

灰毡毛忍冬粉末腺毛头部大多为圆盘形,也有扁圆形、倒圆锥形或倒梨圆形,顶端平坦或微凹,侧面观约 5~16 个细胞,排成 2~3 层,直径 37~118  $\mu\text{m}$ ,柄较短,2~3 个细胞,长 32~240  $\mu\text{m}$ 。

## 2 讨论

文中找出细毡毛忍冬和灰毡毛忍冬在外观形态和组织构造上的主要鉴别特征和区别点。两植物形态在叶和花蕾上有较大区别;在解剖镜下观察药材性状,花蕾表面被毛情况区别明显;组织构造主要以腺毛为区分。

灰毡毛忍冬为《中国药典》收载品种,而细毡毛忍冬仅为四川、湖南、贵州地方药材标准收载品种。两者在四川、重庆、湖南、贵州等地均大量栽培,常混

采混收,商品上两者不易区分。细毡毛忍冬分布广,资源丰富,绿原酸含量较高,质量好,在四川大量栽培,且广泛使用,是一值得开发利用的金银花类药材的新资源,建议收入《中国药典》。

## 参考文献:

- [1] 四川省卫生厅. 四川省中药材标准 [S]. 1987. 146 - 150.
- [2] 湖南省卫生厅. 湖南省中药材标准 [S]. 1993. 191 - 192.
- [3] 贵州省卫生厅. 贵州省中药质量标准 [S]. 1988. 238 - 239.
- [4] 石钺, 石任兵, 陆蕴如. 我国药用金银花资源、化学成分及药理研究进展 [J]. 中国药学期刊, 1999, 34 (11): 724 - 727.
- [5] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 21 - 22.
- [6] 徐炳声, 汪汉津. 中国植物志 [M]. 第 72 卷. 北京: 科学技术出版社, 1988. 248 - 250.

收稿日期: 2007 - 11

# 何首乌的 HPLC 指纹图谱

房志坚<sup>1</sup>, 周洪波<sup>1</sup>, 杨立伟<sup>2</sup>, 陈浩桢<sup>2</sup>

(1. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006; 2 广东省药品检验所, 广东 广州 510180)

**摘要:** 目的 研究何首乌药材的指纹图谱。方法 采用 RP - HPLC 法, 以 2, 3, 5, 4 - 四羟基二苯乙烯 - 2 - O -  $\beta$  - D - 葡萄糖苷为参照物, 采用 Zorbax SB C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm  $\times$  4. 6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为甲醇 - 水, 梯度洗脱, 流速 1 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm。结果 获得了较理想的指纹图谱, 确定了 9 个共有峰, 建立了何首乌共有模式色谱图, 不同产地何首乌的相似度均大于 0.9。结论 所建方法简便、准确, 重复性好, 为何首乌的质量控制提供了依据。

**关键词:** 何首乌; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103 (2008) 05 - 0513 - 03

## Fingerprint chromatogram of Radix Polygoni Multiflori by HPLC

FANG Zhi - jian<sup>1</sup>, ZHOU Hong - bo<sup>1</sup>, YANG Li - wei<sup>2</sup>, CHEN Hao - an<sup>2</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China; 2 Guangdong Institute For Drug Control, Guangzhou 510180, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To establish HPLC chromatographic fingerprint of Radix Polygoni Multiflori. **METHODS** 2, 3, 5, 4 - tetrahydroxystilbene - 2 - O -  $\beta$  - D - glucoside was employed as standard substance for RP - HPLC methods. The separation was performed on Zorbax SB - C<sub>18</sub> column (250 mm  $\times$  4. 6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), with methanol and water as mobile phase for gradient elution. Flow rate was 1 ml  $\cdot$  min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was 254 nm. **RESULTS** A satisfactory method for HPLC fingerprint determination of Radix Polygoni Multiflori from different sources was obtained, and 9 peaks on the chromatographic fingerprint of Radix Polygoni Multiflori was determined, the mutual model of Radix Polygoni Multiflori was established and the similarities were calculated. The results showed the similarities were more than 0.9 in Radix Polygoni Multiflori from different sources except 3 batches. **CONCLUSION** The method is simple and accurate with a good reproducibility and can be used as a standard method in controlling the quality of Radix Polygoni Multiflori.

**Key words:** Radix Polygoni Multiflori; HPLC; Chromatographic fingerprint

**CLC number:** R917

**Document code:** A

**Article ID:** 1006 - 0103 (2008) 05 - 0513 - 03

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum Multiflorum* Thunb 的干燥块根<sup>[1]</sup>, 在中国分布广泛, 广东德

基金项目: 广州市科技攻关重点项目 (2007Z2 - E5061); 广东省科技计划项目 (2007B031407003)

作者简介: 房志坚 (1956 - ), 男, 副教授, 从事中药资源与中药质量标准研究。E - mail: jian139@tom.com

庆有大规模种植。色谱指纹图谱是一种符合中药特色的质量控制方法<sup>[2]</sup>。因此,特建立了何首乌药材的色谱指纹图谱,并分析比较不同来源何首乌药材的色谱图,为其质量控制提供依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

2695 Separations Module 系列高效液相色谱仪包括 2487 紫外检测器、2996 二极管激光阵列检测器、Empower 化学工作站(美国 Waters); KQ-300DA 超声仪(功率 300 W, 频率 50 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); 电子分析天平(赛多利斯); Laborota 4003 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph)。2, 3, 5, 4-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(THSG, 批号: 110844-200505)、大黄素(emodin, 批号: 110756-200110)、大黄酸(rhein, 批号: 0757-200005)、大黄素甲醚(phycion, 批号: 110758-200509)、大黄酚(chrysophanol, 批号: 110796-200310)对照品(中国药品生物制品检定所); 乙醇为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 何首乌药材共 11 个样品, 鉴定为蓼科植物 *Polygonum Multiflorum* Thunb 何首乌(表 1)。

表 1 何首乌药材的来源

Table 1 Origins of the samples

Sample No	Origin and time
1	Enshi, Hubei, 2005
2	Jinggangshan, Jiangxi, 2005
3	Market, Guangzhou, Guangdong, 2006
4	Market, Guangzhou, Guangdong, 2006
5	Jiyuan, Henan, 2006
6	Tianyang, Guangxi, 2006
7	Emeishan, Sichuan, 2005
8	Taian, Shandong, 2005
9	Deqing, Guangdong, 2005
10	Zhaoqing, Guangdong, 2006
11	Jingxi, Guangxi, 2005

### 1.2 方法与结果

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Zorbax SB C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为水(A)-乙腈(B)梯度洗脱程序: 0~5 min 时 A-B(85:15), 35 min 时 A-B(40:60), 50 min 时 A-B(5:95), 60 min 时 A-B(5:95); 柱温 30 °C; 流速 1 ml·min<sup>-1</sup>; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μl。

**1.2.2 溶液的制备** 精密称取经 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 真空干燥 24 h 的 THSG 适量, 加乙醇制成 0.1 mg·ml<sup>-1</sup> 的对照品溶液; 分别精密称取大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、大黄酸对照品适量, 加甲醇分别制成含大黄酚、大黄素、大黄素甲醚、大黄酸各 20 μg·ml<sup>-1</sup> 的对照品溶液。取何首乌药材粉末(过 2 号筛)约 1 g, 置具塞

锥形瓶中, 精密加入 25 ml 乙醇, 称定重量, 超声处理 10 min, 用乙醇补足减失的重量, 过滤, 滤渣再精密加入 25 ml 乙醇, 称定重量, 超声处理 10 min, 用乙醇补足减失的重量, 过滤, 合并两次滤液, 减压蒸干, 残渣以乙醇溶解, 转移至 25 ml 量瓶中, 并用乙醇定容, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

**1.2.3 精密度试验** 取同一份供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图。各色谱峰的  $k_r$  和相对峰面积基本一致, RSD 均小于 3.0%。表明仪器精密度良好。

**1.2.4 稳定性试验** 取同一份供试品溶液, 记录 0, 1, 2, 4, 6, 12 h 的色谱图。各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD 均小于 3.0%。表明样品在 12 h 内稳定。

**1.2.5 重复性试验** 取同一何首乌药材样品 6 份, 按照“1.2.2 项下制备供试品溶液, 在“1.2.1 项色谱条件下记录色谱图, 各色谱峰的  $k_r$  和相对峰面积基本一致, RSD 均小于 3.0%。表明方法重复性良好。

**1.2.6 提取方法的优化** 采用正交试验设计方法, 4 个因素为乙醇浓度、乙醇用量、提取次数和超声时间, 优化筛选何首乌药材的提取条件。按拟定的色谱条件获得色谱图, 以 7 个最强色谱峰的峰面积之和作为选择何首乌超声提取条件的考察指标<sup>[5]</sup>。采用直观分析法分析正交实验设计的结果, 再结合单因素优化, 最终确定提取方法。

**1.2.7 指纹图谱的测定** 按“1.2.2 项供试品溶液的制备方法, 制备表 1 所列何首乌样品的溶液, 吸取各供试品溶液及对照品溶液, 按“1.2.1 项下条件测定, 记录色谱图并进行分析, 总结出典型色谱峰 9 个, 色谱图见图 1。

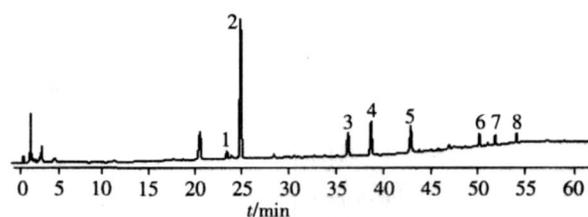


图 1 何首乌的色谱指纹图谱

Fig 1 Chromatogram fingerprint of Radix Polygoni Multiflori

1. Rhein; 2. 2, 3, 5, 4-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside; 6. emodin; 7. phycion; 8. chrysophanol

**1.2.8 整体的质量评价** 用中国药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件, 建立共有模式并计算 11 个样品的相似度。结果显示, 11 个样品相似度分别为 0.994, 0.838, 0.995, 0.996, 0.977, 0.863, 0.556, 0.906, 0.994, 0.995, 0.963。其中 3 批的相似度低于 0.9, 说明不同产地何首乌存在差异(图 2)。

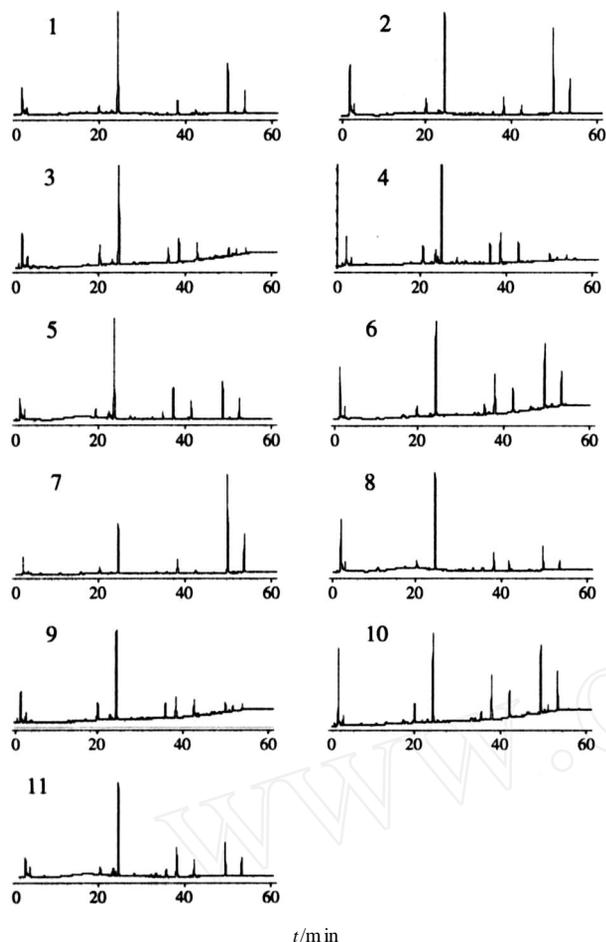


图 2 不同产地的何首乌色谱指纹图谱

Fig 2 Chromatograms fingerprint of Radix polygoni multiflori from different producing area

No 1 ~ 11 were the same as table 1

## 2 讨论

2, 3, 5, 4 - 四羟基二苯乙烯 - 2 - O - - D - 葡萄糖苷 (THSG) 是何首乌药材的主含成分, 其出峰时间居中, 且与附近其他峰分离良好, 故选其作为参照峰。曾选择比较了 Phenomenex gemini  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Thermo ODS - 2 HYSRSL (200 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Shimadzu VP - ODS (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Agilent Zorbax SB -  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Supelco Discovery  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Ultimate XB  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Dikma Diamonsil  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) 7 种色谱柱; 流动相甲醇 - 水、乙腈 - 水、甲醇 - 0.1% 磷酸、乙腈 - 0.1 磷

酸等度或梯度洗脱。最终, 选择色谱柱为 Agilent Zorbax SB -  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 甲醇 - 水为流动相梯度洗脱, 使何首乌中所有峰达到基线分离, 且稳定性良好。利用二极管激光阵列检测器, 从 200 ~ 400 nm<sup>[3,4]</sup> 分别选择 210、254、280、320 nm 显示图谱。210 nm 处在甲醇末端吸收区, 基线不稳定; 320 nm 的何首乌药材色谱图中, THSG 的色谱峰太强, 其他色谱峰难以直观表现。为了充分直观反映其他化学成分, 综合比较不同波长后, 发现在 254 nm 处, 色谱图反映的信息最多, 且基线平稳。

文中建立了 11 批何首乌样品构成的共有模式色谱图, 并进行相似度评价, 有 3 批相似度低于 0.9, 其中, 7 号样品的相似度只有 0.556, 说明不同产地何首乌之间存在差异。通过色谱指纹图谱可反映何首乌的内在质量, 并可鉴别不同产地何首乌之间的差异, 有助于何首乌药材的标准化种植。通过正交实验设计, 结合直观分析法对实验数据进行处理, 可优化供试品的制备方法, 提高提取效率, 增强色谱指纹图谱的稳定性; 以 7 个强共有峰的峰面积之和 (其面积之和占总峰面积 90% 以上) 作为考察指标, 使最终确定的供试品制备办法能保证各色谱峰峰面积之和最大化, 体现了色谱指纹图谱从整体上反映药材内在质量的特点。

文中所建方法简便可靠、分离效果好、共有峰的保留值稳定、具较好的稳定性和可控性, 可用于控制和评价何首乌的质量。

## 参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 122
- [2] XIE Pei-shan, CHEN Si-bao, LIANG Yi-zeng, et al. Chromatographic fingerprint analysis - a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine [J]. J chromatogr A, 2006, 1112: 171 - 174.
- [3] 刘训红, 陈斌, 蔡宝昌, 等. 赤首乌和白首乌的 HPLC 指纹图谱鉴定研究 [J]. 中草药, 2005, 36 (11): 1704 - 1706.
- [4] 刘振丽, 宋志前. 制何首乌高效液相指纹图谱分析 [J]. 中成药, 2005, 27 (4): 378 - 380.
- [5] YANG Li-wei, WU Ding-hong, TANG Xi, et al. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography - photodiode array detection [J]. J chromatogr A, 2005, 1070: 35 - 38.

收稿日期: 2007 - 12