

# 一测多评法结合指纹图谱对杜仲质量控制的研究

林芳<sup>1</sup>, 王云红<sup>2</sup>, 万丽<sup>1</sup>, 杨荣平<sup>2,3\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065;  
3. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

**[摘要]** 目的: 建立杜仲多指标 HPLC 指纹图谱, 并应用一测多评法对药材中松脂醇二葡萄糖苷(PDG)、绿原酸(CA)、京尼平苷酸(PA)的含量同时进行测定。方法: 采用 Welchrom™ C<sub>18</sub> 110A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.3% 冰醋酸进行梯度洗脱, 柱温 20 ℃, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 238 nm, 以松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸、京尼平苷酸和京尼平苷(GP)为指标性成分建立杜仲药材的指纹图谱。以绿原酸为参照内标, 通过相对校正因子对松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸、京尼平苷酸进行含量测定。结果: 建立了杜仲多指标 HPLC 指纹图谱, 标定了 12 个共有指纹峰。对杜仲中 3 个成分用一测多评法进行了测定, 其计算值与外标法实测值之间没有明显差异。结论: 建立了杜仲药材多指标 HPLC 指纹图谱和一测多评法对松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸、京尼平苷酸进行同时测定的方法, 该方法简便可行, 为更全面合理科学地对杜仲药材质量的评价提供了技术支撑。

**[关键词]** 杜仲; 一测多评; 多指标指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0078-05

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1211.016.html>

**[网络出版时间]** 2012-05-04 12:11

## Study on the Quality Control of Eucommiae Cortex by Multi-components Quantitation by One Marker Method and Fingerprint

LIN Fang<sup>1</sup>, WANG Yun-hong<sup>2</sup>, WAN Li<sup>1</sup>, YANG Rong-ping<sup>2,3\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. China Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;

3. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**[收稿日期]** 20111227(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(30801546)

**[通讯作者]** \* 杨荣平, 博士, 从事中药新制剂新剂型研究, Tel: 023-89029056, E-mail: rongpingyang18@yahoo.com.cn

本试验根据“SBE 法理论”, 以上述 5 个指标的数据进行标准化处理, 可消除各指标之间由于单位和量纲的不同, 以及各指标变量范围相差悬殊而造成的影响。针对各指标在工艺选择中的主次, 赋予不同的加权系数, 确定综合评判 Y 值的关系式; 以标准化值加权后再求和, 得到综合评判指标值<sup>[4]</sup>, 优选出 SBE 法最佳提取工艺条件。用多指标综合评判方法, 体现了中药药效物质提取中, 坚持“有成分论, 不唯成分论”, 发挥活性混合物综合作用的特点, 同时也有利于用单体成分控制制剂质量。

### [参考文献]

- [1] 桂双英, 郝枝花, 刘道金. 高效液相色谱法测定川芎嗪葡萄糖注射液中盐酸川芎嗪的含量[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21(4): 46.
- [2] 刘放, 黄卫平. 归脾丸中阿魏酸含量测定[J]. 河南中医药学刊, 1996, 11(1): 23.
- [3] 严优芍, 李卫民. HPLC 法测定益母草分散片中盐酸水苏碱的含量[J]. 广东药学院学报, 2006, 22(6): 604.
- [4] 张兆旺. 中药药剂学专论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 68.

[责任编辑 顾雪竹]

**[ Abstract ] Objective:** To establish the multi-indicator HPLC fingerprint of *Eucommiae Cortex* and to determine the contents of geniposidic acid, chlorogenic acid, pinoresinol diglucoside with quantitative analysis of multi-components by single marker. **Method:** Welchrom™ C<sub>18</sub> 110A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used, the mobile phase was consisted of methanol-water-0.3% acetic acid as gradient elution. The column temperature was at 20 °C. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and the fingerprint was detected at 238 nm. Geniposidic acid and chlorogenic acid, pinoresinol diglucoside and geniposide was choosen as marks of ingredients to establish HPLC fingerprint. Using chlorogenic acid as internal reference standard, the contents of geniposidic acid, chlorogenic acid, pinoresinol diglucoside was determined according to the relative correction factor. **Result:** All tested samples contained the 12 common peaks and there was no significant differences between the quantitative results of three ingredients of quantitative analysis of multi-components by single marker method and external standard method. **Conclusion:** The multi-indicator HPLC fingerprint and simultaneous determination of geniposidic acid and chlorogenic acid, pinoresinol diglucoside with quantitative analysis of multi-components by single marker were firstly studied. This method was simple and feasible, which would provide better technique support for the quality control of *Eucommiae Cortex*.

**[ Key words ]** *Eucommiae Cortex*; quantitative analysis of multi-components by single marker; the multi-indicator HPLC fingerprint

杜仲是杜仲科植物杜仲的干燥树皮,是我国特有植物种,是常用的名贵滋补中药材,在我国已有2000多年的临床使用历史。杜仲性甘、温,归肝、肾经,具有补肝益肾、强筋健骨、安胎的功效。

目前杜仲中药材质量控制与品质评价的方法主要有两类:一类是反映杜仲化学成分整体模糊信息的指纹图谱方法,另一类是对杜仲活性成分含量的精确测定。如张德义等<sup>[1]</sup>对杜仲黄酮指纹图谱进行了研究;狄留庆等<sup>[2]</sup>对杜仲炮制前后的指纹图谱进行了研究;伍庆等<sup>[3]</sup>采用高效液相法同时测定了杜仲药材中松脂醇二葡萄糖苷和绿原酸的含量;李伟等<sup>[4]</sup>测定了不同生长年限杜仲皮中桃叶珊瑚苷的含量;戚向阳等<sup>[5]</sup>同时对杜仲中京尼平苷酸、京尼平苷、绿原酸进行了测定。但这些研究并没有将反映杜仲整体模糊信息的指纹图谱与活性成分含量的精确测定结合起来,因而不能全面科学的控制与评价杜仲药材质量;同时,多个活性成分的含量控制,对对照品提出了更高的要求。一测多评法<sup>[6]</sup>的应用,解决了一些对照品制备困难、价格昂贵、不稳定或难以获得的难题。

本实验建立了多指标 HPLC 指纹图谱,对其中4个活性成分进行了标定,并同时采用一测多评法测定了杜仲药材中松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸、京尼平苷酸的含量,实现了一个对照品完成多个成分的含量测定,将指纹图谱技术和一测多评含量测定技术相结合,为杜仲药材质量控制和评价提供更好的技术手段。

## 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters 2695,四元泵,在线脱气,Waters 2996 DAD 检测器,Empower 工作站,Waters 公司),AUW 电子天平(1/10 万,日本岛津公司)。

杜仲药材共16批,经重庆市中药研究院生药所秦松云研究员鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮。

松脂醇二葡萄糖苷对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号 1107530-200502),京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷由本实验自制,纯度均大于98%,甲醇(色谱纯),双蒸水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 采用 Welchrom™ C<sub>18</sub> 110A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱,流动相甲醇-0.3% 冰醋酸梯度洗脱(表1),流速 1 mL · min<sup>-1</sup>,检测波长 238 nm,柱温 20 °C,进样量 10 μL。

表1 甲醇-0.3%冰醋酸梯度洗脱系统

t/min	甲醇/%	0.3%冰醋酸/%
0~15	12	88
15~20	12~20	88~80
20~25	20	80
25~35	20~25	80~75
35~55	25~30	75~20
55~75	30	70

**2.2 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取绿原

酸 0.046 84 g, 京尼平苷酸 0.012 51 g, 京尼平苷 0.010 07 g, 松脂醇二葡萄糖苷 0.045 23 g 用 50% 甲醇溶解并定容至 100 mL, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 取粉碎成絮状的杜仲药材约 2 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 回流 1 h, 滤过, 滤液回收溶剂, 残渣用 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.4 方法学考察**

**2.4.1 线性关系考察** 精密吸取上述混合对照品溶液 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 μL 进样, 分别以对照品量  $X(\mu\text{g})$  为横坐标, 峰面积  $Y$  为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 得各对照品的标准曲线回归方程及线性范围(表 2), 表明各化合物在相应范围内线性关系良好。

表 2 线性关系考察

化合物	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}$	$r$
松脂醇二葡萄糖苷	$Y = 3.1 \times 10^5 X - 6.3 \times 10^4$	0.468 ~ 11.71	0.999 9
京尼平苷酸	$Y = 1.2 \times 10^6 X - 1.1 \times 10^5$	0.125 ~ 3.128	0.999 6
绿原酸	$Y = 1.6 \times 10^6 X - 4 \times 10^5$	0.468 ~ 11.71	0.999 8

**2.4.2 校正因子计算** 以绿原酸为内标, 计算松脂醇二葡萄糖苷和京尼平苷酸的校正因子(RCF), 见表 3。

表 3 绿原酸对京尼平苷酸和松脂醇二葡萄糖苷的相对校正因子

进样体积	相对校正因子	
	RCF(CA/GA)	RCF(CA/PDG)
1	0.753	0.198
2	0.748	0.201
5	0.728	0.199
10	0.754	0.197
15	0.779	0.195
20	0.781	0.195
25	0.782	0.194
平均值	0.761	0.197
RSD(%)	2.702	1.294

**2.4.3 精密度试验** 分别取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 按照 2.1 项下条件测定, 以松脂醇二葡萄糖苷作为参照峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 京尼平苷酸峰、绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD, 结果表明, 各色谱峰相对保留时间 RSD < 0.50%, 相对峰面积的 RSD <

1.69%, 并且京尼平苷酸峰、绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.68%, 0.21%, 0.64%, 显示精密度良好( $n = 6$ )。

**2.4.4 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 以松脂醇二葡萄糖苷作为参照峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 以及京尼平苷酸峰、绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD, 结果表明, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 0.53%, 相对峰面积的 RSD < 2.02%, 并且京尼平苷酸峰、绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.82%, 0.37%, 0.68%, 表明供试品溶液以及京尼平苷酸峰、绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷在 24 h 内稳定( $n = 6$ )。

**2.4.5 重复性试验** 取同一批杜仲药材 5 份, 按照 2.3 项下操作, 制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 以松脂醇二葡萄糖苷作为参照峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 以及京尼平苷酸峰、绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷峰面积的 RSD, 结果表明, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 0.61%, 相对峰面积的 RSD < 3.00%, 并且京尼平苷酸峰、绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷面积的 RSD 分别为 2.15%, 1.63%, 1.89%, 表明本方法具有较好的重复性( $n = 6$ )。

**2.4.6 加样回收率** 取杜仲药材 2 g, 精密称定, 共 6 份, 分别加入 5 mL 混合对照品, 按 2.3 项下制备成供试品溶液, 进行分析, 计算加样回收率, 京尼平苷酸的加样回收率为 97.73% ~ 103.11%, RSD 1.91% ( $n = 6$ ); 绿原酸的加样回收率为 96.92% ~ 101.76%, RSD 1.67% ( $n = 6$ ); 松脂醇二葡萄糖苷的加样回收率为 95.48% ~ 101.80%, RSD 2.14% ( $n = 6$ ), 表明方法的准确度符合要求, 见表 4。

**2.4.7 校正因子重复性考察** 精密吸取上述混合对照品溶液 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 μL 进样分析, 计算绿原酸对京尼平苷酸和松脂醇二葡萄糖苷的相对校正因子(RCF)。考察了 4 根不同色谱柱。结果见表 5。

实验证明, 在不同色谱柱上杜仲 3 个对照品间的相对校正因子有较好的重复性, 可以实现一测多评对杜仲 3 个成分的同步测定。根据目标物与内参物之间的相对保留时间, 各峰紫外吸收特征等信息, 能够正确判断各目标峰的准确定位。

**2.5 样品测定** 分别精密吸取供试品溶液、混合对照品溶液各 10 μL 进样分析, 分别采用一测多评

表4 杜仲中各成分加样回收率试验

成分	样品中量	添加量	测得量	回收率	平均回收	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	率/%	/%
京尼平苷酸	0.592	0.625	1.236	103.11	101.06	1.91
	0.590	0.625	1.228	102.03		
	0.591	0.625	1.202	97.73		
	0.591	0.625	1.210	99.09		
	0.591	0.625	1.223	101.19		
	0.591	0.625	1.228	101.91		
	0.591	0.625	1.230	102.32		
绿原酸	1.995	2.340	4.361	101.10	99.68	1.67
	1.991	2.340	4.300	98.67		
	1.994	2.340	4.262	96.92		
	1.992	2.340	4.349	100.71		
	1.992	2.340	4.306	98.87		
	1.993	2.340	4.327	99.72		
	1.992	2.340	4.373	101.76		
	1.992	2.340	4.373	101.76		
松脂醇二葡萄糖苷	2.948	2.260	5.232	101.06	100.03	2.14
	2.942	2.260	5.201	99.96		
	2.946	2.260	5.218	100.54		
	2.943	2.260	5.238	101.54		
	2.943	2.260	5.101	95.48		
	2.945	2.260	5.246	101.80		
	2.943	2.260	5.199	99.82		

表5 不同色谱柱测得的相对校正因子

色谱柱	相对校正因子	
	RCF(CA/GPA)	RCF(CA/PDG)
Welchrom™ C <sub>18</sub>	0.761	0.197
Nucleosil C <sub>18</sub>	0.770	0.198
Symmetrix ODS-R	0.767	0.197
Phenomenex C <sub>18</sub>	0.782	0.200
平均值	0.771	0.197
RSD/%	2.81	3.16

和外标法计算药材中绿原酸、京尼平苷酸和松脂醇二葡萄糖苷的含量,见表6。

结果表明,样品2,7,9,12和样品13这5批药材的松脂醇二葡萄糖苷含量没有达到2010年版药典杜仲含量检测项下的要求,为不合格药材。其余的11批药材中松脂醇二葡萄糖苷的含量相差不大,京尼平苷酸和绿原酸的含量差异较大。

**2.6 统计学计算** 采用统计学 *t* 检验,对一测多评法与外标法得到的杜仲药材松脂醇二葡萄糖苷、京

表6 两种方法测定不同产地杜仲中绿原酸、京尼平苷酸和松脂醇二葡萄糖苷的含量

No.	产地	mg·g <sup>-1</sup>				
		GA		CA	PDG	
		A	B	A	A	B
1	湖南1	0.504	0.499	0.130	1.324	1.326
2	湖南2	0.386	0.382	0.206	0.803	0.804
3	湖南3	0.559	0.554	0.149	1.323	1.325
4	湖南4	0.393	0.389	0.132	1.133	1.135
5	陕西1	0.644	0.639	0.897	1.812	1.814
6	陕西2	0.549	0.544	0.617	1.439	1.441
7	湖北1	0.348	0.345	0.442	0.661	0.662
8	湖北2	0.644	0.638	1.990	2.912	2.916
9	湖北3	0.199	0.197	0.161	0.247	0.248
10	重庆1	0.391	0.387	0.435	1.063	1.065
11	重庆2	0.442	0.438	0.624	1.394	1.396
12	重庆3	0.098	0.097	0.086	0.627	0.628
13	重庆4	0.302	0.299	0.097	0.701	0.702
14	贵州1	1.244	1.233	0.394	1.584	1.586
15	贵州2	1.047	1.038	0.327	1.268	1.270
16	贵州3	0.903	0.895	0.892	1.868	1.870

注:A,外标法;B,一测多评法。

尼平苷酸和绿原酸的含量进行比较, $P > 0.05$ ,表明两种方法测得的含量没有显著性差异。

## 2.7 杜仲指纹图谱的建立

**2.7.1 杜仲指纹图谱的建立** 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A(国家药典委员会)软件,根据合格的11批杜仲药材的色谱图,制定杜仲药材的指纹图谱,见图1。

**2.7.2 共有特征峰的标定** 对各批药材进行特征图谱分析,用相对保留时间标定共有指纹峰,共标定了12个共有峰,如图2所示,根据杜仲对照品指纹图谱(图3)对杜仲指纹图谱中2,4,8,10号峰进行确认。2号峰为京尼平苷酸,4号峰为绿原酸,8号峰为京尼平苷,10号峰为松脂醇二葡萄糖苷。

**2.7.3 相似度分析** 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统A版》软件进行相似度的计算,得到11批不同产地杜仲图谱与对照图谱相似度在0.82~0.96。表明本实验建立的杜仲的对照图谱对杜仲的鉴别有意义。

## 3 讨论

考察了甲醇、50%甲醇、95%乙醇、60%乙醇4种提取溶剂,超声、回流、索氏提取3种提取方法,结果以50%甲醇回流提取的样品色谱图谱,特征峰比

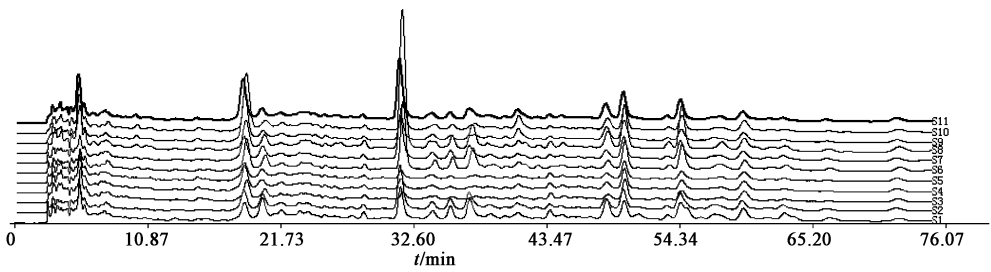


图 1 11 批不同产地杜仲特征指纹图谱叠加

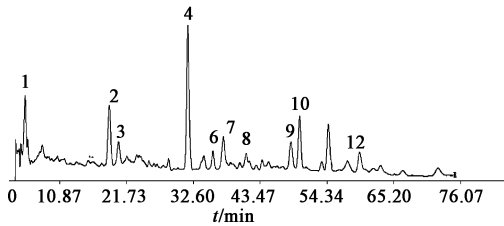


图 2 杜仲药材共有 HPLC 指纹图谱

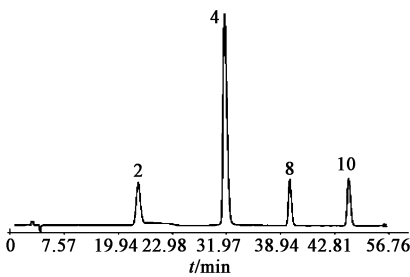


图 3 杜仲对照品指纹图谱

较明显,且方法比较简单。

京尼平苷酸、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷、京尼平苷为杜仲的主要有效成分,本实验以这 4 个成分作为指标性成分建立 HPLC 指纹图谱,因京尼平苷的含量较低,没有达到基线分离,因此没有对京尼平苷进行含量测定。

建立了杜仲中不同类成分的一测多评法,同时测定绿原酸、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷的含量,绿原酸对照品相对廉价易得,且在杜仲中含量较高,因此选绿原酸为内标,更能体现一测多评法的简便实用。

对 16 批不同产地的药材京尼平苷酸、绿原酸、松脂醇二葡萄糖苷的含量进行了测定,5 批不合格药材中的样品 2,7,9 松脂醇二葡萄糖苷的含量均没

达到药典要求,但这 3 批药材绿原酸含量均大于合格药品样品 1,3,4 绿原酸含量,且样品 7 绿原酸含量大于其中 6 批合格药材绿原酸的含量,所以仅以单一成分来控制药材的质量是否合格是不全面的。样品 8 松脂醇二葡萄糖苷的含量最高,但京尼平苷酸的含量仅约为样品 14 的一半;样品 14 京尼平苷酸和松脂醇二葡萄糖苷的含量相对较高,但绿原酸的含量较低,所以仅以单一成分来评价药材质量的优劣也是不全面的,需多成分,多指标进行综合考虑。本实验通过体现模糊信息的指纹图谱和对主要有效成分的精确定量相结合,为杜仲药材质量的控制和评价提供更好技术参考。

### [参考文献]

- [1] 赵德义,高锦明,许爱遐,等. 杜仲黄酮指纹图谱研究[J]. 西北植物学报,2003(11):1987.
- [2] 狄留庆,刘圣金,赵晓莉,等. 杜仲盐制前后质量变化的比较研究[J]. 中药材,2007(5):525.
- [3] 伍庆,张明时,王兴宁,等. 高效液相色谱法同时测定杜仲药材中绿原酸和松脂醇二葡萄糖苷的含量[J]. 时珍国医国药,2008,19(2):308.
- [4] 李伟,王丽楠,覃洁萍,等. 高效液相色谱法测定不同生长年限杜仲皮中桃叶珊瑚苷的含量[J]. 中国药业,2009,18(21):5.
- [5] 戚向阳,陈维军,张声华. 反相高效液相色谱法测定杜仲中京尼平苷、京尼平苷酸及绿原酸的含量[J]. 药物分析杂志,2000(1):22.
- [6] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):1925.

[责任编辑 顾雪竹]