

基于化学指纹图谱和生物毒性检测的何首乌质量评控

庞晶瑶^{1,2#}, 王伽伯^{2#}, 马致洁¹, 朱云³, 邹正升⁴, 滕光菊⁴, 梁庆生⁴, 李永纲³, 曹俊岭⁵, 赵奎君^{1*}, 肖小河^{3*}

1. 首都医科大学附属北京友谊医院 中药剂科, 北京 100050
2. 解放军 302 医院 全军中药研究所, 北京 100039
3. 解放军 302 医院 中西医结合肝病诊疗与研究中心, 北京 100039
4. 解放军 302 医院 非感染肝病诊疗与研究中心, 北京 100039
5. 北京中医药大学附属东直门医院, 北京 100007

摘要: 目的 近年来何首乌肝中毒事件频发, 针对网络销售制何首乌大量增加及质量监测缺失的问题, 检测不同批次从网络上购买(网购)的制何首乌质量和肝细胞毒性大小, 并比较何首乌不同炮制工艺的减毒效果, 为规范和提高何首乌临床用药的安全性提供参考。方法 采用指标成分定量测定、化学指纹图谱和肝细胞毒性评价方法, 考察部分网络销售的制何首乌质量差异; 比较不同炮制方法对何首乌肝细胞毒性降低效果。结果 网购的 26 批制何首乌二苯乙烯苷在 0.004%~3.442%, 其中有 8 批不符合《中国药典》2010 年版规定; 指纹图谱相似度在 0.052~0.998, 其中有 6 批差异巨大; 对肝细胞毒性(IC₅₀)差异较大, 其中 4 批网购的制何首乌样品毒性大于生何首乌对照药材。何首乌常压清蒸法减毒速度较慢, 蒸制 12 h 毒性仅下降 13.6%; 高压清蒸法和高压黑豆汁蒸法减毒速度相对较快, 蒸制 5~6 h 毒性下降 22.1%左右且趋于稳定。结论 网络销售的制何首乌质量参差不齐, 相当部分炮制减毒不充分, 增加了何首乌肝中毒的风险, 应加强何首乌炮制工艺规范化研究; 何首乌高压清蒸法的炮制减毒效果较好、时间较短, 建议推广采用。

关键词: 网络购买; 何首乌; 制何首乌; 肝毒性; 质量监测; 炮制工艺; 安全性; 指纹图谱; 二苯乙烯苷; 高压清蒸法
中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)23-3392-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.007

Quality evaluation and control of *Polygoni Multiflori Radix* based on chemical fingerprint and toxicity monitoring

PANG Jing-yao^{1,2}, WANG Jia-bo², MA Zhi-jie¹, ZHU Yun³, ZOU Zheng-sheng⁴, TENG Guang-ju⁴, LIANG Qing-sheng⁴, LI Yong-gang³, CAO Jun-ling⁵, ZHAO Kui-jun¹, XIAO Xiao-he³

1. Traditional Medicament Department, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China
2. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China
3. Integrative Medical Center, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China
4. Diagnosis and Treatment Center for Non-infectious Liver Diseases, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China
5. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100007, China

Abstract: Objective Recently hepatotoxicity induced by *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* (PMRP) frequently happened. To aim at dealing with the problems of latest increase of online shopping PMRP and lack of quality monitoring mechanism, the quality and hepatotoxicity of various batches of online shopping PMRP were analyzed, the toxicity-attenuation effects of various processing technologies of *Polygoni Multiflori Radix* (PMR) were compared, and the reference for clinical safe medication of PMR was provided.

收稿日期: 2014-04-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373984)

作者简介: 庞晶瑶, 女, 硕士在读。Tel: 13811928630 E-mail: pjy101411@163.com

王伽伯, 男, 博士, 助理研究员。Tel: (010)66933325 E-mail: pharm_sci@126.com

*通信作者 赵奎君 Tel: (010)63138562 E-mail: zhao1959292@sina.com

肖小河 Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy302@126.com

#为共同第一作者

Methods The quality variance of these PMRP was evaluated and the hepatotoxicity-attenuation effects of various processing technologies were compared by adopting index component content determination, chemical fingerprint, and liver cell toxicity evaluation. **Results** The content of diphenylethylene glycosides in 26 batches of online shopping PMRP was 0.004%—3.442%, therein eight batches could not conform to *Chinese Pharmacopoeia 2010*; The chemical fingerprint similarity was between 0.052 and 0.998, therein great differences among six batches existed; The hepatotoxicity difference was significant as 9.7 times, therein the toxicity of four groups of online shopping PMRP samples was higher than that of PMR medicinal material. The toxicity of PMRP attenuated slowly using atmospheric pressure steaming method, and the toxicity by steaming 12 h declined only 13.6%; The toxicity of PMRP attenuated relatively fast by high-pressure steaming and high-pressure black soya bean steaming methods, and the toxicity by steaming 5—6 h declined by 22.1% and tended towards stability. **Conclusion** The quality of online shopping PMRP varies greatly and inadequate processing method increases the liver poisoning risk of PMRP to some extent, which indicates that the researches on technology standardization of PMRP should be strengthened. As well, the high-pressure steaming method can ensure the safety of PMRP and shorten the processing time greatly, which should be expected as a promising processing method.

Key words: online shopping; *Polygoni Multiflori Radix*; *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*; hepatotoxicity; quality detection; processing technology; security; fingerprint; diphenylethylene glycosides; high pressure steaming method

何首乌为传统著名补益类中药, 不仅在中医临床上应用较多, 在民间也备受追捧, 使用人群广泛。然而, 近年来有关何首乌导致肝损伤的报道频发。以“何首乌”和“肝毒性”为关键词检索中国知网和 PubMed 数据库, 何首乌及其相关制剂引起肝损伤的病例报道超过 150 余例。对这些病例调查分析表明, 药材质量不合格和不合理用药是何首乌产生肝损害的重要原因。笔者在临床发现, 近年来因服用从网络购买(网购)的何首乌制品后导致肝中毒的病例多发。由于网络售药缺少监管, 何首乌产品质量难以保障, 可能存在因质量不合格增加何首乌肝中毒的风险。炮制减毒是保障何首乌用药安全的重要措施。据本草记载, 何首乌炮制方法较为复杂, 如“赤白各一斤, 米泔浸三日, 去皮铺黑豆上, 砂釜蒸之, 如此九次”、“制法以竹刀刮去皮, 拌黑豆九蒸九晒”、“米泔浸拌, 黑豆同蒸”等^[1]; 而现代厂家往往对何首乌炮制工艺较为简略, 存在炮制不规范或不合格的情况, 甚至有不法厂家采用墨汁或染料浸泡、代替蒸制的现象^[2-3]。古代应用何首乌几乎没有中毒的记载, 而当前何首乌中毒事件频发, 表明何首乌的炮制方法十分重要^[4]。如今网络销售的何首乌鱼龙混杂, 很可能没有达到有效的炮制减毒, 其真实性和规范性受到质疑。为此, 本实验对网络销售的部分制何首乌进行质量检测, 同时结合何首乌肝细胞毒性检测, 探讨不同炮制方法减毒的有效性, 为加强市售何首乌产品质量监控、降低肝中毒风险提供科学依据。

1 材料与仪器

RPMI 1640 培养基 (Gibco, 批号 1161726),

胎牛血清 (Gibco, 批号 505985), 胰蛋白酶 (Gibco), 乙醇 (北京化工厂, 批号 20111013), 乙腈 (色谱纯, Fisher 公司, 批号 116525), 甲醇 (色谱级, 德国 Merck 公司), 二苯乙炔苷 (批号 110844-201109, 质量分数 ≥ 98%, 购自中国食品药品检定研究院), 去离子水经 (18.2 MΩ) Millipore Milli-Q 系统 (Millipore Co., 美国) 超纯水器净化。26 批网购 (编号 1~18、20~27) 制何首乌药材购于淘宝网 (除了一家同仁堂商品, 其余均为无营业执照、无销售发票、无生产批次的“三无”产品), 生何首乌对照药材 (编号 19, 批号 934-200106) 购自中国食品药品检定研究院。研究炮制工艺用的生何首乌 (批号 10050904) 购于北京绿野药业有限公司, 经解放军第 302 医院肖小河研究员鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪 (美国 Waters), Synergy™ HT 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司), TC10™ 自动细胞计数器 (美国 Bio-Rad Laboratories), 超净工作台 (苏州净化设备有限公司), KQ—500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 公司), ZK—82B 型真空干燥箱 (上海市实验仪器总厂), 恒温二氧化碳培养箱 (NAPCO), AL204 微量分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

2 方法

2.1 何首乌炮制品制备

将生何首乌药材洗净, 放入真空干燥箱内 60℃干燥 12 h, 分别按下述方法炮制。

2.1.1 常压清蒸法^[5] 取干燥后生何首乌样品适

量,加入60%的水闷润6 h至透心,切成2 cm见方小块,分别进行常压蒸制2、4、6、8、10、12 h,干燥,备用。

2.1.2 高压清蒸法^[6] 取干燥后生何首乌样品适量,加入60%的水闷润6 h至透心,切成2 cm见方小块,放入高压锅中,分别进行加压蒸制1、2、3、4、5、6 h,干燥,备用。

2.1.3 高压黑豆汁蒸法^[7] 称取黑豆适量,加水,电炉上加热至沸,小火煮2 h,取黑豆汁,残渣加水再煮1 h,合并2次黑豆汁。取干燥后生何首乌样品适量,加入60%的黑豆汁闷润6 h至透心,切成2 cm见方小块,分别进行加压蒸制1、2、3、4、5、6 h,干燥,备用。

2.2 供试品制备

取网购或不同方法炮制的何首乌样品各30 g,用70%乙醇提取2次,第1次加10倍量溶剂,超声提取1 h,第2次加8倍量溶剂,超声提取1 h。合并2次乙醇提取液,浓缩并减压干燥,制得干粉备用。

2.3 指标成分定量测定

参照《中国药典》2010年版一部方法测定^[8]。

2.4 指纹图谱检测

2.4.1 样品制备 取已粉碎过筛药材粉末10 g,加入50%乙醇100 mL,超声处理30 min,滤过浓缩后,冷冻干燥,计算出膏率,分别称取适量何首乌提取粉末于量瓶中,加甲醇配成40 mg/mL的供试品溶液,过0.22 μm滤膜进样。

2.4.2 液相条件 色谱柱为Waters CSH C₁₈分析柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈-0.5%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~7 min, 5%~35%乙腈;

7~9 min, 35%~45%乙腈;9~13 min, 45%~65%乙腈;13~16.99 min, 65%~80%乙腈;16.99~17 min, 80%~5%乙腈;17~18 min, 5%乙腈;检测波长254 nm;柱温25℃;体积流量0.5 mL/min;进样量5 μL;分析时间18 min。

2.5 肝细胞毒性评价

正常人肝细胞株L02系(购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库),在含有10%胎牛血清,100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素的RPMI 1640培养基中,37℃、5%CO₂进行常规培养,实验均在细胞生长对数期进行。用培养基将不同的何首乌提取物溶解为8 mg/mL(以生药计)的药液,用0.22 μm的无菌滤膜滤过。将100 μL的L02细胞以3.5×10⁴个/mL的浓度接种在96孔板上,培养24 h后,吸弃培养基,加入配制好的何首乌药液200 μL,每个样品设6个复孔,作用24 h后,吸弃药液,加入MTS,在培养箱内反应4 h后检测490 nm处吸光度(A)值,计算细胞抑制率(抑制率=1-A_{样品}/A_{空白})。

3 结果

3.1 不同批次何首乌中二苯乙烯苷定量测定结果和对照指纹图谱相似度结果

27批何首乌药材中二苯乙烯苷定量测定结果和对照指纹图谱的相似度结果见表1。

3.2 不同批次何首乌的UPLC表征结果

指纹图谱的建立参考课题组前期实验结果^[9]。采用2004版中国药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,对所得的27批何首乌药材指纹图谱进行分析,其中19号样品为何首乌对照药材(图1-A),生成对照指纹图谱,同时对27批何

表1 27批何首乌药材中二苯乙烯苷定量测定结果和对照指纹图谱的相似度

Table 1 Quantitative determination of diphenylethylene glycosides and UPLC fingerprint similarity of 27 batches of PMR

编号	二苯乙烯苷 / %	相似度	编号	二苯乙烯苷 / %	相似度	编号	二苯乙烯苷 / %	相似度
1	1.858	0.997	10	2.302	0.995	19	3.442	0.992
2	1.453	0.993	11	1.448	0.986	20	—	0.761
3	2.685	0.995	12	2.539	0.995	21	0.463	0.132
4	3.428	0.993	13	1.483	0.995	22	0.004	0.843
5	2.333	0.997	14	1.359	0.997	23	0.262	0.742
6	—	0.052	15	2.991	0.994	24	0.249	0.995
7	1.624	0.996	16	1.674	0.998	25	0.614	0.188
8	2.560	0.998	17	1.503	0.993	26	0.018	0.992
9	1.278	0.990	18	3.262	0.996	27	1.623	0.991

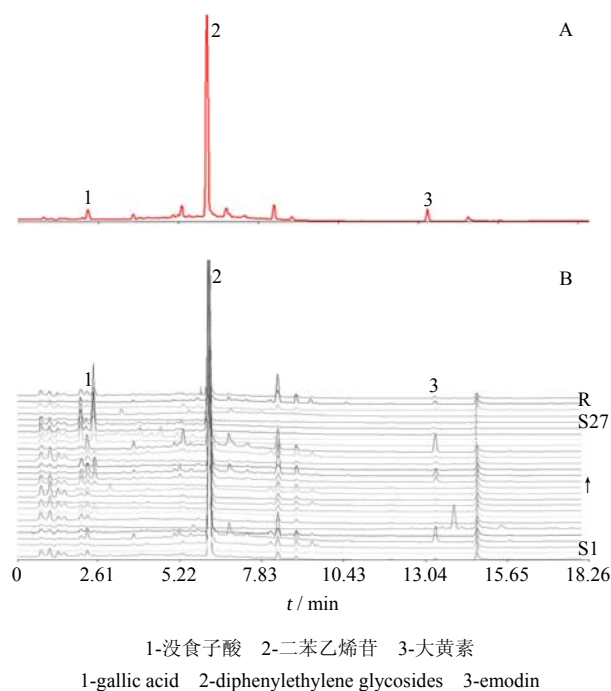


图 1 何首乌对照药材的 UPLC 图谱 (A) 和 27 批何首乌 UPLC 指纹图谱匹配图 (B)

Fig. 1 UPLC of reference PMR (A) and UPLC fingerprint matching figure of 27 batches of PMR (B)

首乌药材的指纹图谱进行匹配 (图 1-B), 并对其相似度进行分析, 以对照指纹图谱为标准, 27 批药材相对对照指纹图谱的相似度在 0.052~0.998 (表 1)。

3.3 不同批次何首乌体外肝毒性评价结果

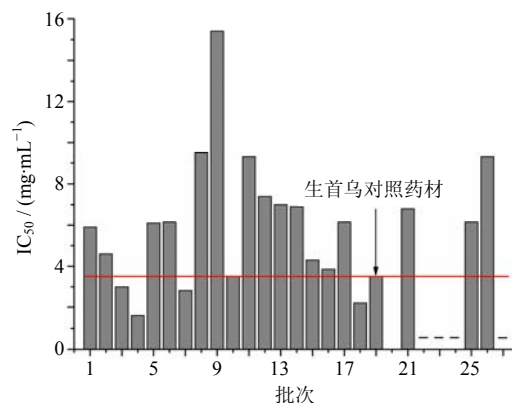
采用 MTS 检测方法评价 27 批何首乌药材对人正常肝细胞 (L02) 的生长抑制情况, 并采用 SPSS 20.0 软件计算不同药材的 IC_{50} 值 (图 2)。

生何首乌对照药材的 IC_{50} 值为 3.5 mg/mL, 26 批制何首乌的 IC_{50} 值差异较大, 其中有 4 批 (第 3、4、7、18 号) 药材的 IC_{50} 值小于 3.5 mg/mL, 毒性大于生何首乌, 还有 3 批 (第 10、15、16 号) 制何首乌的毒性接近于生何首乌。另外 4 批 (第 22、23、24、27 号) 药材在质量浓度为 18 mg/mL 时, 仍得不到其 IC_{50} 值。

3.4 何首乌炮制品毒性评价结果

以人正常肝细胞系 L02 细胞为模型, 采用 MTS 检测方法评价常压清蒸法、高压清蒸法及高压黑豆汁蒸法对何首乌进行炮制后的炮制品对 L02 细胞的生长抑制情况 (图 3)。

从结果可以看出, 3 种炮制方法的细胞抑制率基本均随着炮制时间的增加而减小。从图 3 中还可以看出何首乌常压清蒸法减毒速度较慢, 蒸制 12 h



“—”表示在研究的何首乌生药材质量浓度在 0.6~18 mg/mL, 质量浓度为 18 mg/mL 时, 仍得不到 IC_{50} 值
“—” indicates that concentration of PMR ranges in 0.6—18 mg/mL, when concentration is 18 mg/mL, still can not get IC_{50}

图 2 何首乌样品对人正常肝细胞 (L02) 的 IC_{50} 值

Fig. 2 IC_{50} values of PMR against human normal liver cells (L02)

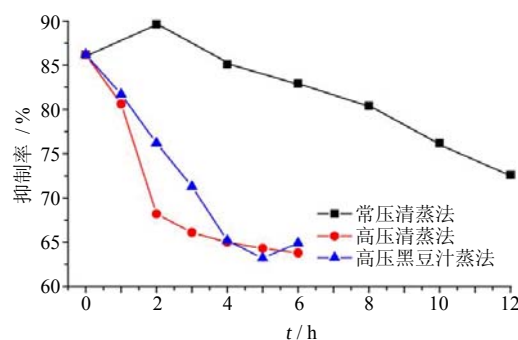


图 3 何首乌不同炮制方法的炮制品对 L02 细胞的抑制情况

Fig. 3 Inhibition of PMR samples by different processed methods against human normal liver cells (L02)

毒性仅下降 13.6%, 高压清蒸法和高压黑豆汁蒸法减毒速度相对较快, 蒸制 5~6 h 毒性下降 22.1% 左右且趋于稳定, 但随炮制时间变化的稳定性有待于进一步考察。

4 讨论

近年来, 临床上有关何首乌及其制剂导致肝损伤的报道频发, 引起人们的广泛关注。为保障公众用药安全, 2013 年 10 月国家食品药品监督管理总局 (CFDA) 决定将养血生发胶囊、首乌丸、首乌片、首乌延寿片及首乌延寿颗粒等 5 个含何首乌的非处方药品种转为处方药管理, 并对上述 5 个品种及白蚀丸的说明书进行修订。笔者在临床调研发现, 很多患者都是服用从网络购买的何首乌制品导致肝中毒。由于网络销售药品的质量监管困难, 导致网购中药的质量参差不齐。本实验对 26 批网购药材中

二苯乙烯苷的量测定发现有6批没有达到《中国药典》2010年版规定的检测值,有2批为伪品。同时细胞毒性实验检测发现制何首乌样品中有4批毒性大于生何首乌,3批毒性接近生何首乌,约有三分之一的样品没有有效地炮制减毒,政府部门应大力加强对何首乌及其他中药的监管。

综上所述,何首乌炮制的有效程度与细胞毒性密切相关。目前尽管对何首乌的炮制进行了一些研究,但全国还没有统一的炮制工艺方法和技术参数。并且何首乌炮制前后主要化学成分的量及药理作用有很大差别^[10-14],因此规范现有的炮制工艺显得尤为重要。

根据《中国药典》2010年版规定,何首乌的炮制采用黑豆汁制法,将何首乌用黑豆汁拌匀置非铁质容器用炖法或蒸法炮制成制何首乌^[8]。本实验采用常压清蒸法、高压清蒸法和高压黑豆汁蒸法对生何首乌进行炮制,根据结果分析,3种炮制方法均能不同程度的降低何首乌的肝毒性,高压清蒸法能更快更稳地降低何首乌的肝细胞毒性,减少炮制时间。从中医的角度讲,黑豆色黑入肾,用黑豆汁炮制可能有利于增强何首乌的补益功效,保健效果更佳。本实验仅从毒性的角度对何首乌进行探讨,今后可能会对何首乌“存效”、“增效”,以及两者之间的联系兼顾“减毒”等多方面进行探索。

综上,网络销售的何首乌产品质量参差不齐,建议民众谨慎购买;国家监管部门应大力加强网络销售何首乌及其他中药的质量监控,提高网络销售中药产品质量;同时应重视和加强何首乌炮制减毒工艺规范化研究,提高何首乌炮制品质量,减少或避免临床上肝中毒的发生。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [2] 龙兴超, 马逾英. 全国中药材购销指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [3] 饶伟文, 蒋玲, 赵纯玉. 几种染色掺假中药的化工染料鉴定 [J]. 药物分析杂志, 2007, 17(11): 1742-1745.
- [4] 鄢良春, 赵军宁, 邱雄. 何首乌安全性问题研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(3): 77-80.
- [5] 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.
- [6] 许冬瑾, 陶艳, 王三姓, 等. 高压炮制对何首乌中二苯乙烯苷和卵磷脂的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 78-80.
- [7] 刘振丽, 宋志前, 张玲, 等. 不同炮制工艺对何首乌中成分含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5): 336-340.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [9] 吕旸. 基于肝细胞毒价检测的何首乌质量控制方法研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2013.
- [10] 李林福, 刘振丽, 宋志前, 等. 何首乌炮制研究进展 [J]. 中国药房, 2007, 18(30): 2377-2379.
- [11] 赵声兰, 赵荣华, 解奉江, 等. 炮制工艺对制何首乌饮片磷脂和总糖的影响研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2006, 26(5): 34-36.
- [12] 赵声兰, 赵荣华, 卫华, 等. 何首乌中总糖和磷脂的测定及其品质的相关分析 [J]. 食品与机械, 2006, 22(5): 93-95.
- [13] 刘振丽, 李林福, 宋志前, 等. 何首乌炮制前后高效液相色谱的变化 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1644-1646.
- [14] 王敏江, 林佩, 李云飞, 等. 何首乌不同炮制品对肝细胞脂代谢的干预作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 494-499.