

基于多指标成分定量和化学模式识别综合评价杜仲叶质量

储 瑞^{1,2}, 范久余^{1,3},
夏 悦², 文兴建^{1,2,3}, 李胜容¹, 励 娜^{1,2,3*}¹重庆市中药研究院, 重庆 400065;²重庆中医药学院, 重庆 402760; ³中药新药创制川渝共建重点实验室, 重庆 400065

摘要:通过建立 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法,运用层次分析法(analytic hierarchy process, AHP)建立一种中药多指标综合评价杜仲叶质量的方法,并优选最佳采收期。采用 HPLC 法测定杜仲叶中绿原酸、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素 5 种指标性成分的含量;紫外分光光度(UV)法测定总黄酮含量;按《中国药典》测定醇溶性浸出物的含量。研究结果显示:杜仲叶中总黄酮含量在 8 月达到最高,绿原酸含量在 6 月达最大值,松脂醇二葡萄糖苷与芦丁含量在 9 月含量最高,综合得分较高的月份为 6 月、8~11 月。通过主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA),比较杜仲叶中多种化学成分的含量差异,发现杜仲叶在不同采收时期,各成分含量差异大。本研究为优选杜仲叶采收时间建立了一种整体、全面的综合评分模型,可根据具体使用需求,对其中单一或者多个化学成分指标的权重进行主观调整,进而能够更好地指导实际生产与应用;所建立的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法简单易行,为杜仲叶质量控制和开发利用提供参考。

关键词:杜仲叶;采收时期;多成分含量测定;AHP;综合评分法

中图分类号:R284.1;R282.4

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)10-1670-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.10.003

Comprehensive quality evaluation of Eucommiae Folium through multi-component content analysis and chemical pattern recognition

CHU Rui^{1,2}, FAN Jiu-yu^{1,3},
XIA Yue², WEN Xing-jian^{1,2,3}, LI Sheng-rong¹, LI Na^{1,2,3*}¹Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;²Chongqing University of Chinese Medicine, Chongqing 402760, China;³Sichuan-Chongqing Joint Key Laboratory of Innovation of New Drugs of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400065, China

Abstract: The analytic hierarchy process (AHP) was utilized to establish a comprehensive evaluation methodology involving multiple indices, aimed at pinpointing the optimal harvest period for Eucommiae Folium (EF). An HPLC method was developed for the simultaneous determination of five components, including chlorogenic acid, geniposide acid, pinosresinol diglucoside, rutin and quercetin. The content of total flavonoids was measured using ultraviolet spectrophotometry (UV), whereas the alcoholic extract content adhered to the criteria outlined in the *Chinese Pharmacopoeia*. It was observed that the highest levels of total flavone occurred in August, chlorogenic acid peaked in June, and pinosresinol diglucoside and rutin reached their highest levels in September. Months with high comprehensive scores were identified as June and August through November. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) were employed to compare the contents of the five components in EF, indicating substantial differences during various harvest times. In this study, an overall and comprehensive scoring model was established to optimize the harvesting time of EF. Furthermore, it was

收稿日期:2024-04-16 接受日期:2024-06-28

基金项目:重庆市中药炮制重点学科建设项目(渝中医[2021]16号);重庆市现代农业产业技术体系资助:中药材(COMAITs202309);中药新药与安全性研究传承创新团队建设(渝中医[2022]33号);重庆市技术创新与应用发展专项(cstc2020jscx-1yjsBX0002)

*通信作者 Tel:86-23-89029025; E-mail:lina@cqacmm.com

noted that weights for single or multiple chemical composition indexes could be adjusted subjectively based on specific usage needs to better guide actual production and application. Moreover, the validated HPLC fingerprint methodology coupled with the assessment of multi-component content represents a streamlined yet practicable strategy, furnishing invaluable insights for quality assurance protocols and informing the strategic exploration and utilization of EF resources.

Key words: Eucommiae Folium; harvesting periods; multicomponent determination; analytic hierarchy process; comprehensive scoring method

杜仲是我国的名贵经济树种,其种质资源多分布在长江中游和南部各省。杜仲叶为杜仲科杜仲属植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥叶^[1]。现代药理研究表明,杜仲叶具有抗氧化^[2]、降血压^[3]、抗炎^[4]、预防肥胖^[5]、神经保护^[6]、骨保护^[7]、改善糖代谢^[8]以及抗肿瘤^[9]等功效。

2020版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)虽收录了杜仲皮与杜仲叶的2个药用部位,但杜仲的临床应用仍以杜仲皮为主。作为国家战略储备资源,杜仲皮长期以来存在种质资源限制、可持续利用率低、成本高等诸多问题。作为与杜仲皮同一植物来源的杜仲叶,具有与杜仲皮相似的有效成分与药理作用^[10],其在国内的开发利用并不广泛。日本是最早将杜仲叶开发加工为保健食品或功能食品原料的国家,仅杜仲茶一项就拥有巨大销售量,因而每年从中国大量进口杜仲叶以满足市场需求。随着国人对健康的认识以及对保健品逐步加大的市场需求,国家卫生健康委员会、国家市场监督管理总局也在2023年将杜仲叶列入了药食同源目录,杜仲叶可以作为食品及食品原料,结合杜仲叶生长周期短、产量巨大,且属于可再生资源的特点,将天然杜仲叶应用到食品领域,使其有了更加广阔的研究与开发空间。

目前杜仲叶的研究主要集中在不同产地及加工方法的杜仲叶质量评价^[11-13]、指纹图谱建立^[14-16],以及不同提取工艺对饮片质量的影响^[17,18]等方面。对于不同采收期的杜仲叶中化学成分含量差异等方面研究较少,且主要以单个成分或少量成分为指标,而中药成分的复杂多样决定了中药质量控制模式必须采用多指标的方法。为了综合反映杜仲叶质量情况,本研究以绿原酸、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素、总黄酮、醇溶性浸出物7类化学成分的含量为指标,采用层次分析法(analytic hierarchy process, AHP)建立一种整体、全面的中药多指标的综合评分法,优选杜仲叶最佳采收时期,并通过HPLC指纹图谱,结合主成分分析(principal component analysis, PCA)及正交偏最小二乘法-判别分析

(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA)等多元化学模式识别手段,比较不同采收期及不同批次杜仲叶在化学成分上的差异性,以期细化和完善杜仲叶的质量控制提供参考,从而为更深层次地挖掘与利用杜仲叶资源奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, DAD 检测器); UV-2600 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); WLD-505A 型万利多卤素水分仪(厦门雄发仪器仪表有限公司); AEG-45SM 十万分之一电子天平(日本岛津公司); BP121S 万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); 101-3AB 型电热鼓风干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司); 数显恒温水浴锅(上海梅香仪器有限公司); BUG25-12 超声波清洗机(必能信超声(上海)有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸(批号 21032502, 纯度 99.4%)、芦丁(批号 19030402, 纯度 98.0%)、京尼平苷酸(批号 19121303, 纯度 90.9%)、松脂醇二葡萄糖苷(批号 20060804, 纯度 91.2%)对照品(成都格利普生物科技有限公司); 槲皮素(批号 DSTDH002802, 纯度 98.0%)对照品(乐美天医药公司); 乙腈(色谱纯, 美国 ThermoFisher 公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

本实验收集到杜仲叶样品共 15 批次,经山东省中医药研究院靳光乾研究员鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥叶,样品来源及采收时间见表 1。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱建立及含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备

称取绿原酸对照品 14.53 mg,京尼平苷酸对照品 15.02 mg,松脂醇二葡萄糖苷对照品 9.81 mg,芦丁对照品 6.47 mg,槲皮素对照品 2.48 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得每 1 mL 含绿原酸、

表 1 杜仲叶样品信息表

Table 1 Sample information of Eucommiae Folium

编号 No.	来源 Origin	采收年月 Harvest date	编号 No.	来源 Origin	采收年月 Harvest date
S1	四川通江	2021年5月	S9	江西安福	2021年5月
S2	四川通江	2021年6月	S10	云南勐海	2021年7月
S3	四川通江	2021年7月	S11	四川广元	2021年5月
S4	四川通江	2021年8月	S12	四川广元	2021年5月
S5	四川通江	2021年9月	S13	四川通江	2021年6月
S6	四川通江	2021年10月	S14	四川通江	2021年6月
S7	四川通江	2021年11月	S15	四川通江	2021年5月
S8	四川南充	2021年5月			

京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素各 1.45、1.50、0.98、0.65、0.25 mg 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备

精密称取杜仲叶粉末(过三号筛)1 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,称重后超声提取 60 min,放冷后再次称定重量,用 50% 甲醇补足缺失的重量。摇匀后过滤,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge C₁₈ (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 流动相: 以乙腈(A)-1% 醋酸水(B)梯度洗脱(0~20 min, 8% A→15% A; 20~35 min, 15% A→20% A; 35~45 min, 20% A→30% A; 45~46 min, 30% A→90% A; 46~52 min, 90% A); 柱温: 30 °C; 检测波长: 265 nm; 进样量: 10 μL; 流速: 1.0 mL/min。混合对照品和样品色谱图见图 1。

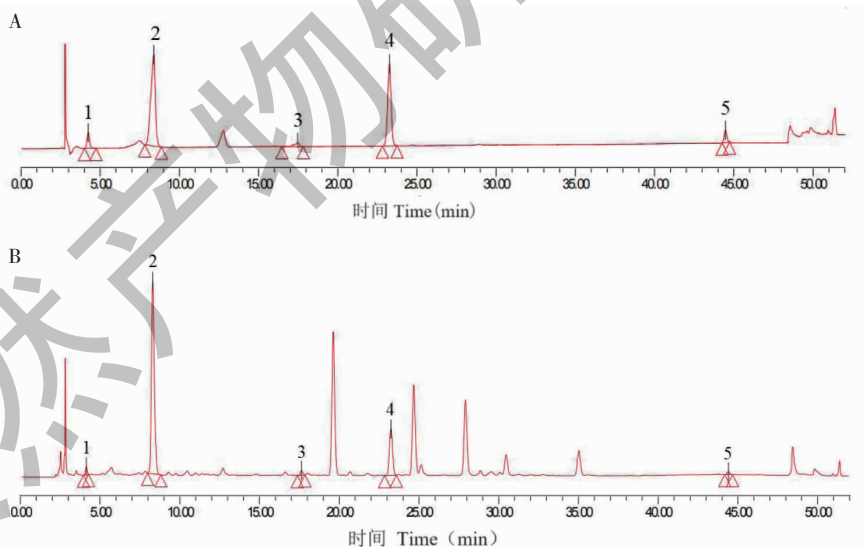


图 1 混合对照品(A)和样品(B)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

注:1. 京尼平苷酸;2. 绿原酸;3. 松脂醇二葡萄糖苷;4. 芦丁;5. 槲皮素。Note:1. Geniposide acid; 2. Chlorogenic acid;3. Pinoresinol diglucoside;4. Rutin;5. Quercetin.

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 线性关系的考察

分别精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液,用甲醇为溶剂分别稀释成相应浓度梯度的标准工作

液注入液相色谱仪,按“2.1.3”项下色谱条件测定峰面积。以浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y),进行线性回归分析。绿原酸线性回归方程为 $y = 6\,002.4x - 47\,289$ ($r = 0.999\,9$),在 1.97~1\,452.60

mg/mL 范围内呈良好线性关系;京尼平苷酸性回归方程为 $y = 909.83x - 5054.7$ ($r = 0.9999$), 在 $1.10 \sim 1501.70$ mg/mL 范围内呈良好线性关系;松脂醇二葡萄糖苷线性回归方程为 $y = 1536.6x + 193.78$ ($r = 0.9999$), 在 $0.98 \sim 98.12$ mg/mL 范围内呈良好线性关系;芦丁线性回归方程为 $y = 15700x + 1555.2$ ($r = 1$), 在 $0.43 \sim 64.71$ mg/mL 范围内呈良好线性关系;槲皮素线性回归方程为 $y = 24002x - 119.08$ ($r = 0.9999$), 在 $0.037 \sim 5.50$ mg/mL 范围内呈良好线性关系。

2.1.4.2 精密性试验

取“2.1.1”项下混合对照品,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样6次,测定峰面积。计算得到绿原酸、芦丁、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、槲皮素的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) ($n = 6$)分别为0.19%、0.48%、1.3%、0.65%、0.24%,表明仪器具有较好的精密性。

2.1.4.3 重复性考察

按“2.1.2”项下方法制备杜仲叶(S2)供试品溶液6份,在“2.1.3”项下色谱条件下进行检测,经过计算,5个化合物含量的RSD($n = 6$)均低于2.0%,表明本法重复性良好。

2.1.4.4 稳定性考察

按“2.1.2”项下方法制备杜仲叶(S2)供试品溶液6份,分别在0、2、6、12、18、24 h处按照“2.1.3”项下色谱条件进行检测,记录峰面积,结果同一样品溶

液在6个不同时间段绿原酸、芦丁、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、槲皮素RSD($n = 6$)分别为0.60%、0.39%、0.65%、0.43%、0.53%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.4.5 回收率考察

精密称取杜仲叶样品粉末(S2),平行9份,分别精密加入混合对照品溶液适量(低、中、高3个浓度,每个浓度各3份)。按“2.1.2”项下制备供试品溶液,在“2.1.3”项下色谱条件下测定,计算结果显示绿原酸、芦丁、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、槲皮素的平均回收率分别为101.1%、100.4%、100.2%、100.2%、100.1%,RSD值分别为1.5%、0.91%、0.76%、0.65%、0.42%,说明该方法回收率良好。

2.1.5 HPLC 指纹图谱方法的建立

将15批杜仲叶样品按照“2.2.2”项下制备供试液,并按“2.2.3”项下色谱条件进行检测,记录52 min的HPLC色谱图。根据中药指纹图谱研究要求^[19],利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(国家药典委员会2012版)软件,以S2为参照图谱,设定时间窗宽度为0.1 min,采用平均数法,多点校正,建立15批杜仲叶HPLC特征图谱^[20]。结果显示,15批杜仲叶样品中有5个共有峰,经对照品比对,指认出绿原酸(峰1)、松脂醇二葡萄糖苷(峰2)、芦丁(峰4)、槲皮素(峰5)(见图2)。15批杜仲叶相似度基本都在0.9以上,共有峰相对保留时间

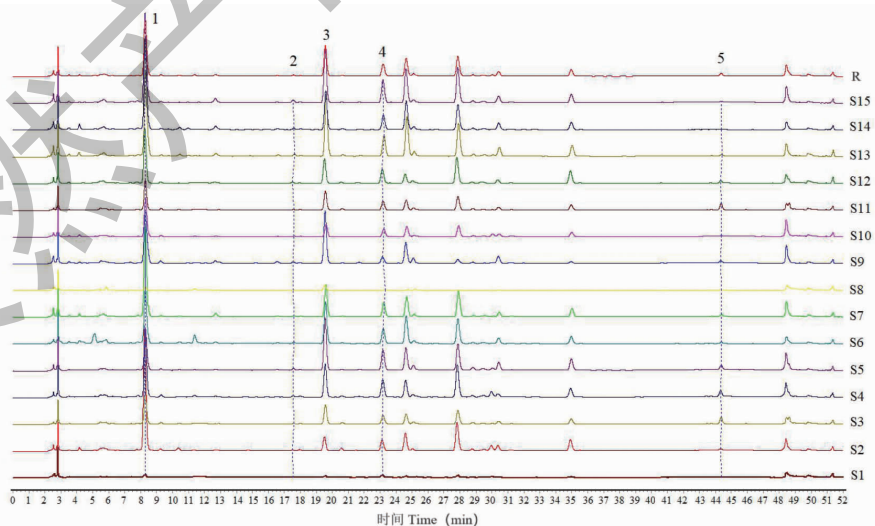


图2 15批杜仲叶HPLC指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of 15 batches of Eucommiae Folium

注:1. 绿原酸;2. 松脂醇二葡萄糖苷;3. 未知;4. 芦丁;5. 槲皮素。Note: 1. Chlorogenic acid; 2. Pinioresinol diglucoside; 3. Unknown; 4. Rutin; 5. Quercetin.

RSD 小于 0.30%, 这在一定程度上反映杜仲叶样品中的化学成分种类较为相似。

2.1.6 样品的多成分含量测定

按“2.1.1”项下制备混合对照品, 将 15 批杜仲

叶样品按照“2.2.2”项下制备供试品溶液, 并按“2.2.3”项下色谱条件进行检测, 计算样品中绿原酸、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素的含量及各成分含量与绿原酸含量的比值, 结果见表 2。

表 2 含量测定结果

Table 2 Content determination results

编号 No.	绿原酸 Chlorogenic acid	京尼平苷酸 Geniposide acid		松脂醇二葡萄糖 Pinoresinol diglucoside		芦丁 Rutin		槲皮素 Quercetin	
	含量 Content (mg/g)	含量 Content (mg/g)	比值 Ratio (%)	含量 Content (mg/g)	比值 Ratio (%)	含量 Content (mg/g)	比值 Ratio (%)	含量 Content (mg/g)	比值 Ratio (%)
S1	0.940	-	-	0.368	39.15	0.292	31.06	0.048	5.11
S2	35.914	3.686	10.26	0.839	2.34	1.411	3.93	0.105	0.29
S3	8.936	-	-	0.895	10.02	1.175	13.15	0.467	5.23
S4	19.938	-	-	1.649	8.27	2.406	12.07	0.416	2.09
S5	13.904	0.657	4.73	2.459	17.69	2.866	20.61	0.287	2.06
S6	18.531	7.542	40.70	1.874	10.11	2.101	11.34	0.108	0.58
S7	30.323	3.200	10.55	1.367	4.51	1.932	6.37	0.160	0.53
S8	1.064	0.062	5.83	0.454	42.67	0.110	10.34	0.025	2.35
S9	18.848	1.485	7.88	1.672	8.87	0.880	4.67	0.143	0.76
S10	12.008	2.174	18.10	0.876	7.30	1.084	9.03	0.048	0.40
S11	21.201	-	-	1.046	4.93	1.390	6.56	0.081	0.38
S12	16.071	-	-	1.514	9.42	1.881	11.70	0.155	0.96
S13	26.496	4.560	17.21	2.402	9.07	2.561	9.67	0.080	0.30
S14	30.438	7.229	23.75	1.687	5.54	2.040	6.70	0.031	0.10
S15	30.056	1.427	4.75	3.666	12.20	3.162	10.52	0.076	0.25
均值	18.98	2.14	-	1.52	-	1.69	-	0.15	-
Average value	18.98	2.14	-	1.52	-	1.69	-	0.15	-
RSD (%)	55.7	121.9	-	56.9	-	52.8	-	91.6	-

注: 比值 = (各成分含量/绿原酸含量) × 100%。

Note: Ratio = (content of each component/chlorogenic acid content) × 100%.

2.2 杜仲叶采收期研究

由于杜仲叶片在 1 年中生长时间比较短, 3 月下旬至 4 月上旬萌芽展叶后, 叶片快速生长, 生长高峰期在 4 月中、下旬, 至 5 月中旬成熟后停止生长, 至秋冬叶落。故分别于 5 月、6 月、7 月、8 月、9 月、10 月、11 月在同一基地进行杜仲叶采集, 低温干燥, 检测总黄酮、京尼平苷酸、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素和醇溶性浸出物的含量。分析这 7 类化学成分含量在不同采收时期的变化情况, 并通过综合评分法选取最佳采收时间。

2.2.1 总黄酮含量测定

2.2.1.1 对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品 5.00 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得(每 1

mL 中含芦丁 0.20 mg)。

2.2.1.2 供试品溶液的制备

精密称取杜仲叶粉末(过三号筛)1 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 80% 乙醇 20 mL, 超声提取 30 min, 滤过; 滤渣再加 80% 乙醇 20 mL, 超声提取 20 min, 滤过; 合并 2 次滤液并定容至 50 mL, 即得。

2.2.1.3 样品含量测定

取供试品溶液 0.5 mL 于 25 mL 量瓶, 加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL, 显色 6 min; 后加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL, 显色 6 min; 最后加入 10% 氢氧化钠溶液 10 mL, 显色 15 min, 于 500 nm 波长处测定吸光度, 计算 5~11 月份采收杜仲叶样品中总黄酮的含量分别为 9.26%、10.83%、5.34%、16.70%、12.97%、13.14%、16.19%。

2.2.1.4 方法验证

线性关系考察:精密量取芦丁对照品溶液,配制浓度分别为 8.2、16.4、24.6、32.8、41.0、49.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,采用“2.2.1.3”项下亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,以相应的试剂为空白对照,进行同法显色,并在 500 nm 波长处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标、芦丁浓度 x 为横坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程 $A = 11.428x - 0.0031$ ($r = 0.9991$),即芦丁检测浓度线性范围为 8.2 ~ 49.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

精密度考察:精密量取“2.2.1.1”项下芦丁对照品溶液,在“2.2.1.3”条件下连续测定 6 次,记录吸光度,计算 RSD 值为 0.26%,表明仪器精密密度良好。

稳定性考察:精密吸取供试品溶液,按“2.2.1.3”条件分别于第 0、2、4、6、8 h 进行检测,记录吸光度,计算 RSD 值为 0.42%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

重复性考察:取同一供试品,按“2.2.1.2”项下制备方法平行制备 6 份,并按“2.2.1.3”项下进

行检测,记录吸光度,计算 RSD 值为 0.42%,表明该法具有良好的重复性。

2.2.2 醇溶性浸出物测定

根据《中国药典》四部(2020 版)“2201 浸出物测定法”项下“醇溶性浸出物测定法”中热浸法测定,5 ~ 11 月采收杜仲叶醇溶性浸出物含量分别为 15.88%、15.92%、20.44%、17.97%、20.39%、18.56%、24.23%。

2.2.3 直观分析法研究采收期

在 5 到 11 月份杜仲叶的采收中,醇溶性浸出物含量波动较小;杜仲叶总黄酮含量在 8 月达到最高,9 月、10 月有所下降,11 月含量又有回升;五种单一化学成分中绿原酸含量最高,且在 5 ~ 6 月含量急剧升高且在 6 月时达到顶峰,之后几个月趋于平衡;京尼平苷酸含量在每年 10 月时最高,其余月份均较低;松脂醇二葡萄糖苷与芦丁含量先增加后减少,在 9 月达到最高值,10 月开始下降;整体而言,杜仲叶中槲皮素含量在 7 月时含量最高,之后呈下降趋势(见图 3)。

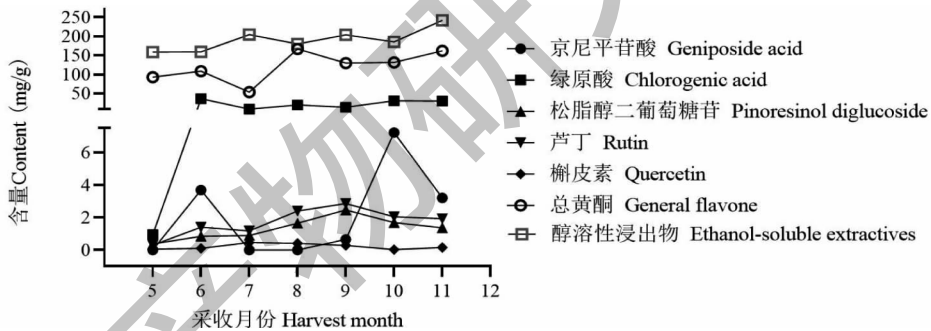


图 3 不同采收期杜仲叶中化学成分含量变化

Fig. 3 The changes of chemical constituents in *Eucommiae Folium* at different harvesting stages

2.2.4 综合评分法评价最佳采收期

杜仲叶最佳采收期评价这个决策目标可由 7 个指标性成分(次级目标)来反映,建立层次结构模型,采用 1 ~ 9 标度法通过两两对比得到各个因素的权重系数^[21]。基于《中国药典》2020 版将绿原酸作为杜仲叶质量控制的指标性成分,总黄酮含量较大,京尼平苷酸及松脂醇二葡萄糖苷为杜仲叶药理活性成分,槲皮素含量最少,将这 7 项指标分为 5 个层次,确定指标的重要性,绿原酸 = 总黄酮 > 京尼平苷酸 = 松脂醇二葡萄糖苷 > 芦丁 > 槲皮素 > 醇溶性浸出物,以 YAAHP 10.1 层次分析软件设计并构建各成分的优先判断矩阵,计算得到 7 类化学成分

的权重系数(见表 3)。结合各成分指标隶属度 = (指标值 - 指标最小值) / (指标最大值 - 指标最小值),计算综合评分:综合评分 = 隶属度 * 指标权重(见表 4)。得出 5 ~ 11 月综合评分分别为 0.105、0.579、0.177、0.640、0.564、0.734、0.815,得分较高的月份为 6 月、8 ~ 11 月,以 11 月为最佳采收期。

2.3 主成分与聚类分析

以绿原酸、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素的含量为因变量,不同批次杜仲叶为自变量,运用 SIMCA 统计软件,对 15 个杜仲叶样品进行主成分分析。前 3 个主成分贡献率 91.3% ($PC1 = 0.516, PC2 = 0.282, PC3 = 0.115$),所有样品坐标点均分布于 95% 置信区间。PCA 得分图(见图 4)显示样品分布较松散,说明此 15 个杜仲叶样品中 5

表 3 7类化学成分的权重系数

Table 3 Weight coefficients for seven different types of chemical constituents

指标 Index	绿原酸 Chlorogenic acid	总黄酮 Total flavonoids	京尼平苷酸 Geniposide acid	松脂醇二 葡萄糖苷 Pinoresinol diglucoside	芦丁 Rutin	槲皮素 Quercetin	醇溶性 浸出物 Ethanol- soluble extractive	权重系数 Weight coefficient	一致性 Consistency
绿原酸 Chlorogenic acid	-	1	3	3	5	7	9	0.297 7	
总黄酮 Total flavonoids	-	-	3	3	5	7	9	0.297 7	
京尼平苷酸 Geniposide acid	-	-	-	1	3	5	7	0.137 5	
松脂醇二葡萄糖苷 Pinoresinol diglucoside	-	-	-	-	3	5	7	0.137 5	0.038 4
芦丁 Rutin	-	-	-	-	-	3	5	0.070 0	
槲皮素 Quercetin	-	-	-	-	-	-	3	0.037 9	
醇溶性浸出物 Ethanol-soluble extractives	-	-	-	-	-	-	-	0.021 7	

表 4 7类化学成分的隶属度

Table 4 The membership degree of seven different types of chemical constituents

采收月份 Harvest month	隶属度 Degree of membership (%)						
	绿原酸 Chlorogenic acid	京尼平苷酸 Geniposide acid	松脂醇二葡萄糖 Pinoresinol diglucoside	芦丁 Rutin	槲皮素 Quercetin	总黄酮 Total flavonoids	醇溶性浸出物 Ethanol- soluble extractive
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045	0.346	0.000
6	1.000	0.510	0.225	0.434	0.159	0.483	0.005
7	0.229	0.000	0.254	0.345	1.000	0.000	0.546
8	0.543	0.000	0.612	0.822	0.886	1.000	0.250
9	0.371	0.091	1.000	1.000	0.591	0.672	0.540
10	0.844	1.000	0.632	0.678	0.000	0.687	0.321
11	0.840	1.000	0.478	0.636	0.295	0.955	1.000

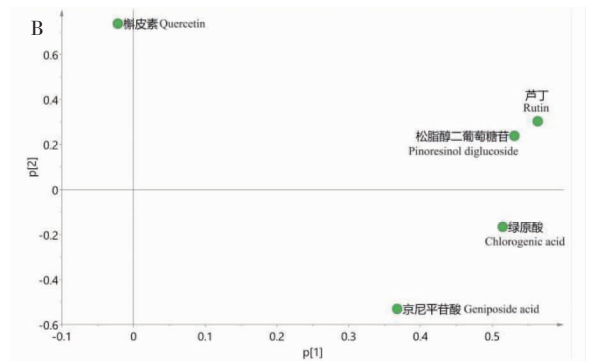
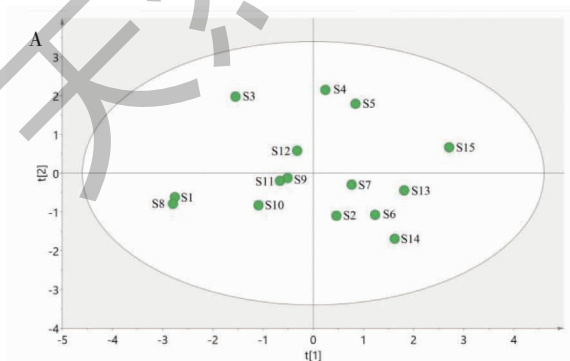


图 4 杜仲叶中 5 个化学成分的 PCA 分析

Fig. 4 Analysis of five chemical constituents in Eucommiae Folium samples by PCA

种化学成分含量差异较大,表2中的RSD值也支持了这一点。为了更好地观察不同样本的组间差异,将同一基地不同采收期杜仲叶归为一个组,不同批次杜仲叶药材一组,进行OPLS-DA分析(见图5),以等方差法为权重,参数为 $R^2 X = 0.967$, $R^2 Y =$

0.474 , $Q^2 = 0.0365$ 。OPLS-DA得分图(见图5A)显示不同采收期杜仲叶较不同批次杜仲叶药材分散,说明采收时间对主要化学成分含量的影响较大;VIP值(见图5C)显示槲皮素、松脂醇二葡萄糖苷和绿原酸对此15批次杜仲叶样品的区分影响较大。

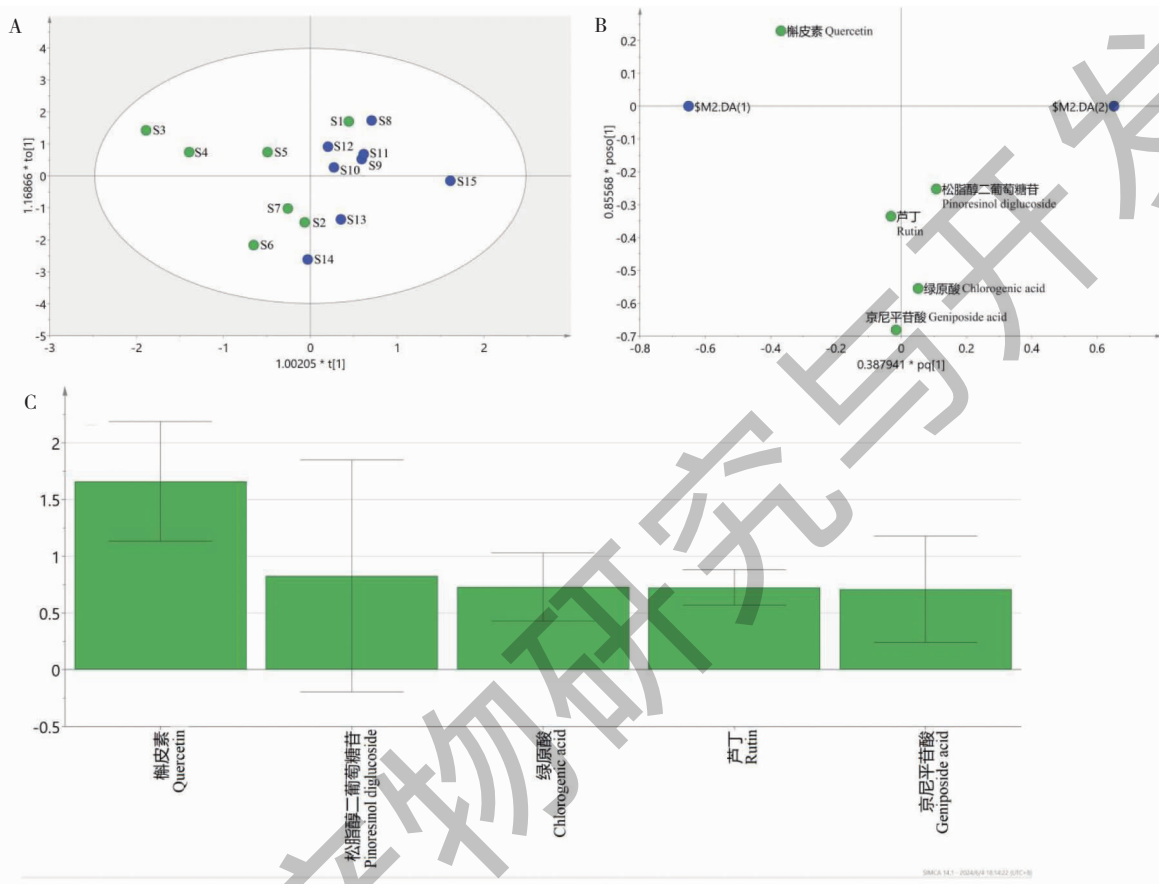


图5 杜仲叶中5个化学成分的OPLS-DA分析

Fig. 5 Analysis of five chemical constituents in *Eucommiae Folium* samples by OPLS-DA

3 讨论与结论

中药材中有效物质往往不是某种单一成分,而是多组分、多靶点作用的综合结果。一般而言,测定的成分越多,越有利于控制中药材的内在质量。中药现代化旨在将传统中药与现代科技相结合,提高中药的疗效和安全性,而多成分、多指标控制中药材质量正是实现中药现代化的重要手段之一,可为中药的研发、生产和应用提供更加科学、规范、可靠的支撑。

本研究通过对不同生长阶段杜仲叶中7类化学成分的含量测定,运用AHP建立了一种中药多指标的综合评价方法,进而优选杜仲叶最佳采收时期,从源头上实现对杜仲叶的质量控制。药材适宜采收期

的确立原则是质量最优化和产量最大化^[22]。从研究结果中可以看出,不同采收期的杜仲药材中的绿原酸、总黄酮、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素、醇溶性浸出物并不一定同时达到峰值。若以绿原酸为指标,6~9月均可进行采收,其中以6月为最佳;主要考虑京尼平苷酸的含量,则可在10月进行采收;考虑松脂醇二葡萄糖苷与芦丁较高可在8~10月采收,其中以9月为最佳;若以总黄酮为指标,则可在8月采收。采收过早或过晚都会降低各药效成分的含量,这主要与植物生长周期中次生代谢产物的变化以及环境中生态因素等有关。综合评分结果表明,6月、8~11月采收较佳,为最佳采收期研究提供了科学依据,便于从源头上控制杜仲叶

质量。本研究成果与杜仲皮^[23]的结果相似,也说明杜仲叶及杜仲皮中主要化学成分的变化规律具有一致性。

同时,通过我们的研究,在综合评分法评价最佳采收期这个评分模型中,可根据具体使用需求,对其单一或者多个化学成分指标的权重进行主观调整以得到不同的计算结果。通过主观与客观的结合,形成一个杜仲叶按化学成分进行质量控制的评价范式,使结果更加科学化,进而能够更好地指导实际生产与应用。

另外,本研究建立了一种简便、实用的杜仲叶 HPLC 指纹图谱方法及同时分析杜仲叶中绿原酸、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、槲皮素的含量测定方法,简单易行,可为杜仲叶质量的综合评价和控制提供参考。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2020:173.
- 2 Tu WQ,Zhang LJ,Xia MY, et al. DPPH kinetic characteristics and identification of antioxidant compounds in *Eucommia ulmoides* leaves[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志),2022,57:264-268.
- 3 Akira I,Akihiro T,Hiroshi S, et al. *Eucommia ulmoides*(Tochu) and its extract geniposidic acid reduced blood pressure and improved renal hemodynamics[J]. Biomed Pharmacother,2021,141:111901.
- 4 Hu FC,Han R,Guo C, et al. Chemical constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides* and its neuroprotective activity[J]. Chem Ind For Prod(林产化学与工业),2023,43:9-15.
- 5 Yu CX,Wang HF,Wang P, et al. Lipid-lowering effect of *Eucommiae Folium* extract on hyperlipidemia model rats and its influence on intestinal flora[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床),2023,39:55-61.
- 6 Hu WC,Wang GC,Li PX, et al. Neuroprotective effects of macranthoin G from *Eucommia ulmoides* against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells via inhibiting NF- κ B activation[J]. Chem Biol Interact,2014,224:108-116.
- 7 Liu Y,Chen QY,Gao X, et al. Effect of collagen scaffold on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells treated by *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extract[J]. Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究),2020,24:2537-2543.
- 8 Xin J,Keisuke A,Yoshito Z, et al. Alimorative effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves extract(ELE) on insulin resistance and abnormal perivascular innervation in fructose-drinking rats[J]. J Ethnopharmacol,2010,128:672-678.
- 9 Lei YN,Zhang XB,Chen SC. Separation and *in vitro* activity of polysaccharides from *Eucommia Folium* leaves [J]. J Northwest A & F Univ:Nat Sci(西北农林科技大学学报:自科版),2020,48:97-103.
- 10 Luo SB,Ren XM,Shi XQ, et al. Study on enhanced extraction and seasonal variation of secondary metabolites in *Eucommia ulmoides* leaves using deep eutectic solvents[J]. J Pharm Biomed Anal,2022,209:114514.
- 11 Feng M,Wang CC,Ling WH, et al. Quality evaluation of *Eucommia ulmoides* leaves based on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition analysis[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2023,54:2931-2939.
- 12 Liu RH,Tang FR,Chen LY, et al. Comparison of contents of five effective components in *Eucommiae Folium* from different areas[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2015,21:31-34.
- 13 Lan JY,Liu Z,Zhang Q, et al. A study on growth characteristics of *Eucommia ulmoides* Oliver in different areas and the dynamic changes of main effective components in leaves[J]. J Agric Univ Hebei(河北农业大学学报),2019,42:51-56.
- 14 Zhong SH,Gu R,Li Y, et al. HPLC fingerprint and accumulation rule of principal component in *Folium Eucommiae*[J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志),2010,25:464-466.
- 15 Ma JH,Li XM,Xu AP. Study on HPLC fingerprint of *Eucommia ulmoides* leaves from Chongqing[J]. J China Med Mater(中药材),2011,34:206-209.
- 16 Tang FR,Liu RH,Shao F, et al. HPLC fingerprint of *Eucommiae Folium* from different habitats[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2016,27:1496-1498.
- 17 Zheng YP,Pan YQ,Qin KM, et al. Effects of different drying methods on contents of 4 active ingredients in leaves of *Eucommia ulmoides*[J]. J China Pharm(中国药房),2017,28:3973-3976.
- 18 Pei XH,Wu X,Zhang LX, et al. Effects of different drying method on medicinal components in leaves of *Eucommia ulmoides*[J]. Guizhou Agric Sci(贵州农业科学),2017,45:95-98.
- 19 Xie PS. Traditional Chinese Medicine (TCM) Chromatographic Fingerprints(中药色谱指纹图谱)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House,2005:22.