

何首乌炮制前后高效液相图谱的变化

刘振丽, 李林福, 宋志前, 吕爱平

(中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。具有解毒、消痈、润肠通便之功效。经炮制后为制何首乌, 具有补肝肾、益精血、乌须发等功效^[1]。何首乌经炮制后其外形、功效均发生了变化。目前在优选炮制工艺与评价饮片质量中, 多注重量变的研究, 测定某成分或提取物在炮制过程中的变化。由于基础性研究工作薄弱, 每味中药中可以进行测定的成分屈指可数, 单纯一种成分的变化并不能全面解释整个单味药功效的改变, 有时成分的变化与功效的改变不相吻合。某些被认为是单味药中起作用的有效成分, 在炮制过程中逐渐下降, 如何首乌中具有补肝作用^[2]的二苯乙烯苷, 在炮制后降低^[3,4]。

随着指纹图谱鉴定技术的发展, 越来越多的中药采用指纹图谱进行鉴定和质量控制。较之单一成分的测定, 指纹图谱可以较全面有效地控制和评价中药饮片质量, 为深入阐明炮制前后药性和功效的改变提供一定的依据。

《中国药典》和《全国中药炮制规范》中, 何首乌的炮制方法为黑豆汁蒸、黑豆汁炖和清蒸。经对全国二十几个省市的炮制规范总结, 另有黑豆汁高压蒸^[4]等。炮制时间从3 h至40 h不等。本实验选择两个产地的何首乌药材, 分别采用不同炮制工艺炮制相同时间, 以及同一炮制工艺炮制不同时间, 对得到的制何首乌饮片进行HPLC-UV图谱分析, 探讨何首乌炮制前后内在成分质与量的变化。

1 仪器、材料与试剂

高效液相色谱仪: HP1100, G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 恒温箱, G1315A DAD 检测器, G1314A VWD 检测器, HP 化学工作站。

何首乌药材来自广东省德庆县德城镇和湖北恩施, 经中国中医研究院中药研究所谢宗万研究员鉴定, 均为蓼科植物何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的干燥块根; 实验样品为实验室自制的何首乌生饮

片和经黑豆汁蒸12、24、32、48 h, 清蒸32 h^[2], 黑豆汁高压蒸12 h^[4]的饮片。

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, 批号0844-200003)、大黄素(批号0756-200110)、大黄素甲醚(批号758-20000S)购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯(美国Fisher公司), 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Diamond C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 甲醇-水从0 min (18:82)到45 min (100:0)线性梯度洗脱, 体积流量为1.2 mL/min, 检测波长为280 nm, 柱温为40 $^{\circ}$ C。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取大黄素、大黄素甲醚、二苯乙烯苷对照品适量, 加甲醇溶解制成40、20、60 μ g/mL的溶液, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取各何首乌饮片粉末(过四号筛)0.15 g, 精密称定, 精密加入甲醇10 mL, 称定质量, 回流提取30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 过0.45 μ m微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验: 取同一何首乌饮片制备的供试品溶液, 连续进样5次, 测定HPLC图谱。结果色谱峰1~4保留时间的RSD分别为0.12%、0.87%、1.21%、1.81%, 峰面积的RSD分别为0.78%、1.13%、3.78%、4.86%。

2.4.2 稳定性试验: 取同一何首乌饮片制备的供试品溶液, 分别在0、8、16、24 h测定HPLC图谱。结果色谱峰1~4保留时间的RSD分别为0.60%、1.11%、1.10%、2.07%, 峰面积的RSD分别为0.18%、2.00%、2.96%、3.89%。表明供试品溶液在24 h内稳定。

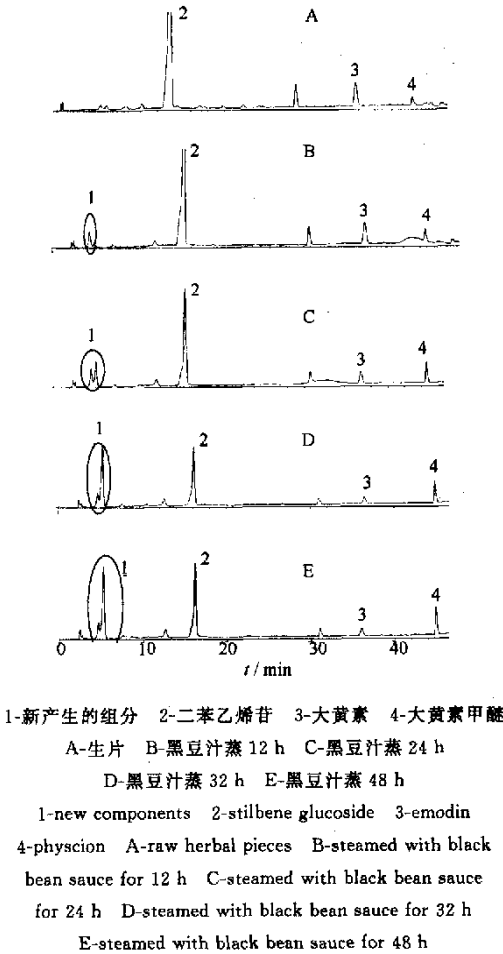
2.4.3 重现性试验: 同一何首乌饮片按供试品溶液制备方法平行制备5份, 分别检测HPLC图谱。结果色谱峰1~4保留时间的RSD分别为0.08%、

1.04%、1.94%、1.36%，峰面积的 RSD 分别为 0.55%、1.99%、3.11%、3.01%。

2.5 各样品 HPLC 图谱测定

2.5.1 色谱峰的归属：精密吸取对照品溶液和何首乌供试品溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪，以 DAD 检测器确认图谱中各对照品峰的归属。

2.5.2 各供试品 HPLC 图谱测定：取各供试品溶液 20 μ L 进样，得到各供试品 HPLC 图谱。湖北恩施产何首乌采用黑豆汁蒸制不同时间各饮片的 HPLC 图谱见图 1，相关色谱峰的峰面积占总峰面积的百分数结果见表 1。广东德庆产何首乌采用不同炮制方法炮制 32 h 后各饮片的 HPLC 图谱见图 2，相关色谱峰的峰面积占总峰面积的百分数结果见表 2。



1-新产生的组分 2-二苯乙烯苷 3-大黄素 4-大黄素甲醚
A-生片 B-黑豆汁蒸 12 h C-黑豆汁蒸 24 h
D-黑豆汁蒸 32 h E-黑豆汁蒸 48 h
1-new components 2-stilbene glucoside 3-emodin
4-phycion A-raw herbal pieces B-steamed with black
bean sauce for 12 h C-steamed with black bean sauce
for 24 h D-steamed with black bean sauce for 32 h
E-steamed with black bean sauce for 48 h

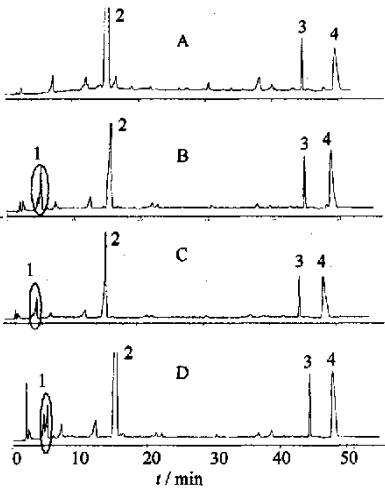
图 1 湖北恩施产何首乌黑豆汁蒸制不同
时间饮片的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Radix Polygoni Multi-
flori* from Enshi, Hubei Provinces steamed
with black bean sauce for different time

表 1 黑豆汁蒸制不同时间何首乌饮片相关色谱峰的
峰面积占总峰面积的百分数 (n=2)

Table 1 Percentage of relative peak area in total peak
area of *Radix Polygoni Multiflora* from steamed
with black bean sauce for different time (n=2)

样品来源	峰 1 新产生 的组分	峰 2 二苯乙 烯苷峰	峰 3 大黄 素峰	峰 4 大黄素 甲醚峰
生片	0	58.88	2.19	2.31
炮制 12 h	3.34	45.05	3.84	2.90
炮制 24 h	11.73	35.13	5.80	11.04
炮制 32 h	27.25	28.40	7.16	13.95
炮制 48 h	26.35	27.53	7.68	13.89



1-新产生的组分 2-二苯乙烯苷 3-大黄素 4-大黄素甲醚
A-生片 B-黑豆汁蒸 32 h C-清蒸 32 h D-黑豆汁高压蒸 12 h
1-new components 2-stilbene glucoside 3-emodin
4-phycion A-raw herbal pieces B-steamed with black
bean sauce for 32 h C-steamed for 32 h D-steamed
with black bean sauce in high pressure for 12 h

图 2 广东德庆产何首乌不同炮制方法饮片 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Radix Polygoni
Multiflora* from Deqing, Guangdong
processed with different methods

表 2 不同炮制方法所得何首乌饮片相关色谱
峰的峰面积占总峰面积百分数 (n=2)

Table 2 Percentage of relative area in total peak
area of *Radix Polygoni Multiflora*
by different processings (n=2)

样品来源	峰 1 新产生 的组分	峰 2 二苯乙 烯苷峰	峰 3 大黄 素峰	峰 4 大黄素 甲醚峰
生片	0	78.32	3.45	9.64
黑豆汁蒸 32 h	7.06	50.89	9.48	29.50
清蒸 32 h	9.31	39.88	8.07	26.14
黑豆汁高压蒸 12 h	7.46	43.27	7.99	14.26

3 讨论

本实验主要对炮制后何首乌新产生的一组色谱

峰以及可以确定归属的3个色谱峰进行了比较研究。从湖北恩施产何首乌采用黑豆汁蒸制不同时间各饮片的HPLC图谱分析可以看出,随炮制时间的延长,3种单体成分中大黄素、大黄素甲醚峰面积逐渐升高,二苯乙烯苷峰面积逐渐降低,而炮制后保留时间4.5~6.5 min出现了一组新的色谱峰。并且随炮制时间由12、24 h延长32 h,这组谱峰峰面积占总峰面积的百分数逐渐增加,至48 h不再增加。

从广东德庆产何首乌采用黑豆汁蒸32 h、清蒸32 h和黑豆汁高压蒸12 h前后各饮片的HPLC图谱分析可知,炮制后保留时间介于4.5~6.5 min也有新的色谱峰产生。同时,大黄素、大黄素甲醚峰面积占总峰面积的百分数升高,二苯乙烯苷降低。各种炮制方法都显示类似的变化。提示与辅料黑豆汁无关。

曾试用甲醇-0.1%磷酸为流动相进行梯度洗脱,但样品分析时基线不平,影响相对峰面积的准确计算,且与甲醇-水系统比较,分离无明显改善。因此

选择甲醇-水梯度洗脱。在供试品溶液的制备中,曾比较了醋酸乙酯、70%乙醇、甲醇回流提取,或甲醇超声提取。结果显示以甲醇回流提取图谱重现性较好,提供的色谱峰数量多,相应色谱峰峰面积大。因此,采用甲醇回流提取制备供试品溶液。采用DAD检测器确定检测波长为280 nm。

试验结果显示,两个产地的何首乌经炮制后既有已知成分量的变化,更存在内在成分质的改变。而炮制后新产生组分的化学结构及其与功效改变的关系,值得进一步研究。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Kimura Y. Effect of stilbene components of roots of *Polygonum* ssp. On liver injury in peroxidized oil-fed rats [J]. *Planta Med*, 1983, 49 (1): 51-53.
- [3] Qi A D. Studies on extraction technology of 2,3,5,4'-stilbene glucoside and the effect of progress on its content from *P. multiflorum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (7): 609-610.
- [4] Tianjin Bureau of Health. *Cut Regulations of Chinese Materia Medica* (中药饮片切制规范) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1975.

枳壳生饮片的HPLC指纹图谱研究

王少军¹, 曹 君², 杨武亮², 龚千锋², 王跃生¹, 杨世林¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实, 具有理气宽中、行滞消胀功效。枳壳生饮片作用较强, 偏于行气宽中除胀。目前我国市场上主流枳壳商品为江枳壳, 湘枳壳, 川枳壳, 分别产于江西、湖南、四川。枳壳来源复杂, 质量参差不齐, 加之市场上不断出现伪劣枳壳药材, 有必要对枳壳饮片建立较全面的质量控制手段。本实验对10批主流枳壳生饮片进行高效液相色谱分析, 建立了枳壳生饮片的特征峰, 为枳壳饮片的鉴别及质量进一步评价提供了一定的科学依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent 1100 柱温箱, DAD 检测器, Agilent 1100 色谱工作站, Mettler AE 240 电子天平, KQ318T 型超声波清洗器。HPLC 级甲醇购于 Merck 公司, 甲醇、磷酸、醋酸乙酯为分析纯, 水为重蒸水。新橙皮苷对照品(自制,

面积归一化测得质量分数为 99.34%), 柚皮苷对照品(批号 0722-200108)、橙皮苷对照品(批号 0721-200010)均购自中国药品生物制品检定所。枳壳原药材分别购于江西新干、江西樟树、湖南连桥、四川荷花池药材市场, 经江西中医学院中药鉴定教研室刘庆华鉴定为枳壳。枳壳生饮片为本课题组自制, 见表 1。

表 1 枳壳生饮片名称及产地

Table 1 Names and habitats of *Fructus Aurantii* raw drugs

编号	样品名	产地
1	湖南生饮片-1	湖南沅江
2	湖南生饮片-2	湖南沅江
3	四川生饮片-1	四川江津
4	四川生饮片-2	四川江津
5	四川生饮片-3	四川江津
6	新干生饮片-1	江西新干
7	新干生饮片-2	江西新干
8	新干生饮片-3	江西新干
9	樟树生饮片-1	江西樟树
10	樟树生饮片-2	江西樟树

收稿日期: 2005-01-21

作者简介: 王少军(1979—), 男, 陕西渭南人, 硕士研究生, 主要从事中药质量标准及天然药物化学研究。E-mail: wangsj@jzjt.com