

加速，使血中游离脂肪酸进一步增高，进而诱导血小板聚集，导致血管闭塞。可见，血浆中游离脂肪酸的浓度能够反映出心肌缺氧缺血的程度，为检测心肌缺血提供依据。乳酸是葡萄糖无氧酵解的产物，在机体正常组织中一般维持一个稳定的浓度。在氧气充足的肌肉细胞中乳酸可以被氧化为丙酮酸，然后直接用来作为三羧酸循环的燃料。当心肌细胞缺氧时，线粒体不能把组织代谢中所产生的还原型辅酶 I (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NADH) 脱氢为氧化型辅酶 I (NAD⁺)。代谢过程中所必需的 NAD⁺，只有通过胞浆中由堆积的丙酮酸从 NADH 在乳酸脱氢酶的作用下接受氢不定期还原成乳酸而再生出来，这就导致了乳酸的大量生成和三磷酸腺苷形成减少。同时，NAD⁺ 的缺乏和三磷酸腺苷的减少一方面抑制乳酸转化成糖（糖异生代谢），另一方面由于缺氧游离脂肪酸不能为心肌细胞提供能量，三磷酸腺苷含量降低。刺激糖酵解以补充机体对三磷酸腺苷的需要，加速了乳酸过多生成及细胞内酸中毒的恶性循环。可见，乳酸浓度的升高能够反映出机体氧化还原能力的降低，因此可用来提示心肌细胞的缺血缺氧状态^[8-10]。

分析本研究机制可能为通过药物本身的行气活血作用改善心肌缺血缺氧状态，进而增加对机体内游离脂肪酸的利用率，减少对葡萄糖无氧酵解供能的需要，最终减少游离脂肪酸的堆积和乳酸的产生，降低对细胞膜、线粒体和溶酶体膜的损害，阻断细胞内酸中毒的恶性循环，保护心肌细胞膜三磷酸腺苷酶活性，使其保持完整。

综上所述，欣通胶囊对急性心肌梗死犬心肌细胞能量代谢有一定的保护作用，可通过降低模型犬血浆中 K⁺ 浓度、升高 Ca²⁺ 浓度，保护 Na⁺-K⁺- 三磷酸腺苷酶和 Ca²⁺- 三磷酸腺苷酶的活性，从而维持 K⁺ 和 Ca²⁺ 的正常转运，并通过降低乳酸、游离脂肪酸含量，改善心肌细胞缺血缺氧状态，使心肌正常利用游离脂肪酸供能，减少糖无氧酵解，保护心肌细胞膜三磷酸腺苷酶活性，维持心肌细胞完整性。

参考文献:

[1]刘利婷,张前燕.急性心肌梗死中医证候及其辨证治疗探析[J].四川中医,2020,38(4):47-50.
 [2]王永,吴继雄,曹浩,等.开胸结扎冠状动脉建立急性心肌梗死动物模型的研究[J].山东医药,2008,48(1):47-48.
 [3]李峰杰,李贻奎.心肌梗死动物模型研究进展[J].中国药理学通报,2013,29(1):5-10.
 [4]邵耕.现代冠心病[M].北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1994:50-51.
 [5]宿燕岗,杨学义.心肌细胞缺血再灌注后钠、钙、钾离子的改变[J].生理科学进展,1993,24(3):229-233.
 [6]李晓莉,刘明,林小波.急性心肌梗死患者血清钾离子浓度的变化[J].广东医药杂志,2001,22(9):812.
 [7]林波.血清钾、钠浓度与急性心肌梗死的关系探讨[J].右江医学,2011,39(6):786-787.
 [8]刘宇红,高东美,张友良,等.心型游离脂肪酸结合蛋白定性检查在急性非ST段抬高型心肌梗死超早期鉴别诊断中的应用[J].中华临床医师杂志,2012,6(5):1298-1299.
 [9]李想,范春雨.游离脂肪酸与冠心病发生发展关系的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(3):446-448.
 [10]卢富栋,陈熙,姜正明.血清游离脂肪酸在急性心肌梗死中的诊断价值[J].河南医学研究,2020,29(3):393-397.

作者简介:

武爽, 通讯作者。

编辑: 弓良彦 编号: EA-3210408080 (修回: 2021-08-03)

何首乌炮制后化学成分定性定量分析

A qualitative and quantitative analysis of the chemical constituents of polygonum multiflorum after processing

柯颖川¹ 陈继英² 陈锡培¹ 梁映兰¹

(1. 东莞市中医院柯颖川东莞市名中医药传承工作室, 广东 东莞, 523000; 2. 东莞市中医院, 广东 东莞, 523000)

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2021) 22-0042-04

【摘要】目的: 探究何首乌炮制后化学成分定性定量分析。方法: 采用超高效液相色谱仪对何首乌进行化学成分定性定量分析, 观察何首乌饮片经九蒸九晒法炮制前后化学变化规律。结果: 熟何首乌样品中没食子酸的含量高于生何首乌样品, 不同蒸晒次数熟何首乌样品中没食子酸含量无显著差异。随着蒸晒次数的增多, 二苯乙烯苷、大黄素含量逐渐降低, 熟何首乌样品 7 二苯乙烯苷、大黄素含量最低, 生何首乌样品及黑豆样品样品中二苯乙烯苷、大黄素含量高于熟何首乌样品。大黄素甲醚含量随着蒸晒次数的增多而逐渐升高, 黑豆样品中大黄素甲醚含量高于何首乌样品。生何首乌样品中反式/顺式-二苯乙烯苷比值为 6.54,

在熟何首乌样品 3 和 7 中反式/顺式-二苯乙烯苷比值降低, 分别为 2.75、2.29, 其中在熟何首乌样品 7 中反式/顺式-二苯乙烯苷比值最低, 黑豆汁炖制反式/顺式-二苯乙烯苷比值低于生何首乌样品。结论: 超高效液相色谱仪对何首乌化学成分进行分析显示何首乌炮制过程中化学成分变化与蒸晒次数存在相关性及量效关系, 不同炮制工艺对何首乌主要化学成分的影响差异显著。

【关键词】 何首乌; 炮制; 化学成分; 定量分析

【Abstract】 Objective: To explore the qualitative and quantitative analysis of the chemical components of polygonum multiflorum after processing. Methods: The chemical constituents of polygonum multiflorum were analyzed qualitatively and quantitatively by ultra high performance liquid chromatography. The chemical changes before and after processing the decoction pieces of polygonum multiflorum were observed. Results: The content of gallic acid in the cooked polygonum multiflorum samples was higher than that in the raw polygonum multiflorum samples. There was no significant difference in the gallic acid content of the cooked polygonum multiflorum samples with different steaming times. With the increase of steaming times, the content of stilbene glycoside and emodin gradually decreases. In sample 7 of cooked polygonum multiflorum, the content of stilbene glycoside and emodin was the lowest. The contents of stilbene glycosides and emodin in the raw samples of polygonum multiflorum and the samples of black soybeans were higher than those in the samples of cooked polygonum multiflorum. The content of emodin methyl ether gradually increases with the increase of steaming times. The content of emodin methyl ether in black soybean samples is higher than that in polygonum multiflorum samples. The ratio of trans/cis-stilbene glycosides in raw polygonum multiflorum samples was 6.54. In samples 3 and 7, the ratio of trans/cis-stilbene glycosides in cooked polygonum multiflorum samples was 2.75 and 2.29, respectively. Among them, the ratio of trans/cis-stilbene glycosides was the lowest in the cooked polygonum multiflorum sample 7. In the black soybean juice stew, the ratio of trans/cis-stilbene glycosides was lower than that in the raw polygonum multiflorum samples. Conclusion: After UHPLC and nine steaming and nine drying methods, the analysis of the chemical components of polygonum multiflorum showed that there was a correlation and dose-effect relationship between the changes of chemical components during the processing of polygonum multiflorum and the number of steaming and drying. The effects of different processing techniques on the main chemical components of polygonum multiflorum are significantly different.

【Keywords】 Polygonum multiflorum; Processed; Chemical composition; Quantitative analysis

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2021.22.011

何首乌是一味常用的安全性较高的补益中药, 最初记载于《开宝本草》, 具有润肠通便、养肝补肾、益精血等诸多功效, 因其益处较多, 常作为保健品在健康领域被熟知^[1]。近年来, 随着何首乌的广泛应用, 其在学术界的被关注度越来越高。但近年来, 何首乌频繁被曝出肝损伤问题, 炮制是何首乌药材减毒的重要手段, 何首乌中包含大黄酸、蒽醌类等多种成分, 对肝脏的毒性损伤有一定的影响^[2]。2015 年版《中华人民共和国药典》对何首乌含量测量有一定的要求, 其主要包含多种四羟基二苯乙烯、二苯乙烯苷等。超高效液相色谱仪是一种全新的检测技术, 通过利用小颗粒填料等全新的检测方法而被应用于多个领域的技术研究中, 例如医学、药物、生化等, 具有通量高、灵敏度高的特点^[3]。文献表示, 超高效液相色谱仪技术应用于中药领域中对于知晓中药组成, 降低中药分离困难具有重要帮助^[4]。因此, 本文对何首乌炮制后的化学成分进行定性定量分析。

1 材料与方法

1.1 仪器

ODS (C18) 液相色谱仪 (中国上海天普分析仪器); 超声清洗器 (中国杭州萧山余祝超声波设备厂); FA1004C 电子分析天平 (中国青岛聚创环保集团); UV-1102 型紫外-可见分光光度计 (上海天美科学); JJW.3KVA 型精密净化交流稳压电源、SK-5200H 型超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); XMTB.8000 型干燥箱 (余姚市金宏仪器厂)。

1.2 药物与试剂

生品药材何首乌的生产地为广东, 经鉴定为蓼科植物何首乌。按照《中华人民共和国药典》相关的传统炮制方法, 将润透后的何首乌生药置笼屉内蒸制, 低温烘干备用。黑豆为安徽黑豆厂家提供。

1.3 何首乌制备

1.3.1 九蒸九晒法

将何首乌饮片加入 20% 黑豆, 然后混合均匀, 放入蒸锅 (不锈钢材质) 中加水蒸制 8~10 h, 取少量黑豆, 1:8 比例加水, 煮沸开至 4 h, 见汤汁约为黑豆 1.5 倍剂量, 然后加入豆渣水 6 倍, 继续熬制 4 h, 最后加入何首乌至蒸锅内, 其比例为 10:1, 即 10 g 何首乌中加入 1 g 黑豆搅拌均匀, 隔水蒸 36 h, 阳光下自然风晒干。如此反复 9 次, 每晒干一次, 取 50 g 留样 (分别为熟何首乌样品 1~9)。备用时间梯度见参考文献^[5]。

1.3.2 对照品溶液的制备

分别量取适量的何首乌, 电子天平称量后, 放入 20 mL 的量瓶中, 加入甲醇超声溶解液到 20 mL, 所得的溶液为混合对照品溶液。

1.3.3 超高效液相色谱色谱条件

选择 Agilent Zorbax C18 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 进行实验, 对 C18 柱的流动相、柱温度、洗脱流速等进行观察, 色谱柱条件为温度 28 °C, 流向甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 见表 1。流速 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 280 nm, 20 μL, 时间 92 min。见表 1。

表1 何首乌样品流动相洗脱梯度

时间	甲醇
0 ~ 5 min	5% ~ 12%
5 ~ 10 min	12% ~ 20%
10 ~ 15 min	20% ~ 22%
15 ~ 18 min	22% ~ 32%
8 ~ 22 min	32% ~ 32%
22 ~ 25 min	32% ~ 44%
25 ~ 31 min	44% ~ 50%
31 ~ 38 min	50% ~ 51%
38 ~ 57 min	51% ~ 71%
57 ~ 61 min	71% ~ 77%
61 ~ 70 min	77% ~ 84%
70 ~ 77 min	84% ~ 100%
77 ~ 92 min	100%

1.3.4 方法学考察

取供试品后,按照色谱条件连续实验5次,相对标准偏差值为0.08%表示精密度较好,按照上述色谱条件分别在0、

4、8、16、20、24 h 记录峰值面积,相对标准偏差值为0.83%表示稳定性较好。取何首乌,按照色谱条件观察峰值面积,相对标准偏差值为1.02%表示此方法重复性较好。

2 结果

2.1 何首乌饮片超高效液相色谱仪检测

何首乌饮片超高效液相色谱仪指纹图检测没食子酸、5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷以及大黄素波长分别为270 nm、284 nm、320 nm、254 nm,进样量5 μL。何首乌色谱图见图1。

2.2 何首乌饮片含量变化

熟何首乌样品中没食子酸的含量高于生何首乌样品,不同蒸晒次数熟何首乌样品中没食子酸的含量无显著差异。随着蒸晒次数的增多,二苯乙烯苷、大黄素含量逐渐降低,熟何首乌样品7中二苯乙烯苷、大黄素含量最低,生何首乌样品及黑豆样品中二苯乙烯苷、大黄素含量高于熟何首乌样品。大黄素甲醚含量随着蒸晒次数的增多而逐渐升高,黑豆样品中大黄素甲醚含量高于何首乌样品。见表2。

表2 何首乌饮片含量变化

样品	没食子酸	相对标准偏差	5-羟甲基糠醛	相对标准偏差	二苯乙烯苷	相对标准偏差	大黄素	相对标准偏差	大黄素甲醚	相对标准偏差
生何首乌样品	0.187	1.18%			38.365	0.59%	0.582	1.49%	0.168	2.09%
熟何首乌样品1	1.089	0.95%			14.182	0.37%	0.439	0.61%	0.177	0.93%
熟何首乌样品2	1.126	1.89%	0.479	0.21%	2.316	0.22%	0.408	0.35%	0.184	2.62%
熟何首乌样品3	1.028	1.81%	0.704	0.35%	0.384	0.29%	0.429	0.22%	0.217	1.27%
熟何首乌样品4	1.172	2.27%	0.892	0.15%	0.147	0.67%	0.402	0.47%	0.209	1.88%
熟何首乌样品5	1.077	1.93%	0.618	0.27%	0.139	0.41%	0.391	0.35%	0.239	1.95%
熟何首乌样品6	1.125	1.85%	0.577	0.19%	0.141	0.38%	0.388	0.39%	0.224	2.04%
熟何首乌样品7	1.045	1.26%	0.634	0.22%	0.123	0.27%	0.377	0.37%	0.227	2.27%
熟何首乌样品8	1.008	1.22%	0.821	0.27%	0.139	0.32%	0.389	0.43%	0.231	2.19%
熟何首乌样品9	1.233	1.75%	0.754	0.36%	0.175	0.25%	0.393	0.42%	0.235	2.36%
黑豆样品					29.731	0.48%	0.683	1.59%	0.326	2.87%

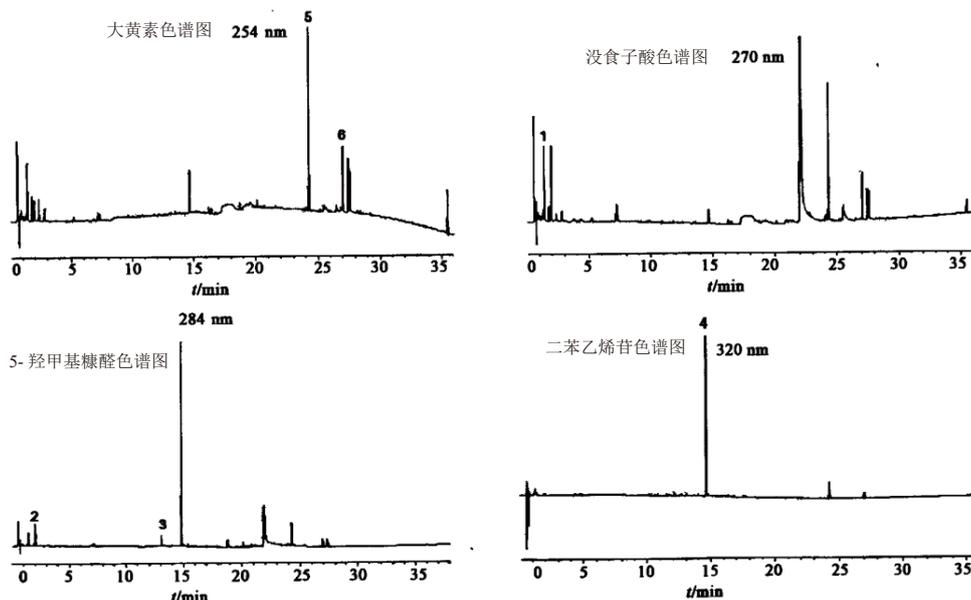


图1 何首乌供试品色谱分析结果

2.3 二苯乙烯苷含量测定结果

九蒸九晒法炮制结果显示,随着蒸晒次数的增多,何首乌样品中二苯乙烯苷的含量呈递减趋势。生何首乌样品中反式/顺式-二苯乙烯苷比值为 6.54,在熟何首乌样品 3 和 7 中反式/顺式-二苯乙烯苷比值降低,分别为 2.75、2.29,其中在熟何首乌样品 7 中反式/顺式-二苯乙烯苷比值最低,黑豆汁炮制反式/顺式-二苯乙烯苷比值低于生何首乌样品。见表 3。

表 3 何首乌样品中二苯乙烯苷测量结果

样品	反式	顺式	反式/顺式
生何首乌样品	1.83%	0.28%	6.54
熟何首乌样品 1	1.47%		
熟何首乌样品 2	0.86%		
熟何首乌样品 3	0.66%	0.24%	2.75
熟何首乌样品 4	0.61%		
熟何首乌样品 5	0.55%		
熟何首乌样品 6	0.48%		
熟何首乌样品 7	0.39%	0.17%	2.29
熟何首乌样品 8	0.31%		
熟何首乌样品 9	0.28%		
黑豆样品	1.41%	0.26%	5.42

3 讨论

中药需经过炮制后方可入药,核心原理是通过改变药物内在物质基础从而改变药性。中药炮制需要遵循辨证了解药物本身的特性,以便调剂和制剂采用不同的制药技术^[6]。化学成分群调控的药物生物活性及变化规律,化学成分具有复杂性,生理作用的化学成分在疾病治疗过程中的作用存在双面性,可能在治疗过程中发挥有效作用,也可能是无效甚至有害的^[7]。因此了解药物化学成分进行中药炮制,保留治疗成分,去除无效成分,对疾病治疗具有重要帮助。一般情况下,中药饮片需要经历炮制才能够应用于临床中,发挥药理作用。何首乌饮片炮制加工需要遵守中医药理基础,并在了解何首乌饮片自身的理化特性的基础上开展加工处理,按照临床用药需求进行针对性的调剂和制剂^[8]。

本文研究发现熟何首乌样品中没食子酸的含量高于生何首乌样品,随着蒸晒次数的增多,二苯乙烯苷、大黄素含量逐渐降低,有学者研究证实采用超高效液相色谱仪检测,样品以甲醇直接超声提取后检测蒽醌苷类成分,生大黄、熟大黄及大黄炭中蒽醌苷类成分含量均不断降低,表示在蒸制等过程中蒽醌类成分遭到破坏,向苷元转化,没食子酸占比升高。^[9]二苯乙烯苷是何首乌中具有活性的化合物,经炮制后变化规律与蒽醌苷的变化存在差异,何首乌中二苯乙烯苷含量占比较高,在炮制过程中起到增加没食子酸的作用^[10]。蒽醌类化学产生苷元,而该类物质可分解成没食子酸,导致何首乌炮制后其含量增加^[11]。炮制后何首乌中没食子酸类物质增加,蒽醌苷类占比降低,鞣质类为中药何首乌的主要药理活性成分,但会随着炮制过程而发生分解,可能由于在炮制过程遭到破坏而转化成没食子酸,进一步增加何首乌中没食子酸含量占比^[5,12]。

本文对生何首乌以及部分制何首乌中顺式-二苯乙烯苷

含量进行研究,发现随着蒸晒次数增加,反式/顺式-二苯乙烯苷比例逐渐降低,推测顺式-二苯乙烯苷的作用得到突显。本次研究通过超高效液相色谱仪对何首乌炮制结果进行分析,发现熟何首乌样品中大黄素甲醚含量高于生何首乌。采用超高效液相色谱仪检测炮制前后蒽醌类、苯丁酮类等物质成分并分析,揭示了何首乌炮制前后质量的变化,具有较好的实践意义^[13-14]。

综上所述,采用超高效液相色谱仪及九蒸九晒法对何首乌化学成分进行分析,结果显示何首乌炮制过程中化学成分变化与蒸晒次数存在相关性及其量效关系,不同炮制工艺对何首乌主要化学成分的影响差异显著。

参考文献:

- [1]CHEN H D,QING S H,YAN Y, *et al.* Preliminary Study on the Processing Mechanism of Polygonum multiflorum Thunb by Microbial Fermentation[J]. Nat. Prod. Res.,2012.
- [2]孙立丽,任晓亮,张慧杰,等.基于超高效液相色谱指纹图谱和化学计量学相结合何首乌炮制研究[J].中华中医药杂志,2017,32(5):310-313.
- [3]胥爱丽,董玉娟,陈昭,等.UPLC/Q-TOFMS法对何首乌配方颗粒化学成分的快速分析[J].中药材,2015,38(6):1287-1289.
- [4]靳宝芬,叶昊,王凤云,等.基于UPLC/Q-TOFMS法分析生何首乌药材的化学成分[J].广东药科大学学报,2020,36(4):473-478.
- [5]成颜芬,聂欣,谭睿,等.基于经典"九蒸九晒"法不同炮制程度何首乌的化学质量概貌评价[J].中国中药杂志,2019,44(23):141-148.
- [6]罗益远,刘娟秀,刘廷,等.UPLC-MS/MS法同时测定何首乌中二苯乙烯苷,蒽醌,黄酮及酚酸类成分[J].质谱学报,2016,37(4):327-335.
- [7]KIM Y G,LEE S J,KIM H S, *et al.* Comparison of Active Compounds for Each Supplement after Processing Methods of KIOM Polygonum multiflorum Thunberg Using Various Ingredient(s)[J]. J Agr & Life Sci, 2020,54(5):37-44.
- [8]张萍,胡克特,陈荣祥,等.超高效液相色谱-电化学检测法测定不同产地盐肤木中的酚类化合物[J].西南林业大学学报(自然科学),2021,41(1):173-179.
- [9]王丽.何首乌炮制后化学成分及药理作用分析[J].中国现代药物应用,2020,14(6):233-235.
- [10]周杨静,唐俊峰,高峰,等.基于"九蒸九晒"炮制法的何首乌主要化学成分含量变化及对大鼠肝脏的影响实验研究[J].中南药学,2020,18(4):25-30.
- [11]周杨静,高峰,卫培峰,等.何首乌九蒸九晒历史沿革及主要化学成分变化研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(10):182-186.
- [12]LIU Y, WANG Q, YANG J B, *et al.* Polygonum multiflorum Thunb: A Review on Chemical Analysis, Processing Mechanism, Quality Evaluation, and Hepatotoxicity[J]. Front. Pharmacol.,2018,9:364.
- [13]杨磊,刘梦娇,陈文明,等.2种炮制方法对何首乌中6种成分变化的影响[J].中成药,2019,41(1):119-123.
- [14]蒲俊安,张思敏,刘梦娇,等.何首乌九蒸九晒炮制工艺的优化研究[J].中国药房,2020,31(22):2713-2719.

编辑:张怀锦 编号:EA-4210312159(修回:2021-08-07)