

采用滤袋技术快速测定杜仲叶片中杜仲胶含量

刘慧东^{1,2}, 马志刚^{1,2,3}, 朱景乐^{1,2,3}, 伊 焕⁴, 杜红岩^{1,2,3}, 孙志强^{1,2,3*}

¹国家林业局泡桐研究开发中心, 郑州 450003; ²中国林科院经济林研究开发中心, 郑州 450003;

³国家林业局杜仲工程技术研究中心, 郑州 450003; ⁴商丘市梁园区林业局, 商丘 476000

摘要: 采用滤袋技术依据减重法原理测定了杜仲叶片中杜仲胶含量。通过正交设计比较了不同滤袋孔径、样品量和提取时间对提取效果的影响, 并采用该方法比较了同一产地不同品种、同一品种不同产地的杜仲叶中胶含量的差异。结果表明, 不同孔径的提取效果差异显著 ($F = 3.685, p = 0.043$), 样品量和提取时间对提取效果无显著影响。适宜的测定条件是样品量 0.1 g、滤袋孔径 25 μm /10 μm 、提取时间 60 min。滤袋法测得的‘华仲 6 号’胶含量为 4.49%, 传统碱煮法为 3.64%。同一产地不同品种、同一品种不同产地的杜仲叶中胶含量差异极显著 ($F = 92.689, P = 0.001$), 其中郑州的‘华仲 11 号’含量最高, 平均为 7.00%, 灵宝的‘华仲 12 号’含量最低, 为 4.28%。生产杜仲胶的原料应标明品种、产地以及树龄, 这样有助于合理评估预期产量和生产成本。

关键词: 杜仲; 杜仲胶含量; 提取率; 减重法; 滤袋技术

中图分类号: S792.99

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.006

Fast Determination of Eucommia Rubber Content in *Eucommia ulmoides* Leaves Using Filter Bag Technology

LIU Hui-dong^{1,2}, MA Zhi-gang^{1,2,3}, ZHU Jing-le^{1,2,3}, YI Huan⁴, DU Hong-yan^{1,2,3}, SUN Zhi-qiang^{1,2,3*}

¹Paulownia R&D Center of China, Chinese Academy of Forestry CAF, Henan Zhengzhou 450003, China;

²Non-timber Forest R&D Center, CAF, Henan Zhengzhou 450003, China; ³Eucommia

Engineering Research Center of State Forestry Administration, Henan Zhengzhou 450003, China;

⁴Forestry Bureau of Liangyuan District of Shangqiu, Henan Shangqiu 476000, China

Abstract: Based on weight lost method, filter bag technology (FBT) was applied to determine rubber content in *Eucommia ulmoides* leaves. An orthogonal design was applied to compare the effect of filter bag aperture, sample weight and extraction time on extraction efficacy. The rubber content in leaves from different clones and the same clone planted in different sites were then compared using FBT. Results indicated that rubber content varied significantly among different filter bag apertures ($F = 3.685, p = 0.043$), while it was not impacted significantly by sample weight and extraction time. The optimal condition for determining rubber content was 25 μm or 10 μm of filter bag aperture with 0.1 g of sample weight and 60 min of extraction time. The rubber content of ‘Huazhong 6’ was 4.49% by filter bag method, higher than 3.64% by traditional Soxhlet’s extraction. The rubber content in leaves from different clones and the same clone planted in different sites varied significantly ($F = 92.689, P = 0.001$). The highest rubber content of 7.00% was found in leaves of ‘Huazhong 11’ collected from Zhengzhou, while the lowest of 4.28% was from ‘Huazhong 12’ growing in Lingbao. Raw materials for Eucommia rubber industrialization were strongly recommended to be marked by Eucommia clone’s name, its place of origin and its age, which would be conducive for manufacturing enterprise to reasonably assess the expected rubber yield and production cost.

Key words: *Eucommia ulmoides*; Eucommia rubber content; extraction rate; weight lost method; filter bag technology

杜仲胶 (Eucommia rubber), 又被称为古塔波胶 (*Gutta-Percha*) 或巴拉塔胶, 是由我国特有的国家二

级保护树种杜仲 (*Eucommia ulmoides*) 器官中的含胶细胞合成的一种天然高分子化合物^[1-4]。杜仲胶以固态形式广泛分散分布于杜仲叶、树皮、根皮及果皮的薄壁细胞和韧皮部中, 相对含量较低^[3]。长期以来, 关于杜仲器官中杜仲胶的含量多是基于采用以甲苯、石油醚等有机溶剂的索氏提取法得到的提取

收稿日期: 2015-11-18 接受日期: 2016-01-26

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划 (2012BAD21B0502)

* 通讯作者 E-mail: zq_sun@paulownia.ac.cn

率来表述的。大多数文献认为杜仲胶在杜仲叶中含量为 1.5% ~ 4.2%、杜仲树皮和根皮中 6% ~ 10%、杜仲果皮中 13% ~ 17%^[1,2,5,9]。

近年来的研究表明,杜仲胶在杜仲不同器官中实际含量可能更高,譬如有学者发现杜仲果皮中的杜仲胶含量甚至可以达到自身干重的 30%^[10]。以杜仲叶片为例,早期的测量方法多是采用索氏提取,以实测法测量提取的杜仲胶的量,以提取率来表征杜仲胶的含量,提取率从 1% ~ 3% 不等^[6,11-14]。Takeno S 等采用傅里叶变换红外光谱和裂解气相色谱/质谱法测得杜仲叶片(2006 年 10 月采集,日本九州大学)中胶含量平均在 3.73% ~ 4.03%,与之对应的索氏提取法测得的含胶量为 4.01%^[15]。近期我国学者采用超微粉碎结合索氏提取从杜仲叶片(产自河南汝阳)中获得质量分数 99% 的杜仲胶,经测算其杜仲胶含量达 8%^[16]。

Takeno S 等并未像前期的研究那样直接测量提取的杜仲胶的量,而是通过测量剩余残渣的量,即通过减重法来估测提取出的杜仲胶量,这样就避免了杜仲胶在溶出后的过滤和沉淀过程中的损失^[15]。因此,在表述杜仲胶含量的概念方面,提取率很可能会低于其实际含量;而减重法测得的结果会更接近甚至稍高于其真实含量。近年来的研究表明,在实验室条件下,影响杜仲胶提取率的主要因素包括原料被粉碎的颗粒度大小及来自组织中色素、脂肪和其他一些次生代谢物的干扰。颗粒度越小表示原料的比表面积越大,可以使有机溶剂与细胞中的杜仲胶充分接触,提高杜仲胶的溶出率,进而提高整体提取率^[16]。另一方面,杜仲胶分散分布于薄壁细胞和韧皮部中^[3],构成薄壁细胞壁的木质纤维素不溶于石油醚,但细胞中的色素和其他次生代谢物会随着石油醚回流过程被溶解;因此,去除这些易溶解性物质也是提高杜仲胶提取效率和尽可能准确反映杜仲胶含量的前提保证。Takeno S 等在提取过程中,首先对样品采用乙醇进行高温消煮,这一过程去除了绝大部分影响杜仲胶含量的干扰物质。因此,他们测得的叶片中杜仲胶含量较大多数文献记载的有所提高^[5,12,15]。同时,不同的检测方法已证明,通过石油醚等有机溶剂经索氏提取获得的杜仲叶片中杜仲胶的分子量在 1×10^3 到 2×10^6 之间^[16,17],说明了这种提取工艺的科学性和有效性。另外, Takeno S 等对采自我国陕西杨凌的杜仲优良品种的测定发现,10 月的叶片中胶含量在 4% ~ 7% 之间^[15],说明

不同品种在同一产地其叶片中杜仲胶含量存在较大的差异^[18]。

准确测定杜仲器官中杜仲橡胶含量对其产业化开发中提取效率以及综合成本核算具有重要的参考价值;同时,开发一种简便、快速、准确的测量方法可用于界定高含量杜仲胶新品种的选育,尤其是当样本量大时,简便易行的测量方法能够大大提高工作效率。

滤袋技术(Filter Bag Technology, FBT)是一种简便易行和高效准确的分析技术。该项技术主要应用于饲料和食品中粗纤维、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维以及脂肪的测定^[19]。其基本原理是采用减重法,即采用浸提溶剂将所测定的成分与其他非测定成分分离,并通过测定剩余的非测定成分从而间接得出所测定成分的含量。有研究证实,以减重法原理采用滤袋技术可替代国标法检测饲料中粗纤维、脂肪以及植物种子含油量,且工作效率可成倍提高^[20]。

目前尚未见根据减重法采用滤袋技术测定杜仲胶含量的相关研究和报道。为此,本文以杜仲 1a 实生苗、杜仲新品种‘华仲 6 号’(*E. ulmoides* ‘Huazhong 6’)、‘华仲 11 号’(*E. ulmoides* ‘Huazhong 11’)和‘华仲 12 号’(*E. ulmoides* ‘Huazhong 12’)的叶片为研究对象,采用微孔滤袋定量装填样品,以索氏提取技术并依据减重法原理,通过正交设计比较了不同滤袋孔径、不同样品量及不同提取时间对提取效果的影响,探索了快速测量叶片内杜仲胶含量的方法;并进一步比较了不同品种以及同一品种在不同立地条件下的杜仲胶含量的差异。

1 材料与方 法

1.1 测试样品采集

1a 生杜仲实生苗叶片于 2015 年 7 月采自国家林业局泡桐研究开发中心试验基地(河南原阳),‘华仲 6 号’和‘华仲 11 号’(亦称小叶杜仲)于 2015 年 7 月采自国家林业局泡桐研究开发中心(郑州),‘华仲 12 号’(红叶杜仲)分别于 2015 年 8 月采自河南灵宝,原阳和山东青州,其中灵宝的叶片采自 15 年生大树,原阳和青州的叶片均为 3a 生的嫁接幼树,其接穗来自灵宝的同一批大树。叶片经冷冻干燥(LABCONCO 冻干机)后备用。

1.2 适宜滤袋孔径和测定条件的确定

根据笔者的预实验及参考文献^[6-8],按 $L_9(3^3)$ 正交表安排实验探索滤袋孔径、样品重量和提取时

间对提取效果的影响(表1)。滤袋(ANKON公司,美国)型号和孔径分别为F57(25 μm)、F58(10 μm)、XT4(3 μm)。

操作步骤如下:定量称取干燥叶片(m_1),揉碎,料液比按 $w:v=1:10$ (g/mL) 加入 10% NaOH,置于恒温磁力搅拌器(HJ-3)上于 50 °C 搅拌浸煮 3 h;筛洗后干燥,称重(m_2),粉碎后过 60 目筛^[17];按照表 1 所示,先将滤袋干燥至恒重,称重(m_3),定量称取叶粉(精确到 0.0001 g)装袋(合计重量 m_4),滤袋用封口机(PFS-200/300/400型)封口,每个重量样

品重复 3 次。封口后滤袋置于烧杯中,加入 1% HCl + 65% 乙醇液,置于摇床上 120 rpm 浸泡 65 min,然后置于数控超声波清洗器(HT-300BQ)中,频率 40 kHz 超声洗涤 40 min,更换盐酸乙醇液并重复超声洗涤 2 次,至洗涤液无色;取出滤袋干燥后称重(m_5)。随后采用 60 ~ 90 °C 沸程石油醚 90 °C 索氏提取,按照设计的提取时间及时取出滤袋,同时用热石油醚清洗滤袋 2 ~ 3 次,干燥至恒重后称重(m_6)。

$$\text{杜仲胶含量} = m_2 / m_1 \times (m_5 - m_6) / (m_4 - m_3) \times 100\% \quad (1)$$

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

| 水平 Level | 因素 Factor | | |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------|
| | (A)样品量 Sample weight (g) | (B)滤袋孔径 Filter bag aperture (μm) | (C)提取时间 Extraction time (min) |
| 1 | 0.1 | 25 | 60 |
| 2 | 0.3 | 10 | 120 |
| 3 | 0.5 | 3 | 180 |

1.3 滤袋法与传统碱煮法测量工艺流程与提取效果比较

1.3.1 滤袋法

定量称取‘华仲 6 号’干燥叶片(m_1),揉碎,料液比按 $w:v=1:10$ (g/mL) 加入 10% NaOH,置于磁力搅拌器上于 50 °C 搅拌浸煮 3 h;筛洗后干燥,称重(m_2),粉碎后过 60 目筛^[17];先将滤袋干燥至恒重,称重(m_3),定量称取叶粉 0.5 g (精确到 0.0001 g)装袋(合计重量 m_4),封口,加入沸程为 60 ~ 90 °C 的石油醚,90 °C 回流 120 min;取出滤袋,用 50 mL 热溶剂冲洗,干燥至恒重称重 m_5 ;滤袋内为杂质。

$$\text{杜仲胶含量}\% = m_2 / m_1 \times (m_4 - m_3 - m_5) / (m_4 - m_3) \times 100\% \quad (2)$$

1.3.2 传统碱煮法

定量称取干燥叶片(m_1),揉碎,料液比按 $w:v=1:10$ 加入 10% NaOH,置于磁力搅拌器上于 50 °C 搅拌浸煮 3 h;筛洗后干燥,称重(m_2),粉碎后过 60 目筛。每样称取 5 g 叶粉并重复 3 次,记重 m_3 (精确到 0.0001 g)按 1:10 (g:mL) 加入沸程为 60 ~ 90 °C 的石油醚,90 °C 回流提取 2 h,待溶解完成后继续回流 0.5 h。之后趁热用 100 目或 120 目金属丝网过滤于 500 mL 烧杯中,并用 50 mL 热溶剂冲洗烧瓶和滤网,得杜仲胶石油醚溶解液。合并滤液,待冷却后缓慢加入两倍体积的无水乙醇,同时进行搅拌,

直至无沉淀生成,取出少量溶液加入无水乙醇检验有无沉淀继续生成,直至无沉淀生成,静置 2 h 后过滤。

慢速定量滤纸预先经石油醚长时间浸泡,在 40 °C 真空干燥箱中恒重备用。取备用滤纸于 90 mm 漏斗中,先将含胶沉淀溶液上层过滤,最终把烧杯中的沉淀用装入洗瓶的无水乙醇全部冲洗进滤纸中。然后用镊子小心将有杜仲胶沉淀的滤纸转移到干净的烧杯中,小心操作,不要让杜仲胶沉淀固体洒落到滤纸外。将有滤纸的烧杯置于真空干燥箱中,在 40 °C 条件下干燥至恒重。减去滤纸原来恒重的质量既得杜仲胶的质量。

$$\text{杜仲提取率}\% = \text{杜仲胶重量} / \text{样品重量} \times 100\% \quad (3)$$

1.3.3 杜仲胶纯度测定

将 1.3.2 步骤中提取获得的杜仲胶冷冻干燥,粉碎后定量称取 0.2 g (m) (精确到 0.0001 g) 装入已干燥称重的滤袋,合计重量(m_1),重复索氏提取步骤,提取完毕后用热石油醚洗涤滤袋 2 次,干燥至恒重后称重(m_2)。

$$\text{杜仲胶纯度}\% = (m_1 - m_2) / m \times 100\% \quad (4)$$

1.4 品种及产地对含胶量的影响

将干燥后的‘华仲 11 号’和‘华仲 12 号’叶片分别粉碎后过 60 目筛。选取在 1.3 中效果最好的滤袋干燥至恒重,称重(m_1),定量称取叶粉 0.1 g ~

0.3 g(精确到 0.0001 g) (m_2) 装袋,滤袋用封口机封口,每个样品重复 3 次。用 1% HCl + 65% 乙醇将样品置于烧杯中,放于摇床上浸泡 65 min,然后置于超声清洗器中,频率 40 kHz 超声洗涤 40 min。干燥后称重(m_3),先用 30 ~ 60 °C 沸程石油醚浸提 2 h,取出干燥后称重(m_4),然后用 60 ~ 90 °C 沸程石油醚浸提 2 h,回流结束时用热石油醚洗涤 2 ~ 3 次,干燥至恒重,称重(m_5)。

$$\text{杜仲胶含量} = (m_4 - m_5) / m_2 \times 100\% \quad (5)$$

1.5 统计与分析

采用 SPSS 软件(17.0 版)进行数据分析,用正交方差分析($P < 0.05$)比较各因素水平的杜仲胶含量的差异性,并对差异显著的因素进行多重比较,分析不同因素水平对杜仲胶测定效率的影响,并找出最佳组合。采用单因素方差分析($P < 0.05$)对传统碱煮法和微孔滤袋法的提取结果的差异性,比较两种方法的均值和相对标准偏差率。均值反映提胶的效率,相对标准偏差率可反映出测定效果稳定性。

采用单因素方差分析($P < 0.05$)检验不同品种及同一品种不同产地的杜仲叶的胶含量的差异性并对差异显著的结果进行 Duncan 多重比较。最后,综合比较传统提取技术和滤袋技术的工艺步骤和效率的差异。

2 结果与分析

2.1 滤袋孔径对提取效果的影响

正交实验结果如表 2 所示,方差分析的各项统计结果见表 3、4、5。从表 3 中明显可以看出,样品量、提取时间对杜仲叶胶含量的提取没有显著的影响($P > 0.05$),而滤袋孔径间的测定结果差异显著($F = 3.685, p = 0.043$)。滤袋孔径的单因素统计量表(表 4)和配对比较表(表 5)显示, A_1 、 A_2 均值最大,均为(2.8%),且与 A_3 (2.3%)有显著差异。由以上结果表明,最佳测定工艺为 $A_1B_1C_1$ 及 $A_1B_2C_1$,即样品量为 0.1 g、滤袋孔径为 F57(25 μm) / F58(10 μm)、提取时间为 60 min。

表 2 正交实验方案及结果

Table 2 Scheme and results of orthogonal experiment

| 编号 No. | A | B | C | x_1 | x_2 | x_3 |
|-----------|---|---|---|----------|----------|----------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 0.030537 | 0.036473 | 0.023084 |
| 2 | 1 | 2 | 3 | 0.024435 | 0.043958 | 0.02573 |
| 3 | 1 | 3 | 2 | 0.018938 | 0.014041 | 0.020588 |
| 4 | 2 | 1 | 3 | 0.025132 | 0.036635 | 0.024653 |
| 5 | 2 | 2 | 2 | 0.024975 | 0.029483 | 0.036111 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 0.033796 | 0.025127 | 0.019858 |
| 7 | 3 | 1 | 2 | 0.023603 | 0.027694 | 0.022808 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 0.019169 | 0.02495 | 0.026896 |
| 9 | 3 | 3 | 3 | 0.019988 | 0.017655 | 0.022447 |

表 3 SPSS 方差分析数据表

Table 3 Data table of ANOVA variance analysis

| 源 Source | III 型平方和 Square sum | df | 均方 Mean square | F | Sig |
|------------------------------|------------------------|----|-------------------|-------|-------|
| (A) 样品量 Sample weight | 0.000 | 2 | 0.00007 | 1.959 | 0.167 |
| (B) 滤袋孔径 Filter bag aperture | 0.000 | 2 | 0.00000 | 3.685 | 0.043 |
| (C) 提取时间 Extraction time | 0.00004 | 2 | 0.00002 | 0.482 | 0.624 |
| 误差 Error | 0.001 | 20 | 0.00004 | | |
| 总计 Total | 0.019 | 27 | | | |
| 校正的总计 Total correction | 0.001 | 26 | | | |

表 4 单因素计量表
Table 4 Single factor table

| (B) 滤袋孔径 Filter bag aperture | 均值 Mean | 标准误 Standard error |
|---------------------------------|------------|-----------------------|
| 1 | 0.028 | 0.02 |
| 2 | 0.028 | 0.02 |
| 3 | 0.021 | 0.02 |

表 5 成对比较
Table 5 Paired comparison

| (I) 滤袋孔径 B Filter bag aperture | (J) 滤袋孔径 B Filter bag aperture | 均值差值 (I-J) Mean difference | 标准误差 Standard error | Sig |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------|-------|
| 1 | 2 | 0 | 0.003 | 0.846 |
| | 3 | .006 * | 0.003 | 0.036 |
| 2 | 1 | 0.001 | 0.003 | 0.846 |
| | 3 | .007 * | 0.003 | 0.024 |
| 3 | 1 | -.006 * | 0.003 | 0.036 |
| | 2 | -.007 * | 0.003 | 0.024 |

2.2 滤袋法与传统碱煮法测量效果比较

滤袋法测定‘华仲 6 号’杜仲胶含量平均为 4.49%，高于传统碱煮法 3.64% 的平均提取率（表 6）。而传统碱煮法提取胶得率的相对标准偏差率（36.30%）是滤袋法（0.4%）的约 90 倍，说明了滤

袋法产生的偶然误差小，稳定性高。随后，采用滤袋对碱煮法提取的杜仲胶的纯度进行测定，其纯度平均为 97%（表 6），表明采用滤袋技术通过索氏法测定杜仲胶纯度是可行的。

表 6 传统碱煮法与微孔滤袋法的提胶结果比较 (Mean ± SD)

Table 6 Comparison of rubber content between filter bag method and traditional Soxhlet extraction (Mean ± SD)

| | 传统碱煮法/质量分析 Traditional Soxhlet extraction/quality analysis | 微孔滤袋法/质量分析 Filter bag method/ quality analysis | 索氏提取法/纯度分析 Traditional Soxhlet extraction/purity analysis |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 杜仲胶含量 Rubber content (%) | 3.64 ± 1.32 | 4.49 ± 0.02 | 97 ± 0.60 |
| 相对标准偏差 Relative standard deviation (%) | 36.30 | 0.4 | 0.6 |

2.3 不同品种、不同产地杜仲叶中胶含量的测定

同一产地不同品种及同一品种不同产地间杜仲叶的杜仲胶含量差异极显著 ($F = 92.689, P = 0.001$) (表 7)。其中‘华仲 11 号’的胶含量最高，平均为 7.00%，与青州的‘华仲 12 号’的胶含量（6.68%）没有明显差异，但显著高于产自灵宝的‘华仲 12 号’和产自原阳的‘华仲 12 号’。灵宝‘华仲 12 号’叶的杜仲胶含量最低，为 4.28%，与其他几种杜仲叶的杜仲胶含量差异显著。而青州‘华仲 12 号’胶含量与‘华仲 11 号’和原阳‘华仲 12 号’均没有显著差异。

2.4 传统提取工艺与滤袋技术测量工艺的比较

图 1 比较了传统碱煮法测定杜仲胶提取率和滤袋技术测定杜仲胶含量的工艺差别。传统提取方法测定时，所需要的样品量较大，甚至达到 100 g 或更高^[7,8]，滤袋法所需样品量在 0.1~0.5 g 之间，对于批量测定来说具有明显的优势。采用滤袋测定时，在预处理步骤上，分别采用了碱煮和直接去除色素，从实验结果看，两者差别不显著；而直接去除色素在步骤上更简洁，这一点与 Takeno S 等^[15]的结果相符。整体操作步骤上，滤袋技术避免了后续诸如沉淀、过滤等繁琐步骤所带来的损失。笔者在实验过

表7 不同品种及产地的杜仲胶含量 (Mean ± SD)

Table 7 Rubber content in leaves from different clones and the same clone of different sites (Mean ± SD)

| 品种及产地 Species (place of origin) | 华仲 11 号(郑州) Huazhong 11 (Zhengzhou) | 华仲 12 号(灵宝) Huazhong 12 (Lingbao) | 华仲 12 号(青州) Huazhong 12 (Qingzhou) | 华仲 12 号(原阳) Huazhong 12 (Yuanyang) |
|---------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| 含量 Rubber content (%) | 7.00 ± 0.30a | 4.28 ± 0.17c | 6.68 ± 0.26ab | 6.30 ± 0.76bc |
| 相对标准偏差 Relative standard deviation | 4.32 | 4.01 | 3.87 | 1.20 |

注:字母相同者表示差异不显著。

Note: Data in the same row with same letter indicated no significant difference.

程中测定的附着在滤网和烧杯壁上的杜仲胶高的会
占总提取量的 46%。同时,滤袋法不需要用大型仪

器设备,具有操作简便易行、易于掌握的优点,有利
于产业化过程中对原材料品质的估测。

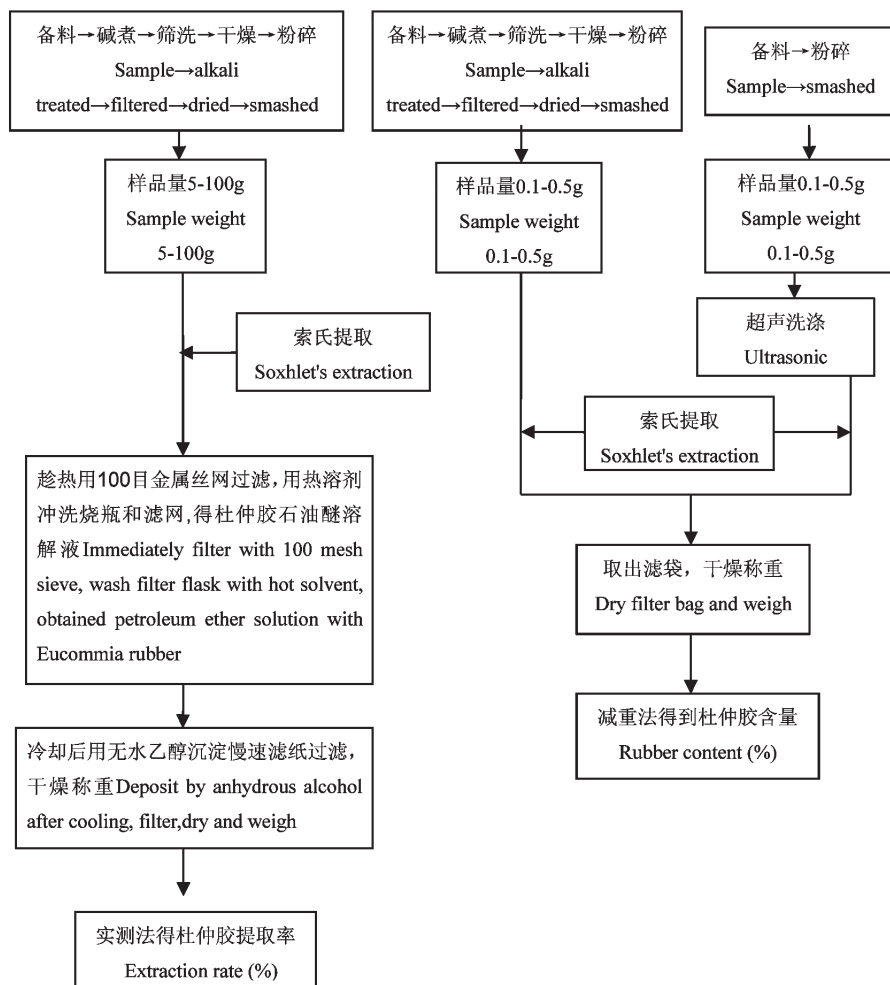


图1 传统提取方法和滤袋测量方法操作工艺比较

Fig. 1 Comparison of operational process of traditional extraction method and filter bag method

3 讨论与结论

本文采用减重法测定原理,首次利用滤袋技术测定杜仲叶片中杜仲胶的含量。正交实验结果表明,滤袋孔径是影响测定结果的主要因素,提取时间和样品量对提取效果没有影响,这与梁宁宁等^[16]的

报道一致。‘华仲6号’叶片的测定结果与 Takeno S 等^[15]采用傅里叶变换红外光谱和裂解气相色谱/质谱法测得的结果十分接近,且高于碱煮后的索氏法得到的杜仲胶提取率,说明该方法的测定结果是可信的。滤袋法测量数据的相对标准偏差率小于1%,表明该方法的稳定性极高。针对杜仲优良品种

‘华仲 11 号’和‘华仲 12 号’,参照 Takeno S 等^[15]去除色素等可溶性物质后的测定结果显示,‘华仲 11 号’叶片中胶含量平均达 7%;尽管梁宁宁等^[16]未说明其杜仲样品是否为优良品种,但两者的结果十分接近。

Takeno S 等^[16]和张付远^[18]的研究均证实不同杜仲品种在相同立地条件下,叶片中杜仲胶含量存在较大的差异。本研究结果一方面印证了上述结论,如同一产地的‘华仲 6 号’与‘华仲 11 号’杜仲胶含量存在差异(参见表 6 和表 7);另一方面,本研究结果表明同一品种,即‘华仲 12 号’在不同立地条件下的胶含量也存在显著差异(表 7)。

综上所述,根据减重法原理采用滤袋技术快速测量杜仲器官中杜仲胶含量较传统按杜仲胶提取率的结果更加接近于真实。实际操作中,推荐滤袋孔径为 25 μm 和 10 μm 的滤袋,样品量 0.1 ~ 0.5 g,索氏提取 60 min。本方法可广泛用于评估杜仲胶产业原材料的质量,测定杜仲胶的纯度;在高含量杜仲胶新品种选育方面,亦可用于大样本量的快速检测和比较。对未来杜仲胶产业而言,建议将原料初步测量后,应标明品种、产地以及树龄,这样有助于生产企业合理评估预期产量和生产成本。

参考文献

- 1 Dian XL(田兰馨), Hu ZH(胡正海). Study on the morphology and distribution of *Eucommia* rubber wire. *J Northwest Univ, Nat Sci* (西北大学学报, 自科版), 1983, S(1): 10-13.
- 2 Li FD(李芳东), Du HY(杜红岩). *Eucommia ulmoides* Oliv. Beijing: Chinese Medicine Press, 2001. 232-256.
- 3 Nakazawa Y, Takeda T, Suzuki N, et al. Histochemical study of trans-polyisoprene accumulation by spectral confocal laser scanning microscopy and a specific dye showing fluorescence solvatochromism in the rubber-producing plant, *Eucommia ulmoides* Oliver. *Planta*, 2013, 238: 549-560.
- 4 Yan RF(严瑞芳). Development and application of *Eucommia* rubber. *Rubber Sci Technol* (橡胶科技), 2010, 8(10): 9-13.
- 5 Xie BX(谢碧霞), Dong HY(杜红岩), Du LY(杜兰英), et al. Variations of Gutta Percha concent in Samara from different *Eucommia ulmoides* forms. *Sci Silv Sin* (林业科学), 2005, 1: 144-146.
- 6 Lu ZK(陆志科), Xie BX(谢碧霞), Du HY(杜红岩). Study on extraction method of *Eucommia* rubber. *J Fujian Coll Forest* (福建林学院学报), 2004, 24: 353-356.

- 7 Ma BL(马柏林), Liang SF(梁淑芳). Study on extraction *Eucommia* rubber with gummy method. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1996, 8: 79-82.
- 8 Ouyang H(欧阳辉), Yu J(余佶), Li JH(李继华), et al. Extraction of rubber from the seed shells of *Eucommia ulmoides*. *J Northwest For Univ* (西北林学院学报), 2009, 24: 160-162.
- 9 Du HY, Li FD, Sun ZQ, et al. Gutta-percha research associated with *Eucommia ulmoides* Oliv. *Acta Horticult*, 2008, 769: 509-514.
- 10 Nakazawa Y, Bamba T, Takeda T, et al. Production of *Eucommia*-rubber from *Eucommia ulmoides* Oliv. (Hardy Rubber Tree). *Plant Biotechnol*, 2009, 26(1): 71-79.
- 11 Chen ZB(陈增波). The extraction method from *Eucommia ulmoides* leaf or back. CN86100216, 1987-11-26.
- 12 Zhai WH(翟文慧), Tian XL(田秀兰), Wang JC(王景春). Comprehensive extraction method of *Eucommia* rubber. CN1054985, 1991-10-02.
- 13 Yang ZT(杨振堂), Zang P(臧埔), Zhao JH(赵景辉). The introduction and extraction method of *Eucommia ulmoides* callus. CN1252215, 2000-05-10.
- 14 Wang JL(王俊丽). Study on *Eucommia ulmoides*. Baoding: Hebei University Press, 2001.
- 15 Takeno S, Bamba T, Nakazawa Y, et al. Quantification of trans-1, 4-polyisoprene in *Eucommia ulmoides* by fourier transform infrared spectroscopy and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105: 355-359.
- 16 Liang NN(梁宁宁), Wang YW(王颖悟), Xin ZX(辛振祥), et al. The *Eucommia* rubber by superfine grinding extraction method and its structure analysis. *China Rubber Ind* (橡胶工业), 2015, 62(1): 53-56.
- 17 Guo T, Liu Y, Wei Y, et al. Simultaneous qualitation and quantitation of natural trans-1, 4-polyisoprene from *Eucommia ulmoides* Oliver by gel permeation chromatography (GPC). *J Chromatogr B*, 2015, 1004(1): 17-22.
- 18 Zhang FY(张付远). Study on dynamic changes of content and molecular weight of *Eucommia ulmoides* gum in leaves. Yangling: Northwest Agricultural and Forestry University (西北农林科技大学), MSc. 2008.
- 19 Komarek AR, Komarek RJ. Method for determining the fat content of feed, food, and other materials utilizing filter media encapsulation. USP6184039, 2001.
- 20 Zhang S(张森), Zhang YY(张媛媛), Su YC(苏宇辰), et al. Influence of feed size and distribution for determination of crude fiber by the national standard method and filter bag method and the difference of the two methods. *Cereal Feed Ind* (粮食与饲料工业), 2015, 9: 62-66.