

## 不同产地何首乌 HPLC 指纹图谱研究

李帅锋<sup>1</sup>, 郑传柱<sup>1</sup>, 张丽<sup>1</sup>, 兰才武<sup>2</sup>, 贺定翔<sup>2</sup>, 姚卫峰<sup>1</sup>, 尚尔鑫<sup>1</sup>, 丁安伟<sup>1\*</sup>

1. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

2. 贵州昌昊中药发展有限公司, 贵州 凯里 556000

**摘要:** 目的 建立不同产地何首乌 *Polygonum multiflorum* 的 HPLC 指纹图谱。方法 采用 HPLC 法建立不同产地 16 批何首乌药材的指纹图谱, 色谱条件为 Extend C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 通过 Matlab 软件对共有峰面积进行主成分分析, 同时对 16 批何首乌中的二苯乙烯苷进行测定。结果 16 批何首乌的相似度在 0.936~0.998, 说明不同产地何首乌样品质量稳定。同时确定了 18 个共有峰, 并通过 HPLC/Q-TOF/MS 对何首乌共有峰进行定性分析。主成分分析结果与相似度分析结果一致, 同时二苯乙烯苷量与主成分分析结果一致。结论 该方法简便、可靠, 可为何首乌药材的质量控制提供指导和依据。

**关键词:** 何首乌; HPLC; 指纹图谱; HPLC/Q-TOF-MS; 二苯乙烯苷

**中图分类号:** R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)14-2149-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.14.022

## HPLC fingerprint on roots of *Polygonum multiflorum* from different habitats

LI Shuai-feng<sup>1</sup>, ZHENG Chuan-zhu<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, LAN Cai-wu<sup>2</sup>, HE Ding-xiang<sup>2</sup>, YAO Wei-feng<sup>1</sup>, SHANG Er-xin<sup>1</sup>, DING An-wei<sup>1</sup>

1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Guizhou Changhao Chinese Medicine Development Co., Ltd., Kaili 556000, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC-fingerprint method for evaluating the quality of the root of *Polygonum multiflorum* from different habitats in China. **Methods** A separation was performed on an Agilent extend C<sub>18</sub> chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution. The mobile phase consisted of acetonitrile-formic acid water solution (0.1%). And the mobile phase was at flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was at 280 nm. HPLC fingerprint chromatograms of 16 batches of crude material of the roots of *P. multiflorum* were analyzed. Chemometric methods including principle component analysis (PCA), and clustering analysis (CA) were used through the software of Matlab for common peaks. And the content of 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-D-glucoside was determined by HPLC. **Results** The similarities of the 16 batches of samples were between 0.936 and 0.998. This showed that the quality of the roots of *P. multiflorum* from different habitats in China was stable. Eighteen common peaks were identified by HPLC/Q-TOF/MS. The results of FCA and CA were consistent with similarity evaluation. The content of 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-D-glucoside was consistent with principle component loading factors. **Conclusion** The method is simple reliable, and it can provide a standard and guidance for the quality control of the roots of *P. multiflorum*.

**Key words:** *Polygonum multiflorum* Thunb.; HPLC; fingerprint; HPLC/Q-TOF-MS; 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-D-glucoside

何首乌为蓼科 (Polygonaceae) 植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。有生首乌和制首乌之分。生首乌苦泄性平兼发散, 具有解毒消

痈、润肠通便、截疟的功能。制首乌味甘厚性温, 具有补肝肾, 益精血、乌须发、强筋骨的作用<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 何首乌中主要含有二苯乙烯苷、蒽醌类及

收稿日期: 2015-01-19

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2011BAI13B04); 2011 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心建设首批重点项目 (ZDXM-1-3); 贵州省中药现代化专项 (黔科合中药字[2013]5059 号)

作者简介: 李帅锋 (1988—), 男, 硕士研究生。Tel: 18351895627 E-mail: lishuafeng0219@163.com

\*通信作者 丁安伟, 教授, 博士研究生导师, 从事中药炮制与质量控制研究。Tel: (025)85811523 E-mail: awding105@163.com

磷脂类等活性成分<sup>[2]</sup>,其中二苯乙烯苷因具有抗衰老、降低胆固醇、提高免疫功能、防止动脉硬化、保护肝脏<sup>[3]</sup>等作用,故《中国药典》中将其作为何首乌定量的控制标准。何首乌主产于贵州、四川、云南、湖北、广东、广西、湖南、江苏、河南等地,规格等级复杂,加之采收时间、炮制加工、贮存等因素的制约,故在功效、作用上存在一定的差异,仅凭个别化学成分的量难以全面反映药材的质量,目前,有很多文献研究何首乌的指纹图谱,但是仍然存在共有峰数目较少、不能全面地评价何首乌的质量,缺乏对共有峰进行定性等问题。本实验以 HPLC 法建立何首乌的 HPLC 指纹图谱,并应用主成分分析对实验数据进行处理,同时采用 HPLC/Q-TOF-MS 和对照品对照对何首乌共有峰进行归属,用于全面评价何首乌的质量。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent1290 高效液相色谱仪,配 1260 DAD 检测器; Agilent1260 高效液相色谱仪,配 1260 DAD 检测器; Waters2695 高效液相色谱仪,配 2998PDA 检测器; Triple Q-TOF 5600 质谱仪(AB 公司),配备电喷雾离子源系统,岛津高效液相 LC-20AD; 电子天平 AY220 (0.1 mg, 江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂), DK-S22 电热恒温水浴锅(上海精密实验设备有限公司)。

### 1.2 药材和试剂

16 批生何首乌药材 *Polygoni Multiflori Radix* 由贵州昌昊中药发展有限公司提供,产地见表 1。经

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

编号	产地
S1	贵州省余庆县敖溪镇
S2	贵州省赫章县平山乡
S3	贵州省施秉县牛大场镇
S4	湖北省罗田县九资河镇
S5	云南省丽江市永胜县上巳村
S6	湖北省黄山县石镇
S7	四川省北川县
S8	广西省南丹县城关龙五坡脚镇
S9	浙江省临江市瑞口镇
S10	贵州省威宁县小海镇
S11	贵州省普安县
S12	重庆市丰都县
S13	贵州省凯里市三棵树镇
S14	贵州省瓮安县
S15	湖南省江华县
S16	广东省高州市

南京中医药大学段金廛教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。

二苯乙烯苷、大黄素甲醚、大黄素对照品购自中国食品药品检定研究院,批号分别为 110844-201310、110758-201415、110756-200110; 乙腈为色谱纯(美国 Merck 公司),甲醇为色谱纯(江苏汉邦公司),甲酸为色谱纯(美国 ACS 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件及质谱条件

**2.1.1 色谱条件** Agilent Extend C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,检测波长 280 nm; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL,流动相为 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱条件为 0~30 min, 8%~30% A; 30~55 min, 30%~70% A; 55~65 min, 70%~80% A; 65~70 min, 80%~100% A; 70~75 min, 100% A; 75~80 min, 100%~8% A; 80~85 min, 8% A。

**2.1.2 质谱条件** 采用 TOF MS-IDA-MS/MS 模式, ESI 负离子模式,扫描范围  $m/z$  100~1 200, 喷雾电压 4 500 eV, 离子源温度 500 °C, 气帘气(CUR N<sub>2</sub>) 0.20 MPa, 雾化器(GSI N<sub>2</sub>) 0.38 MPa, 辅助气 0.38 MPa, 去簇电压(DP) 80 eV IDA 条件下设置: 碰撞电压(CE) 35 eV, 碰撞电压差(CES) 15 eV, 开启动态背景扣除。

### 2.2 对照品溶液的制备

**2.2.1 二苯乙烯苷对照品溶液的制备** 精密称取二苯乙烯苷对照品 11.85 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度, 即得。

**2.2.2 大黄素对照品溶液的制备** 精密称取大黄素对照品约 8.25 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

**2.2.3 大黄素甲醚对照品溶液的制备** 精密称取大黄素甲醚对照品 4.50 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过四号筛)约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 30 mL, 称定重量, 加热回流 45 min, 放冷, 再称定质量, 用 75% 甲醇补足损失的质量, 摇匀, 静置, 上清液滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 稳定性试验** 取何首乌样品, 按供试品溶液的制备方法制备, 分别于 0、2、4、8、12、16 h 依

法进行测定,考察色谱峰相似度的一致性,利用中药指纹图谱相似度评价系统研究版(2012)进行相似度评价。结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积RSD均<3%,表明16h内供试品溶液的成分是稳定的。

**2.4.2 精密度试验** 取何首乌样品,按供试品溶液制备方法制备溶液,依法连续进样6次,利用中药指纹图谱相似度评价系统研究版(2012),进行相似度评价。结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积RSD均<3%,表明仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性试验** 取何首乌样品,按供试品溶液制备方法平行制备供试品溶液6份,依法检测,利用中药指纹图谱相似度评价系统研究版(2012),进行相似度评价。结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积RSD均<3%,表明重复性良好。

**2.5 何首乌中二苯乙烯苷的测定**

取何首乌粉末0.2g,按照《中国药典》2010年规定方法<sup>[1]</sup>测定16批何首乌中二苯乙烯苷量,其结果都达到了《中国药典》2010年版要求,结果见表2。

表2 16批何首乌中二苯乙烯苷量  
Table 2 Content of 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-D-glucoside of 16 batches of samples

样品	质量分数/%	样品	质量分数/%
S1	2.51	S9	3.18
S2	3.86	S10	3.85
S3	3.41	S11	5.30
S4	2.86	S12	2.42
S5	5.69	S13	3.32
S6	3.18	S14	4.74
S7	3.63	S15	2.52
S8	2.37	S16	2.11

**2.6 何首乌药材指纹图谱的建立**

取16批何首乌,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定。

**2.6.1 共有峰的确定** 根据16批何首乌药材高效液相分析,发现18个共有峰,构建了何首乌HPLC色谱图的特征指纹图谱,作为何首乌鉴别的依据,由于二苯乙烯苷在各批次何首乌中均有出现,分离度良好且峰面积较大,故选择二苯乙烯苷(11号峰)作为参照峰,共有峰相对保留时间、相对峰面积结果见表3和4。

表3 共有峰相对峰面积  
Table 3 Relative peak areas of common peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1	0.022	0.006	0.009	0.009	0.011	0.006	0.006	0.015	0.009	0.012	0.004	0.038	0.007	0.004	0.018	0.047
2	0.074	0.067	0.061	0.045	0.060	0.071	0.036	0.202	0.088	0.102	0.046	0.097	0.063	0.046	0.094	0.165
3	0.019	0.016	0.009	0.018	0.011	0.010	0.009	0.031	0.009	0.015	0.010	0.011	0.007	0.010	0.019	0.052
4	0.123	0.018	0.022	0.045	0.027	0.054	0.050	0.216	0.030	0.027	0.009	0.065	0.011	0.013	0.046	0.088
5	0.007	0.010	0.010	0.005	0.010	0.004	0.004	0.041	0.005	0.010	0.005	0.002	0.008	0.004	0.011	0.004
6	0.073	0.008	0.045	0.066	0.041	0.102	0.050	0.083	0.083	0.011	0.060	0.069	0.035	0.050	0.046	0.027
7	0.031	0.090	0.045	0.023	0.058	0.032	0.015	0.173	0.036	0.082	0.024	0.028	0.058	0.032	0.081	0.060
8	0.044	0.015	0.009	0.023	0.009	0.022	0.020	0.027	0.016	0.011	0.014	0.026	0.008	0.013	0.027	0.013
9	0.045	0.068	0.077	0.333	0.181	0.127	0.082	0.333	0.121	0.045	0.033	0.048	0.046	0.024	0.068	0.029
10	0.013	0.020	0.013	0.035	0.016	0.033	0.015	0.051	0.024	0.017	0.016	0.026	0.013	0.016	0.010	0.008
11	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12	0.024	0.095	0.093	0.097	0.100	0.137	0.087	0.055	0.104	0.078	0.050	0.090	0.101	0.045	0.108	0.054
13	0.344	0.079	0.156	0.164	0.164	0.090	0.304	0.043	0.124	0.093	0.138	0.351	0.224	0.099	0.069	0.054
14	0.103	0.056	0.036	0.045	0.053	0.020	0.085	0.030	0.030	0.059	0.032	0.128	0.132	0.033	0.044	0.026
15	0.122	0.017	0.032	0.027	0.028	0.025	0.057	0.020	0.023	0.011	0.026	0.120	0.049	0.026	0.035	0.034
16	0.058	0.009	0.018	0.011	0.015	0.010	0.014	0.016	0.005	0.007	0.009	0.028	0.030	0.012	0.019	0.008
17	0.325	0.092	0.164	0.174	0.144	0.066	0.262	0.028	0.098	0.209	0.063	0.245	0.120	0.050	0.174	0.118
18	0.242	0.077	0.091	0.045	0.095	0.040	0.150	0.018	0.071	0.104	0.052	0.139	0.099	0.034	0.097	0.056

表4 共有峰相对保留时间

Table 4 Relative peak areas of common peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1	0.117 1	0.117 1	0.117 1	0.117 1	0.117 2	0.117 1	0.117 1	0.117 0	0.117 2	0.117 1	0.117 0	0.117 1	0.117 1	0.117 1	0.117 2	0.117 1
2	0.138 2	0.138 2	0.138 5	0.138 3	0.138 3	0.138 5	0.138 2	0.138 1	0.138 2	0.138 4	0.138 4	0.138 2	0.138 3	0.138 3	0.138 2	0.137 9
3	0.165 8	0.165 8	0.165 8	0.165 8	0.165 8	0.165 7	0.165 9	0.165 9	0.165 7	0.165 6	0.165 8	0.165 7	0.165 6	0.165 8	0.165 9	0.165 9
4	0.205 3	0.205 4	0.205 3	0.205 4	0.205 4	0.205 3	0.205 4	0.205 3	0.205 2	0.205 3	0.205 4	0.205 3	0.205 1	0.205 2	0.205 3	0.205 3
5	0.392 7	0.393 0	0.393 1	0.393 3	0.393 0	0.393 0	0.393 1	0.392 4	0.392 4	0.392 9	0.392 7	0.392 5	0.392 8	0.392 6	0.392 3	0.392 2
6	0.487 7	0.487 3	0.488 3	0.487 9	0.487 9	0.487 9	0.487 5	0.487 4	0.487 6	0.492 7	0.492 6	0.487 4	0.487 6	0.487 7	0.487 9	0.488 2
7	0.495 7	0.498 3	0.497 7	0.497 2	0.497 8	0.497 8	0.497 2	0.497 4	0.497 5	0.497 3	0.497 4	0.497 2	0.497 4	0.497 6	0.497 7	0.497 5
8	0.729 6	0.729 9	0.729 7	0.729 4	0.729 6	0.730 4	0.730 0	0.730 0	0.730 4	0.729 9	0.730 0	0.730 4	0.730 5	0.730 0	0.728 5	0.726 8
9	0.798 1	0.798 2	0.798 1	0.798 1	0.798 0	0.798 0	0.798 2	0.798 0	0.798 1	0.798 0	0.798 1	0.798 4	0.798 0	0.798 0	0.798 1	0.797 9
10	0.960 8	0.961 7	0.961 4	0.961 1	0.961 1	0.960 9	0.960 7	0.960 5	0.960 7	0.960 9	0.961 0	0.960 9	0.960 4	0.960 7	0.960 7	0.960 5
11	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
12	1.048 8	1.049 5	1.048 8	1.048 9	1.048 7	1.048 6	1.048 9	1.048 4	1.048 3	1.048 8	1.049 0	1.049 0	1.048 7	1.048 9	1.048 9	1.048 8
13	1.730 5	1.730 0	1.729 6	1.730 2	1.730 5	1.730 4	1.730 7	1.731 0	1.731 0	1.731 1	1.730 8	1.730 4	1.730 9	1.730 6	1.730 1	
14	1.897 5	1.897 0	1.896 8	1.897 1	1.897 6	1.897 5	1.897 7	1.897 7	1.897 9	1.897 8	1.897 7	1.897 4	1.897 1	1.897 6	1.897 4	1.897 1
15	1.951 6	1.951 1	1.950 5	1.951 0	1.951 4	1.951 5	1.951 9	1.951 9	1.9522	1.952 0	1.951 9	1.951 6	1.951 3	1.951 9	1.951 7	1.951 2
16	2.096 2	2.095 7	2.095 4	2.095 6	2.096 1	2.096 2	2.096 4	2.096 5	2.097 0	2.096 5	2.096 4	2.096 1	2.095 7	2.096 4	2.096 3	2.095 7
17	2.761 2	2.760 7	2.760 6	2.760 8	2.761 4	2.761 4	2.761 5	2.761 3	2.761 8	2.761 6	2.761 4	2.761 0	2.760 3	2.761 4	2.761 4	2.760 6
18	3.319 1	3.318 7	3.318 8	3.318 5	3.319 1	3.319 2	3.319 3	3.319 3	3.319 9	3.319 5	3.319 4	3.318 7	3.318 0	3.319 1	3.319 0	3.318 2

2.6.2 共有峰的归属 采用对照品对照和参考文献中的质谱一级、二级数据和色谱保留行为<sup>[4-6]</sup>, 共确定了 11 个共有峰代表的化学成分, 其中 11、17、18 号峰采用对照品对照确定为二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚。4、6、9、12、13、14、15、16 号峰通

过质谱鉴定为没食子酸、儿茶素、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2,3-二-O-β-D-葡萄糖苷、polygonimitin B、大黄素-1-O-葡萄糖苷、大黄素-8-O-(6'-O-丙二酰)-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-(6'-O-丙二酰)-β-D-葡萄糖苷。结果见表 5。

表5 共有峰的化学成分推测

Table 5 Speculation of chemical components of common peaks

峰号	t <sub>R</sub> /min	ESI <sup>-</sup> 离子(m/z)	碎片离子(m/z)	成分推定
4	3.65	169 [M-H] <sup>-</sup>	125 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	没食子酸
6	8.76	289 [M-H] <sup>-</sup>	271 [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	儿茶素
9	15.48	567 [M-H] <sup>-</sup>	243 [M-H-2Glu] <sup>-</sup>	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2,3-二-O-β-D-葡萄糖苷
11	18.01	405 [M-H] <sup>-</sup>	243 [M-H-Glu] <sup>-</sup>	二苯乙烯苷*
12	19.03	417 [M-H] <sup>-</sup>	255 [M-H-Glu] <sup>-</sup>	polygonimitin B
13	31.60	431 [M-H] <sup>-</sup>	269 [M-H-Glu] <sup>-</sup>	大黄素-1-O-葡萄糖苷
14	34.38	517 [M-H] <sup>-</sup>	473 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> 269 [M-H-CO <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> CO-Glu] <sup>-</sup>	大黄素-8-O-(6'-O-丙二酰)-β-D-葡萄糖苷
15	35.64	445 [M-H] <sup>-</sup>	283 [M-H-Glu] <sup>-</sup> 268 [M-H-Glu-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> 240 [M-H-Glu-CH <sub>3</sub> -CO] <sup>-</sup>	大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷
16	38.12	531 [M-H] <sup>-</sup>	283 [M-H-malonyl-Glu] <sup>-</sup>	大黄素甲醚-8-O-(6'-O-丙二酰)-β-D-葡萄糖苷
17	50.35	269 [M-H] <sup>-</sup>	241 [M-H-CO] <sup>-</sup> 225 [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	大黄素*
18	60.68	283 [M-H] <sup>-</sup>	241 [M-H-CH <sub>2</sub> -CO] <sup>-</sup>	大黄素甲醚*

\*为经过对照品对照确定的成分

\*identified components by reference substance

**2.6.3 相似度计算及对照指纹图谱的生成** 经实验得到 16 批何首乌指纹图谱, 见图 1, 将 16 批何首乌药材样品指纹图谱的 AIA 数据文件导入中药指纹图谱相似度评价系统研究版(2012), 进行相似度计算, 设置样品 S7 图谱为参照图谱, 对照图谱生成方法采用中位数法, 时间窗宽度为 0.1, 自动匹配, 生成对照指纹图谱, 见图 2, 其相似度结果见表 6。

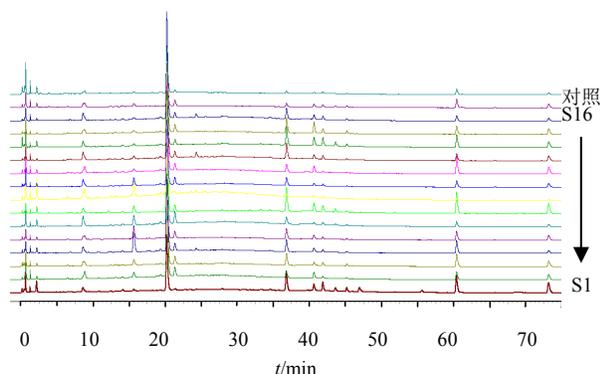
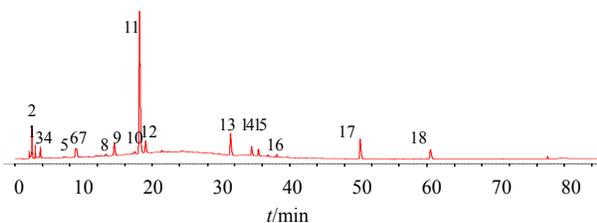


图 1 16 批何首乌指纹图谱

Fig. 1 HPLC-fingerprint of 16 batches of samples



11-二苯乙烯苷 17-大黄素 18-大黄素甲醚  
11-2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-D-glucoside 17-emodin 18-phycion

图 2 何首乌对照指纹图谱

Fig. 2 Reference-fingerprint for 16 batches of samples

表 6 16 批何首乌相似度计算结果

Table 6 Similarity of 16 batches of samples

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.951	S9	0.997
S2	0.993	S10	0.992
S3	0.998	S11	0.992
S4	0.974	S12	0.972
S5	0.996	S13	0.992
S6	0.991	S14	0.989
S7	0.980	S15	0.994
S8	0.936	S16	0.985

**2.6.4 何首乌指纹图谱相似度评价** 与 16 批何首乌生成的对照指纹图谱比较, 各批的何首乌样品的相似度在 0.936~0.998, 表明各批何首乌样品的质量相对稳定, 从图 1 可以看出不同产地何首乌的化学成分基

本一致, 从共有峰面积 RSD 可以看出共有峰峰面积差异较大, 表明各成分量有所差异。从表 6 可以看出, 样品 S1、S4、S7、S8、S12 相似度相对较低, 其他样品相似度相对较高, 其中样品 S8 相似度最低。

**2.6.5 何首乌样品主成分分析** 为了更加合理地评价何首乌的品质, 对何首乌共有峰峰面积主成分分析, 将 16 批何首乌样品的共有峰面积导入 MatlabR2014a 中, 运用 zero-mean normalization 处理方法进行数据前处理, 然后进行主成分分析, 分别对应于 3 个最大特征值的主成分 PC1、PC2、PC3, 从方差贡献率来看, PC1 贡献率为 70.3%, 贡献率最大, 包含的信息最多; PC2 贡献率为 15.7%, PC3 贡献率为 7.7%, 前 3 个主成分的累计贡献率 93.7%, 所以对前 3 个主成分分析已经能反映何首乌的基本特征。分别以第 1、第 2、第 3 主成分建立坐标系, 进行投影, 得到 16 批样品的 PCA 得分图 (图 3), 同时对 PC1 进行载荷图分析 (图 4)。用以反映不同样品间差异的主要元素。

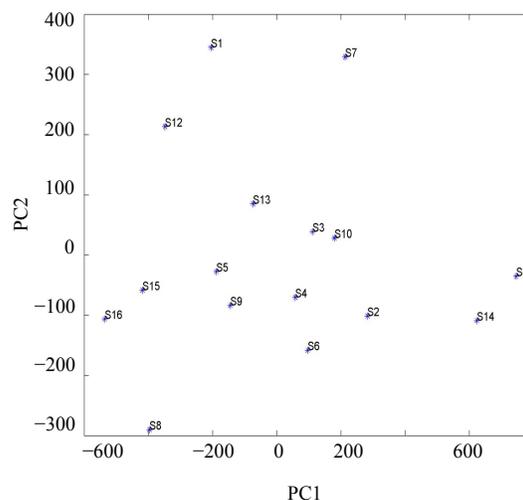


图 3 第 1、2 主成分投影图

Fig. 3 Projection drawing of PC1 and PC2

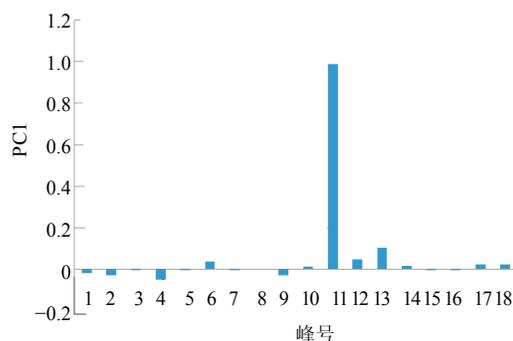


图 4 第 1 主成分载荷图

Fig. 4 Loading diagram of PC1

根据图4可知,对主成分PC1贡献最大的因素是11号峰。从第1、2主成分投影图可以看出除了样品S1、S7、S8、S12、S15、S16、S11、S14之外,其余样品聚集在一块,其中与其他药材的区别主要体现在第1主成分上,其中样品S1、S8、S12、S15、S16在第1主成分的得分上较低,样品S11、S14得分较高,得出结果与“2.5”项中得到的结果基本一致。

从三维得分图(图5)可以看出样品S8为一类、S1、S7、S12为一类,其他为一类。分析结果和相似度分析结果一致。也进一步验证了所建指纹图谱的可靠性。

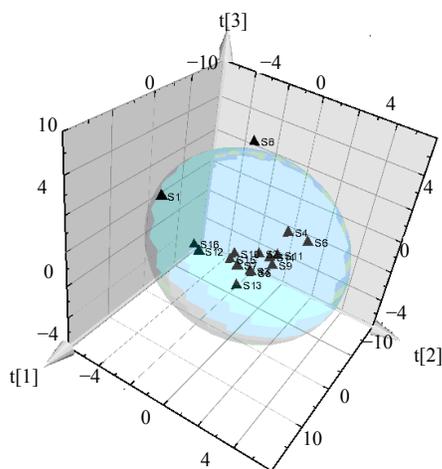


图5 何首乌第1、2、3主成分三维得分图

Fig. 5 3D Diagram of PC1, PC2, and PC3 scores of samples

### 3 讨论

本实验对样品的提取溶剂、提取时间、提取方法进行了考察,最终确定了“2.3”项下供试品溶液的制备方法。同时对检测波长、色谱柱、流动相系统、梯度条件、柱温进行了优选,最终确定了最优的色谱条件<sup>[7-11]</sup>。同时本实验在指纹图谱的基础上创新性地采用了HPLC/Q-TOF/MS法对共有峰进行了归属,运用主成分分析、二苯乙烯苷测定对指纹图谱进行验证。

本实验确定了何首乌指纹图谱中的18个共有峰,并对部分共有峰进行定性分析,其中4、6、9、11、12、13、14、15、16、17、18号峰得出分别是没食子酸、儿茶素、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2,3-二-O-β-D-葡萄糖苷、二苯乙烯苷、polygonimitin B、大黄素-1-O-葡萄糖苷、大黄素-8-O-(6'-O-丙二酰)-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-(6'-O-丙二酰)-β-D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚。

何首乌指纹图谱共有峰的保留时间差别较小,但

峰面积有较大差异,说明不同批次的同一化学成分的量有所差别。不同批次的何首乌相似度0.936~0.998,表明不同产地的何首乌质量相对稳定,没有太大差异。本实验中峰面积RSD较大,但相似度较高,分析原因可能是二苯乙烯苷峰面积过大,从而导致相似度较高。

主成分分析结果可知,样品S1、S7、S12为一类,S8为一类,其他样品为一类,其分析结果与16批样品相似度结果基本一致,进一步验证了本实验的合理与准确性。对第1主成分进行载荷图分析,可以得出对此主成分贡献最大的峰为11号峰,即为二苯乙烯苷,样品S1、S8、S12、S15、S16在第一主成分的得分较低,样品S11、S14得分较高,与二苯乙烯苷的测定结果一致。同时二苯乙烯苷的量满足《中国药典》要求。

研究表明本实验建立的方法简便、可靠,可为综合评价何首乌质量提供指导和依据。

### 参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 朱铁英.何首乌化学成分研究进展[J].时珍国医国药,2006,17(2):274-275.
- [3] 刘新桥,高文远,陈海霞.何首乌中二苯乙烯苷提取物的制备工艺及量测定[J].中国中药杂志,2007,32(14):1474-1476.
- [4] Yi T, Leung K S, Lu G H. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal plant *Polygonum multiflorum* Thunb. by HPLC coupled with PAD and ESI/MS [J]. *Phytochem Anal*, 2007, 18(3): 181-187.
- [5] Zhao Y, Kao C P, Chang Y S. Quality assessment on *Polygoni multiflori* Caulis using HPLC/UV/MS combined with principle component analysis [J]. *Chem Cent J*, 2013, 7(1): 106-118.
- [6] Liu Z, Liu Y, Wang C. Comparative analyses of chromatographic fingerprints of the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. and their processed products using RRLC/DAD/ESI-MS(n) [J]. *Planta Med*, 2011, 77(16): 1855-1860.
- [7] 罗文,刘斌,王伟,等.何首乌药材HPLC指纹图谱研究[J].北京中医药大学学报,2008,31(8):557-560.
- [8] 房志坚,周洪波,杨立伟,等.何首乌的HPLC指纹图谱[J].华西药学杂志,2008,23(5):513-515.
- [9] 梁永枢,段启,方丽华,等.广东肇庆何首乌药材HPLC指纹图谱方法学研究[J].广东药学院学报,2006,22(3):265-267.
- [10] 刘振丽,李林福,宋志前,等.何首乌炮制前后高效液相图谱的变化[J].中草药,2005,36(11):1644-1646.
- [11] 苏建,袁志芳,吴一兵,等.何首乌和夜交藤药材指纹图谱研究与评价[J].中草药,2008,39(5):766-769.