

- chucic aldehyde in the adventitious root culture of *Salvia niltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(12): 885-888.
- [4] Yu K W, Gao W Y, Hahn E J, et al. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Biochem Eng J*, 2002, 11: 211-215.
- [5] Gao W Y, Fan L, Hahn E J, et al. Pigment and saikosaponin production through bioreactor culture of *Carthamus tinctorius* and *Bupleurum falcatum* [J]. *J Plant Biotechnol*, 2001, 3: 1-5.
- [6] Jacob J R, Korba B E, You J E, et al. Korean medicinal plant extracts exhibit antiviral potency against viral hepatitis [J]. *J Altern Complement Med*, 2004, 10(6): 1019-1026.
- [7] Kim D I, Lee T K, Jang T H, et al. The inhibitory effect of a Korean herbal medicine, *Zedoariae rhizoma*, on growth of cultured human hepatic myofibroblast cells [J]. *Life Sci*, 2005, 77(8): 890-906.

RP-HPLC 法测定何首乌和夜交藤中二苯乙烯苷和蒽醌类成分

苏建, 袁志芳, 张兰桐*, 王春英, 吕春艳, 刘伟娜

(河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017)

何首乌 *Radix Polygoni Multiflori* 为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。性微温, 味苦、甘、涩。《中国药典》2005 年版一部记载具有润肠通便之功效。何首乌中的主要有效成分之一为蒽醌类^[1](anthraquinone, AQ), 包括大黄素(emodin, EM)、大黄酸(rhein)、大黄酚(chrysophanol, CH)、大黄素甲醚(physcion, PH)等; 何首乌中另一种有效成分为二苯乙烯苷(stilbene glycoside)类^[2]。夜交藤 *Caulis et Folium Polygoni Multiflori*, YJT 又名首乌藤, 为蓼科植物何首乌的干燥藤茎或带叶藤茎, 有养心、安神、通络、祛风止痛等功效^[3], 用于治疗失眠、劳伤、多汗、血虚身痛。何首乌与夜交藤虽为同一植物的不同部位, 但功效却不尽相同。二苯乙烯苷和蒽醌类衍生物均为何首乌中的有效成分。《中国药典》2005 年版中记载了何首乌中二苯乙烯苷的测定, 但并未记载关于何首乌中蒽醌类成分的测定方法。本实验采用 RP-HPLC 法分别测定了何首乌、制首乌和夜交藤中二苯乙烯苷和蒽醌类衍生物的量, 并且对 3 种药材中二苯乙烯苷和蒽醌类衍生物的量进行了比较, 为探讨其药效物质基础与作用机制, 开发新的药物制剂提供了依据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, Waters 色谱工作站。大黄素(批号: 0756-9908)、大黄酸(批号: 0757-200206)、大黄酚(批号: 110796-200309)、大黄素甲

醚(批号: 758-9803)、二苯乙烯苷(批号: 0844-200003)对照品购于中国药品生物制品检定所, 甲醇、乙腈均为迪马公司的色谱纯, 水为自制重蒸水。

何首乌、制首乌和夜交藤购于河北省安国市药材公司、河北乐仁堂药店和石家庄市饮片厂, 经河北医科大学药学院聂凤提教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Dikma (迪马) C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-1% 甲酸 (15 : 10 : 75), 检测波长为 320 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min。理论板数按二苯乙烯苷计算不低于 2 500, 分离度大于 2.0。流动相: 甲醇-乙腈-1% 磷酸 (70 : 10 : 15), 检测波长为 254 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min。理论板数按大黄素、大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚计算不低于 2 500, 分离度大于 2.0。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取二苯乙烯苷、大黄素、大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量, 分别加甲醇溶解并稀释制成 160、90.0、100、100、100 μg/mL 的溶液, 即得。

2.3 二苯乙烯苷定量用供试品溶液的制备: 取何首乌、制首乌细粉 0.2 g, 或者夜交藤细粉 1.0 g, 精密称定, 加 50% 乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 15 min, 放冷, 再次称定质量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 蒽醌类成分定量用供试品溶液的制备^[4,5]: 将

收稿日期: 2006-04-14

作者简介: 苏建(1980-), 男, 河北秦皇岛人, 河北医科大学 2004 级硕士研究生。

* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311)86266419 Fax: (0311)86052053 E-mail: zhanglangtong@263.net

何首乌、制首乌和夜交藤样品粉碎,取其细粉0.5 g,精密称定,加入70%甲醇25 mL,超声提取30 min后,药渣用70%甲醇5 mL洗2次,合并提取液,蒸干,于残渣加入水10 mL和2 mol/L硫酸使之成酸性,用氯仿提取3次,每次10 mL,合并氯仿提取液,蒸干,加入甲醇5 mL,即得游离型蒽醌类成分定量用供试品溶液;对水层再加入浓硫酸0.6 mL和氯仿10 mL,在70~80℃水浴中回流1 h水解,冷却后,取氯仿层,水层再用氯仿提取2次,每次30 mL,将全部提取液合并,蒸干,加入甲醇5 mL,即得结合型蒽醌类成分定量用供试品溶液。

2.5 标准曲线的制备

2.5.1 二苯乙烯苷标准曲线的制备:取160 μg/mL二苯乙烯苷对照品溶液,分别稀释成质量浓度为20.0、40.0、80.0、120.0、160.0 μg/mL的溶液,分别吸取20 μL,注入液相色谱仪,记录相应的峰面积值。以峰面积对质量浓度进行线性回归,得其回归方程为 $Y = 7.17 \times 10^7 X - 1.00 \times 10^5$, $r = 0.9996$,结果表明二苯乙烯苷在20.0~160.0 μg/mL与峰面积呈良好的线性关系。

2.5.2 蒽醌类标准曲线的制备:取2.2项下的对照品溶液,大黄素对照品稀释成0.6、3.0、15.0、30.0、60.0、90.0 μg/mL,大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚对照品稀释成0.5、2.0、8.0、20.0、40.0、100.0 μg/mL,分别吸取20 μL,注入液相色谱仪,记录相应的峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归,得其回归方程,大黄素: $Y = 53470 X - 36480$, $r = 0.9991$,大黄酸: $Y = 86420 X - 150360$, $r = 0.9993$,大黄酚: $Y = 148295 X - 70207$, $r = 0.9997$,大黄素甲醚: $Y = 35061 X - 38742$, $r = 0.9996$ 。结果表明,大黄素在0.6~90.0 μg/mL和大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚在0.5~100.0 μg/mL与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 稳定性试验:取供试品溶液于0、1、2、4、6、8、12、24 h测定二苯乙烯苷的峰面积,RSD值为2.6%。结果表明,供试品溶液在24 h内稳定;同法测定大黄素和大黄素甲醚的峰面积,RSD值分别为1.2%和1.6%。结果表明,供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 精密度试验:取二苯乙烯苷对照品溶液连续进样5次,测定其峰面积,RSD值为1.6%;取大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品溶液连续进样5次,测定峰面积,计算得其RSD值分别为1.3%、1.1%、0.87%和1.7%。

2.8 重现性试验:取同一批药材细粉5份,精密称

定,制备供试品溶液,连续进样5次,测定二苯乙烯苷的质量分数,RSD值为1.33%;供试品溶液连续进样5次,测定大黄素和大黄素甲醚的质量分数,RSD值分别为1.04%和1.42%。

2.9 回收率试验:取何首乌药材细粉6份,每份约0.1 g,精密称定,精密加入二苯乙烯苷对照品溶液160 μg/mL,制备供试品溶液,测定峰面积,计算平均回收率为101.9%(RSD为1.81%);精密称定何首乌药材细粉6份,每份约0.25 g,精密加入蒽醌类4种对照品溶液适量(分别相当于含50 μg),制备供试品溶液,测定峰面积,计算平均回收率。结果大黄酸:98.7%(RSD为4.1%, $n=6$)、大黄素:99.1%(RSD为1.1%, $n=6$)、大黄酚:99.7%(RSD为2.2%, $n=6$)和大黄素甲醚:100.2%(RSD为0.7%, $n=6$)。

2.10 样品测定

2.10.1 二苯乙烯苷的测定:分别精密称取5个不同批次何首乌、制首乌和夜交藤药材细粉适量,制备供试品溶液,进样测定,每个样品测定3次,以均值作为结果,色谱图见图1,结果见表1。

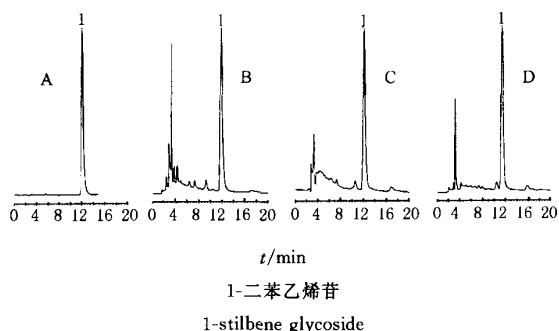


图1 二苯乙烯苷对照品(A)、何首乌(B)、制首乌(C)和夜交藤(D)HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of stilbene glycoside reference substance (A), *Radix Polygoni Multiflori* (B), *Radix Polygoni Multiflori Preparata* (C), and *Caulis et Folium Polygoni Multiflori* (D)

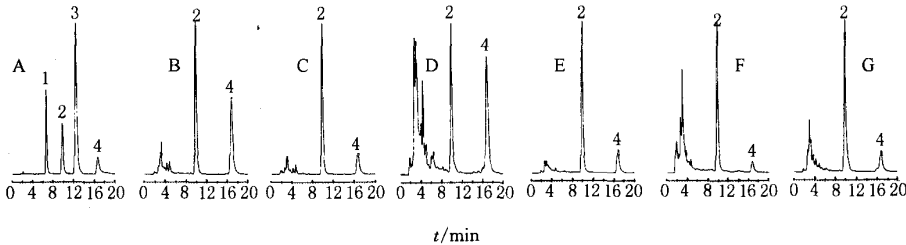
2.10.2 蒽醌类成分的测定:分别精密称定5个不同批次何首乌、制首乌和夜交藤样品适量,制备供试品溶液,进样测定,每批样品测定3次,以3次测定结果的平均值作为测定值,测得何首乌、制首乌和夜交藤中蒽醌类成分的量,实验结果见表1,色谱图见图2。

3 讨论

3.1 何首乌和夜交藤虽然来源于同一植物,但功能主治有显著的差异。何首乌苦、甘、涩、温,归肝、心、肾经。具有解毒,消痈,润肠通便的功效,用于瘰疬疮

表 1 样品分析结果(n=5)
Table 1 Results of sample analysis (n=5)

药品名称	批次	二苯乙烯 苷/%	游离型蒽醌/%				结合型蒽醌/%			
			EM	CH	PH	EM/PH	EM	CH	PH	EM/PH
何首乌	1	3.320 1	0.039 9	—	0.021 2	1.882 0	0.071 6	—	0.044 4	1.612 6
	2	3.201 0	0.040 5	—	0.021 0	1.928 6	0.072 4	—	0.043 7	1.656 8
	3	2.983 0	0.040 4	—	0.021 3	1.896 7	0.072 9	—	0.044 2	1.649 3
	4	2.890 2	0.040 1	—	0.020 9	1.918 7	0.072 7	—	0.043 1	1.686 8
	5	3.010 0	0.041 3	—	0.021 2	1.948 1	0.071 9	—	0.042 7	1.683 8
制首乌	1	1.768 3	0.067 0	—	0.042 0	1.595 2	0.014 9	—	0.003 6	4.138 9
	2	1.893 1	0.066 0	—	0.041 8	1.578 9	0.015 0	—	0.003 6	4.166 7
	3	1.574 3	0.067 5	—	0.042 1	1.603 3	0.015 0	—	0.003 4	4.411 8
	4	1.753 6	0.067 8	—	0.042 5	1.595 3	0.015 3	—	0.003 5	4.731 4
	5	1.574 3	0.067 7	—	0.042 5	1.592 9	0.015 1	—	0.003 6	4.194 4
夜交藤	1	0.179 7	0.009 4	—	0.027 6	0.340 6	0.025 1	—	0.014 4	1.743 1
	2	0.174 6	0.009 3	—	0.028 1	0.330 9	0.026 0	—	0.014 9	1.745 0
	3	0.187 1	0.009 5	—	0.027 8	0.341 7	0.025 5	—	0.014 6	1.746 6
	4	0.183 2	0.009 7	—	0.027 2	0.356 6	0.025 7	—	0.014 8	1.736 5
	5	0.188 1	0.009 4	—	0.027 8	0.338 1	0.026 1	—	0.015 0	1.740 0



A-对照品 B-何首乌(游离型) C-制首乌(游离型) D-夜交藤(游离型) E-何首乌(结合型) F-制首乌(结合型) G-夜交藤(结合型)
1-大黄酸 2-大黄素 3-大黄酚 4-大黄素甲醚

A-reference substances of anthraquinone B-*Radix Polygoni Multiflori* (free anthraquinone) C-*Radix Polygoni Multiflori Preparata* (free anthraquinone) D-*Caulis et Folium Polygoni Multiflori* (free anthraquinone) E-*Radix Polygoni Multiflori* (glycoside anthraquinone) F-*Radix Polygoni Multiflori Preparata* (glycoside anthraquinone) G-*Caulis et Folium Polygoni Multiflori* (glycoside anthraquinone) 1-rhein 2-emodin 3-chrysophanol 4-phycion

图 2 蒽醌类对照品与样品色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of anthraquinone reference substances and samples

痛,风疹瘙痒,肠燥便秘,高血脂。而夜交藤甘、平,归心、肝经。具有养血安神,祛风通络的功效,用于失眠多梦,血虚身痛,风湿痹痛,外治皮肤瘙痒。参考有关文献,何首乌和夜交藤所含有的成分大致相似,但成分的量有很大的不同,其量的差异可能是何首乌和夜交藤功效不同的主要原因之一。

3.2 本实验建立了 RP-HPLC 法分别测定何首乌、制首乌和夜交藤中二苯乙烯苷及蒽醌成分的分析方法,并分别对其量进行了比较。何首乌与制首乌中二苯乙烯苷和总蒽醌的量较高,但夜交藤中总蒽醌与二苯乙烯苷的比值较高,夜交藤为 0.4 以上,而何首乌与制首乌中二者的比值分别为 0.06~0.09 和 0.05~0.07。

3.3 夜交藤中游离型大黄素的量低于游离型大黄素甲醚的量,比值在 0.33 左右,结合型大黄素的量高于结合型大黄素甲醚的量,比值在 1.74 左右,但

是何首乌与制首乌中游离型大黄素的量高于游离型大黄素甲醚的量,比值为 1.57~1.95,结合型大黄素的量高于结合型大黄素甲醚的量,何首乌比值在 1.65 左右,制首乌比值在 4.10~4.74。

3.4 在优选样品中二苯乙烯苷提取方法时,考察了甲醇、乙醇、50%乙醇的超声提取方法,在对不同溶剂超声提取 5、15、30、60 min 进行了考察,结果表明,50%乙醇超声提取 15 min 可将待测成分提取完全。因此,用 50%乙醇超声提取 15 min 为最佳提取方法。

3.5 在流动相的选择中,比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-1%甲酸、甲醇-乙腈-1%甲酸、甲醇-乙腈-1%磷酸(60:20:20)、甲醇-乙腈-1%磷酸(70:10:15)、甲醇-乙腈-1%磷酸(75:5:20)7 种不同的流动相系统,最终确定在甲醇-乙腈-1%甲酸(15:10:75)为流动相系统下,二苯乙烯苷分离效果良

好,且保留时间恰当;在甲醇-乙腈-1%磷酸(70:10:15)为流动相系统下,蒽醌类分离效果良好,且保留时间恰当。

References:

- [1] Shi G B. Study on the influence of concoction over active ingredients in *Polygonum multiflorum* [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2003, 23(2): 95-97.
- [2] Xie W J, Li I, Wei H F, et al. Effect of 2, 3, 4, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside on hippocampal genes expression in mimetic-dementia mice induced by D-galactose

[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2005, 19(1): 24-28.

- [3] Song Y, Tang Y, Zhang Z Y, et al. Anti-inflammatory and bacteria inhibition effects of *Caulis Polygoni Multiflori* [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2003, 18(2): 114-116.
- [4] Li X D, Huang L Q. Influence of processing rhubara on it's anthraquinone contents [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(12): 904-943.
- [5] Jin B, Li W, Cai W. Study on extraction and purification process of total anthraquinone in *Rheum* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2005, 16(8): 756-758.

电位滴定法测定五味子中总游离有机酸

吴建兵,王誉洁,赵 铁,赵爱华,贾 伟,邱明丰*

(上海交通大学药学院,上海 200240)

五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实,习称北五味子。其味酸、甘,性温,入肺、心、肾经,收敛固涩、益气生津、补肾宁心。用于久嗽虚喘、梦遗滑精、遗尿尿频、久泻不止、自汗、盗汗、津伤口渴、短气脉虚、内热口渴。五味子含多种有效成分如木脂素、有机酸、挥发油、多糖,木脂素类成分可滋补肝肾、治疗肝炎^[1],柠檬酸、苹果酸等多种有机酸具有祛痰和镇咳作用^[2,3],木脂素类成分检测方法较多,但尚无有机酸测定的文献报道。本实验采用直接电位滴定的方法测定五味子中总有机酸的量,避免酸碱滴定法中有有机酸提取液较深颜色对滴定终点的干扰。

1 仪器与试剂

雷磁 PHS-25 数显 pH 计(上海志威电器), 85-2 型恒温磁力搅拌器(上海志威电器), E-201-C-9 型 pH 复合电极(上海罗素科技公司)。五味子(上海华宇药业有限公司 3 份,标为上海华宇 1~3 号;安徽亳州药材市场 3 份,标为亳州药市 1~3 号;成都荷花池药材市场 3 份,标为荷花池药市 1~3 号),经上海交通大学药学院王梦月讲师鉴定,符合《中国药典》2005 年版一部的要求。邻苯二甲酸氢钾(基准级)、柠檬酸(质量数 99.5%,上海润捷化学试剂有限公司,批号 20000219),其他试剂试药均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制:称取柠檬酸适量置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 12.8 mg/mL 的对照品溶液,备用。

2.2 供试品溶液的制备:取五味子 50 目粉,精密加入 30 倍去 CO₂ 蒸馏水和少许沸石至烧瓶中,精密称质量,煎煮提 40 min,放冷,加水补足质量,抽滤,弃去初滤液,收集续滤液待测。

2.3 测定方法:精密移取一定量待测溶液置于 250 mL 锥形瓶中,置电磁搅拌器上,将连接有 pH 计的 pH 复合电极插入液面下,放入搅拌子,开启搅拌,照《中国药典》2005 年版附录 VIII A 电位滴定法^[4],用 0.099 9 mol/L NaOH 滴定液滴定。采用 ORIGIN 软件绘制一阶导数曲线($\Delta E/\Delta V$)-V。一阶导数曲线最高点对应的体积即为滴定终点体积。将结果用空白实验校正,总游离有机酸量按柠檬酸折算,以占生药材的质量分数表示。每 1 mL NaOH 滴定液(0.099 9 mol/L)相当于 6.397 mg 的柠檬酸($M_r = 192.1$)。

2.4 柠檬酸对照品突跃范围试验:准确吸取柠檬酸对照品溶液 10 mL,加水 20 mL,按前述测定方法用 0.102 5 mol/L NaOH 滴定液测定,将结果用空白实验校正。柠檬酸对照品的一阶导数滴定曲线见图 1-A。

由图可见:曲线的极大值对应体积就是滴定终点,消耗碱量为 17.7 mL。由公式($V_{碱} = 3C_{酸} V_{酸}/$

收稿日期:2006-06-12

基金项目:上海市科委中药现代化专项(05DZ19733)

作者简介:吴建兵(1978-),男,湖北省武汉市人,上海交通大学在读硕士研究生,主要从事中药物质基础研究和新药开发。

*通讯作者 邱明丰 Tel & Fax:(021)62932292 E-mail:mfgiu@sytu.edu.cn