

# 陕西产杜仲子药材质量标准研究

陈千良<sup>1</sup>, 石张燕<sup>1\*</sup>, 高扬<sup>2</sup>, 赵磊<sup>1</sup>, 蔡霞<sup>1</sup>, 刘文哲<sup>1</sup>

<sup>1</sup>西北大学生命科学学院西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安 710069;

<sup>2</sup>西安理工大学水利水电学院, 西安 710048

**摘要:**为陕西产杜仲子药材制订质量标准。采用生药学研究方法,包括:种子比率测定法、水分测定法、灰分测定法、酸败度测定法、油脂含量测定法、薄层色谱法及 HPLC 法,对不同产地样品的性状、显微特征进行了描述。在对 5 批样品的种子比率、水分、灰分、酸败度、油脂测定以及指标成分桃叶珊瑚苷 TLC 定性鉴别和 HPLC 定量分析的基础上,制订了陕西杜仲子药材质量评价方法,初步规定了各项指标的限度,确定了质量标准。本文建立的方法专属性好,操作简便,是一种能全面、有效地控制陕西产杜仲子药材质量的较理想方法。为陕西省杜仲子的科学利用和杜仲资源的综合开发提供了依据。

**关键词:**杜仲子;质量标准;高效液相;桃叶珊瑚苷

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

## Study on Quality Standard of *Eucommia Fructus* of Shaanxi Province

CHEN Qian-liang<sup>1</sup>, SHI Zhang-yan<sup>1\*</sup>, GAO Yang<sup>2</sup>, ZHAO Lei<sup>1</sup>, CAI Xia<sup>1</sup>, LIU Wen-zhe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China of Ministry of Education,

College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; <sup>2</sup> Faculty of Water Resources

and Hydraulic Power, Xi'an University of Technology, Xi'an 710048, China

**Abstract:** In this study, pharmacognosital methods were employed to establish the quality standard of *Eucommia Fructus* of Shaanxi. The morphological and histological characters of *Eucommia Fructus* were described. The rate of seeds, moisture content, ash content, degree of rancidity and total fat content of samples from different production places of Shaanxi province were determined. The principal bioactive constituent (aucubin) was analyzed by TLC (qualitatively) and HPLC (quantitatively). Based on the data of each assay, the quality standard of *Eucommia Fructus* from Shaanxi was tentatively set up. The quality standard established in this paper was objective and reasonable. The developed evaluation method was of good specificity. It can be used for quality control of *Eucommia Fructus* of Shaanxi.

**Key words:** *Eucommia Fructus*; quality standard; HPLC; aucubin

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 是我国特有的名贵药用植物,传统上以干燥树皮入药,具有补肝肾,强筋骨,安胎之功效<sup>[1]</sup>。现代研究表明,杜仲叶和花也含有多种活性成分,具有多种药理作用,目前已进行了一系列的研究开发<sup>[2,3]</sup>。杜仲子为杜仲的干燥成熟果实,对杜仲子的研究尚处于初步阶段,近几年进展迅速。已有文献报道,杜仲子果实中富含杜仲胶、油脂、蛋白以及桃叶珊瑚苷、绿原酸等多种天然活性成分,具有极高的营养保健及药用价

值<sup>[4,5]</sup>。陕西杜仲资源丰富,为我国杜仲中心产区之一<sup>[6]</sup>。目前还没有杜仲子质量方面的相关研究和报道,为了更好地开发利用这一植物资源,规范药材质量,本文选择了陕西产量较大和具有代表性的产地的杜仲子药材样品,对其性状和显微特征、种子比率、水分、灰分、酸败度、油脂测定,指标成分 TLC 定性鉴别和 HPLC 定量分析等项目进行研究,并在此基础上初步制定陕西产杜仲子药材的质量标准,为进一步科学开发利用杜仲子这一新的药用资源提供依据。

收稿日期:2013-08-23 接受日期:2013-12-31

基金项目:陕西省教育厅科研项目(11JK0688);陕西省食品药品监督管理局陕西省中药材标准项目;西北大学资源生物与现代生物技术教育部重点实验室开放基金项目(ZS11003)

\* 通讯作者 Tel:86-29-88302411; E-mail:Sirius999@sina.com

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 液相色谱仪四元泵,配可变波长紫

外线检测器; Millipore 超纯水机(美国-密立博); 光学显微镜(Leica DMLB); 照相机(Nikon 50i); TB-114 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); KW-I 电热恒温箱(银川市金属制品厂)。

桃叶珊瑚苷对照品(自制,核磁共振光谱鉴定结构,TLC 检查为单一斑点。HPLC 检测为单一峰,HPLC-ELSD 归一化法计算纯度为 100%); 水为屈臣氏蒸馏水; 乙腈为色谱纯(Fisher); 甲醇、乙醇等其余试剂均为分析纯(天津市富宇精细化工有限公司)。

## 1.2 药材

杜仲子药材自采或委托购买,来源见表 1,所有样品经西北大学生命科学学院倪士峰副研究员鉴定为杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.) 的干燥成熟果实。

## 1.3 药材性状检定

照《中华人民共和国药典》2010 年版(一部)中药材和饮片检定通则(附录 IIB)检定。测量药材长、宽; 观察药材色泽、表面特征; 嗅闻气味; 破碎后口尝药材味感。

## 1.4 显微特征观察

照《中华人民共和国药典》2010 年版(一部)显微鉴别法(附录 II C)进行种子切面石蜡制片和粉末制片,根据观察对象不同,滴加相应试液,盖片,显微镜下观察并拍照,绘制墨线图。

## 1.5 薄层色谱鉴定

取剥去果皮的杜仲种子,研细后,称取细粉 1.0 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加甲醇 30 mL,振摇 5 min,置冰箱中过夜。取出,放至室温,再振摇 10 min,过滤,续滤液作为供试品溶液。另取桃叶珊瑚苷对照品,加甲醇制成 0.3 mg/mL 的浓度,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中华人民共和国药典》2010 年版一部附录 VI B),吸取供试品溶液 5  $\mu$ L 及桃叶珊瑚苷对照品溶液 10  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-甲醇(3:1)为展开剂,展开,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,置于红外线干燥器中加热至斑点显色清晰。

## 1.6 种子比率测定

从各产地药材样品中随机取杜仲果实约 50 g,精密称定,用手工剥离除去果壳,得种子,精密称定,计算种子比率,每个产地测 3 次,计算平均值。

## 1.7 水分、灰分及酸败度检查

分别照《中华人民共和国药典》2010 年版(一部)水分测定法(附录 IX H 第一法)、总灰分及酸不

溶性灰分测定法(附录 IX K)及酸败度测定法(附录 IX P)进行测定,计算含量。

## 1.8 种子油脂含量测定

用索氏抽提法测定种子油脂含量。精密称取种子粉末 3.0 g,用石油醚(60~90  $^{\circ}$ C)于索氏提取器中 80  $^{\circ}$ C 条件下提取 2~3 h,回收石油醚,于 105  $^{\circ}$ C 烘至恒重。根据抽提瓶增加的重量,计算杜仲种子中油脂含量。每个样品测 3 份,计算平均值。

## 1.9 种子桃叶珊瑚苷含量测定

参照杨小梅等<sup>[7]</sup> HPLC 法测定杜仲仁中桃叶珊瑚苷的含量,略作修改。

### 1.9.1 对照品溶液的制备

精密称取桃叶珊瑚苷对照品 5.0 mg 置 25 mL 容量瓶中,用体积分数 30% 甲醇定容,即得。

### 1.9.2 供试品溶液的制备

取种子比率检查中剥出的种子若干,研细后,精密称取细粉 0.5 g,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶液近刻度,振摇 5 min,冰箱放置浸泡过夜。取出,振摇 10 min,加甲醇至刻度,定容,摇匀。精密吸取 1 mL 置 5 mL 容量瓶,加水至刻度定容。摇匀,过滤,弃去初滤液,取续滤液用滤膜滤过,即得。

### 1.9.3 色谱条件

色谱柱:汉邦 Hadera ODS-2(4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu$ m); 以乙腈-水(3.5:96.5,v:v)为流动相; 流速:1.0 mL/min; 柱温:25  $^{\circ}$ C; 检测波长为 206 nm; 理论塔板数按桃叶珊瑚苷峰计算应不低于 10000。

### 1.9.4 线性关系考察

精密吸取 0.1 mg/mL 桃叶珊瑚苷的对照品溶液 1、2、5、10、20  $\mu$ L,分别注入液相测定,每个浓度进样 3 次。以峰面积为纵坐标,对照品溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程。

### 1.9.5 精密度试验

取同一对照品溶液连续 6 次注入液相色谱仪,测定峰面积。

### 1.9.6 稳定性考察

取同一样品溶液分别在 0.5、1、2、3、4、5 h 时,连续 6 次注入液相色谱仪,测定桃叶珊瑚苷峰面积。

### 1.9.7 重复性试验

精密称取同一产地杜仲种子细粉 5 份,按照上述方法制备供试品溶液,测定并计算桃叶珊瑚苷含量。

### 1.9.8 加样回收率试验

采用加样法进行回收率考察。取上述已知桃叶

珊瑚苷量的同一产地杜仲种子细粉(眉县,含量:1.83%)6份,每份0.5 g,精密称定,分别置25 mL容量瓶中,按供试品溶液制备方法制备(加水定容前,精密加入1.01 mg/mL的桃叶珊瑚苷对照品溶液1 mL)。测定,计算加样回收率。

## 2 结果与分析

### 2.1 药材性状

翅果,长椭圆形,扁平,长26.7~41.4 mm,宽9.6~14.3 mm。表面光滑,黄褐色或棕褐色,久贮者呈黑褐色;有光泽,中间稍突,先端2裂,基部楔形,周围有薄翅,果皮断裂后有银白色的胶丝相连。内含种子1粒,扁平,长10.6~18.0 mm,宽2.0~4.7 mm,棕褐色,气微,味苦。见图1。

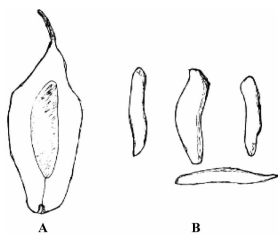


图1 杜仲子果实(A)及种子(B)外形图

Fig. 1 Appearance of fruit(A) and seed(B) of *E. ulmoides*

### 2.2 显微特征

种子切面,种皮衰退,仅留1~2层残留细胞,类长方形,外被角质层。胚乳发达,由类圆形或不规则形薄壁细胞组成,10~12层。胚发育完全,由胚根、胚轴、胚芽、子叶组成。细胞内含大量油滴、糊粉粒及其他内含物,见图2。种子粉末,灰黄色。胚乳细胞壁较薄,类圆形或不规则形,胞腔内多含油滴或糊粉粒。油滴圆形或类圆形。淀粉粒类圆形或卵圆形,脐点及层纹不明显。偶见晶体,长柱形或不规则形,见图3。

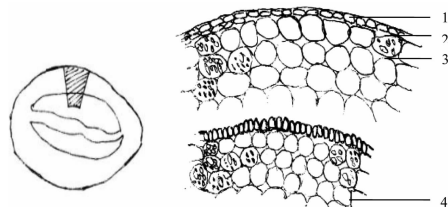


图2 种子横切面详图( $\times 40$ )

Fig. 2 Detailed transverse section of seed of *E. ulmoides*

1. 角质层;2. 种皮;3. 胚乳细胞;4. 子叶细胞

1. *stratum corneum*; 2. *testa*; 3. *endosperm cell*; 4. *cotyledon cell*

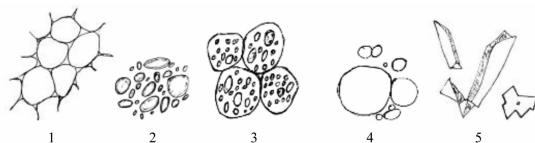


图3 种子粉末图( $\times 40$ )

Fig. 3 Powder characteristics of seed of *E. ulmoides*

1. 薄壁细胞;2. 淀粉粒;3. 糊粉粒;4. 油滴;5. 晶体

1. *parenchyma cell*; 2. *starch grain*; 3. *aleurone grain*; 4. *fat drop*; 5. *crystal*

### 2.3 薄层色谱鉴定结果

供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,见图4。

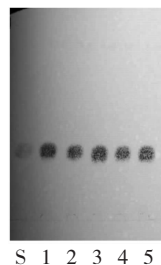


图4 种子薄层色谱

Fig. 4 TLC chromatogram of seed of *E. ulmoides*

S: 桃叶珊瑚苷对照品;1: 陇县;2: 眉县;3: 略阳;4: 合阳;5: 大荔

S: *aucubin standard*; 1: Long county; 2: Mei county; 3: Lueyang; 4: Heyang; 5: Dali

表1 陕西产杜仲子药材种子比率、水分、灰分及酸败度测定结果( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Contents of seed rate, moisture, ash and degree of rancidity of *Eucommia Fructus* ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

| 产地<br>Location | 种子比率<br>Rate of seeds (%) | 水分<br>Moisture content (%) | 总灰分<br>Total ash (%) | 酸不溶性灰分<br>Acid-insoluble ash (%) | 酸值<br>Acid value<br>(mg KOH/g) | 过氧化值<br>Peroxide value (%) |
|----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 陇县             | 44.46 ± 1.87              | 7.64 ± 0.15                | 7.65 ± 0.02          | 1.87 ± 0.06                      | 2.05 ± 0.07                    | 0.09 ± 0.008               |
| 眉县             | 44.74 ± 1.48              | 8.21 ± 0.25                | 8.05 ± 0.10          | 2.17 ± 0.05                      | 2.62 ± 0.07                    | 0.10 ± 0.003               |
| 略阳             | 39.29 ± 2.80              | 8.46 ± 0.05                | 9.51 ± 0.18          | 3.43 ± 0.03                      | 3.13 ± 0.12                    | 0.08 ± 0.008               |
| 合阳             | 38.85 ± 1.24              | 9.43 ± 0.14                | 8.13 ± 0.09          | 3.43 ± 0.08                      | 3.96 ± 0.08                    | 0.09 ± 0.003               |
| 大荔             | 39.08 ± 2.91              | 8.47 ± 0.02                | 8.21 ± 0.20          | 3.98 ± 0.03                      | 3.50 ± 0.05                    | 0.10 ± 0.006               |

## 2.4 种子

种子比率测定结果见表1。

## 2.5 水分、灰分及酸败度

水分、灰分及酸败度检查结果见表1。

## 2.6 种子油脂含量

种子油脂含量测定结果见表2。

表2 陕西产杜仲子药材种子油脂及桃叶珊瑚苷含量测定结果( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Contents of fat and aucubin in seed of *Eucommia Fructus* ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

| 产地<br>Location | 油脂<br>Total fat (%) | 桃叶珊瑚苷<br>Content of<br>aucubin (%) |
|----------------|---------------------|------------------------------------|
| 陇县             | 32.51 ± 0.73        | 2.04 ± 0.18                        |
| 眉县             | 34.02 ± 0.98        | 1.83 ± 0.07                        |
| 略阳             | 31.02 ± 0.46        | 2.39 ± 0.14                        |
| 合阳             | 31.58 ± 0.69        | 2.22 ± 0.08                        |
| 大荔             | 30.58 ± 0.49        | 2.57 ± 0.13                        |

## 2.7 种子桃叶珊瑚苷含量测定

### 2.7.1 含量测定方法学考察结果

线性关系考察,以峰面积为纵坐标,对照品溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $Y = 116.92X + 5.5008, r = 1$ ,表明桃叶珊瑚苷在 0.1 ~ 2.0  $\mu\text{g}$  范围内,进样量与峰面积呈良好的线性关系;精密度试验 RSD 值为 0.5%,说明精密度良好;稳定性考察表明 5 h 内桃叶珊瑚苷峰面积的 RSD 为 0.9%,所制备的样品溶液中桃叶珊瑚苷在 5 h 内稳定;重复性试验表明桃叶珊瑚苷含量测定的 RSD 为 2.7%,说明本方法的重复性好;加样回收率试验表明平均回收率为 100.8%,RSD 为 1.8%,回收率理想。

### 2.7.2 样品含量测定

按照上述方法,测定从陕西省内收集到的 5 个批次样品中桃叶珊瑚苷的含量。色谱图见图 5,测定结果见表 2。

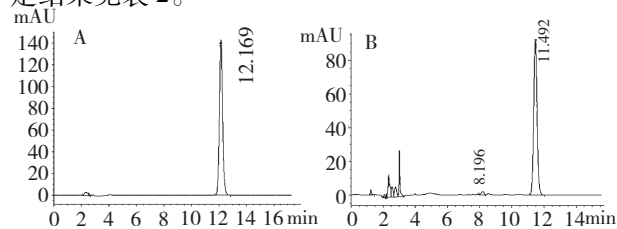


图5 对照品(A)和样品(B)HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of reference substance(A) and sample(B)

## 2.8 标准中各项指标的限度确定

根据陕西不同产地杜仲子药材实验测定结果(表1、表2),并考虑药材样品来源情况,暂确定以杜仲子药材种子比率不低于 30.0%,水分含量不得过 11.0%,总灰分含量不得过 11.0%,酸不溶性灰分含量不得过 4.5%,酸值不得过 4.0,过氧化值不得过 0.12,种子中油脂含量不低于 30.0%,桃叶珊瑚苷的含量不低于 1.8%作为陕西杜仲子的质量控制标准。

## 3 讨论

杜仲子为椭圆形扁长翅果,翅中间为内裹种子的果壳,由于果壳内壁上密布有富含杜仲胶的胶丝,具有较大的韧性,很难将果壳种子剥开。本研究的前期实验及文献报道表明,杜仲子中具有较高营养保健及药用价值的部位为种子<sup>[7,8]</sup>。目前虽已有杜仲翅果脱壳装置专利的报道<sup>[9]</sup>,但由于一些条件限制,实际中杜仲子仍以翅果流通。故本研究直接以杜仲翅果作为药材,进行质量标准控制研究,并以手工剥离除去果壳所得纯净种子比率作为质量控制指标。

化学研究表明,杜仲种子中含大量油脂及多种环烯醚萜类活性成分<sup>[4,5,7,8]</sup>。油脂不饱和程度较高,属于干性油,其不饱和脂肪酸比例为 91.18%,人体必需脂肪酸——亚油酸和  $\alpha$ -亚麻酸所占比例高达 73.68%,具有极高的营养保健及药用价值<sup>[5]</sup>。赵德义等将杜仲子油与紫苏子油进行了比较研究,结果发现它们具有很好的相似性,说明了杜仲籽油具有与紫苏籽油同样的开发价值,应引起高度重视<sup>[10]</sup>。杜仲种子中的环烯醚萜类活性成分中以桃叶珊瑚苷含量最高,是主要活性成分。桃叶珊瑚苷具有护肝解毒、抗炎、抗氧化、抗衰老、抗骨质疏松及营养神经元细胞等众多药理活性<sup>[11]</sup>。以桃叶珊瑚苷作为指标成分来衡量杜仲种子的质量优劣是可行的<sup>[8,18]</sup>。因此,杜仲种子中油脂及桃叶珊瑚苷的含量是反映药材质量的两个重要方面,选择油脂及桃叶珊瑚苷作为杜仲子的质量控制指标可以提高质量控制的科学性和准确性。油脂含量测定结果也表明,杜仲种子中油脂含量很高,达 30.58% ~ 34.02%,以种子中油脂含量作为杜仲子药材的质量评价指标,具有实用性。薄层色谱鉴别及 HPLC 含量测定以桃叶珊瑚苷作为指标,两种方法操作简便、结果可靠。

薄层色谱鉴别中,尝试了体积分数 80% 乙醇、乙醇、体积分数 50% 甲醇、甲醇四种提取溶剂,结果发现以甲醇作为提取溶液效果最好,故选用甲醇作为提取溶液。在展开剂的选择上,参考文献报道<sup>[8]</sup>,尝试了氯仿-乙酸乙酯-甲醇(2:2:1)、氯仿-甲醇(3:1)、氯仿-乙酸乙酯-无水乙醇(2:2:1)、氯仿-乙酸乙酯-无水乙醇-水(2:2:1:0.1)、乙酸乙酯-无水乙醇(4:1)、氯仿-乙酸乙酯-无水乙醇(6:3:1)六种展开剂,结果发现氯仿-甲醇(3:1)展开效果最好,故选用氯仿-甲醇(3:1)作为展开剂。在显色剂的选择上,尝试了 10% 硫酸乙醇溶液、碘蒸汽、10% 磷钼酸溶液三种显色剂,结果发现 10% 硫酸乙醇显色效果最好,故选为显色剂。

桃叶珊瑚苷 HPLC 定量测定中,结合文献报道<sup>[7]</sup>,在提取溶剂选择中试验了体积分数 30% 甲醇、乙醇、乙醇作为提取溶剂。同一批样品用甲醇作为提取溶剂效率最高。因此确定使用甲醇作为供试品制备的提取溶剂。采取了冷浸提取、超声波振荡提取两种方式,对比考察了提取方式对测定结果的影响。实验发现,超声波振荡会破坏样品中的桃叶珊瑚苷,超声波振荡 40 min,样品中的桃叶珊瑚苷已经被破坏,所以必须采用冷浸法。经过反复试验确定了用冷浸提取时先用漩涡混匀器振摇,然后在冰箱放置浸泡过夜,次日取出再振摇,能够达到最佳的提取效果。此法所制备供试品溶液含量最高。

## 4 结论

本研究较全面地考查了陕西产杜仲子药材的各项指标,在实验结果和数据分析的基础上制定了相关限度。所建立的方法专属性好,操作简便,是一种能全面、有效地控制陕西产杜仲子药材质量的较理想方法,为杜仲综合开发利用提供了依据。

本文 5 批药材样品的来源地中略阳是陕西杜仲面积最大,产量最高的地区,位于陕南。其他四个分别是陕西东部和西部的产地,因此本文的样品比较具有代表性。在以后工作中将考察更多产地和批次的药材样品,进一步修订,得出更符合药材实际状况,更具指导意义的相关限度标准。

## 参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会).

Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010. Vol I, 154.

- 2 Yan Y(晏媛), Guo D(郭丹). Research advances in chemist and pharmacology of *Eucommia ulmoides* leaf. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2003, 25: 491-492.
- 3 Zhang XJ(张学俊), Yi TJ(伊廷金), Sun QY(孙黔云), et al. Isolation, anti-complement activities, and chemical structures of polysaccharide from *Eucommia ulmoides* leaves. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23: 606-611.
- 4 Liang SF(梁淑芳), Ma BL(马柏林), Zhang KJ(张康健), et al. Chemical constituents of *Eucommia* Fruit. *J Northwest Forest Coll*(西北林学院学报), 1997, 12: 43-47.
- 5 Wang L(王蓝), Ma BL(马柏林), Zhang KJ(张康健), et al. The extraction technology of the oil from *Eucommia ulmoides* seeds. *J Northwest Forest Coll*(西北林学院学报), 2003, 18: 123-125.
- 6 He F(何方), Zhang KJ(张康健), Wang CN(王承南), et al. Division of produce areas in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Nonwood Forest Res*(经济林研究), 2010, 28: 86-87.
- 7 Yang XM(杨小梅), Shang PP(尚平平), Liu JB(刘建斌), et al. Content determination of aucubin in *Eucommia ulmoides* seeds by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2003, 34: 7-9.
- 8 Zhu LW(朱莉伟), Chen SW(陈素文), Jiang JX(蒋建新), et al. Study on chemical constituents of *Eucommia* kernel. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源), 2005, 24: 41-42.
- 9 Ma BL(马柏林), Wang L(王蓝), Zhang KJ(张康健). *Eucommia* seeds sheller (杜仲籽剥壳机). CN 2493308Y, 2002-5-29.
- 10 Zhao DY(赵德义), Xu AX(徐爱遐), Zhang BY(张博勇), et al. Comparison of fatty acid component between *Eucommia ulmoides* seed oil and *Perilla frutescens* seed oil. *Acta Bot Boreal Occident Sin*(西北植物学报), 2005, 25: 0191-0193.
- 11 Kang Z(康楨), Wu WH(吴卫华), Wang JJ(王俊杰), et al. Research advances in pharmacology of aucubin and aucubigenin. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32: 2585-2587.