

青海栽培何首乌中蒽醌类成分的含量动态变化研究

星玉秀^{1,2}, 许传梅^{1,2}, 肖远灿^{1,2}, 皮立¹, 董琦¹, 胡凤祖^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; ²中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要:采用 RP-HPLC 方法研究不同生长年份的栽培何首乌药用部位中蒽醌类物质的动态变化规律, 来确定何首乌的最佳采收年份, 为青海栽培何首乌作为药用提供科学依据。试验结果表明: 不同采收年份的栽培何首乌药材中蒽醌类物质以 8 年生的含量最高。

关键词:栽培何首乌; 蒽醌类; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917; Q946

文献标识码: A

Studies on Dynamic Variation of Anthraquinones Contents in *Polygonum multiflorum* Cultivated in Qinghai by RP-HPLC

XING Yu-xiu^{1,2}, XU Chuan-mei^{1,2}, XIAO Yuan-can^{1,2}, PI Li¹, DONG Qi¹, HU Feng-zu^{1*}

¹Northwest Biological Research Institute of Plateau of Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

²Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: RP-HPLC method was used to study the yearly dynamic variation of anthraquinones contents in *Polygonum multiflorum* collected by its growth time in Qinghai, and deciding optimum harvesting time. Meanwhile, it can offer scientific foundation. The results showed that the total contents of anthraquinones in eight-year-old *Polygonum multiflorum* cultivated in Qinghai were the highest. The *Polygonum multiflorum* cultivated in Qinghai could take place of the wild one as useful medicinal plant, and the time for which a cultivated *Polygonum multiflorum* had grown could be preliminarily determined by the contents of anthraquinones.

Key words: cultivated *Polygonum multiflorum*; anthraquinones; RP-HPLC

中药何首乌始载于《开宝本草》,为蓼科植物何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 的干燥块根^[1],主产于河南、湖北、广西、广东、贵州、四川、江西等地^[2]。文献记载大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、大黄酸、芦荟大黄素具有广泛的生理活性,包括较强的抗菌、抗肿瘤、心肌损伤保护、止血等作用,大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷具有较强的促智作用,2,3,5,4-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、2,3,5,4-四羟基二苯乙烯-2-(2-O-乙酰基)- β -D-葡萄糖苷等二苯乙烯苷类成分具有广泛的心血管活性、免疫调节、保肝作用等,以上各化学成分的药理活性从多方面较全面地体现了何首乌的传统功效。在何首乌中蒽醌类成分主要为大黄素和大黄素甲醚,本文以大黄素和大黄素甲醚为指标考察了青海栽培何首乌中蒽醌类成分量变的规律,为青海栽培何首乌的采收时

间、质量控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

甲醇为色谱纯,磷酸、甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯、氯仿、盐酸均为分析纯。芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、大黄酸对照品均购自中国药品质量检验所。

栽培何首乌由青海西宁市廿里铺蓓蕾花木有限公司提供。样品经阴干,粉碎后,过 80 目筛,冷藏保存。

1.2 仪器

美国 waters 高效液相色谱仪:二元梯度泵, waters 2996 紫外检测器 Empower 色谱工作站。

1.3 标准溶液的配制

精确称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚标准品各 0.8、0.8、0.3、0.3、0.4 mg,分别用甲醇溶解于 10 mL 的棕色容量瓶,浓度分别为

收稿日期: 2007-04-20 接受日期: 2007-07-17

*通讯作者 Tel: 86-971-6132750; E-mail: hufz@nwipb.ac.cn

80、80、30、30、40 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.4 混合标准溶液的配制

精密量取不同体积的上述标准溶液,用甲醇稀释至 1 mL,浓度分别为:芦荟大黄素 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酸 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酚 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.5 供试液的制备

将样品粉碎,精密称取 0.5 g,置于 50 mL 锥形瓶,各加甲醇 50 mL,超声波提取 30 min 后,冷却,过滤,取 25 mL 滤液,蒸干,加 10% 盐酸溶液 30 mL,水浴加热水解 1 h,立即放冷,加氯仿振荡提取四次,每次 30 mL,合并氯仿液,在 40 的旋转蒸发器上浓缩至干,残渣用适量无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液供 HPLC 分析用。

1.6 高效液相色谱条件

色谱柱:Kromasil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-水-磷酸(750:250:0.001),紫外检测波长:254 nm,流速:1 mL/min,进样量 10 μL ,柱温:25 。

在该色谱条件下芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚均被洗脱并达到基线分离(图 1)。

表 1 五种蒽醌类成分的回归方程及线性范围

Table 1 Linear equation and linear rang of five anthraquinones

| 成分 Component | 线性范围 Linear rang ($\mu\text{g/mL}$) | 线性方程 Linear equation | 相关系数 r^2 |
|------------------|--|----------------------------|---------------|
| 芦荟大黄素 Ahe-emodin | 0.50 ~ 8.0 | Y 芦荟大黄素 = 79307X + 23098 | 0.9999 |
| 大黄酸 Rhein | 0.50 ~ 8.0 | Y 大黄酸 = 41647X + 400.08 | 0.9996 |
| 大黄素 Emodin | 0.375 ~ 6.0 | Y 大黄素 = 40926X - 2745.1 | 0.9993 |
| 大黄酚 Chrysophanol | 0.375 ~ 6.0 | Y 大黄酚 = 58429X - 8759.9 | 0.9993 |
| 大黄素甲醚 Physcion | 0.50 ~ 8.0 | Y 大黄素甲 = 14686X - 1360.1 | 0.9995 |

1.7.2 回收率

精密称取 0.5 g 的 5 年生何首乌样粉 9 份,取上述混合标准溶液依次加 50、100、150 μL 于每三份样品中,按样品的测定方法提取及测定。取 9 次测定的平均值计算回收率,结果分别为:芦荟大黄素 95.02%、大黄酸 94.06%、大黄素 95.01%、大黄酚 94.02%、大黄素甲醚 92.00%。

1.7.3 精密度

精密吸取混合对照品溶液(芦荟大黄素 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酸 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大

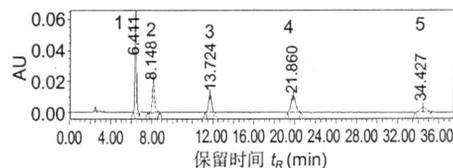


图 1 蒽醌类标准品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference standards

1. 芦荟大黄素 Ahe-emodin; 2. 大黄酸 Rhein; 3. 大黄素 Emodin; 4. 大黄酚 Chrysophanol; 5. 大黄素甲醚 Physcion

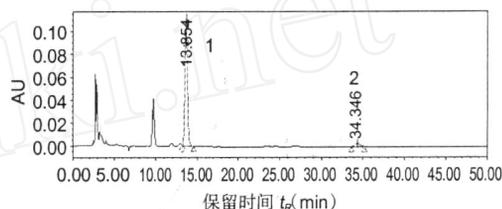


图 2 样品色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of sample

1. 大黄素 Emodin; 2. 大黄素甲醚 Physcion

1.7 方法学考察

1.7.1 线性关系考察

用甲醇将“1.4 项下混合标准按 1、1/2、1/4、1/8、1/16 倍稀释,按“1.6 项下分析条件,以蒽醌浓度对峰面积作图,进行线性回归,得标准曲线回归方程(表 1):

黄酚 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚 8.0 $\mu\text{g/mL}$) 10 μL 重复进样 5 次,测定各标准峰面积,计算 RSD 值,结果:芦荟大黄素 1.30%、大黄酸 1.31%、大黄素 1.20%、大黄酚 1.00%、大黄素甲醚 1.20%。试验结果表明,在该条件下精密度良好。

1.7.4 稳定性

取同一批供试品溶液,按含量测定法分别在 0、4、8、12、24 h 进样,测定样品中蒽醌类的含量。测得各大黄素峰面积分别为 529028、528409、522016、518701、517596,各大黄素甲醚峰面积分别为

84956、84012、83127、82969、82928,计算 RSD 值,结果:大黄素 1.02%、大黄素甲醚 1.05%。试验结果表明,供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

1.7.5 重复性

精密称取同一年份样品粉末 5 份,按供试品制备方法制得待测溶液,依照样品测定方法进样,测定样品中大黄素和大黄素甲醚的含量。测定各目的峰面积,计算 RSD 值,结果:大黄素 1.81%、大黄素甲醚 1.88%。试验结果表明,大黄素和大黄素甲醚的含量测定结果重现性良好。

2 结果与讨论

2.1 样品测定结果与分析

测定生何首乌中主要的蒽醌类成分是大黄素和大黄素甲醚(见图 2)。据文献^[3]报道何首乌含有大黄素、大黄素甲醚、大黄酚和大黄酸等成分,本文以青海省西宁市廿里铺蓓蕾花木有限公司提供的 1、2、3、4、5、8 年生栽培何首乌作为分析样品,将中国药典中规定的五种蒽醌类标准品制备为混合标准进行测定,试验证明青海栽培何首乌中只含有大黄素和大黄素甲醚两种蒽醌类成分,所得结果见表 2。

表 2 样品检测结果(%, n=6)

Table 2 The results of samples(%, n=6)

| 样品类型 Sample type | 大黄素 Emodin(%) | 大黄素甲醚 Physcion(%) | 总量 Total content(%) |
|---------------------|------------------|----------------------|------------------------|
| 一年生何首乌 | 0.238 | 0.037 | 0.275 |
| 两年生何首乌 | 0.253 | 0.040 | 0.293 |
| 三年生何首乌 | 0.170 | 0.025 | 0.195 |
| 四年生何首乌 | 0.130 | 0.017 | 0.129 |
| 五年生何首乌 | 0.239 | 0.032 | 0.271 |
| 八年生何首乌 | 0.360 | 0.057 | 0.417 |

从含量测定结果可以看出不同生长年份何首乌中大黄素和大黄素甲醚含量数值相差无明显规律,

但大黄素的含量都要比大黄素甲醚高。

2.2 讨论

根据文献^[4]报道,不同产地何首乌中蒽醌类物质的含量差异很大,本试验结果显示本文所用样品中 3、4 年生何首乌中蒽醌类物质含量较前 1、2、3 年生的何首乌明显降低,5 年生至 8 年生何首乌中蒽醌类含量又急剧增加,其中存在的生理变化机制和其它活性成分如 2,3,5,4-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、2,3,5,4-四羟基二苯乙烯-2-(2-O-乙酰基)-β-D-葡萄糖苷等二苯乙烯苷类成分及氨基酸、金属元素等的含量变化情况尚未进行研究,但对于药用植物而言,有效活性成分与生态环境及其周围生物因子之间必定有内在的关联,值得进一步探讨。

本实验采用 HPLC 法首次测定了青海不同生长年份栽培何首乌中的蒽醌类成分,精确度高,重复性好。并且采用对照品中各组分的相对保留时间(t_R)及紫外光谱(UV)相结合的比较方法确定了样品色谱图中各组分的位置,结果准确,可靠。因此,本研究结果可以为青海栽培何首乌的质量评价提供参考依据。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol I(一部), 122
- 2 Xu GJ, He HX, Xu IS, et al. *J The Chin Mater Med*, Vol 1. Beijing: 1996. 125.
- 3 Zhao SL(赵声兰), Zhao RH(赵荣华), Xie FJ(谢峰江), et al. Optimization of extracting technology of *Polygonum multiflorum*. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2006, 37: 1496-1499.
- 4 Zuo HX(左红香), Jin Y(金勇), Yin SY(尹寿玉). Comparison of the content of anthraquinone in different regions radix *Polygoni multiflori* W.C.J. *PS(华西药学杂志)*, 2006, 21: 76-77.