

赤首乌和白首乌的 HPLC 指纹图谱鉴定研究

刘训红¹, 陈斌¹, 蔡宝昌¹, 王玉玺²

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029; 2. 南京生物工程与医药科技发展有限公司, 江苏 南京 210036)

摘要:目的 建立赤、白首乌 HPLC 指纹图谱鉴定方法。方法 用 RP-HPLC(DAD)法, 梯度洗脱, 测定赤、白首乌、加工炮制品及其何首乌粉的指纹图谱, 并作相似度比较分析。结果 何首乌不同样品指纹图谱相似度较好, 而何首乌与白首乌的指纹图谱具有明显区别, 何首乌炮制前后、白首乌加工前后也有差异。结论 HPLC 指纹图谱具有重现性好、特征性强、方法简便等特点, 可用于赤、白首乌药材的鉴别。

关键词:何首乌; 白首乌; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号:R282

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)11-1704-03

Identification on *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Cynanchi Auriculati*
by HPLC fingerprint

LIU Xun-hong¹, CHEN Bin¹, CAI Bao-chang¹, WANG Yu-xi²

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Nanjing Bio-engineering and Medical Technology Development Co., Ltd., Nanjing 210036, China)

Abstract: **Objective** To establish HPLC fingerprint for the identification of *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Cynanchi Auriculati*. **Methods** Chromatographic fingerprint of *Radix Polygoni Multiflori*, *Radix Cynanchi Auriculati*, *Radix Polygoni Multiflori Preparata*, and "HESHOU WU FEN" was determined by RP-HPLC (DAD) and the gradient elution mode applied in chromatographic separation, data were analysed by Fingerprint Similarity Evaluation Software to compare the similarity of samples. **Results** *Radix Polygoni Multiflori* from different samples were of high similarity, but *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Cynanchi Auriculati* showed evident difference in fingerprint, and there was difference in fingerprint through processing them. **Conclusion** HPLC fingerprint method is repeatable and feasible and can be used for the identification of *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Cynanchi Auriculati*.

Key words: *Radix Polygoni Multiflori*; *Radix Cynanchi Auriculati*; fingerprint; HPLC

何首乌自古分赤、白两种。赤首乌即为《中国药典》记载的何首乌, 系蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的块根^[1]; 白首乌为萝藦科植物耳叶牛皮消 *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight 等牛皮消属的块根, 民间作何首乌用^[2]。具有补肝肾、益精血、乌须发、延年益寿等功效, 是常用的补益中药, 在国内外享有盛名。何首乌炮制后(制何首乌)补益作用增强, 白首乌加工成“精制何首乌粉”(商品名应更名为白首乌粉)作营养滋补品销售。据文献记载^[2], 何首乌主要含蒽醌类、二苯乙烯苷、卵磷脂等成分, 白首乌主要含 C₂₁甾苷类、磷脂类成分。本实验采用高效液相色谱法对赤、白首乌指纹图谱

鉴定进行了初步探讨, 以期为何首乌质量控制和药材鉴别提供一些依据。

1 材料与仪器

1.1 药材: 何首乌采自安徽六安、全椒及南京老山等地或市售品, 共 10 份样品, 除南京老山为野生品外, 其他均为栽培品, 经笔者鉴定均为蓼科植物何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的块根; 制何首乌购自安徽六安, 经鉴定为何首乌的炮制加工品; 白首乌采自江苏滨海五汛、振东等地, 为栽培品, 经鉴定为萝藦科植物耳叶牛皮消 *C. auriculatum* Royle ex Wight 的块根; “精制何首乌粉”为市售商品, 购自江

收稿日期: 2005-01-25

基金项目: 江苏省高校自然科学研究计划项目(03KJA360092)

作者简介: 刘训红(1959—), 男, 江苏滨海人, 硕士, 南京中医药大学药学院教授, 主要从事中药品质鉴定研究, 主持或参加了“江苏地产药材太子参的活性成分研究”“中药材光谱鉴别”“中药全息指纹图谱数据库的研制”“江苏地产太子参指纹谱与 GAP 的基础研究”等国家级或省级科研项目 13 项, 负责完成了国家中医药管理局重大课题《中华本草》“药材专业”的编撰工作。获科技进步奖 2 项, 获国家发明专利 2 项。 Tel: (025)86798190 85811511 E-mail: Liuxunh1959@shou.com

苏盐城,经鉴定为白首乌粉。

1.2 仪器与试剂:Agilent 1100 液相色谱仪(自动进样品),二极管阵列检测器(DAD);METTLER AE240 电子天平;HH-6 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。对照品大黄素为实验室自制,质量分数为 97.72%。乙腈(美国 Tedia 公司,色谱纯),重蒸去离子水(实验室制备),乙醇(上海化学试剂有限公司,分析纯;Tedia 公司,色谱纯),氯仿(上海化学试剂有限公司,分析纯),异丙醇(上海化学试剂有限公司,分析纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX 80A Extend- C_{18} 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:水(A)与乙腈(B)梯度洗脱,梯度条件 0→60 min, A(%)98→0, B(%)2→100, 60→80 min, A(%)0→0, B(%)100→100;体积流量:1.0 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:210 nm;参比波长:360 nm;分析时间:80 min;进样量:20 μ L。

2.2 供试品的制备:精密称取药材粗粉 5.0 g,置圆底烧瓶中,加乙醇 100 mL,水浴加热回流提取 3 次,合并滤液,将滤液浓缩至小体积,用氯仿 40 mL 萃取 2 次,合并萃取液,用无水 Na_2SO_4 脱水,滤过,滤液浓缩至适当体积,蒸干,残渣加异丙醇溶解,定容至 25 mL 量瓶中。用微孔滤膜(孔径为 0.45 μ m)滤

过,滤液作为供试品。

2.3 对照品的制备:精密称定大黄素对照品适量,加甲醇制成 20 μ g/mL 的溶液,作为对照品液。

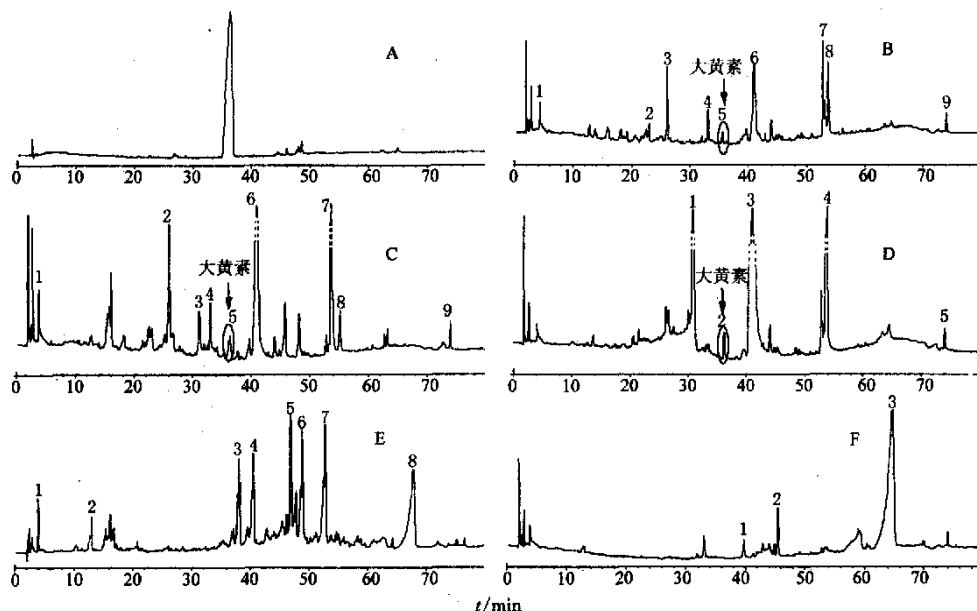
2.4 方法学考察:以南京老山产何首乌药材为样品,对其稳定性、仪器精密度、实验方法重现性作了相应考察,结果证明稳定性及重现性良好。

2.4.1 稳定性试验:取同一份供试品溶液,分别在 0、2、4、7、11、16、22、29、36 h 进行检测,考察色谱峰相对保留时间的一致性,各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0.2%~2.9%。

2.4.2 精密度试验:取同一份供试品溶液,连续进样 5 次,考察色谱峰相对保留时间的一致性,各色谱峰相对保留时间的 RSD 均低于 3%。

2.4.3 重现性试验:取同一批号的供试品 5 份,同法检测,考察色谱峰相对保留时间的一致性,以 t_R 为 36.3 min 的大黄素峰为对照,各色谱峰相对保留时间的 RSD 均低于 3%。直观观察叠加的色谱图,也可判断峰位有良好的重合。

2.5 指纹图谱建立:精密吸取对照品与供试品溶液各 20 μ L,注入高效液相色谱仪,按选定的色谱条件,进行检测。同一实验条件下,测定所有供试品 HPLC 色谱图。根据不同批次供试品测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对保留时间)等相关参数,进行分析、比较,制定优化的指纹图谱(图 1)。



A-大黄素 B-何首乌(栽培品) C-何首乌(野生品) D-制何首乌 E-白首乌 F-白首乌粉
A-emodin B-*Radix Polygoni Multiflorum* (culture) C-*Radix Polygoni Multiflori* (wild) D-*Radix Polygoni Multiflori* Preparata E-*Radix Cynanchi Auriculati* F-"HE SHOU WU FEN"

图1 赤首乌和白首乌的HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Cynanchi Auriculati*

2.6 指纹图谱分析

2.6.1 共有指纹峰标定:经与对照品对照以及比较所有测定和记录的色谱图,何首乌标定9个共有峰作为指纹图谱的特征峰,制何首乌标定5个共有指纹特征峰。与大黄素对照品峰(5号峰)相比,何首乌其他8个共有指纹峰相对保留时间依次为:栽培品0.119、0.647、0.734、0.929、1.153、1.485、1.510、2.081,野生品0.104、0.717、0.855、0.907、1.127、1.474、1.514、2.030;制何首乌其他4个共有指纹峰相对保留时间依次为:0.853、1.138、1.485、2.041。白首乌经比较所有测定和记录的色谱图,标定8个共有指纹特征峰,以供试品中保留时间约为38 min的共有指纹峰为参照,与参照峰(3号峰)相比,其他7个共有指纹峰相对保留时间依次为:0.100、0.339、1.064、1.232、1.284、1.387、1.782。

2.6.2 何首乌指纹图谱相似度评价:将10个批次何首乌样品测试数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,经选峰,设定匹配模板,将谱峰自动匹配;然后设定标准模板,进行谱峰差异性评价和整体相似性评价。通过中药指纹图谱相似度计算软件得出何首乌HPLC指纹谱共有模式,与共有模式比较,10个批次何首乌的相似度:安徽六安(1)0.93,六安(2)0.90,安徽全椒0.94,安徽滁州商品0.91,南京老山(野生)0.82,江苏省中医院药房0.89,南京同仁堂药店0.88,南中医药大国医堂0.92,河南商品0.96,扬州商品0.95。

2.6.3 赤首乌和白首乌的指纹图谱比较:从各自的指纹图谱中,可以直观地看出,何首乌和白首乌的指纹图谱明显不同,其特征峰数目、位置(相对保留时

间)、积分值都有显著差异,何首乌含有大黄素,白首乌则没有。何首乌与制何首乌,白首乌与白首乌粉,它们的指纹图谱也有差异。

3 讨论

3.1 通过对不同提取溶剂、提取方法进行实验比较,对赤首乌和白首乌的色谱图同时进行考察,并作综合分析,拟定上述供试品的制备方法。

3.2 在色谱条件优化过程中,主要考察何首乌的色谱图,适当兼顾白首乌的色谱峰分离情况。经实验比较,以水与乙腈为流动相,按上述条件进行梯度洗脱,能较好地使何首乌样品中各色谱峰分离且出峰较多;采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察,记录并比较不同波长的色谱图,结果在230 nm检测波长下,何首乌色谱图中色谱峰较多,信息丰富,故选择230 nm为检测波长。

3.3 相似度分析结果表明,何首乌不同样品指纹图谱相似度较好,而何首乌与白首乌的指纹图谱具有明显区别,何首乌炮制前后、白首乌加工前后的指纹图谱也有差异。

3.4 赤首乌和白首乌加工炮制前后指纹图谱显示出的差异,主要是由于何首乌通过炮制后,结合型蒽醌量降低而游离型蒽醌增加;白首乌在加工制成“白首乌粉”的过程中, C_{21} 甾苷类成分大量流失所致。

3.5 本实验对何首乌HPLC指纹图谱的构建进行了初步探讨,可为首乌类药材的品种鉴定和质量评价提供依据。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Xiao P G. *Modern Chinese Materia Medica* (新编中药志) [M]. Vol 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.

广州相思子GAP栽培技术研究

岑丽华¹,徐良^{1*},郑雪花^{2*},周路山²

(1. 广州中医药大学,广东 广州 510405; 2. 广药集团广州市药材公司,广东 广州 510130)

摘要:目的 对广州相思子(鸡骨草)实施规范化栽培(GAP)研究,探索优质丰产栽培技术。方法 以国家食品药品监督管理局颁布的《中药材生产质量管理规范》为指导原则,开展鸡骨草GAP栽培。结果 实施GAP栽培管理鸡骨草的浸出物和黄酮量比非GAP栽培管理的高,农残和重金属的量较低。结论 开展鸡骨草GAP种植,通过严格选地、选种、选施无污染无公害肥料与农药,可有效地控制药材中有害重金属与农药残留量,提高鸡骨草的质量和产量。

收稿日期:2005-01-22

基金项目:广东省、广州市中药现代化科技攻关资助项目(2003C60403;2003Z3-E5051;112K4030008 穗科条[2003]41号)

*通讯作者 徐良 Tel:(020)86235281 E-mail:cgzxl@163.com

** 湖南中医学院 2002 级硕士研究生