

杜仲药材 HPLC 指纹图谱及其共有模式的建立

狄留庆¹, 刘圣金¹, 赵晓莉¹, 单进军¹, 毕肖林¹, 宋 燕²

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029; 2. 上海华宇药业有限公司, 上海 200002)

摘要:目的 用高效液相色谱法建立杜仲药材的指纹图谱分析方法。方法 采用 Lichrospher C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 分析柱, 甲醇-0.1% 磷酸水为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温 30 ℃。结果 共有 11 个共有峰, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)》, 计算各被测样品的 HPLC 指纹图谱的整体相似度, 10 批被测样品的色谱指纹图谱的整体相似度在 0.574~0.958, 并得出了杜仲药材的对照指纹图谱。结论 该指纹图谱方法简便、重现性好, 可专属性地研究杜仲药材的指纹图谱, 为有效地控制杜仲药材的内在质量提供了科学依据。

关键词:杜仲药材; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 共有模式; 质量控制

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)04-0596-04

Establishment of fingerprint of *Cortex Eucommiae* and its mutual mode by HPLCDI Liu-qing¹, LIU Sheng-jin¹, ZHAO Xiao-li¹, SHAN Jin-jun¹, BI Xiao-lin¹, SONG Yan²

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Shanghai

Huayu Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200002, China)

Abstract: **Objective** To establish the fingerprints for analysis of *Cortex Eucommiae* by HPLC. **Methods** The column of Lichrospher C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid with gradient elution. The detective wavelength was 230 nm, the column temperature was 30 ℃, and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** The fingerprint consisted of 11 common peaks. The mutual mode of HPLC fingerprints was set up and the similar degrees to the crude drugs from different habitats were compared by *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of CMM (Version 2004A)*, and the range of similarity for ten batches of *Cortex Eucommiae* 0.574—0.958. The standard HPLC fingerprint of *Cortex Eucommiae* was established too. **Conclusion** This method is accurate and reliable, and provides a scientific basis for the quality control of *Cortex Eucommiae*.

Key words: *Cortex Eucommiae*; HPLC; fingerprint; mutual mode; quality control

杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 始载于《神农本草经》, 上品, 为我国名贵药材, 具有补肝肾、强筋骨、安胎、降血压之功效。产于湖北、四川、贵州等省^[1]。为更有效地控制其质量, 保证商品药材及相应制剂质量的稳定性, 本实验应用梯度洗脱法建立了杜仲药材的 HPLC 指纹图谱的分析方法。

1 仪器、试剂与药材

1.1 仪器与试剂: Agilent 1100 高效液相色谱系统 (美国 Agilent 公司); 《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)》(国家药典委员会发行); BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); AS20500A 超声波清洗器 (天津奥特赛恩斯仪器有

限公司); 中药材粉碎机 (阜阳中鼎机械有限公司)。

松脂醇二葡萄糖苷 (pinoresinol diglucoside, PDG) 对照品购于中国药品生物制品检定所, 供测定用。甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 重蒸水自制。

1.2 药材: 不同产地及批次药材由上海华宇药业有限公司提供, 经南京中医药大学中药鉴定学教研室吴德康教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *E. ulmoides* Oliv. 的干燥树皮。药材产地及批次见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱 Lichrospher C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水梯度洗脱 [10: 90~18: 82 (0~10 min), 18: 82~30: 70 (10~30 min), 30: 70~35: 65 (30~40 min),

收稿日期: 2006-09-17

基金项目: 国家科技部“十五”攻关课题 (2001BA701A55-37)

作者简介: 狄留庆 (1964—), 男, 江苏海安人, 教授, 博士, 南京中医药大学中医药研究院制剂研究室主任。

Tel: (025) 86798226 E-mail: diliuqing928@163.com

表 1 10 批杜仲药材样品来源

Table 1 Ten batches of *Cortex Eucommiae* from various sources

编号	产区	批号及等次	采购地
1	四川	S020901	广元-1
2	四川	/	广元-2
3	四川	G101301	达州
4	四川	T101804	通江-1
5	四川	/	通江-2
6	四川	G2003100803	都江堰
7	贵州	一等	遵义
8	贵州	二等	黔西-1
9	贵州	/	黔西-2
10	湖北	/	恩施鹤峰飞龙

35 : 65~70 : 30 (40~75 min), 70 : 30~10 : 90 (75~77 min), 10 : 90 (77~92 min)]; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 ℃, 检测波长: 230 nm; 进样体积 10 μ L。

2.2 供试品溶液的制备: 取杜仲干燥粉末 2 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声 40 min, 冷却后称质量, 补足质量, 滤过, 滤渣同滤纸再置锥形瓶中加入 50% 甲醇 50 mL 同法提取 20 min, 合并滤液, 摇匀, 精密移取 50 mL 置蒸发皿中蒸干, 用甲醇溶解, 残渣用 50% 甲醇溶解, 定容至 10 mL, 摇匀, 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 溶液的制备: 选择松脂醇二葡萄糖苷对照品作为参照物。取松脂醇二葡萄糖苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成 0.1 mg/mL 的溶液。

2.4 样品测定: 取供试品溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件测定, 记录色谱图。在供试品色谱中, 以松脂醇二葡萄糖苷色谱峰 (S 峰) 的保留时间和色谱峰面积为 1, 计算各指纹峰的相对保留时间和相对共有峰面积值。

2.5 方法学考察

2.5.1 稳定性试验: 取供试品溶液, 在 0、2、4、6、8、10 h 分别进样分析, 记录主要色谱峰面积, 各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0~0.3%, 相对共有峰面积的 RSD 为 0~5.0%, 均小于 5%。结果表明, 供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.5.2 精密度试验: 取供试品溶液, 重复进样 5 次, 记录主要色谱峰面积, 各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0~0.2%, 相对共有峰面积的 RSD 为 0~1.7%, 均小于 5%, 符合指纹图谱技术要求。

2.5.3 重现性考察: 称取同一批四川通江产杜仲药材样品 6 份, 按照上述供试品溶液制备方法制备, 并按上述色谱条件分析, 记录主要色谱峰面积, 各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0~3.1%, 相对共有峰面积的 RSD 为 0~4.2%, 均小于 5%。

2.6 指纹图谱及技术参数

2.6.1 指纹图谱的建立及共有指纹峰的确定: 取上述 10 批杜仲药材, 按供试品溶液制备方法制备, 分别进样 10 μ L, 按 2.1 条件测定。根据测定结果, 制定以松脂醇二葡萄糖苷为参照物的杜仲指纹图谱, 确定了 11 个共有色谱峰。对选择的指纹峰编号为 1~11。

2.6.2 共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积: 按“2.4”项下方法计算 11 个共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积值。其相对保留时间分别为: 1 (0.189~0.190)、2 (0.399~0.403)、3 (0.584~0.587)、4 (0.888~0.889)、5 (1)、6 (1.066~1.068)、7 (1.084~1.085)、8 (1.312~1.314)、9 (1.345~1.346)、10 (1.672~1.674)、11 (1.868~1.870), 显示出了很好的“共有”特点。相对峰面积值结果见表 2。

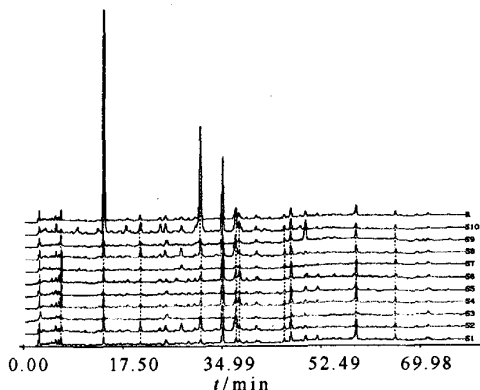
2.6.3 相似度评价及对照指纹图谱的建立: 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)》对各样品色谱图的原始数据文件(输出格式为 aia)进

表 2 10 批杜仲药材指纹图谱中共有指纹峰的相对峰面积值

Table 2 Relative peak areas of common fingerprint peak in ten batches of *Cortex Eucommiae*

样品号	各峰相对峰面积										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.201	0.174	0.188	0.234	1	0.173	0.103	0.147	0.257	0.307	0.242
2	0.308	0.386	0.115	0.302	1	0.310	0.142	0.123	0.435	0.607	0.166
3	0.114	0.524	0.241	0.412	1	0.678	0.084	0.093	0.277	0.220	0.095
4	0.111	0.530	0.240	0.442	1	0.711	0.087	0.094	0.275	0.218	0.098
5	0.359	0.257	0.119	0.154	1	0.170	0.172	0.075	0.364	0.421	0.096
6	0.357	0.263	0.123	0.160	1	0.179	0.171	0.078	0.363	0.437	0.097
7	0.214	0.291	0.094	0.250	1	0.201	0.156	0.170	0.469	0.867	0.210
8	0.209	0.294	0.093	0.247	1	0.192	0.163	0.130	0.467	0.887	0.232
9	0.149	0.649	0.086	0.202	1	0.218	0.121	0.123	0.213	0.185	0.140
10	0.035	3.131	0.149	1.548	0	0.282	0.058	0.053	0.151	0.059	0.047

行分析,自动匹配见图 1,并以 10 批样品生成的对照谱图(中位数法)作为对照模板,计算各色谱图的整体相似度在 0.574~0.958,见表 3,得到杜仲药材的对照指纹图谱,见图 2。



S10-湖北恩施 S9-贵州黔西-1 S8-四川通江-1 S7-贵州遵义
S6-四川广元-1 S5-贵州黔西-2 S4-四川广元-2 S3-四川达州
S2-四川通江-2 S1-四川都江堰 R-对照图谱

S10-Enshi, Hubei S9-Qianxi, Guizhou S8-Tongjiang,
Sichuan S7-Zunyi, Guizhou S6-Guangyuan, Sichuan
S5-Qianxi, Guizhou S4-Guangyuan, Sichuan
S3-Dazhou, Sichuan S2-Tongjiang, Sichuan
S1-Dujiangyan, Sichuan R-reference substance

图 1 10 批杜仲药材 HPLC 色谱指纹图谱相似度
评价系统(2004A 版)自动匹配结果

Fig. 1 Result of automatic matching of ten batches
of *Cortex Eucommiae* by similarity evaluation
system for chromatographic fingerprint
(Version 2004A)

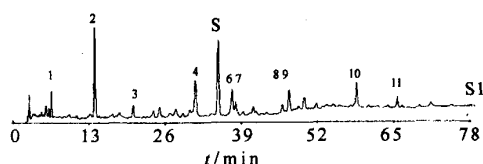


图 2 杜仲药材 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 2 Reference HPLC fingerprint of *Cortex Eucommiae*

3 讨论

3.1 检测波长的选择:采用 Agilent 1100 DAD 检测器对样品进行全波长扫描,综合考虑已知杜仲中有效成分松脂醇二葡萄糖苷和其他成分的吸收,根据 3D-plot 图谱,表明以 230 nm 处检测的图谱信息量较多,峰形较好,溶剂干扰少,基线平稳。

3.2 提取溶剂、时间和次数的选择:为了尽可能全面反映药材的化学信息,对药材供试品溶液制备方法进行实验研究。选择醋酸乙酯、甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇、25% 甲醇、水 6 个极性梯度的溶剂进行考察,结果 50% 甲醇热提的样品信息量较多、峰面积较大;选择回流、超声提取方法进行了比较,结果超声法所得峰面积为回流法的 95% 以上,考虑到操作的方便性,确定选择超声法;选择不同超声时间为 20、40、60 min 进行比较,结果以超声 40 min 为宜;比较提取两次和 3 次,得出以提取两次为宜。

3.3 流动相的选择:分别对甲醇-水(酸水)和乙腈-水(酸水)系统进行 3%~97% 范围的梯度洗脱比较,结果表明,在甲醇-0.1% 磷酸水条件下所得色谱峰分离度、峰形较好,程序稳定。

表 3 杜仲指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)相似度计算结果

Table 3 Similarity of *Cortex Eucommiae* samples calculated by fingerprint

药材编号	s1	s2	s3	s4	s5	s6	s7	s8	s9	s10	对照指纹图谱
s1	1.000	0.790	0.817	0.903	0.996	0.906	0.827	0.745	0.855	0.428	0.885
s2	0.790	1.000	0.908	0.842	0.773	0.845	0.848	0.949	0.739	0.660	0.915
s3	0.817	0.908	1.000	0.890	0.808	0.889	0.829	0.876	0.792	0.721	0.958
s4	0.903	0.842	0.890	1.000	0.883	1.000	0.894	0.825	0.804	0.472	0.957
s5	0.996	0.773	0.808	0.883	1.00	0.886	0.801	0.724	0.881	0.416	0.868
s6	0.906	0.845	0.889	1.00	0.886	1.000	0.893	0.827	0.806	0.474	0.957
s7	0.827	0.848	0.829	0.894	0.801	0.893	1.000	0.792	0.695	0.449	0.903
s8	0.745	0.949	0.876	0.825	0.724	0.827	0.792	1.000	0.714	0.651	0.892
s9	0.855	0.739	0.792	0.804	0.881	0.806	0.695	0.714	1.000	0.441	0.811
s10	0.428	0.660	0.721	0.472	0.416	0.474	0.449	0.651	0.441	1.000	0.574
对照指纹图谱	0.885	0.915	0.958	0.957	0.868	0.957	0.903	0.892	0.811	0.574	1.000

3.4 参照物的选择:松脂醇二葡萄糖苷为杜仲的主要降压成分^[2],也是现行《中国药典》收载杜仲的指标性成分^[3]。在优选的洗脱条件下,松脂醇二葡萄糖苷的分离较好,保留时间适中。最终确定选择样品中松脂醇二葡萄糖苷为参照物。

3.5 所收集的 10 批杜仲药材,其产地、生长年限、

采收季节、加工工艺等因素对杜仲药材的内在质量均有一定的影响,所研究的指纹图所表达的信息,仅代表杜仲药材的整体情况,故而 10 批杜仲药材的指纹图的相对峰面积值变异较大。

3.6 在中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)的辅助下,得出了杜仲药材的 HPLC 色谱指纹

图谱的对照指纹图谱,为杜仲药材提供了质量上的技术监控手段。

References:

- [1] Kang T G. *Traditional Chinese Medicine Identification* (中药鉴定学) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese

Medicine, 2003.

- [2] Charles J S, Ravikumar P R, Huang F C, *et al.* Isolation and synthesis of pinoresinol-diglucosides, a major antihypertensive principle of Tu-Chung [J]. *J Am Chem Soc*, 1976, 98(17): 5412.
[3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

太子参脱病毒苗的核糖体 ITS 序列研究

朱艳¹, 秦民坚^{1*}, 杭悦宇²

(1. 中国药科大学 中药资源教研室, 江苏 南京 210038; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要:目的 研究太子参脱病毒苗与外界苗 rDNA ITS 区碱基序列的异同。方法 运用 PCR 直接测序法对 9 种太子参脱病毒苗和 4 种外界苗的 rDNA ITS 区 (包括 ITS1、5.8S、ITS2) 碱基序列进行了序列测定。结果 太子参脱病毒苗与外界苗的 5.8S 碱基序列完全一致, 变异位点基本上位于 ITS1 的起始端与 ITS2 的终止端, 其中江苏溧阳和安徽宣城的脱病毒苗变异位点较多。使用 UPGMA 法构建了系统发生树, 从分子生物学角度说明了它们之间的内在联系。结论 rDNA ITS 碱基序列的比较分析从分子水平上进一步阐明了脱病毒苗的遗传稳定性。

关键词:太子参; 脱病毒苗; rDNA ITS 区; DNA 序列

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)04-0599-03

Sequence analysis of rDNA ITS of de-virus seedlings of *Pseudostellaria heterophylla*

ZHU Yan¹, QIN Min-jian¹, HANG Yue-yu²

(1. Department of Traditional Chinese Medicinal Material Resources, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Institute of Plant, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Objective To study rDNA ITS sequence similarities and differences between the de-virus seedlings and outside seedlings of *Pseudostellaria heterophylla*. **Methods** The sequences of ITS region (including ITS1, ITS2, and 5.8S) from nine de-virus seedlings and four outside seedlings were studied by the method of DNA sequence analysis. **Results** There were the same sequences in 5.8S region between the de-virus seedlings and outside seedlings of *P. heterophylla*. Variable sites lay in the initial position of ITS1 and termination of ITS2 basically. The de-virus seedlings from Liyang (Jiangsu Province) and Xuancheng (Anhui Province) had more variable sites. Phylogenetic dendrogram based on ITS was constructed by using UPGMA methods, which showed the inherent relation at the level of molecular biology. **Conclusion** The analysis of rDNA ITS of *P. heterophylla* has further clarified the inherit stability of de-virus seedlings at the molecular level.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm.; de-virus seedlings; rDNA ITS; sequences of DNA

太子参为石竹科孩儿参属植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根, 收载于《中国药典》^[1], 具有益气健脾, 生津润肺之功效, 主治心悸自汗, 疲倦乏力, 脾虚食少, 气阴不足, 自汗口渴, 肺燥干咳等症。太子参主产于江苏、山东、安徽、福建等省, 长期无性繁殖易发生病毒病, 关于太子参脱病毒的具体情况, 笔者

已作了初步的研究^[2]。近年来, rDNA ITS 区以进化速率快且与植物生活型呈相关性, 而被广泛用于近缘属间、属内系统发育及种内居群间的差异性研究^[3~5]。余永邦等^[6]曾对部分产区的太子参进行 rDNA ITS 区序列的比较, 那么太子参脱病毒苗与外界苗间是否也存在 DNA 序列上的差异? 脱病毒苗是否既脱除了病毒, 又保持了该品种的优良特性?

收稿日期: 2006-07-31

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2005206)

作者简介: 朱艳 (1972—), 女, 江苏吴江人, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事药用植物种质资源保存和生物技术等方面的研究。

* 通讯作者 秦民坚 Tel: (025) 85391290 E-mail: minjianqin@sohu.com