

不同产地杜仲叶中5种主要有效成分的含量比较

刘荣华*, 唐芳瑞, 陈兰英, 邵峰, 李于益, 张忠立, 黄慧莲
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的:比较17个不同产地杜仲叶中5种主要有效成分的含量差异。方法:利用高效液相色谱法(HPLC)测定桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、儿茶素、芦丁的含量,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~45 min,5%~15% A; 45~85 min,15%~24% A),检测波长208 nm。考察不同产地杜仲叶中5种有效成分的含量差异。结果:不同产地杜仲叶中5种主要有效成分总量及各有效成分含量之间均存在显著差异,其中采自陕西省黄陵县的杜仲叶中5种有效成分总质量分数高达14.15%,而采自四川省渠县的杜仲叶仅1.37%,两者相差>10倍。结论:杜仲叶中主要有效成分含量存在一定的地域性差异,其中陕西、河南等地样品中含量明显高于西南地区(如四川、重庆、贵州等)。杜仲叶应尽量采取低温快速干燥。

[关键词] 杜仲叶; 桃叶珊瑚苷; 京尼平苷酸; 绿原酸; 儿茶素; 芦丁

[中图分类号] R284.1;R282.4;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0031-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180031

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150806.1722.004.html>

[网络出版时间] 2015-08-06 17:22

Comparison of Contents of Five Effective Components in Eucommiae Folium from Different Areas

LIU Rong-hua*, TANG Fang-rui, CHEN Lan-ying, SHAO Feng, LI Yu-yi, ZHANG Zhong-li, HUANG Hui-lian
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To compare contents of five main effective components (aucubin, geniposidic acid, chlorogenic acid, catechin and rutin) in Eucommiae Folium from 17 different areas. **Method:** HPLC was employed to determine contents of five main effective components with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid for gradient elution and detection wavelength at 208 nm. Contents of five main effective components in Eucommiae Folium from 17 different areas were investigated. **Result:** There were significant differences between contents and total content of these five main effective components in Eucommiae Folium from different areas. The highest total content of five effective components was 14.15% which was from Huangling county, Shaanxi province; samples with the lowest total content (1.37%) of them was from Quxian county, Sichuan province; difference of these two values was more than 10-fold. **Conclusion:** There are some regional differences of contents of five main effective components in Eucommiae Folium. The total content of main effective components in samples from Shaanxi and Henan province is more than from southwest area of our country, such as Sichuan, Guizhou province and Chongqing city. Eucommiae Folium should be possible to take low temperature rapid drying.

[Key words] Eucommiae Folium; aucubin; geniposidic acid; chlorogenic acid; catechin; rutin

杜仲叶具有补肝肾、强筋骨等功能,用于治疗肝肾不足、头晕目眩、腰膝酸痛、筋骨痿软等证^[1]。现代药理研究表明杜仲叶具有抗高血压、降血脂、抗糖尿病、抗氧化、抗肥胖、改善骨质代谢及增强免疫功能等

作用^[2]。杜仲叶主要化学成分有木脂素类^[3-4]、环烯醚萜类^[5]、苯丙素类^[6]、黄酮类^[7]、多糖^[8]等化合物,其中绿原酸、桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、芦丁及儿茶素为各类成分的代表成分,且均具有很好的药理活

[收稿日期] 20150303(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160508)

[通讯作者] *刘荣华,博士,教授,从事中药质量评价与中药药效物质基础研究,Tel:0791-87118992,E-mail:rhliu@163.com

性^[9-17]。本实验拟采用 HPLC 同时测定这 5 种活性成分的含量,比较采自 17 个不同产地杜仲叶的质量,为该药材的质量控制及综合开发提供参考。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(配置 G1311C 型四元梯度泵,G1329B 型自动进样器,G1316A 型柱温箱,G1314B 型二极管阵列检测器,ChemStation 色谱工作站,美国 Agilent 公司),BT-25S 型 1/10 万电子天平和 BT-124S 型 1/1 万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。绿原酸、儿茶素、芦丁对照品

(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110753-200413,110877-201203,100080-200707),京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-12121502, MUST-12032606),乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。杜仲叶采自不同产地,按 2010 年版《中国药典》方法晒干或低温烘干,经江西中医药大学刘荣华教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 的干燥叶,凭证标本存于江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室标本室,见表 1。

表 1 不同产地杜仲叶样品的信息

Table 1 Sample informations of *Eucommiae Folium* from different areas

编号	产地	采集时间	当地天气	干燥方式	编号	样品产地	采集时间	当地天气	干燥方式
S1	江西省峡江县	2013-05-27	多云 22 ~ 29 ℃	低温烘	S10	四川省渠县	2013-06-25	阴 23 ~ 32 ℃	晾晒
S2	南昌市湾里区	2013-05-16	阴 18 ~ 25 ℃	低温烘	S11	四川省剑阁县	2013-06-11	晴 16 ~ 29 ℃	晾晒
S3	江西省崇义县	2013-05-28	多云 25 ~ 35 ℃	晾晒	S12	重庆市开县	2013-06-14	多云 24 ~ 34 ℃	晾晒
S4	江西省贵溪市	2013-06-18	晴 27 ~ 36 ℃	晾晒	S13	重庆市江津区	2013-05-26	多云 23 ~ 32 ℃	晾晒
S5	湖南省溆浦县	2013-06-15	晴 23 ~ 34 ℃	晾晒	S14	河南省新郑市	2013-06-15	晴 24 ~ 33 ℃	晾晒
S6	湖南省汝城县	2013-05-23	晴 22 ~ 31 ℃	晾晒	S15	焦作沁阳市	2013-05-20	晴 19 ~ 32 ℃	晾晒
S7	张家界永定区	2013-06-15	晴 22 ~ 33 ℃	晾晒	S16	河南省内乡县	2013-06-15	晴 23 ~ 33 ℃	晾晒
S8	湖北省襄阳市	2013-05-16	多云 17 ~ 26 ℃	晾晒	S17	陕西省黄陵县	2013-06-12	晴 18 ~ 28 ℃	晾晒
S9	贵州省遵义县	2013-05-26	多云 17 ~ 30 ℃	晾晒					

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[18-19] YMC-Triact C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 45 min, 5% ~ 15% A; 45 ~ 85 min, 15% ~ 24% A),检测波长 208 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。

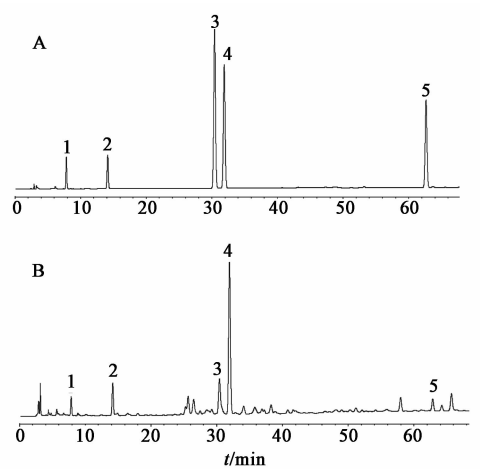
2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁对照品适量,用乙腈-0.1% 磷酸水溶液(1:20)混合溶剂分别定容于 2 mL 量瓶中,制成质量浓度依次为 0.22, 0.13, 0.19, 0.43, 0.15 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,于 4 ℃ 冰箱中保存,备用。

2.2.2 供试品溶液 准确称取杜仲叶粉末(过四号筛,下同)1.0 g,加入 50% 甲醇 60 mL,称定质量,超声处理(300 W, 40 kHz) 40 min,静置至室温,用 50% 甲醇补足失重,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 系统适应性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件测定,采用外标法计算指标成分含量。以绿原酸计理论塔板数不低

于 6 000,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品(S2); 1. 桃叶珊瑚苷; 2. 京尼平苷酸; 3. 儿茶素; 4. 绿原酸; 5. 芦丁

图 1 杜仲叶 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Eucommiae Folium*

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得桃

叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁的回归方程分别为 $Y = 230.02X + 14.498 (R^2 = 0.9999)$, $Y = 497.88X - 8.159 (R^2 = 1.0000)$, $Y = 5490.5X - 108.940 (R^2 = 0.9997)$, $Y = 1547.5X - 1.168 (R^2 = 1.0000)$, $Y = 3219.0X - 30.025 (R^2 = 1.0000)$, 线性范围依次为 0.22 ~ 13.20, 0.26 ~ 6.50, 0.19 ~ 1.90, 2.15 ~ 21.50, 0.15 ~ 1.50 μg 。

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁峰面积的 RSD 依次为 1.6%, 0.4%, 1.5%, 0.6%, 1.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于室温放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁峰面积的 RSD 依次为 1.0%, 1.0%, 0.8%, 1.1%, 1.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取 6 份样品 S2, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 2.7%, 1.9%, 1.3%, 2.0%, 说明该方法重复性好。

2.4.5 加样回收率 分别精密称定桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁对照品 30.36, 23.40, 2.28, 36.12, 2.70 mg 置于 50 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇配成混合对照品溶液。精密称取样品 S2 粉末共 6 份, 每份约 0.1 g, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各加入上述混合对照溶液 5 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果 5 种成分的平均加样回收率分别为 99.67%, 102.42%, 95.65%, 101.29%, 96.92%, RSD 依次为 1.7%, 1.2%, 2.8%, 0.8%, 1.5%。

2.5 样品测定 采自 17 个不同产地杜仲叶药材, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定各样品中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、儿茶素、绿原酸、芦丁的含量, 结果见表 2。

3 讨论

依据 2010 年版《中国药典》及相关文献报道^[18], 本课题组将杜仲叶采集时间定于同年(2013 年)5~6 月份, 选择杜仲主要产地江西、湖南、河南、四川、重庆、贵州、陕西、湖北等省的 17 个县进行采集, 按要求晒干或低温烘干后, 采用 HPLC 比较这些样品中 5 种主要有效成分的含量。结果表明各

表 2 不同产地杜仲叶中 5 种成分的含量 ($n=3$)

Table 2 Contents of five components in *Eucommiae Folium* from 17 different areas ($n=3$) %

编号	桃叶珊瑚苷	京尼平苷酸	儿茶素	绿原酸	芦丁
S1	1.99	2.29	0.15	3.65	0.21
S2	3.03	2.36	0.24	3.51	0.29
S3	0.47	0.65	0.05	1.36	0.17
S4	0.51	0.28	0.05	1.74	0.11
S5	3.38	2.35	0.29	4.27	0.29
S6	0.20	0.12	0.03	1.72	0.13
S7	3.17	1.79	0.12	3.18	0.24
S8	0.30	0.22	0.06	2.89	0.31
S9	0.09	0.26	0.09	3.12	0.17
S10	0.26	0.15	0.03	0.86	0.07
S11	0.12	0.11	0.03	3.74	0.20
S12	0.42	0.56	0.04	1.57	0.12
S13	0.98	0.43	0.04	2.72	0.13
S14	1.63	2.83	0.19	2.97	0.20
S15	2.73	1.91	0.11	2.92	0.20
S16	6.69	2.54	0.08	2.53	0.11
S17	4.98	2.74	0.48	5.59	0.36

杜仲叶中绿原酸含量均符合 2010 年版《中国药典》的标准 ($\geq 0.080\%$)^[1], 其中陕西省黄陵县产杜仲叶中该成分含量最高, 含量最低的样品来自四川省渠县。表明该季节采集的杜仲叶可确保质量。

虽然所有样品均符合 2010 年版《中国药典》标准, 但这 5 种主要有效成分的含量存在极大差异。桃叶珊瑚苷含量最高的是采自河南内乡县的杜仲叶 (6.69%), 含量最低的是采自贵州省遵义县的杜仲叶 (0.09%), 两者相差约 74 倍; 京尼平苷酸含量最高的是采自河南省新郑市的杜仲叶 (2.83%), 含量最低的是采自四川省剑阁县的杜仲叶 (0.11%), 两者相差约 26 倍; 儿茶素含量最高的是采自陕西省黄陵县的杜仲叶 (0.48%), 与含量最低的 0.03% 相差 16 倍; 芦丁含量最高的是采自陕西省黄陵县的杜仲叶 (0.36%), 含量最低的是采自四川省渠县 (0.07%), 两者相差约 5 倍; 绿原酸含量最高与最低值也相差 6.5 倍。

结果表明杜仲叶中 5 种主要有效成分的含量差异存在一定的地域性。陕西、河南等地产的杜仲叶中含量较高, 西南地区(四川、重庆、贵州)的杜仲叶中含量较低。原因可能有两方面: ①由于产地不同, 其化学成分含量有所差异; ②由于气候的原因, 陕

西、河南等地较为干燥,样品采集后晾晒能快速干燥,化学成分能较好的保留;而西南地区天气潮湿,样品采集后干燥速度较慢,有效成分可能发生了酶解反应,尤其是桃叶珊瑚苷和京尼平苷酸,两者都是环烯醚萜类成分,稳定性很差,容易破坏。

采自江西省的 4 个样品中 5 种成分含量也存在显著差异,原因可能是干燥方式不同导致的。江西省峡江县、南昌市湾里区 2 个产地的杜仲叶采取的是低温快速烘干,有效成分损失较少,5 种成分总质量分数分别为 8.29%、9.43%;而江西省崇义县、江西省贵溪市 2 个产地的杜仲叶是采取晒干的方式,其干燥速度较慢,可能有效成分损失较多,5 种成分总质量分数分别为 2.70%、2.69%。此结论与相关文献报道相符^[19-20]。提示影响杜仲叶中主要化学成分含量的因素不仅与产地有关,可能还与采集后干燥速度有关,要确保杜仲叶中主要化学成分少损失,应尽可能采取低温快速干燥。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:154-155.

[2] 袁天翊,方莲花,吕扬,等. 杜仲叶的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):781-785.

[3] Takamura C, Hirata T, Yamaguchi Y, et al. Studies on the chemical constituents of green leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. J Nat Med,2007,61(2):220-221.

[4] 晏媛,郭丹. 杜仲叶的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药,2003,25(6):491-492.

[5] Takamura C, Hirata T, Ueda T, et al. Iridoids from the green leaves of *Eucommia ulmoides* [J]. J Nat Prod, 2007,70(8):1312-1316.

[6] 成军,白焱晶,赵玉英,等. 杜仲叶苯丙素类成分的研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(1):38-39.

[7] 成军,赵玉英,崔育新,等. 杜仲叶黄酮类化合物的研究[J]. 中国中药杂志,2000,25(5):284-285.

[8] He X R, Wang J H, Li M X, et al. *Eucommia ulmoides* Oliv.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol,2014,151(1):78-92.

[9] Luo J, Tian C, Xu J, et al. Studies on the antioxidant activity and phenolic compounds of enzyme-assisted water extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves [J]. J Enzym Inhib Med Ch, 2009, 24(6):1280-1287.

[10] 向灿辉,罗景,王文君,等. 杜仲叶绿原酸抗氧化稳定性研究[J]. 食品科技,2013,38(1):224-227.

[11] Zhou Y Q, Liang M, Li W Z, et al. Protective effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. bark and leaf on amyloid β -induced cytotoxicity [J]. Environ Toxicol Phar, 2009, 28,342-349.

[12] 阮德功,马龙,许晖,等. 杜仲翅果桃叶珊瑚甙体外抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技,2011,32(8):120-122.

[13] Li Y, Metori K, Koike K, et al. Improvement in the turnover rate of the stratum corneum in false aged model rats by the administration of geniposidic acid in *Eucommia ulmoides* Olive. leaf [J]. Biol Pharm Bull, 1999,22(6):582-585.

[14] 郑杰,刘端,赵肃清,等. 杜仲叶桃叶珊瑚苷的酶法提取及其抑菌活性[J]. 中药材,2012,35(2):304-306.

[15] Dai X, Huang Q, Zhou B, 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.

[16] 刘静,濮智颖,李爱玲,等. 杜仲叶黄酮降血脂及抗氧化作用的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(11):5631-5632.

[17] 孙燕荣,董俊兴,吴曙光,等. 中药杜仲抗 HIV 作用的实验研究[J]. 解放军预防医学杂志,2004,22(4):101-103.

[18] 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.

[19] 宣志红,寿辉,姚璇,等. 不同干燥加工与贮藏方法对杜仲叶药材质量变化的研究[J]. 中草药,2013,44(11):1431-1434.

[20] 严瑞娟,张水寒,罗跃龙,等. 不同产地初加工方式处理杜仲叶的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2013,44(15):2085-2091.

[责任编辑 刘德文]