

何首乌炮制过程中5种化学成分的含量变化

陈庆堂, 卓丽红, 徐文, 黄志海, 丘小惠*

(广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120)

[摘要] 目的: 建立制何首乌中5种化学成分没食子酸、5-羟甲基糠醛(5-HMF)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素与大黄素甲醚的含量测定方法, 并比较5种成分在炮制时间变化过程中含量的动态变化。方法: 采用RP-HPLC法, 色谱柱为Kinetex™ C₁₈(4.6 mm × 100 mm, 2.6 μ m); 流动相为乙腈-0.5%乙酸梯度洗脱; 流速为1.8 mL·min⁻¹; 柱温为30℃; 检测波长分别为254, 270, 284, 320 nm, 检测时间为36 min。结果: 没食子酸、5-HMF、二苯乙烯苷、大黄素与大黄素甲醚分别在0.585~58.5, 0.54~53.5, 1.07~107, 1.23~123, 0.564~16.92 mg·L⁻¹线性良好。没食子酸炮制后含量明显增加, 但随着炮制时间延长其含量变化不大; 5-HMF为炮制后新产生的成分, 其含量随着炮制时间的延长而有所增加; 二苯乙烯苷随着炮制时间的延长, 其含量呈下降趋势; 游离蒽醌类物质大黄素与大黄素甲醚, 两者炮制后均比炮制前要高, 而且都在炮制后32 h达最高峰。结论: 提供了一种结果准确、重复性好、快捷的(制)何首乌质量分析方法。何首乌炮制过程中化学成分变化与其药效之间的相关性及其量效关系有待进一步深入的研究。

[关键词] 制何首乌; 没食子酸; 5-羟甲基糠; 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷; 大黄素; 大黄素甲醚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0066-06

Content Changes of 5 Components in *Polygonum multiflorum* During Processing

CHEN Qing-tang, ZHUO Li-hong, XU Wen, HUANG Zhi-hai, QIU Xiao-hui*

(The Second College of Clinical Medicine, Guangzhou University
of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To study the content changes of gallic acid, 5-hydroxymethyl furfural, emodin, 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside and emodin monomethyl ether in *Polygonum multiflorum* during processing and establish a method of determination by HPLC. **Method:** The separation was performed on a Kinetex™ C₁₈ column (4.6 mm × 100 mm, 2.6 μ m), using acetonitrile and water (0.5% acetic acid pH 2.9) as the mobile phase with gradient elution. The flow rate was 1.8 mL·min⁻¹; column temperature was at 30℃ and the detection wavelength was 254, 270, 284, 320 nm, respectively. **Result:** The linear ranges of gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, emodin, 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside and emodin monomethyl ether were 0.585-58.5, 0.54-53.5, 1.07-107, 1.23-123, 0.564-16.92 mg·L⁻¹, respectively. The content of gallic acid was increased significantly and 5-HMF was a new component after processing, and timing had a little effect on the content change of gallic acid, however, the content change of 5-HMF was higher and higher in the process of time till 72 h. Meanwhile, the content of stilbene glycoside was decreased in the process of time during processing and dissociative anthraquinone, emodin and emodin monomethyl ether, both of them were increased by processing after 32 h the content reach the maximum. **Conclusion:** The method is simple, accurate and can be used for quality control of *P. multiflorum*. Further research of the correlation between the content changes of these

[收稿日期] 20110714(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073052); 广东省科技项目(2007B031407009)

[第一作者] 陈庆堂, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础及成分分析, Tel: 13725127232, E-mail: 346229213@qq.com

[通讯作者] * 丘小惠, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及成分分析, Tel: 020-39318571, E-mail: gxhgxh@med-mail.com.cn

5 components in *P. multiflorum* and pharmacodynamics as well as dose-effect relationship should be done.

[**Key words**] *Polygonum multiflorum*; gallic acid; 5-HMF; emodin; 2, 3, 5, 4'-tetraHydroxystilbene-2-*O*- β -D-glucoside; emodin monomethyl ether

何首乌始载于《开宝本草》,为蓼科植物何首乌的干燥块根,生用可解毒、消痈、润肠通便,制品则具有补肝肾、益精血、乌须发等功效^[1]。《中国药典》^[4]和《全国中药炮制规范》^[5]对何首乌炮制时间未做明确规定,课题组采用大鼠血虚动物模型^[6],证明采用传统方法炮制 24,32,40 h 的炮制品醇提液显示一定的补血功效,生首乌和 72 h 炮制品醇提液则未显示出补血功效。

何首乌主要含 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷(二苯乙烯苷)、游离蒽醌(如大黄素与大黄素甲醚)等,是目前何首乌质量控制的主要成分,在 2010 年版《中国药典》中均有含量测定要求^[4]。此外,近几年研究发现,何首乌经炮制后可检测到没食子酸^[7]、5-羟甲基糠醛(5-HMF)^[8]等成分,但是否与其炮制后药效变化相关尚不明确,目前仍缺乏制何首乌饮片有效的质量控制方法。

本文采用 RP-HPLC 法建立制何首乌中没食子酸、5-羟甲基糠醛(5-HMF)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素与大黄素甲醚的含量测定方法,分析生首乌及其 24,32,40,72 h 的炮制品 5 种成分的含量变化规律,结合前期药效研究结果^[6],为进一步研究制何首乌饮片质量控制方法提供参考。

1 材料

1.1 仪器 美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪(含在线真空脱气机,高压四元泵,自动进样器,智能化柱温箱,二极管阵列检测器 DAD, Agilent1200 series 色谱工作站; BS224S 电子分析天平(Sartorius); USC-702 超声波清洗器(上海波龙电子设备有限公司); G20 型医用高速离心机(安新县白洋离心机厂); minipore 纯水机

1.2 试药 没食子酸对照品(批号 110831-200302)、5-HMF 标准品(批号 111626-200402)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷对照品(批号 110844-200505)、大黄素对照品(批号 0756-9707)与大黄素甲醚对照品(批号 110758-200509)均购自中国药品生物制品检定所;其余所用试剂均为色谱纯,水为超纯水。

何首乌饮片生品(批号 050402)由广东省康美饮片厂提供,产地为广东德庆,原药材经该厂质检部

鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb 的块根。制首乌饮片由本实验室人员在康美饮片厂炮制,采用传统炮制方法,将润透后的生药置笼屉蒸,分别蒸制 24,32,40,72 h,低温烘干。

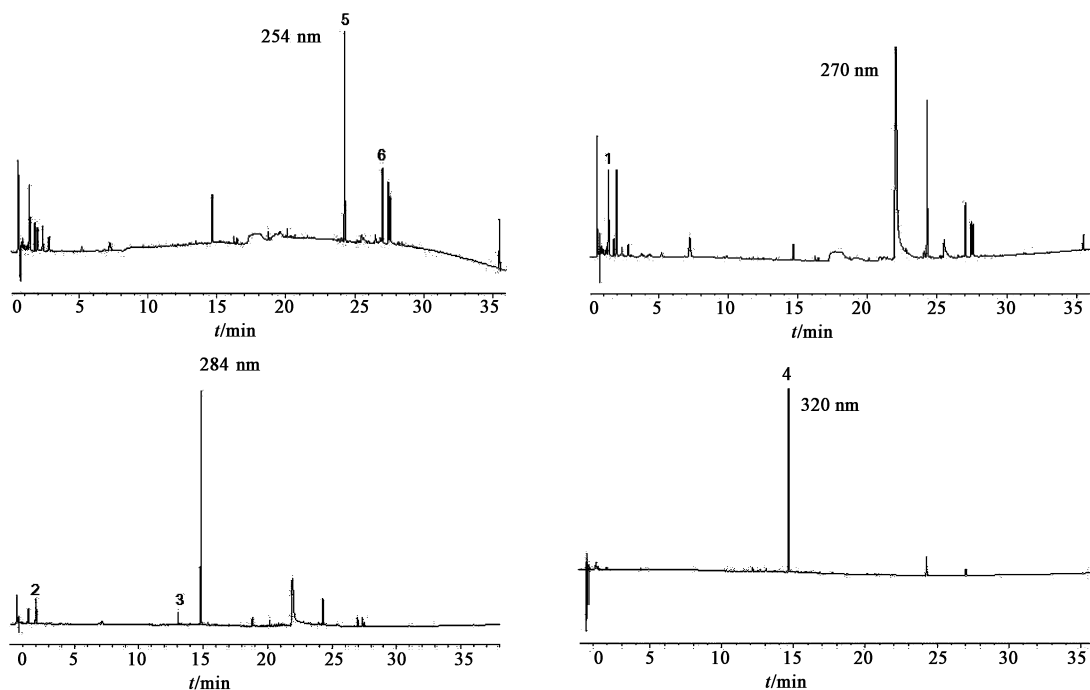
2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex KinetexTM C₁₈(4.6 mm × 100 mm, 2.6 μ m); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.5% 乙酸,梯度洗脱(0 ~ 7 min, 2% ~ 3% A, 98% ~ 97% B; 7 ~ 18 min, 3% ~ 28% A, 97% ~ 72% B; 18 ~ 24 min, 28% ~ 55% A, 72% ~ 45% B; 24 ~ 36 min, 55% ~ 95% A, 45% ~ 5% B); 流速 1.8 mL · min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, DAD 全波长扫描范围为 190 ~ 400 nm, 检测波长没食子酸 270 nm、5-HMF 284 nm、二苯乙烯苷 320 nm、大黄素和大黄素甲醚 254 nm; 进样量 5 μ L。对照品与供试品色谱图分别见图 1, 2。

2.2 对照品溶液 分别精密称取没食子酸、5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷与大黄素对照品适量,置于 100 mL 量瓶中,加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别配制成 117.0, 107.0, 107.0, 123.0 mg · L⁻¹ 对照品溶液; 精密称取大黄素甲醚对照品适量,置于 100 mL 量瓶中,加 80% 甲醇适量,超声 10 min, 超声后冷却至室温,80% 甲醇补足至刻度,摇匀,精密移取 2.87 mL 置于 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度,配制成 33.84 mg · L⁻¹ 大黄素甲醚对照品溶液。

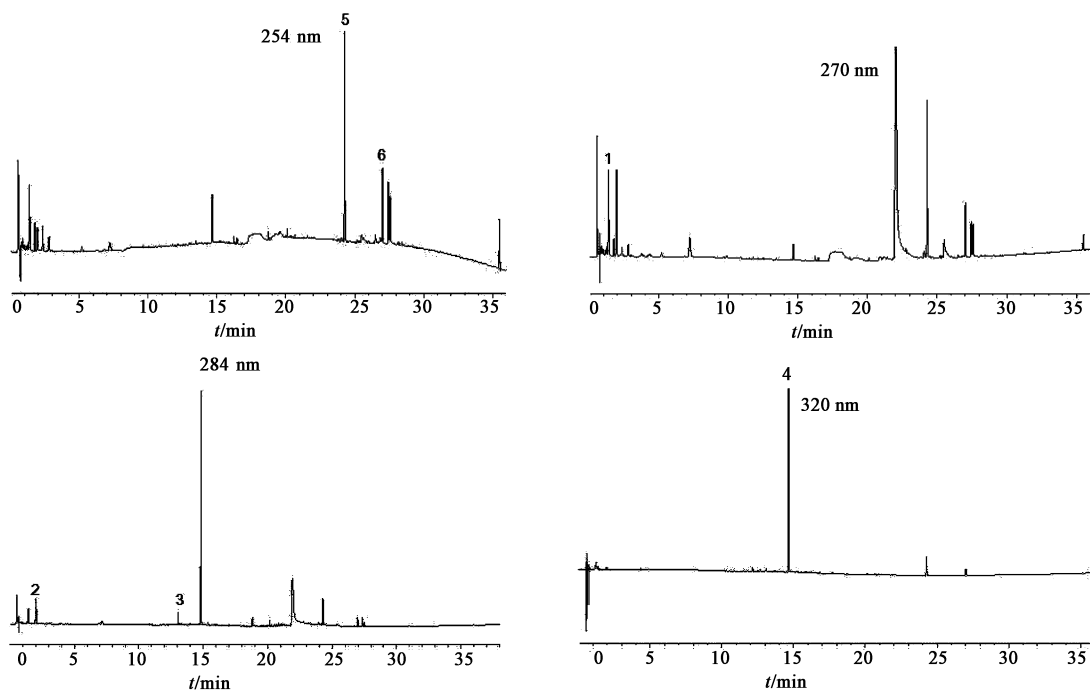
2.3 供试品溶液 取制何首乌细粉约 0.25 g, 精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加入 80% 甲醇适量,静置 30 min 后,超声提取 20 min, 超声后冷却至室温,80% 甲醇补足至刻度,摇匀,10 000 r · min⁻¹ 离心 3 min, 吸取上清液,0.22 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密移取 5 种对照品溶液,分别用 80% 甲醇配制成 6 个不同质量浓度,见表 1,按 2.1 项下色谱条件,分别取系列质量浓度的没食子酸、5-HMF、二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚对照品溶液注入高效液相色谱仪,测定峰面积值;由于所考察的对照品溶液线性范围较广,采取以对照品溶液浓度(mg · L⁻¹)为自变量(X),色谱峰面积为因变量(Y),利用 Excel 数据处理软件进行最小二乘法回归



1. 没食子酸; 2. 5-羟甲基糠醛; 3. 顺式二苯乙烯苷; 4. 二苯乙烯苷; 5. 大黄素; 6. 大黄素甲醚

图 1 对照品色谱图



1. 没食子酸; 2. 5-羟甲基糠醛; 3. 顺式二苯乙烯苷; 4. 二苯乙烯苷; 5. 大黄素; 6. 大黄素甲醚

图 2 何首乌供试品色谱图

分析,得到斜率与截距,其回归方程式与相关系数(r)如表 2 所示,5 个成分均呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 按 2.1 项下色谱条件,分别取没食子酸、5-HMF、二苯乙烯苷、大黄素与大黄素甲醚对照品溶液连续进样 6 次,测定并计算 5 种成分峰面积值 RSD 分别为 1.45%、0.42%、0.34%、

0.92%、1.45%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 按 2.1 项下色谱条件,取同一供试品溶液,分别在制备后的 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 注入高效液相色谱仪,测定 5 种成分峰面积 RSD 分别为 1.64%、0.63%、0.52%、0.74%、1.25%,表明供试品溶液中 5 种成分在 24 h 之内保持稳定。

表1 5个成分线性关系考察对照品溶液质量浓度

mg·L⁻¹

组分	1	2	3	4	5	6
没食子酸	0.585 0	1.170	5.850	11.70	29.25	58.50
5-羟甲基糠醛	0.535 0	1.070	5.350	10.70	26.75	53.50
二苯乙烯苷	1.070	5.350	10.70	26.75	53.50	107.0
大黄素	1.230	6.150	12.30	30.75	61.50	123.0
大黄素甲醚	0.5640	1.128	2.820	5.640	11.28	16.92

表2 5种成分的线性关系

组分	线性范围/mg·L ⁻¹	回归方程	r
没食子酸	0.585 0 ~ 58.50	$Y = 6.5407X - 0.15862$	0.999 9
5-羟甲基糠醛	0.535 0 ~ 53.50	$Y = 17.633X + 0.85754$	0.999 9
二苯乙烯苷	1.070 ~ 107.0	$Y = 7.8360X + 5.0298$	0.999 8
大黄素	1.230 ~ 123.0	$Y = 5.4760X - 0.5267$	0.999 9
大黄素甲醚	0.564 0 ~ 16.92	$Y = 7.5118X + 1.8686$	0.999 8

2.7 重复性试验 取同一批次何首乌样品6份,每份约0.25 g,精密称定,分别按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,计算没食子酸、5-HMF、二苯乙烯苷、大黄素与大黄素甲醚的含量,RSD分别为0.58%,0.68%,0.46%,0.37%,0.15%(n=6),表明该法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 称取已知5种成分含量的制何首乌饮片细粉约0.25 g,精密称定。另取5种对照品用80%甲醇配制成低、中、高3种质量浓度的混合对照品溶液,分别含没食子酸32.33,40.42,55.50 mg·L⁻¹;5-HMF 7.800,8.520,11.10 mg·L⁻¹;二苯乙烯苷146.0,220.9,419.8 mg·L⁻¹;大黄素31.82,45.46,78.84 mg·L⁻¹;大黄素甲醚8.920,17.44,23.16 mg·L⁻¹。精密移取混合对照品溶液10 mL加至样品中,各成分对照品加入量与样品中的含量比例约为1:1。按照2.3项下方法制备,每个浓度平行操作3份。按2.1项下色谱条件分别测定5种成分含量,并计算加样回收率,结果见表3。

2.9 样品测定 取1.2项下何首乌和制何首乌各样品细粉约0.5 g,精密称定,按2.3项下供试品溶液制备方法制备,按2.1项下色谱条件进样,测定5种成分的含量,测定结果分别见表4。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的建立 比较了两种提取方法的提取效率,结果发现80%甲醇超声提取20 min所得5种成分含量较高(没食子酸、5-HMF、二苯乙烯苷、大黄素与大黄素甲醚含量分别为0.154 3%,0.037 52%,1.932%,0.184 9%,

0.056 68%),大于80%乙醇回流提取2 h得到的含量(含量分别为0.130 9%,0.037 63%,1.523%,0.090 52%,0.027 73%),效率显著提高。

3.2 色谱柱的选择 应用了具有超高效、低背压性能的新型色谱柱,采用1.8 mL·min⁻¹的流速,检测时间36 min,比常规C₁₈色谱柱(约需70 min)^[9]大大节省分析时间,从而显著提高了分析效率,且结果准确,重复性良好,也为(制)何首乌质量标准研究提供了一种快捷的分析方法。

3.3 3号峰的鉴定 采用乙腈-0.5%乙酸体系进行梯度洗脱,所测5种成分得到有效的分离,采用LC-MS(Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos)对照品及供试品图谱(图1,2)的3号峰进行了检测分析,3号峰与4号峰(反式二苯乙烯苷)在一级负离子全扫描质谱中的准分子离子[M-H]⁻均为m/z 405,准分子离子的二级质谱中生成相同的碎片离子m/z 243,为m/z 405脱去1分子葡萄糖后的碎片离子,表明3号峰分子结构与4号峰相同,应为顺式二苯乙烯苷。结果表明该流动相能把顺反结构二苯乙烯苷得到有效分离。

3.4 小结 何首乌所含的鞣质类物质经加热后水解,制首乌中没食子酸的含量比生首乌显著升高,但炮制至24 h后,其含量变化较为稳定;5-HMF为炮制后新产生的成分,其含量随着炮制时间的延长而增加;大黄素和大黄素甲醚炮制后含量升高,以32 h炮制品含量最高,之后则呈现下降的趋势;二苯乙烯苷的含量则随着炮制时间的延长呈下降趋势,按照2010年版《中国药典》规定^[4],制首乌二苯乙烯苷

表 3 5 种组分加样回收率分析 ($n=9$)

组分	药材称样量 /g	药材中含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
没食子酸	0.252 0	384.0	323.3	725.4	105.60	102.85	2.81
	0.252 1	384.2	323.3	726.1	105.75		
	0.252 2	384.3	323.3	726.4	105.82		
	0.250 2	381.2	404.2	810.5	106.21		
	0.250 0	381.0	404.2	783.2	99.50		
	0.250 5	381.7	404.2	788.5	100.64		
	0.253 3	386.0	555.0	948.4	101.33		
	0.253 6	386.4	555.0	942.3	100.16		
	0.253 0	385.5	555.0	943.8	100.59		
5-羟甲基糠醛	0.252 0	81.00	78.00	158.0	98.72	100.80	1.56
	0.252 1	81.03	78.00	158.0	98.68		
	0.252 2	81.06	78.00	159.0	99.92		
	0.250 2	80.42	85.20	166.6	101.15		
	0.250 0	80.36	85.20	168.5	103.45		
	0.250 5	80.52	85.20	166.6	101.03		
	0.253 3	81.42	111.0	195.0	102.32		
	0.253 6	81.51	111.0	193.0	100.44		
	0.253 0	81.32	111.0	194.0	101.51		
二苯乙烯苷	0.252 0	2 117	1 460	3 602	101.71	100.29	1.98
	0.252 1	2 118	1 460	3 605	101.85		
	0.252 2	2 119	1 460	3 603	101.64		
	0.250 2	2 102	2 209	4 238	96.70		
	0.250 0	2 100	2 209	4 313	100.18		
	0.250 5	2 104	2 209	4 369	102.54		
	0.253 3	2 128	4 198	6 264	98.52		
	0.253 6	2 130	4 198	6 374	101.10		
	0.253 0	2 125	4 198	6 255	98.38		
大黄素	0.252 0	432.1	318.2	756.4	101.92	97.65	3.46
	0.252 1	432.3	318.2	739.4	96.51		
	0.252 2	432.4	318.2	727.0	92.58		
	0.250 2	429.0	454.6	896.2	102.77		
	0.250 0	428.7	454.6	855.9	93.97		
	0.250 5	429.5	454.6	869.5	96.79		
	0.253 3	434.3	788.4	1 200	97.12		
	0.253 6	434.8	788.4	1 223	99.97		
	0.253 0	433.8	788.4	1 200	97.18		
大黄素甲醚	0.252 0	173.5	89.20	265.1	102.69	100.28	2.64
	0.252 1	173.6	89.20	263.8	101.12		
	0.252 2	173.6	89.20	263.8	101.12		
	0.250 2	172.3	174.4	351.8	102.92		
	0.250 0	172.1	174.4	350.4	102.24		
	0.250 5	172.5	174.4	346.5	99.77		
	0.253 3	174.4	231.6	397.2	96.20		
	0.253 6	174.6	231.6	407.9	100.73		
	0.253 0	174.2	231.6	395.9	95.72		

表4 050204批次何首乌5种物质含量变化($n=6$)

组分	没食子酸 /mg·g ⁻¹	RSD /%	5-羟甲 基糠醛 /mg·g ⁻¹	RSD /%	二苯乙烯苷 /mg·g ⁻¹	RSD /%	大黄素 /mg·g ⁻¹	RSD /%	大黄素甲醚 /mg·g ⁻¹	RSD /%
生首乌	0.199 3	1.16	*	*	38.30	0.58	0.400 1	1.46	0.161 7	2.03
24 h 炮制品	1.097	0.94	*	*	14.06	0.39	1.147	0.57	0.279 2	0.90
32 h 炮制品	1.121	1.86	0.475 3	0.19	2.309	0.21	2.100	0.32	0.637 8	2.57
40 h 炮制品	1.025	1.83	0.681 6	0.32	0.387 0	0.26	1.689	0.25	0.509 7	1.23
72 h 炮制品	1.165	2.24	0.895 6	0.13	0.142 0	0.66	1.492	0.46	0.475 0	1.84

注: * 表示峰值低于定量限或检测限。

含量应不低于0.7%,即7 mg·g⁻¹,本实验按传统炮制方法清蒸32,40,72 h样品的二苯乙烯苷含量均低于0.7%,而前期的药效学研究表明^[6],24,32,40 h的制首乌均有改善大鼠贫血模型指标的作用。因此,制首乌补血功效与其主要化学成分之间的相关性及其量效关系有待进一步深入的研究。

[参考文献]

- [1] 彭晓波. 何首乌的研究与应用[J]. 中国现代药物应用, 2008, 19(2): 117.
- [2] 甄汉深. 何首乌炮制历史沿革的研究[J]. 中成药研究, 1987, 6: 17.
- [3] 叶定江, 朱荃, 王青歌, 等. 何首乌及其炮制品的化学成分研究[J]. 中药通报, 1986, 11(12): 23.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 164.

- [5] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 62.
- [6] 丘小惠, 宋艳刚, 孙景波, 等. 不同炮制工艺制首乌对大鼠血虚模型的作用研究[J]. 中药材, 2008, 30(1): 14.
- [7] 刘振丽, 宋志前, 巢志茂, 等. HPLC测定何首乌中抗氧化有效成分没食子酸和儿茶素在炮制前后含量的变化[J]. 中成药, 2009, 31(9): 1392.
- [8] 刘振丽, 李林福, 宋志前, 等. 何首乌炮制后新产生成分的分离和结构鉴定[J]. 中药材, 2007, 30(12): 1505.
- [9] 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.

[责任编辑 蔡仲德]