

了地方用药的需求。丹参不同产地的样本差异小,最先聚在一起,其次为其白花变种,再次为与其亲缘最近的南丹参。华鼠尾在经典分类中为 Ser. Japonicae,在陕西将根作丹参药用,与同为丹参组的云南鼠尾草聚为一支,置信度为 97 的一支可认为是地方用药中作丹参药用的一支。荔枝草为全草入药,民间用于治疗跌打损伤、无名肿毒、流感等,不作丹参药用,但荔枝草组与丹参组同属荔枝草亚属,聚为一支。甘西鼠尾根入药,四川作秦艽用,云南丽江作丹参用,呈圆柱锥形,数个根茎合着呈辫子状或扭曲状,质松脆,与别种性状差异较大。三叶鼠尾草根茎短,约 1 cm,生须状根,形态、形状与别种差异较大,也作丹参药用,蔓茎丹参根部性状与三叶鼠尾草相近,但不作丹参药用,这 3 种单独为一支。NJ 系统树

的分类基本兼顾了经典分类与地方用药的需要,具有一定的系统学意义。但由于唇形科是一个高度进化的类群,ITS 序列分析仅仅反映了鼠尾草属植物遗传背景的一个方面,因此仅根据 ITS 序列研究鼠尾草属种系关系是不够全面的,还需结合其他 DNA 分析手段作出更准确的结论。

致谢:江西省高安市药品监督管理局简洋辉、云南省大理州药品检验所许华提供本实验所需样本。

References:

- [1] Shi S H, Wen J, Zhu L F, et al. Sequence analysis of ITS regions of nrDNA from *Siphocranion nudipes* Kudo (Lamiaceae) [J]. *Acta Sci Nat Univ Sun Yat-sen; Nat Sci* (中山大学学报:自然科学版), 1998, 37(2): 52-56.
- [2] Xu H, Li X B, Ding X Y, et al. rDNA ITS sequencing of *Herba Dendrobii* (Huangcao) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36 (10): 777-783.

不同产地毛脉酸模药材 HPLC 指纹图谱研究

王振月¹, 左月明¹, 康毅华¹, 李瑞明², 崔红花³

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 天津天士力制药股份有限公司, 天津 300402; 3. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 采用 RP-HPLC (DAD) 对不同产地毛脉酸模药材进行指纹图谱比较。方法 用 Planetsil C₁₈ 分析柱, 甲醇-0.1% 磷酸水线性梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 洗脱时间 50 min, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 测定了 12 个不同产地的毛脉酸模药材的 HPLC 指纹图谱。结果 方法学考察表明, 本研究建立的分析方法有较好的重现性; 不同产地毛脉酸模药材共有峰面积的比值有一定的差异。结论 本方法可用作毛脉酸模药材的具有专属性的指纹图谱的建立。

关键词:毛脉酸模; 指纹图谱; 高效液相色谱; 梯度洗脱法

中图分类号:R282.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)09-1385-04

HPLC fingerprint of *Rumex gmelini* from different habitats

WANG Zhen-yue¹, ZUO Yue-ming¹, KANG Yi-hua¹, LI Rui-ming², CUI Hong-hua³

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Tianjin Tasly Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China; 3. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective To compare the HPLC fingerprint of *Rumex gmelini* from different habitats by RP-HPLC (DAD). **Methods** In this paper, 12 different samples were studied. Separation was performed on an Planetsil C₁₈ column, with mobile phase consisting of methanol and 0.1% phosphoric acid-water and with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL/min. The UV detection wavelength was 254 nm, column temperature was 35 °C, and the analysis time was 50 min. **Results** The results showed that this method has a good repeatability and the ratio of common peaks' area of different samples had some difference. **Conclusion** This method can be used to establish the chromatographic fingerprint of *R. gmelini* with high specificity.

Key words: *Rumex gmelini* Turcz.; fingerprint; HPLC; gradient elution

收稿日期: 2004-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270156)

作者简介: 王振月 (1956-), 男, 哈尔滨人, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药资源开发与生物技术研究。

Tel: (0451) 82196254, 82195025 E-mail: wangzhen_yue@163.com

毛脉酸模 *Rumex gmelini* Turcz. 为蓼科酸模属多年生宿根草本植物,广泛分布于黑龙江省大、小兴安岭及张广才岭等地区,是黑龙江省、吉林长白山地区的重要药用植物资源,在民间常以根入药,对淋病、上呼吸道感染、癣病和疮毒有确切疗效^[1~3]。毛脉酸模根中主要含有蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类和酸模素等化合物,现已从毛脉酸模根中分离得到大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、白藜芦醇、白藜芦醇苷和酸模素等多种成分^[4~5]。按指纹图谱的目的即对原料药材进行质控,要求对药材应固定品种、固定适宜的药材采收地。故本实验主要对 12 个野生毛脉酸模样品(采自黑龙江省各林区)进行指纹图谱的分析和比较,可区分不同产地毛脉酸模药材质量的异同,为毛脉酸模的鉴别和药材指纹图谱研究奠定基础。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器:美国 Waters 高效液相色谱仪(Waters 2695 型泵,2996 型二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站);色谱柱 Planetsil C₁₈ 分析柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm);Dikma 微孔滤膜(0.45 μm);瑞士 Mettler AE 240 电子天平。

1.2 试剂:甲醇为色谱纯(美国 Dikma 公司);磷酸为分析纯;水为重蒸水(自制),并经 0.45 μm 水系滤膜滤过。

1.3 对照品:白藜芦醇苷、白藜芦醇(Sigma 公司),大黄素、大黄酚、大黄素甲醚(中国药品生物制品检定所),酸模素、大黄酚-1-O-β-D-葡萄糖苷从毛脉酸模根中分离得到,经波谱分析鉴定结构,归一化法计算其质量分数为 98% 以上。

1.4 药材:12 个产地野生毛脉酸模样品(采自黑龙江省各林区),经笔者鉴定为蓼科酸模属植物毛脉酸模 *Rumex gmelini* Turcz. 的干燥根及根茎。将上述药材样品经低温干燥后,粉碎成粗粉(过 80 目筛),备用。药材具体来源见表 1。

表 1 毛脉酸模的来源

Table 1 Source of *R. gmelini*

编号	样品	采收时间	编号	样品	采收时间
1	大兴安岭新林	2001-09	7	绥棱义气松	2002-09
2	大兴安岭加格达奇	2001-09	8	尚志市帽儿山	2002-09
3	大兴安岭塔河	2001-09	9	伊春市翠峦	2003-09
4	桃山跃进	2002-09	10	伊春市红星区	2003-09
5	桃山神树	2002-09	11	伊春市上甘岭	2003-09
6	绥棱北股流	2002-09	12	伊春市新青桦林	2003-09

2 实验方法

2.1 色谱条件的选择:分别以甲醇-水、乙腈-水、甲

醇-水-磷酸的不同比例及不同梯度进行试验,记录不同波长(220、254、290、310、330 nm)的色谱图。样品 2 h 图谱显示,50 min 后无特征峰出现。结果表明,用甲醇-0.1% 磷酸水线性梯度洗脱,检测波长 254 nm,洗脱时间 50 min,体积流量 1.0 mL/min,柱温 35 °C 为佳。

2.2 供试品溶液的制备:称取不同产地毛脉酸模药材样品各 0.25 g,置索氏提取器内加 95% 乙醇 65 mL 提取 4 h,滤过,蒸干。残渣用 25 mL 甲醇溶解并定容至刻度,此溶液再过 0.45 μm 的微孔滤膜,弃去初滤液,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备:分别精密称取白藜芦醇苷、白藜芦醇、酸模素、大黄酚苷、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量,用甲醇溶解制成对照品溶液。

2.4 方法学考察:为了考察分析方法的可靠性,以 2 号(采自大兴安岭加格达奇)药材为例,对仪器精密密度、方法重现性以及稳定性作了相应考察。

2.4.1 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样 5 次,其相对保留时间 RSD 小于 3%,主要共有峰面积的 RSD 不超过 5%。

2.4.2 重现性试验:取同一产地供试品 5 份,分别按供试品溶液的制备方法制备并测定,其相对保留时间 RSD 小于 3%,主要共有峰面积的 RSD 不超过 5%。

2.4.3 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别在 0、3、6、9、12 h 检测,其相对保留时间 RSD 小于 3%,主要共有峰面积的 RSD 不超过 5%,说明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 指纹图谱的制备:分别精密吸取对照品和供试品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,进样,测定,记录 50 min 色谱图,即得。

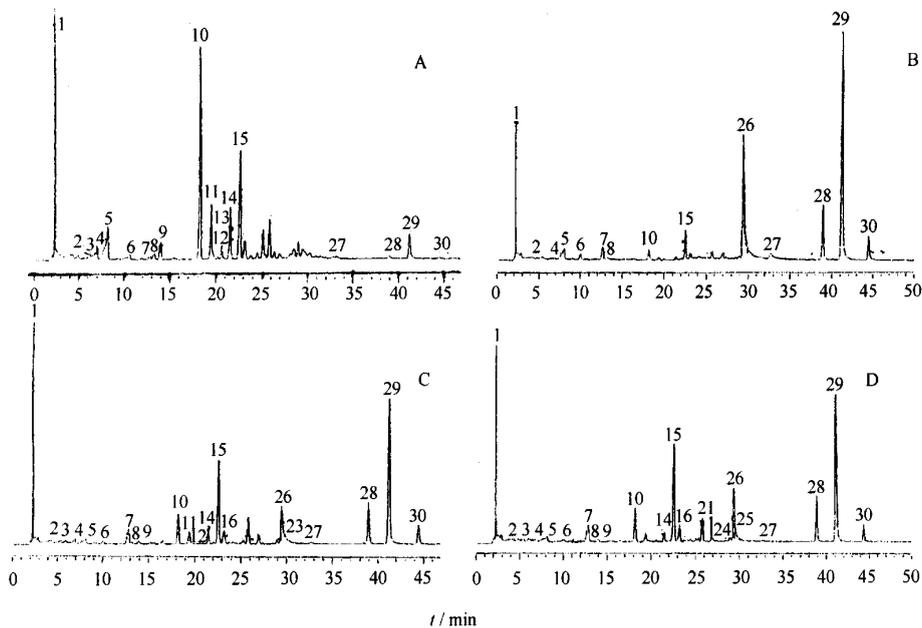
2.5.2 共有峰的确定:测定了 12 个不同产地毛脉酸模药材样品,比较其色谱图,确定共有峰为 30 个。以 10 号峰(18.21 min)为内参比峰,以其各色谱峰对内参比峰的相对保留时间和相对峰面积定性,测定各峰相对保留时间 RSD < 3%,共有指纹峰的峰面积之和大于 95%。典型色谱图见图 1-A。

2.5.3 共有峰的归属:取对照品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,在上述色谱条件下分别进样,对比各色谱峰的紫外吸收光谱和相对保留时间可知,指纹谱中 5 号峰为白藜芦醇苷(8.11 min),7 号峰为白藜芦醇(12.80 min),15 号峰为 22.56 min),26 号峰为酸模素(29.42 min),28 号峰为大

黄素 (38.91 min), 29 号峰为大黄酚 (41.15 min), 30 号峰为大黄素甲醚 (44.43 min)。

2.6 系统聚类分析: 系统聚类分析是一种无管理、无指导的模式识别方法。依据所测样品的色谱指纹

图谱特征, 对样品进行分类。本研究应用 SPSS 软件, 采用组间距离法, 以向量余弦相似性作为样品的测度。12 个样品大致分为两类, 第 1 类为 1、4、8 号样品, 第 2 类为其余样品。聚类谱系图见图 2。



A-大兴安岭塔河 B-大兴安岭新林 C-桃山跃进 D-尚志市帽儿山
A-Daxing'anling-Tahe B-Daxing'anling-Xinlin C-Taoshan-Yuejin D-Shangzhi-Mao'ershan

图 1 不同产地毛脉酸模 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of *R. gemlini* from different habitats

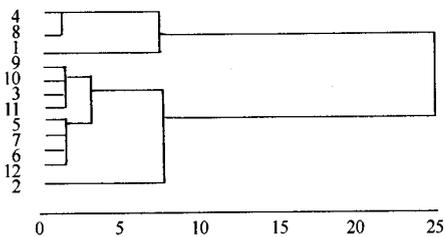


图 2 毛脉酸模聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of *R. gemlini* clustering analysis

2.7 相似度分析: 根据聚类分析结果, 以第 2 类毛脉酸模 (2、3、5、6、7、9、10、11、12 号) 药材的 9 批样品的色谱指纹图谱为基础, 建立共有模式。通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (国家药典委员会), 计算各样品与共有模式间的相似度, 见表 2、3, 组成共有模式的色谱叠加图见图 3。而第 1 类 1、4、8 号样品的色谱图 (见图 1), 与共有模式的指纹图谱比较, 各共有峰基本都存在, 但各色谱峰之间的相对峰面积不同, 由此可以看出它们之间的内在质量存在一定的差异。所以, 指纹图谱正是通过这种内在的差异, 达到控制不同批次、不同产地的药材。

表 2 建立共有模式毛脉酸模样品相似度数据

Table 2 Similarity of *R. gemlini* samples in mutual mode

编号	相似度	编号	相似度
2	0.92	9	0.96
3	0.97	10	0.96
5	0.98	11	0.95
6	0.99	12	0.99
7	0.99		

表 3 与共有模式比较的毛脉酸模样品的相似度数据

Table 3 Similarity of *R. gemlini* samples compared with mutual mode

编号	相似度
1	0.38
4	0.56
8	0.59

3 讨论

3.1 通过对一系列提取方法 (超声、索氏、回流提取)、不同的提取溶液和提取时间的考察以及结合有关文献确定了以上供试品溶液的制备方法。

3.2 采用二级管阵列检测器对指纹图谱的检测波长进行了选择, 从 190~400 nm 内先选出 220、254、290、310、330 nm 分离度较好的波长, 分析比较各波

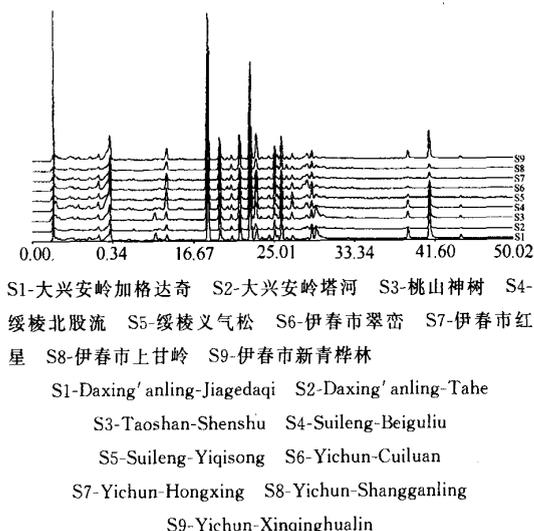


图 3 毛脉酸模样品 HPLC 指纹图谱共有模式图
Fig. 3 Chromatogram of mutual mode of HPLC fingerprint of *R. gmelini* samples

长下指纹图谱,发现检测波长为 254 nm 时色谱图所包含的信息量最大,且各色谱峰分离较好。

3.3 采用 HPLC 梯度洗脱法对毛脉酸模药材进行了指纹图谱的研究,实验证明,该方法可操作性强、重现性好,可作为毛脉酸模药材指纹图谱研究的基础。

3.4 按本方法建立的由 9 批药材构成的共有模式图和 1、4、8 号样品色谱图相比较,构成共有模式 9 批样品的相似度较高,均在 90% 以上,而 1、4、8 号样品的相似度均低于 90%。从图 1 可以看出,两类毛脉酸模样品差异主要集中在 10、15、26、28、29 号峰的峰形及其相对高度上,构成共有模式样品的色谱指纹图谱中 10、15 号峰明显较高,经研究是蒽醌

苷类成分。在第 1 类的 4 号(桃山跃进)、8 号(尚志市帽儿山)样品中 15、26、28、29 号峰较高,其中 28 号峰(大黄素)、29 号峰(大黄酚)为蒽醌苷元类成分;在 1 号(大兴安岭新林)样品中 26、28、29 号峰的峰位高,其中 26 号峰(酸模素)的相对高度较其他样品均高,可能与 1 号样品采于水湿洼地有关,故怀疑酸模素的积累可能受水分的影响较大,具体影响过程有待进一步研究。

3.5 本实验先对所有样品进行聚类分析,然后选择好的一类样品来建立共有模式,并将整个色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,生成共有模式,计算相似度。结果表明,相似度分析结果与系统聚类结果一致,两种方法得到了相互验证。对于待测样品,只需测得该样品的色谱指纹图谱,计算样品相似度,即可评价其质量。本研究仅收集了 12 个产地的毛脉酸模药材,如能收集更多,采用分析方法获取更多化学信息,并以代表临床药效的药理实验进行验证,则对毛脉酸模的质量评价会更加完善和科学。

References:

[1] Liu S T. *Herb Flora of Chinae Boreali-Orientalis* (东北草本植物志) [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1959.
[2] Jilin Institution of Traditional Chinese Medicine. *Flora of Changbaishan* (长白山植物志) [M]. Changchun: Jilin People's Publishing House, 1982.
[3] Wang Z Y, Ye W H, Yang R F, et al. Investigation of resources of *Rumex gmelini* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, 19(12): 603-605.
[4] Wang Z Y, Li Y B, Kuang H X. Isolation and identification of rhein and emodin [J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医学报), 1996, 24(2): 54.
[5] Wang Z Y, Cai X Q, Kang Y H. Structure of two compounds from the root of *Rumex gmelini* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(12): 714-716.

不同树龄邳州银杏叶在不同采收期指纹图谱比较

鞠建明¹,段金成¹,钱大玮¹,朱玲英¹,张绍君²,郭巧生³

(1. 江苏省中医药研究院 江苏省现代中药制剂工程技术中心,江苏 南京 210028;

2. 江苏银杏生化集团股份有限公司,江苏 邳州 221300; 3. 南京农业大学,江苏 南京 210095)

摘要:目的 比较江苏道地药材邳州银杏叶在不同采收期的指纹图谱。方法 采用 HPLC-DAD 方法。色谱条件为:色谱柱:Alltima C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5% 磷酸水(B)进行梯度洗脱,15%~27% A (0~40 min),27%~15% A (40~60 min),15% A (60~75 min);体积流量:1 mL/min;柱温:20 °C;检测波长:360 nm。并应用计算机辅助相似性评价系统对银杏叶指纹图谱进行了相似度分析。结果 同一树龄不同采收期的银杏叶中,二至四年生银杏叶分别在不同采收期指纹图谱相似度较高(>0.90);五年生和六年生银杏叶分

收稿日期:2004-11-12

基金项目:国家科技部“中药现代化研究与产业化开发”资助项目(99-929-01-01AE99206)

作者简介:鞠建明(1972—),男,江苏泰兴人,硕士,助理研究员,主要从事中药质量标准研究及制剂工艺研究。

Tel: (025)85639640 E-mail: jjm405@sina.com