

川牛膝酒炙和盐炙前后 HPLC 化学指纹图谱及其主要药效成分变化研究

童 凯¹, 李昭玲¹, 闫 焱¹, 邓孟胜¹, 唐勇斌¹, 姜美杰¹, 杨建华², 田孟良^{1,3*}

1. 四川农业大学农学院, 四川 成都 611130

2. 宝兴县农业局, 四川 雅安 625700

3. 四川农业大学新农村发展研究院, 四川 雅安 625014

摘 要: 目的 揭示川牛膝药材经酒炙和盐炙前后的化学成分变化规律, 为修订和完善川牛膝质量标准提供参考。方法 采用 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相梯度洗脱, 检测波长 266 nm, 体积流量 0.5 mL/min, 建立 HPLC 指纹图谱, 记录各色谱峰的保留时间和峰面积数据。采用对照品指认主要色谱峰物质, 采用向量夹角法计算指纹图谱相似系数, 采用主成分分析和聚类分析方法进行模式识别。结果 从 24 批次样品中一共提取出 25 个主要色谱峰, 指认了其中的葛根素、杯苋甾酮、大豆苷元 3 个色谱峰。主成分分析、聚类分析以及相似度结果显示, 酒炙和盐炙对川牛膝化学成分的整体组成与其量水平具有显著影响。葛根素、杯苋甾酮、大豆苷元 3 个已知的药效成分在经酒炙后其量均未得到显著提升, 经盐炙后仅有葛根素的量得到一定程度地提升。结论 现行药效指标成分对于川牛膝酒炙品和盐炙品的质控作用较弱, 有关川牛膝炮制品的质控指标成分还需进一步筛选。实验所建立的 HPLC 化学指纹图谱及其分析方法可以用于川牛膝生品、酒炙品、盐炙品之间的鉴定及其质量控制。

关键词: 川牛膝; 炮制; 酒炙; 盐炙; 指纹图谱; HPLC; 葛根素; 杯苋甾酮; 大豆苷元

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)04-0580-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.009

HPLC fingerprint of crude *Cyathula officinalis* and its processed products stir-fried with wine and salt and variation of their index components

TONG Kai¹, LI Zhao-ling¹, YAN Shen¹, DENG Meng-sheng¹, TANG Yong-bin¹, JIANG Mei-jie¹,
YANG Jian-hua², TIAN Meng-liang^{1,3}

1. College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

2. Agricultural Bureau of Baoxin County, Ya'an 625700, China

3. Institute for New Rural Development, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: Objective To reveal the variation regularity of chemical components in crude *Cyathula officinalis* and its processed products (stir-fried with yellow rice wine and salt), and promote the quality control of the herb. **Methods** Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution in gradient elution mode. The detective wavelength was 266 nm and the flow rate was 0.5 mL/min. The fingerprints for 24 herbal samples were set up and 25 peaks were recorded with different retention time and peak areas. Three peaks were successfully identified as puerarin, cyasterone, and daidzein by comparing with the retention time of reference substances. The vectorial angle method was used to evaluate the similarity between fingerprints. The cluster analysis and principal component analysis were applied to studying the HPLC fingerprint and chemical pattern recognition. **Results** The two processing techniques, stir-frying with wine and salt, both had significant effect on herbal chemical profiles. The contents of three known active components, puerarin, cyasterone, and daidzein, were not observed except a little increasing of the content of puerarin after the crude herbs were processed with salt. **Conclusion** More precise active components of the processed products of *C. officinalis* need to future study to improve the current quality standard of *C. officinalis* in *Chinese Pharmacopoeia*. The method provided by this study is a powerful tool to identify and quality control between crude and processed *C. officinalis* because of its quantificational and visual evaluation system.

收稿日期: 2015-09-25

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (2011BAI13B02-7)

作者简介: 童 凯 (1987—), 男, 四川郫县人, 博士研究生, 研究方向为中药材质量评价。Tel: 15680427880 E-mail: tk-tongkai@qq.com

*通信作者 田孟良 (1977—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药材良种选育与规范化栽培。Tel: 13881636473 E-mail: 652430882@qq.com

Key words: *Cyathula officinalis* Kuan; processing; stir-fried with wine; stir-fried with salt; fingerprint; HPLC; puerarin; cyasterone; daidzein

川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 是我国传统川产道地大宗中药材之一,有逐瘀通经、通利关节、利尿通淋之功效^[1-2]。川牛膝历史上曾出现过酒炙、酒蒸、酒洗、麸炒、酒麸炒、蜜麸炒、盐炙、焦制、制炭、茶水浸、童便酒浸等 10 余种不同的炮制方法^[3-4]。但现行临床实践中多沿用其酒炙品与盐炙品,其他炮制品或因临床表现不佳而被逐渐淘汰。根据中医古代文献记载,酒炙川牛膝具有增强通经活血的作用,盐炙川牛膝具有增强筋骨的作用^[4]。尽管川牛膝炮制品的应用历史可以追溯到 2 000 年前,但是关于炮制的机制解释一直局限于药性理论层面,缺乏炮制处理对于药材内在化学成分影响方面的证据。鉴于此,本研究利用高效液相色谱(HPLC)法比较分析了川牛膝炮制(酒炙和盐炙)前后的化学成分构成特征和主要指标成分量的变化,试图为阐释川牛膝的炮制机制提供新的视角,同时也为改善川牛膝炮制品的质量控制水平提供新的方法。

1 仪器与材料

Agilent1200 高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;HH-8 数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;CP224S 电子天平,德国赛多利斯公司;DHG-9101-3SA 电热恒温鼓风干燥箱,上海三发科学仪器有限公司;BJ-100 型高速多功能粉碎机,浙江爱雪厨房设备有限公司。

甲醇、乙腈、磷酸均为色谱级,氯化钠为分析纯;超纯水由密理博公司 Milli-Q Biocel 型超纯水生产系统制备。黄酒为越王台绍兴老酒 3 年陈酿花雕酒(酒精度 $\geq 15.0\%$),浙江越王台绍兴酒有限公司酿造;对照品购自于成都曼思特生物科技有限公司,包括葛根素(批号 MUST-15012916,质量分数 99.71%)、大豆苷元(批号 MUST-14122616,质量分数 99.92%)、杯苋甾酮(批号 MUST-14081506,质量分数 98.84%)。实验药材于 2014 年 2 月采集自四川省雅安市宝兴县蜂桶寨乡新康村,由四川农业大学田孟良教授鉴定为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的根。

2 方法与结果

2.1 药材处理

随机选取新鲜药材 24 批次,除去芦头,洗净泥沙,鲜切成薄片,按照《中国药典》2015 年版附录

0213(炮制通则)中所述酒炙和盐炙方法^[1]进行炮制,分别制成川牛膝生品 8 批次(A1~A8)、酒炙品 8 批次(B1~B8)和盐炙品 8 批次(C1~C8)。粉碎过 20 目筛,保存备用。

2.2 溶液制备

每批次样品精密称取 1 g 粉末(炮制前后样品质量变化微小,忽略不计),置入具塞锥形瓶中,精密加入 25 mL 甲醇并称定质量,于 80 ℃水浴加热提取 30 min 后取出静置到室温,再次称定质量,用甲醇补足损失质量。提取液过 0.45 μm 微孔滤膜,滤液用超纯水稀释 1 倍,充分混匀后即得药材供试品溶液。另精密称取葛根素、杯苋甾酮、大豆苷元对照品适量,配成甲醇溶液,即得对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱条件在参考文献方法^[5]的基础上,略作修改:色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);体积流量 0.5 mL/min;柱温 30 ℃;检测波长 266 nm;流动相为 0.1%磷酸水溶液-乙腈;梯度洗脱程序:0~70 min, 5%~58%乙腈,70~80 min, 58%~100%乙腈;80~90 min, 100%~5%乙腈。

2.4 方法学考察

2.4.1 空白考察 精密吸取 50%甲醇溶液作为空白溶液,注入高效液相色谱仪,按“2.3”项色谱条件测定。结果显示,色谱流出曲线基线平稳,无杂峰,说明空白溶液对测定结果的无干扰。

2.4.2 精密度考察 以 A1 溶液连续进样测定 6 次,测定指纹图谱。结果显示,各色谱峰的保留时间的 RSD 值在 0.52%以内,峰面积的 RSD 值在 1.33%以内,说明仪器的精密度良好。

2.4.3 稳定性考察 取 A1 溶液,分别在首次进样后 0、4、8、12、24、48 h 进样检测。结果显示,各色谱峰的保留时间的 RSD 值在 0.55%以内,峰面积的 RSD 值在 1.04%以内,说明样品溶液在 48 h 内稳定。

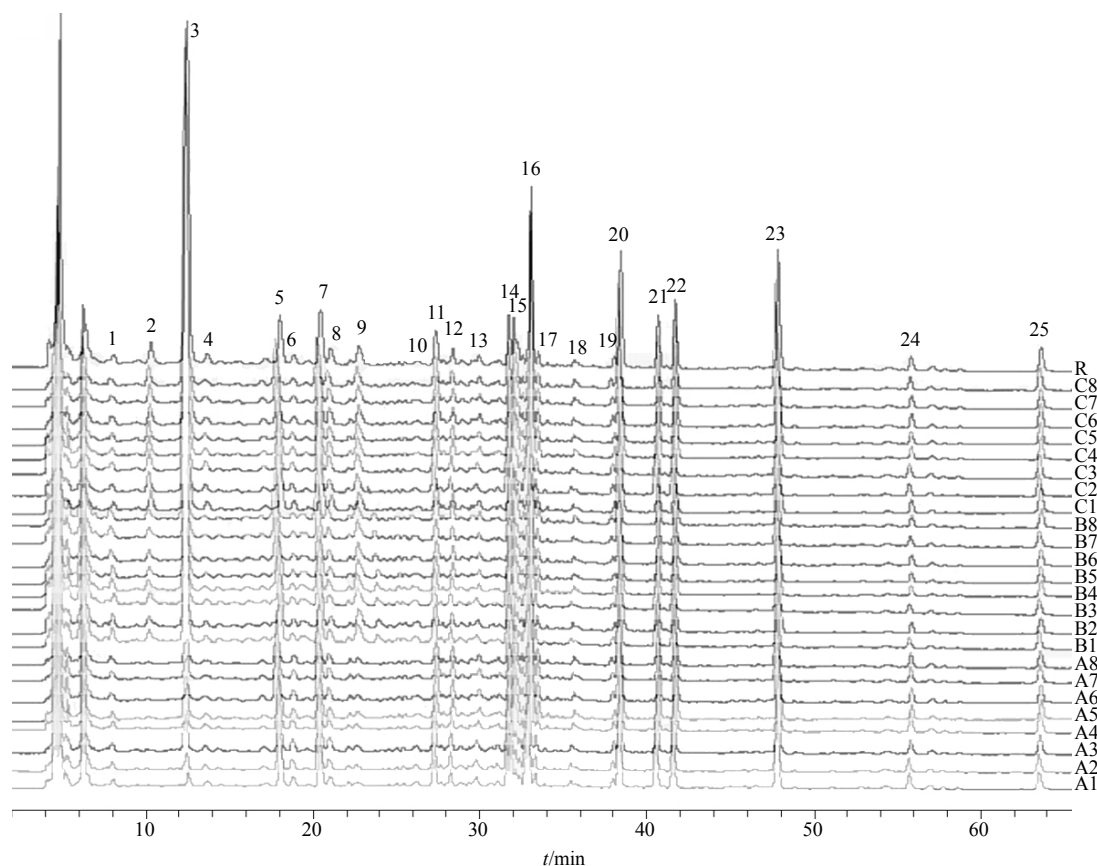
2.4.4 重复性考察 以 A1 的样品取样,平行制备 6 份样品溶液,依次进样检测,结果显示,各色谱峰的保留时间的 RSD 值在 0.68%以内,峰面积的 RSD 值在 2.32%以内,说明该方法重复性较好。

2.5 特征指纹图谱的建立

2.5.1 色谱峰提取 24 份川牛膝样品按“2.3”项色

谱方法依次进样测得各自 HPLC 指纹图谱 (图 1), 从中一共提取 25 个响应值较高的色谱峰作为川牛膝的 HPLC 特征指纹图谱, 按保留时间先后依次编号为峰 1~25 (图 1)。

2.5.2 色谱峰指认 根据相同物质在同一色谱条件下具有相近保留时间的特性, 经对照品比对初步确认其中的 8、16、21 号色谱峰分别为葛根素、杯苋甾酮和大豆苷元 (图 2)。



R-对照图谱 8-葛根素 16-杯苋甾酮 21-大豆苷元, 下同
R-common mode of HPLC fingerprints 8-puerarin 16-cyasterone 21-daidzein, same as below

图 1 24 份样品的 HPLC 指纹图谱和共有指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints and common fingerprints of 24 samples

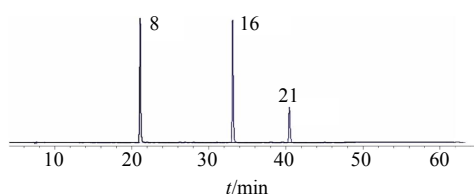


图 2 混合对照品的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substances

2.5.3 峰对齐检验 统计 1~25 各个色谱峰的保留时间在 24 个样品中变化情况。结果显示同一色谱峰在不同样品中保留时间差值均小于 0.37 min, RSD 值小于 0.83%, 说明各色谱峰对齐效果良好, 即同一编号的色谱峰特征分别反映了各自样品相同化学成分的特征。

2.5.4 峰面积提取 各色谱峰完成对齐处理后, 统

计 24 个样品中各自 25 个色谱峰的峰面积数据, 得到 1 张 24×25 的数据集。该数据集用于后续计算各类型样品指纹图谱的相似度, 以及聚类分析与主成分分析。

2.6 炮制前后成分特征总体差异比较

2.6.1 主成分分析 (PCA) [6] 对上述 24×25 的数据集进行 PCA, 前 3 个主成分 (PC1、PC2、PC3) 分别表征了原始数据 42.57%、23.00%、9.40%, 累计 74.97% 的信息量。计算 PC1、PC2、PC3 的主成分得分, 据此绘制样品在三维空间的分布情况图 (图 3)。结果显示, 24 个样品在主成分得分图上被明显地分为了 3 类, 来自于同一炮制类型的样品被聚为了同一类。这说明炮制处理对川牛膝的化学成分总体特征造成了明显的影响。

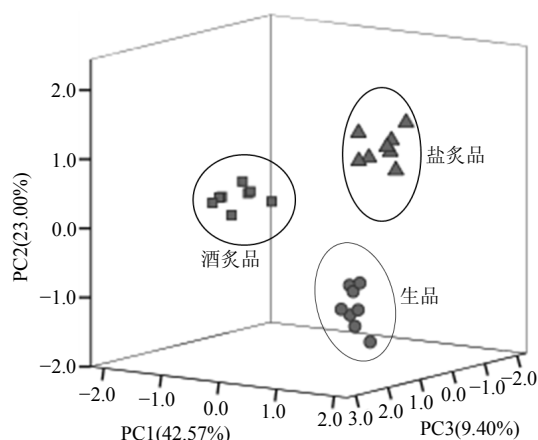


图 3 不同类型样品在主成分得分图上的聚类情况

Fig. 3 Cluster result of principal component analysis in different samples

2.6.2 系统聚类分析^[6-7] 对上述数据集, 在 SPSS 软件中以平方 Euclidean 距离为度量标准, 采用组间联接法绘制 24 个样品的系统聚类树状图 (图 4)。结果显示, 在类间相对距离为 5 左右, 川牛膝生品、酒炙品、盐炙品样品被明显地分别聚为了一类。这进一步证实了酒炙和盐炙对川牛膝药材化学成分总体构成的影响。

2.6.3 相似度比较 采用 24 批样品的指纹图谱中各色谱峰面积的中位数作为对照指纹图谱, 采用向量夹角法^[8-9]计算川牛膝生品、酒炙品、盐炙品指纹图谱分别与对照指纹图谱的平均相似度 (表 1)。结果显示, 川牛膝生品、酒炙品、盐炙品的指纹图谱与对照指纹图谱的平均相似度介于 0.84~0.99, 彼此之间呈现极显著差异 ($P < 0.01$)。

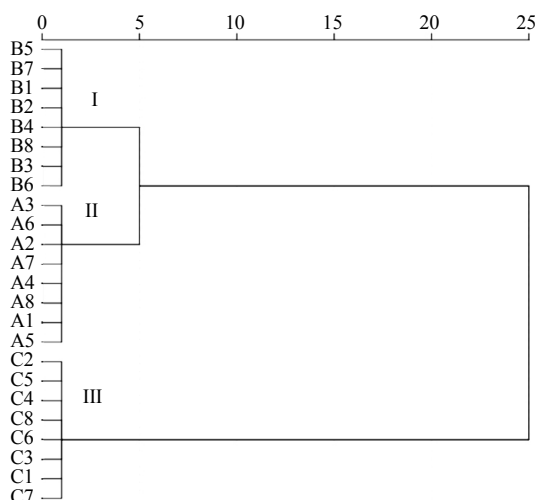


图 4 不同类型样品中系统聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram of hierarchical cluster analysis in different samples

表 1 不同组别样品与对照指纹图谱相似度和可检出色谱峰数量

Table 1 Index of similarity and number of chromatography peaks in different samples

炮制类型	与对照指纹图谱的相似度	平均色谱峰数量
生品	0.844	16.00
酒炙品	0.994**	18.13**
盐炙品	0.916**	18.38**

**表示相较于生品与对照指纹图谱的相似度差异极显著 ($P < 0.01$)

** means significant difference with common mode of HPLC fingerprint ($P < 0.01$)

2.7 炮制前后成分种类与其量比较

2.7.1 色谱峰检出种类比较 色谱峰检出数量反映了样品炮制前后成分种类的增减变化。比较川牛膝生品、酒炙品、盐炙品的平均色谱峰检出数量 (表 1) 后发现, 相较于生品, 酒炙 ($P < 0.01$) 和盐炙 ($P < 0.01$) 处理均促进了川牛膝中更多种类的成分溶出。

2.7.2 色谱峰积分面积比较 各个色谱峰的峰面积反映了该峰所表征化学成分量的多少。对川牛膝生品与酒炙品中各色谱峰面积进行显著性检验 (表 2), 结果显示, 峰 4、5、7、8 (葛根素)、11、14、15、18 共 8 个色谱峰在酒炙前后无显著性变化。其余 17 个具有显著性变化的色谱峰中, 峰 2、9、10 共 3 个成分为酒炙后新检出色谱峰, 峰 1、3 共 2

表 2 川牛膝酒炙和盐炙前后各色谱峰 (成分) 的量变化情况
Table 2 Content changes of each component after herbs stir-fried with wine and salt

峰号	生品	酒炙品	盐炙品	峰号	生品	酒炙品	盐炙品
1	14.09	28.96**	19.62*	14	59.54	63.52	67.02**
2	0.00	27.85**	41.49**	15	76.23	62.68	69.92
3	62.32	320.39**	875.07**	16	268.80	237.95**	253.21**
4	0.00	0.00	7.18*	17	23.50	19.47**	20.95**
5	108.46	110.58	105.02	18	11.90	2.74	9.66
6	16.68	6.79*	15.76	19	14.39	7.00**	14.83
7	98.53	92.44	114.91*	20	147.96	123.62**	157.59
8	25.24	25.90	33.68**	21	81.77	69.19**	82.14
9	0.00	51.80**	47.61**	22	103.74	89.37**	105.46
10	0.00	13.55**	0.00	23	177.52	141.53**	180.58
11	58.24	50.90	65.94	24	28.46	20.20**	24.64**
12	35.25	28.61**	31.16	25	39.52	36.51*	49.10**
13	27.84	20.67*	23.47				

**、*表示相较于生品差异显著性水平 ($P < 0.01$ 、0.05)

**、* means significant difference with crude samples ($P < 0.01$, 0.05)

个组分经炮炙后其量极显著上升,包括杯苋甾酮(峰16)和大豆苷元(峰21)在内其余12个组分经酒炙后其量均有不同程度地下降。

对川牛膝生品与盐炙品中各色谱峰面积进行显著性检验(表2),结果显示,峰5、6、10、11、12、13、15、18、19、20、21(大豆苷元)、22、23共13个色谱峰在酒炙前后无显著性变化。其余12个具有显著性变化的色谱峰中,峰2、4、9共3个成分为盐炙后新检出色谱峰。峰1、3、7、8(葛根素)、14、25共6个组分经炮炙后其量上升,包括杯苋甾酮(峰16)在内其余3个组分(峰16、17、24)经盐炙后其量均不同程度地下降。

3 讨论

药效学实验表明杯苋甾酮具有雌激素样活性和蛋白质同化作用^[10],可以部分解释川牛膝的强筋骨效果,因此被《中国药典》2015年版列为质量控制的指标化合物。葛根素和大豆苷元在其他相关药理学实验表明,其具有改善血液循环和干预骨细胞生长方面的作用^[11-14],与川牛膝活血和壮骨等临床功效亦存在关联。因此将二者作为川牛膝类药材质量控制的补充指标亦有一定的合理性。

通常情况下,药物的疗效和药效成分的量呈现正相关关系。因此药材经过炮制过后,其量水平发生显著提升的成分(包括新产生的成分)往往是解释炮制品特殊疗效的关键^[15]。在本实验中,酒炙处理对杯苋甾酮、葛根素、大豆苷元3个已知的药效成分量提升均未表现出明显的促进作用。但是现行药典却仍然将杯苋甾酮作为川牛膝酒炙品的质控指标,这显然并不合理。而在盐炙品中,葛根素的量虽发生了一定提升,但是幅度微小。因此综合来看,杯苋甾酮、葛根素、大豆苷元是否适宜作为川牛膝炮制品的质控指标还有待进一步确认。

在本实验指纹图谱所提示的其他成分中,川牛膝酒炙品中的峰1、2、3、9、10成分,以及盐炙品中的峰1、2、3、7、8(葛根素)、9、14、25成分均在炮制后其量发生了显著性地上升,尤其峰3变化幅度较大,有潜力成为川牛膝炮制品的新质控指标。因此,综合应用其他化学方法开展上述色谱峰的成分归属鉴定工作对于完善川牛膝酒炙品和盐炙品的质量标准将具有重要意义。

4 总结

酒炙和盐炙对川牛膝药材内在化学成分的种类构成和其量水平具有显著影响。酒炙处理至少对其

中的16个成分产生了显著影响,包括新检出3个成分,量上升2个成分,量下降11个成分。而盐炙处理至少对其中的12个成分产生了显著影响,包括新检出3个成分,量上升6个成分,量下降3个成分。葛根素、杯苋甾酮、大豆苷元3个已知的药效成分不能完全代表川牛膝酒炙品和盐炙品的质控指标成分,新质控指标成分尚需进一步研究确认。本实验所建立的HPLC指纹图谱及分析方法可以用于川牛膝生品、酒炙品、盐炙品之间的鉴定及其质量控制。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 廖彭莹,王东,杨崇仁,等.苋科牛膝资源植物的化学成分研究进展[J].中草药,2013,44(14):2019-2026.
- [3] 叶品良,彭娟,刘娟.川牛膝研究概况[J].中医药学报,2007,35(2):51-53.
- [4] 中医研究院中药研究所.中药炮制经验集成[M].北京:人民卫生出版社,1974.
- [5] 陈丹丹,王书林,赵磊,等.川牛膝的HPLC指纹图谱研究[J].亚太传统医药,2008,4(5):27-29.
- [6] 王元清,韩彬,向荣,等.总量统计矩结合聚类分析与主成分分析评价虎杖饮片一致性与差异性[J].中草药,2015,46(19):2863-2869.
- [7] 罗云,熊志伟,张婧,等.三七总皂苷微丸的成型性与原料物性的相关性研究[J].中草药,2015,46(17):2540-2548.
- [8] 王龙星,肖红斌,梁鑫淼,等.一种评价中药色谱指纹图谱相似性的新方法:向量夹角法[J].药学报,2002,37(9):713-717.
- [9] 张海红,王树,薛贵平.四季三黄片制剂-药材谱峰匹配指纹图谱研究[J].中草药,2014,45(21):3087-3091.
- [10] 黎万寿,陈幸,王晓阳,等.川牛膝的品质研究[J].现代中药研究与实践,2003,17(4):18-20.
- [11] 李海,王金花,黄海玲,等.葛根素联合雌二醇对去卵巢大鼠骨质疏松症的治疗作用[J].中国老年学杂志,2012,32(18):3950-3952.
- [12] 龚志刚,石向群,卢普连.葛根素对运动大鼠血液流变及运动能力的影响[J].中国康复医学杂志,2012,27(7):639-642.
- [13] 李大为,于红玉.大豆苷元对原代培养大鼠成骨细胞功能的影响[J].中国临床康复,2006,10(37):68-70.
- [14] 叶和杨,刘征辉,邱峰,等.大豆苷元对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2006,22(5):10-12.
- [15] Zhao Z Z, Liang Z T, Chan K, et al. A unique issue in the standardization of Chinese materia medica: Processing[J]. *Planta Med*, 2010, 76(17): 1975-1986.