

# 不同采集地制何首乌薄层色谱指纹图谱研究

高晓霞\*, 严寒静, 梁从庆  
(广东药学院, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立制何首乌薄层色谱指纹图谱。方法: 黑豆汁蒸 10 份不同采集地何首乌样品, 用甲醇提取其有效成分并以两种展开系统进行薄层色谱分离分析建立薄层色谱指纹图谱。薄层扫描法对色谱图进行定量扫描, 以峰高进行主成分分析和聚类分析。结果: 获得的 11 个共有指纹峰构成了制何首乌蒽醌类和二苯乙烯苷类成分薄层色谱指纹图谱。结论: 薄层色谱指纹图谱可快速有效地鉴别制何首乌, 并评价其质量。

[关键词] 制何首乌; 薄层色谱; 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)05-0004-04

## Study on TLC Fingerprint of Prepared Radix Polygoni Multiflori from Different Areas

GAO Xiao-xia\*, YAN Han-jing, LIANG Cong-qing  
(Guangdong University of Pharmacy, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish TLC fingerprint of prepared Radix Polygoni Multiflori from different areas. **Methods:** The samples that the pieces of the root, were mixed thoroughly with black bean juice ana steamed were extracted with methanol. The extrac spotted and developed on a silicagil thin layer plates. The plates were scauned by TLC scanner and the chromatograms were analyzed by principal components analysis (PCA) and cluster analysis. **Results:** The chromatograms of prepared Radix Polygoni Multiflori 11 characteristic common peaks representing anthraquinones and stilbene glucoside were foundon. **Conclusion:** The fingerprints can be used to classify and identify prepared Radix Polygoni Multiflori rapidly and to evaluate its quality.

[Key words] Prepared Radix Polygoni Multiflori; TLC; fingerprint; principal components analysis(PCA); cluster analysis

制何首乌为蓼科植物何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 干燥块根的炮制品<sup>[1]</sup>, 主产于我国广东、四川、湖南、贵州、河南等省区, 其味苦、甘、涩, 性温, 具养心安神、补肝肾、益精血、壮筋骨、乌须发之功效<sup>[2]</sup>。制何首乌中富含蒽醌类、二苯乙烯苷类和磷脂类等有效成分, 药效各有不同<sup>[3,4]</sup>。指纹图谱可对样品的整体轮廓进行较直观地观察, 着重于提取宏观规律性的特征, 是现阶段可以较全面反映

中药材内在质量的一种有效手段。何首乌及其炮制品的指纹图谱研究多为 HPLC 法, 武政等<sup>[5]</sup>测定了 36 批何首乌药材 HPLC 指纹图谱, 通过计算各批药材的相似度可直观地界定合格与不合格药材; 刘振丽等<sup>[6]</sup>建立的 16 个制何首乌饮片 HPLC/UV 指纹图谱表明样品间指纹谱的相似性与二苯乙烯苷含量呈正相关。由于指纹图谱受药材的产地、采收期、炮制工艺等因素的影响较大, 为减少不同炮制工艺的影响, 本文收集了几个主产区的何首乌均按《中华人民共和国药典》<sup>[1]</sup>要求炮制, 制成统一的炮制品后进行指纹图谱研究。

薄层色谱由于简便、快速, 展开剂组成灵活, 色

[收稿日期] 2007-01-29

[通讯作者] \* 高晓霞, Tel: (020) 89239517; E-mail: gaoxia@pub. guangzhou. gd. cn; gaoxia91@yahoo. com. cn

谱后衍生方便, 可以提供直观的彩色图像等优点<sup>[7]</sup>, 对 HPLC 法是很好的一个补充。本文分别对制何首乌中蒽醌类、二苯乙烯苷类成分进行薄层色谱指纹图谱研究, 检测其质量是否稳定和一致, 并引入化学计量学方法做进一步的数据挖掘, 更深层次地反映制何首乌药材的内在质量, 为制何首乌药材的综合质量评价提供理论依据。

## 1 仪器与试剂

**1.1 样品来源** 2004 年 6 月~ 10 月在何首乌主产区(广东、广西、贵州、重庆、湖北、河南、江西)由本文第二作者采集栽培及野生何首乌块根(河南登封嵩山的样品购自当地药材市场), 用清水洗净表面泥土后, 以蒸馏水、去离子水分别快速淋洗 3 遍, 60 °C 烘箱烘干, 备用。何首乌药材, 由广东药学院中药学院药用植物与中药鉴定教研室鉴定见表 1。

样品均经黑豆汁蒸制, 详见参考文献<sup>[1, 8]</sup>。

表 1 何首乌样品来源

Table 1 The source of Radix Polygoni Multiflori

样品编号 Samples No.	采集地 Locality	经度 Longitude	纬度 Latitude	品种 Variety
1. 德庆	广东德庆官圩金林	111°48'41"	23°17'38"	栽培
2. 济源	河南济源承留镇卫福安村	112°28'58"	35°01'20"	野生
3. 井冈山	江西井冈山行州	114°11'07"	26°31'05"	野生
4. 嵩山	河南登封嵩山法王寺	113°01'13"	34°30'24"	野生
5. 靖西	广西靖西小洲开发区	105°56'~ 106°48'	22°51'~ 23°34'	栽培
6. 缙云山	重庆缙云山	106°22'57"	29°50'29"	野生
7. 峨眉山	四川峨眉山	103°10'30"	29°16'30"	野生
8. 恩施	湖北恩施七里坪石灰窑	109°31'58"	30°16'27"	野生
9. 施秉	贵州施秉县牛场镇山口	108°01'55"	27°05'54"	栽培
10. 田阳	广西田阳波洪镇	105°27'~ 106°15'	23°58'~ 24°41'	野生

**1.2 仪器与试剂** CAMAG TLC scanner 3(瑞士卡玛公司); WD-403C 型紫外分析仪(北京市六一仪器厂); 硅胶 G(青岛海洋化工厂); 实验中所用试剂均为分析纯。

大黄素(批号 110756-200110); 大黄酸(批号 0757-200206); 大黄酚(批号 110796-200311); 大黄素甲醚(批号 110758-200307); 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品(批号 110844-200404); 何首乌对照药材(批号 120934-200507); 均购自中国药品生物制品检定所。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 取 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品 4 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加稀乙醇适量, 超声 3 min 使溶解, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别取大黄素、大黄酚和大黄酸对照品各 2 mg, 大黄素甲醚对照品 1 mg, 精密称定, 置 2 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 5 min 使溶解, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别精密量取上述大黄素、大黄酚、大黄酸和大黄素甲醚对照品溶液各 20 μL, 混合, 作为对照品溶液 I; 另精密量取上述大黄素对照品溶液和 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷对照品溶液各 10 μL, 混合, 作为对照品溶液 II。

**2.2 供试品溶液与对照药材溶液的制备** 取制何首乌粉末和何首乌对照药材粉末各 0.2 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加入甲醇 50 mL, 超声提取 30 min, 过滤, 滤液蒸干, 残渣用甲醇溶解, 定容至 2 mL 量瓶中, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

**2.3 薄层色谱条件** 薄层板: 硅胶 G(0.4% CMC-Na), 105 °C 活化 1 h; 点样量: 供试品溶液、对照品溶液 I 各 5 μL, 对照品溶液 II 10 μL; 展开系统: 石油醚-乙酸乙酯-甲酸(15: 5: 1) 为展开剂 I; 三氯甲烷-甲醇-水[6.5: 2.25: 0.42, pH= 4.0(以醋酸-醋酸钠缓冲液调节)] 为展开剂 II; 检测方式: 紫外灯下(365 nm) 成像。扫描条件: λ<sub>s</sub> = 300 nm, λ<sub>R</sub> = 370 nm。

**2.4 制何首乌薄层色谱指纹图谱的建立** 制何首乌薄层色谱指纹图谱建立过程中, 采用不同提取方法和不同的展开系统进行方法学考察, 结果表明以甲醇为提取溶剂、以石油醚-乙酸乙酯-甲酸和三氯甲烷-甲醇-水为展开剂, 薄层色谱斑点展开较清晰, 荧光条带多, 信息量丰富。其指纹图谱不仅能反映制何首乌的特征性成分, 也能反映不同来源药材之间的差异, 因此本研究用两个展开系统综合评价制何首乌药材内在质量。

依照上述实验获得的色谱图及其扫描轮廓图见图 1。取 R<sub>f</sub> 值在 0.1~ 0.8 之间的色谱峰进行分析, 展开系统 I 共检出 4 个共有峰(图 1A), 按照 R<sub>f</sub> 值由小到大的顺序对共有峰进行编号。根据对照品的位置, 确定其中 3 号峰为大黄素, 4 号峰是大黄素甲醚。图 1(B) 为制何首乌在展开系统 II 所获得指纹图谱, 共检出 7 个共有峰, 根据对照品的位置, 确定其中 2 号峰是 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷,

6 号峰为大黄素。

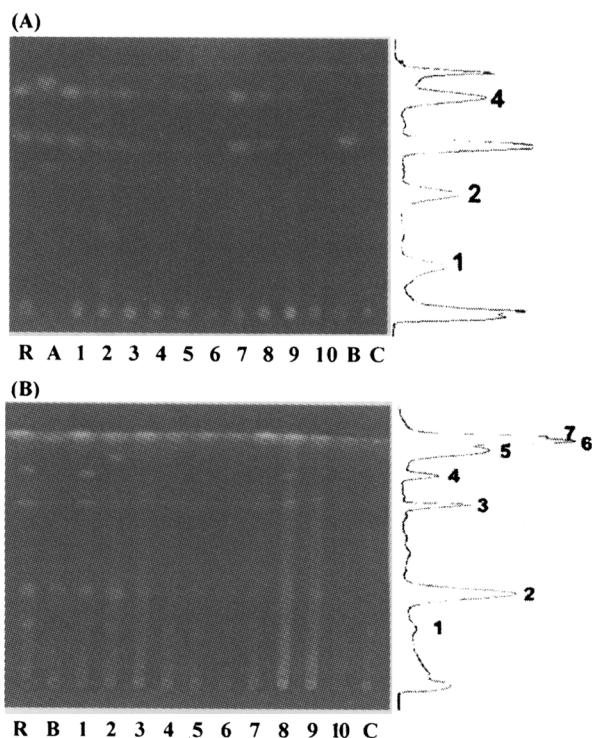


图 1 不同采集地制何首乌薄层色谱图和色谱扫描轮廓图, (A) 蒽醌类成分; (B) 二苯乙烯苷类成分。R, 何首乌对照药材; A, 对照品溶液 I; B, 对照品溶液 II; C, 黑豆汁; 1-10, 1-10 号样品(同表 1)。

Fig. 1 TLC spectrum and TLC scanning spectrum of Radix Polygoni Multiflori collected from difference areas, (A) anthraquinone; (B) stilbene glucoside. Lane R, Polygonum multiflorum Thunb. reference drug; Lane A, reference solution I; Lane B, reference solution II; Lane C, soybean milk; Lane 1-10, No. 1-10 samples(same as Tab. 1).

### 2.4 制何首乌薄层色谱指纹图谱化学计量学分析

不同采集地制何首乌样品在两种展开系统中共检出 11 个共有峰, 由于多数色谱峰没有达到基线分离, 且峰宽窄不一, 因此以共有峰的峰高为变量, 用 SPSS11.5 软件进行主成分分析和聚类分析。通过计算相关系数矩阵、特征根和特征向量和方差贡献率, 共获得 3 个主成分, 累积贡献率达 90.8%, 其降维效果良好, 基本上可以表征原始因子代表的全部信息。主成分 1(PC1)/主成分 2(PC2)、主成分 1(PC1)/主成分 3(PC3) 所组成的二维散点图见图 2 所示, 1, 4, 5, 6, 7, 8 号样品的位置相对集中, 均处于 PC1 负轴; 2, 3, 9 号样品集中在 PC1 横轴位置及其上方; 10 号样品可以明显地同其它制何首乌区分开。

以主成分分析(PCA)获得的降维数据为变量对不同采集地制何首乌进行聚类分析, 图 3 为聚类分析

树状图。总体上制何首乌分为两大类, 1~9 号样品聚为一个分支, 10 号田阳样品单独聚为一支。

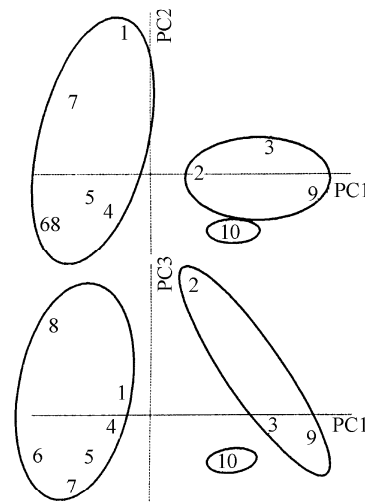


图 2 主成分分析二维散点图

Fig. 2 Principal component analysis

Dendrogram using Single Linkage

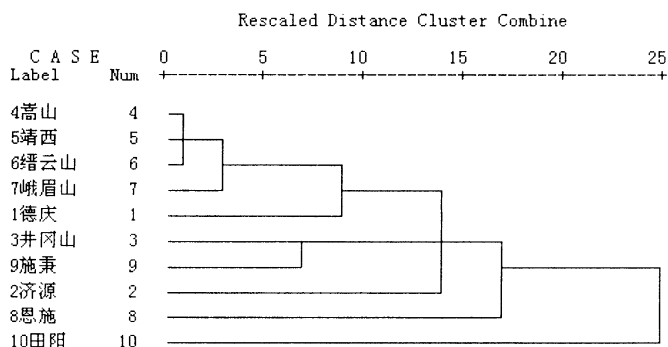


图 3 聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis

### 3 讨论

中药材及其炮制品以其化学成分多样性和模糊性为特点, 以薄层色谱指纹图谱为基础进行分析, 具有快速、分析成本低、形象直观等优点, 实用性较强。采用 PCA 把薄层色谱指纹图谱作为一个整体, 提取其特征后进行综合评价, 避免了单纯以某一指标或某几个指标进行分析的不确定性, 反映的是总化学特征。PCA 还可以通过聚类分析综合评价个样品间的相似性和远近关系, 按照他们在性质上的亲疏程度在没有先验知识的情况下自动进行分类。本研究中利用 PCA 简化的综合指标进行聚类分析来处理样品之间的细微差别, 结果表明制何首乌药材质量与不同采集地的地理环境有关, 制何首乌可分为两类: (1) 1~9 号样品聚为一个分支, 其中 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 号样品采自黄河以南, 2 号济源和 4 号嵩山样品采自黄河以北, 但聚类结果中 2 号和 4 号样品未聚在一支, 可能是与 4 号样品为购自河南登封嵩山

法王寺的生晒品,其干燥方法与其它样品不同有关。

(2)采集自广西田阳的10号样品单独分为一类,仅在百色地区遍用的田阳产何首乌其在形态学研究中与其它产地何首乌有差异,但是否为一个新的何首乌变种仍有争论<sup>[9,10]</sup>,本研究为何首乌的品种整理提供了新的证据。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005. 123.

[2] 徐国钧, 何宏贤, 徐珞珊, 等. 中国药材学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996. 125.

[3] 史国兵. 炮制对何首乌中有效成分含量的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(2): 95-97.

[4] 罗瑞芝, 贾伟, 赵利斌, 等. 何首乌研究进展[J]. 中草

药, 2005, 36(7): 1097-1100.

[5] 武政, 张勉, 张朝凤, 等. 36批何首乌药材质量的HPLC指纹图谱评价研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(4): 257-260.

[6] 刘振丽, 宋志前, 乔淑贞, 等. 制何首乌高效液相指纹图谱分析[J]. 中成药, 2005, 27(4): 378-380.

[7] 谢培山, 林巧玲. 白芍总苷的薄层色谱指纹图谱实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 171-173.

[8] 解奉江, 赵荣华, 赵声兰, 等. 清蒸与黑豆汁蒸何首乌中有效成分的比较[J]. 中草药, 2005, 36(7): 1004-1006.

[9] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 25(1): 102-103.

[10] 傅军, 严寒静, 梁从庆, 等. 不同采集地何首乌的质量评价[J]. 广东药学院学报, 2006, 22(3): 253-254.