

何首乌中顺式和反式-二苯乙烯苷的 HPLC/DAD/MS 测定及其光稳定性考察

孙晋苓^{1,2,3}, 黄晓兰², 吴惠勤^{2*}, 黄芳² (1.中国科学院广州化学研究所, 广州 510650; 2.中国广州分析测试中心, 广州 510070; 3.中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 目的 采用液相色谱/光电二极管阵列检测器/质谱 (HPLC/DAD/MS) 联用技术鉴定何首乌中同时存在顺式和反式-二苯乙烯苷, 并分别测定其含量, 同时考察二苯乙烯苷对光的稳定性。方法 采用反相 Ultimate XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵水溶液二元线性梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 离子阱质谱 (IT-MS) 鉴定出何首乌中同时存在顺式和反式-二苯乙烯苷, DAD 检测器做定量分析, 检测波长为 280 nm。结果 首次证实何首乌中不仅存在反式-二苯乙烯苷, 还存在顺式-二苯乙烯苷。顺式和反式-二苯乙烯苷分别在 0.252~4.022 μg (r=0.999 9) 和 2.14~34.36 μg (r=0.999 3) 内线性关系良好, 测得顺式、反式二苯乙烯苷在生首乌和制首乌中的含量分别为 0.058%, 1.56% 和 0.027%, 0.84%。光照条件下何首乌中的反式-二苯乙烯苷部分转化成顺式结构, 但总含量不变。结论 此方法可以很好地将何首乌中的顺式和反式-二苯乙烯苷分离并准确测定其含量, 灵敏度高, 光照条件下何首乌中的反式-二苯乙烯苷会部分转化成顺式结构。

关键词: 何首乌; 液相色谱/光电二极管阵列检测器/质谱; 顺式和反式-二苯乙烯苷; 光稳定性

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-2494(2009)07-0541-04

Determination of Content and Light Stability of *cis*- and *trans*-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside in Radix Polygoni multiflori by HPLC/DAD/MS

SUN Jin-ling^{1, 2, 3}, HUANG Xiao-lan², WU Hui-qin^{2*}, HUANG Fang² (1. Guangzhou Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. China National Analytical Center, Guangzhou 510070, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify the *cis*- and *trans*-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside (THSG) coexisting in Radix Polygoni multiflori and determine the contents by High Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detector /Mass Spectrometry (HPLC/DAD/MS). **METHODS** A separation was performed on a Ultimate XB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with gradient elution. The mobile phase was methanol-10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate aqueous solution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Ion Trap-Mass Spectrometry (IT-MS) was used to confirm that *cis*- and *trans*- THSG coexisting in Radix Polygoni multiflori. DAD was used to quantitative analysis, with the wavelength of 280 nm. **RESULTS** The *cis*- and *trans*- THSG were identified in Radix Polygoni multiflori. The calibration curves were linear over the range of 0.252~4.022 μg (0.999 9) and 2.14~34.36 μg (0.999 3), respectively. The contents of *cis*- and *trans*- THSG were 0.058% and 1.56% in Radix Polygoni multiflori and were 0.027% and 0.84% in Radix Polygoni multiflori preparata. Part of *trans*-THSG in Radix Polygoni multiflori was transformed into *cis*-THSG under light *cis* form in light. But the total contents were constant. **CONCLUSION** It is a good method to separate and determine *cis*- and *trans*- THSG in Radix Polygoni multiflori. The method is accurate and sensitive. Study of content and light stability of them is meaningful for pharmacology research and quality control of preparation of Radix Polygoni multiflori.

KEY WORDS: Radix Polygoni multiflori; HPLC/DAD/MS; *cis*- and *trans*-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside; light stability

何首乌(Radix Polygoni multiflori)为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb)的干燥块根。生首乌具有润肠、通便和解毒等功效, 制首乌具有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨等功效。研究表明, 何首乌的特征成分 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)含量较高, 具有抗衰老、降低胆固醇、提高免疫功能、防治动脉硬化及保肝等作用^[1]。从化学结构上看, 二苯乙烯苷有顺式和反式 2 种立体异构体, 但以往的药理研究和成分分析都是以反式-二苯乙烯苷为研

基金项目: 广东省科技计划项目[2006B35605009]

作者简介: 孙晋苓, 女, 硕士研究生 研究方向: 有机化学 *通讯作者: 吴惠勤, 男, 研究员 研究方向: 有机质谱 Tel: (020) 87686536 Fax: (020) 87686536 E-mail: wu_hui_qin@tom.com

中国药学杂志 2009 年 4 月第 44 卷第 7 期

Chin Pharm J, 2009 April, Vol. 44 No. 7 • 541 •

研究对象^[1-3]，忽视了何首乌中顺式-二苯乙烯苷的存在及其药理作用。

二苯乙烯苷与白藜芦醇苷(3, 5, 4'-三羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷)结构相似,生理活性上与白藜芦醇有相似之处,都具有保肝、抗癌、清除自由基等功能^[4]。据报道,顺式和反式白藜芦醇中的生物学效价有区别但生物学功能是一样的^[5],所以顺式结构在生物体中的存在及含量不可忽视。已有人对白藜芦醇在生物体中的存在形式及含量测定进行了研究^[6],在何首乌中是否也存在顺式-二苯乙烯苷,尚未见报道。

我们采用液相色谱/质谱(LC/MS)联用技术进行了研究。通过优化色谱条件从何首乌中分离出与反式-二苯乙烯苷相同相对分子质量的色谱峰,经过质谱分析和标准品对照,证实为顺式结构的二苯乙烯苷。同时采用二极管阵列检测器(DAD)对生首乌和制首乌中的顺式和反式-二苯乙烯苷的含量进行了测定,并考察了二苯乙烯苷对光的稳定性。本实验为何首乌的药理研究和制剂的质量控制提供理论依据。

1 仪器、试剂及药材

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent1100 Trap XCT 质谱仪, G1315B-DAD 检测器, AS3120 超声波发生器。

色谱纯甲醇作为 HPLC/MS 的流动相;分析纯甲醇作为提取用;分析纯醋酸铵;实验所用水为二次蒸馏水。

对照品:反式-二苯乙烯苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110844-200606,纯度≥98%)。

药材:生首乌(广东德庆县药材市场);制首乌(广州杏园春药店)。

2 实验方法

2.1 实验条件

色谱条件:色谱柱:Ultimate XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流速:1 mL·min⁻¹,进样量:20 μL,紫外检测波长:280 nm。流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 10 mmol·L⁻¹醋酸铵水溶液,流动相系统配比的梯度程序见表 1。

质谱条件:离子源为 APCI 源,负离子模式,离子阱质量分析器,毛细管电压:3 500 V,放电电流:20 μA,干燥气流速:7 L·min⁻¹,毛细管加热温度:350 °C,汽化温度:400 °C,扫描质量范围 *m/z*:50~800 u,自动二级质谱。

2.2 对照品溶液及样品溶液的制备

2.2.1 反式-二苯乙烯苷对照品溶液的配制 避光的条件下精密称取反式-二苯乙烯苷对照品 2.26, 3.05, 150.20, 17.18 mg, 70%甲醇定容至 10 mL,配制成质量浓度为 0.226, 0.305, 15.02, 1.718 g·L⁻¹的溶液,再由 1.718 g·L⁻¹标准液逐级稀释得到浓度为 0.859, 0.430, 0.215, 0.107 g·L⁻¹的溶液,做标准曲线用,15.02 g·L⁻¹对照品溶液做回收率实验用。

2.2.2 顺式-二苯乙烯苷对照品溶液的配制 由于市面上没有顺式-二苯乙烯苷标准品,故采用了转化的方法配制。二苯乙烯苷与白藜芦醇苷结构相似,仅相差一个羟基,故本实验参考文献^[6-7]将反式-二苯乙烯苷标准溶液在紫外灯下(λ=365 nm)照射而制得。顺式-二苯乙烯苷的转化率计算为:配制质量浓度为 0.226, 0.305 g·L⁻¹的反式-二苯乙烯苷对照品溶液分成 2 份,其中一份根据“2.1”的液相色谱检测条件测定反式-二苯乙烯苷的色谱峰面积为 *A*₁;另一份反式-二苯乙烯苷对照品溶液在紫外灯下照射一定时间后,按“2.1”测定转化后剩余的反式-二苯乙烯苷的色谱峰面积为 *A*₂;顺式-二苯乙烯苷的转化率为: [1- (*A*₂/*A*₁)]×100%,顺式-二苯乙烯苷的浓度为: ρ[1- (*A*₂/*A*₁)]×100%。

取“2.2”配制好的质量浓度为 0.226 g·L⁻¹的反式-二苯乙烯苷对照溶液分成 2 份,其中一份在 λ 365 nm 的紫外灯下照射 1 h,计算转化率为 88.98%,得到质量浓度为 0.201 1 g·L⁻¹顺式-二苯乙烯苷标准溶液,然后再逐级稀释得到质量浓度为 0.100 6, 0.050 3, 0.025 2, 0.012 6 g·L⁻¹顺式-二苯乙烯苷的对照品溶液,做标准曲线用。同样,0.305 g·L⁻¹的反式-二苯乙烯苷的标准溶液紫外灯照射 0.5 h,转化率为 69.18%,得到质量浓度为 0.211 g·L⁻¹的顺式-二苯乙烯苷对照品溶液,做回收率实验用。

2.2.3 供试品溶液的制备 避光条件下制备供试品溶液。称取 1.0 g 何首乌样品于 50 mL 带塞试管中,用 70%甲醇超声波提取 3 次,每次 20 mL,每次超声 10 min,合并滤液,然后蒸干,用 70%甲醇定容到 10 mL,过 0.45 μm 膜后待分析。

表 1 梯度洗脱条件

Tab.1 Condition of gradient elution

<i>t</i> / min	A/%	B/%
0	0	100
20	30	70
50	95	5
60	95	5

3 结果与讨论

3.1 顺式和反式-二苯乙烯苷的鉴定

何首乌样品的 HPLC/MS 的总离子流图 (TIC) 中 (图 1), 保留时间 $t_{R1}=27.2$ min 和 $t_{R2}=30.5$ min 的 2 个色谱峰对应的一级质谱都得到准分子离子峰 $m/z=405$ 和丢失糖基后的苷元碎片峰 $m/z=243$, 确定这 2 个峰对应化合物的分子质量都为 406, 与二苯乙烯苷的相对分子质量相同。以准分子离子为母离子通过质谱的碰撞诱导解离 (CID), 获得对应的二级质谱, 均得到丢失糖基后的苷元碎片离子峰 $m/z=243$ 。这 2 个化合物的一级质谱和二级质谱信息相同 (表 2), 推断这 2 个峰对应的化合物可能是二苯乙烯苷的顺、反异构体。进一步通过与对照品的保留时间 (图 2)、一级质谱和二级质谱对照, 确定 $t_{R1}=27.2$ min 和 $t_{R2}=30.5$ min 两色谱峰对应的化合物分别是顺式和反式-二苯乙烯苷。根据文献^[8]报道, 60 °C 以下温度对二苯乙烯苷的稳定性基本无影响, 样品处理过程中没有 60 °C 以上的高温操作, 则可排除样品处理中因热导致顺、反异构转化, 样品处理操作是在避光条件下操作的, 也可排除样品处理中因光导致的顺、反异构转化, 说明二苯乙烯苷在何首乌中本来就是顺、反异构体共存。

3.2 定量分析

取 0.107, 0.215, 0.430, 0.859, 1.718 $g \cdot L^{-1}$ 的反式-二苯乙烯苷对照品溶液和 0.012 6, 0.025 2, 0.050 3, 0.100 6, 0.201 1 $g \cdot L^{-1}$ 的顺式-二苯乙烯苷对照品溶液, 分别进样 20 μL , 按“2.1”色谱条件分别进行测定。以峰面积为纵坐标, 以进样量 (μg) 为横坐标, 计算得回归方程分别为: 反式: $Y=1\ 399.12X+3\ 181.50$ ($r=0.999\ 3$), 顺式: $Y=1\ 654.25X-12.90$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明, 反式-二苯乙烯苷在 2.14~34.36 μg 、顺式-二苯乙烯苷在 0.252~4.022 μg 内线性关系良好。

3.2.1 精密度实验 取同一何首乌药材 (生首乌) 供试液, 连续进样 5 次, 每次进样 20 μL , 测得顺式-二苯乙烯苷峰面积的 RSD=1.16%, 反式-二苯乙烯苷色谱峰的峰面积的 RSD=1.25%, 2 色谱峰总面积的 RSD=1.18%。

3.2.2 重现性实验 同一何首乌药材 (生首乌) 取 5 份制备供试品溶液, 按“2.1”色谱条件进行测定, 测得顺式-二苯乙烯苷峰面积的 RSD=1.22%, 反式-二苯乙烯苷色谱峰的峰面积 RSD=1.34%, 2 色谱峰峰面积总和的 RSD 为 1.23%。

3.2.3 加样回收实验 反式-二苯乙烯苷加样回收

率实验: 称取生首乌药材粉末 1.0 g (已测得反式-二苯乙烯苷含量为 15.6 mg) 5 份, 分别加入浓度为 15.02 $g \cdot L^{-1}$ 的反式-二苯乙烯苷对照品溶液 1 mL, 按“2.2”供试品溶液的制备操作, 分别进样 10 μL , 按“2.1”色谱条件进行测定, 求得平均回收率为 98.0%, RSD 为 1.71%。

顺式-二苯乙烯苷加样回收率实验: 称取制首乌药材粉末 1.0 g (已测得顺式-二苯乙烯苷含量为 0.27 mg) 5 份, 分别加入质量浓度为 0.211 $g \cdot L^{-1}$ 的顺式-二苯乙烯苷对照品溶液 1 mL, 按“2.2”供试品溶液的制备操作, 分别进样 10 μL , 再按“2.1”色谱条件进行测定同法操作, 求得平均回收率为 98.8%, RSD 为 1.10%。

3.2.4 何首乌药材中二苯乙烯苷含量的测定 用“2.1”项色谱方法测定生首乌和制首乌中二苯乙烯苷的含量, 测定结果见表 3。

3.3 光对何首乌中二苯乙烯苷稳定性的影响

在不避光的条件下按照“2.2”的方法制备不避光的样品溶液。将“2.2”方法超声波提取的滤液

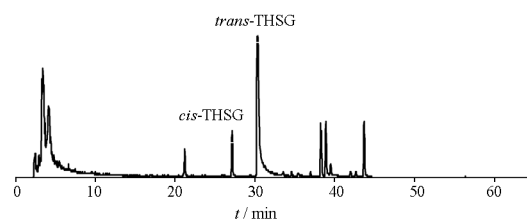


图 1 生首乌 HPLC/MS 的 TIC 图

Fig.1 TIC of Radix Polygoni multiflori

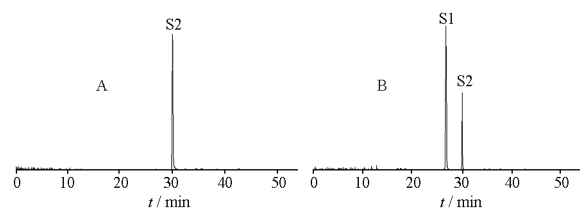


图 2 二苯乙烯苷对照品 HPLC/MS 的 TIC 图

A-反式-二苯乙烯苷 (S2); B-顺式-二苯乙烯苷 (S1) 和反式-二苯乙烯苷 (S2)

Fig.2 TIC of reference substance THSG

A-*trans*-THSG (S2); B-*cis*-THSG (S1) and *trans*-THSG (S2)

表 2 何首乌中二苯乙烯苷的质谱碎裂信息

Tab.2 MS information of THSG in Radix Polygoni multiflori

No.	t_R /min	MS^1 (m/z)	MS^2 (m/z)	M_r /u	Molecular formula	Identification
1	27.2	405, 243	243	406	$C_{20}H_{22}O_9$	<i>Cis</i> -2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucopyranoside
2	30.3	405, 243	243	406	$C_{20}H_{22}O_9$	<i>Trans</i> -2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucopyranoside

置于阳光下照射 1 h 后蒸干, 用 70% 甲醇定容到 10 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 制得阳光照射下的样品溶液。避光、不避光和阳光照射的样品中顺式和反式-二苯乙烯苷的测定结果见表 4。

从表 4 的结果看, 从避光到不避光再到阳光照射, 顺式和反式-二苯乙烯苷的峰面积比在增大, 而顺式和反式总的峰面积基本不变, 说明光照的条件下反式-二苯乙烯苷含量降低而顺式-二苯乙烯苷的含量升高, 而二苯乙烯苷总含量基本不变, 可以确定反式-二苯乙烯苷含量的降低不是发生了分解反应, 而是发生了异构转化, 反式-二苯乙烯苷部分转化为顺式结构。鲁静等^[9]已经注意到了不避光操作的情况下反式-二苯乙烯苷的含量下降, 但没有深入的研究和做出合理解释。二苯乙烯苷在溶液中对光非常敏感, 在不避光的条

件下极易发生顺、反异构转化。除了何首乌本身同时含有顺式和反式-二苯乙烯苷, 在煎煮和炮制过程中因不易完全避光, 也易引起二苯乙烯苷顺、反异构含量的变化。

4 结 论

采用 HPLC/MS 联用的方法分离鉴定出顺式和反式-二苯乙烯苷在何首乌中同时存在, 并 DAD 检测器分别测定了其在何首乌中的含量。二苯乙烯苷对光敏感, 光照会使反式转化成顺式结构。在炮制过程中光照时间的长短, 会影响炮制品中的顺式和反式-二苯乙烯苷的含量, 对其药效产生一定影响。二苯乙烯苷是何首乌中的主要有效成分之一, 对顺式和反式-二苯乙烯苷含量及光稳定性的研究对其药理研究和制剂质量控制都将有重要意义。

表 3 何首乌中二苯乙烯苷的测定结果. $n=5$

Tab.3 Determination of THSG in *Radix Polygoni multiflori*. $n=5$

Sample	Content of <i>cis</i> -THSG	RSD of <i>cis</i> -THSG	Content of <i>trans</i> -THSG	RSD of <i>trans</i> -THSG	Total content	RSD of total content
	%	%	%	%	%	%
Radix Polygoni multiflori	0.058	1.22	1.56	2.12	1.62	2.04
Radix Polygoni multiflori praeparate	0.027	1.19	0.84	1.04	0.87	1.01

表 4 光对何首乌中顺式和反式-二苯乙烯苷的影响

Tab.4 Effect of light on *cis*- and *trans*-THSG in *Radix Polygoni multiflori*

Sample	Light condition	Peak area of <i>cis</i> -THSG(A1)	Peak area of <i>trans</i> -THSG(A2)	$A_1 : A_2$	$A_1 + A_2$
Radix Polygoni multiflori	In dark	1 899.0	46 906.1	0.040	48 805.9
	Normal	2 757.3	45 797.5	0.060	48 554.8
	In light	42 084.8	7 875.4	5.344	49 960.2
Radix Polygoni multiflori praeparate	In dark	873.7	26 827.8	0.033	27 701.5
	Normal	1 540.8	24 439.8	0.941	25 980.6
	In light	23 488.2	4 128.5	5.689	27 616.7

REFERENCES

- [1] LV L S. Recent advances on stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum* Thunb[J]. *Food Sci*(食品科学), 2006, 27(10): 608-612.
- [2] SUN J H, YUAN Z F, WANG C Y, et al. Pharmacokinetics of stilbene glycoside from *Polygonum multiflorum* in rats *in vivo*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(3): 405-408.
- [3] LIU Y, ZHANG D, YUAN H. Determination of 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene- α -O- β -D-glucoside in *Radix polygoni multiflori praeparata* by HPLC[J]. *Chin Trad Pat Med* (中成药), 2005, 27(11): 1310-1312.
- [4] SHU S Y, LU Z Y, WANG X Y. The biologic activity and pharmacology effect of polydatin [J]. *Pediatric Pharm J* (儿科药科学杂志), 2002, 8(1): 9-11.
- [5] HUI B L, ZHANG Y, PEI L P, et al. Study on quenching hydroxyl free radical by E- and Z-isomers of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*[J]. *Chin Pharm J* (中国药科学杂志), 2005, 40(24): 1892-1894.
- [6] WU B, ZHANG H J. Quantitative determination of the (E)- and (Z)-diastereomers of resveratrol glucoside in dry red wine by HPLC [J]. *Chin Brew*(中国酿造), 2006, 9: 64-67.
- [7] WANG Z X, ZHANG X J, ZHOU Y, et al. A convenient synthesis of *trans* and *cis*-3, 4', 5-trihydroxystilbene[J]. *Chin Pharm Sci*, 2005, 14(4): 204-208.
- [8] LIU Z L, SONG Z Q. Determination of content and stability of 2, 3, 5, 4'-stilbeneglucoside in prepared *Radix Polygoni multiflori* from different areas[J]. *Chin Trad Pat Med* (中成药), 2002, 24(9): 684-685.
- [9] LU J, SHU X L, DONG H R, et al. HPLC Determination of stilbene derivative in *Radix Polygoni multiflori*[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析), 2000, 20(2): 104-106.

(收稿日期: 2008-08-10)