

杜仲叶 HPLC 指纹图谱及成分积累规律的研究

钟世红¹, 古锐², 李羿¹, 熊玲娟¹

(1. 成都医学院药学院 四川 成都 610083; 2. 成都中医药大学 四川 成都 611131)

摘要: 目的 建立杜仲叶的 HPLC 指纹图谱, 分析杜仲叶中成分积累的规律。方法 采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱; 0.05% 磷酸水溶液 - 甲醇梯度洗脱系统; 柱温 25 °C; 检测波长 220 nm。结果 对不同产地杜仲叶的指纹图谱进行评价, 生成对照指纹图谱, 确定了 10 个共有峰, 指认了第 5 号色谱峰为绿原酸, 是第 1 大色谱峰。四川地区杜仲叶中的成分积累规律为: 芽开绽期含量最高, 次月减小, 5 月出现回升, 再逐渐降低, 7 月降至最低, 然后逐渐回升延续至落叶盛期。结论 所做研究可为杜仲叶的质量控制及最佳采收期的确定提供参考。

关键词: 杜仲叶; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 绿原酸; 主要成分; 积累规律

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2010)03 - 0464 - 03

HPLC fingerprint and accumulation rule of principal component in folium eucommiae

ZHONG Shi - hong¹, GU Rui², LI Yi¹, XIONG Ling - juan¹

(1. Pharmaceutical School, Chengdu Medical Colledge, Chengdu, Sichuan, 610083 P. R. China; 2. Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan, 611131 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish HPLC fingerprint of folium eucommiae and analyze its accumulation of principal component.

METHODS An RP - HPLC method was used for the determination. The separation was performed on a Welchrom C₁₈ column, and a mobile phase of gradient elution with 0.05% phosphoric acid and methanol was employed. The column temperature was 25 °C. The detection wavelength was 220 nm.

RESULTS The fingerprint of samples from different regions were analysed to get the reference chromatogram composed of ten common peaks were analyzed. The No. 5 peak was the biggest one and it was confirmed to be chlorogenic acid. The accumulation rule of principal component was analyzed in folium eucommiae from Sichuan province. The maximum content was in bud sprouting period, then reduced next month, rebounded in May, gradually decreased to the minimum point till July, then gradually rose till defoliation peak period. **CONCLUSION** The study is useful for the quality control and choosing optimal harvest time of folium eucommiae.

Key words: Folium eucommiae; HPLC; Fingerprint; Chlorogenic acid; Principal component; Accumulation rule

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2010)04 - 0464 - 03

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 为川产道地药材^[1], 其叶具有促进机体功能、抗高血压、降血糖血脂、抗衰老等功效。杜仲叶中主含以绿原酸为代表的咖啡酰类、环烯醚萜及木脂素等成分^[2], 多采用 HPLC 法测定其中的一种或几种成分^[3]。中药材的指纹图谱具有整体性与模糊性的特点, 可避免单一成分测试的不足, 能提供更全面的信息, 是中药材质量评价的有效方法。现建立了杜仲叶的 HPLC 指纹图谱分析不同产地样品, 并探讨了杜仲叶中主要成分的积累规律。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

2695 - 2998 型高效液相色谱仪(美国 Waters); P680 高效液相色谱仪(美国戴安); AS5150A 超声清

洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司, 180 W、40 kHz)。绿原酸(中国药品生物制品检定所, 批号: 110753 - 200413); 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂为分析纯; 样品均为自采(表 1) 其中 1 ~ 48 号为不同采收期样品, 分别来自 4 个不同地点的 6 棵树, 从 2007 年芽开绽期(成都市为 3 月、虹口乡为 4 月)开始, 于每月中旬由树体中部不同方向分别定点采集, 直至落叶盛期(虹口乡为 10 月, 成都市为 11 月)经成都中医药大学卫莹芳教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥叶, 样品均粉碎为中粉。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为 0.05% 磷酸溶液 - 甲醇梯度系统(87 : 13 ~ 83 : 17 ~ 65 : 35 ~ 45 : 55 ,

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目(2006B113)

作者简介: 钟世红(1980—) 女, 博士, 讲师, 从事中药品种、质量及资源研究。Email: saraca1980@126.com

梯度洗脱时间为 0 ~ 12 ~ 35 ~ 60 min), 检测波长 220 nm, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 记录时间 60 min。

表1 杜仲叶来源表

Table 1 Samples source of folium eucommiae

编号	采集时间	来源	编号	采集时间	来源
1	2007.03	四川成都市犀浦镇	31	2007.08	四川成都市华西药用植物园
2		四川成都市华西药用植物园	32		四川成都市植物园 1#
3		四川成都市植物园 1#	33		四川成都市植物园 2#
4	2007.04	四川成都市犀浦镇	34	2007.09	四川成都市犀浦镇
5		四川都江堰市虹口乡 1#	35		四川都江堰市虹口乡 1#
6		四川都江堰市虹口乡 2#	36		四川都江堰市虹口乡 2#
7		四川成都市华西药用植物园	37		四川成都市华西药用植物园
8		四川成都市植物园 1#	38		四川成都市植物园 1#
9		四川成都市植物园 2#	39		四川成都市植物园 2#
10	2007.05	四川成都市犀浦镇	40	2007.10	四川成都市犀浦镇
11		四川都江堰市虹口乡 1#	41		四川都江堰市虹口乡 2#
12		四川都江堰市虹口乡 2#	42		四川成都市华西药用植物园
13		四川成都市华西药用植物园	43		四川成都市植物园 1#
14		四川成都市植物园 1#	44		四川成都市植物园 2#
15		四川成都市植物园 2#	45	2007.11	四川成都市犀浦镇
16	2007.06	四川成都市犀浦镇	46		四川成都市华西药用植物园
17		四川都江堰市虹口乡 1#	47		四川成都市植物园 1#
18		四川都江堰市虹口乡 2#	48		四川成都市植物园 2#
19		四川成都市华西药用植物园	49	2007.07	四川乐山市金口河区
20		四川成都市植物园 1#	50	2007.07	四川宝兴县崇兴乡
21		四川成都市植物园 2#	51	2007.09	湖北宣恩县沙道沟镇
22	2007.07	四川成都市犀浦镇	52	2007.09	湖北五峰县五峰镇
23		四川都江堰市虹口乡 1#	53	2006.07	四川成都市犀浦镇
24		四川都江堰市虹口乡 2#	54	2007.07	四川宝兴县崇兴乡
25		四川成都市华西药用植物园	55	2007.09	湖北鹤峰县
26		四川成都市植物园 1#	56	2008.07	云南文山县
27		四川成都市植物园 2#	57	2008.08	湖南蓝山县正市乡
28	2007.08	四川成都市犀浦镇	58	2008.07	湖南蓝山县正市乡
29		四川都江堰市虹口乡 1#	59	2008.07	四川峨眉山
30		四川都江堰市虹口乡 2#			

1.2.2 溶液的制备 取 0.5 g 样品粉末,精密称定,加入 30 mL 50% 甲醇,称定重量,超声提取 40 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液作为供试品溶液。

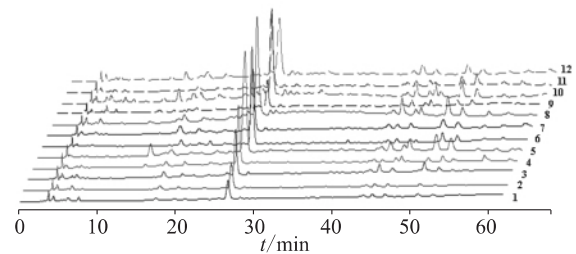
1.2.3 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 5 次,比较各主要共有峰的 t_R 和相对峰面积 RSD 均小于 5%,表明仪器精密度良好。

1.2.4 重复性考察 取同一批样品 6 份,按“1.2.2”项方法制备供试品溶液。分别进样 10 μL,比较各主要共有峰的 t_R 和相对峰面积 RSD 均小于 5%,表明方法的重复性良好。

1.2.5 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 时进样测定,比较各主要共有峰的 t_R 和相对峰面积 RSD 均小于 5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

1.2.6 共有峰的标定 按上述确定的条件,分别制备供试品溶液,各进样 10 μL,记录样品的色谱图。采用“matlab 6.5.1 计算机辅助相似度评价系统”软件对 12 批不同产地样品的指纹图谱(图 1)进行评

价,生成对照指纹图谱。确定了 10 个共有色谱峰(图 2)。经与对照品色谱图对照,结合二级管阵列检测器分析色谱峰的光谱图,指认了杜仲叶指纹图谱中的第 5 号色谱峰为绿原酸,为第 1 大色谱峰,其峰面积占总峰面积的 29.5% ~ 60.4%,平均占 42.8%。



1.四川成都市犀浦镇(22号);2.四川成都市(25号);3.四川成都市天回镇(26号);
4.四川都江堰市虹口乡(24号);5.四川乐山市金口河区(49号);6.四川宝兴县崇兴乡(54号);
7.四川峨眉山(59号);8.湖北宣恩县沙道沟镇(51号);9.湖北五峰县五峰镇(52号);
10.湖北鹤峰县(55号);11.云南文山县(56号);12.湖南蓝山县正市乡(58号)

图1 不同产地杜仲叶的 HPLC 指纹图谱(表 1 对应编号)

Fig 1 HPLC fingerprint chromatogram of folium eucommiae samples from different areas(refer to table 1)

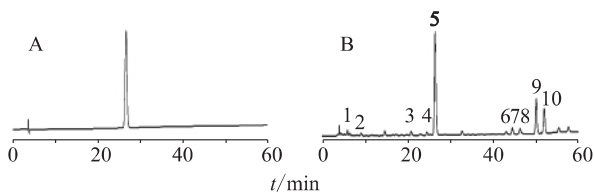


图 2 绿原酸对照品 (A) 及样品 (B) 溶液的指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprint chromatograms of control solution (A) and sample solution (B)

1.2.7 样品指纹图谱主成份的分析 采用“计算机辅助相似度评价系统”对 59 批杜仲叶样品指纹图谱进行主成份分析(图 3)。分析投影图,样品投影较为分散。位于左下方 1 号样为绿原酸峰面积最高的样品,按绿原酸峰面积大小排列依次为 2、5、6、4、3 号样,这几个样均位于左下方;而位于右上方的 22 号样为绿原酸峰面积最小的样品,按绿原酸峰面积由小到大排列依次为 52、42、25、38、39、23 号样,这几个样均位于右上方。推测绿原酸色谱峰的峰面积大小为影响主成份投影分布的主要因素。

1.2.8 不同采收期杜仲叶的指纹图谱分析 对来自 4 个产地 6 棵杜仲树叶的指纹图谱分别进行分析,分别绘制色谱峰面积相对较大的 5、7、9、10 号色谱峰以及总峰面积的变化趋势图(图 4)。5 号色谱

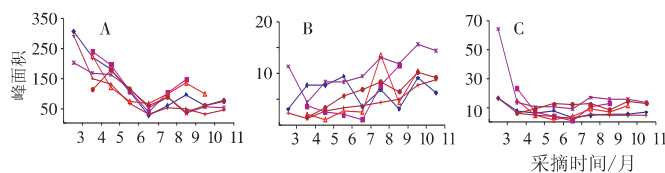


图 4 不同采收期样品指纹图谱色谱峰面积变化趋势图(A~E 分别药用表示 5、7、9、10 号色谱及总峰面积)

Fig 4 Change trend figure for peak areas of fingerprint chromatograms of samples collected in different periods

2 讨论

分析不同采收期样品的指纹图谱,杜仲叶中的主要成分在芽开绽期含量最高;次月由于营养物质集中用于植株生长,导致合成次生代谢物的底物减少,次生代谢物含量逐渐降低;5 月中旬杜仲树生长处于低谷期,次生代谢物合成、积累速率加大,含量出现一个明显的高峰。此后植株生长最旺盛,至 7 月含量达最低值;8 月植株生长的速度趋缓,成分含量开始逐渐升高,至落叶盛期的 10、11 月杜仲树基本停止生长,成分可能没有发生转移或降解,积累在叶片组织中,此时出现了一个含量高点^[2]。

进一步分析了同一立地条件下(虹口乡的 1#和成都植物园的 1#均代表雄树,虹口乡的 2#和成都植

物园在芽开绽期的 3、4 月峰面积值最大,随后逐渐减小,7 月降至最小,然后逐渐回升至 9 月出现次高点,10 月逐渐减小,11 月略有回升;7 号色谱峰面积从 3、4 月逐渐增大至 6 月出现第 1 波峰,7 月略减小,8 月大幅度增大呈第 2 波峰,9 月回落,10 月上升至年度最高点,11 月稍回落;9 号色谱峰 3、4 月峰面积值最大,5 月减小,6 月略回升,7 月降至最小,8 月显著增大,9 月稍减小,至落叶盛期的 10、11 月略回升;10 号色谱峰与 9 号色谱峰的变化趋势基本相同,但其峰面积在 5 月有次高点,6 月减小;在芽开绽期的总峰面积值最大,次月减小,5 月出现回升,再逐渐降低,7 月降至最小,然后逐渐回升延续至落叶盛期。

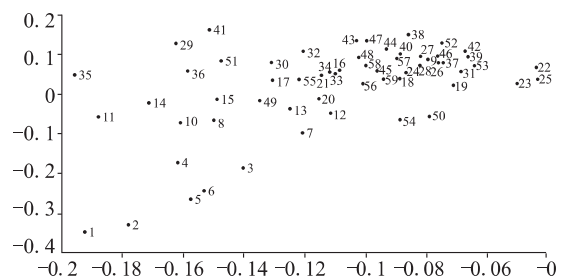
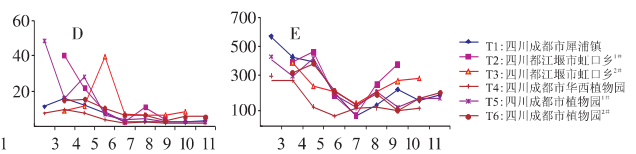


图 3 样品主成份投影图

Fig 3 Projection figure of sample principal component



物园的 2#均代表雌树) 的雌、雄杜仲树叶中主要成分的积累趋势,结果表明:性别对杜仲叶中化学成分的积累规律无影响,与文献^[4]一致。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 张康健. 中国杜仲次生代谢物 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [3] 伍庆, 王兴宁, 张明时, 等. 高效液相色谱法同时测定杜仲叶药材中芦丁等 3 种黄酮类有效成分的含量 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1186-1187.
- [4] 张康健, 白明生, 张檀, 等. 杜仲叶次生代谢物与个体生长发育特性的研究 [J]. 林业科学, 2001, 37(6): 45-51.

收稿日期: 2009-09-27