

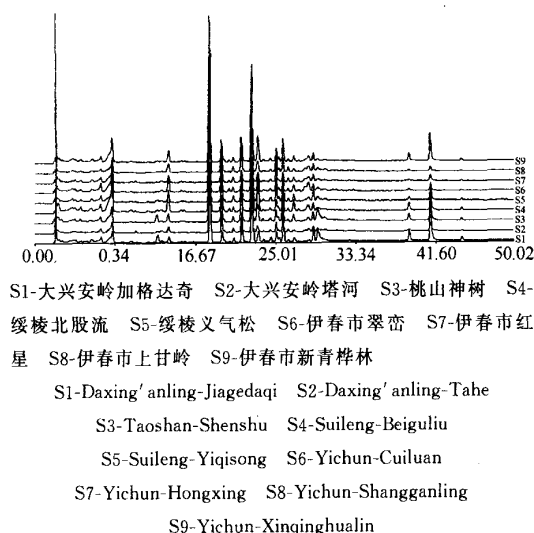


图3 毛脉酸模样品 HPLC 指纹图谱共有模式图

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* (中医药学报), 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℃;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

别在不同采收期指纹图谱相似度变化范围较大(0.86~0.97)。同一采收期不同树龄的银杏叶中,5~7月不同树龄银杏叶指纹图谱相似度较高(>0.90);8~10月不同树龄银杏叶指纹图谱相似度变化范围较大(0.84~0.99)。**结论** 本研究为控制邳州银杏叶内在质量建立了指纹图谱方法,为银杏叶的合理采收提供了科学依据。

关键词 银杏叶; HPLC; 指纹图谱; 计算机辅助相似性评价系统; 相似度

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)09-1388-04

Comparison of fingerprints of *Ginkgo biloba* leaves at different ages of trees in different collecting seasons

JU Jian-ming¹, DUAN Jin-ao¹, QIAN Da-wei¹, ZHU Ling-ying¹, ZHANG Shao-jun², GUO Qiao-sheng³

(1. Center of Modern Preparation Engineering and Technique of Chinese Materia Medica in Jiangsu Province, Jiangsu

Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Jiangsu Biochemistry of *Ginkgo biloba*

Group Co., Ltd., Pizhou 221300, China; 3. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract; Objective To compare the fingerprints of Pizhou *Ginkgo biloba* leaves at different trees ages in different collecting seasons. **Methods** HPLC-DAD was applied. The conditions were as follows: Alltima C₁₈ column (250 nm×4.6 mm, 5 μm); mobile phase: acetonitrile (A)-0.5% phosphoric acid solution (B) (gradient elution), 15%—27% A (0—40 min), 27%—15% A (40—60 min), 15% A (60—75 min); flow rate: 1 mL/min; column temperature: 20 °C; detecting wavelength: 360 nm. Computer Aided Similarity Evaluation System was used to analyze the similarity of *G. biloba* leaves. **Results** Among the same-age but different collecting-time, the similarities of fingerprints of *G. biloba* leaves from 2 to 4 aged trees are relatively higher (>0.90); but those from 5 to 6 aged trees change from 0.86 to 0.97. Among the different-age but same collecting-time, the similarities of fingerprints of *G. biloba* leaves collected from May to July were relatively higher (>0.90); but those from August to October changed from 0.84 to 0.99. **Conclusion** The research has established a method of using fingerprint to control the internal quality of Pizhou *G. biloba* leaves and has provided a scientific basis for the reasonable collection of *G. biloba* leaves.

Key words: *Ginkgo biloba* L. leaves; HPLC; fingerprint; Computer Aided Similarity Evaluation System; similarity

银杏叶为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶^[1]。银杏叶主要含黄酮类(flavonoids)和萜烯酯类(terpenes)化合物,具有扩张血管、改善脑循环、抑制血小板活化因子(PAF)作用。

曾经制定了邳州银杏叶黄酮类成分和内酯类成分测定方法,并对其化学成分进行了系统的分析评价研究^[2~4],但是由于银杏叶中成分呈复杂化、多样化特性,仅几个指标成分的测定不能全面反应其内在质量,而指纹图谱能够全面反应银杏叶所含化学成分的种类、数量及相互之间的比例,进而有效地表征其内在质量。本实验以梯度洗脱方法建立了银杏叶指纹图谱,方法学研究表明该法稳定性好,可操作性强,为全面控制银杏叶质量提供了实验依据。通过不同树龄银杏叶在不同采收期指纹图谱相似度分析,为合理采集银杏叶提供指导。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(Alliance 2695 四元泵及自动进样系统,996 二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站);KQ—250E 型医用超声波清洗

器(昆山市超声仪器有限公司);Millipore 纯水器。乙腈(HPLC),磷酸(AR),超纯水,其他试剂均为分析纯。

药材采自邳州银杏叶生产基地港上、铁富两镇,每样在同一实验田采集3个点,每一点采集3~6株银杏叶全株,混匀,置阴凉通风处,晾至近干,置干燥箱于50 °C烘干,真空包装,于避光、阴凉处存放。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: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;检测波长: 360 nm;柱温: 20 °C。

2.2 供试品溶液的制备^[4]:称取四年生银杏叶8月中旬采集样品粉末1.0 g,置100 mL三角烧瓶中,加入25 mL 50%乙醇,超声处理40 min,取上清液,滤过,即得。

2.3 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样5

次,考察各色谱峰的相似度,结果表明:5 张色谱图与其共有模式的相似度分别为 0.997、0.996、0.995、0.999、0.998,说明仪器的精密度较好。

2.4 重现性试验:取供试品 5 份,分别按供试品制备方法制备,进样,测定,考察色谱峰的相似度,结果表明:5 个供试品色谱图与其共有模式的相似度分别为 0.994、0.994、0.999、0.999、0.995,说明该法重现性较好。

2.5 稳定性试验:取供试品溶液分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 进行测定,考察色谱峰与其共有模式比较的相似度,结果表明:不同时间点采集的色谱峰相似度分别为 0.996、0.992、0.983、0.996、0.995、0.999、0.998,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.6 样品测定:将不同树龄银杏叶在不同采收期采集的 35 批样品分别制备供试品溶液,进样 20 μ L,按选定的 HPLC 色谱条件分析测定,采集 60 min 的数据,并将采集的数据导出,供计算机辅助相似性评价系统进行评价。

2.7 应用计算机辅助相似性评价系进行数据处理:将采集的数据导入中药指纹图谱相似度计算软件(Ver 1.315,中南大学中药现代化研究中心研制),经数据剪切、等长处理、数据平移,然后将谱峰进行自动匹配,接着进行全谱相似度分析。求出各谱峰的共有模式(同一树龄的银杏叶不同采收期指纹图谱共有模式图和同一采收期不同树龄的银杏叶指纹图谱共有模式图各选出 1 张代表性图谱,见图 1、2)及各谱峰与共有模式比较的相似度,结果见表 1、2。

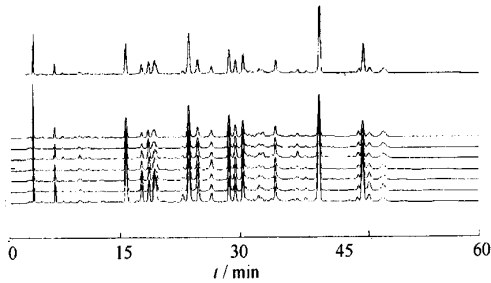


图 1 二年生银杏叶 5~10 月份采集样品共有模式图
Fig. 1 Common pattern of biennial *G. biloba* leaves collected from May to October

2.8 结果

2.8.1 由表 1 可以看出,同一树龄不同采收期的银杏叶相似度评价中,二至四年生银杏叶不同采收期样品指纹图谱相似度高(大于 0.90);五年生和六年生银杏叶不同采收期样品指纹图谱相似度变化范围较大(0.86~0.97)。提示二至四年生银杏叶分别在 5~10 月不同的生长期所含成分虽然有差异,

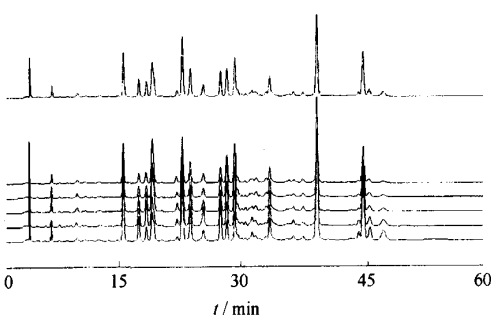


图 2 六月份采集不同树龄银杏叶共有模式图
Fig. 2 Common pattern of different tree-aged *G. biloba* leaves collected in June

表 1 同一树龄的银杏叶不同采收期指纹图谱相似度评价
Table 1 Evaluation of fingerprint similarity of *G. biloba* leaves at same tree ages and different collecting time

树龄	时 间						
	05-12	06-15	07-15	08-15	09-02	09-16	10-03
二年生	0.950	0.974	0.994	0.996	0.975	0.984	0.959
三年生	0.938	0.990	0.991	0.981	0.988	0.969	0.955
四年生	0.946	0.971	0.989	0.928	0.957	0.985	0.960
五年生	0.860	0.904	0.979	0.932	0.840	0.923	0.895
六年生	0.911	0.919	0.929	0.926	0.867	0.946	0.892

表 2 同一采收期不同树龄的银杏叶指纹图谱相似度评价
Table 2 Evaluation of fingerprint similarity of *G. biloba* leaves at same collecting time and different tree ages

时间	二年生	三年生	四年生	五年生	六年生
05-12	0.916	0.941	0.989	0.987	0.958
06-15	0.922	0.970	0.991	0.985	0.968
07-15	0.929	0.970	0.996	0.956	0.940
08-15	0.928	0.930	0.959	0.885	0.889
09-02	0.854	0.912	0.993	0.901	0.956
09-16	0.897	0.903	0.988	0.849	0.916
10-03	0.921	0.926	0.967	0.861	0.912

但成分的组成和比例有较好的一致性;五年生和六年生银杏叶分别在 5~10 月份不同的生长期成分的组成和比例有一定的变化。

2.8.2 由表 2 可以看出,同一采收期不同树龄的银杏叶指纹图谱相似度评价中,5~7 月不同树龄银杏叶指纹图谱相似度高(大于 0.90);8~10 月不同树龄银杏叶指纹图谱相似度变化范围较大(0.84~0.99)。提示不同树龄银杏叶分别在 5~7 月所含成分的组成和比例有较好的一致性,8~10 月所含成分的组成和比例有一定的变化。鉴于邳州银杏叶生产基地药农传统采药时间为 8 月底到 9 月初,为了保证所采集银杏叶质量有较好的一致性,建议采叶时间提前到 7 月份。

3 讨论

3.1 银杏叶高效液相色谱图可分离出 90 多个峰, 如果按照国家药典委员会关于“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知”进行谱峰分析, 计算共有峰相对保留时间和相对峰面积, 面积小的峰就会作为非共有峰或未被识别出来, 这样部分信息会被丢失, 而采用计算机辅助相似性评价系统软件进行全谱相似度计算, 对每一个采集点信息进行处理, 能全面反映谱峰之间的相似关系。

3.2 在方法学考察中, 本研究对精密度、稳定性、重现性实验数据应用相似度软件处理, 结果相似度均应在 0.90 以上, 符合指纹图谱研究技术要求。

3.3 将不同树龄银杏叶在不同采收期采集的 35 批样品进行相似度分析, 剔除相似度小于 0.90 的样品, 建立相似度大于 0.90 的样品共有模式, 作为

邳州银杏叶的标准指纹图谱, 以此作为银杏叶投料标准。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol. 1. 2005.
- [2] Ju J M, Duan J A, Qian D W, et al. A study on the changing rules for total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves in different planting models and growing seasons [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23 (3): 195-198.
- [3] Qian D W, Ju J M, Zhu L Y, et al. Study on changing rules for total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves at different ages of tree and collecting seasons [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (11): 1025-1027.
- [4] Qian D W, Ju J M, Zhu L Y, et al. Analysis of total flavonoids and total terpene lactones in *Ginkgo biloba* leaves in Pizhou [J]. *Res Pract GAP* (GAP 研究与实践), 2002, 2 (1): 36-38.
- [5] You S, Wang L, Jiang Y H, et al. Research on fingerprint chromatography of *Ginkgo biloba* leaves injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (3): 216-218.

近红外漫反射光谱技术测定牛膝中蜕皮甾酮

白 雁¹, 余振喜¹, 孙素琴², 朱风云¹, 王 东¹, 陈志红¹

(1. 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2. 清华大学 分析中心, 北京 100084)

摘要:目的 利用近红外漫反射光谱技术和偏最小二乘法测定牛膝中蜕皮甾酮。方法 近红外漫反射光谱技术和偏最小二乘法。结果 所建立预测方程样品的预测值和真实值之间的相关系数为 0.948 9, 该法的建立证明了近红外漫反射光谱技术应用于中药中化学成分测定的可行性。结论 同其他测定方法相比该法操作简单、速度快、效率高、无污染、费用低、无需复杂的前处理, 可以直接对大量未知样品进行测定。

关键词:牛膝; 蜕皮甾酮; 近红外漫反射光谱

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)09-1391-04

Determination of ecdysterone in *Radix Achyranthis Bidentatae* by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy

BAI Yan¹, YU Zhen-xi¹, SUN Su-qin², ZHU Feng-yun¹, WANG Dong¹, CHEN Zhi-hong¹

(1. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Analyzing Centre of Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: **Objective** To determine ecdysterone content in *Radix Achyranthis Bidentatae* by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy (NIRDRS) combined with partial least squares (PLS). **Methods** NIRDRS and PLS. **Results** The correlation coefficient of the quantitative mathematics model between the prediction and the true values was 0.948 9. It is feasible to applying the above established method to determination of chemical constituents in Chinese materia medica. **Conclusion** Compared with other methods, the method is simple, rapid, high efficient, low expenditure, no pollution and with preparation undone and is suit for large quantity of unknown samples.

Key words: *Radix Achyranthis Bidentatae*; ecdysterone; near-infrared diffuse reflectance spectroscopy (NIRDRS)