

## 高压炮制对何首乌中有效成分含量的影响

刘世琪,王磊\*,越亮

(太极集团重庆涪陵制药厂有限公司,重庆 408000)

**[摘要]** **目的:**考察高压炮制对何首乌中大黄素、大黄素甲醚及二苯乙烯苷含量的影响。**方法:**何首乌采用高压清蒸法炮制,考察不同蒸制时间对何首乌中蒽醌类成分、二苯乙烯苷含量的影响,并观察其在炮制过程中性状变化。采用 HPLC 测定大黄素、大黄素甲醚含量,色谱条件为 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸(80:20),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL;二苯乙烯苷的 HPLC 测定条件为 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,流动相乙腈-水梯度洗脱,检测波长 320 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。**结果:**高压蒸制 0,1,2,3,4,5,6 h 时二苯乙烯苷质量分数(*n* = 2)依次为 4.55%,3.54%,2.20%,1.87%,1.52%,1.15%,0.76%。随着蒸制时间的增加,何首乌中结合蒽醌、二苯乙烯苷含量逐渐下降,游离蒽醌含量在一定蒸制时间内随蒸制时间的增加而增多。**结论:**何首乌作为补益药应用时宜采用高压蒸制 4 h 炮制品。

**[关键词]** 何首乌;制何首乌;炮制;高压蒸制;二苯乙烯苷

**[中图分类号]** R283.3;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0037-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013210037

## Influence of High Pressure Processing on Contents of Active Ingredients from *Polygoni Multiflori Radix*

LIU Shi-qi, WANG Lei\*, YUE Liang

(Chongqing Fuling Pharmaceuticals Co. Ltd, Taiji Group, Chongqing 408000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of high pressure processing on contents of emodin, physcion and 2, 3, 5, 4'-stilbene glucoside from *Polygoni Multiflori Radix*. **Method:** *Polygoni Multiflori Radix* was processed by high pressure steaming method, effects of different steaming time on contents of anthraquinones and 2, 3, 5, 4'-stilbene glucoside were investigated, and properties change during processing was observed. The contents of emodin and physcion were determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Diamonsil C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid (80:20), flow rate 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength 254 nm, column temperature 30 ℃, injection volume 10 μL. HPLC conditions of 2, 3, 5, 4'-stilbene glucoside were as follows: mobile phase of acetonitrile-water gradient elution, detection wavelength 320 nm; other conditions were the same as these above conditions. **Result:** The content of 2, 3, 5, 4'-stilbene glucoside were 4.55%, 3.54%, 2.20%, 1.87%, 1.52%, 1.15%, 0.76% after high pressure steamed 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h. By increasing of steaming time, contents of incorporating anthraquinones and 2, 3, 5, 4'-stilbene glucoside from *Polygoni Multiflori Radix* gradually decreased, but the content of free anthraquinones increased. **Conclusion:** As tonics applications, *Polygoni Multiflori Radix* should be heated for four hours under high pressure.

**[收稿日期]** 20130407(005)

**[基金项目]** 中药大品种急支糖浆技术改造项目(2011zx09201-201-18)

**[第一作者]** 刘世琪,学士,副主任药师,从事中药制剂新剂型、新技术及制剂质量评价研究,Tel:13896777396,E-mail:liushiqi2004@163.com

**[通讯作者]** \*王磊,硕士,主管药师,从事中药制剂新剂型、新技术及制剂质量评价研究,Tel:18083086119,E-mail:w15313@163.com

[Key words] Polygoni Multiflori Radix; Polygoni Multiflori Radix Praeparata; processing; high pressure steaming; 2, 3, 5, 4'-stilbene glucoside

何首乌多以制首乌入药,历代以黑豆为辅料炮制较多,主要成分有卵磷脂、蒽醌衍生物、二苯乙烯苷类化合物、淀粉、脂肪、矿物质、糖类等。其中二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷,THSG)具有降低胆固醇和保肝作用,卵磷脂能促进血液细胞的生长发育,为何首乌补肝肾、益精血的主要成分;总糖及还原糖具有滋补作用,结合蒽醌衍生物可促进肠管的蠕动以通便,游离蒽醌衍生物具有补益作用,能抑制肠道对胆固醇的再吸收<sup>[1-2]</sup>。为阐明中药炮制前后引起的药性改变与其内在物质基础的变化有关,本实验采用高压蒸汽锅(0~0.27 MPa, 0~130℃)蒸制何首乌,考察不同时间制得的炮制品中游离蒽酯、结合蒽醌及二苯乙烯苷类成分的含量及其变化规律,探讨现代炮制方法和炮制时间对何首乌炮制品质量的影响,同时分析炮制过程中有效成分的变化,为何首乌的现代炮制工艺研究提供参考<sup>[3-4]</sup>。

### 1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), XG1. X 型普通卧式压力蒸汽灭菌器(山东新华医疗), 240 型电子分析天平(德国赛多利斯集团), S2-93 型自动双重纯水机(美国 Minipore 公司)。

大黄素、大黄素甲醚、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(简称二苯乙烯苷, THSG)对照品(均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为 0795-9813, 758-200007, 110844-200506), 何首乌饮片生品(由重庆中药材饮片厂提供,产地广东德庆,批号 120701,经本厂质检部门鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 干燥块根切片),制何首乌饮片(自制),甲醇为色谱醇,水为自制二次重蒸水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法和结果

**2.1 何首乌炮制品的制备** 称取生首乌片(片厚约 1 cm)适量,加入少量水闷润 0.5 h,置于普通卧式压力蒸汽灭菌器中,于 0.20 MPa, 120℃ 条件下分别加压炮制 1, 2, 3, 4, 5, 6 h,在 50℃ 鼓风干燥,粉碎过 60 目筛,备用,性状鉴别特征见表 1,水份测定结果表明各样品水分均在 7.2%~8.1%。

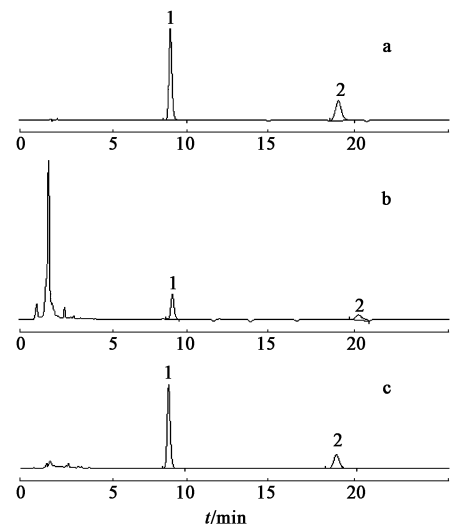
#### 2.2 蒽醌类成分的含量测定

**2.2.1 色谱条件**<sup>[5-6]</sup> Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1%磷酸

(80:20),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm,柱温 30℃,进样量 10 μL,见图 1。

表 1 不同加压时间制何首乌的形状比较(n=2)

炮制时间/h	质地	外观颜色	粉末颜色	气味
0	硬	黄白色	淡黄色	气香味微苦
1	坚硬	棕褐色	深黄色	气香甜味微苦
2	坚硬	深褐色	浅褐色	气香甜味微苦带甘
3	坚硬	深褐色	褐色	气香甜味微苦带甘
4	坚硬	黑色	黑色	气香甜味微苦带甘
5	坚硬	黑色	黑色	气香甜味微苦带甘
6	坚硬	黑色	黑色	气香甜味微苦带甘



a. 对照品; b. 样品(游离蒽醌); c. 样品(总蒽醌);

1. 大黄素; 2. 大黄素甲醚

图 1 何首乌中蒽醌的 HPLC

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取大黄素、大黄素甲醚适量,用甲醇溶解并稀释成 0.08 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,备用。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密称取何首乌样品粉末 1.0 g 置锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,密闭称重,回流 1 h,取出,称定质量,补足减失质量,取上清液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得游离蒽醌供试品。精密量取上述上清液 25 mL 置锥形瓶中,水浴挥干,加入 8% 盐酸 20 mL,超声(200 W, 40 kHz) 5 min,加三氯甲烷 20 mL,置锥形瓶中回流 1 h,立即冷却,用分液漏斗分取三氯甲烷层,用三氯甲烷洗涤酸液 2 次,每次 15 mL,合并三氯甲烷层,水浴挥去溶剂,残渣用甲醇转移至 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释到刻度,过

0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,即得总蒽醌供试品<sup>[7]</sup>。

**2.2.4 标准曲线的制备** 分别精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 1, 2, 6, 8, 10  $\mu\text{L}$ , 按 2.2.1 项下色谱条件进样, 记录峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得大黄素、大黄素甲醚回归方程分别为  $Y = 358.76X + 18.034$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 318.02X + 12.678$  ( $r = 0.9999$ ), 二者线性范围均为 0.4 ~ 4  $\mu\text{g}$ 。

**2.2.5 精密度试验** 吸取大黄素、大黄素甲醚混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$  重复进样 5 次, 结果峰面积的 RSD 分别为 0.86%, 0.60%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 精密量取同一游离蒽醌供试品溶液, 于 24 h 内按 2.2.1 项下色谱条件进样 5 次, 记录峰面积, 结果大黄素、大黄素甲醚 RSD 分别为 0.62%, 0.86%, 表明供试品溶液中 2 种成分在 24 h 内保持稳定。

**2.2.7 重复性试验** 精密量取同一游离蒽醌供试品溶液 5 份, 按 2.2.1 项下色谱条件进样, 测定大黄素和大黄素甲醚含量, 结果 RSD 分别为 0.46%, 0.38%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 称取已知含量的何首乌生品约 1.0 g, 按比例(加入量 - 样品中质量  $\approx 1:1$ ) 加入各成分的混合对照品溶液, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 每个样品平行操作 3 次, 按 2.2.1 项下色谱条件测定大黄素、大黄素甲醚含量, 结果平均回收率分别为 100.2% (RSD 0.89%), 101.3% (RSD 0.68%)。

**2.2.9 样品测定** 取 2.1 项下何首乌和制何首乌各样品细粉约 1.0 g, 精密称定, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样, 记录峰面积, 计算游离蒽醌(大黄素和大黄素甲醚)、总蒽醌及结合蒽醌含量总和, 随加热时间蒽醌类成分含量变化曲线见图 2。显示加压蒸制 4 h 内, 结合蒽醌含量逐渐降低, 且降低幅度较大; 总大黄素和大黄素甲醚的含量略有增加, 进入 1 个平台期, 蒸制至 6 h 后检测发现结合蒽醌类成分几乎完全水解。

### 2.3 二苯乙烯苷的含量测定

**2.3.1 色谱条件** 迪马 Diamonsil  $C_{18}$  色谱柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流速 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 25% A; 10 ~ 20 min, 80% A), 检测波长 320 nm, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 见图 3。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取二苯乙烯苷对照品 6 mg 置于 25 mL 量瓶中, 用 50% 乙醇定容

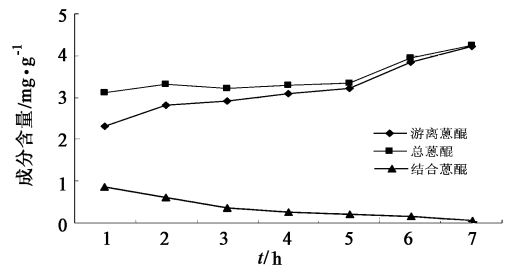
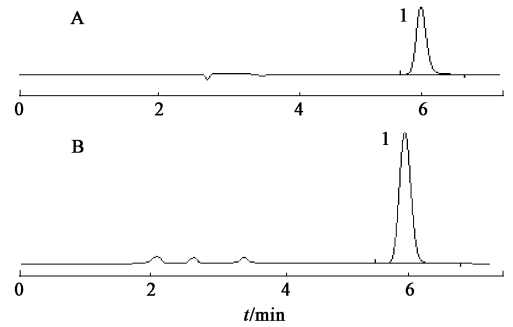


图 2 不同加压时间制何首乌蒽醌类成分的含量变化曲线



A. 对照品; B. 供试品; 1. 二苯乙烯苷

图 3 何首乌中二苯乙烯苷的 HPLC

至刻度, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 备用。

**2.3.3 标准曲线的制备** 精密吸取对照品溶液 2, 4, 8, 10, 12  $\mu\text{L}$ , 按 2.3.1 项下色谱条件进样, 记录峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程  $Y = 4517X - 282.76$  ( $r = 0.9998$ ), 线性范围 0.48 ~ 2.88  $\mu\text{g}$ 。

**2.3.4 供试品溶液的制备** 精密称取各何首乌粉末 (60 目, 干燥后恒重) 0.5 g, 精密加入 50% 乙醇 25 mL, 密闭称重, 回流提取 30 min, 取出, 称定质量, 用 50% 乙醇补足减失质量, 取上清液 2.5 mL, 用 50% 乙醇稀释至 10 mL, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

**2.3.5 精密度试验** 吸取对照品溶液 10  $\mu\text{L}$  重复进样 5 次, 结果 THSG 峰面积的 RSD 0.87%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.6 稳定性试验** 精密量取同一供试品溶液适量, 每隔 1 h 进样 1 次, 结果表明 5 h 内 THSG 峰面积的 RSD 0.32%, 表明供试品溶液在 5 h 内保持稳定。

**2.3.7 重复性试验** 取何首乌生品 5 份, 按 2.3.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测得 THSG 平均质量分数 4.55%, RSD 0.64%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.8 加样回收率试验** 取已测 THSG 含量的何首乌生品 0.25 g, 按 1:1 比例加入 THSG 对照品约 5.7 mg, 按 2.3.4 项下方法制备供试品溶液, 按

2.3.1 项下色谱条件测定,计算平均回收率 99.5%, RSD 0.83%。

2.3.9 样品测定 将各供试品溶液按按 2.3.1 项下色谱条件,记录 THSG 峰面积,计算高压清蒸 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 时 THSG 质量分数 ( $n = 2$ ) 依次为 4.55%, 3.54%, 2.20%, 1.87%, 1.52%, 1.15%, 0.76%, 结合蒽醌和 THSG 含量变化率曲线见图 4, 发现在 2 h 内何首乌中 THSG 含量下降最快, 之后进入平稳下降期, 下降幅度较小。

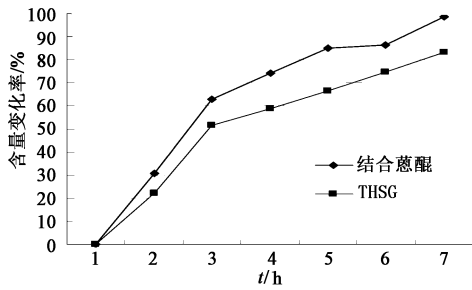


图 4 不同加热时间制何首乌结合蒽醌及 THSG 变化率曲线

### 3 讨论

蒸制时间的长短与何首乌颜色存在紧密关系, 蒸制时间较短, 颜色暗淡无光泽; 蒸制时间越长, 颜色逐渐乌黑发亮, 与相关报道一致<sup>[8]</sup>。在 0.20 MPa, 120 °C 高压清蒸 4 h 后, 饮片外观和粉末颜色基本一致, 说明炮制后饮片内外质量保持一致。

蒸制时间对 THSG、蒽醌含量具有一定影响, THSG 含量随蒸制时间的增加而减小, 游离蒽醌则相反。THSG 含量较生品何首乌均有明显降低, 可能是由于 THSG 对湿、热不稳定引起的<sup>[9]</sup>。THSG 为何首乌中作用明确的活性成分<sup>[10]</sup>, 试验采用的何首乌中 THSG 含量相对较高, 高压蒸制 6 h 后其含量仍高于 2010 年版《中国药典》对制何首乌的要求, 但不同产地何首乌在该条件下炮制很有可能达不到相关要求, 因此应尽量缩短蒸制时间。

何首乌含有较多的结合蒽醌, 该成分具有强烈

的泻下作用, 故何首乌临床用于补益肝肾多用炮制品。研究发现蒸制约 4 h 时, 结合蒽醌类成分降低幅度最大, 为达到增效减毒的目的, 初步将炮制时间设定 4 h, 此时结合蒽醌逐渐水解为游离蒽醌, 而游离蒽醌总量几乎不变。制何首乌的传统炮制方法为常压清蒸 32 h 或更长时间, 不适合于大生产需要。与常压清蒸相比, 采用高压蒸制可大大缩短炮制时间, 节约生产成本, 提高生产效率。

### [参考文献]

- [1] 赖荣汉, 刘晓文, 王毅兵. 何首乌炮制沿革及工艺研究[J]. 中药材, 2000, 23(1): 25.
- [2] 陈庆堂, 卓丽红, 徐文, 等. 何首乌炮制过程中 5 种化学成分的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 66.
- [3] 刘振丽, 宋志前, 张玲, 等. 不同炮制工艺对何首乌中成分含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 336.
- [4] 吕丽爽. 何首乌中二苯乙烯苷的研究进展[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 608.
- [5] 吴明侠, 王淑美, 梁生旺, 等. 何首乌不同炮制品中二苯乙烯苷的含量测定[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(12): 943.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 164.
- [7] 张挺, 吕圭源, 陈素红, 等. 炮制前后何首乌蒽醌类含量的比较研究[J]. 浙江中医药大学报, 2009, 33(6): 872.
- [8] 金嘉文, 陈有军, 刘梅, 等. 何首乌与制何首乌补血作用及 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 206.
- [9] 刘振丽, 宋志前. 不同地区制何首乌中二苯乙烯苷含量测定及稳定性考察[J]. 中成药, 2002, 24(9): 684.
- [10] 班翊, 刘其礼, 金悠, 等. 二苯乙烯苷的稳定性研究[J]. 中草药, 2004, 35(11): 1325.

[责任编辑 全燕]