果表明, 所建立的方法重复性好、可操作性强, 比较全面、直观地反映了不同初加工方式处理的杜仲叶质量差异, 可用于对杜仲叶药材的定性鉴别和定量研究。

实验分别比较了甲醇、乙醇、50%甲醇、50%乙醇等提取溶剂, 超声、回流等不同提取方法, 甲醇-0.1%乙酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-

0.1%乙酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液等不同流动相, 以及 DAD UV 200~400 nm 下各波长的扫描结果, 表明 50%甲醇超声提取率高, 且以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 在 208 nm 波长下检测, 图谱基线平稳、色谱峰较多、各个色谱峰的分离效果较好、操作简便等特点, 能够反映出杜仲叶组分的全貌。

通过比较 38 批不同初加工方式的杜仲叶样品及鲜品 HPLC 图谱发现, 在产地、品种、采收时间等因素都相同的情况下, 采取不同的初加工方式所得的杜仲叶样品成分之间既有相似性又有不同点,

其中所含化学成分类别大致相同,但各种化学成分的色谱峰面积却相差较大,整体峰面积及绿原酸、京尼平苷酸等有效成分的量在通过适当的初加工后,与阴干或低温烘干相比均得到了极大地改善。同时,杜仲叶中的绿原酸等活性物质在自然阴干的条件下易被生物活性酶破坏,同时这些苯丙素类及环烯醚萜等化合物热稳定性差,温度过高反而会造成分解损失。因此,在杜仲叶药材的利用上,绝对不能忽视产地初加工对其质量的重要影响。研究结果发现,在烫制过程中,随着时间的延长,综合评分呈现明显降低的趋势,这与有效成分溶解流失和高温破坏有关;烘制方法中,80℃烘制的杜仲叶样品中绿原酸的量普遍低于100℃和120℃,这可能与绿原酸本身结构性质有关,因其易在多酚氧化酶的作用下氧化缩合,而80℃不能使多酚氧化酶在短时间内失活,故绿原酸的量迅速下降^[11],可见《中国药典》2010年版所规定的杜仲叶初加工方法并不是最佳的方式。微波条件能使杜仲叶鲜品在短时间内快速升温,从而可以短时间内达到杀青的效果,保证了杜仲叶的品质。总体而言,蒸制、微波及适当高温(100~120℃)烘制的效果较其他初加工方式好,品质与鲜叶非常接近。在本实验所研究的初加工方法中,蒸制和烫能耗高、操作不方便,效果一般,炒制外观较差,产品质量不易控制;烘制和微波制因其操作简单、效果好、运用容易而便于推广。

为提高杜仲叶药材的有效利用率,必须选择高效、稳定、可靠的初加工方式并加以规范,才能从源头上避免药材资源的无形损失。本实验为筛选适用于杜仲叶的产地初加工方式,提高和控制杜仲叶药材质量奠定了理论和技术依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 王俊丽. 杜仲的研究与应用 [J]. 中草药, 1993, 24(12): 655-658.
- [3] Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, *et al.* Studies on the constituents of *Eucommia ulmoides* iridoids from the leaves [J]. *Nat Med*, 1997, 51(2): 275-277.
- [4] 韩宇东, 李文娜. 杜仲的化学成分和药理活性及临床应用研究新进展 [J]. 中国实用医学杂志, 2010, 20(5): 3-5.
- [5] Hirata T, Kobayashi T, Wada A, *et al.* Anti-obesity compounds in green leaves of *Eucommia ulmoides* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(6): 1786-1791.
- [6] Dai X P, Huang Q, Zhou B T, *et al.* Preparative isolation and purification of seven main antioxidants from *Eucommia ulmoides* Oliv. (Du-zhong) leaves using HSCCC guided by DPPH-HPLC experiment [J]. *Food Chem*, 2013, 139(1/4): 563-570.
- [7] Wang J L, Liu E W, Wu S, *et al.* Development of HPLC method to evaluate drug-processing technique of *Eucommiae Cortex* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 221-225.
- [8] 张强, 苏印泉, 苑子夜, 等. 杀青工艺对杜仲叶抗氧化活性的影响 [J]. 北方园艺, 2011(23): 157-160.
- [9] 杜红岩, 刘昌勇, 李钦, 等. 杜仲叶中3种主要活性成分含量的季节变化 [J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(8): 6-9.
- [10] 王冬梅, 吕振江, 王永红, 等. 多指标综合评价玉竹蜜蒸炮制工艺研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1934-1938.
- [11] 段晓颖. 金银花水提工艺中绿原酸变化的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1189-1190.