

• 药剂与工艺 •

基于炮制减毒思想的何首乌肝毒性物质基础初步研究

郜丹¹, 李晓菲^{1,2}, 尹萍¹, 王伽伯^{1*}, 孙洪胜², 李飞³, 肖小河¹

1. 解放军第三〇二医院全军中医药研究所, 北京 100039

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

3. 北京中医药大学, 北京 100102

摘要 目的 基于何首乌炮制前后的谱-毒相关分析, 筛选何首乌肝毒性物质基础, 为提高何首乌药材质量控制方法, 确保临床用药安全提供参考。**方法** 以何首乌生品及黑豆汁蒸制不同时间的炮制品为研究对象, 采用 UPLC-Q/TOF-MS 技术表征各样品的化学信息, 并结合文献初步指认其主要成分; 再以正常人肝细胞 (Lo2 细胞系) 为模型, 细胞抑制率为评价指标, 采用简单相关分析及多元线性相关分析方法, 筛选何首乌致肝毒性的主要成分。**结果** 共指认出何首乌生品及炮制品中的 7 种主要共有成分反式二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、顺式二苯乙烯苷、儿茶素, 并基于谱-效简单相关分析发现反式二苯乙烯苷、大黄素甲醚、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、顺式二苯乙烯苷、儿茶素 5 个成分与何首乌毒性相关性较强。进一步主成分回归分析发现大黄素甲醚与顺式二苯乙烯苷对何首乌毒性贡献度较大, 提示这 2 个成分可能是何首乌主要毒性成分。何首乌高压黑豆汁蒸至 36 h 后才能达到减毒的效果。**结论** 该研究可为何首乌的合理利用和毒性研究提供参考和依据。

关键词: 何首乌; 炮制; 肝毒性; 物质基础; 安全性; 谱-毒相关分析; 用药安全; 黑豆; UPLC-Q/TOF-MS; 抑制率; 简单相关分析; 多元线性相关分析; 反式二苯乙烯苷; 没食子酸; 大黄素; 大黄素甲醚; 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 顺式二苯乙烯苷; 儿茶素

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-2044-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.019

Preliminary study on hepatotoxic components in *Polygoni Multiflori Radix* based on processing and toxicity-decreasingGAO Dan¹, LI Xiao-fei^{1,2}, YIN Ping¹, WANG Jia-bo¹, SUN Hong-sheng², LI Fei³, XIAO Xiao-he¹

1. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract Objective To explore the main toxic components induced hepatotoxicity based on the spectrum-toxicity correlation analysis of processed *Polygoni Multiflori Radix* (PMR), and to provide reference of PMR for promoting the quality control as well as the safe clinical treatment. **Methods** The UPLC-Q-TOF-MS characterized chemical information of all samples including crude and processed PMR which were black soybean steamed with high pressure in different time, and the main components were identified after referring to the literatures. With the normal human hepatocytes (Lo2 cell line) as *in vitro* model and cell inhibitory rate as testing index, the simple correlation analysis and multivariate linear correlation analysis were used to screen the main components of PMR hepatotoxicity. **Result** Seven main same components of crude and processed PMR were identified as *trans*-stilbene glycoside, gallic acid, emodin, physcion, emodin-8-*O*- β -D-glucoside, *cis*-stilbene glycoside, and catechin. And it was found that *trans*-stilbene glycoside, physcion, emodin-8-*O*- β -D-glucoside, *cis*-stilbene glycoside, and catechin were closely related to PMR hepatotoxicity.

收稿日期: 2017-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373984); 国家公益性行业科研专项课题 (201507004-04); 北京自然科学基金项目 (7152142)

作者简介: 郜丹 (1987—), 女, 在读博士, 研究方向为中药有效性和安全性。Tel: 18910847699 E-mail: gaodan_gd@163.com

*通信作者 王伽伯, 男, 副研究员, 主要从事临床中药学研究。Tel: (010)66933325 E-mail: pharm_sci@126.com

Furthermore, physcion and *cis*-stilbene glycoside were found greatly contributing to hepatotoxicity induced by PMR in the principle component regression analysis, which indicated these two might be the main toxic components. In addition, the results demonstrated apparent effects in detoxification could not be achieved until black soybean steamed with high pressure at least 36 h. **Conclusion** This study will provide data support for further rational use of PMR and deep hepatotoxicity research.

Key words: *Polygoni Multiflori Radix*; processing; hepatotoxicity; material basis; safety; spectrum-toxicity correlation analysis; medication safety; black soybean; UPLC-Q-TOF-MS; inhibitory rate; simple correlation analysis; multivariate linear correlation analysis; *trans*-stilbene glycoside; gallic acid; emodin; physcion; emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside; *cis*-stilbene glycoside; catechin

何首乌为蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根,《中国药典》2015 年版一部中收录了何首乌和制何首乌。何首乌有解毒、消痛、润肠通便的功效,制何首乌可补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨、化浊调脂^[1-3], 历来为古今医家、饮食家所推崇,临床应用颇广。然而,近年来国内外有关何首乌及其制剂不良反应,尤其是肝脏毒性的报道日渐增多,其安全性问题引起社会各界的广泛关注^[4-7]。历代医家均强调炮制入药,早在《本草汇言》中已明确提出何首乌“生用有毒,炮制减毒”思想,与现代多数文献认为的炮制方法可影响何首乌安全性或有效性观点一致^[8-14]。然而,何首乌炮制减毒过程中可能发生了极其复杂的变化,如何揭示这些变化,并与中医临床相关联,是何首乌质量安全性评控的难点和重点问题之一,也是筛选何首乌可能毒性物质的重要手段^[15-16]。

何首乌化学成分主要包括蒽醌类、二苯乙烯苷类、磷脂类等,其质量以往多以蒽醌衍生物及二苯乙烯苷的量作为评价指标^[1-2]。近年来,由于中药指纹图谱能较全面地反映药材所含化学成分的相对关系,体现中药成分的复杂性和相关性,已成为国内外广泛接受的一种中药或天然药物的质量评价模式^[15,17-18]。但其不能体现化学成分是否代表发挥药效的活性物质,故单纯的指纹图谱在中药质量评价中难以实施。因此,本实验将何首乌炮制前后指纹图谱中的化学成分的变化与其整体毒性评价^[19-22]相结合,通过研究其相关性,寻找与毒性相关的物质群,为何首乌的质量控制标准及安全性评价提供参考和依据。

1 仪器与材料

ZK-82B 型真空干燥箱,上海市实验仪器总厂, W12PCS505E 电压力锅,美的集团; Agilent Technology 1290 Infinity UPLC 超高效液相色谱仪, Agilent Technology iFunnel 6550 LC-Q-TOF /MS 四级杆串联飞行时间质谱, G4212A 1290 二极光阵列检测器; AL204 型微量分析天平,瑞士 Mettler Toledo

公司; 旋转蒸发器,德国 Heidolph 公司; 恒温二氧化碳培养箱, NAPCO 公司; 台式低速离心机,湖南赫西仪器装备有限公司; SN510C 高压蒸汽灭菌器,重庆雅马拓科技有限公司。

经解放军第三〇二医院肖小河研究员鉴定,生首乌(批号 13101701,北京绿野药业有限公司,产地湖北)为蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根,小黑豆(批号 12021507,购自北京绿野药业有限公司)为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种子; DMEM 培养基(批号 1552738)、胎牛血清(批号 505985)、0.25%胰酶(批号 1155756)、青链霉素(批号 ZC03418)均购于美国 Gibco 公司; 人正常肝细胞系 L02 细胞株购自中国典型培养物保藏中心; Cell Counting Kit-8 (CCK-8,批号 GD619)购自日本同仁化学研究所; PBS(批号 20140918)购于北京索莱宝科技有限公司; 对照品对乙酰氨基酚(批号 100018-200408,质量分数 $\geq 98.59\%$)购自中国食品药品检定研究院,顺式二苯乙烯苷(批号 14091807,质量分数 $\geq 98\%$)、反式二苯乙烯苷(批号 14051503,质量分数 $\geq 98\%$)、大黄素(批号 14030604,质量分数 $\geq 98\%$)、大黄素甲醚(批号 13110706,质量分数 $\geq 98\%$)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 14081501,质量分数 $\geq 98\%$)、儿茶素(批号 13091702,质量分数 $\geq 98\%$)、没食子酸(批号 13121803,质量分数 $\geq 98\%$)均购自成都普菲德生物技术有限公司; 乙腈、甲醇,色谱纯, Sigma; 纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司; 超纯水, Millipore Milli-Q water purification system; 无水乙醇,分析纯,北京市化工厂。

2 方法

2.1 何首乌炮制品制备

将所购何首乌饮片(500 g)置带盖不锈钢桶中,加入黑豆汁 125 g(取黑豆 100 g,加水适量,煮约 4 h,熬汁约 150 g,豆渣再加水煮约 3 h,熬汁约 100 g,合并得黑豆汁约 250 g)^[1],按液体量 80%闷润

8 h 至透心, 分别高压清蒸 0、6、12、24、36、48、72、84、96 h, 置于 45 °C 烘箱中烘干, 备用^[23-25]。

2.2 基于 UPLC-Q/TOF-MS 技术的何首乌化学指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent 300SB-C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为水-乙腈, 线性梯度洗脱: 0~5 min, 95%~68%水; 5~6 min, 68%~45%水; 6~12 min, 45%~12%水; 12~15 min, 15%~10%水; 柱温 30 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 280 nm; 洗脱时间 15 min; 进样量 0.5 μL。理论板数按反式二苯乙烯苷峰计算不低于 2 000。

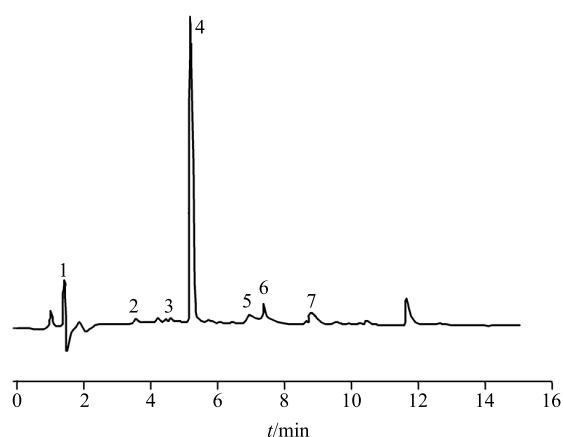
2.2.2 质谱条件 离子源 ESI; 毛细管电压及锥孔电压分别为 4 000 V 和 45 V; *m/z* 50~1 000; 脱溶剂气温度 225 °C; 脱溶剂气流量 11 L/min; 雾化器压力 310.275 kPa (45 psi); 鞘气温度 350 °C; 鞘气体积流量 12 L/min; 喷嘴电压 500 V。

2.2.3 供试品溶液制备 课题组前期研究表明 50% 乙醇冷浸提取何首乌的肝细胞毒性较强, 本实验采取 50% 乙醇制备样品^[26]。取何首乌粗粉 (过 40 目筛) 适量, 精密称定, 加入 10 倍量 50% 乙醇, 超声提取 30 min, 滤过取滤液, 减压蒸馏, 真空干燥得何首乌干浸膏, 计算得率。精密称取适量的何首乌样品醇提物干浸膏, 置于 10 mL 量瓶中, 加 50% 乙腈, 超声溶解, 放冷, 补加溶剂至刻度, 摇匀, 0.22 μm 滤膜滤过, 配制成 4 mg/mL (以生药量计) 的供试品溶液^[27]。

2.2.4 对照品溶液制备 分别精密称取顺式二苯乙烯苷、反式二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、儿茶素、没食子酸适量于 10 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇, 超声溶解, 放冷, 补加 50% 甲醇溶剂至刻度, 摇匀, 0.22 μm 滤膜滤过, 配制成质量浓度分别为顺式二苯乙烯苷 50.900 μg/mL、反式二苯乙烯苷 51.300 μg/mL、大黄素 49.200 μg/mL、大黄素甲醚 53.100 μg/mL、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 48.800 μg/mL、儿茶素 50.000 μg/mL、没食子酸 50.100 μg/mL 的混合对照品溶液, 其色谱图谱见图 1。

2.3 何首乌肝细胞毒性评价

取适量生首乌和不同炮制时间的制何首乌饮片, 分别加 8 倍量 50% 乙醇, 置阴凉处密封, 冷浸提取。共提取 2 次, 每次 48 h, 合并提取液, 浓缩至相应质量浓度备用^[23-25]。将人正常胚肝细胞系



1-顺式二苯乙烯苷 2-反式二苯乙烯苷 3-大黄素 4-大黄素甲醚
5-大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 6-儿茶素 7-没食子酸
1-*cis*-stilbene glycoside 2-*trans*-stilbene glycoside 3-emodin
4-phycion 5-emodin-8-*O*-β-*D*-glucoside 6-catechins 7-gallic acid

图 1 何首乌主要成分混合对照品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard substances of main chemical components in PMR

L02 细胞以 3.5×10^4 /mL 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 200 μL, 在常规条件下培养 24 h 后, 吸弃上清, 将何首乌醇提物分别以生药量 40 mg/mL 给药, 对乙酰氨基酚溶液按 1.7 mg/mL 给药, 每孔 200 μL, 设 6 复孔。药物孵育 24 h 后, 吸弃上清, 每孔加入 10% CCK-8 溶液 100 μL。培养箱内反应 30 min 后, 450 nm 处检测吸光度 (*A*)^[26,28]。以对乙酰氨基酚对照品溶液为对照组 (*s*), 不同炮制时间何首乌醇提物样品溶液为供试品组 (*t*), 分别测定对照品、供试品及空白对照吸光度 (*A_s*、*A_t*、*A_{ctr}*), 计算不同炮制时间何首乌醇提物细胞抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - (A_t - A_{ctr}) / (A_s - A_{ctr})$$

3 结果

3.1 指纹图谱方法学考察

取不同炮制时间炮制品, 以 50% 乙醇为溶剂, 按供试品溶液制备方法制备样品, 分别进行精密度试验、重复性试验、稳定性试验, 计算各色谱峰的相对峰面积与相对保留时间。结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明方法进样精密度及重复性良好, 且供试品在 24 h 内稳定, 符合指纹图谱测定要求。

3.2 何首乌生品及不同炮制品指纹图谱表征及成分量变化

采用“2.1”和“2.2”项下所述样品制备方法和液相质谱条件表征何首乌生品及不同时间炮制品化

学指纹图谱, 运用《中药指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版》软件, 以平均数方法通过自动匹配获得对照指纹图谱 (R), 所得何首乌生品及不同时间炮制品与对照指纹图谱的相似度差异较大 (表 1, 图 2)。通过提取相应物质的离子流色谱图信息、对照品各成分色谱峰信息及相关参考文献, 标定 7 个共有指纹峰, 初步鉴定为反式二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、顺式二苯乙烯苷、儿茶素。

表 1 何首乌生品及不同炮制品指纹图谱相似度
Table 1 Fingerprint chromatogram similarity analysis of crude and processed PMR

编号	样品名称	相似度	编号	样品名称	相似度
S1	生品	1.000	S6	黑豆汁高压 48 h	0.694
S2	黑豆汁高压 6 h	0.993	S7	黑豆汁高压 72 h	0.393
S3	黑豆汁高压 12 h	0.981	S8	黑豆汁高压 84 h	0.316
S4	黑豆汁高压 24 h	0.996	S9	黑豆汁高压 96 h	0.191
S5	黑豆汁高压 36 h	0.891			

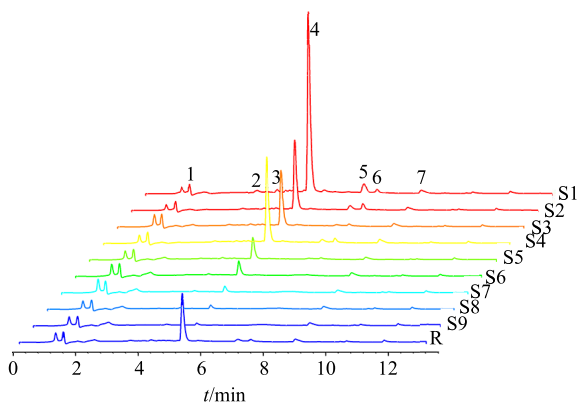


图 2 何首乌生品及不同时间炮制品化学指纹图谱

Fig. 2 Chemical fingerprint of crude and processed PMR

何首乌生品在炮制过程中, 随着炮制时间的增加, 各成分变化趋势不相同, 如图 3 所示, 反式二苯乙烯苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷量随炮制时间增加呈现明显下降趋势; 大黄素甲醚量炮制前期变化不大, 当炮制第 72 小时之后, 其量迅速下降; 儿茶素量随炮制时间增加而下降, 到第 36 小时, 儿茶素量降为零; 大黄素较稳定, 其量无明显变化。说明反式二苯乙烯苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚、儿茶素受炮制时间影响较大。

3.3 何首乌生品及不同炮制品体外肝毒性评价结果

采用 CCK-8 检测方法评价何首乌生品及不同炮制品对人正常胚肝细胞系 L02 细胞的生长抑制情

况。由表 2 可知, 何首乌在炮制 36 h 之前抑制率均大于 50%, 尤其生首乌高压黑豆汁蒸至 24 h 细胞抑制率较高, 可能这个过程发生化学反应促进毒性物质生成; 何首乌炮制 36 h 之后, 细胞抑制率都较低, 在 30% 以下, 并且随着炮制时间的增加而进一步降低。由此可知, 何首乌炮制 36 h 后才能达到减毒的效果。

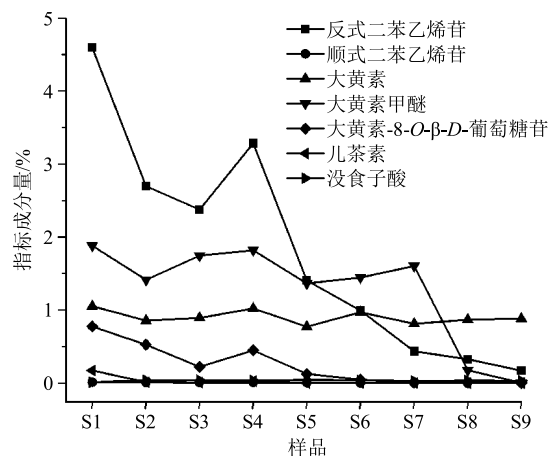


图 3 何首乌生品及不同时间炮制品主要化学成分变化趋势
Fig. 3 Changes of main chemical components of crude and processed PMR

表 2 何首乌生品及不同炮制品对 L02 细胞的抑制率

Table 2 L02 cell inhibition of crude and processed PMR

供试品	细胞抑制率/%	供试品	细胞抑制率/%
S1	89.35 ± 2.12	S6	33.15 ± 1.75
S2	74.68 ± 3.41	S7	17.44 ± 1.06
S3	57.66 ± 1.89	S8	10.46 ± 0.99
S4	86.54 ± 3.10	S9	11.18 ± 0.74
S5	28.66 ± 1.03		

3.4 何首乌主要成分与毒性相关分析

实验结果显示何首乌生品及不同炮制品肝细胞毒性差异较大, 同时不同何首乌药材中 7 种主要成分的色谱峰峰面积差异也较大, 这些差异是否会造其肝毒性, 具体哪些成分在其肝毒性起主要贡献作用, 为明确成分与生物效应的关系, 首先, 采用简单相关分析, 进一步将化学成分和细胞毒性进行多元线性回归分析, 寻找与其毒性相关的主要化学成分。

3.4.1 何首乌主要成分与毒性的简单相关分析 本实验以 50%乙醇提取的何首乌生品及分别炮制 6、12、24、36、48、72、84、96 h 共 9 个样品 (S1~S9) 为考察对象。为了排除其他成分变量的影响,

独立考察各成分与毒性之间的相关性，以何首乌 9 个样品的毒性为因变量 (Y)，何首乌样品中主要的 7 种主要成分反式二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8- O - β - D -葡萄糖苷、顺式二苯乙烯苷、儿茶素的色谱峰面积为自变量 ($X_1 \sim X_7$)，采用 SPSS 13.0 软件单独进行简单相关分析。首先经过正态性检验，检验结果见表 3， $X_1 \sim X_7$ 偏态性

强，均不满足正态分布，因此所有相关分析采用 Spearman 简单相关进行研究。综合变量 $X_1 \sim X_7$ 与 Y 的简单相关分析结果 (表 3)，以相关系数 $r > 0.80$ ， $P < 0.05$ 为指标，可初步确定反式二苯乙烯苷、大黄素甲醚、大黄素-8- O - β - D -葡萄糖苷、顺式二苯乙烯苷、儿茶素 5 个成分与何首乌毒性相关性较强。

表 3 何首乌生品及不用时间炮制品的主要化学成分 (X) 对 L02 细胞抑制率 (Y) 简单相关分析结果

Table 3 Results of simple correlation analysis about L02 cell inhibition (Y) of main chemical components (X) in crude and processed PMR

供试品	$Y/\%$	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7
S1	89.64	12 277 971.90	792 619.59	35 846 071.51	872 352.89	18 491 904.78	294 739.35	804 133.19
S2	76.06	7 217 886.81	3 169 652.21	28 309 848.11	668 905.01	12 548 908.11	231 175.75	53 479.82
S3	58.78	6 361 191.69	3 110 585.80	29 587 074.72	804 695.39	5 170 089.07	186 100.57	23 910.69
S4	85.43	8 784 684.89	2 804 889.74	33 808 366.25	850 227.85	10 562 817.59	202 503.99	109 765.01
S5	26.41	3 789 766.91	3 292 992.49	25 564 085.15	626 138.19	2 930 563.96	92 584.09	0.00
S6	30.21	2 705 600.93	3 056 665.15	31 721 070.55	646 183.05	1 018 600.86	58 377.36	0.00
S7	14.53	1 212 660.16	2 243 922.60	26 758 073.78	711 775.02	279 690.99	33 205.83	0.00
S8	10.09	921 397.98	2 690 682.45	28 152 989.56	532 549.51	159 044.58	15 675.67	0.00
S9	10.72	500 245.85	2 505 635.14	30 411 755.60	533 475.40	96 339.16	8 085.00	0.00
r	1.000	0.967	0.067	0.633	0.867	0.950	0.950	0.913
P		0.000	0.865	0.067	0.002	0.000	0.000	0.001

3.4.2 多元线性相关统计分析方法的选择 本研究采用 SPSS 13.0 进行多元回归的方法进一步探讨何首乌毒性与成分之间的相关性。回归模型中以何首乌生品及不同炮制品毒价为因变量 (Y)，以上述何首乌样品中 7 种主要成分色谱峰面积为自变量 $X_1 \sim X_7$ ，回归模型中自变量较多，自变量之间可能存在严重的共线性问题，使自变量与因变量之间的真实相关性被掩盖，因此首先需要进行共线性诊断，以确定采用合适的统计方法。回归模型共线性诊断结果显示多个维度的特征值接近 0 且除 X_3 外其余方差膨胀因子 (VIF) 均大于 30，说明回归模型存在较严重的共线性，因此本研究采用主成分回归分析探讨何首乌毒性与成分之间的相关性。

3.4.3 主成分回归分析结果及逐步回归分析 本研究采用主成分回归分析探讨何首乌毒性与成分之间的相关性。通过 SPSS 13.0 软件分析，KMO (Kaiser-Meyer-Olkin) 值约为 0.6，原始数据适宜主成分因子分析模型。依据回归矩阵中各主成分的特征值及贡献率，7 种成分可提取 2 个主成分 Z_1 、 Z_2 ，累积贡献率为 0.891 7 > 0.85，因此剔除其他主成分。

A 为 SPSS 13.0 分析软件自动标准化的自变量，标准化公式为 $A_i = (X_i - \bar{x})/s$ (s 为样本标准差)， $Z_1 \sim Z_2$ 的表达式分别为 $Z_1 = 0.305 A_1 + 0.291 A_2 - 0.029 A_3 + 0.275 A_4 + 0.254 A_5 + 0.362 A_6 - 0.071 A_7$ ； $Z_2 = -0.107 A_1 - 0.62 A_2 + 0.0296 A_3 - 0.103 A_4 - 0.42 A_5 - 0.203 A_6 + 0.392 A_7$ 。

Z_1 和 Z_2 2 个变量进入回归模型后，模型很好地拟合了数据 (调整后 $R^2 = 0.964$ ， $F = 107.703$ ， $P = 0.000$ $0 < 0.01$)。将主成分 $Z_1 \sim Z_2$ 的表达式代回到回归模型中，得到因变量 Y 对标准化自变量 $A_1 \sim A_7$ 的线性回归模型，通过标准化公式将标准化自变量转化为原始自变量，得到因变量 Y 与原始自变量 $X_1 \sim X_7$ 的线性回归方程： $Y = -54.801 4 + 2.24 \times 10^{-6} X_1 + 7.3 \times 10^{-6} X_2 + 2.5 \times 10^{-7} X_3 + 6.45 \times 10^{-5} X_4 + 8.42 \times 10^{-7} X_5 + 9.79 \times 10^{-5} X_6 + 2.35 \times 10^{-7} X_7$ 。

上述主成分回归分析结果表明，拟合的回归模型中 $P = 0.000$ $0 < 0.01$ ，有显著统计学意义。由回归模型可知，自变量 X_4 与 X_6 与具有较大的参数值，说明大黄素甲醚与顺式二苯乙烯苷对何首乌毒性有较大的贡献度。综合简单相关分析和多元分析结果，

提示大黄素甲醚与顺式二苯乙烯苷 2 个成分可能是何首乌主要毒性成分。

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,探究其毒性物质基础成了学术界关注的焦点^[4-7]。然而,何首乌药物成分与毒性之间的关系尚不明确,无法阐明其毒性物质基础^[29]。指纹图谱技术凭借其能够表征样品所含化学成分的特征和量的大小以及中药的整体特征^[15,17-18],是当前进行中药等复杂物质体系质量控制及研究的重要手段。本研究通过何首乌醇提物的化学指纹图谱信息与何首乌致肝细胞毒性相结合,探讨何首乌所致肝毒性的物质。实验采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术表征何首乌生品和不同时间炮制品的化学信息,通过对照品各成分色谱峰信息、高分辨质谱、相关参考文献数据指出 7 种主要共有成分分别为反式二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、顺式二苯乙烯苷、儿茶素。通过何首乌肝细胞毒性与主要成分的简单相关分析,表明反式二苯乙烯苷、大黄素甲醚、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、顺式二苯乙烯苷、儿茶素均与何首乌毒性作用相关,进一步主成分回归分析显示大黄素甲醚与顺式二苯乙烯苷对何首乌肝毒性贡献最大,提示这 2 个成分可能是与何首乌毒性相关的目标化合物。

目前国内何首乌的质量控制方法主要是基于指标性成分的定量测定,且生首乌与制首乌控制指标相似^[1]。然而,一般认为,何首乌生用有一定的毒性,制何首乌毒性小,不同炮制品何首乌毒性有很大差异^[14],如本研究显示何首乌高压黑豆汁蒸至 36 h 后才能达到减毒的效果。因此,这种质控模式既难以有效监控也不能合理评价药材质量,更难以反映其安全性和有效性。倘若物质基础明确,则有利于降低何首乌毒性,从而保证临床用药的安全与有效。本课题基于谱、毒相关,构建成分指纹谱与毒性相对应的表现形式,可以更准确地表征药材整体的肝毒性,为从药材质量层面降低何首乌临床肝损害的发生提供科学支持。但也存在不足之处,如该谱效相关研究目前还无法阐明毒性成分之间是否存在协同作用,突破此项技术难点也是中药现代化的关键所在;选取的药效学指标不能完全代表中药多功效特性,且各指标检测与中药临床效应并不完全吻合等问题。本研究为阐明何首乌毒性物质基础进

行了初步研究,后续将应用动物实验对可能的何首乌毒性物质进一步验证,为制定科学的何首乌质量评价标准提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Lin L, Ni B, Lin H, *et al.* Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159: 158-183.
- [3] 梅雪, 余刘勤, 陈小云, 等. 何首乌化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(1): 122-131.
- [4] 国家食品药品监督管理局药品评价中心. 英国 MHRA 警告何首乌的肝损害不良反应 [J]. *中国药物警戒*, 2006, 3(5): 313-314.
- [5] 马喆, 赵珺睿, 董冉冉, 等. 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(22): 4021-4029.
- [6] Jung K A, Min H J, Yoo S S, *et al.* Drug-induced liver injury: Twenty five cases of acute hepatitis following ingestion of *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. *Gut Liver*, 2011, 5(4): 493-499.
- [7] Wang J, Ma Z, Niu M, *et al.* Evidence chain-based causality identification in herb-induced liver injury: Exemplification of a well-known liver-restorative herb *Polygonum multiflorum* [J]. *Front Med*, 2015, 9(4): 457-467.
- [8] 元·李东垣. 珍珠囊补遗药性赋 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1958.
- [9] 李帅锋, 丁安伟, 张丽, 等. 何首乌产地加工与饮片炮制一体化工艺研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(17): 3003-3008.
- [10] 元·王好古. 刘文泰纂. 本草汇精要 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [11] 李晓菲. 基于质-效-用一体化评控的何首乌炮制减毒研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [12] 明·李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 商务印书馆, 1930.
- [13] 马致洁, 李晓菲, 吕旻, 等. 基于肝细胞毒价检测的何首乌炮制工艺比较研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(12): 2325-2329.
- [14] 崔鹤蓉, 柏兆方, 宋海波, 等. 从古今炮制方法演变探讨何首乌毒性的潜在影响因素 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(2): 333-339.
- [15] 庞晶瑶, 王伽伯, 马致洁, 等. 基于化学指纹图谱和生物毒性检测的何首乌质量评控 [J]. *中草药*, 2014, 45(23): 3392-3396.
- [16] 陈绍文, 刘贞, 喻小明. 何首乌生品及炮制品的大鼠

- 血药指纹图谱比较研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(1): 36-39.
- [17] Zaini N N, Osman R, Juahir H, *et al.* Development of chromatographic fingerprints of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) roots using online solid phase extraction-liquid chromatography (SPE-LC) [J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 583-593.
- [18] 沙明, 王嘉仡, 曹爱民, 等. HPLC 指纹谱技术在中药新药质量控制中的应用 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 87-89.
- [19] 秦昆明, 郑礼娟, 沈保家, 等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1): 26-31.
- [20] Zhu C S, Lin Z J, Xiao M L, *et al.* The spectrum-effect relationship-a rational approach to screening effective compounds, reflecting the internal quality of Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(3): 177-184.
- [21] 肖云芝, 于超, 刘朝勇, 等. 鳖甲药材指纹图谱与其抗肝纤维化作用的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2506-2510.
- [22] 楼招欢, 吕圭源, 俞静静. 何首乌成分、药理及毒副作用相关的研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(4): 495-500.
- [23] 丘小惠, 马兴田, 闵江, 等. 何首乌炮制工艺的研究 [J]. 中国药房, 2006, 17(16): 1270-1273.
- [24] 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.
- [25] 李卫先, 张琦, 王国仁, 等. 高压蒸制不同时间的何首乌质量标准探讨 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(9): 396-397.
- [26] 吕旻, 王伽伯, 嵇扬, 等. 提取溶剂对何首乌肝细胞毒性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 19(20): 268-272.
- [27] 李奇, 赵奎君, 赵艳玲, 等. 大剂量何首乌醇提物致大鼠多脏器损伤研究 [J]. 环球中医药, 2013, 6(1): 1-7.
- [28] 吕旻. 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.
- [29] 王伽伯, 李春雨, 朱云, 等. 基于整合证据链的中草药肝毒性客观辨识与合理用药: 以何首乌为例 [J]. 科学通报, 2016, 61(9): 971-980.