

文章编号:1008-1534(2020)01-0054-05

# 基于全程质量控制理念的杜仲颗粒 特征图谱研究

马永青<sup>1</sup>, 王璐<sup>1</sup>, 刘颖<sup>2</sup>, 刘永利<sup>1</sup>

(1.河北省药品检验研究院,河北石家庄 050011;2.河北省食品药品审评认证中心,河北石家庄 050011)

**摘要:**为明确杜仲颗粒生产过程中水溶性成分的转移情况,提供更为全面的质量控制方法,采用 HPLC 法对杜仲饮片、杜仲叶饮片、标准煎液与杜仲颗粒的特征图谱进行了相关性评价。使用 Phenomenex(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,检测波长为 227 nm,柱温为 30 °C,流速为 1.0 mL/min,考察提取方式、提取溶剂及时间的影响。结果表明,选用超声提取方式,以甲醇作为提取溶剂,反应时间为 20 min 时获得的效果较好;在此优化条件下建立特征图谱分析方法,能够使得杜仲颗粒的药效物质基础与药材保持一致,样品质量稳定,制备工艺规范,几个特征峰可全部在饮片中得到追溯,各共有峰的相对保留时间小于 0.5%。所建立的特征图谱专属性强,重复性好,可有效鉴别和评价杜仲颗粒的质量,为制定系列品种的全面质量控制方法提供参考。

**关键词:**中药化学;高效液相色谱法;杜仲饮片;杜仲叶饮片;杜仲颗粒;特征图谱

中图分类号:R917 文献标识码:A doi: 10.7535/hbgykj.2020yx01010

## Characteristic chromatogram of Duzhong granules on whole process quality control concept

MA Yongqing<sup>1</sup>, WANG Lu<sup>1</sup>, LIU Ying<sup>2</sup>, LIU Yongli<sup>1</sup>

(1. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 2. Hebei Province for Food and Drug Evaluation Certification Center, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

**Abstract:** In order to clarify the transfer of water-soluble components in the production process of Duzhong granules and provide a more comprehensive quality control method, HPLC method is used to evaluate the correlation between the characteristic maps of Eucommiae Cortex, Eucommiae Folium, standard decoction and Duzhong granules. The analysis is performed on Phenomenex C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution as the mobile phase

收稿日期:2019-5-21;修回日期:2019-10-21;责任编辑:张士莹

基金项目:河北省科技计划项目(16272511)

第一作者简介:马永青(1978—),女,河北石家庄人,副主任药师,博士,主要从事药物分析及质量控制方面的研究。

通讯作者:刘永利主任药师。E-mail:liuyongli2008@126.com

马永青,王璐,刘颖,等.基于全程质量控制理念的杜仲颗粒特征图谱研究[J].河北工业科技,2020,37(1):54-58.

MA Yongqing, WANG Lu, LIU Ying, et al. Characteristic chromatogram of Duzhong granules on whole process quality control concept [J]. Hebei Journal of Industrial Science and Technology, 2020, 37(1): 54-58.

for gradient elution. The detection wavelength is set at 227 nm, the column temperature is maintained at 30 °C and flow rate is 1.0 mL/min. The effects of extraction method, extraction solvent and reaction time are investigated. The results show that the ultrasonic extraction method is selected, methanol is used as the extraction solvent, and the reaction time is 20 minutes. The analysis method of Duzhong granules characteristic map is established under the optimized conditions. The effective substance basis of Duzhong granules is consistent with that of medicinal materials, the sample quality is stable, the preparation process is standard, several characteristic peaks could be traced all in the decoction pieces, and the relative retention time of each common peak is small at 0.5%. The established characteristic map has strong specificity and good repeatability, which can effectively identify and evaluate the quality of Duzhong granules, and provide a certain reference for the quality detection methods of a series of varieties.

**Keywords:** chemistry of Chinese material medica; HPLC; Eucommiae Cortex; Eucommiae Folium; Duzhong granules; characteristic chromatogram

杜仲与杜仲叶分别为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮、干燥叶, 具有补肝肾、强筋骨、安胎之功效, 用于肝肾不足、腰膝酸痛、筋骨无力、头晕目眩、胎动不安等症的治疗<sup>[1]</sup>。目前针对不同产地杜仲及杜仲叶中主要有效成分含量的报道较多<sup>[2-3]</sup>。杜仲饮片及杜仲叶饮片 HPLC 指纹图谱的初步建立, 可有效控制药材的内部质量<sup>[4-5]</sup>。另外, 研究发现盐制过程对杜仲中环烯醚萜类及木脂素类成分的影响明显<sup>[6]</sup>。中成药质量影响因素较多, 如原药材质量、投料饮片质量、提取制备工艺等。已有文献报道的质量控制多集中在对成品质量标准的上<sup>[7-12]</sup>, 对杜仲颗粒质量全程控制的研究鲜有报道。

中药特征图谱技术能够表征中药整体质量信息, 反映中药复杂的化学成分, 在有效成分尚未完全阐明的情况下, 有效表征中药质量, 适用于控制中药生产过程各环节中间体及成品质量<sup>[13-17]</sup>。本研究采用 HPLC 法建立杜仲颗粒的特征图谱, 考察杜仲颗粒生产过程重要环节中药材和杜仲颗粒水溶性成分的转移情况。

## 1 主要仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters e2695 色谱仪(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); TOLEDO XS105 电子分析天平(瑞士 Mettler 公司)。

### 1.2 试剂

松脂醇二葡萄糖苷(中国食品药品检定研究院提供, 批号为 111537-200501); 绿原酸(中国食品药品检定研究院, 批号为 110753-201415, 含量以 96.2% 计); 杜仲颗粒, 规格为每袋装 5 g; 乙腈(色谱纯, Merck KGaA 公司提供); 其他试剂均为分析纯; 10 批杜仲颗粒样品由生产厂家提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B; 采用梯度洗脱方式: 0~5 min, 5% A; 5~30 min, 5% → 15% A; 30~45 min, 15% → 20% A; 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 227 nm。

### 2.2 溶液制备

#### 2.2.1 混合对照品溶液

取绿原酸对照品、松脂醇二葡萄糖苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 150 μg、松脂醇二葡萄糖苷 20 μg 的混合溶液, 即得。

#### 2.2.2 杜仲颗粒供试品溶液

取本品内容物, 研细, 取约 2 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 kHz) 20 min。放冷, 摇匀, 取续滤液, 即得。

#### 2.2.3 杜仲饮片、杜仲叶饮片与标准煎液供试品溶液

取杜仲饮片、杜仲叶饮片及处方药味(杜仲对照药材 0.5 g、杜仲叶对照药材 2.5 g 混匀), 加水煎煮 1 h, 离心, 取上清液加 2.8 倍乙醇使其沉淀。再次离心, 将上清液调整至约 30 mL, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

## 3 方法学考察

### 3.1 杜仲颗粒特征图谱的建立及分析

取 10 批杜仲颗粒, 按“2.2.2”项所述方法制备供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件进行分析, 确定色谱图中出峰时间基本一致、峰面积较大的 5 个峰为共有特征色谱峰。通过与对照品比对, 确认 2 号峰为绿原酸, 4 号峰为松脂醇二葡萄糖苷。其中 2 号峰峰形较好, 前后无杂质峰干扰, 分离完全, 出峰时间居中, 选其作为参考峰, 见图 1。

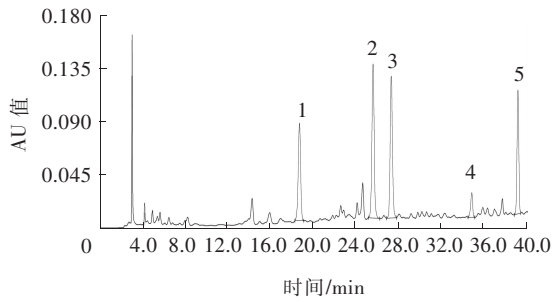


图 1 杜仲颗粒 HPLC 特征图谱

Fig.1 HPLC characteristic spectrum of Duzhong granules

此外,通过比较杜仲颗粒与原药材 HPLC-DAD 的色谱图,明确了 1 号—3 号共有峰来源于杜仲与杜仲叶,4 号共有峰来源于杜仲,5 号共有峰来源于杜仲叶。将杜仲饮片、杜仲叶饮片、标准煎液、杜仲颗粒图谱进行比较可知,与杜仲、杜仲叶药材指标成分相关的主要色谱峰在标准煎液及杜仲颗粒色谱图中均能得到体现;同时,杜仲颗粒中主要色谱峰也能在药材提取物图谱中得到追溯。10 批杜仲颗粒 HPLC 特征色谱,以及杜仲饮片、杜仲叶饮片及标准煎液的 HPLC 色谱图见图 2—图 3。

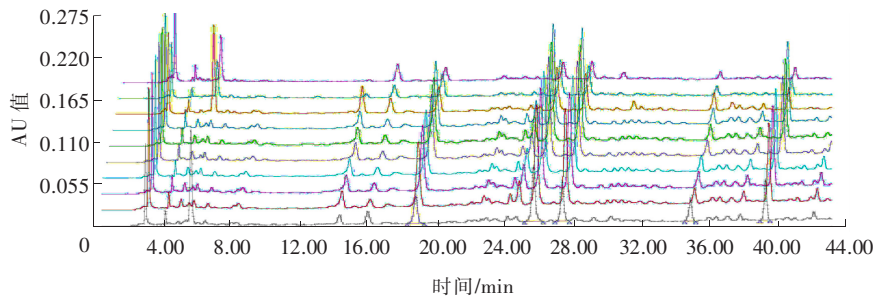
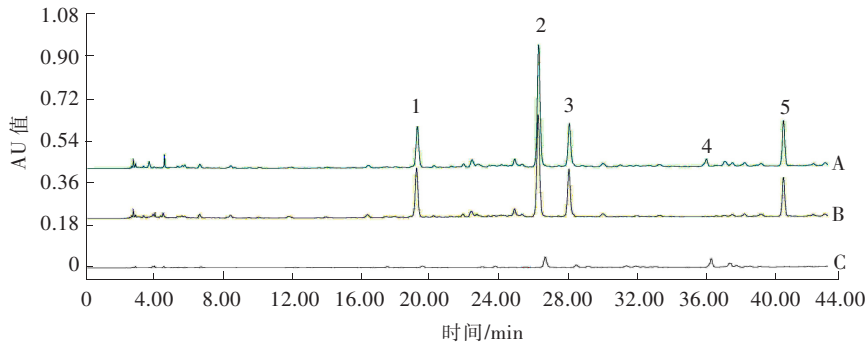


图 2 10 批杜仲颗粒 HPLC 叠加图谱

Fig.2 Overlapped HPLC chromatograms of ten batches of Duzhong granules



A—标准煎液;B—杜仲叶饮片;C—杜仲饮片;2—绿原酸;4—松脂醇二葡萄糖苷。

图 3 杜仲饮片、杜仲叶饮片和标准煎液 HPLC 色谱图比较

Fig.3 Comparison on HPLC chromatograms of Eucommiae Cortex, Eucommiae Folium and standard decoction

### 3.2 重复性试验

取同一批样品,研细,各取 1,2,3 g 共 3 份,按“2.2.2”项所述方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件进行测定。结果表明,本方法保留时间的重复性良好,结果见表 1 和表 2。

### 3.3 稳定性试验

取“2.2.2”项制备的供试品溶液,分别放置 0,8,16,24 h 后,按“2.1”项色谱条件进行分析,以绿原酸为参照峰,计算特征图谱中各共有峰的相对保留时间。结果显示,各共有峰的相对保留时间小于 0.5%,表明该溶液在 24 h 内稳定。

表 1 重复性试验结果(相对保留时间)

Tab.1 Repeated test results (relative retention time)

编号	称样量/g	相对保留时间				
		峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5
1	1.001 5	18.799	25.674	27.371	34.933	39.258
2	1.000 3	18.805	25.702	27.401	34.945	39.249
3	1.000 4	18.779	25.673	27.375	34.894	39.229
4	2.003 5	18.806	25.708	27.406	34.941	39.266
5	2.001 9	18.820	25.710	27.407	34.969	39.275
6	2.000 5	18.766	25.667	27.375	34.933	39.267
7	3.009 4	18.797	25.678	27.398	34.959	39.272
8	3.003 9	18.816	25.692	27.396	34.929	39.257
9	3.003 1	18.790	25.680	27.383	34.939	39.259
相对保留时间平均值	—	18.798	25.687	27.390	34.938	39.259
RSD 值/%	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0

表 2 重复性试验结果(相对峰面积)

Tab.2 Repeated test results (relative peak area)

编号	称样量/g	相对峰面积				
		峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5
1	1.001 5	629 886	924 193	848 431	127 080	565 090
2	1.000 3	629 092	924 121	850 005	127 070	562 709
3	1.000 4	626 213	925 000	850 198	126 294	564 516
4	2.003 5	1 255 803	1 838 105	1 687 043	253 838	1 131 148
5	2.001 9	1 258 522	1 835 604	1 679 740	251 887	1 132 095
6	2.000 5	1 243 843	1 834 464	1 684 230	255 191	1 127 453
7	3.009 4	1 868 087	2 715 017	2 499 577	378 436	1 678 116
8	3.003 9	1 876 723	2 721 946	2 505 043	379 468	1 681 736
9	3.003 1	1 865 599	2 720 819	2 514 983	385 302	1 679 044

## 4 讨 论

### 4.1 检测波长的选择

杜仲颗粒成分复杂,主要有效成分紫外吸收差异较大。为保证各共有峰具有适宜的灵敏度和精密性,采用二极管阵列 PDA 检测器在 200~400 nm 下进行各波长扫描。结果表明,在 227 nm 处基线稳定,各共有峰在同一波长下均有较好的吸收,干扰较小,且低含量组分松脂醇二葡萄糖苷的检测灵敏度好,峰型好。

### 4.2 提取方法的选择

通过实验比较了甲醇、70%甲醇、水、乙醇 4 种提取溶剂的提取效果。结果表明,采用甲醇作为提取溶剂时所得色谱峰的分离效果较好,响应值较高。以甲醇作为提取溶剂,对回流和超声提取方式进行考察的结果表明,两者的提取效果并无明显差异。此外,通过实验比较了提取时间对提取效果的影响。综合考虑,确定采用操作简单的超声提取方法,以甲醇作为提取溶剂,超声时间为 20 min。

### 4.3 流动相选择

实验中比较了甲醇-水、乙腈-磷酸水等多个流动相系统。结果显示,采用乙腈-0.1%磷酸溶液时峰型对称,可获得较高的理论塔板数,分离度也都达到要求。因此,选择乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相。

## 5 结 语

1)杜仲、杜仲叶提取物、杜仲颗粒的主要化学成分组成基本一致<sup>[18-19]</sup>,说明药材经过现代化工艺提取、浓缩等工艺制成颗粒后的主成分与药材提取物高度相关,提示杜仲颗粒保留了原料药中的主要特

征成分,药效物质基础与药材保持一致。

2)采用标准煎液来标准化杜仲颗粒的质量,有助于实现临床用药的一致性和安全性。

3)本研究探索杜仲颗粒与其组方药味杜仲、杜仲叶的药用物质基础关系,体现了中药多成分作用整体性的质量控制方法。特征图谱专属性强、重复性好,可有效鉴别和评价杜仲颗粒的质量,全面体现杜仲颗粒的组成成分,共有峰归属的初步确立也为该产品的质量控制提供了依据,可为建立杜仲颗粒的综合质量标准提供一定的参考。

4)后期研究将进一步指认及明确杜仲颗粒中多种成分的含量及其药理作用。

## 参考文献/References:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:化学工业出版社,2015:165-166.
- [2] 孙佳,陆苑,向文英,等.UPLC同时测定杜仲中6种有效成分的含量[J].天然产物研究与开发,2016,28(6):874-879.  
SUN Jia, LU Yuan, XIANG Wenying, et al. Simultaneous determination of six components in *Eucommia ulmoides* by UPLC[J]. Natural Product Research and Development, 2016, 28(6):874-879.
- [3] 刘荣华,唐芳瑞,陈兰英,等.不同产地杜仲叶中5种主要有效成分的含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(18):31-34.  
LIU Ronghua, TANG Fangrui, CHEN Lanying, et al. Comparison of contents of five effective components in *Eucommiae folium* from different areas[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(18):31-34.
- [4] 狄留庆,刘圣金,赵晓莉,等.杜仲药材 HPLC 指纹图谱及其共有模式的建立[J].中草药,2007,38(4):596-599.  
DI Liuqing, LIU Shengjin, ZHAO Xiaoli, et al. Establishment of fingerprint of Cortex *Eucommiae* and its mutual mode by HPLC[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(4):

- 596-599.
- [5] 钟世红, 古锐, 李羿, 等. 杜仲叶 HPLC 指纹图谱及成分积累规律的研究[J]. 华西药理学杂志, 2010, 25(4): 464-466.  
ZHONG Shihong, GU Rui, LI Yi, et al. HPLC fingerprint and accumulation rule of principal component in folium *Eucommiae* [J]. Weast China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 25(4): 464-466.
- [6] 刘可鑫, 周翎, 刘攀峰, 等. 盐制对杜仲化学成分含量变化的影响[J]. 中成药, 2011, 33(2): 280-284.  
LIU Kexin, ZHOU Ling, LIU Panfeng, et al. Effect of processing with salt-water on the chemical constituents of *Eucommiae Cortex* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2011, 33(2): 280-284.
- [7] 张颖, 张起辉, 王光函, 等. 枣仁安神颗粒指纹图谱的相关性研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(10): 825-828.  
ZHANG Ying, ZHANG Qihui, WANG Guanghan, et al. Correlativity between fingerprint peaks of Zaorenanshen granules and its relevant herbs [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2010, 27(10): 825-828.
- [8] 李丽丽, 田海伟, 李晋, 等. HPLC-ELSD 测定安神宝颗粒中 3 种成分[J]. 河北科技大学学报, 2018, 39(1): 49-55.  
LI Lili, TIAN Haiwei, LI Jin, et al. Determination of 3 ingredients in Anshenbao granules by HPLC-ELSD [J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2018, 39(1): 49-55.
- [9] 孙志, 周霖, 李卓伦, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术的脑心通胶囊化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(19): 1687-1695.  
SUN Zhi, ZHOU Lin, LI Zhuolun, et al. The chemical constituents study of Naoxintong capsules based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2018, 53(19): 1687-1695.
- [10] 何晨婕, 彭丰, 刘彤, 等. 基于 UPLC-LTQ Orbitrap HRMS 分析天芪降糖胶囊的化学成分[J]. 中草药, 2018, 49(9): 2019-2025.  
HE Chenjie, PENG Feng, LIU Tong, et al. Identifications of components of Tianqi Jiaonang capsules by UPLC-LTQ Orbitrap HRMS [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(9): 2019-2025.
- [11] 林向前. 杜仲片质量标准研究[J]. 中国药业, 2018, 27(4): 20-23.  
LIN Xiangqian. Study on quality standard of Duzhong tablets [J]. China Pharmaceuticals, 2018, 27(4): 20-23.
- [12] 周霖, 周珮珮, 王肖辉, 等. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合主成分分析的丹灯通脑软胶囊质量评价研究[J]. 中草药, 2018, 49(18): 4311-4318.  
ZHOU Lin, ZHOU Peipei, WANG Xiaohui, et al. Quality assessment of dandeng tongnao soft capsule based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with principal component analysis [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(18): 4311-4318.
- [13] 方雯雯, 成守玲, 陈培胜, 等. 白芷药材-饮片-提取物及配方颗粒的 HPLC 特征图谱相关性研究[J]. 中草药, 2016, 47(18): 3211-3214.  
FANG Wenwen, CHENG Shouling, CHEN Peisheng, et al. Correlation study on HPLC characteristic spectrum of raw herb-decoction pieces-extract-dispensing granules of *Angelicae Dahuricae Radix* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(18): 3211-3214.
- [14] 申卫红, 张子龙, 叶家宏, 等. 侧柏叶及其水煎液 HPLC 特征图谱的相关性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(5): 487-490.  
SHEN Weihong, ZHANG Zilong, YE Jiahong, et al. Analysis of HPLC characteristic spectrum for *Cacumen Platycladi* and its-decoction [J]. Traditional Chinese Drug Reserach and Clinical Pharmacology, 2013, 24(5): 487-490.
- [15] 伍小燕, 杨梅, 梁冰丽, 等. 基于相关性的广金钱草配方颗粒特征图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1057-1061.  
WU Xiaoyan, YANG Mei, LIANG Bingli, et al. Correlation-based study on the development of characteristic pattern of Herba *Desmodii Styracifolii* granules [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34(6): 1057-1061.
- [16] 周楚娟, 任晋, 张俊仪, 等. 美花石斛 HPLC 特征图谱研究及其水煎液相关性分析[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 671-675.  
ZHOU Chujuan, REN Jin, ZHANG Junyi, et al. Analysis of HPLC characteristic spectrum of *Dendrobium Loddigesii* and the correlation between and the correlation between samples prepared from decoction pieces and decoction [J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2017, 28(5): 671-675.
- [17] 魏梅, 杜兰哲, 李慧, 等. 醋延胡索饮片、水煎液、配方颗粒高效液相色谱特征图谱相关性研究[J]. 中药材, 2015, 38(5): 1066-1069.  
WEI Mei, DU Lanzhe, LI Hui, et al. Correlation of HPLC characteristic spectra of vinegar corydalis rhizoma decoction pieces, water decoction and formula granules [J]. Journal of Chinese Medical Materials, 2015, 38(5): 1066-1069.
- [18] 严颖, 赵慧, 邹立思, 等. 杜仲化学成分的 LC-Triple TOF MS/MS 分析[J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 146-156.  
YAN Ying, ZHAO Hui, ZOU Lisi, et al. Chemical constituents of *Eucommiae Cortex* by LC-Triple TOF MS/MS [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(1): 146-156.
- [19] 刘慧, 张盛, 刘仲华. HPLC 法同时测定杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1547-1549.  
LIU Hui, ZHANG Sheng, LIU Zhonghua. Simultaneous determination of geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide, and pinosresinol diglucoside in *Eucommia ulmoides* by HPLC [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(8): 1547-1549.