

杜仲叶质量评价和药典标准建议

王萍^{1,2}, 梁少佳³, 张文文², 冯伟红², 易红², 李春², 郭凤倩², 斯琴², 符德静², 龚曼¹,
王峥涛⁴, 郑红初³, 刘晓谦^{2*}, 王智民^{1,2*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450008; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 鄢陵县杜仁康生物科技有限公司, 河南 许昌 461000;
4. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立杜仲叶药材中5种成分(桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁)含量测定的一测多评法(QAMS), 并验证其在杜仲叶药材含量测定中的可行性和适用性, 为该药材质量标准的制定提供科学依据。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC), Welch Boltimate™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×100 mm, 2.7 μm), 流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~8 min, 3%A; 8~10 min, 3%~11%A; 10~26 min, 11%A; 26~27 min, 11%~25%A; 27~60 min, 25%~32%A), 流速 0.6 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm 和 254 nm。以绿原酸为内参物, 建立其与另外4个指标成分之间的相对校正因子(*f*), 并分别采用QAMS和外标法(ESM)测定14批杜仲叶药材中5种成分的含量。结果: 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷和芦丁的*f*分别为3.13、1.45、2.64、0.56, 在不同实验条件下重复性良好, 相对标准偏差(RSD)<5.0%。测得14批杜仲叶中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁的质量分数分别为1.340~28.975、0.252~36.086、10.016~27.443、1.396~8.646、0.533~1.766 mg·g⁻¹, QAMS与ESM比较, 结果无明显差异(RSD<5.0%)。结论: 以绿原酸为内参物建立的QAMS可用于杜仲叶药材中5种成分的含量测定, 该方法简便易行、结果准确。经综合评估, 建议将绿原酸(质量分数不低于1.5%)、桃叶珊瑚苷(质量分数不低于1.0%)及京尼平苷酸(质量分数不低于1.0%)作为杜仲叶的质量控制指标, 以较好地避免因2005—2020年版《中华人民共和国药典》指标成分(绿原酸)专属性差和含量限度过低而带来的潜在质量风险。

[关键词] 杜仲叶; 一测多评法(QAMS); 桃叶珊瑚苷; 京尼平苷酸; 绿原酸; 相对校正因子; 质量标准

[中图分类号] R22; R28; R931; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)02-0010-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220157 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220106.1336.004.html>

[网络出版日期] 2022-01-06 19:01

Quality Evaluation and Suggestions on Pharmacopoeia Standard of *Eucommiae Folium*

WANG Ping^{1,2}, LIANG Shaojia³, ZHANG Wenwen², FENG Weihong², YI Hong², LI Chun²,
GUO Fengqian², SI Qin², FU Dejing², GONG Man¹, WANG Zhengtao⁴,
ZHENG Hongchu³, LIU Xiaoqian^{2*}, WANG Zhimin^{1,2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
3. Yanling DU Renkang Biotechnology Co. Ltd., Xuchang 461000, China;
4. Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To establish a quantitative analysis multi-components by single marker method

[收稿日期] 2021-10-14

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1701900); 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04407); 国家药典委员会课题(2021Z002); 2020河南省中央引导地方科技发展专项(YDZX20204100004985)

[第一作者] 王萍, 在读硕士, 从事中药化学与质量标准评价研究, E-mail: 1484486626@qq.com

[通信作者] * 刘晓谦, 博士, 研究员, 从事中药制剂及质量评价研究, Tel: 010-64087242, E-mail: lianyu1127@126.com;

* 王智民, 博士, 研究员, 从事中药化学与质量标准评价研究, Tel: 010-84014128, E-mail: zhmw123@263.net

(QAMS) for five main components (aucubin, geniposidic acid, chlorogenic acid, asperuloside and rutin) in *Eucommiae Folium*, to verify its feasibility and applicability in the determination of *Eucommiae Folium*, so as to provide a scientific basis for the development of quality standard of this herb. **Method:** High performance liquid chromatography was performed on a Welch Boltmatetm™ C₁₈ column (4.6 mm×100 mm, 2.7 μm) with methanol (A)-0.2% phosphoric acid aqueous solution (B) as the mobile phase for gradient elution (0-8 min, 3%A; 8-10 min, 3%-11%A; 10-26 min, 11%A; 26-27 min, 11%-25%A; 27-60 min, 25%-32%A), the column temperature was set at 30 °C, the flow rate was 0.6 mL·min⁻¹, the detection wavelengths were at 210 nm and 254 nm. Chlorogenic acid was used as an internal reference to establish the relative correction factors (*f*) between it and the other four components, and the contents of the five components in 14 batches of *Eucommiae Folium* were determined by QAMS and external standard method (ESM), respectively. **Result:** The *f* values of chlorogenic acid to aucubin, geniposidic acid, asperuloside and rutin were 3.13, 1.45, 2.64 and 0.56, respectively. Repeatability was good under different experimental conditions, relative standard deviation (RSD) was <5.0%. The contents of aucubin, geniposidic acid, chlorogenic acid, asperuloside and rutin in 14 batches of *Eucommiae Folium* were 1.340-28.975, 0.252-36.086, 10.016-27.443, 1.396-8.646, 0.533-1.766 mg·g⁻¹, respectively. There were no significant difference between content results of QAMS and that of ESM (RSD<5.0%). **Conclusion:** QAMS established with chlorogenic acid as the internal reference can be used to determine the contents of five components in *Eucommiae Folium*, and this method is simple and accurate. After comprehensive evaluation, the quality standard of *Eucommiae Folium* in subsequent editions of *Chinese Pharmacopoeia* is suggested that three main active components, chlorogenic acid, aucubin and geniposidic acid, are selected as quality markers, and their content limits are recommended not less than 1.5%, 1.0% and 1.0%, respectively. This quality standard draft can avoid the potential quality risk due to poor specificity and low content limit of the index component (chlorogenic acid) in the previous editions of *Chinese Pharmacopoeia*.

[Keywords] *Eucommiae Folium*; quantitative analysis multi-components by single marker method (QAMS); aucubin; geniposidic acid; chlorogenic acid; relative correction factor; quality standard

杜仲别名扯丝皮、胶木、丝棉皮、思仲,为杜仲科杜仲属多年生落叶乔木,是我国特有的第三纪孑遗植物,始载于《神农本草经》,被列为上品。其作为我国特有的国家战略储备资源,除具有较高的战略和绿化价值外,还具有良好的药用和保健价值,素有“黄金树种”的美誉^[1]。现代药理研究表明,杜仲叶与杜仲皮所含化学成分及药理作用上基本相似^[2],富含环烯醚萜类、酚酸类及黄酮类等化合物,具有抗疲劳、抗氧化、抗衰老、降血压、调节免疫、抗炎等作用^[3-5];其中绿原酸是杜仲叶中的主要活性成分之一,具有降压、抗菌、抗病毒等作用^[6],同时还具有较强的抗氧化活性,能有效清除体内自由基,从而发挥延缓衰老等作用^[7];京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷等环烯醚萜类成分具有肝脏保护等作用^[8-9];芦丁等黄酮类成分具有抗骨质疏松等作用^[10-11]。2005年,杜仲叶首次被列入2005年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》),并于2019年11月被列为药食两用物质的试点品种。

杜仲叶自2005年版《中国药典》收录以来,其质

量标准一直采用非专属性成分绿原酸不得少于0.08%的限度来控制。然而,据市场调研发现,该标准难以有效控制杜仲叶的内在质量,因此,为保证该药材临床用药的有效性,有必要在深入研究其质量状况的基础上,制定科学合理的质量控制标准。杜仲叶主要含木质素类、环烯醚萜类、酚酸类、黄酮类等成分,其绿原酸、桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸质量分数分别为0.33%~1.64%、0.36%~4.94%和0.09%~1.85%^[12];其他报道也均证实这些成分在杜仲叶中含量较高^[13-14]。目前杜仲叶不仅作药材用,且已被列入药食两用物质试点品种,还是替代抗生素的饲料添加剂原料和化妆品的合法原料,市场需求巨大,仅以含量限度较低的非特异性成分进行质量控制,将难以保证杜仲叶的质量稳定性。因此,以药效成分群为指标,构建能够反映杜仲叶内在质量特征的质量标准,对于保障其质量而言尤为重要。

一测多评法(QAMS)于2006年由王智民研究员提出,该方法仅使用1个对照品即可实现多成分同步测定,能较好地降低药物检测成本,并解决了

对照品制备困难、不稳定或难以获得等问题^[15],为中药材质量控制从单指标成分向多指标成分的发展提供了便捷的方法^[16]。其在2010年版《中国药典》中被首次收载于黄连药材含量测定项下,标志着该方法正式应用于实际生产^[17]。截止到2020年版《中国药典》,丹参、生姜、穿心莲、黄连、淫羊藿及蟾酥等均采用了QAMS进行多指标成分的含量测定^[18]。本研究在全面分析杜仲叶化学成分的基础上,选取桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁为指标成分,拟建立杜仲叶多成分同步测定的QAMS,并对该药材的质量进行分析和评价,为杜仲叶的国家标准起草提供数据支撑和实验依据,并为其相关健康产品的质量控制提供可借鉴的质量控制方案。

1 材料

LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司),U3000型高效液相色谱仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],e2695型高效液相色谱仪(美国沃特世公司),XS206型1/10万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],HC-2518型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为T-01611807010、J-015-170504、L-007-190829、C-077-180906、L-00102003024,纯度依次为 $\geq 98\%$ 、 99.3% 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$ 、 $\geq 98\%$),水为娃哈哈纯净水,甲

醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。实验用杜仲叶药材源自主产区,共14批,样品S1和S2收购于陕西省汉中市略阳县锦绣农业发展有限公司,样品S3和S4收购于湖南省张家界茶坤缘杜仲基地,样品S5~S7购自江西樟树药材市场,S8采摘于北京市东城区,样品S9~S14均采收于河南省鄢陵县杜仲基地,药材产地和批号信息见表1和图1,均经中国中医科学院中药研究所王智民研究员鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* 的干燥叶。

表1 杜仲叶样品信息

Table 1 Sample information of *Eucommiae Folium*

样品编号	批号	产地	样品来源
S1	HY202009	陕西省安康市汉阴县	市售
S2	LY202008	陕西省汉中市略阳县	市售
S3	ZJJ201909	湖南省张家界	市售
S4	ZJJ202009	湖南省张家界	市售
S5	JS202009	江西省吉安市吉水县	市售
S6	JGS202009	江西省吉安市井冈山	市售
S7	YF202009	江西省吉安市永丰县	市售
S8	BJ202011	北京市东城区	自采
S9	HN202007-1	河南省许昌市鄢陵县	自采
S10	HN202007-2	河南省许昌市鄢陵县	自采
S11	HN202007-3	河南省许昌市鄢陵县	自采
S12	HN202007-4	河南省许昌市鄢陵县	自采
S13	HN202007-5	河南省许昌市鄢陵县	自采
S14	HN202009-1	河南省许昌市鄢陵县	自采



图1 14批杜仲叶样品照片

Fig. 1 Photographs of 14 batches of *Eucommiae Folium*

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用Welch Boltimate™ C₁₈色谱柱(4.6 mm×100 mm, 2.7 μm),流动相甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~8 min, 3%A; 8~10 min, 3%~11%A; 10~26 min, 11%A; 26~27 min, 11%~

25%A; 27~60 min, 25%~32%A),流速0.6 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量2 μL,京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁检测波长均为254 nm,桃叶珊瑚苷检测波长210 nm。色谱图见增强出版附加材料。

2.2 对照品溶液配制 分别精密称取桃叶珊瑚苷、

京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷和芦丁对照品适量,加甲醇使溶解并定容,制成质量浓度分别为0.754、0.953、0.720、0.260、0.029 2 g·L⁻¹的混合对照品储备液,备用。精密吸取该储备液适量,用甲醇稀释2、10、20、50、100倍,得系列混合对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液配制 称取杜仲叶药材粉末(过二号筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声30 min(250 W, 40 kHz),取出,冷却至室温,加50%甲醇补足减失的质量,摇匀,离心5 min(1万 r·min⁻¹,离心

半径8.3 cm),取上清液过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取2.2项下不同质量浓度的混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算各成分的回归方程及相关系数(*r*),取低质量浓度的混合对照品溶液,梯度稀释,分别按信噪比(S/N)约为3时计算各成分检测限,S/N约为10时计算各成分定量限,见表2。结果表明各成分在一定质量浓度内与峰面积呈良好线性关系。

表2 杜仲叶中指标成分含量测定的线性关系考察

Table 2 Investigation of linearity in determination of index components in Eucommiae Folium

成分	线性方程式	<i>r</i>	线性范围/ng	定量限/ng	检测限/ng
桃叶珊瑚苷	$Y=1.07\times 10^6 X+1.93\times 10^3$	1.000 0	15.08~1 508	11.77	3.920
京尼平苷酸	$Y=2.44\times 10^6 X+3.63\times 10^3$	0.999 9	19.06~1 906	1.44	0.720
绿原酸	$Y=3.52\times 10^6 X-9.14\times 10^3$	1.000 0	14.40~1 440	1.62	0.810
车叶草苷	$Y=1.37\times 10^6 X+4.54\times 10^2$	0.999 9	5.20~520	5.20	1.990
芦丁	$Y=6.01\times 10^6 X-2.62\times 10^2$	0.999 9	0.584~58.4	1.65	0.138

2.4.2 精密度试验 精密吸取2.2项下混合对照品储备液适量,按2.1项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积并计算相对标准偏差(RSD)。结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁峰面积的RSD分别为0.7%、0.5%、0.5%、0.6%、0.8%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取样品S8粉末6份,每份约0.5 g,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下条件测定,计算桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁平均质量分数分别为12.696、13.884、9.966、1.569、0.571 mg·g⁻¹,RSD分别为0.6%、0.4%、0.3%、1.1%、0.8%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取样品S8粉末约0.5 g,按2.3项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0、4、8、12、18、24 h按2.1项下条件测定,记录峰面积并计算RSD。结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁峰面积的RSD分别为0.5%、0.1%、0.1%、0.8%、0.5%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.5 加样回收试验 取样品S8粉末6份,每份约0.25 g,精密称定,按1:1加入桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁对照品,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,计算各成分的加样回收率及RSD,见增强出版附加材料。结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁的平均加样回收率分别为95.96%、102.10%、

92.62%、102.15%、96.07%,RSD分别为1.4%、0.9%、0.5%、1.3%、1.4%。符合2020年版《中国药典》(四部)通则9101项下相关规定,表明建立的含量测定方法准确度良好。

2.5 QAMS相对校正因子(*f*)的确定 目前,*f*的计算方法有斜率法和多点校正法^[19]。多点校正法的计算公式为 $f_{s/i}=f_i f_i=A_s \times C_i / (A_i \times C_s)$,式中*s*表示内参物,*i*表示待测成分,*A_s*为内参物峰面积,*C_s*为内参物质量浓度,*A_i*为待测成分峰面积,*C_i*为待测成分质量浓度;斜率法计算公式为 $f_{s/i}=a_s/a_i$,式中*a*为斜率。精密吸取2.2项下混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样1、2、3、4、5 μL,记录各组成分的峰面积,以绿原酸为内参物,分别用斜率法和多点校正法计算桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷、芦丁的*f*,见表3和表4。结果发现这2种方法计算得到的*f*差异较小,RSD<5%,说明二者均可采用。故采用多点校正法计算各成分的*f*,取平均值进行含量计算,结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷、芦丁与内参物绿原酸之间的*f_{s/i}*分别为3.13、1.45、2.64、0.56,RSD分别为0.5%、1.6%、1.7%、0.7%。

2.6 耐用性考察

2.6.1 不同品牌仪器对*f*的影响 分别采用岛津LC-20A、赛默飞U3000和Waters e2695型高效液相色谱仪,考察不同仪器对*f*的影响。结果发现不同仪器对桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷、芦丁的

表3 多点校正法计算的杜仲叶中4种成分的相对校正因子

Table 3 Relative correction factors of four components in Eucommiae Folium calculated by multi-point correction method

进样量/ μL	$f_{\text{CA/AU}}$	$f_{\text{CA/GPA}}$	$f_{\text{CA/AS}}$	$f_{\text{CA/RU}}$
1	3.105	1.420	2.579	0.560
2	3.145	1.441	2.619	0.561
3	3.136	1.459	2.673	0.569
4	3.144	1.475	2.678	0.564
5	3.142	1.476	2.674	0.561

注:CA.绿原酸;AU.桃叶珊瑚苷;GPA.京尼平苷酸;AS.车叶草苷;RU.芦丁(表4和表5同)

表4 斜率法计算的杜仲叶中4种成分的相对校正因子

Table 4 Relative correction factors of four components in Eucommiae Folium calculated by slope method

项目	CA	AU	GPA	AS	RU
斜率	1 794.3	567.57	1 221.80	674.82	3 177.40
f_{sti}	-	3.16	1.47	2.66	0.56

f_{sti} 影响较小,RSD分别为4.9%、2.5%、2.3%、4.0%,表明 f_{sti} 在不同品牌高效液相色谱仪上耐用性良好。

2.6.2 柱温对 f 的影响 分别在柱温25、30、35℃条件下计算各成分的 f_{sti} ,其他色谱条件不变,考察不同柱温对 f_{sti} 的影响。结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷、芦丁 f_{sti} 的RSD分别为0.3%、0.4%、0.1%、1.0%,表明柱温的变化对 f 无明显影响。

2.6.3 不同流速对 f 的影响 采用LC-20A型高效液相色谱仪,考察流速(0.5、0.6、0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)对各成分 f_{sti} 的影响,其他色谱条件不变,结果发现不同流速下桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷、芦丁 f_{sti} 的RSD分别为0.4%、0.3%、0.4%和0.9%,表明不同流速对各成分 f_{sti} 无明显影响。

2.7 待测成分色谱峰的定位 采用QAMS测定各待测成分色谱峰时,待测成分的保留时间可能会因不同仪器、不同温度、不同流速等因素的影响而有微小波动,故采用相对保留时间对杜仲叶中各待测成分色谱峰进行定位,见表5,结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷、芦丁相对保留时间的RSD分别为4.7%、2.4%、0.9%、4.3%。提示不同仪器、不同柱温及不同流速下各待测成分之间的相对保留时间波动较小,说明相对保留时间用于色谱峰的定位可行性较好。同时,为保证各待测成分色谱峰定位的准确性,可根据紫外光谱图辅助相对保留时间,对待测成分色谱峰进行准确定位。

2.8 QAMS与外标法(ESM)测定结果的比较 取14批杜仲叶药材,采用ESM和QAMS对桃叶珊瑚

表5 不同检测条件对杜仲叶指标成分相对保留时间的影响

Table 5 Effect of different instruments, flow rates and column temperatures on relative retention time of index components in Eucommiae Folium

影响因素	参数	$t_{\text{CA/AU}}$	$t_{\text{CA/GPA}}$	$t_{\text{CA/AS}}$	$t_{\text{CA/RU}}$
仪器	LC-20A	0.319	0.730	1.125	2.124
	U3000	0.344	0.689	1.130	2.322
	e2695	0.335	0.694	1.112	2.339
流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0.5	0.324	0.724	1.116	2.103
	0.6	0.311	0.730	1.120	2.136
	0.7	0.300	0.735	1.131	2.243
柱温/ $^{\circ}\text{C}$	25	0.329	0.703	1.104	2.100
	30	0.311	0.730	1.120	2.136
	35	0.301	0.720	1.133	2.140

苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁进行含量测定,并以相对偏差(RE)为参数对2种方法所得结果进行比较^[20],计算公式为 $\text{RE}=(\text{QAMS计算值}-\text{ESM实测值})/\text{ESM实测值}\times 100\%$,见表6。结果发现QAMS与ESM计算结果的RE均 $<5\%$,表明建立的QAMS准确可靠,可用于杜仲叶药材中多成分质量评价研究。

2.9 相关性分析和聚类分析

2.9.1 相关性分析 利用SPSS 25.0对5个成分的含量结果进行Spearman相关系数检验,见表7。结果发现桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷四者之间呈显著正相关,芦丁与其他成分之间则无相关性,从测定结果看,为进一步简化质量控制指标,芦丁和车叶草苷的含量普遍较低,因此可不作为杜仲叶质量控制指标。而桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸的含量较高且差异更大,故建议选择桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸作为后续版本《中国药典》杜仲叶含量测定项下的指标成分,以评价不同产地样品的质量。

2.9.2 聚类分析 采用SPSS 25.0,以杜仲叶药材中5个成分经QAMS测得含量数据为变量,对14批样品进行系统聚类分析,见图2。结果发现当平方欧氏距离为15时,14批杜仲叶药材可聚为四类,即I类包含4份样品,其中1份来源于陕西省安康市汉阴县,3份来自于江西省吉安市,主要特征为桃叶珊瑚苷($1.340\sim 7.175\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、京尼平苷酸($0.252\sim 7.558\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、绿原酸($14.109\sim 16.796\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)含量均相对较低;II类仅1份样本,来自陕西省汉中市略阳县,主要特征为芦丁的含量较高($1.766\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$);III类包含2份样本,1份来源于北京市东城区,1份

表6 ESM和QAMS测得的杜仲叶中5种成分的质量分数

Table 6 Contents of five components in *Eucommiae Folium* determined by ESM and QAMS

样品 编号	绿原酸				桃叶珊瑚苷			京尼平苷酸			车叶草苷			芦丁		
	ESM /mg·g ⁻¹	ESM /mg·g ⁻¹	QAMS /mg·g ⁻¹	RE/%	ESM /mg·g ⁻¹	QAMS /mg·g ⁻¹	RE/%	ESM /mg·g ⁻¹	QAMS /mg·g ⁻¹	RE/%	ESM /mg·g ⁻¹	QAMS /mg·g ⁻¹	RE/%			
S1	16.796	6.938	7.175	3.42	7.506	7.558	0.69	1.897	1.896	-0.05	1.076	1.064	-1.12			
S2	17.461	21.295	21.916	2.92	17.884	17.987	0.58	3.102	3.115	0.42	1.785	1.766	-1.06			
S3	18.251	9.871	9.980	1.10	23.160	23.283	0.53	5.699	5.739	0.70	0.876	0.865	-1.26			
S4	19.487	13.965	14.376	2.94	23.229	23.340	0.48	5.824	5.863	0.67	0.942	0.930	-1.27			
S5	15.429	2.901	2.992	3.14	0.975	0.997	2.26	1.761	1.773	0.68	1.394	1.377	-1.22			
S6	15.688	1.297	1.340	3.32	0.247	0.252	2.02	1.410	1.417	0.50	1.370	1.354	-1.17			
S7	14.109	2.149	2.220	3.30	0.253	0.255	0.79	1.388	1.396	0.58	1.365	1.350	-1.10			
S8	10.016	12.444	12.604	1.29	13.516	13.728	1.57	1.518	1.538	1.32	0.529	0.533	0.76			
S9	20.890	21.639	21.797	0.73	24.826	24.690	-0.55	5.263	5.226	-0.70	0.823	0.836	1.58			
S10	22.865	27.295	27.379	0.31	19.402	19.286	-0.60	7.724	7.677	-0.61	1.079	1.096	1.58			
S11	27.443	18.785	18.800	0.08	25.311	25.123	-0.74	8.708	8.646	-0.71	1.321	1.342	1.59			
S12	20.927	28.955	28.975	0.07	28.483	28.325	-0.55	7.900	7.857	-0.54	1.123	1.142	1.69			
S13	23.301	27.277	27.520	0.89	36.324	36.086	-0.66	7.552	7.504	-0.64	1.017	1.033	1.57			
S14	12.780	23.811	24.153	1.44	10.999	11.004	0.05	4.146	4.134	-0.29	0.766	0.781	1.96			

表7 杜仲叶中5种成分含量的相关性分析

Table 7 Correlation analysis of contents of five components in *Eucommiae Folium*

成分	桃叶珊瑚苷	京尼平苷酸	绿原酸	车叶草苷	芦丁
桃叶珊瑚苷	1.000				
京尼平苷酸	0.515 ¹⁾	1.000			
绿原酸	0.694 ²⁾	0.790 ²⁾	1.000		
车叶草苷	0.859 ²⁾	0.761 ²⁾	0.858 ²⁾	1.000	
芦丁	0.241	-0.162	-0.246	-0.100	1.000

注: ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

来源于河南省许昌市鄢陵县,主要特征是芦丁含量较低,IV类包含7份样本,2份来源于湖南省张家界、5份来源于河南省许昌市鄢陵县,主要特征为桃叶珊瑚苷(9.980~28.975 mg·g⁻¹)、京尼平苷酸(19.286~36.086 mg·g⁻¹)、绿原酸(18.251~27.443 mg·g⁻¹)含量均较高。说明不同产地杜仲叶之间存在一定差异,相同产地不同批次杜仲叶之间也存在差异,但由于样本量偏少,尚有待深入研究。自行采收加工的样品中5种成分的含量均相对较高,而市场购买的其他地区杜仲叶样品中目标成分含量差异较大且相对偏低。从样品性状上看,不同地区杜仲叶样品外观颜色差异明显,河南省鄢陵县杜仲基地采收的杜仲叶样品叶片颜色相对较绿;而市售杜仲叶样品则颜色不一,为黄绿色至黑褐色,见图1。对样品颜色与其化学成分含量作相关分析(样品S1和S2颜色

记作1;样品S3和S4颜色记作2;样品S5~S8颜色记作3;样品S9~S14颜色记作4),结果发现指标成分含量与叶片色泽无明显相关性,但直观上看,绿色者各指标成分含量均较高,表明产地加工工艺对药材质量影响较大,必须加以重视,从源头上做到质量控制。

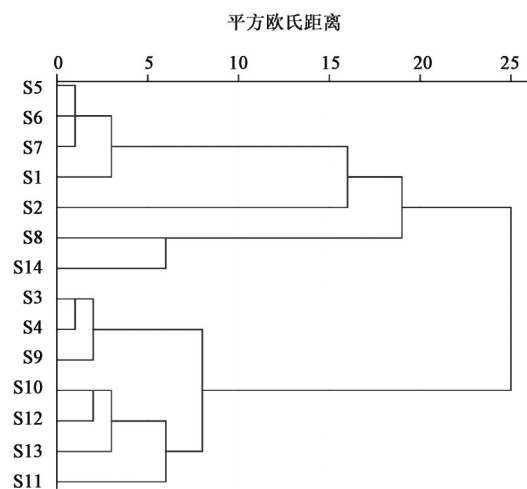


图2 杜仲叶样品中5种成分QAMS测得含量的聚类分析
Fig. 2 Cluster analysis of contents of five components in *Eucommiae Folium* measured by QAMS

3 讨论

3.1 样品制备及色谱方法的优化 杜仲叶药材所含成分复杂,本文测定的5种活性成分属环烯醚萜

类、酚酸类和黄酮类,各成分的最大吸收波长不同,采用单波长无法兼顾各成分均能达到适宜的灵敏度和准确性。通过对各成分在190~800 nm的全波长扫描图可以发现,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁的最大吸收波长依次为190、237、237、238、254 nm;对比不同波长下的色谱图,在254 nm时,京尼平苷酸、车叶草苷、绿原酸、芦丁吸收峰型、分离度、对称因子、理论塔板数均较好,而桃叶珊瑚苷在该波长下没有吸收,故桃叶珊瑚苷的检测波长选择210 nm进行检识。为了获取最佳的提取方法,预试验对提取溶剂、料液比、提取方式、提取时间进行考察,分别考察了不同提取溶剂(乙醇、甲醇、50%乙醇、50%甲醇)、料液比(1:25和1:50)、提取方式(回流和超声)及不同超声时间(15、30、45 min)对5种成分提取结果的影响,结果发现以50倍量50%甲醇为溶剂,超声提取30 min时,各成分含量均较高。同时,还考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2%磷酸水溶液及乙腈-0.2%磷酸水溶液作为流动相时对分离效果的影响,结果发现以甲醇-0.2%磷酸水溶液作为流动相梯度洗脱时,其色谱峰峰形及分离度均较好。

3.2 内参物的选择 本文选取含量较高、性质稳定且廉价易得的绿原酸为内参物,建立其与另外4个成分之间的 f ,为了验证建立的5个成分QAMS的适用性及可行性,进行了方法学考察、待测成分色谱峰的定位,以及 f 的重复性等考察。通过对不同高效液相色谱仪、不同柱温、不同流速的考察,结果表明绿原酸与桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷、芦丁之间的 f 具有良好的重复性。QAMS含量结果和ESM测定结果之间差异无统计学意义,说明以绿原酸为内参物建立的QAMS适用于同时测定杜仲叶

中5个成分的含量。

3.3 质量标准的制订方案 杜仲树属于落叶乔木类,树干高大不方便采收,随着杜仲种植面积的增加,使得杜仲叶品质得以提升。自2005年版《中国药典》收录杜仲叶以来,其含量标准一直为“本品按干燥品计算,含绿原酸不得少于0.080%”。本文以绿原酸为内参物,采用QAMS对不同地区杜仲叶进行了测定,结果测得样品中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、车叶草苷、芦丁的质量分数范围分别为1.340~28.975、0.252~36.086、10.016~27.443、1.396~8.646、0.533~1.766 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;仅就绿原酸而言,其含量远高于2020年版《中国药典》的规定,有提高其含量限度的空间,同时,绿原酸广泛存在于植物中,不具有专属性,而杜仲叶中环烯醚萜类成分的药理活性也已被证实^[21-23],其作用与杜仲叶的临床功效具有一定的相关性,因此可考虑将环烯醚萜类成分纳入质量控制指标以构建能反映其内在质量特征的质量标准。考虑到杜仲叶中绿原酸、桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、车叶草苷、芦丁质量分数的平均值分别为1.83%、1.58%、1.66%、0.45%、0.11%,其中车叶草苷和芦丁的质量分数相对较低,因此不考虑将二者纳入标准草案。参照数据的正态分布情况,依据所有样本的频次统计结果,发现绿原酸成分的质量分数主要集中在15 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 以上,桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸的质量分数均主要集中在10 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 以上,详细分析结果见图3。因此,建议杜仲叶的标准草案为本品按干燥品计算,含绿原酸($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$)不得少于1.5%,桃叶珊瑚苷($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9$)不得少于1.0%,京尼平苷酸($\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$)不得少于1.0%。该标准(草案)不仅能代表多数样本的质量现状,同时也能保证优质药材的质量。

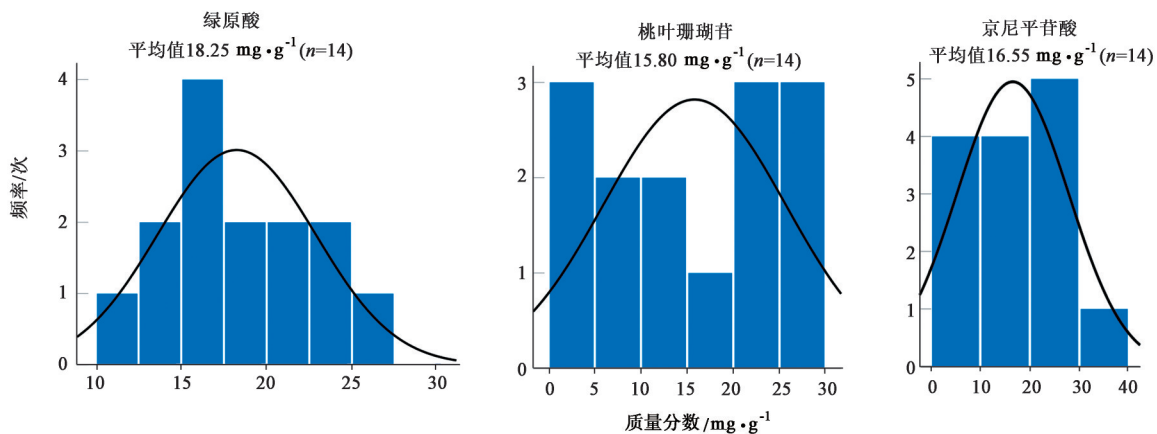


图3 杜仲叶中绿原酸、桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸含量频次分析

Fig. 3 Normal distribution frequency of chlorogenic acid, aucubin and geniposidic acid contents in *Eucommiae Folium*

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[致谢] 国家药典委员会对杜仲叶标准提高的项目支持;河南省鄆陵县杜仲基地的全力配合;陕西省汉中市略阳县锦绣农业发展有限公司和湖南省张家界茶坤缘杜仲基地协助提供杜仲叶药材。

[参考文献]

- [1] 马希汉,张康健. 中国杜仲近代认识史上的四次飞跃[J]. 中成药, 2011, 33(8):1393-1396.
- [2] 郭姝,刘杰,李娜,等. 指纹图谱结合一测多评法评价杜仲叶代替杜仲皮的可行性[J]. 中药材, 2020, 43(4):896-902.
- [3] 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.
- [4] ZHANG Y Y, ZHANG H X, WANG F, et al. The ethanol extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves inhibits disaccharidase and glucose transport in Caco-2 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 163:99-105.
- [5] 柴建新. 杜仲叶黄酮提取物的体外活性及其对大鼠高尿酸血症的防治作用[D]. 南昌:南昌大学, 2012.
- [6] WANG L, DU H W, CHEN P. Chlorogenic acid inhibits the proliferation of human lung cancer A549 cell lines by targeting annexin A2 *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131:110673.
- [7] LUO J Y, TIAN C R, XU J G, et al. Studies on the antioxidant activity and phenolic compounds of enzyme-assisted water extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2009, 24(6):1280-1287.
- [8] 陈浩,赵威,俞浩,等. 京尼平苷酸对ANIT诱导胆汁淤积大鼠的酮洛芬肝代谢和胆汁排泄的影响及机制探究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(2):147-155.
- [9] 韩曼飞,张刘强,李医明. 天然桃叶珊瑚苷及其衍生物的化学结构和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(19):4105-4113.
- [10] 唐芳瑞,张忠立,左月明,等. 杜仲叶黄酮类化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5):90-92.
- [11] 袁真,闵珺,王恺,等. 杜仲黄酮类3种药物成分治疗大鼠骨质疏松的比较研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(2):244-248.
- [12] 周云雷,郭婕,王志宏,等. HPLC法同时测定矮林杜仲叶中6种成分含量[J]. 中药材, 2015, 38(3):540-543.
- [13] 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.
- [14] 刘荣华,唐芳瑞,陈兰英,等. 不同产地杜仲叶中5种主要有效成分的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18):31-34.
- [15] WANG Y C, YU Y, SUN G X, et al. Quality evaluation of powdered poppy capsule extractive by systematic quantified fingerprint method combined with quantitative analysis of components by single marker method[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 185:113247.
- [16] 石莉尧,房蕴歌,陈两绵,等. 麝香保心丸中蟾酥的质量控制标准提升[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2):159-165.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:154-156.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:173.
- [19] 冯伟红,李春,吉丽娜,等. 基于高分离度和对照图谱的红参中9种人参皂苷类成分“一测多评”质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18):3389-3399.
- [20] 刘宏,雷露静,白玉琴,等. 一测多评法同时测定蒙药三子散中7种指标成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18):58-63.
- [21] LI Y T, HU W J, HAN G H, et al. Involvement of bone morphogenetic protein-related pathways in the effect of aucubin on the promotion of osteoblast differentiation in MG63 cells[J]. Chem Biol Interact, 2018, 283:51-58.
- [22] 王娟娟,秦雪梅,高晓霞,等. 杜仲化学成分、药理活性和质量控制现状研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(15):3228-3237.
- [23] MA B, ZHANG J, ZHU Z M, et al. Aucubin, a natural iridoid glucoside, attenuates oxidative stress-induced testis injury by inhibiting JNK and CHOP activation via Nrf2 up-regulation [J]. Phytomedicine, 2019, 64:153057.

[责任编辑 刘德文]