

# 杜仲不同炮制产品的水提液指纹图谱对比研究

朱星宇<sup>1,2,3</sup> 周燕萍<sup>2,3</sup> 陆金兰<sup>2,3</sup> 林上阳<sup>2,3</sup> 谢辉<sup>2,3</sup> 夏晨洁<sup>2,3</sup> 李伟东<sup>2,3</sup>

(1 江苏护理职业学院, 淮安, 223001; 2 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京, 210023;

3 江苏省中药炮制重点实验室, 南京, 210023)

**摘要** 目的: 建立杜仲不同炮制品(生品、盐品与炭品)的水提液指纹图谱, 从整体水平表征杜仲炮制前后的化学成分变化, 为杜仲质量控制提供参考。方法: 采用 HPLC 法, Kromasil 100-5-C<sub>18</sub> 色谱柱, 0.3% 磷酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1 mL/min, 检测波长为 238 nm。建立 10 批杜仲不同炮制品水提液的指纹图谱, 利用中药指纹图谱相似度评价系统(2012A 版) 计算相似度, 同时运用聚类分析(HCA) 和主成分分析(PCA) 对杜仲炮制前后进行模式识别分析。结果: 建立了杜仲不同炮制品的水提液指纹图谱, 生品标定了 7 个共有峰, 盐品标定了 7 个共有峰, 炭品标定了 8 个共有峰, 并指认了其中 5 个共有峰。HCA 和 PCA 模式识别能够明显区分杜仲不同炮制品。结论: HPLC 指纹图谱结合化学模式识别能够有效地区分杜仲不同炮制品, 为其质量控制研究提供参考。

**关键词** 杜仲; 炮制品; HPLC 指纹图谱; 化学模式识别; 水提液; 聚类分析; 成分分析

## Comparative Study on Fingerprints of Decoctions of Processed Products of Eucommiae Cortex

Zhu Xingyu<sup>1,2,3</sup>, Zhou Yanping<sup>2,3</sup>, Lu Jinglan<sup>2,3</sup>, Lin Shangyang<sup>2,3</sup>, Xie Hui<sup>2,3</sup>, Xia Chenjie<sup>2,3</sup>, Li Weidong<sup>2,3</sup>

(1 Jiangsu College of Nursing, Huai'an, 223001, China; 2 Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China; 3 Key Laboratory of State Administration of TCM for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**Abstract Objective:** To establish the fingerprints of water extracts from different processed products (raw, salt and charcoal) of Eucommiae Cortex to characterize the changes of chemical components before and after processing at the overall level, and to provide reference for the quality control of Eucommiae Cortex. **Methods:** HPLC method was applied, and Kromasil 100-5-C<sub>18</sub> column was used with 0.3% phosphoric acid in water (v/v)-acetonitrile as the elution system in gradient elution mode. The flow rate was 1.0 mL/min and the detective wavelength was 238 nm. Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 A edition) was used to establish fingerprints of 10 batches of different processed Eucommiae Cortex products. Meanwhile, Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) as methods of pattern recognition were applied to give an overall evaluation. **Results:** The common modes of HPLC fingerprint for different processed Eucommiae Cortex were set up. There were 7 common peaks in crude and salt products, respectively, and 8 common peaks for the charcoal products. **Conclusion:** The combination of fingerprints and chemical pattern recognition was an effective method for the distinction between different processed Eucommiae Cortex. The results would provide meaning references for quality evaluation of Eucommiae Cortex.

**Key Words** Eucommiae Cortex; Processed products; Fingerprint; Chemical pattern recognition; Water extract; Cluster analysis; Component analysis

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.02.004

杜仲为杜仲科植物杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 的干燥树皮, 性甘, 温, 归肝、肾经, 具有补肝肾, 强筋骨, 安胎的功效。用于肝肾不足, 腰膝酸痛, 筋骨无力, 头晕目眩, 妊娠漏血, 胎动不安<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 杜仲中主要含有木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、黄酮类、萜类、多糖类等化学成分, 主要具有降压、降血脂、降血糖、抗肿瘤、抗炎、保肝利胆、抗骨质疏松等药理作用<sup>[2-4]</sup>。

杜仲有 3 种常见的炮制品: 生杜仲、盐杜仲、杜

仲炭。中医药理论认为杜仲盐炙后可以增强其补肝肾、强筋骨的功效, 起到“盐制入肾”的作用<sup>[5]</sup>。课题组前期研究表明, 杜仲盐炙后可以明显增强其治疗去卵巢大鼠骨质疏松症的作用<sup>[6]</sup>, 此外, 生品和盐炙品含药血清均可以促进人成骨细胞增殖和分化的作用, 且盐炙后促进作用显著增强, 与其所含的环烯醚萜类成分有关<sup>[7]</sup>。有学者认为杜仲炒炭后的补肝肾, 强筋骨功效较生品更佳<sup>[8]</sup>, 且有研究发现杜仲炭具有明显的抗炎作用<sup>[9]</sup>。前期研究发现, 杜仲盐炙

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81773902)——基于“咸入肾”、“肾主骨”理论研究青蛾丸中杜仲、补骨脂盐炙增效机理

作者简介: 朱星宇(1992.03—), 男, 硕士, 助教, 研究方向: 中药质量标准研究, E-mail: 15295512919@163.com

通信作者: 李伟东(1969.08—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药质量标准及饮片炮制机理研究, E-mail: liweidong0801@163.com

后京尼平、京尼平苷和京尼平苷酸质量分数分别降低 25%、40%、40%，炒炭后京尼平、京尼平苷和京尼平苷酸质量分数分别降低 98%、70%、70%，说明炮制对其化学成分的影响显著<sup>[10]</sup>。杜仲炮制前后化学成分的改变，必然会导致药效的差异。但是目前关于杜仲不同炮制品的化学成分差异研究多以少量成分含量测定为主<sup>[11-12]</sup>，而指纹图谱研究多集中于不同产地或杜仲药材的研究<sup>[13-14]</sup>，缺少对其炮制前后整体化学成分的比较研究。因此本研究采用 HPLC 技术建立杜仲生品、盐品、炭品的指纹图谱，并结合聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA)对杜仲炮制前后进行模式识别研究，以期从整体角度评价杜仲炮制前后的化学成分变化，为其质量控制研究提供参考。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);BT25S 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);AIBOTE 电热套(南京予华仪器设备有限公司);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂 对照品京尼平苷酸(批号:20180201JNPGS)、咖啡酸(批号:20180320KFS)、京尼平苷(批号:20180201JNPG)、松脂醇二葡萄糖苷(批号:20180120SZCEPTG)、京尼平(批号:20180120JNP)均购于南京世洲生物科技有限公司,纯度 >98%。

色谱级乙腈(上海 ANPEL 实验器材有限公司);色谱级磷酸(上海阿拉丁生物科技有限公司);水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

1.3 分析样品 杜仲生品:十批杜仲生品来源见表 1,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)的干燥树皮。

杜仲盐品:分别称取十批杜仲生品饮片 50 g,照 2015 年版《中华人民共和国药典》四部盐炙法(通则 0213)炒至断丝、表面焦黑色,取出,晾凉。

杜仲炭品:分别称取十批杜仲生品饮片 50 g,照 2015 年版《中华人民共和国药典》四部炒炭法(通则 0213)用武火炒至表面焦黑色、内部焦褐色,并断丝存性,喷淋清水少许,熄灭火星,取出,晾干。

## 2 方法

2.1 供试品溶液的制备 取杜仲生品、盐品和炭品粉末(过四号筛)约 1 g,精密称定,加入 10 倍量水浸泡 30 min 后,武火煮沸,文火煎煮 30 min,滤过。药渣再加入 8 倍量,煎煮 20 min,滤过,合并 2 次滤液,

定容至 25 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

表 1 杜仲生品样品来源表

编号	批号	产地
S1	20170204	四川
S2	180401	湖北
S3	20180730	安徽
S4	1708001	四川
S5	170901C199	四川
S6	170903	湖南
S7	111023	浙江
S8	170602	湖南
S9	180603	湖北
S10	20170608	四川

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取京尼平苷酸、咖啡酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、京尼平对照品适量,加入甲醇溶解并稀释,摇匀,得到质量浓度分别为 0.168 mg/mL、0.248 mg/mL、0.241 mg/mL、0.174 mg/mL、0.198 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件 色谱柱:Kromasil 100-5-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:25 °C;体积流量:1 mL/min;流动相:0.3% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,程序如下:0 ~ 15 min, 95 ~ 90% A;15 ~ 25 min, 90 ~ 85% A;25 ~ 35 min, 85 ~ 83% A;35 ~ 50 min, 83 ~ 80% A;50 ~ 55 min, 80 ~ 75% A;55 ~ 65 min, 75 ~ 65% A;65 ~ 75 min, 65 ~ 5% A;进样量:10 μL;检测波长:238 nm。

## 2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度实验 取同一批杜仲生品,按照“2.1 项”下制备供试品溶液,按照“2.3 项”下条件连续进样 6 次,以京尼平苷酸为参照峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.8%,相对峰面积 RSD 均小于 1.1%,结果表明仪器的精密密度符合要求。

2.4.2 重复性实验 取同一批杜仲生品 6 份,按照“2.1 项”下制备供试品溶液,按照“2.3 项”下条件进样,以京尼平苷酸为参照峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.5%,相对峰面积 RSD 均小于 1.2%,结果表明该方法的重复性符合要求。

2.4.3 稳定性实验 取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.3 项”下条件进样,以京尼平苷酸为参照峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 1.3%,相对峰面积 RSD 均小于 1.4%,结果表

明,样品在 24 h 内稳定性良好。

2.5 数据分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 A) 分析杜仲炮制前后的 HPLC 指纹图谱数据。采用 Simca14.1 统计分析软件进行聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA)。

### 3 结果与分析

3.1 指纹图谱结果与分析 取 30 批杜仲样品,按“2.1 项”下方法制备供试品溶液,按“2.3 项”下色谱条件检测,记录色谱图。将数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 A),生成杜仲不同炮制品的对照指纹图谱如图 1 所示,混合对照品高效液相色谱图如图 2 所示。其中生品标定了 7 个共有峰,盐品标定了 7 个共有峰,炭品标定了 8 个共有峰,并指认了其中 5 个共有峰。通过杜仲 3 种不同炮制品对照图谱可以明显看出,盐品和炭品明显生成了 2 号峰,生品在 2 号峰的位置无明显峰。5 号峰(咖啡酸)、8 号峰(京尼平)在炮制后峰强明显减弱。相似度评价系统采用中位数计算杜仲不同炮制品的水提液的指纹图谱的相似度,其相似度结果见表 2。

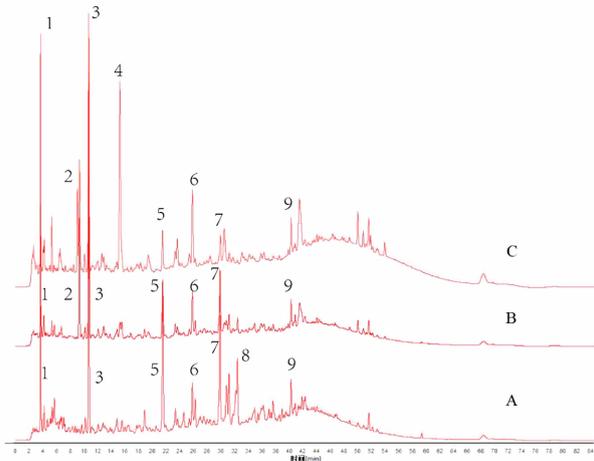


图 1 杜仲不同炮制品的对照指纹图谱

注:生品 A、盐品 B、炭品 C

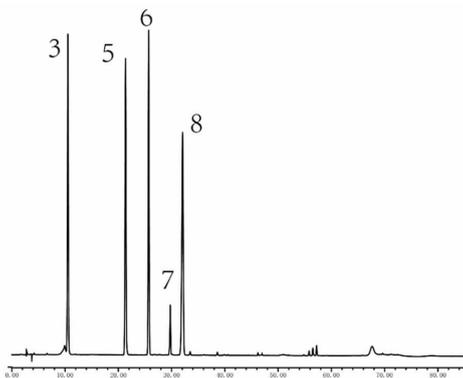


图 2 混合对照品 HPLC 图

注:3-京尼平羧酸;5-咖啡酸;6-京尼平苷;7-松脂醇二葡萄糖苷;8-京尼平

表 2 杜仲不同炮制品水提液指纹图谱相似度计算结果

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.855	S11	0.876	S21	0.909
S2	0.948	S12	0.768	S22	0.913
S3	0.804	S13	0.910	S23	0.815
S4	0.818	S14	0.780	S24	0.948
S5	0.861	S15	0.945	S25	0.818
S6	0.914	S16	0.884	S26	0.873
S7	0.838	S17	0.855	S27	0.955
S8	0.885	S18	0.868	S28	0.878
S9	0.859	S19	0.896	S29	0.923
S10	0.934	S20	0.781	S30	0.918

注:S1-S10 为炭品,S11-S20 为生品,S21-S30 为盐品

### 3.3 化学模式识别

3.3.1 聚类分析(HCA) 将杜仲不同炮制品的匹配峰数据导入 Simca14.1 统计分析软件进行聚类分析。结果表明,当  $t$  为 800 时,杜仲生品、盐品、炭品明显分为 3 类,其中 1~10 为炭品聚为一类,11~20 为生品聚为一类,21~30 为盐品聚为一类。见图 4。

3.3.2 主成分分析(PCA) 将杜仲 3 种炮制品的指纹图谱所有峰面积作为变量,采用 Simca14.1 统计分析软件对原始数据进行标准化处理后进行主成分分析(PCA)。杜仲生品、盐品、炭品明显分成 3 类,其中生品之间差异较大,比较分散,经盐炙后差异缩小,经炒炭后分散程度明显缩小,说明炮制过程对杜仲中整体化学式成分产生了显著的影响。由生品到盐品由于炒制的剧烈程度不如由生品到炭品,所以其分散程度由生品到盐品再到炭品逐渐减小。见图 5。

### 4 讨论

本实验建立了杜仲 3 种不同炮制品(生品、盐品、炭品)的水提液指纹图谱,并对其进行了聚类分析及主成分分析。结果发现,杜仲 3 种不同的炮制品明显聚为 3 类,且生品的离散度较大,盐品次之,炭品最小,说明炮制过程对杜仲中的化学成分产生了较大的影响,且随着炮制程度的增加使其化学成分更趋于一致。中药在临床使用多入汤剂,指纹图谱研究以有机溶剂提取的方式得到的结果对其临床应用提供参考具有局限性。本实验建立的杜仲水提液指纹图谱不仅可以为其质量控制提供参考,还可为其不同炮制品的临床应用提供参考。

高效液相色谱指纹图谱结合化学模式识别方法中的 HCA、PCA 分析,能够对不同炮制方法处理的中药饮片之间进行快速聚类鉴别和判别分析<sup>[15-16]</sup>。从 3 种炮制品的对照谱图可以看出,杜仲中的京尼

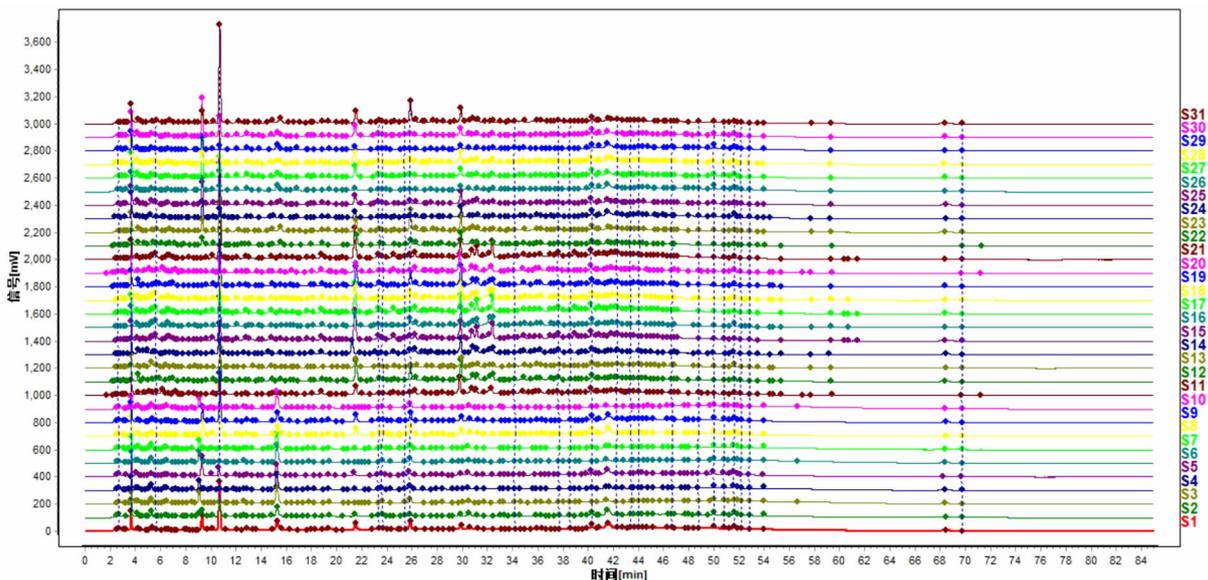


图3 杜仲不同炮制品水提液指纹图谱叠加图

注:S1-S10为炭品,S11-S20为生品,S21-S30为盐品

图谱结合化学模式识别手段可以从整体上表征杜仲炮制前后的化学成分变化,能够真实的反应杜仲炮制前后的化学成分变化,为其质量控制研究以及药效学变化研究提供参考。

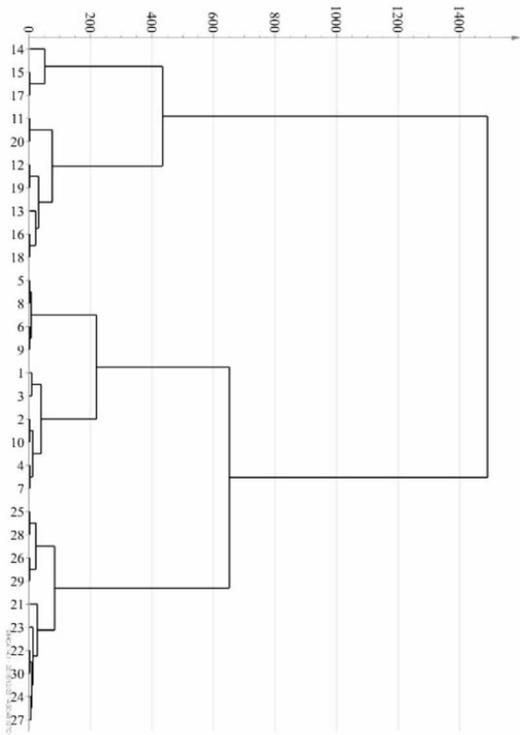


图4 杜仲不同炮制品水提液样品聚类分析图

平昔酸、咖啡酸、京尼平昔松脂醇二葡萄糖苷、京尼平在炮制后响应均呈下降趋势,而炮制后在9.1 min和15.5 min附近明显峰响应增加,正是化学成分的改变导致其可以明显聚为3类。本实验建立的杜仲不同炮制品的指纹图谱可以从整体上区别杜仲3种不同炮制品(生品、盐品、炭品),但是有关于具体的化学成分的改变,课题组将通过 LC-Triple TOF MS/MS 技术进行进一步研究。

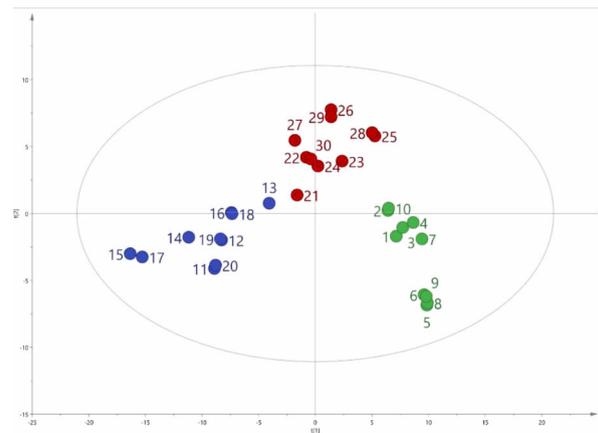


图5 杜仲不同炮制品水提液样品主成分分析得分图

注:1~10为炭品;11~20为生品;21~30为盐品

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 165.  
 [2] 王娟娟, 秦雪梅, 高晓霞, 等. 杜仲化学成分、药理活性和质量控制现状研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(15): 3228-3237.  
 [3] 冯哈, 周宏灏, 欧阳冬生. 杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(6): 713-720.  
 [4] KOH W S J, LEE J, LEE I H, et al. Anti-inflammatory effect of Cortex Eucommiae via modulation of the toll-like receptor 4 pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264. 7 macrophages[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 209: 255-263.  
 [5] 蔡宝昌. 中药炮制学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 65.

综上所述,本实验建立的杜仲不同炮制品指纹

(下接第282页)

二羟基二氢查尔酮进行体外抗肺癌 A549 细胞活性筛选,结果表明,2 种成分均能明显抑制 A549 细胞的增殖,并具有剂量依赖趋势,其中 2',4'-二羟基二氢查尔酮抑制效果更佳,给药 48 h 的  $IC_{50}$  值为  $63.83 \mu\text{g/mL}$ 。本文提取分离成分方法的创新之处在于,聚酰胺具有富集黄酮的作用,是较为理想的吸附剂,利用黄酮类化合物富含酚羟基的特点,通过分子中的酚羟基与聚酰胺分子中的酰胺基形成氢键缔合产生吸附,可显著提高黄酮成分纯度<sup>[17]</sup>;与中压制备液相色谱法联用提取分离镰形棘豆中的黄酮单一成分,简便易行,提取效率高,单体成分纯度高,是分离纯化镰形棘豆黄酮类化合物的新手段;将制备得到的黄酮单体进行体外抗肺癌 A549 细胞实验,检测其抗癌活性,为研究及阐述镰形棘豆抗肿瘤活性黄酮单体成分及其抗肿瘤的作用机制奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 高博,李钦,杨丽霞,等. 镰形棘豆的研究现状与分析[J]. 中医研究,2017,30(1):75-78.
- [2] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第1册[S]. 1995:340.
- [4] 张晓晶,李凌宇,格桑罗布,等. 藏药镰形棘豆中的黄酮类化合物(英文)[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences,2014,23(2):99-105.
- [5] 顾鹏程,许惠琴. 镰形棘豆化学成分和药理毒理作用的研究进展[J]. 时珍国医国药,2009,20(10):2549-2550.
- [6] 陈锦珊,杨钦磊,刘晓玲,等. 藏药镰形棘豆的化学成分、药理作用

- 及毒理学研究进展[J]. 中国药房,2016,27(28):3945-3.
- [7] 楼成华,王明艳,杨欢,等. 镰形棘豆中黄酮类化合物抗肿瘤活性的体外实验研究[J]. 南京中医药大学学报,2009,25(1):46-50.
- [8] 王栋,唐炜,杨光明,等. 藏药镰形棘豆黄酮类成分的抗炎、抗氧化及细胞毒性研究(英文)[J]. 中国天然药物,2010,8(6):461-465.
- [9] LI A, SUN A, LIU R, et al. An efficient preparative procedure for main flavonoids from the peel of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. using polyamide resin followed by semi-preparative high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B,2014,965:150-157.
- [10] LIU GY, ZHUANG LW, SONG DD, et al. Isolation, purification, and identification of the main phenolic compounds from leaves of celery (*Apium graveolens* L. var. *dulce* Mill./Pers.) [J]. Journal of Separation Science,2017,40:472-479.
- [11] 李旭升,蒋鑫炜,单晓煜,等. 黑豆皮花色苷的中压液相色谱制备及结构鉴定[J]. 食品与发酵工业,2018,44(6):51-57.
- [12] 杨欢,王栋,童丽,等. 镰形棘豆的化学成分研究(III)[J]. 南京中医药大学学报,2008,24(1):43-44.
- [13] 吕芳,徐筱杰. 藏药镰形棘豆中黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(4):318-320.
- [14] 确生. 藏药镰形棘豆化学成分的研究[D]. 兰州:西北师范大学,2003.
- [15] 魏学红,金莉. 藏药镰形棘豆的研究进展[J]. 中国药理学通报,2010,26(11):1535-1538.
- [16] 杨光明,燕珂,顾青,等. 藏药镰形棘豆对 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国药理学杂志,2013,48(24):2113-2116.
- [17] 孙兆林,王晓,王岱杰,等. 聚酰胺色谱结合高速逆流色谱分离制备蒽醌类化合物[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(5):854-8.

(2019-01-10 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 277 页)

- [6] 翁泽斌,颜翠萍,吴育,等. 盐制对杜仲治疗去卵巢大鼠骨质疏松症影响的研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(12):1457-1463.
- [7] 翁泽斌,颜翠萍,高倩倩,等. 不同炮制品的杜仲含药血清及其环烯\_省略\_经后妇女成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 时珍国医国药,2015,26(11):2636-2638.
- [8] 马晓鹏,宋立群,陈雅超,等. 宋立群教授治疗肾衰竭药对举要[J]. 中医学报,2015,43(2):92-93.
- [9] 郑斌,杨瑞,解燕. 杜仲炭抗炎镇痛作用研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(16):126-127,165.
- [10] 陶益,盛辰,李伟东,等. 杜仲不同炮制品化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(22):4352-4355.
- [11] 党会章,刘磊磊,赵帅. 杜仲饮片中心尼平苷酸和京尼平苷的含量测定[J]. 抗感染药学,2014,11(4):315-317.

- [12] 李晔,刘峰,李彤晖,等. 杜仲药材含量测定方法的研究[J]. 西北药学杂志,2010,25(5):348-350.
- [13] 范彦博,袁明洋,张义生. 四川产杜仲药材高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 医药导报,2016,35(10):1121-1124.
- [14] 黄徐英,陈玲,程静,等. 不同产地杜仲药材水提液高效液相色谱指纹图谱及其共有模式[J]. 医药导报,2015,34(11):1497-1500.
- [15] 杨冰月,彭亮,颜永刚,等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别分析不同产地款冬花生品与蜜炙品[J]. 中草药,2018,49(11):4991-4997.
- [16] 孙立丽,王萌,任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药,2017,48(20):4339-4345.

(2019-01-10 收稿 责任编辑:徐颖)