

# 变波长-梯度洗脱 HPLC 法同时测定杜仲的 12 种成分

付冬梅<sup>1</sup>, 张子东<sup>2</sup>, 张威鹏<sup>1</sup>, 朱雯<sup>1</sup>, 张琳<sup>1</sup>, 祖元刚<sup>1</sup>

(1. 东北林业大学, 化学化工与资源利用学院, 森林植物生态学教育部重点实验室, 林业生物制剂教育部工程研究中心, 黑龙江哈尔滨 150040) (2. 黑龙江中医药大学, 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** 建立了变波长-梯度洗脱高效液相色谱法(HPLC)同时测定杜仲中的12种成分含量。色谱条件为: HiQ Sil C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.2% 甲酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱, 检测波长为 208 nm、277 nm 和 240 nm, 方法学考察结果良好。用此方法测定不同生长年限、不同部位的杜仲样品中的桃叶珊瑚苷、京尼平、京尼平苷、京尼平苷酸、原儿茶酸、松柏苷、紫丁香苷、绿原酸、咖啡酸、松脂醇二葡萄糖苷、丁香脂醇二葡萄糖苷和橄榄树脂素含量。此方法所用 3 个波长既使各成分信号最大化又可以使基线稳定, 梯度洗脱可以保证杜仲中的 12 种成分在 60 min 内全部出峰并完全分离, 为 HPLC 测定杜仲中多种成分提供参考, 进一步为杜仲中的功能性成分的含量测定和杜仲的质量控制提供有力的方法和手段。

**关键词:** 杜仲; 12 种成分; 高效液相色谱法; 不同生长年限; 不同部位

文章编号: 1673-9078(2020)10-315-323

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0330

## Simultaneous Determination of 12 Active Components in *Eucommia ulmoides* Oliv. by Variable Wavelength-gradient Elution HPLC

FU Dong-mei<sup>1</sup>, ZHANG Zi-dong<sup>2</sup>, ZHANG Wei-peng<sup>1</sup>, ZHU Wen<sup>1</sup>, ZHANG Lin<sup>1</sup>, ZU Yuan-gang<sup>1</sup>

(1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Engineering Research Center of Forestry Biologics, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Heilongjiang Province Harbin 150040, China) (2. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Key Points of Applied Research of North Medicine Key Laboratory of Basic Research of Chinese Medicine and Natural Medicines, Heilongjiang Province, Harbin 150040, China)

**Abstract:** A variable wavelength-gradient elution HPLC method for simultaneous determination of 12 components in *Eucommia ulmoides* Oliv. was established. Chromatography conditions were as follows: HiQ Sil C 18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. Mobile phase was 0.2% formic acid (A)-acetonitrile (B) with gradient elution. Detect wavelength were 208 nm, 277 nm and 240 nm. The result of methodology investigation indicated that this method was good. Twelve components in *Eucommia ulmoides* Oliv. from different growth years and parts were determined using this method. This method could be used to determine the 12 components in *Eucommia ulmoides* Oliv within 60 min. Three wavelengths used in this method could not only maximize the signal of each component, but also stabilize the baseline. Gradient elution could ensure that all 12 components of *Eucommia ulmoides* Oliv. can be separated completely within 60 minutes, which will provide a reference for the determination of various components in *Eucommia ulmoides* Oliv. by HPLC. Furthermore, it will provide powerful method and means for the content determination of functional components and quality control of *Eucommia ulmoides* Oliv.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv.; 12 components; high performance liquid chromatography; different growth years; different parts  
引文格式:

付冬梅,张子东,张威鹏,等.变波长-梯度洗脱 HPLC 法同时测定杜仲的 12 种成分[J].现代食品科技,2020,36(10):315-323

FU Dong-mei, ZHANG Zi-dong, ZHANG Wei-peng, et al. Simultaneous determination of 12 active components in *Eucommia ulmoides* Oliv. by variable wavelength-gradient elution HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 315-323

收稿日期: 2020-04-10

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2572015CA06); 林业公益性行业科研专项(201504701-205)

作者简介: 付冬梅(1983-),女,硕士研究生,研究方向:药用植物资源的开发与利用

通讯作者: 张琳(1978-),女,博士,副教授,研究方向:药用植物资源的开发与利用

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 为杜仲科杜仲属植物, 是我国特有的植物, 为可用于保健食品的中药<sup>[1]</sup>。杜仲具有很高的经济价值, 是我国二级保护植物, 在活性功能方面具有舒张血管、降血压<sup>[2]</sup>、强筋壮骨、治疗腰膝酸痛和腿足拘挛等作用<sup>[3]</sup>, 这与其含有多种功能性成分有着密不可分的关系, 然而不同生长年限和不同部位的杜仲中的化学成分与含量并不完全一致<sup>[4]</sup>, 导致其活性功能的强弱也不一致。据目前国内外对杜仲化学成分的相关研究可知, 杜仲叶与杜仲皮中的化合物成分几乎相同, 含量有一定差别, 且存在互补趋势<sup>[5]</sup>, 其活性成分主要集中于总木脂素、总环烯醚萜、总苯丙素、总黄酮类化合物<sup>[6]</sup>。杜仲的化学成分检测分析方法较多<sup>[7-12]</sup>, 目前有很多分析法同时测定杜仲中某一类或两类化合物的定量分析<sup>[13-17]</sup>, 同时测定杜仲中 12 种活性成分的方法未见报道。由于杜仲中的活性成分会随生长年限、采收时间、药用部位及药材产地等因素的不同而发生变化<sup>[17-21]</sup>, 所以其产生的变化与杜仲的活性有极大的相关性。因此, 本实验在张子东等<sup>[22]</sup>采用高效液相色谱 (HPLC) 法对杜仲中 5 种苯丙素类成分同时测定的基础上, 建立了采用 3 个波长取代 1 个波长、梯度洗脱取代等度洗脱的方法对包括这 5 种苯丙素在内的 12 种活性成分同时进行 HPLC 测定的方法, 并用其分别测定树龄为 16~25 年的杜仲叶、干皮、枝皮 3 个部位中松脂醇二葡萄糖苷、丁香树脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素、京尼平、京尼平苷、京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、松柏苷、原儿茶酸 12 种活性成分含量, 探讨并阐明其主要活性成分与生长年限、药用部位之间的关系, 从整体的角度出发, 为药食同源植物的质量控制指标提供理论依据, 并对以杜仲为原料开发的药品、食品及保健品的深度开发具有指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

杜仲样品采于陕西省汉中市略阳县国家杜仲良种基地, 树龄分别为 16~25 年, 每个生长年限的杜仲分别采集其叶、枝皮、干皮三个部位。标准品: 桃叶珊瑚苷、紫丁香苷、绿原酸、咖啡酸、松脂醇二葡萄糖苷、京尼平、京尼平苷、京尼平苷酸 (纯度>98%), 中国药品生物制品检定所, 原儿茶酸 (纯度>98%)、丁香树脂醇二葡萄糖苷, 大连美仑生物技术有限公司; 松柏苷 (纯度≥98%), 上海源叶生物科技有限公司; 橄榄树脂素 (纯度≥97%) 云南西力生物技术股份有限公司; 实验中使用乙腈、甲醇为色谱纯, 百灵威科技

有限公司; 实验用水为去离子水; 其他所用试剂均为分析纯, 天津科密欧化工试剂有限公司。

### 1.2 仪器和设备

LC-20A HPLC 仪 (包括 SPD-20A 紫外检测器), 日本岛津公司; 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; RE 52-99 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; KQ2200D 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; DFT-50 手提式高速万能粉碎机, 温岭市林大机械有限公司; Unique-LCR20 多功能超纯水系统, 厦门锐思捷水纯化技术有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 HPLC 色谱条件

采用日本岛津 LC-20A 高效液相色谱仪。色谱柱为 HiQ Sil C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。柱温: 25 °C, 进样量: 5 μL, 流动相流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 208 nm、277 nm、240 nm。洗脱梯度如表 1:

表 1 HPLC 梯度洗脱条件

Table 1 The condition of HPLC gradient elution

保留时间/min	A/%	B/%	检测波长/nm
0	96	4	208
7	96	4	208
12	96	4	277
15	88	12	277
17	88	12	240
20	88	12	240
25	86	14	240
50	86	14	240
60	80	20	240

注: A: 0.2% 甲酸水; B: 乙腈。

#### 1.3.2 标准品溶液的制备

精密称取适量松脂醇二葡萄糖苷、丁香树脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素、京尼平、京尼平苷、京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、松柏苷、原儿茶酸标准品, 用甲醇溶解、定容, 配置成 1 mg/mL 的混合标准品溶液, 于 4 °C 冰箱中保存备用<sup>[23-26]</sup>。

#### 1.3.3 供试品样品溶液的制备

分别精密称取粉碎后的杜仲样品粉末 1.0 g, 每份样品中加入无水甲醇溶液, 超声提取 30 min, 料液比为 1:10, 过滤, 保留滤液, 残渣用无水甲醇再次超声提取 30 min, 料液比为 1:10, 过滤, 滤液两次合并, 混匀<sup>[27-30]</sup>。分别从各样品合并滤液中吸取 1 mL, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

### 1.3.4 方法学考察

#### 1.3.4.1 线性关系考察

分别精密吸取梯度浓度范围的标准品混合溶液，进样量为 5  $\mu$ L，按“1.3.1”项色谱条件注入高效液相色谱仪，测定峰面积（平行测定 5 次），以进样浓度 X (mg/mL) 为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，绘制标准曲线。

#### 1.3.4.2 精密度试验

分别吸取标准品溶液，按“1.3.1”项所述的色谱条件下，一天内重复进样 6 次，计算各标准品峰面积的相对标准偏差。

#### 1.3.4.3 稳定性试验

取杜仲样品溶液，室温放置 48 h 内不同时间进样，按“1.3.1”项所述的色谱条件进行测定，计算各样品中 12 种有效成分峰面积的相对标准偏差。

#### 1.3.4.4 重复性试验

取每份杜仲样品的 6 份供试品溶液，分别按“1.3.3”项所述的方法制备供试品溶液，按“1.3.1”项所述的色谱条件进行测定，计算各 12 种有效成分峰面积的相对标准偏差。

#### 1.3.4.5 回收率试验

精密称取已知含量的各杜仲样品溶液 3 份，分别加入不同浓度的标准品溶液后，分别按“1.3.3”项所述的方法制备待测溶液，并进行 HPLC 检测，分别进样后计算 30 种杜仲样品的平均回收率和相对标准偏差。

### 1.3.5 样品含量的测定

将“1.3.3”项制备的各杜仲样品按“1.3.1”项色谱条件对 12 种活性成分进行 HPLC 分析。

## 1.4 统计分析

应用 R Studio3.4.4 (Version3.6) 软件对数据进行编程及可视化处理<sup>[31]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 HPLC 色谱分析

在“1.3.1”项色谱条件下对 12 种活性成分标准品和杜仲公式样品进行分析，混合标准品 (a) 与供试品分析图谱/放大图谱 (b,c) 分别见图 1。

本法测定的杜仲中 12 种活性物质不为同一类物质，而为木脂素、环烯醚萜、苯丙素三类物质，这三类物质的最大吸收波长不全相同，为了使 12 种物质同时分离并最大限度地被检测到，将 12 种物质的最大吸收波长进行整合，采用 3 个波长进行检测，分别是 0~12 min 208 nm，12~17 min 277 nm，17~55 min 240 nm，

测定效果良好。在流动相组成的方面，选择 0.2% 甲酸和乙腈作为 A 项和 B 项，甲酸的添加能够更好地改善有些解吸附困难的物质的峰拖尾的问题，由于被分析物质数量较多，等度洗脱很难在 1 h 内实现 12 种物质全部分离并被检测到，因此选择梯度洗脱对 12 种物质进行分离，通过流动相比例的变化来调整出峰时间。结果表明，合适的梯度洗脱程序 (0~7 min, 96% A; 7~15 min, 96% A→88% A; 15 min~20 min, 88% A; 20~25 min, 88% A→86% A; 25~50 min, 86% A; 50~55 min, 86% A→80% A; 55~60 min, 80% A) 可以使 12 种物质在 1 h 内被全部检测到，杜仲样品各物质在此分离条件下分离效果良好。

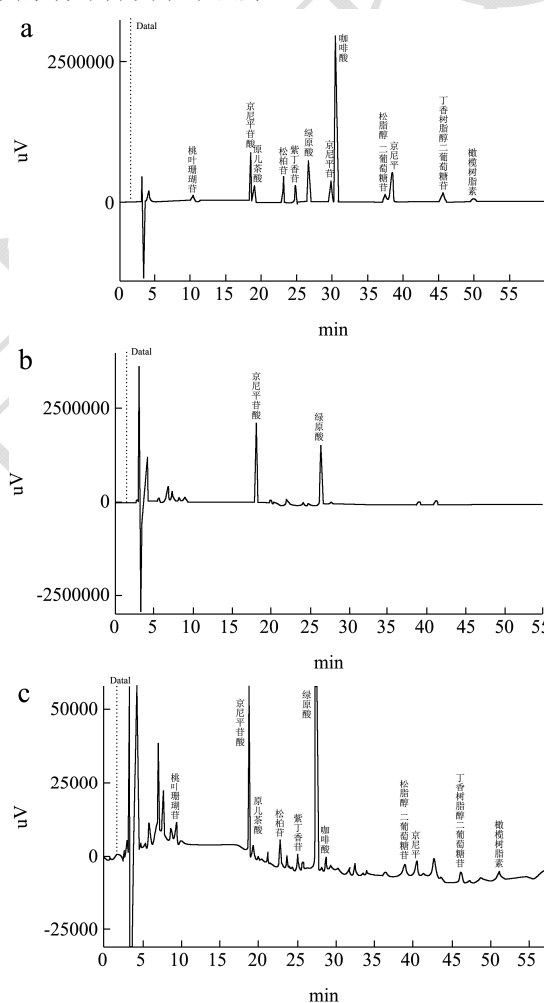


图 1 12 种成分混合标准品 (a) 和杜仲样品 (b, c) HPLC 色谱图  
Fig.1 HPLC chromatograms of mixed standard substances (a) of 12 compounds *Eucommia* sample (b,c)

## 2.2 方法学考察结果

### 2.2.1 线性关系考察

根据“1.3.4.1”项线性关系考察方法，计算得出 12 种成分的回归方程及相关系数，结果见表 2。

表 2 12 种成分的线性方差及相关系数

Table 2 The regression equation, correlation coefficients of 12 components

成分	线性方程	R <sup>2</sup>	线性范围/(mg/mL)
松脂醇二葡萄糖苷	y=0.9424x+6.108	R <sup>2</sup> =0.9992	1×10 <sup>-4</sup> ~1
丁香树脂醇二葡萄糖苷	y=1.0324x+5.7347	R <sup>2</sup> =1.0000	1×10 <sup>-3</sup> ~1
橄榄树脂素	y=1.0063x+6.0689	R <sup>2</sup> =0.9999	1×10 <sup>-4</sup> ~1
桃叶珊瑚苷	y=893044x-39817	R <sup>2</sup> =0.9994	1×10 <sup>-1</sup> ~1
京尼平	y=0.9799x+6.9654	R <sup>2</sup> =0.9992	1×10 <sup>-4</sup> ~1
京尼平苷	y=0.9778x+6.553	R <sup>2</sup> =0.9993	1×10 <sup>-4</sup> ~1
京尼平苷酸	y=0.9972x+6.7422	R <sup>2</sup> =0.9993	1×10 <sup>-4</sup> ~1
绿原酸	y=0.9716x+6.8786	R <sup>2</sup> =0.9991	1×10 <sup>-3</sup> ~1
咖啡酸	y=0.9595x+7.531	R <sup>2</sup> =0.9994	1×10 <sup>-4</sup> ~1
紫丁香苷	y=0.9769x+6.3329	R <sup>2</sup> =0.9993	1×10 <sup>-3</sup> ~1
松柏苷	y=1.0011x+6.4856	R <sup>2</sup> =0.9996	1×10 <sup>-4</sup> ~1
原儿茶酸	y=1.0148x+7.3461	R <sup>2</sup> =0.9992	1×10 <sup>-3</sup> ~1

表 3 回收率试验结果

Table 3 Results of recovery tests

成分	回收率/%			平均回收率/%	RSD/%
	1	2	3		
松脂醇二葡萄糖苷	99.10	102.80	103.10	101.70	1.79
丁香树脂醇二葡萄糖苷	98.30	103.40	102.90	101.50	2.26
橄榄树脂素	97.60	100.60	104.10	100.70	2.64
桃叶珊瑚苷	100.50	101.20	104.70	102.10	1.80
京尼平	99.40	100.90	100.50	100.30	0.63
京尼平苷	97.80	102.90	103.10	101.30	2.42
京尼平苷酸	101.30	100.20	103.40	101.60	1.31
绿原酸	100.80	103.70	105.60	103.30	1.91
咖啡酸	101.20	103.80	102.70	102.60	1.04
紫丁香苷	99.60	104.90	106.10	103.50	2.73
松柏苷	98.10	101.10	102.80	100.70	1.93
原儿茶酸	100.10	99.70	101.40	100.40	0.72

2.2.2 精密度试验

根据“1.3.4.2”节中精密度试验考察方法，计算各标准品峰面积的相对标准偏差。结果表明：松脂醇二葡萄糖苷、丁香树脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素、桃叶珊瑚苷、京尼平、京尼平苷、京尼平苷酸、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、松柏苷、原儿茶酸峰面积的 RSD 分别为：2.56%、1.33%、3.76%、2.12%、4.02%、1.54%、2.77%、2.43%、0.98%、0.99%、1.55%、0.78%，显示仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性试验

根据“1.3.4.3”节中稳定性试验考察方法，计算各样品中 12 种有效成分峰面积的相对标准偏差。结果表明：松脂醇二葡萄糖苷、丁香树脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素、桃叶珊瑚苷、京尼平、京尼平苷、京尼平

苷酸、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、松柏苷、原儿茶酸峰面积的 RSD 分别为：2.32%、1.56%、2.02%、3.58%、1.87%、2.61%、1.91%、2.35%、0.98%、1.66%、1.15%、0.77%，表明供试品溶液中松脂醇二葡萄糖苷、丁香树脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素、桃叶珊瑚苷、京尼平、京尼平苷、京尼平苷酸、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、松柏苷、原儿茶酸在 48 h 内较为稳定。

2.2.4 重复性试验

根据“1.3.4.4”节中重复性试验考察方法，计算各 12 种有效成分峰面积的相对标准偏差。结果表明：松脂醇二葡萄糖苷、丁香树脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素、桃叶珊瑚苷、京尼平、京尼平苷、京尼平苷酸、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、松柏苷、原儿茶酸峰面积的 RSD 分别为：3.74%、2.81%、3.09%、1.68%、

3.19%、4.11%、2.94%、1.44%、0.67%、1.12%、0.97%、0.53%，表明本方法重复性良好。

### 2.2.5 回收率试验

根据“1.3.4.5”项中回收率试验考察方法，计算 30 种杜仲样品 12 种物质的平均回收率和相对标准偏差。结果见表 3，结果表明各物质加标回收率良好。

## 2.3 不同生长年限不同部位的杜仲中 12 种活性成分的含量

取树龄为 16~25 年的杜仲叶、干皮和枝皮样品，按“1.3.3”项方法分别制备供试品溶液，采用 1.3.1 项 HPLC 条件进行测定 (n=3)，取平均值后，根据“2.2.1”项各成分的标准曲线计算 12 种活性成分的含量，结果见表 4。

整理近 10 年的杜仲成分含量测定的文献报道，主要采用 HPLC 和高效液相-质谱联用 (HPLC-MS/MS) 方法进行检测，其特点主要为三个方面：第一，针对杜仲中的某一类成分进行检测，如张子东<sup>[22]</sup>、许兰波<sup>[32]</sup>等分别采用 HPLC 方法对杜仲中的 5 种苯丙素类成分和 6 种黄酮类成分进行含量测定；第二，检测杜仲中的成分数量有限，如张留记<sup>[33]</sup>、肖芳<sup>[34]</sup>等分别对杜仲中的 8 种成分进行了检测，张欣<sup>[35]</sup>、周云雷<sup>[7]</sup>、袁建国<sup>[36]</sup>等对杜仲中的成分检测数量分别为 7 种、6 种和 5 种，这些研究方法结果皆为杜仲中化学成分含量的测定提供了有效的理论依据，而本文建立的对杜仲中 12 种成分同时测定的 HPLC 方法为首次可以在一个检测方法里针对杜仲中更多的化学成分进行定量分析，进一步为杜仲中的功能性成分的含量测定和杜仲的质量控制提供有力的方法和手段

表 4 不同生长年限、不同部位杜仲样品中 12 种成分测定结果

Table 4 Contents of 12 components in different growth years and parts of *E. ulmoides* Oliv. ( $\mu\text{g/g}$ )

name	桃叶珊瑚苷	京尼平	京尼平苷	京尼平苷酸	原儿茶酸	松柏苷	紫丁香苷	绿原酸	咖啡酸	松脂醇二葡萄糖苷	丁香脂醇双葡萄糖苷	橄榄树脂素
	Aucubin	G	Geniposide	GA	PA	Coniferin	Syringin	CA	Caffeic acid	PDG	SDG	Olivil
16-Y	3613.87	20.94	82.72	2931.29	2.63	101.60	336.36	3039.89	5.23	49.43	73.54	602.00
16-G	6426.77	387.26	28.56	6409.35	8.96	80.24	98.16	83.94	15.48	1527.96	244.54	71.87
16-Z	3473.16	1275.61	161.00	3589.93	13.21	360.75	270.93	637.61	29.75	1349.45	675.32	161.32
17-Y	677.57	17.28	88.52	6848.98	6.54	64.53	78.93	891.73	8.23	70.74	972.22	157.88
17-G	3849.35	840.21	1622.41	7836.00	13.71	150.43	23.62	133.00	3.16	1894.42	250.01	68.19
17-Z	6840.55	896.83	4643.25	16291.40	27.32	159.86	69.41	848.30	5.35	1982.95	77.15	75.94
18-Y	1150.96	40.02	85.53	6251.69	6.48	607.42	312.66	730.79	8.48	119.56	1227.72	264.01
18-G	1784.76	206.20	885.17	7110.31	20.64	141.52	13.36	141.66	2.42	1587.62	518.38	19.18
18-Z	1106.49	1611.10	1480.81	1704.70	35.67	396.97	361.69	263.80	6.75	2132.71	2342.17	166.71
19-Y	5822.77	67.00	92.32	8103.22	14.84	219.96	64.25	396.55	17.89	77.82	397.35	235.75
19-G	8346.05	526.52	32.38	11386.39	14.96	24.65	86.01	86.17	22.25	1247.50	49.42	124.56
19-Z	6138.27	169.787	309.82	12131.92	12.94	63.78	122.31	480.52	15.09	1066.49	145.37	82.14
20-Y	1143.96	93.85	49.43	2585.58	7.32	88.14	501.22	1867.44	9.49	121.96	536.23	454.47
20-G	2540.88	643.03	74.01	81.70	1.71	37.81	110.49	28.58	7.18	1770.63	391.79	67.71
20-Z	1032.60	3038.31	2443.40	2848.34	6.79	46.86	564.08	194.96	19.97	2199.73	890.01	287.26
21-Y	9514.53	157.16	90.71	15833.16	7.19	264.32	32.22	1914.85	27.15	238.27	415.35	143.84
21-G	6329.65	395.77	525.03	11172.64	3.63	50.17	110.14	132.49	12.81	1862.07	135.97	130.14
21-Z	10127.30	551.39	1847.15	22943.53	73.67	79.22	81.32	376.31	42.70	2675.28	345.57	189.79
22-Y	3695.15	15.48	87.86	190.86	19.63	56.39	91.00	1901.44	23.89	32.19	535.718	475.73
22-G	668.79	314.11	103.82	612.97	22.63	45.86	101.08	28.51	6.71	1460.62	322.27	157.92
22-Z	4012.33	1774.54	1964.86	9101.13	16.22	156.46	60.21	841.42	4.50	5032.97	5060.99	2414.86
23-Y	3135.68	12.95	93.06	563.51	6.05	42.28	58.97	1298.80	2.73	251.78	486.74	300.56
23-G	751.27	513.69	48.55	145.17	34.79	85.69	22.73	18.32	18.42	1631.40	775.87	119.06
23-Z	15826.59	268.29	2178.03	15171.62	48.74	197.27	29.02	153.90	11.19	3091.90	743.37	1225.55
24-Y	3415.08	36.16	106.82	4608.53	15.66	333.49	57.01	4600.00	36.82	142.43	551.86	441.06
24-G	814.49	699.44	68.89	187.58	20.52	28.50	12.89	42.28	18.24	2149.11	1550.71	86.11
24-Z	13982.26	408.97	2431.47	17907.77	72.16	255.68	66.74	505.81	55.81	4031.94	1278.86	88.44
25-Y	1574.31	100.36	196.22	3369.82	21.81	424.95	83.02	3604.00	19.91	120.93	748.67	457.20
25-G	743.81	1128.93	82.77	171.35	26.51	44.04	91.21	55.70	10.74	461.06	7606.44	573.18
25-Z	12762.02	1225.60	4297.82	9386.29	49.55	190.87	103.54	377.82	3.66	2401.77	1091.63	2118.94

注: 16-Y: 16 年树龄的杜仲叶; 16-Z: 16 年树龄的杜仲树枝皮; 16-G: 16 年树龄的杜仲树干皮。

## 2.4 杜仲中 12 种活性成分与生长年限和部位的相关性分析

使用 R 语言编程方法对 12 种活性成分的含量进

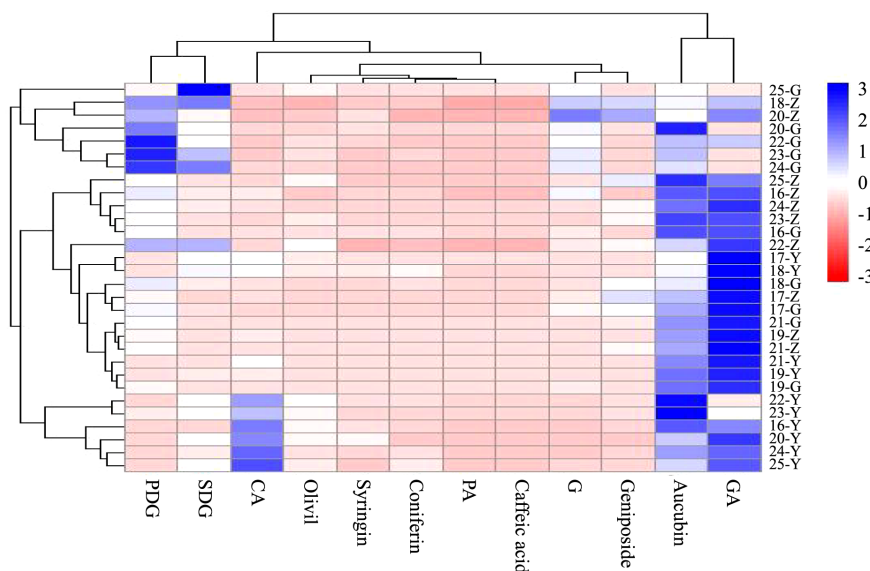


图 2 10 个生长年限 (16~25 年)、3 个药用部位的杜仲样品与 12 种活性成分聚类分析热图

Fig.2 The cluster heat map of data set with 12 compounds for 30 samples from 3 medicinal parts of *Eucommia* in 16~25 years

注: Coniferin: 松柏萜; CA: 绿原酸; GA: 京尼平苷酸; Aucubin: 桃叶珊瑚苷; Caffeic acid: 咖啡酸; PDG: 松脂醇二葡萄糖苷; Geniposide: 京尼平苷; PA: 原儿茶酸; SDG: 丁香树脂醇二葡萄糖苷; Olivil: 橄榄树脂素; G: 京尼平; Syringin: 紫丁香苷。

由图 2 所示,根据 12 种活性成分种类的不同进行分类,可进一步分成五类:第一类为绿原酸(CA)、松柏萜(Coniferin)含量较高;第二类为京尼平苷酸(GA)、桃叶珊瑚苷(Aucubin)、咖啡酸(Caffeic acid)含量较高;第三类为松脂醇二葡萄糖苷(PDG)、京尼平苷(Geniposide)和原儿茶酸(PA)含量较高;第四类为丁香树脂醇二葡萄糖苷(SDG)、橄榄树脂素(Olivil)含量较高的样品:22-Z, 23-Z, 25-Z, 25-G, 其中 25-G 中 SDG 含量极高;第五类为京尼平(G)、紫丁香苷(Syringin)含量较高。从热图中观察到的结果表明,在杜仲不同药用部位中,杜仲叶中黄酮类化合物较高;杜仲枝皮、干皮中木脂素类化合物:丁香树脂醇二葡萄糖苷、松脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素含量较高;杜仲叶中的苯丙素类化合物:松柏萜、绿原酸含量较高。杜仲枝皮中的环烯醚萜化合物:京尼平、京尼平苷含量较高。

利用 R 语言单因素 ANOVA 函数进行数据分析,结合以上聚类分析的讨论,从杜仲生长年限角度出发,原儿茶酸在杜仲不同部位中的含量随生长年限的增加呈增加趋势( $p<0.05$ );从杜仲不同药用部位角度出发,紫丁香苷在杜仲叶、杜仲枝皮中含量较高( $p<0.05$ ),

行聚类热图分析。采用两个维度(12 种活性成分、不同年限不同药用部位的杜仲样品)对进行样品含量的聚类分析,进一步分析杜仲中活性成分含量的变化趋势。结果见图 2。

京尼平在杜仲树枝皮中含量较高( $p<0.01$ ),松柏萜、绿原酸在杜仲叶中的含量较高( $p<0.05$ ,  $p<0.001$ ),咖啡酸在杜仲叶与杜仲枝皮中含量均较高,橄榄树脂素在杜仲枝皮、干皮中含量较高( $p<0.05$ ),可以从热图中观察到木脂素类化合物:松脂醇二葡萄糖苷、丁香树脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素在杜仲枝皮、干皮中含量较高;苯丙素类化合物松柏萜、绿原酸在杜仲叶中含量较高。

## 3 结论

3.1 建立了同时测定杜仲中松脂醇二葡萄糖苷、丁香树脂醇二葡萄糖苷、橄榄树脂素、桃叶珊瑚苷、京尼平、京尼平苷、京尼平苷酸、绿原酸、咖啡酸、紫丁香苷、松柏萜、原儿茶酸 12 种活性成分的变波长-梯度洗脱 HPLC 分析方法。与已有文献报道的杜仲化学成分含量测定方法相比,本方法可以对杜仲中更多的化学成分同时测定并进行含量分析,在 60 min 内即可完成杜仲 12 种成分的检测,方法学考察结果良好,可以作为对杜仲中上述 12 种活性成分进行定量分析的检测方法。

3.2 采用此新建 HPLC 方法测定杜仲中 12 种活性成

分的含量,并利用 R 语言聚类热图分析函数,将 360 个杜仲活性成分含量数据进行可视化处理,并进行聚类分析,进一步将大量含量数据分类归纳,最终得出结论:原儿茶酸含量与杜仲生长年限有关;紫丁香苷、京尼平、松柏苷、绿原酸、咖啡酸和橄榄树脂素的含量与杜仲不同药用部位有关。原儿茶酸在杜仲不同部位中的含量随生长年限的增加呈增加趋势;紫丁香苷在杜仲叶、杜仲树枝皮中含量较高;京尼平在杜仲树枝皮中含量较高;松柏苷、绿原酸在杜仲叶中的含量较高;咖啡酸在杜仲叶与杜仲树枝皮中含量均较高;橄榄树脂素在杜仲树枝皮中含量较高。因此,在制备含杜仲保健食品时,可考虑应用杜仲叶作为杜仲干皮的替代物。

### 参考文献

- [1] 李世全.杜仲药用价值的研究与开发[J].中国现代中药,1999,1:25-26  
LI Shi-quan. Research and development of the medicinal value of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Modern Chinese Medicine, 1999, 1: 25-26
- [2] 胡佳玲.杜仲研究进展[J].中草药,1999,30(5):394-395  
HU Jia-ling. Research progress of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 1999, 30(5): 394-395
- [3] 赵军太,张诚.杜仲不同部位的化学成分研究与应用[J].实用医技杂志,2003,9:1025-1026  
ZHAO Tai-jun, ZHANG Cheng. Reseach and application of chemical ingridients in different partial of Duzhong [J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2003, 9: 1025-1026
- [4] 龚桂珍,宫本红,张学俊,等.杜仲叶和杜仲皮中化学成分的比较[J].西南大学学报:自然科学,2010,32(7):167-172  
GONG Gui-zhen, GONG Ben-hong, ZHANG Xue-jun, et al. A comparison of the chemical composition of the bark and leaf of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Journal of Southwest University: Natural Science, 2010, 32(7): 167-172
- [5] 姚新生.天然药物化学[M].北京:人民卫生出版社(第二版),1996:286  
YAO Xin-sheng. Natural Pharmaceutical Chemistry [M]. Beijing: People's Medical Publishing House (Second Edition), 1996: 286
- [6] 姚丽娜.杜仲的化学成分研究[D].天津:天津大学,2010  
YAO Li-na. Chemical studies on the *Eucommia ulmoides* Oliv [D]. Tianjin: Tianjin University, 2010
- [7] MING-Qiang, ZHU, Jia-long, et al. Isolation and analysis of four constituents from barks and leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver by a multi-step process [J]. Industrial Crops & Products, 2016
- [8] 魏薇,王建刚.HPLC 测定不同树龄杜仲叶中黄酮类成分的含量[J].安徽农业科学,2011,39(18):10779-10781  
WEI Wei, WANG Jian-gang. Determination of flavonoids in leaves of *Eucommia ulmoides* Oliver at different tree age by HPLC [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2011, 39(18): 10779-10781
- [9] WENG Ze-bin, YAN Cui-ping, WU Yu, et al. Determination of ten components in *Eucommia ulmoides* Oliver by high-performance liquid chromatography with dual detectors [J]. Analytical Letters, 2014, 47(12): 1978-1986
- [10] 曹宇.杜仲盐炙的化学成分和质量研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2009:31-51  
CAO Yu. Study on chemical composition and quality of *Eucommia* salt roasting [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2009: 31-51
- [11] 何峰,王永林,郑林,等.UPLC-PDA-ESI-MS 分析杜仲中化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(3):59-62  
HE Feng, WANG Yong-lin, ZHENG Lin, et al. Analysis of chemical constituents in *Eucommia ulmoides* Oliv. by UPLC-PDA-ESI-MS [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(3): 59-62
- [12] LUO Xu-biao, MA Ming, CHEN Bo, et al. Analysis of nine bioactive compounds in *Eucommia ulmoides* Oliv. and their preparation by HPLC photodiode array detection and mass spectrometry [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2004, 27(1): 63-81
- [13] Ding Y, Dou D, Guo Y, et al. Simultaneous quantification of eleven bioactive compounds of male flowers of *Eucommia ulmoides* Oliver by HPLC and their quality evaluation by chemical fingerprint analysis with hierarchical clustering analysis [J]. Pharmacognosy Magazine, 2014, 10(40): 435-440
- [14] 李钦,杜红岩,杜兰英,等.HPLC 法测定杜仲雄花和杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸和京尼平苷[J].中草药,2009,40(1):71-72  
LI Qin, DU Hong-yan, DU Lan-ying, et al. Determination of geniposide, chlorogenic acid and geniposide in *Eucommia* flower and *Eucommia* flower tea by HPLC [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2009, 40(1): 71-72
- [15] 郑阳.杜仲叶中杜仲醇的提取纯化及表征[D].吉首:吉首大学,2016  
ZHENG Yang. Study on Extraction, purification and characterization of eucommol from leaves of *Eucommia*



- ulmoides* Oliv [D]. Jishou: Jishou University, 2016
- [16] Wang J L, Liu E W, Shuai W U, et al. Development of HPLC method to evaluate drug-processing technique of *Eucommia ortex* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2011, 3(3): 221-225
- [17] XIAO Jian-bo, WEI Xin-lin, WANG Yuan-feng. Extraction and determination of major hypotensive compounds in bark of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Archives of Biological Sciences, 2009, 61(4): 811-817
- [18] 江春艳,许激扬,卞筱泓,等.杜仲降血压成分的组合及血管舒张作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):218-220  
JIANG Chun-yan, XU Ji-yang, BIAN Xiao-hong, et al. Composition of hypotensive components and vasodilation of *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2010, 16(6): 218-220
- [19] 许激扬,赵芳,卞筱泓,等.杜仲降压组分对大鼠胸主动脉的舒张作用[J].药物生物技术,2009,16(4):338-341  
XU Ji-yang, ZHAO Fang, BIAN Xiao-hong, et al. Vasodilation effect of antihypertensive components from *Eucommia ulmoides* Oliv. on isolated rats thoracic aorta [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2009, 16(4): 338-341
- [20] Kwan C Y, Chen C X, Deyama T, et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action [J]. Vascular Pharmacology, 2003, 40(5): 229-235
- [21] 张全喜,孟紫强.内源性气态SO<sub>2</sub>对血管的舒张作用及其机制:细胞离子通道的作用[J].生态毒理学报,2008,3(6):558-562  
ZHANG Quan-xi, MENG Zi-qiang. The vasorelaxant effect of endogenous gaseous sulfur dioxide on aortic rings and its mechanism: involvement of ion channels [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(6): 558-562
- [22] 张子东,付冬梅,张威鹏,等.HPLC法同时测定不同生长年限不同部位杜仲中5种苯丙素类成分[J].食品科学,2019,40(8):186-191  
ZHANG Zi-dong, FU Dong-mei, ZHANG wei-peng, et al. Simultaneous determination of five phenylpropanoids in *Eucommia ulmoides* Oliv. from different ages and different parts by HPLC [J]. China Academic Journal Electronic Publishing House, 2019, 40(8): 186-191
- [23] Nakamura T, Nakazawa Y, Onizuka S, et al. Twelve phenolics from leaves of *Eucommia ulmoides* [J]. Natural Medicines, 1998, 1: 52
- [24] 齐武强,王明昭.杜仲叶和杜仲皮中化学成分的比较[J].临床医学研究与实践,2017,2(11):121-122,124  
QI Wu-qiang, WANG Ming-zhao. Comparison of chemical composition for *Eucommia ulmoides* and *Eucommia folium* [J]. Clinical Research and Practice, 2017, 2(11): 121-122, 124
- [25] 左月明,张忠立,李于益,等.杜仲叶木脂素类化学成分研究[J].时珍国医国药,2014,6:1317-1319  
ZUO Yue-ming, ZHANG Zhong-li, LI Yu-yi, et al. Study on the chemical components of lignans of folium *Eucommia* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2014, 6: 1317-1319
- [26] 戚向阳,陈维军,张声华.杜仲中双环氧木脂素二糖苷分离纯化技术的研究[J].林产化学与工业,2005,25(4):47-50  
QI Xiang-yang, CHEN Wei-jun, ZHANG Sheng-hua. Study on method of isolation and purification of bisepoxylignans in *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2005, 25(4): 47-50
- [27] 方宁.杜仲叶提取物及其单体槲皮素、(+)-丁香脂素抑制BMSCs成脂分化研究[D].南昌:南昌大学,2014  
FANG Ning. Study on extract of *Eucommia ulmoides* leaves and its monomer quercetin and (+)-syringic inhibit the adipogenic differentiation of BMSCs [D]. Nanchang: Nanchang University, 2014
- [28] Deyama T, Ikawa T, Kitagawa S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. IV [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(2): 4933
- [29] 李锷,郝志友,张翠利,等.杜仲化学成分研究[J].中药材,2016,9:2016-2018  
LI Kun, HAO Zhi-you, ZHANG Cui-li, et al. Chemical constituents from *Eucommia ulmoides* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 9: 2016-2018
- [30] 吕沅珊,李棣华,刘俊红.HPLC-ELSD法测定杜仲中绿原酸和鹅掌楸苷[J].现代药物与临床,2013,28(3):344-346  
LYU Yuan-shan, LI Di-hua, LIU Jun-hong. Determination of chlorogenic acid and liriiodendrin in *Eucommia* by HPLC-ELSD [J]. Drugs & Clinic, 2013, 28(3): 344-346
- [31] 薛毅.统计建模与R软件[M].北京,清华大学出版社,2007  
XUE Yi. Statistical Modeling and R Software [M]. Beijing, Tsinghua University Press, 2007
- [32] 张留记,李宁,屠万倩,等.HPLC法同时测定杜仲叶中8种成分的含量[J].中国药房,2019,30(24):3383-3387  
ZHANG Liu-ji, LI Ning, TU Wan-qian, et al. Simultaneous determination of 8 components in *Eucommia ulmoides* leaves by HPLC [J]. China Pharmacy, 2019, 30(24): 3383-3387