

# 枇杷叶生品及不同炮制品质量评价<sup>△</sup>

高伟城\*,王小平#,何丽珊(漳州卫生职业学院药学系,福建漳州 363000)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)02-0196-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.02.12



**摘要** 目的 评价枇杷叶生品及不同炮制品的质量。方法 将10批枇杷叶生品分别制成蜜炙枇杷叶、姜汁炙枇杷叶、姜汁煮枇杷叶、甘草汁炙枇杷叶、甘草汁煮枇杷叶、清炒枇杷叶,共70批样品。采用热浸法测定其醇溶性浸出物含量,采用紫外-可见分光光度法测定其总三萜酸含量(以熊果酸计),采用高效液相色谱法测定其中野鸦椿酸等5个三萜酸类成分的含量;采用高效液相色谱法联合《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》建立指纹图谱并进行相似度评价,与混合对照品比对指认共有峰。采用SPSS 22.0软件和SIMCA-P 14.1软件进行系统聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析。结果 枇杷叶生品、蜜炙枇杷叶、姜汁炙枇杷叶、姜汁煮枇杷叶、甘草汁炙枇杷叶、甘草汁煮枇杷叶、清炒枇杷叶中醇溶性浸出物平均测定值分别为25.90%、39.95%、27.44%、28.20%、28.38%、26.36%、29.26%,总三萜酸平均含量分别为40.62、49.33、52.56、46.38、52.17、55.06、53.41 mg/g,野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸的平均含量和平均总含量分别为1.966~4.808、1.459~2.824、4.525~8.172、1.294~1.817、6.294~8.470、15.538~25.671 mg/g。70批样品中有11个共有峰,指认出峰2、5、6、10、11分别为野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸。枇杷叶生品及不同炮制品与生品指纹图谱的相似度为0.919~1.000。70批样品中,10批枇杷叶生品聚为一类,10批姜汁煮枇杷叶聚为一类,其他50批枇杷叶炮制品聚为一类;前2个主成分的累计方差贡献率为80.682%;变量投影重要性(VIP)值排序为峰2(野鸦椿酸)>峰5(山楂酸)>峰6(科罗索酸)>峰9(未知成分)>峰11(熊果酸)>峰10(齐墩果酸),其值均大于1。结论 枇杷叶生品经炮制后,醇溶性浸出物、总三萜酸含量和5个三萜酸类成分(野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸)总含量均有不同程度的增加,其中蜜炙枇杷叶中醇溶性浸出物最高,甘草汁煮枇杷叶中总三萜酸含量最高,姜汁煮枇杷叶中5个三萜酸类成分总含量最高。野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、熊果酸、齐墩果酸等成分可能是影响枇杷叶生品及炮制品质量的差异性成分。

**关键词** 枇杷叶;炮制品;醇溶性浸出物;三萜酸类成分;指纹图谱;化学模式识别;质量评价

## Quality evaluation of crude drug and different processed products of Eriobotryae Folium

GAO Weicheng, WANG Xiaoping, HE Lishan(Dept. of Pharmacy, Zhangzhou Health Vocational College, Fujian Zhangzhou 363000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To evaluate the quality of crude drug and different processed products of Eriobotryae Folium. **METHODS** Ten batches of Eriobotryae Folium were processed into honey-stir-baked Eriobotryae Folium, ginger-juice-stir-baked Eriobotryae Folium, ginger-juice-boiled Eriobotryae Folium, licorice-juice-stir-baked Eriobotryae Folium, licorice-juice-boiled Eriobotryae Folium, stir-fried Eriobotryae Folium, totally 70 batches of samples. The contents of alcohol-soluble extracts, the contents of total triterpene acids (calculated by ursolic acid) and five triterpene acids such as euscaphic acid were determined by hot-dipping method, ultraviolet and visible spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC), respectively. The fingerprints were established with HPLC and their similarity evaluation was conducted with *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2004A). Common peaks were identified by comparison with mixed control. Hierarchical clustering analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were performed by using SPSS 22.0 software and SIMCA-P 14.1 software. **RESULTS** In Eriobotryae Folium, honey-stir-baked Eriobotryae Folium, ginger-juice-stir-baked Eriobotryae Folium, ginger-juice-boiled Eriobotryae Folium, licorice-juice-stir-baked Eriobotryae Folium, licorice-juice-boiled Eriobotryae Folium, stir-fried Eriobotryae Folium, average contents of alcohol-soluble extracts were 25.90%, 39.95%, 27.44%, 28.20%, 28.38%, 26.36% and 29.26%; average contents of total triterpene acids were 40.62, 49.33, 52.56, 46.38, 52.17, 55.06 and 53.41 mg/g; average contents of euscaphic acid, crataegolic acid, corosolic acid, oleanolic acid, ursolic acid and average total content were 1.966-4.808, 1.459-2.824, 4.525-8.172, 1.294-1.817, 6.294-8.470, 15.538-25.671 mg/g, respectively. There were 11 common peaks in 70 batches of samples, and the peak 2, 5, 6, 10 and 11 were identified as euscaphic acid, crataegolic acid, corosolic acid, oleanolic acid and ursolic acid. The similarities of crude drug and different processed products with crude drug fingerprint were 0.919-1.000. Among 70 batches of samples, 10 batches of Eriobotryae Folium could be clustered into one category, and 10 batches of ginger-juice-boiled Eriobotryae Folium could

<sup>△</sup> 基金项目:漳州市市级个人科技特派员资助项目(No.20210187);漳州卫生职业学院科技创新团队培育计划项目(No.Kjcx-5)

\* 讲师,硕士。研究方向:中药提取分离及质量分析。电话:0596-2559522。E-mail:280493018@qq.com

# 通信作者:教授,博士。研究方向:中药制剂及质量标准。电话:0596-2559522。E-mail:jxrcwxp@163.com

be clustered into one category; other 50 batches of processed products of *Eriobotryae Folium* could be clustered into one category; the cumulative variance contribution rate of the first two principal components was 80.682%; variable importance in projection (VIP) value was in descending order, i.e. peak 2 (euscaphic acid) > peak 5 (crataegolic acid) > peak 6 (corosolic acid) > peak 9 (unknown component) > peak 11 (ursolic acid) > peak 10 (oleanolic acid), which of them were all higher than 1.

**CONCLUSIONS** After processing, the contents of alcohol-soluble extracts, total triterpene acids and the total content of five triterpene acids (euscaphic acid, crataegolic acid, corosolic acid, oleanolic acid and ursolic acid) increased in varying degrees, among which the content of alcohol-soluble extracts in honey-stir-baked *Eriobotryae Folium* was the highest, the content of total triterpene acids in licorice-juice-boiled *Eriobotryae Folium* was the highest, and total content of five triterpene acids in ginger-juice-boiled *Eriobotryae Folium* was the highest. Euscaphic acid, crataegolic acid, corosolic acid, ursolic acid, oleanolic acid and other components may be the differential components affecting the quality of raw and processed the leaves from *Eriobotryae Folium*.

**KEYWORDS** *Eriobotryae Folium*; processed product; alcohol-soluble extracts; triterpene acids; fingerprint; chemical pattern recognition; quality evaluation

枇杷叶为蔷薇科植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶, 能清肺止咳、降逆止呕<sup>[1]</sup>。该药首载于《名医别录》, 列为中品<sup>[2]</sup>。现代研究表明, 枇杷叶的重要药效成分为野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸等三萜酸类<sup>[3]</sup>; 其乙醇提取物具有镇咳等作用<sup>[4]</sup>。枇杷叶炮制历史悠久, 从晋代至今的炮制方法有蜜炙、姜汁炙、姜汁煮、甘草汁炙、甘草汁煮、炒制等<sup>[5]</sup>, 如2020年版《中国药典》(一部) 记载有枇杷叶生品和蜜炙品<sup>[1]</sup>; 《上海市中药饮片炮制规范(2018年版)》记载有清炒枇杷叶<sup>[6]</sup>; 《圣济总录》中记载, “治伤寒干呕, 烦渴不止。枇杷叶去毛姜汁炙”<sup>[7]</sup>; 《本草纲目》中曰, “凡用拭去毛, 甘草汤洗再试”<sup>[7]</sup>。枇杷叶不同炮制品的临床应用广泛, 蜜炙枇杷叶多用于治疗肺燥咳嗽; 姜汁制枇杷叶多用于和胃止呕; 甘草制枇杷叶多用于祛痰止咳; 清炒枇杷叶少了油腻之性, 多用于治疗外感咳嗽、呕吐<sup>[5]</sup>。可见, 不同炮制方法可直接影响枇杷叶的临床功效, 故很有必要对其不同炮制品的药效物质及化学成分进行分析。

本文通过分析枇杷叶生品及不同炮制品醇溶性浸出物、总三萜酸(以熊果酸计)和5个三萜酸类成分(野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸)含量的差异, 结合指纹图谱和化学模式识别方法研究不同炮制方法对枇杷叶中化学成分含量的影响, 以期对枇杷叶生品及其炮制品的质量评价和临床选择提供依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、XSE205DU型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)、OHAUS PX224ZH/E型万分之一电子分析天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司]、FST-III-10精密型超纯水机(上海富诗特仪器设备有限公司)、XL-10B型中药粉碎机(广州旭朗机械设备有限公司)、KQ5200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、HWS-2型电热恒温水浴锅

(上海一恒科学仪器有限公司)、电热鼓风高温干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

10批枇杷叶(定名为“早钟6号”)药材均于2020年10月采集自福建省漳州市云霄县火田镇, 用沸水烫3 min, 取出晾干, 再用鼓风高温干燥箱于70℃下烘干4 h; 甘草饮片(批号20180801)购自江西药都堂中药饮片有限公司; 生姜饮片(批号20200703)购自漳州新华都百货有限责任公司。上述药材/饮片经我院中药教研室王小平教授鉴定, 分别为蔷薇科植物枇杷 *E. japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶, 豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 以及姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎。

野鸦椿酸对照品(批号 MUST-21011201, 纯度 98.73%)、山楂酸对照品(批号 MUST-20062813, 纯度 99.79%)、科罗索酸对照品(批号 MUST-20061305, 纯度 99.79%)、齐墩果酸对照品(批号 MUST-19032706, 纯度 98.33%)、熊果酸对照品(批号 MUST-19062710, 纯度 98.46%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 蜂蜜(批号 20200090)购自北京同仁堂蜂产品(江山)有限公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 生品及炮制品的制备

2.1.1 枇杷叶生品 取干燥的枇杷叶, 切丝, 制得枇杷叶生品样品(编号 S1-1~S1-10)<sup>[1]</sup>。

2.1.2 蜜炙枇杷叶 取上述枇杷叶丝, 加蜜水(将蜂蜜制成炼蜜, 并用沸水稀释成蜜水, 炼蜜与水的质量比为2:1)拌匀, 闷透, 置于锅内, 用文火炒至不黏手时取出, 晾干, 制得蜜炙枇杷叶样品(编号 S2-1~S2-10)<sup>[8]</sup>。每100 g 枇杷叶丝用炼蜜 25 g。

2.1.3 姜汁炙枇杷叶 取上述枇杷叶丝, 加姜汁(加水将生姜捣成姜汁, 所得姜汁与生姜的质量比为1:1)拌匀, 闷透, 置于锅内, 用文火炒至姜汁被吸尽, 取出, 晾干, 制得姜汁炙枇杷叶样品(编号 S3-1~S3-10)<sup>[7]</sup>。每

100 g 枇杷叶丝用生姜 10 g。

2.1.4 姜汁煮枇杷叶 取上述枇杷叶丝,加水没过药材和生姜一起煮至水被吸尽后,文火炒干,取出,制得姜汁煮枇杷叶样品(编号 S4-1~S4-10)<sup>[7]</sup>。每 100 g 枇杷叶丝用生姜 10 g。

2.1.5 甘草汁炙枇杷叶 取上述枇杷叶丝,加甘草汁(每 1 g 甘草加水煮成 1.5 g 甘草汁)拌匀,闷透,置于锅内,用文火炒至甘草汁被吸尽,取出,晾干,制得甘草汁炙枇杷叶样品(编号 S5-1~S5-10)<sup>[7]</sup>。每 100 g 枇杷叶丝用甘草 6 g。

2.1.6 甘草汁煮枇杷叶 取上述枇杷叶丝,加水没过药材和甘草一起煮至水被吸尽后,文火炒干,取出,制得甘草汁煮枇杷叶样品(编号 S6-1~S6-10)<sup>[7]</sup>。每 100 g 枇杷叶丝用甘草 6 g。

2.1.7 清炒枇杷叶 取上述枇杷叶丝,置于锅内,用文火炒至微具焦斑,筛去灰屑,制得清炒枇杷叶样品(编号 S7-1~S7-10)<sup>[6]</sup>。

## 2.2 枇杷叶生品及不同炮制品醇溶性浸出物的测定

根据 2020 年版《中国药典》(四部)通则“2201 浸出物测定法”,以 75% 乙醇为溶剂,采用热浸法测定 10 批枇杷叶生品及不同炮制品中醇溶性浸出物的含量<sup>[8]</sup>。结果显示,枇杷叶生品及不同炮制品的醇溶性浸出物含量都符合 2020 年版《中国药典》(一部)要求<sup>[1]</sup>,且炮制后枇杷叶醇溶性浸出物均有所增加,其中蜜炙枇杷叶增加幅度最大,增幅达到了 54.25%。枇杷叶生品及不同炮制品中醇溶性浸出物平均含量的高低顺序依次为蜜炙枇杷叶>清炒枇杷叶>甘草汁炙枇杷叶>姜汁煮枇杷叶>姜汁炙枇杷叶>甘草汁煮枇杷叶>枇杷叶生品。结果见表 1。

表 1 枇杷叶生品及不同炮制品醇溶性浸出物的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10, \%$ )

样品	醇溶性浸出物	样品	醇溶性浸出物
枇杷叶生品	25.90±0.24	甘草汁炙枇杷叶	28.38±0.41
蜜炙枇杷叶	39.95±0.31	甘草汁煮枇杷叶	26.36±0.36
姜汁炙枇杷叶	27.44±0.18	清炒枇杷叶	29.26±0.34
姜汁煮枇杷叶	28.20±0.27		

## 2.3 总三萜酸含量的测定

采用紫外-可见分光光度法进行测定。

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取熊果酸对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,加 95% 乙醇超声(功率 250 W, 频率 50 kHz, 下同)溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为 86.4  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液<sup>[9]</sup>。

2.3.2 供试品溶液的制备 取样品粗粉约 1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 95% 乙醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,加 95% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液 1 mL,用 95% 乙醇定容于 25 mL 量瓶中,备用。

2.3.3 方法学考察 使用紫外-可见分光光度计在 550

nm 波长处测定熊果酸的吸光度( $A$ )。以  $A$  值为纵坐标、熊果酸质量浓度( $c, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标进行线性回归,得回归方程为  $A=0.071 1c-0.056$  ( $r=0.999 6$ ),熊果酸检测质量浓度的线性范围为 2.88~14.4  $\mu\text{g/mL}$ ;精密度、稳定性(24 h)、重复性试验的 RSD 均小于 2% ( $n=6$ );平均加样回收率为 97.88% ( $RSD=1.96\%, n=6$ )。具体内容参看文献[9]。

2.3.4 样品中总三萜酸的含量测定 精密吸取 10 批枇杷叶生品及不同炮制品的供试品溶液各 1 mL,按照“2.3.3”项下方法测定吸光度并代入回归方程计算总三萜酸含量。结果显示,枇杷叶生品经炮制后总三萜酸含量均增加,其中甘草汁煮枇杷叶的总三萜酸含量最高,增幅达到了 35.55%。枇杷叶生品及不同炮制品中总三萜酸平均含量的高低顺序依次为甘草汁煮枇杷叶>清炒枇杷叶>姜汁炙枇杷叶>甘草汁炙枇杷叶>蜜炙枇杷叶>姜汁煮枇杷叶>枇杷叶生品。结果见表 2。

表 2 枇杷叶生品及不同炮制品中总三萜酸的含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/g}$ )

样品	总三萜酸含量	样品	总三萜酸含量
枇杷叶生品	40.62±0.37	甘草汁炙枇杷叶	52.17±0.42
蜜炙枇杷叶	49.33±0.46	甘草汁煮枇杷叶	55.06±0.49
姜汁炙枇杷叶	52.56±0.51	清炒枇杷叶	53.41±0.38
姜汁煮枇杷叶	46.38±0.33		

## 2.4 野鸦椿酸等 5 个三萜酸类成分含量的测定

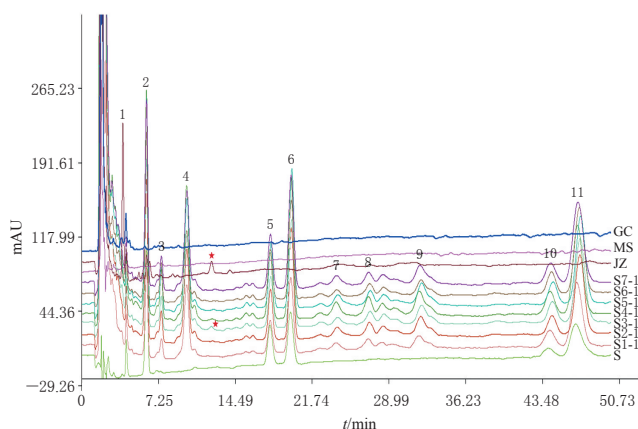
采用高效液相色谱法进行测定。

2.4.1 色谱条件 以 Shim-pack Scepter HD-C<sub>18</sub>-80 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 为色谱柱,以乙腈(A)-甲醇(B)-0.5% 乙酸铵溶液(C)为流动相进行梯度洗脱(0~20 min, 3% A→15% A, 76% B→64% B, 21% C; 20~50 min, 15% A→20% A, 64% B→59% B, 21% C);流速为 1.0 mL/min;柱温为 40  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长为 210 nm;进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。

2.4.2 溶液的配制 (1)混合对照品溶液:精密称取野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸对照品各适量,置于同一量瓶中,加 95% 乙醇超声溶解并定容,制成每 1 mL 分别含上述对照品 1 090、755、1 350、275、1 515  $\mu\text{g}$  的混合对照品溶液,备用。(2)供试品溶液:取枇杷叶生品及不同炮制品粗粉各约 2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 95% 乙醇 25 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,加 95% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,再过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,备用。(3)辅料溶液的制备:分别取蜜水 0.25 g、姜汁 0.1 g、甘草汁 1.25 g,分别按照“2.4.2(2)”项下方法制备辅料溶液,备用。

2.4.3 专属性考察 精密吸取“2.4.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液(编号 S1-1~S7-1)、辅料溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图 1)。结果显示,混合对照品溶液中,野鸦椿酸、山楂酸、

科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于1.5,理论板数按熊果酸峰计均大于5 000;各供试品溶液的主要色谱峰信息接近,图谱中5个已知色谱峰达到基线分离且保留时间与混合对照品溶液图谱一致;各辅料溶液对上述成分的测定无干扰。此外,姜汁炙枇杷叶供试品溶液(编号S3-1)图谱中新增加了1个色谱峰,经与辅料姜汁图谱对比,确认该新增色谱峰对应成分为姜汁成分。



S:混合对照品;S1-1:枇杷叶生品;S2-1:蜜炙枇杷叶;S3-1:姜汁炙枇杷叶;S4-1:姜汁煮枇杷叶;S5-1:甘草汁炙枇杷叶;S6-1:甘草汁煮枇杷叶;S7-1:清炒枇杷叶;JZ:姜汁;MS:蜜水;GC:甘草汁;2:野鸦椿酸;5:山楂酸;6:科罗素酸;10:齐墩果酸;11:熊果酸;1,3~4,7~9:未知成分;★:新增成分

图1 混合对照品、辅料、枇杷叶生品及不同炮制品的高效液相色谱图

2.4.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液1、2、3、4、5、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加入95%乙醇稀释至刻度,摇匀,按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定。以进样量( $x, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,结果见表3。

表3 野鸦椿酸等5个成分的回归方程和线性范围

待测成分	回归方程	$r$	线性范围/ $\mu\text{g}$
野鸦椿酸	$y=497.09x-55.338$	0.999 9	2.18~21.8
山楂酸	$y=438.57x-5.934 8$	0.999 8	1.51~15.10
科罗素酸	$y=336x+14.426$	0.999 8	2.70~27.00
齐墩果酸	$y=477.82x-12.787$	0.999 8	0.55~5.50
熊果酸	$y=421.47x+23.936$	0.999 8	3.03~30.30

2.4.5 精密度、重复性、稳定性、加样回收率考察 (1)精密度试验:精密吸取“2.4.4”项下混合对照品溶液(含野鸦椿酸545  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、山楂酸377.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、科罗素酸675  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、齐墩果酸137.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、熊果酸757.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),按照“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD均小于2%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。(2)重复性试验:取同一枇杷叶生品(编号S1-1)6份,按照“2.4.2(2)”项下方法制备供试品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并代入回归

方程计算含量。结果显示,野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸含量的RSD均小于3%( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。(3)稳定性试验:取同一供试品溶液(编号S1-1)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、24 h时按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸峰面积的RSD均小于2%( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。(4)加样回收率试验:精密称取已知含量的枇杷叶生品(编号S1-1)9份,每3份为1组,分别按已知量的80%、100%、120%加入混合对照品溶液,按照“2.4.2(2)”项下方法制备供试品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸的平均加样回收率为98.21%~101.82%,RSD均小于3%( $n=3$ )。

2.4.6 样品中5个三萜酸类成分的含量测定 分别取枇杷叶生品及不同炮制品适量,按照“2.4.2(2)”项下方法制备供试品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并代入回归方程计算含量。结果显示,枇杷叶生品经炮制后,野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸5个成分的含量均出现不同程度的增加,其中姜汁煮枇杷叶的野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸的含量增加最多,甘草汁煮枇杷叶中的齐墩果酸、熊果酸的含量增加最多。5个三萜酸类成分平均总含量的高低顺序依次为姜汁煮枇杷叶>甘草汁炙枇杷叶>清炒枇杷叶>甘草汁煮枇杷叶>姜汁炙枇杷叶>蜜炙枇杷叶>枇杷叶生品。结果见表4。

表4 枇杷叶生品及不同炮制品中野鸦椿酸等5个成分的含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg}/\text{g}$ )

样品	野鸦椿酸	山楂酸	科罗素酸	齐墩果酸	熊果酸	合计
枇杷叶生品	$1.966 \pm 0.010$	$1.459 \pm 0.047$	$4.525 \pm 0.023$	$1.294 \pm 0.035$	$6.294 \pm 0.059$	$15.538 \pm 0.081$
蜜炙枇杷叶	$3.453 \pm 0.010$	$2.109 \pm 0.038$	$6.278 \pm 0.028$	$1.518 \pm 0.037$	$7.147 \pm 0.225$	$20.505 \pm 0.260$
姜汁炙枇杷叶	$3.623 \pm 0.008$	$2.241 \pm 0.042$	$6.093 \pm 0.061$	$1.565 \pm 0.046$	$7.693 \pm 0.033$	$21.215 \pm 0.201$
姜汁煮枇杷叶	$4.808 \pm 0.008$	$2.824 \pm 0.053$	$8.172 \pm 0.045$	$1.716 \pm 0.047$	$8.151 \pm 0.087$	$25.671 \pm 0.149$
甘草汁炙枇杷叶	$4.538 \pm 0.010$	$2.495 \pm 0.043$	$7.928 \pm 0.139$	$1.650 \pm 0.029$	$8.029 \pm 0.161$	$24.640 \pm 0.617$
甘草汁煮枇杷叶	$4.066 \pm 0.009$	$2.316 \pm 0.029$	$6.236 \pm 0.029$	$1.817 \pm 0.051$	$8.470 \pm 0.137$	$22.905 \pm 0.178$
清炒枇杷叶	$4.083 \pm 0.011$	$2.413 \pm 0.023$	$6.944 \pm 0.068$	$1.627 \pm 0.036$	$8.111 \pm 0.105$	$23.178 \pm 0.087$

## 2.5 枇杷叶生品及不同炮制品指纹图谱的建立

采用高效液相色谱法操作。

2.5.1 色谱条件 同“2.4.1”项。

2.5.2 溶液的配制 同“2.4.2”项。

2.5.3 精密度、重复性、稳定性考察 (1)精密度试验:取枇杷叶生品供试品溶液(编号S1-1)适量,按照“2.5.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以熊果酸色谱峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,11个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%( $n=6$ ),表明该方法精密度良好。(2)重复性试验:取枇杷叶生品(编号S1-1)2 g,共6份,按照“2.5.2”

项下方法制备供试品溶液,按照“2.5.1”项下色谱条件进样测定,以熊果酸色谱峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,11个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。(3)稳定性试验:取枇杷叶生品供试品溶液(编号S1-1)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、24、48 h时按照“2.5.1”项下色谱条件进样测定,以熊果酸色谱峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,11个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置48 h内稳定性良好。

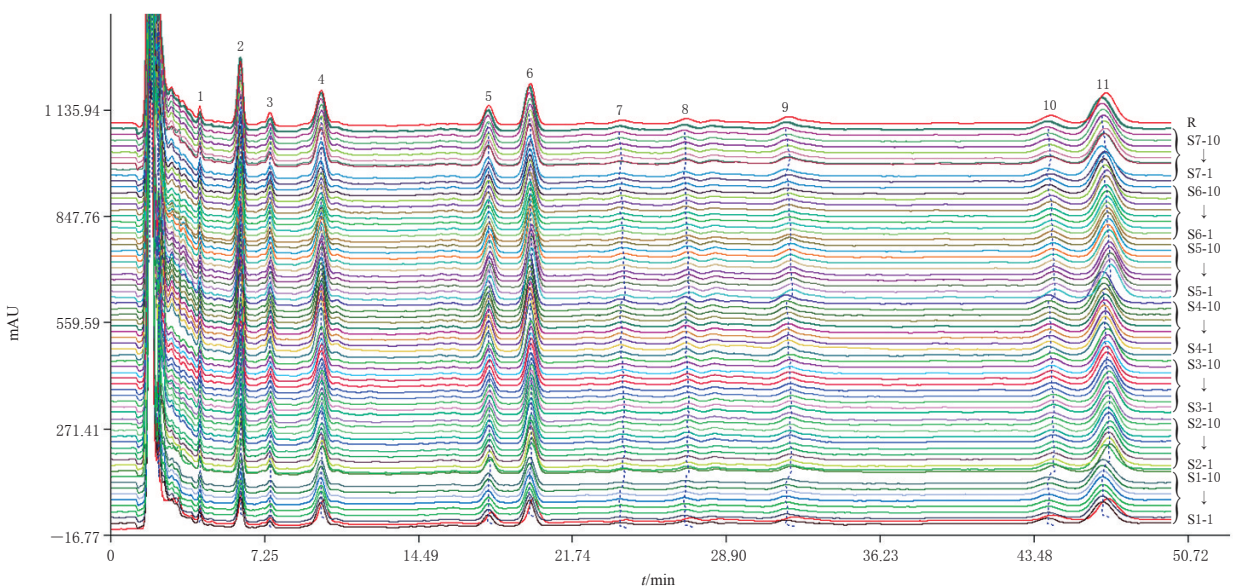
2.5.4 指纹图谱建立与相似度评价 将枇杷叶生品及不同炮制品的色谱信息导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》,选择S1-1图谱为参照,设定时间窗宽度为0.4 s,以中位数法自动匹配生成叠加指纹图谱和对照指纹图谱(R)并进行相似度分析。结果显示,70批枇杷叶生品及不同炮制品的指纹图谱中有11个共有峰;与混合对照品溶液色谱图(图1中的“S”)比对,指认峰2、5、6、10、11分别为野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸。与S1-1图谱进行比较,各批枇杷叶生品、蜜炙枇杷叶、姜汁炙枇杷叶、姜汁煮枇杷叶、甘草汁炙枇杷叶、甘草汁煮枇杷叶、清炒枇杷叶的相似度分别为0.995~1.000、0.966~0.977、0.984~0.987、0.919~0.930、0.966~0.970、0.959~0.966、0.969~0.983。由此可见,枇杷叶生品与6种枇杷叶炮制品存在一定差异,说明经炮制后枇杷叶成分的含量均有变化,其中姜汁煮枇杷叶的变化最为明显。70批枇杷叶生品及不同炮制品的对照指纹图谱和叠加指纹图谱见图2。

## 2.6 化学模式识别分析

2.6.1 系统聚类分析 将70批样品11个共有峰的峰面积信息导入SPSS 22.0软件,采用组间连接法进行系统聚类分析<sup>[10]</sup>。结果显示,当平方欧氏距离 $>10$ 时,70批样品可分为三大类,枇杷叶生品S1-1~S1-10为一类,姜汁煮枇杷叶S4-1~S4-10为一类,其余为一类,该结果与相似度分析结果基本一致。70批枇杷叶生品及不同炮制品的聚类分析树状图见图3。

2.6.2 主成分分析 将70批样品11个共有峰的峰面积信息导入SPSS 22.0软件,标准化处理后进行因子载荷矩阵分析并计算方差贡献率,以特征值 $>1$ 为标准筛选主成分<sup>[10]</sup>。结果显示,前2个主成分的累计方差贡献率为80.682%;第1主成分的方差贡献率为70.967%,主要反映共有峰2~11,其中峰2为野鸦椿酸、峰5为山楂酸、峰6为科罗索酸、峰10为齐墩果酸、峰11为熊果酸;第2主成分的方差贡献率为9.715%,主要反映峰1,该峰对应成分未知。70批枇杷叶生品及不同炮制品中前2个主成分的特征值和方差贡献率见表5。

2.6.3 正交偏最小二乘法-判别分析 将70批样品11个共有峰的峰面积信息导入SIMCA-P 14.1软件中进行正交偏最小二乘法-判别分析。结果显示,枇杷叶生品、姜汁煮枇杷叶与其他炮制品差异明显,详见图4。以变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)值大于1为依据<sup>[11]</sup>,筛选出对差异贡献较大的色谱峰有6个,贡献大小依次为峰2(野鸦椿酸) $>$ 峰5(山楂酸) $>$ 峰6(科罗索酸) $>$ 峰9 $>$ 峰11(熊果酸) $>$ 峰10(齐墩果酸),详见图5。结果表明,上述6个共有峰对应成分对枇杷叶生品及不同炮制品质量差异的影响较大。



S1-1~S1-10: 枇杷叶生品; S2-1~S2-10: 蜜炙枇杷叶; S3-1~S3-10: 姜汁炙枇杷叶; S4-1~S4-10: 姜汁煮枇杷叶; S5-1~S5-10: 甘草汁炙枇杷叶; S6-1~S6-10: 甘草汁煮枇杷叶; S7-1~S7-10: 清炒枇杷叶; R: 对照指纹图谱; 2: 野鸦椿酸; 5: 山楂酸; 6: 科罗索酸; 10: 齐墩果酸; 11: 熊果酸; 1、3~4、7~9: 未知成分

图2 70批枇杷叶生品及不同炮制品的叠加指纹图谱和对照指纹图谱

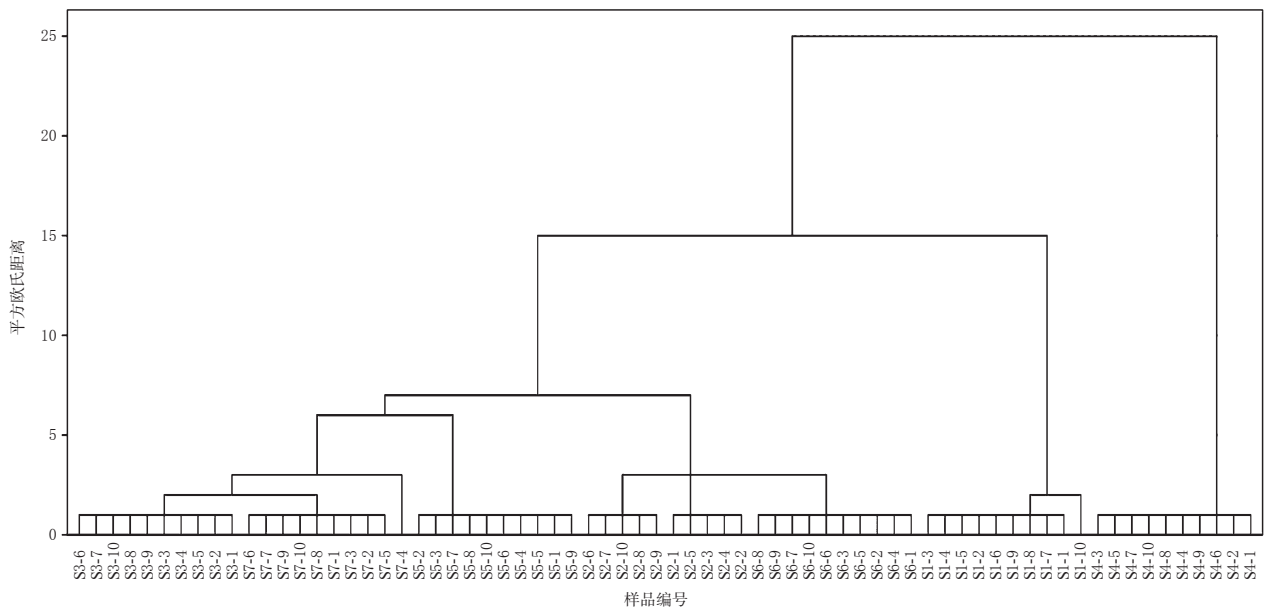


图3 70批枇杷叶生品及不同炮制品的系统聚类分析树状图

表5 70批枇杷叶生品及不同炮制品中前2个主成分的特征值和方差贡献率

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	7.806	70.967	70.967	7.806	70.967	70.967
2	1.069	9.715	80.682	1.069	9.715	80.682

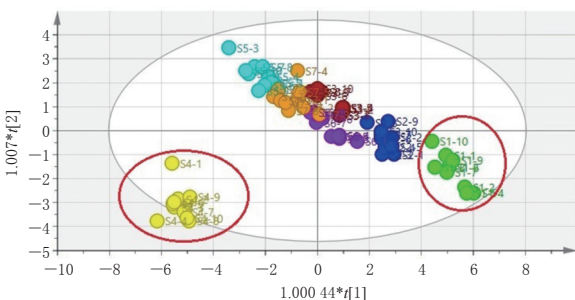


图4 70批枇杷叶生品及不同炮制品的正交偏最小二乘法-判别分析得分散点图

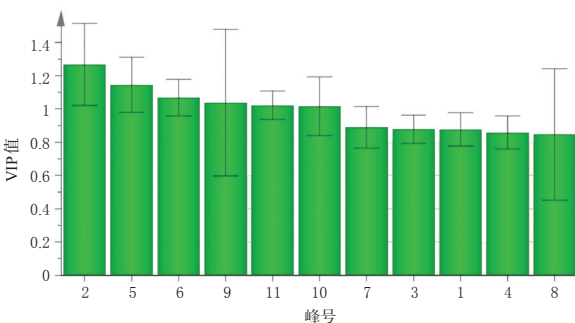


图5 70批枇杷叶生品及不同炮制品中11个共有峰的VIP值( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的考察

山楂酸和科罗素酸、齐墩果酸和熊果酸均为三萜酸类同分异构体,较难分离。笔者在借鉴文献[9, 12-13]及前期研究的基础上,分别考察了 Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6

mm×250 mm, 5 μm)、ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm)等色谱柱及乙腈-0.1%磷酸盐缓冲溶液、甲醇-0.1%磷酸盐缓冲溶液等不同流动相对野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸5个成分含量测定的影响。结果显示,在本研究色谱条件下,野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸等5个成分的分度均大于1.5,可实现基线分离。

#### 3.2 醇溶性浸出物、总三萜酸及5个三萜酸类成分分析

2020年版《中国药典》(一部)枇杷叶项下规定:醇溶性浸出物不得少于18.0%(生品)、16.0%(蜜炙);含齐墩果酸和熊果酸的总量不得少于0.70%<sup>[1]</sup>。本研究结果显示,枇杷叶生品及不同炮制品的醇溶性浸出物平均含量为25.90%~39.95%,齐墩果酸和熊果酸的平均总量为0.759%~1.029%(即7.588~10.287 mg/g),均符合上述规定。

有研究表明,枇杷叶乙醇提取物有明显的止咳作用和改善急性肺损伤作用<sup>[14-15]</sup>,三萜酸类成分是枇杷叶抗炎、止咳的活性成分<sup>[14]</sup>。本研究结果表明,枇杷叶生品经炮制后,醇溶性浸出物、总三萜酸含量和5个三萜酸类成分的总含量均有不同程度的增加。其中,蜜炙枇杷叶中醇溶性浸出物最高,进一步验证了“润肺止咳宜蜜炙用”这一传统中医理论,可为枇杷叶经蜜炙后增强润肺止咳作用提供理论依据;甘草汁煮枇杷叶中总三萜酸含量最高,可为甘草制枇杷叶增加祛痰止咳作用提供理论依据;姜汁煮枇杷叶中5个三萜酸类成分的总含量最高,可为姜制枇杷叶增加止咳作用提供理论依据。另有研究报告,枇杷叶经炮制后熊果酸的含量均高于生品,并且姜汤煮品>姜汁炒品>生品<sup>[16]</sup>,本文研究结果与之相符。本研究结果表明,枇杷叶经炮制后5个三萜酸类成分(野鸦椿酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸和熊果酸)总含量都高于生品,原因可能为这5个三萜酸类成分以盐

或昔的形式存在于枇杷叶生品中,经炮制后分解,也可能是其他成分经炮制后转化,具体原因有待进一步研究。

综上所述,枇杷叶生品经炮制后,醇溶性浸出物、总三萜酸含量和5个三萜酸类成分(野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸)总含量均有不同程度的增加,其中蜜炙枇杷叶中醇溶性浸出物最高,甘草汁煮枇杷叶中总三萜酸含量最高,姜汁煮枇杷叶中5个三萜酸类成分总含量最高。野鸦椿酸、山楂酸、科罗索酸、熊果酸、齐墩果酸等成分可能是影响枇杷叶生品及炮制品质量的差异性成分。

### 参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:213-214.

[2] 肖旭坤,王翰华,阮洪生.枇杷叶化学成分和药理活性研究进展[J].中医药导报,2019,25(21):60-66.

[3] 冯航.枇杷主要药效成分及药理作用研究进展[J].西安文理学院学报(自然科学版),2015,18(2):14-16.

[4] 魏鑫,宋达.枇杷叶三萜酸类成分及其生物活性研究进展[J].云南中医中药杂志,2015,36(7):82-84.

[5] 汪世浩,闫其朋,周玉波.枇杷叶及其炮制品中总三萜的含量分析[J].中国民族民间医药,2017,26(12):22-23,27.

[6] 上海市药品监督管理局.上海市中药饮片炮制规范:2018年版[S].上海:上海科学技术出版社,2019:436.

[7] 王孝涛.历代中药炮制法汇典:古代部分[M].南昌:江西科学技术出版社,1998:188.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:31-32,232.

[9] 高伟城,王小平,黄建军,等.响应面法优化云霄产枇杷叶三萜酸类成分的提取工艺[J/OL].中国现代中药,2021 [2021-04-12]. <https://doi.org/10.13313/j.issn.1673-4890.20201213001>.

[10] 高伟城,王小平,沈晓华,等.基于化学模式识别技术的不同干姜炮制品质量比较[J].中国现代中药,2021,23(5):861-867.

[11] 陈旺,詹雁,王美慧,等.马甲子总三萜的HPLC指纹图谱建立、聚类分析和主成分分析及含量测定[J].中国药房,2021,32(2):201-206.

[12] 华俊磊,蔡雪萍,鞠建明,等. HPLC-ELSD测定枇杷叶总三萜酸固体分散体片中6种三萜酸含量[J].中国药学杂志,2014,49(17):1550-1553.

[13] 吴月娟,吕寒,简曩昱,等.不同类型枇杷叶三萜酸类成分含量及降糖活性的比较[J].植物资源与环境学报,2017,26(4):101-103.

[14] 鞠建华,周亮,林耕,等.枇杷叶中三萜酸类成分及其抗炎、镇咳活性研究[J].中国药学杂志,2003,38(10):752-757.

[15] 朱敏芳,张捷,冯丽,等.枇杷叶提取物对中性粒细胞弹性蛋白酶的抑制作用[J].中成药,2017,39(1):177-180.

[16] 周宁,颜红.枇杷叶不同炮制品中熊果酸含量的测定[J].广东药学,2005,15(3):3-4.

(收稿日期:2021-08-01 修回日期:2021-12-08)

(编辑:邹丽娟)

(上接第195页)

[12] GONZALEZ-VICENTE A, SAEZ F, MONZON C M, et al. Thick ascending limb sodium transport in the pathogenesis of hypertension[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1): 235-309.

[13] ORTEGA J T, PARMAR T, JASTRZEBSKA B. Flavonoids enhance rod opsin stability, folding, and self-association by directly binding to ligand-free opsin and modulating its conformation[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(20): 8101-8122.

[14] 蒋红,何雯,张晨.维药异叶青兰总黄酮对血管紧张素Ⅱ诱导的大鼠心肌细胞肥大的影响[J].中国药学杂志,2018,53(8):594-600.

[15] 孙治霞,索红亮,王丽辉.槲寄生总黄酮对心肌梗死大鼠心肌损伤的保护作用及对JNK和NF- $\kappa$ B通路的影响[J].重庆医学,2019,48(10):1646-1651,1656.

[16] 张振.山楂叶总黄酮对高脂高盐所致高血压大鼠降压及心脏保护作用的研究[J].环球中医药,2017,10(2):136-140.

[17] YOKOTA T, LI J, HUANG J J, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates chamber-specific perinatal growth in heart[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5287-5301.

[18] WANG S Y, NI X, HU K Q, et al. Cilostazol alleviate nicotine induced cardiomyocytes hypertrophy through modulation of autophagy by CTSB/ROS/p38 MAPK/JNK feedback loop[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11): 2001-2013.

[19] MEIJLES D N, CULL J J, MARKOU T, et al. Redox regulation of cardiac ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) controls p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase) and orchestrates cardiac remodeling to hypertension[J]. *Hypertension*, 2020, 76(4): 1208-1218.

[20] 陈德才,王雅,马从乾,等. miR-23b通过MAPK信号通路对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中国老年学杂志,2019,39(1):136-141.

(收稿日期:2021-07-20 修回日期:2021-11-16)

(编辑:唐晓莲)