

高压炮制对何首乌中二苯乙烯苷和卵磷脂的影响

许冬瑾, 陶艳*, 王三姓, 程文胜, 钟小芳, 尤北宏

康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515300

摘要: 目的 考察高压炮制方法对二苯乙烯苷和卵磷脂的影响, 优选何首乌炮制工艺。方法 用不同辅料润制何首乌, 然后采用高压方法进行炮制, 炮制时间为 4、6、8、10 h; 分别采用钼蓝比色法和 HPLC 法测定炮制品中卵磷脂和二苯乙烯苷。结果 随着各种炮制方法时间的延长, 卵磷脂和二苯乙烯苷量均有所降低, 并且高压豆制品 > 高压酒制品 > 高压酒豆制品 > 高压清蒸品, 以豆制为佳。结论 以卵磷脂与二苯乙烯苷为考察指标, 建议可采用高压豆制 4 h 方法炮制何首乌。

关键词: 何首乌; 高压炮制; 二苯乙烯苷; 高效液相色谱; 卵磷脂; 钼蓝比色法

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2011)01-0078-03

Effect of high pressure processing on stilbene glycoside and phosphatidylcholine in *Polygoni Multiflori Radix*

XU Dong-jin, TAO Yan, WANG San-xing, CHENG Wen-sheng, ZHONG Xiao-fang, YOU Bei-hong

Kangmei Pharmaceutical Co., Ltd., Puning 515300, China

Key words: *Polygoni Multiflori Radix*; high pressure processing; stilbene glycoside; HPLC; phosphatidylcholine; molybdenum blue colorimetric method

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 生品性平, 味苦, 微甘, 生津润燥, 解毒散结; 炮制品性变温, 味转甘, 补肝肾, 益精血。临床多采用制首乌入药, 该药主要有效成分为卵磷脂、二苯乙烯类化合物、蒽醌类化合物等。卵磷脂可促进血液细胞的生长发育, 能阻止胆固醇在肝内沉积, 阻止类脂类在血清滞留或渗透到动脉内膜而减轻动脉硬化, 具抗纤溶活性, 能促进纤维蛋白裂解, 减轻动脉粥样硬化和降低血液高凝状态等功效^[1], 是何首乌补肝肾、益精血的主要成分; 二苯乙烯苷(2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷)是何首乌的主要有效成分之一, 具有抗衰老、降低胆固醇、保肝、神经保护等作用, 为何首乌的主要质量控制指标^[2-7]。何首乌炮制方法有清蒸、加黑豆汁蒸制、米泔豆共制及酒制等, 通过炮制可以降低何首乌的毒性, 但其有效成分也随即降低^[8-9]。本实验选取卵磷脂和二苯乙烯苷作为考察指标, 从有效成分的角度探讨高压清蒸、豆制、酒制、酒豆制何首乌之间的差异, 为合理、高效炮制何首

乌工艺选择提供依据。

1 仪器与试剂

岛津 UV-2401PC 型紫外可见分光光度计; Shangping FA2104 型电子天平; Agilent 1100 高效液相色谱仪(四元泵 VWD 检测器)。

生何首乌购于广东德庆, 经笔者鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 干燥块根的切片; 二苯乙烯苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110844-200505); 乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯, 黑豆为市场购买的普通黑豆, 黄酒为普通食用黄酒。

2 方法与结果

2.1 不同何首乌炮制品的制备

按《中国药典》制何首乌项下方法制备黑豆汁, 取何首乌片, 去除杂质, 分别加入 60% 的水、20% 的黄酒、黑豆汁, 润透, 即得清蒸、酒制、豆制用何首乌片; 用黑豆汁润透后, 再加入 20% 的黄酒润制, 即得酒豆制用何首乌片, 置蒸气压力锅内进行高压蒸制, 压力 0.1 MPa, 温度 120 °C, 时间分别

收稿日期: 2010-08-23

作者简介: 许冬瑾(1970—), 女, 广东普宁人, 主管药师, 澳门科技大学工商管理专业硕士, 中国中药协会中药饮片专业委员会专家、广州中医药大学兼职副教授、全国中药标准化技术委员会委员; 1992—1995 年, 普宁市国际信息咨询服务公司业务员; 1995—1997 年, 广东省康美药业有限公司副董事长兼副总经理; 1997 年至今, 康美药业股份有限公司副董事长兼副总经理, 研究方向为药品生产、研发及药品、医疗器械营销。Tel: (0663)2917777 E-mail: kangmei@126.com

*通讯作者 陶艳 Tel: (0663)2920350 E-mail: taoyan830801@yahoo.com.cn

是 4、6、8、10 h，取出，低温烘干，即得。

2.2 卵磷脂的测定

2.2.1 磷标准溶液的制备^[10] 精密称取磷酸二氢钾 213.00 mg，加水定容至 50 mL，作为磷储备液。临用时吸取磷储备液 1.0 mL，稀释至 50 mL。

2.2.2 显色剂的制备^[11] 称取钼酸铵 0.66 g，精密称定，加水溶解并定容至 250 mL，摇匀；另称取抗坏血酸 2.50 g，精密称定，加水溶解并定容至 25 mL，得 10% 抗坏血酸溶液。临用时两种溶液按照 9：1 混合均匀作为显色剂。

2.2.3 标准曲线的制备 精密吸取磷稀释液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加 2.5 mol/L 硫酸溶液 1.2 mL，再加显色剂 4.0 mL，最后加水至刻度，摇匀，于沸水中加热 5 min，同时作空白，冷却后以空白溶剂调零，于 828 nm 处测定吸光度。以磷质量为横坐标，吸光度为纵坐标绘制曲线，得回归方程 $Y=84.581 X-0.021$ ， $r=0.9997$ 。

2.2.4 供试品溶液的制备 取何首乌炮制品粉末（过 4 号筛）0.5 g，精密称定，加无水乙醇 100 mL，60 °C 超声（240 W、100 kHz）提取 1.5 h，滤过，收集滤液，置于坩埚内挥干溶剂，于 550 °C 马福炉中灰化，残渣加稀盐酸 10 mL 溶解，移至 20 mL 量瓶中，用水洗坩埚，洗液并入量瓶中，最后加水稀释至刻度，摇匀，即得。精密移取供试品溶液 2.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，其余操作同标准曲线的制备项下。同时作空白，计算磷的质量浓度，并计算卵磷脂的量。

2.2.5 不同何首乌炮制品中卵磷脂的测定 取何首乌炮制品，制备供试品溶液，分别精密吸取溶液 2.0 mL，按标准曲线的制备项下方法操作，测定吸光度，由回归方程计算磷的量，结果见表 1。

表 1 何首乌高压炮制品中卵磷脂的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of phosphatidylcholine in *Polygoni Multiflora Radix* processed by high pressure (n=3)

炮制品	卵磷脂/(mg·g ⁻¹)			
	4 h	6 h	8 h	10 h
高压清蒸品	1.15	1.13	1.12	1.11
高压豆制品	1.45	1.40	1.31	1.26
高压酒制品	1.20	1.15	1.06	1.00
高压酒豆制品	1.17	1.12	1.02	0.98

随着蒸制时间延长，卵磷脂的量有所降低，从整体来看卵磷脂的保留效果依次为高压豆制品>高

压酒制品>高压酒豆制品>高压清蒸品，以高压豆制品 4 h 为佳。

2.3 二苯乙烯苷的 HPLC 法测定

2.3.1 色谱条件 Hypersil ODS 色谱柱（200 mm×4.6 mm，5μm），流动相为乙腈-水（20：80），检测波长 320 nm，体积流量 1.0 mL/min，柱温 15 °C，进样量 10 μL。色谱图见图 1。

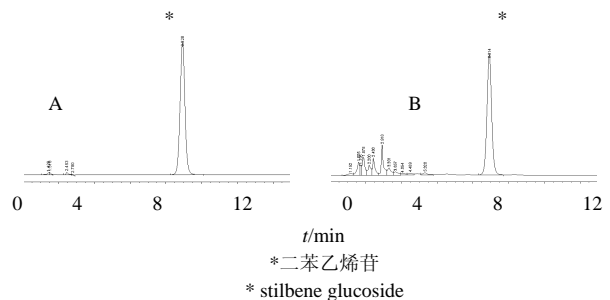


图 1 二苯乙烯苷对照品 (A) 和何首乌 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of stilbene glucoside reference substance (A) and *Polygoni Multiflora Radix* (B)

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取二苯乙烯苷对照品 5.32 mg，置于 25 mL 棕色量瓶中，加入稀乙醇溶液溶解并定容，即得 212.8 μg/mL 二苯乙烯苷溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取何首乌炮制品粉末 0.2 g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入稀乙醇 25 mL，称定质量，80 °C 水浴回流 30 min，冷却后再称定质量，用稀乙醇补足减失的质量，摇匀，静置，上清液过 0.45 μm 滤膜，取续滤液，即得。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取已配制好的二苯乙烯苷对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1、2、4、6、8、10、12 μL 注入高效液相色谱仪，按照上述方法测定峰面积。以进样质量对峰面积进行线性回归，得回归方程 $Y=4047.2 X-48.063$ ， $R^2=0.9999$ ，线性范围为 2.128~255.36 μg/mL。

2.3.5 精密度试验 精密吸取已配制好的二苯乙烯苷对照品溶液 10 μL，注入高效液相色谱仪，连续进样 6 次，测定峰面积值，结果 RSD 为 0.21%。

2.3.6 稳定性试验 取何首乌炮制品（高压清蒸 4 h）供试品溶液，分别在 0、4、8、12、18、24 h 按上述条件进样，测定二苯乙烯苷峰面积，其 RSD 为 1.91%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重现性试验 取何首乌炮制品（高压清蒸 4 h）粉末 5 份，制备供试品溶液，按上述条件进样测定，计算，二苯乙烯苷质量分数的 RSD 为 1.74%。

2.3.8 加样回收率试验 取何首乌炮制品（高压清蒸 4 h）粉末 6 份，每份 0.2 g，精密称定，分别精密加入 12.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 二苯乙烯苷对照品溶液 2 mL，制备供试品溶液，进样分析，计算得二苯乙烯苷的平均回收率为 101.20%，RSD 为 1.89%。

2.3.9 样品中二苯乙烯苷的测定 按上述确定的测定方法对高压清蒸、高压豆制、高压酒制、高压酒豆制何首乌中二苯乙烯苷进行测定，结果见表 2。

表 2 何首乌高压炮制品中二苯乙烯苷的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of stilbene glucoside in *Polygoni Multiflori Radix* processed by high pressure ($n=3$)

炮制品	二苯乙烯苷/%			
	4 h	6 h	8 h	10 h
高压清蒸品	0.73	0.49	0.37	0.15
高压豆制品	1.37	0.98	0.62	0.53
高压酒制品	1.27	1.06	0.92	0.66
高压酒豆制品	0.89	0.6	0.60	0.59

随着蒸制时间延长，二苯乙烯苷的量有所降低，高压炮制 4 h，二苯乙烯苷的量依次为高压豆制品 > 高压酒制品 > 高压酒豆制品 > 高压清蒸品。其中高压清蒸和酒豆制何首乌二苯乙烯苷的量下降较快，4 h 之后其值低于 0.7%（《中国药典》2010 年版规定制何首乌中二苯乙烯苷不得低于 0.7%），高压豆制品和酒制品在同一炮制时间二苯乙烯苷的量均高于清蒸和酒豆制品，说明黑豆汁制和酒制有利于二苯乙烯苷的保留，以高压豆制 4 h 为佳。

3 讨论

《中国药典》2010 年一部中采用的传统炮制方法，根据现有的文献研究与报道，高压炮制能有效减少活性成分的损失，同时消除何首乌的致泄作用，缩短炮制周期等优点，故本实验选择高压炮制方法进行研究。

何首乌中卵磷脂和二苯乙烯苷的量与药效密切相关，随着炮制时间的延长，卵磷脂和二苯乙烯苷的量有所降低，这可能与二苯乙烯苷和卵磷脂长时

间加热不稳定有关，故在何首乌炮制过程中，应注意炮制方法、工艺参数的选择，尽可能减少药用活性成分的损失。综合高压炮制对何首乌中二苯乙烯苷及卵磷脂的影响，建议何首乌炮制方法以高压豆制 4 h 为佳。

根据现有文献与报道研究，为考虑消除何首乌的致泄作用，选择以 4 h 炮制时间为起点，至于 4 h 以内的效果如何，将根据正在进行的药理药效研究，考虑是否要进一步考察。

参考文献

- [1] 苏 玮, 郭 群. 何首乌的现代药理研究概况 [J]. 中草药, 1997, 28(2):119.
- [2] 周庆华, 张 蕾, 吕 鑫, 等. 何首乌炮制前后二苯乙烯苷含量测定 [J]. 中医药信息, 2009, 26(1): 30-31.
- [3] 王春英, 张兰桐, 袁志芳, 等. 何首乌醋酸乙酯提取部位与二苯乙烯苷的调血脂作用 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 78-83.
- [4] 王建科, 高言明, 陈惠玲, 等. 何首乌生品及四种炮制品中二苯乙烯苷含量测定 [J]. 微量元素与健康研究, 2004, 21(4): 27-28.
- [5] 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): 608-702.
- [6] 杨 杰, 周芝文, 杨期东, 等. 二苯乙烯苷对脑缺血再灌注大鼠神经生长因子表达及神经细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1676-1679.
- [7] 赵 玲, 李春阳, 张 丽, 等. 二苯乙烯苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 394-397.
- [8] 廖海明, 胡正海, 贺定翔, 等. 制首乌中二苯乙烯苷含量的 HPLC 测定 [J]. 西北医药杂志, 2006, 21(1): 3-4.
- [9] 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.
- [10] 任丽建, 裴莲花, 尹寿玉, 等. 不同炮制工艺对何首乌中二苯乙烯苷含量的影响 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22(3): 346-347.
- [11] 白 研, 毋福海, 陈志澄. 广东德庆何首乌中卵磷脂含量测定 [J]. 广东药学, 2004, 14(5):3-5.