

# 不同干燥方式对杜仲叶4种活性成分含量的影响<sup>Δ</sup>

郑艳萍<sup>1\*</sup>, 潘艳琼<sup>2</sup>, 秦昆明<sup>1</sup>, 徐虹<sup>2#</sup> (1.南京海昌中药集团有限公司, 南京 210061; 2.江苏省第二中医院药剂科, 南京 210061)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3973-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.23

**摘要** 目的:考察不同干燥方式对杜仲叶中活性成分含量的影响,为建立杜仲叶在产地采收后的干燥加工方式提供参考。方法:取杜仲叶采用不同干燥方法[自然阴干72 h、自然晒干36 h、烘干(60℃ 6 h、80℃ 2 h、100℃ 1 h、120℃ 0.5 h)、微波真空冷冻干燥12 h、真空冷冻干燥12 h]对杜仲叶进行处理;采用高效液相色谱法同时测定样品中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量,并与未处理的鲜品进行比较。结果:2种冷冻干燥后的样品与鲜品中的4种成分含量接近,并高于其他干燥方式处理的样品。结论:干燥方法对杜仲叶有效成分具有较显著的影响,微波真空冷冻干燥和真空冷冻干燥较自然阴干、自然晒干、烘干更能保留杜仲鲜叶中的活性成分。

**关键词** 杜仲叶;桃叶珊瑚苷;京尼平苷酸;绿原酸;京尼平苷;干燥方式;微波真空冷冻干燥;真空冷冻干燥

**Effects of Different Drying Methods on Contents of 4 Active Ingredients in Leaves of *Eucommia ulmoides***  
ZHENG Yanping<sup>1</sup>, PAN Yanqiong<sup>2</sup>, QIN Kunming<sup>1</sup>, XU Hong<sup>2</sup> (1.Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Co., Ltd., Nanjing 210061, China; 2.Dept. of Pharmacy, Jiangsu Second TCM Hospital, Nanjing 210061, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of different drying methods on contents of active ingredients in leaves of *Eucommia ulmoides*, and provide reference for establishing its drying methods after habitat harvesting. METHODS: Different drying methods [natural drying in the shade for 72 h, natural drying in the sunlight for 36 h, drying beside or over a fire (60℃ 6 h, 80℃ 2 h, 100℃ 1 h, 120℃ 0.5 h), microwave vacuum freeze drying for 12 h, vacuum freeze drying for 12 h] were used for processing. HPLC was conducted to determine the contents of aucubin, geniposidic acid, chlorogenic acid and geniposide in samples and compare with the untreated fresh products. RESULTS: Contents of 4 ingredients in samples after the 2 freeze drying were close to these in fresh samples, which were higher than samples after other drying. CONCLUSIONS: Drying methods show significant effects on the effective ingredients in leaves of *E. ulmoides*. Compared with natural drying in the shade and natural drying sunlight and drying beside or over a fire, microwave vacuum freeze drying and vacuum freeze drying can make better retention of the active ingredients in fresh leaves of *E. ulmoides*.

**KEYWORDS** Leaves of *Eucommia ulmoides*; Aucubin; Geniposidic acid; Chlorogenic acid; Geniposide; Drying method; Microwave vacuum freeze drying; Vacuum freeze drying

杜仲叶为杜仲科杜仲属植物杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)的干叶<sup>[1]</sup>。杜仲传统以树皮入药,是中国自古以来名贵滋补药材<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明,杜仲中有效成分对免疫系统、内分泌系统、中枢神经系统、循环系统和泌尿系统均有不同程度的调节作用,还能兴奋垂体-肾上腺皮质系统,增强肾上腺皮质功能<sup>[3]</sup>。

由于杜仲传统加工方式导致剥皮树死,为保护杜仲植物资源,作为替代资源的杜仲叶的化学成分及药理作用研究近年来已取得初步进展。杜仲叶与传统杜仲皮的化学成分和药理作用极其相似,均具有降压作用<sup>[4]</sup>。桃叶珊瑚苷是杜仲叶中重要的生物活性物质,具有清湿热、利尿、镇痛、降压、保护肝脏、抗肿瘤等作用,能促进

干细胞再生,显著抑制乙型肝炎病毒DNA的复制<sup>[5]</sup>;杜仲叶中的活性成分京尼平苷酸具有消炎、利胆等功效,临床用于降压效果非常显著<sup>[6]</sup>;杜仲叶中含量较高的活性成分之一绿原酸具有抗菌消炎、特殊的抗诱变及抗恶性肿瘤等多种药理疗效<sup>[7]</sup>;另一种活性成分京尼平苷对心血管系统、消化系统及中枢神经系统疾病均有独特的疗效,同时,京尼平苷还有抗炎和治疗软组织损伤的疗效<sup>[8]</sup>。杜仲叶在产地采收以后需要干燥后储存,传统干燥方式以低温烘干为主<sup>[9]</sup>,而近年来又出现多种新的干燥方式,如微波真空冷冻干燥和真空冷冻干燥等。为比较各干燥方式的效果,笔者在本试验中较系统地研究了杜仲叶经自然阴干、自然晒干、烘干、冷冻干燥后,主要活性成分桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量变化,比较各干燥工艺对杜仲叶主要活性成分的影响,为杜仲叶干燥方式的改进提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20AB 高效液相色谱(HPLC)仪,包括二极管阵

Δ 基金项目:国家中医药管理局公益性行业专项——30味中药饮片产地加工及饮片生产一体化研究(No.201507002-2)

\* 助理研究员,硕士。研究方向:中药分析与质量标准。E-mail: zyp611@163.com

# 通信作者:副主任中药师。研究方向:中药制剂与质量标准。E-mail: 2541999692@qq.com

列检测器(DAD)(日本 Shimadzu 公司);FA1104 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ3200DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:350 W,频率:40 kHz);TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂);真空冷冻干燥机(北京四环仪器公司);YHW-4S 微波真空冷冻干燥机(南京亚泰微波能技术研究所)。

## 1.2 药材、药品与试剂

杜仲叶(于2016年7月采摘自北京林业科学研究院,经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为杜仲植物的新鲜叶);桃叶珊瑚苷对照品(批号: MUST-11091601,纯度:>98%)、京尼平苷酸对照品(批号: MUST-11121502,纯度:>98%)均来自成都曼思特生物科技有限公司;绿原酸对照品(批号: 110753-200413,纯度:>98%)、京尼平苷对照品(批号: 110749-200613,纯度:>98%)均来自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 不同干燥方式制备杜仲叶样品

通过参考文献[9]方法及预试验筛选,本试验采用以下几种干燥方式。

2.1.1 自然阴干 取杜仲叶鲜品1份,50 g,于室内通风处自然阴干(72 h),备用,样品编号S1。

2.1.2 自然晒干 取杜仲叶鲜品1份,50 g,于日光下晒干(36 h),备用,样品编号S2。

2.1.3 烘干 取杜仲叶鲜品4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60、80、100、120 °C下加热,各温度下分别干燥6、2、1、0.5 h后取出,备用,样品编号分别为S3、S4、S5、S6。

2.1.4 微波真空冷冻干燥 取杜仲叶鲜品1份,50 g, -40 °C预冻后放入微波真空冷冻干燥机进行冷冻干燥(微波功率为700 W,冷阱温度为-40 °C,真空度为0.07 kPa),干燥12 h后取出,备用,样品编号S7。

2.1.5 真空冷冻干燥 取杜仲叶鲜品1份,50 g, -40 °C预冻后放入真空冷冻干燥机进行冷冻干燥(冷阱温度为-45 °C,真空度为0.06 kPa),干燥12 h后取出,备用,样品编号S8。

2.1.6 未干燥 另取杜仲叶鲜品不作任何处理,样品编号为S9。

### 2.2 色谱条件与系统适用性试验

参考文献[10-13]确定色谱条件。色谱柱:YMC C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:200 nm;柱温:35 °C;进样量:10 μL。取“2.3”项下供试品(S7)溶液和混合对照品溶液进样分析,色谱图见图1。

由图1可见,4个主成分的峰之间及与相邻峰之间分离度均大于1.5,杂质及其他成分不干扰主成分的测定。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

t, min	A, %	B, %
0	5	95
10	5	95
18	10	90
40	14	86

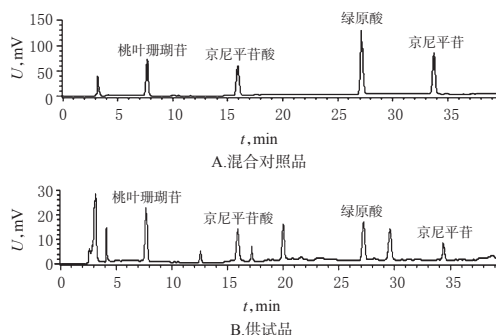


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液 参考文献[12]方法制备。分别取不同干燥方式制得的杜仲叶样品适量,粉碎后过3号筛;其中冷冻干燥的样品,在干冰保护下研钵捣碎后过筛。取过筛粉末约1 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,加入20 mL石油醚超声30 min,过滤弃去滤液;滤渣挥干,精密加入80%甲醇10 mL,称定质量,超声处理40 min,放冷;再称定质量,用80%甲醇补足损失的质量,摇匀,0.45 μm滤膜过滤;取续滤液,即得供试品溶液。新鲜杜仲叶取约4.1 g(相当于干燥品1 g),剪碎后同法处理。

2.3.2 混合对照品溶液 分别精密制备质量浓度为2.1 mg/mL的桃叶珊瑚苷、0.72 mg/mL的京尼平苷酸、0.692 mg/mL的绿原酸和1.4 mg/mL的京尼平苷的甲醇对照品溶液,分别吸取0.5、1、1、0.5 mL置于5 mL量瓶中,用甲醇定容,即得混合对照品溶液。

### 2.4 线性关系与定量限考察

精密量取混合对照品溶液0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加80%甲醇定容至刻度,摇匀。将上述制备好的不同质量浓度的混合对照品溶液按照“2.2”项下色谱条件进样分析。以对照品的峰面积(y)对对应的质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程、相关系数及线性范围。以各化合物的信噪比等于10时的相应质量浓度确定定量限(LOQ),结果见表2。

表2 4种成分的线性关系和定量限

Tab 2 Linear relationship and LOQ of 4 ingredients

成分	线性方程	线性范围, μg/mL	r	LOQ, ng
桃叶珊瑚苷	$y=8.0 \times 10^5 x + 78\ 443$	1.05~105	0.999 5	105
京尼平苷酸	$y=8.0 \times 10^5 x + 39\ 819$	1.40~140	0.999 9	14
绿原酸	$y=2.0 \times 10^5 x + 203\ 716$	1.44~144	0.999 8	14.4
京尼平苷	$y=1.0 \times 10^5 x + 40\ 621$	1.38~138	0.999 6	138

### 2.5 精密度试验

取混合对照品溶液,在“2.2”项条件下连续进样6次,记录保留时间和峰面积。计算得桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷峰面积的RSD分别为4.56%、2.34%、4.72%、2.71% ( $n=6$ ),保留时间的RSD分别为3.03%、2.64%、3.88%、1.48% ( $n=6$ )。结果表明,该仪器的精密度良好。

## 2.6 重复性试验

取S7样品粉末,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,平行6份,按“2.2”项下色谱条件进样测定。计算得桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷含量的RSD分别为2.37%、1.79%、1.70%、4.17% ( $n=6$ ),保留时间的RSD分别为1.15%、0.83%、0.79%、1.04% ( $n=6$ )。结果表明,该方法的重复性较好。

## 2.7 稳定性试验

取S7样品的供试品溶液,分别在放置0、1、6、12、18、24 h后进样测定,记录峰面积和保留时间。结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷峰面积的RSD分别为3.70%、1.03%、3.04%、3.69% ( $n=6$ ),保留时间的RSD分别为2.35%、3.73%、2.73%、3.22% ( $n=6$ )。结果表明,供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 2.8 准确度试验

取已测定含量的S7样品6份,精密称定,分别精密加入一定量的桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷对照品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样分析,计算回收率。结果桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷平均加样回收率分别为98.61%、98.56%、99.50%、101.28%,RSD分别为1.82%、3.25%、1.80%、1.47% ( $n=6$ )。

## 2.9 样品中4种成分含量测定

取9种样品制备的供试品溶液进样测定,计算样品中桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量(以干燥品计)。各数据采用SPSS 17.0软件进行统计分析,多组均数比较采用单因素方差分析,组间进行多重比较,分析采用LSD法。结果见表3。

表3 样品中4种成分含量测定结果( $n=3$ , mg/g)

Tab 3 Determination results of 4 ingredients of samples( $n=3$ , mg/g)

样品	桃叶珊瑚苷	京尼平苷酸	绿原酸	京尼平苷
S1	0.091*	2.50	3.35*	1.23*
S2	0.072*	2.42*	3.12*	1.19*
S3	0.065*	2.41*	3.02*	1.39
S4	0.051*	2.41*	2.78*	1.35
S5	0.049*	2.42*	2.63*	1.37
S6	0.041*	2.41*	2.61*	1.38
S7	0.123	2.54	4.79	1.46
S8	0.131	2.54	4.77	1.45
S9	0.138	2.56	4.81	1.44

注:与S9样品比较,\* $P<0.05$

Note: vs. S9 samples, \* $P<0.05$

通过表3可知,除S1、S2外,各干燥样品中京尼平苷含量与鲜叶比较变化不大;S7、S8与鲜叶中4种成分的含量均接近,并高于其他方式干燥后的样品。

## 3 讨论

本试验在考察杜仲叶的自然阴干、晒干、烘干、冷冻干燥工艺的基础上,建立了同时测定杜仲叶中4种活性成分即桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷含量的HPLC法,并对不同干燥方式的效果进行了比较。结果表明,本文建立的含量测定方法重复性好、可操作性强,所测结果比较全面、直观地反映了不同干燥方式处理后的杜仲叶中4种活性成分的差异,可用于杜仲叶药材的功效成分定量研究及质量控制。

笔者在前期试验中分别比较了不同提取溶剂(甲醇、50%甲醇、80%甲醇、乙醇、50%乙醇、80%乙醇)、不同提取方法(超声、回流、索氏提取等)、不同流动相组成(乙腈-0.2%乙酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液、甲醇-0.2%乙酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液)条件下的提取效果,以及在HPLC-DAD全波段190~800 nm波长下的扫描结果。结果显示,提取溶剂为80%甲醇时被测成分提取率最高;3种提取方法的效果相近,但因超声方法简单易行,故选取超声提取;流动相选择乙腈-0.2%磷酸水溶液、检测波长在200 nm时,被测成分分离度好、干扰小、色谱图基线平稳。

真空冷冻干燥机和微波真空冷冻干燥机一次干燥最大容量为1.2 L,因为杜仲叶体积较大,所以每次干燥量一般约为50 g。与真空冷冻干燥机比较,微波真空冷冻干燥机增加了微波功能,而微波可以穿透物料,可以在物料内部形成均匀的内热源,补充了物料冻干所需能量,故其干燥时间缩短。真空冷冻干燥机由于没有微波功能,故其冷冻效率更低,若要达到相同的冷冻效果就要降低冷冻温度,因此本试验中真空冷冻干燥温度设置为-45℃,由于温度低,真空度只能达到0.06 kPa。

通过比较9种杜仲叶样品中活性成分的含量发现,在产地、品种、采收时间等因素都相同的情况下,采取不同的干燥方式制得的杜仲叶样品活性成分含量相差较大,与文献结论<sup>[14-15]</sup>一致。桃叶珊瑚苷和绿原酸在烘干方式下,随着烘干温度升高,含量降低,尤其以桃叶珊瑚苷含量变化尤为明显,可能与这2种成分的热稳定性差有很大的关系。2种真空冷冻干燥处理后的样品,其中的活性成分含量与鲜叶样品最接近,表明冷冻干燥工艺更能保留杜仲叶的活性成分。

为提高杜仲叶药材的有效利用率,必须选择高效、稳定、可靠的干燥方式并加以规范操作,才能更有效地利用药材资源。本研究为筛选适用于杜仲叶的产地干燥方式、提高和控制杜仲叶药材质量提供了科学依据。

## 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年

# 复方五指毛桃颗粒的提取工艺研究<sup>Δ</sup>

孙丽娜<sup>1\*</sup>, 刘小虹<sup>1</sup>, 刘建博<sup>2</sup>, 邵瑶昕<sup>3</sup>, 黄慧婷<sup>2</sup>, 张志强<sup>1</sup>, 王硕辉<sup>1</sup>, 王振华<sup>1#</sup>(1.广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2.广州中医药大学第一附属医院呼吸科, 广州 510405; 3.广州中医药大学科技产业园有限公司, 广州 510445)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3976-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.24

**摘要** 目的:优化复方五指毛桃颗粒的提取工艺。方法:以复方五指毛桃颗粒提取液中补骨脂素、苦杏仁苷的转移率及出膏率为指标,采用 $U_{12}(6 \times 4 \times 3)$ 均匀设计表安排试验,考察加水倍量、提取时间、提取次数3个因素对提取工艺的影响,并通过3次放大试验对优化工艺进行验证。结果:优化工艺为加10倍量水、提取3次、每次60 min。在此条件下,提取液中补骨脂素、苦杏仁苷的转移率及出膏率分别为82.51% (RSD=1.45%,  $n=3$ )、93.69% (RSD=0.85%,  $n=3$ )、18.89% (RSD=0.74%,  $n=3$ ),工艺验证结果均置于预测值的95%置信区间内。结论:优化的提取工艺稳定、可行,为该制剂的后续开发提供了科学依据。

**关键词** 复方五指毛桃颗粒;均匀设计;提取工艺;补骨脂素;苦杏仁苷

## Study on the Extraction Technology of Compound Radix Fici Hirta Granule

SUN Lina<sup>1</sup>, LIU Xiaohong<sup>1</sup>, LIU Jianbo<sup>2</sup>, SHAO Yaoxin<sup>3</sup>, HUANG Huiting<sup>2</sup>, ZHANG Zhiqiang<sup>1</sup>, WANG Shuohui<sup>1</sup>, WANG Zhenhua<sup>1</sup>(1.College of TCM, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2.Dept. of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 3.Science and Technology Park Co., Ltd., Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510445, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Compound radix fici hirta granule. METHODS: Using the transfer rate of psoralen and amygdalin in extraction liquid of Compound radix fici hirta granule and extraction rate as indexes,  $U_{12}(6 \times 4 \times 3)$  uniform design was used for the test, the effects of amount of adding water, extraction time, extraction times on the

- 版.北京:中国医药科技出版社,2015:166.
- [2] 肖芳,黄勤挽,范润勇,等.HPLC法同时测定杜仲3个药用部位中8种成分[J].中成药,2016,38(8):1782-1786.
- [3] 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):81-85.
- [4] 黄勤挽,王瑾,苏娟双,等.双波长HPLC法同时测定杜仲雄花中3种成分的含量[J].中国药房,2011,22(27):2565-2567.
- [5] 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.
- [6] 孙彦超,李钦,杜红岩,等.RP-HPLC测定杜仲叶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量[J].中成药,2009,31(10):1608-1609.
- [7] 李文娜,韩宇东,刘银花,等.杜仲叶绿原酸提取物对脂代谢关键酶活性的影响[J].中药新药与临床药理,2012,23(1):30-33.
- [8] Li Y, Kamo S, Metori K, et al. The promoting effect of eucommiol from Eucommiae cortex on collagen synthesis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(1): 54-59.
- [9] 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):2485-2491.
- [10] 王柏强,刘福,江承平,等.正交试验优选杜仲叶绿原酸的提取工艺[J].中国药房,2014,25(27):2527-2530.
- [11] 唐芳瑞,荣华,邵峰,等.不同产地杜仲叶高效液相色谱指纹图谱分析[J].时珍国医国药,2016,27(6):1496-1498.
- [12] 阿来·赛坎,文娥,田树革.高效液相色谱法同时测定杜仲叶中4种有效成分的含量[J].国际药学研究杂志,2016,43(3):571-574.
- [13] Wang JL, Liu EW, 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.
- [14] 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.
- [15] 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.

<sup>Δ</sup> 基金项目:广东省中医药强省建设专项资金医院中药制剂建设项目(No.粤中医办函[2015]102号);广东省科技计划项目(No.2014B050-502013,2014B040404066,2015B020234003)

\* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型、新技术。E-mail: 1083532885@qq.com

# 通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:药物新剂型、新技术。E-mail: wzh@gzucm.edu.cn

(收稿日期:2017-01-05 修回日期:2017-04-20)

(编辑:刘 萍)