

• 药剂与工艺 •

不同辅料对何首乌炮制减毒效果对比研究

刘亚蕾^{1,2}, 郜 丹², 李晓菲², 肖小河², 王伽伯^{2*}

1. 解放军总医院研究生院, 北京 100853

2. 解放军总医院 第五医学中心全军中医药研究所, 北京 100039

摘要:目的 根据历代本草记载的辅料种类, 对比不同辅料炮制何首乌的减毒效果差异, 为优选何首乌炮制减毒的辅料提供参考。方法 采用 UPLC-Q/TOF-MS 表征不同辅料炮制何首乌样品的化学信息, 以培养的正常人肝 L02 细胞为对象评价肝细胞毒性, 综合比较不同辅料炮制何首乌的减毒效果差异及成分变化规律。结果 不同辅料对何首乌炮制后的化学指纹图谱、指标性成分及肝细胞毒性有不同程度的影响, 在相同蒸制压力和时间条件下, 黑豆、米泔水或大枣蒸制对何首乌的主要成分包括没食子酸、儿茶素、顺式二苯乙烯苷、反式二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚和大黄素及肝细胞毒性的影响相对较大, 减毒效果最好的 3 种辅料分别为米泔水>大枣>黑豆。通过简单相关和多元相关综合分析, 提示顺式二苯乙烯苷可能是何首乌肝细胞毒性相关的主要化学成分, 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷可能是何首乌潜在的毒性相关成分。结论 传统记载的不同辅料用于何首乌炮制均可减毒, 目前除了常用的黑豆有较好的减毒效果外, 米泔水或大枣也可作为何首乌炮制减毒的候选辅料。

关键词: 何首乌; 肝毒性; 炮制减毒; 辅料; 谱-毒相关分析; UPLC-Q/TOF-MS; L02 细胞; 指纹图谱; 简单相关分析; 多元相关分析; 没食子酸; 儿茶素; 顺式二苯乙烯苷; 反式二苯乙烯苷; 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 大黄素甲醚; 大黄素

中图分类号: R283.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)02-0330-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.008

Preliminary study on hepatotoxic components in *Polygoni Multiflori Radix* based on different adjuvants processing for detoxificationLIU Ya-lei^{1,2}, GAO Dan², LI Xiao-fei², XIAO Xiao-he², WANG Jia-bo²

1. Graduate School of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China

2. Department of China Military Institute of Chinese Materia, The Fifth Medical Centre, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To provide references for optimizing adjuvants with *Polygoni Multiflori Radix* (PMR), we compared the effects of detoxification by different adjuvants processing according to Chinese medicine's records of past dynasties. **Methods** The chemical information of all samples including crude and processed PMR with different adjuvants was characterized by UPLC-Q-TOF-MS, and the normal human hepatocytes (L02 cell line) was cultured *in vitro* to evaluate the cytotoxicity, then we gave synthetic analyses on effects of processed PMR with different adjuvants for toxicity-decreasing and variations of chemical contents. The difference of toxicity reducing effect and the rule of composition change of PMR processed with different adjuvants were compared comprehensively. **Results** Different adjuvants had different level of effects on chemical fingerprint, index component and cytotoxicity of PMR under the same conditions of pressure and time. More specifically, black bean, jujube and rice-rinsing water had greater impact on PMR main components including gallic acid, catechins, *cis*-stilbene glycoside, *trans*-stilbene glycoside, emodin-8-*O*- β -D-

收稿日期: 2019-07-23

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项课题: 基于临床的中药何首乌肝毒性生物标记物研究 (2015ZX09501-004-001-008); 国家公益性行业专项课题: 基于免疫应激的何首乌肝损害易感人群筛查及风险防控对策研究 (201507004-04); 国家自然科学基金重点项目: 基于临床病证的传统无毒中药肝毒性客观辨识及机制研究 (81630100)

作者简介: 刘亚蕾, 女, 在读硕士, 研究方向为中药安全性与合理用药。Tel: 17338101505 E-mail: 809526329@qq.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

glucoside, physcion and emodin as well as hepatotoxicity. The three adjuvants with the best toxicity-decreasing effects were in sequence of rice-rinsing water > jujube > black bean. Furthermore, comprehensive analysis of simple correlation and multiple correlation suggested that *cis*-stilbene glycoside might be the main chemical component contributed to hepatotoxicity of PMR, and emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside might be the potential toxicity component. **Conclusion** Different adjuvants traditionally recorded can attenuate the toxicity of PMR. In addition to black beans, rice-rinsing water and jujube can also be used as candidate adjuvants for the toxicity-decreasing of PMR.

Key words: *Polygoni Multiflori Radix*; hepatotoxicity; processing for detoxification; adjuvants; spectrum-toxicity correlation analysis; UPLC-Q/TOF-MS; L02 cells; fingerprint; simple correlation analysis; multivariate correlation analysis; gallic acid; catechins; *cis*-stilbene glycoside; *trans*-stilbene glycoside; emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside; physcion; emodin

何首乌 *Polygoni Multiflori Radix* 为蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 传统认为其炮制品为无毒中药^[1-3]。然而, 近年来国内外有关何首乌及其制剂引起肝损伤不良反应频见报道^[4-5]。国家药品监督管理局先后通报了何首乌及部分制剂致肝损伤的风险。古代本草一般不认为制何首乌有毒, 但亦认识到其偏性, 认为通过炮制可减弱其偏性; 而现代研究证实炮制可显著降低何首乌的肝毒性风险^[6-7]。历代医籍和本草记载了多种何首乌炮制方法, 涉及多种炮制辅料^[8]。目前《中国药典》2015 年版收载何首乌的炮制方法采用黑豆作为辅料^[1]。除此之外, 传统炮制方法还有女贞子炮制、米泔水炮制、黑豆酒蒸法、白酒炮制、黄酒炮制、牛乳拌蒸法等 20 余种^[8-16]。何首乌添加不同辅料炮制减毒过程中, 化学成分可能发生不同的变化^[17], 不同辅料对何首乌减毒效果的影响尚缺少系统的比较和研究。为此本研究选取历代医籍记载的不同辅料, 系统比较辅料种类对何首乌炮制减毒效果的影响规律, 为优化建立何首乌安全炮制方法提供参考。

1 仪器与材料

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 二极管阵列检测器; ZK-82B 型真空干燥箱, 上海市实验仪器总厂; W12PCS505E 电压力锅, 美的集团股份有限公司; Hei-VAP Core ML G3 旋转蒸发器, 德国 Heidolph 公司; TC10TM 自动细胞计数器, 美国 Bio-Rad 公司; GG318-NAPCO6500 恒温二氧化碳培养箱, 法国 NAPCO 公司; AXTD5A 台式低速离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; SW-CJ-2D 超净工作台, 苏州净化设备有限公司; SN510C 高压蒸汽灭菌器, 重庆雅马拓科技有限公司。

生首乌 (批号 13101701)、黑豆 (批号

12021507)、女贞子 (批号 13010501) 及甘草 (批号 13062401) 均购自北京绿野药业有限公司; 大枣 (批号 20140608), 北京本草方源药业有限公司; 经解放军总医院第五医学中心肖小河研究员鉴定均为生首乌为蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根、黑豆为豆科大豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 干燥成熟种子、女贞子为木犀科女贞属植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实、甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、大枣为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujube* Mill. 的干燥成熟果实。白酒, 牛栏山二锅头, 北京顺鑫农业股份有限公司; 黄酒, 绍兴黄酒, 绍兴县唐宋酒业有限公司; 牛乳, 三元鲜牛奶; 大米, 购自物美超市, 产地湖北; 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 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (简称顺式二苯乙烯苷, 批号 14091807)、反式 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (简称反式二苯乙烯苷, 批号 14051503)、大黄素 (批号 14030604)、大黄素甲醚 (批号 13110706)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (批号 14081501)、儿茶素 (批号 13091702)、没食子酸 (批号 13121803) 均购自成都普菲德生物技术有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$; 乙腈、甲醇, 色谱纯, Sigma 公司; 无水乙醇, 分析纯, 北京市化工厂; 纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司; 超纯水, Millipore Milli-Q water purification system 制备。

2 方法

2.1 何首乌不同辅料炮制制品的制备

2.1.1 黑豆汁制法 取黑豆 1.0 kg, 加水适量, 煮约 4 h, 熬汁约 1.5 kg, 豆渣再加水煮约 3 h, 熬汁约 1.0 kg, 合并得黑豆汁约 2.5 kg^[1]。

2.1.2 米泔水制法 大米 0.5 kg 加入 1 200 mL 水, 淘洗 30 min, 取上层液体, 即为米泔水^[9]。

2.1.3 甘草煮制 取甘草 2 kg, 加水适量, 煮约 2 h, 滤过得煎液 3 kg, 药渣再加水煮 2 h, 滤过, 得煎液

2 kg, 合并煎液约 5 kg。将净药材与煎液拌匀 (何首乌片-甘草 10:1)^[13]。

2.1.4 大枣制 锅内铺何首乌一层, 大枣一层, 重重铺尽^[10-11]。

将所购何首乌饮片置带盖不锈钢桶中加入不同辅料 (表 1), 按 80% 液体量的比例闷润 8 h 至透心, 分别置于不锈钢容器中, 采用课题组前期优化的何首乌炮制方法, 高压 (120 °C, 压力 0.1 MPa) 蒸制 6 h 后, 置于 45 °C 烘箱中烘干备用^[9]。

表 1 何首乌生品及不同辅料炮制制品的制备

Table 1 Preparation of crude and processed PMR with different adjuvants

编号	样品名称	辅料	编号	样品名称	辅料
S1	生品	清水	S7	高压黑豆汁白酒炮制品	25%黑豆汁+30%白酒+25%水
S2	高压黑豆汁炮制品	25%黑豆汁+55%水	S8	高压米泔水炮制品	米泔水
S3	高压黑豆拌蒸炮制品	10%黑豆	S9	高压甘草炮制品	10%甘草
S4	高压黄酒炮制品	30%黄酒+50%水	S10	高压大枣炮制品	大枣
S5	高压白酒炮制品	30%白酒+50%水	S11	高压牛乳炮制品	牛乳
S6	高压黑豆汁黄酒炮制品	25%黑豆汁+30%黄酒+25%水	S12	高压女贞子炮制品	5%女贞子 ^[11]

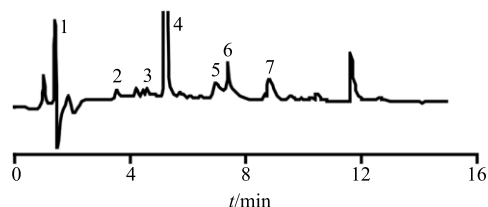
2.2 基于 LC-Q/TOF-MS 技术的何首乌化学指纹图谱的建立

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, 5%~32%乙腈; 5~6 min, 32%~55%乙腈; 6~12 min, 55%~88%乙腈; 12~15 min, 88%~90%乙腈; 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。理论塔板数按 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烷-2-O-β-D-葡萄糖苷峰计算应不低于 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 310.264 kPa (45 psi); 鞘气温度 350 °C; 鞘气流量 12 L/min; 喷嘴电压 500 V。

2.2.3 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 50.9 μg/mL、反式二苯乙烯苷 51.3 μg/mL、大黄素 49.2 μg/mL、大黄素甲醚 53.1 μg/mL、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷 48.8 μg/mL、儿茶素 50.0 μg/mL、没食子

酸 50.1 μg/mL 的混合对照品溶液, 其色谱指纹图谱见图 1。



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

图 1 混合对照品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances

2.2.4 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供试品的肝细胞毒性较强^[18], 因此本实验采取 50% 乙醇制备样品。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% 乙醇, 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。其中正离子模式下生首乌供试品溶液的总离子流图见图 2。

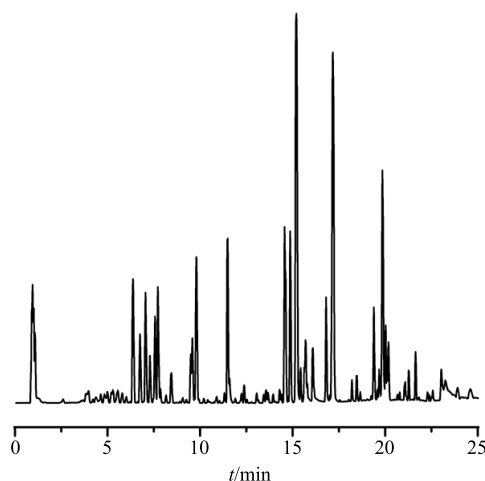


图 2 生首乌总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of raw PMR

2.2.5 方法学考察 取同一批何首乌的供试品(S1),按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,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,且供试品溶液在24 h内稳定,符合指纹图谱测定要求。

2.3 何首乌肝细胞毒性评价

取适量生首乌和不同辅料炮制的制何首乌饮片,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。将人正常肝细胞系L02细胞以 $3.5 \times 10^4/\text{mL}$ 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 ,重复6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)值^[19]。以仅加入对乙酰氨基酚对照品溶液为对照组(s),不同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(50%乙醇,ctr)吸光度(A_s 、 A_t 、 A_{ctr}),计算不同辅料炮制何首乌醇提物的细胞抑制率,计算公式为细胞抑制率 $=1-(A_t-A_{\text{ctr}})/(A_s-A_{\text{ctr}})$ 。

3 结果

3.1 何首乌生品及不同辅料炮制品指纹图谱表征及成分含量变化

采用“2.1”项下方法制备样品和“2.2”项下液

相、质谱条件表征何首乌生品及不同辅料炮制品化学指纹图谱,运用《中药指纹图谱相似度评价系统2012版》软件,以S1样品指纹图谱为参照图谱,时间窗宽度设为0.1 min,经多点校正后进行色谱峰匹配和叠加,所得何首乌生品与不同辅料炮制品的相似度差异并不大(表2),但就生成的各炮制品指纹图谱的匹配状况可以看出各共有峰还是存在一定差异(图3)。因此,本实验进一步通过提取相应供试品的离子流色谱图信息、对照品各成分色谱峰信息及参考相关文献报道^[20-21],标定7个共有指纹峰,分别为顺式二苯乙烯苷、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。

表 2 何首乌生品及不同辅料炮制品指纹图谱相似度

Table 2 Fingerprint chromatogram similarity analysis of crude and processed PMR with different adjuvants

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	1.000	S5	0.996	S9	0.998
S2	0.993	S6	0.997	S10	0.979
S3	0.994	S7	0.998	S11	0.998
S4	0.997	S8	0.984	S12	0.993

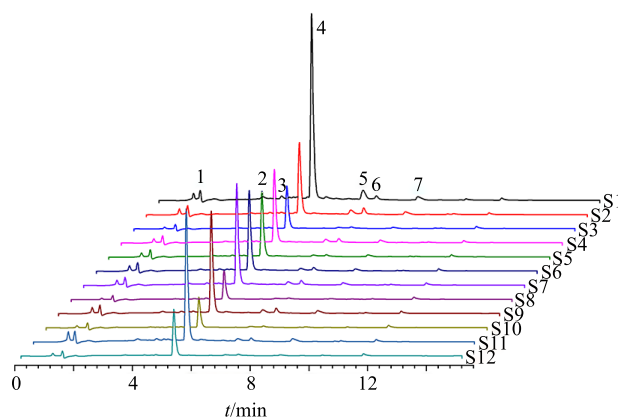
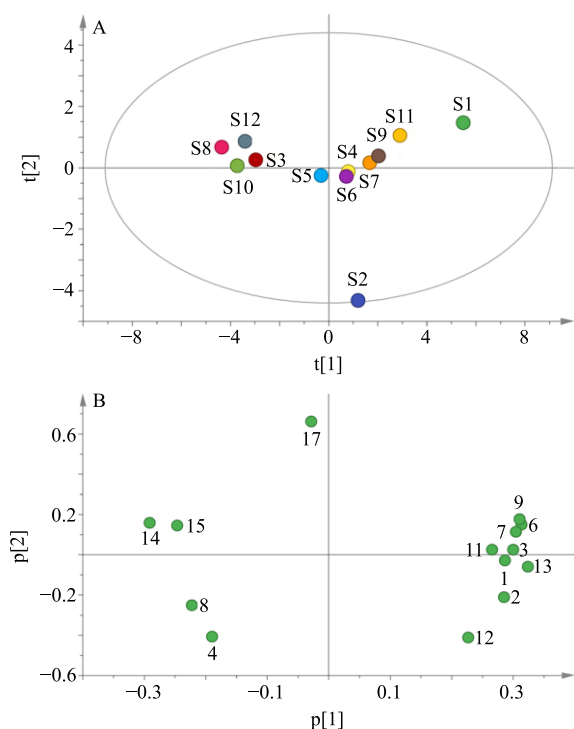


图 3 何首乌生品及不同辅料炮制品化学指纹图谱

Fig. 3 Chemical fingerprint of crude and processed PMR with different adjuvants

为获取更详细的化学成分变化信息,本实验提取何首乌生品及不同辅料炮制品醇提物对应色谱峰峰面积进行主成分分析(principal component analysis, PCA),找出生品与不同辅料炮制品炮制过程中组间变化情况及主要变化成分。由反映组间离散程度的Score Scatter Plot得分图(图4-A)可知,所有个体均分布于95%置信区间(椭圆形区域)内,未见离群点,生品醇提样品与炮制品醇提样品区分较好,



A-何首乌不同供试品 Score Scatter Plot 得分图 B-何首乌不同供试品 Loading Scatter Plot 载荷图

A-score scatter plot of crude and processed PMR B-loading scatter plot of crude and processed PMR

图 4 何首乌生品与不同辅料炮制品的 PCA

Fig. 4 PCA analysis of crude and processed PMR with different adjuvants

说明炮制前后化学成分发生变化。不同辅料炮制品醇提样品偏离生品的程度不同,并且沿 $t[1]$ 延伸,说明不同辅料炮制对于何首乌成分的改变具有较大影响,同时说明在炮制减毒时选择合适辅料具有重要意义。结合图 4-B 载荷图可知,何首乌生品在不同辅料炮制过程中,各成分变化趋势不同,共有成分中差异性较大的为 3 号(保留时间 1.859 min,未知成分)、6 号(保留时间 3.548 min,鉴定为儿茶素)、7 号(保留时间 4.19 min,鉴定为顺式二苯乙烯苷)、9 号(保留时间 5.196 min,鉴定为反式二苯乙烯苷)、13 号(保留时间 8.814 min,鉴定为大黄素)。

何首乌在炮制过程中,在其他条件相同的前提下,添加辅料不同,则成分变化规律有所差异,如表 3 所示,当辅料为黑豆汁白酒(S7)、10%甘草(S9)、牛乳(S11)时,炮制品中反式二苯乙烯苷、大黄素和大黄素甲醚含量较其他辅料炮制品高;当辅料为黑豆拌蒸(S3)、米泔水(S8)、大枣(S10)、女贞子(S12)时,各成分含量相对均较低。所以何首乌炮制时所选择的辅料不同,制首乌中化学成

分含量差异较大。

3.2 何首乌生品及不同辅料炮制品体外肝细胞毒性差异

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肝细胞系 L02 细胞的生长抑制情况。由表 4 可知,何首乌炮制时选择不同的辅料对于其毒性具有重要影响。高压黑豆拌蒸(S3)、高压米泔水(S8)、高压大枣(S10)炮制品细胞抑制率在 50%以下,有相对较好的减毒效果,米泔水炮制减毒效果更佳。而高压黄酒(S4)、高压黑豆汁黄酒(S6)、高压黑豆汁白酒(S7)、高压甘草(S9)、高压牛乳(S11)等减毒效果则不理想,说明选择合适炮制辅料对于何首乌炮制减毒具有重要意义。

表 3 何首乌生品及不同辅料炮制品主要化学成分含量

Table 3 Main chemical components content of crude and processed PMR with different adjuvants

供试品	质量分数/%						
	1	2	3	4	5	6	7
S1	0.011	0.172	0.010	4.595	0.775	1.883	1.054
S2	0.040	0.012	0.008	2.697	0.526	1.415	0.856
S3	0.022	0.028	0.004	1.977	0.153	0.759	0.485
S4	0.024	0.069	0.006	2.679	0.419	1.233	0.820
S5	0.028	0.021	0.005	2.519	0.255	1.151	0.686
S6	0.022	0.059	0.005	2.824	0.342	1.862	0.729
S7	0.023	0.086	0.006	3.240	0.412	1.341	0.771
S8	0.019	0.020	0.008	1.583	0.130	0.514	0.317
S9	0.023	0.096	0.009	3.260	0.442	1.542	0.868
S10	0.028	0.006	0.003	1.620	0.172	0.431	0.349
S11	0.026	0.103	0.008	3.720	0.383	2.994	0.957
S12	0.033	0.030	0.006	2.132	0.150	0.627	0.450

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

表 4 何首乌生品及不同辅料炮制品对 L02 细胞的抑制率

Table 4 L02 cell inhibition rate of crude and processed PMR with different adjuvants

供试品	细胞抑制率/%	供试品	细胞抑制率/%
S1	93.43±2.54	S7	92.89±1.87
S2	76.06±1.98	S8	33.73±0.64
S3	51.79±0.97	S9	94.91±3.77
S4	87.37±3.21	S10	44.93±1.12
S5	71.01±2.33	S11	95.26±4.02
S6	93.90±1.34	S12	56.43±3.66

3.3 何首乌各供试品主要成分与毒性相关性分析

上述实验结果显示何首乌生品及不同辅料炮制品对肝细胞毒性存在较大差异,同时在不同辅料炮制过程中主要成分含量也存在一定差异,这些差异是否会造成其肝毒性,具体哪些成分在其肝毒性起主要贡献作用,应进一步阐明。因此,为明确成分与生物效应的关系,本实验采用简单相关性分析、化学成分和细胞毒性多元线性回归分析、主成分回归分析等统计学方法,寻找与其毒性相关的主要化学成分。

3.3.1 何首乌主要成分与肝细胞毒性的简单相关分析 为了排除其他成分变量之间的影响,独立考察各成分与毒性之间的相关性,以何首乌 12 个样品的

细胞毒性为因变量 (Y),何首乌样品中 7 种主要共有成分没食子酸、大黄素、大黄素甲醚、儿茶素、反式二苯乙烯苷、顺式二苯乙烯苷、大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷的质谱峰面积为自变量 ($X_1 \sim X_7$),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,除 X_2 不满足正态分布,采用 Spearman 简单相关分析,其余 X_1 、 $X_3 \sim X_7$ 均满足正态分布,相关性分析采用 Pearson 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 5),以相关系数 (r) > 0.80 , $P < 0.05$ 为指标,可初步确定顺式二苯乙烯苷、大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷与何首乌肝细胞毒性的相关性较强。

3.3.2 多元线性相关统计分析方法的选择 本研究

表 5 何首乌生品及不同辅料炮制品的化学成分与 L02 细胞毒性 (Y) 简单相关分析

Table 5 Simple correlation analysis between main chemical components and L02 cell inhibition rate (Y)

供试品	质谱峰面积							$Y/\%$
	没食子酸	大黄素	大黄素甲醚	儿茶素	反式二苯乙烯苷	顺式二苯乙烯苷	大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷	
S1	792 619	35 846 072	872 352	804 133	12 277 972	294 739	18 491 905	93.43
S2	3 169 652	28 309 848	668 905	53 479	7 217 887	131 175	12 548 908	76.06
S3	1 707 468	27 376 809	103 567	140 545	6 332 881	46 638	4 570 104	51.79
S4	1 844 905	27 376 809	458 430	327 643	7 183 460	115 498	12 858 413	87.37
S5	2 169 805	23 887 975	105 384	106 601	6 748 688	76 398	9 932 950	71.07
S6	1 738 534	24 093 006	417 145	251 562	7 540 537	203 963	17 023 510	93.91
S7	1 742 323	24 708 247	493 100	39 623	6 659 588	152 811	12 665 131	92.89
S8	1 483 512	10 536 665	58 150	103 067	4 292 668	31 993	3 049 072	33.73
S9	1 791 165	28 450 670	437 041	441 285	8 722 733	198 247	10 334 098	94.91
S10	2 165 435	11 394 433	87 423	36 363	4 355 530	32 862	4 005 650	44.93
S11	1 991 990	31 295 311	615 838	475 374	10 112 000	175 097	10 971 762	95.26
S12	2 561 614	14 585 026	56 099	142 835	5 721 571	46 766	3 490 785	56.43
r	-0.178	0.750	0.799	0.714	0.781	0.882	0.870	1.000
P	0.580	0.005	0.002	0.009	0.003	0.000	0.000	

采用 SAS 9.4 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辅料炮制品的肝细胞抑制率为因变量 (Y),以上述何首乌样品中 7 种主要成分质谱峰面积为自变量 ($X_1 \sim X_7$),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自变量最大特征根与最小特征根之比大于 1 000,说明回归模型存在严重共线性问题,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。

3.3.3 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。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 0.907 0 > 0.85 ,因此剔除其他主成分。标准化公式为 $A_i = (X_i - \bar{X})/s$ (s 为样本标准差)。 Z_1 和 Z_2 2 个变量进入回归模型后,只有 Z_1 模型很好地拟合了数据(调整后 $r^2 = 0.726 8$, $P = 0.000 4 < 0.01$)。将主成分 Z_1 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: $Y = 4.14 - 3.68 \times 10^{-7} X_1 + 4.82 \times 10^{-8} X_2 + 1.43 \times 10^{-6} X_3 + 1.75 \times 10^{-6} X_4 + 1.82 \times 10^{-7} X_5 + 5.07 \times 10^{-6} X_6 + 7.33 \times 10^{-8} X_7$ 。由回归模型可知,自变量 X_6 参数值最大,提示顺式二苯乙烯苷对何首乌毒性贡献度最大。

4 讨论

近年来,以何首乌为代表的中药肝毒性问题成为舆论热点,严重影响着中医药声誉和信任度,当务之急除了建立中药肝损伤的客观辨识模式和方法,更重要的是如何在中医药理论指导下降低用药风险,减少毒性事件发生^[22]。古籍中记载着丰富且复杂的何首乌“炮制减毒”方法,辅料炮制就有很多种,如米泔水制、黑豆制、甘草制、大枣制、牛乳拌蒸等,但添加不同辅料炮制的减毒效果及其科学内涵尚未进行系统研究^[8,23]。本研究试图根据历代本草记载的辅料种类,对比不同辅料炮制何首乌的减毒效果差异,为优选炮制减毒的辅料提供参考,同时通过不同辅料制首乌成分变化与毒性之间的关系阐明其毒性物质基础,为建立可反映减毒程度的质量评控方法和标准提供可靠依据。

鉴于指纹图谱技术表征样品所含化学成分质的特征和量的大小以及中药的整体特征,本研究将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,探讨何首乌引起肝毒性的潜在物质基础^[24-25]。实验采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术表征何首乌生品和不同辅料炮制品的化学信息,PCA 分析表明何首乌生品、现代炮制工艺与不同辅料炮制品的成分变化趋势各不相同。何首乌生品及不同辅料炮制品对人正常肝细胞系 L02 的生长抑制情况来看,高压黑豆拌蒸、高压大枣、高压米泔水炮品有相对较好的减毒效果,其中米泔水炮制减毒效果最佳。通过何首乌肝细胞毒性与主要成分的简单相关分析,初步表明顺式二苯乙烯苷、大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷与何首乌肝细胞毒性有较强的相关性;进一步主成分回归分析显示顺式二苯乙烯苷对何首乌肝毒性的贡献较大。综合分析提示顺式二苯乙烯苷可能是何首乌毒性相关的主要化学成分,大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷可能是何首乌潜在的毒性相关成分。但本研究仅是体外实验相关性分析,上述化学成分与何首乌肝毒性是否存在因果关系,还需进一步研究以及体内实验证实。

辅料在中药炮制解毒过程中发挥着重要作用,本研究发现黑豆拌蒸、大枣炮品、米泔水炮制品肝细胞损伤改善程度与其中所含潜在毒性物质含量降低有较显著的相关性。与现代黑豆炮制技术相比,米泔水炮制何首乌减毒效果最好,可能由于脂溶性物质难溶于水,又太易溶于酒,而米泔水则是悬浊液,用米泔水浸泡,可以较多地吸附何首乌中难溶于水的物质,却又不致于太过,加之高压炮制,促进毒性成分降低或转化以达到炮制减毒且保存药效或增效目的^[26]。此为何首乌炮制减毒提供除药典之外的有效辅料选择借鉴,但仍需更充分的证据如体内动物实验或临床数据支持以及制首乌解毒机制的阐释。笔者认为非常有必要传承和挖掘传统中药炮制技术的宝贵经验,采用现代科学技术揭示,首乌炮制减毒的科学原理和机制,建立可反映减毒程度的质量评控方法和标准,增加炮制辅料质量标准,避免炮制加工不当,最大限度降低何首乌肝损伤等毒副反应的发生。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 任红微, 魏 静, 高秀梅, 等. 何首乌及其主要化学成分药理作用及机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(7): 1357-1362.
- [3] Lin L F, Ni B R, Lin H M, et al. Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159: 158-183.
- [4] 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.
- [5] Wang Y, Wang L, Saxena R, et al. Clinicopathological features of He Shou Wu-induced liver injury: This ancient anti-aging therapy is not liver-friendly [J]. *Liver Int*, 2019, 39(2): 389-400.
- [6] 元·王好古. 本草品汇精要 (刘文泰纂) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [7] 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.
- [8] 崔鹤蓉, 柏兆方, 宋海波, 等. 从古至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.
- [9] 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.

- [10] 苏 颂. 本草图经 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994.
- [11] 朱 橐. 普济方 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983.
- [12] 高健杰, 魏学冰. 何首乌炮制用辅料的研究 [J]. 中成药, 1999, 21(6): 295-297.
- [13] 张艳君, 韩峰超, 刘唯芬, 等. 不同炮制方法对何首乌成分的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(4): 215-216.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 1964.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 1979.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 1985.
- [17] 郇 丹, 李晓菲, 尹 萍, 等. 基于炮制减毒思想的何首乌肝毒性物质基础初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2044-2050.
- [18] 吕 旸, 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, 2013, 19(20): 268-272.
- [19] 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.
- [20] Gao D, Li Y M, Wang N, *et al.* Establishment and validation of quantitative analysis of multi-components by a single marker for quality control of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Anal Methods*, 2016, 8(39): 7170-7176.
- [21] 翟旭峰, 李 柯, 娄勇军, 等. 中药何首乌炮制前后特征化学成分的分析 [J]. 中南药学, 2016, 14(7): 704-708.
- [22] 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.
- [23] 顾 蘅, 张 毅. 何首乌炮制方法古今研究 [J]. 中医临床研究, 2015, 34(7): 24-26.
- [24] 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.
- [25] 肖小河, 王伽伯, 郇 丹. 生物评价在中药质量标准化中的研究与应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 514-518.
- [26] 张钰祺, 龚千锋. 米泔水在中药炮制中的古今应用研究 [J]. 江西中医药, 2011, 42(4): 64-66.