

古法黑豆蒸晒与药典黑豆汁连续蒸对何首乌中 12 个成分含量的影响

汪颖舒¹, 朱广灏¹, 王冰^{1,2}, 李杰荣¹, 骆前飞¹, 何修滢¹, 赵佳逸¹, 修彦凤^{1*}

1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

2. 中国科学院上海药物研究所 药物制剂研究中心, 上海 201203

摘要: 目的 探究何首乌 *Polygoni Multiflori Radix* 采用古法黑豆“九蒸九晒”和现代药典黑豆汁连续蒸制对主要药效成分含量的影响。方法 模拟“九蒸九晒”的时间安排, 制备古法黑豆与何首乌分层铺放蒸后晒品、拌入黑豆汁蒸后晒品和药典拌入黑豆汁后连续蒸制品; 建立超高压液相三重四极杆质谱 (UPLC-QqQ-MS/MS) 测定何首乌中 12 个成分的分析方法并进行检测; 结合 *t* 检验、主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析评价不同炮制方法所得样品的差异。结果 建立了可靠的 UPLC-QqQ-MS/MS 测定何首乌中大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、顺式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷 (*cis*-THSG)、反式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷 (*trans*-THSG)、虎杖苷、白藜芦醇、表儿茶素、芦丁和金丝桃苷含量的方法; 随着蒸制时间的延长, 12 个成分的含量发生了明显变化: 游离蒽醌类成分先降低后升高, 蒽醌苷类成分、*cis*-THSG、虎杖苷和金丝桃苷先升高后降低, *trans*-THSG、白藜芦醇、表儿茶素和芦丁降低; 成分的含量与蒸制用的辅料和操作方法及炮制时间密切相关, 操作方法的影响大于辅料对何首乌质量的影响。结论 从成分含量的角度分析, 古法黑豆蒸晒与药典法的黑豆汁连续蒸制不能等同, 该研究为传承和发扬何首乌的传统炮制方法提供了实验依据。

关键词: 何首乌; 九蒸九晒; 黑豆汁; UPLC-QqQ-MS/MS; 药效成分; 动态变化; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 大黄素; 大黄素甲醚; 大黄酸; 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 顺式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷; 反式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷; 虎杖苷; 白藜芦醇; 表儿茶素; 芦丁; 金丝桃苷; 蒽醌

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-4972-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.016

Influences of ancient processing method steaming with black bean and drying and pharmacopoeia processing method continuous steaming with black bean decoction on 12 components of *Polygoni Multiflori Radix*

WANG Ying-shu¹, ZHU Guang-hao¹, WANG Bing^{1,2}, LI Jie-rong¹, LUO Qian-fei¹, HE Xiu-ying¹, ZHAO Jia-yi¹, XIU Yan-feng¹

1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Center for Pharmaceutics Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To explore the influence of ancient processing method black bean “nine cycles of steaming and drying” and modern pharmacopoeia processing method continuous steaming with black bean decoction on the main components of *Polygoni Multiflori Radix* (PMR). **Methods** Simulating the time arrangement of “nine cycles of steaming and drying”, samples were prepared using three processing methods: ancient method that raw PMR (rPMR) and black bean were steamed in layers and then dried, modern method that rPMR were steamed with black bean decoction and then dried, the method recorded in *Chinese Pharmacopoeia* that rPMR were steamed continuously with black bean decoction; The determination method of 12 components in rPMR and processed PMR

收稿日期: 2020-04-10

基金项目: 上海中医药大学研究生创新创业培养项目 (Y2019089); 上海市大学生创新活动计划项目 (2019SHUTCM066); 上海市大学生创新活动计划项目 (2020SHUTCM048)

作者简介: 汪颖舒, 女, 在读硕士, 从事中药炮制及制剂研究。E-mail: 1123110608@qq.com

*通信作者 修彦凤, 女, 副教授, 从事中药炮制及制剂研究。E-mail: xiuyf@hotmail.com

(pPMR) was established using ultra-performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QqQ-MS/MS), and 12 components in all samples processed by different methods were determined; The results was analyzed combining with *t* test, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** A reliable UPLC-QqQ-MS/MS method was established for the determination of emodin, physcion, rhein, emodin-8-*O*- β -D-glucoside, physcion-8-*O*- β -D-glucoside, *cis*-2,3,5,4'-tetrahydroxylstilbene-2-*O*- β -D-glucoside (*cis*-THSG), *trans*-2, 3,5,4'-tetrahydroxylstilbene-2-*O*- β -D-glucoside (*trans*-THSG), polydatin, resveratrol, epicatechin, rutin and hyperoside. With the prolongation of steaming time, the content of 12 effective components changed obviously: the content of free anthraquinone was decreased first and then increased; The content of anthraquinone glycoside, *cis*-THSG, polydatin and hyperoside was increased first and then decreased; The content of *trans*-THSG, resveratrol, epicatechin and rutin was decreased; The components content were closely related to the auxiliary materials, steaming operation methods and processing time, the influence of operation methods was greater than that of auxiliary materials on the quality of pPMR. **Conclusion** The ancient processing method steaming with black bean and drying could not be equated with the modern pharmacopoeia processing method continuous steaming with black bean decoction in terms of the content of effective components. The result provides experimental basis for inheriting and developing the traditional processing method of PMR.

Key words: *Polygoni Multiflori Radix*; nine cycles of steaming and drying; black bean decoction; UPLC-QqQ-MS/MS; effective components; dynamic change; principal component analysis; partial least squares discrimination analysis; emodin; physcion; rhein; emodin-8-*O*- β -D-glucoside; physcion-8-*O*- β -D-glucoside; *cis*-2,3,5,4'-tetrahydroxylstilbene-2-*O*- β -D-glucoside (*cis*-THSG); *trans*-2, 3,5,4'-tetrahydroxylstilbene-2-*O*- β -D-glucoside (*trans*-THSG); polydatin; resveratrol; epicatechin; rutin; hyperoside; anthraquinone

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 临床常用生何首乌与制何首乌 2 种饮片规格, 生品解毒、消痈、截疟和润肠通便, 制品补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨和化浊降脂^[1]。近年来, 何首乌的肝毒性问题引起了人们的关注^[2], 自 2010 年版开始, 《中国药典》收载的何首乌生品用量由 6~12 g 调整为 3~6 g。研究表明, 炮制可以降低生品的滑肠致泻^[3]和肝毒性^[4-6], 在一定的炮制时间范围内, 炮制时间与减毒作用成正比^[7]。从古至今, 蒸法是炮制何首乌的常用方法, 明代李时珍在《本草纲目》对“九蒸九晒”何首乌的操作方法进行了详细描述: “……切片, 用黑豆三斗, 每次用三升三合三勺, 以水泡过, 砂锅内铺豆一层, 首乌一层, 重重铺尽, 蒸之, 豆熟, 取出去豆, 将何首乌晒干, 再以豆蒸, 如此九蒸九晒, 乃用”^[8]。现代, 在《中国药典》2020 年版及全国各个省市炮制规范中收载的制何首乌的炮制方法主要是加入黑豆汁拌匀后蒸制。由古法何首乌与黑豆层层交叉铺叠的“九蒸九晒”法, 演变为将黑豆先煎汁再拌入何首乌中连续蒸制的方法是否有据可依, 未见史料进行二者的比较。

何首乌中主要含有蒽醌类、二苯乙烯苷类和黄酮类等成分, 为其有效和有毒成分^[9]。为了传承和发扬中药的传统炮制方法, 解释现代炮制方法与古法的差异, 本研究从成分含量变化的角度, 以上述 3 类成分大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄素-8-*O*-

β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、顺式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷 (*cis*-THSG)、反式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -D-葡萄糖苷 (*trans*-THSG)、虎杖苷、白藜芦醇、表儿茶素、芦丁和金丝桃苷为测定指标, 采用超高压液相三重四极杆质谱 (UPLC-QqQ-MS/MS) 分析古法黑豆拌蒸后晒、作为古今方法衔接对照的黑豆汁拌蒸后晒及现代药典中收载的黑豆汁拌后连续蒸制 3 种方法所得制何首乌在“九蒸”过程中药效成分发生的动态变化, 为古法炮制与现代方法炮制何首乌的异同提供实验数据的支撑。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 5500 UPLC-QqQ-MS/MS 液质联用系统, 美国 Agilent 公司; Sartorius CP225D 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; KQ-250DB 超声清洗机, 昆山市超声仪器有限公司; DHG-9245A 鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 试药

对照品大黄素 (批号 T02S8F42983)、大黄素甲醚 (批号 T09M9F55482)、大黄酸 (批号 T30A8F42628)、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (批号 P17A10F86138)、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (批号 P16N9F75128)、*cis*-THSG (批号 P19J10F91001)、*trans*-THSG (批号 J17O8Z45941)、虎杖苷 (批号 T31O7F23950)、白藜芦醇 (批号 R04A9S57840)、

表儿茶素(批号 K19J9R66088)、芦丁(批号 T10J10Z90356)和金丝桃苷(批号 Y08N9X74602)均购自上海源叶公司,各个对照品质量分数均>98%;乙腈和甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水。

经上海中医药大学修彦凤副教授鉴定,何首乌生品(批号 181006-1)为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根加工品,黑豆(批号 180614-1)为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种子,均购自上海万仕诚药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 不同炮制方法制何首乌的制备

2.1.1 生品 取何首乌生品饮片,除去杂质,平行制备 3 份样品。

2.1.2 古法黑豆蒸晒品 称取 9 份何首乌生品,每份约 300 g,分别加清水拌匀、润透,置蒸锅内,一层黑豆生品上铺何首乌,再铺一层黑豆,蒸制加热 8 h,弃去熟黑豆,摊开晾晒 24 h,第 2 天继续加黑豆生品蒸制 8 h,晾晒 24 h,如此反复操作,9 份生品分别蒸制 8、16、24、32、40、48、56、64、72 h,取出达到蒸制时间的样品,晾晒,将蒸锅内的液体浓缩,与蒸晒品拌匀,干燥(60℃),得到 9 份“九蒸九晒”样品,分别标记为 D8、D16、D24、D36、D48、D56、D64、D72。每个蒸制时间的样品同时平行制备 3 份。

2.1.3 黑豆汁蒸晒品 称取 9 份生何首乌片,每份约 300 g,分别加黑豆汁拌匀、润透,置蒸锅内,蒸制加热 8 h,摊开晾晒 24 h,继续蒸制 8 h,再晾晒 24 h,如此反复操作,9 份生品分别蒸制 8、16、24、32、40、48、56、64、72 h,取出达到蒸制时间的样品,晾晒,将蒸锅内的液体浓缩,与蒸晒品拌匀,干燥(60℃),得到 9 份蒸制不同时间的样品,分别标记为 Z8、Z16、Z24、Z36、Z48、Z56、Z64、Z72。每个蒸制时间的样品同时平行制备 3 份。

黑豆汁制法^[1]:取黑豆 10 kg,加水适量,煮约 4 h,熬汁约 15 kg,药渣再加水煮约 3 h,熬汁约 10 kg,合并得黑豆汁约 25 kg。每 100 kg 何首乌片,用黑豆 10 kg。

2.1.4 药典黑豆汁蒸制品 称取 9 份生何首乌片,每份约 300 g,分别加“2.1.3”项下黑豆汁拌匀、润透,置不锈钢蒸锅内,分别蒸制 8、16、24、32、40、48、56、64、72 h,取出达到蒸制时间的样品,晾至表面略干,将蒸锅内的液体浓缩,拌入,干燥

(60℃),得到 9 份蒸制不同时间的样品,分别标记为 Y8、Y16、Y24、Y36、Y48、Y56、Y64、Y72。每个蒸制时间的样品同时平行制备 3 份。

2.2 供试品溶液的制备

取“2.1”项下何首乌不同炮制品,粉碎,取细粉 400 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声 45 min,放冷,用 70%甲醇补足减失的质量,滤过,将续滤液用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,每个样品平行制备 3 份供试品溶液,备用。因为何首乌样品中大黄素、大黄素甲醚、*cis*-THSG、*trans*-THSG 和表儿茶素的含量较高,在测定分析前,取适量供试品溶液,加入 70%甲醇稀释 400 倍,所得溶液进样分析。

2.3 对照品溶液的制备

分别称取 12 个对照品适量,精密称定,加 70%甲醇制成对照品母液;分别取适量的 12 个成分的对照品母液,加 70%甲醇配制成含 12 个成分的对照品混合储备液,备用。

2.4 色谱与质谱条件

液相色谱条件:色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈(B),梯度洗脱:0~2 min, 95%~80% A; 2~5 min, 80%~68% A; 5~6 min, 68%~45% A; 6~8 min, 45%~5% A; 8~9 min, 5%~0% A; 9~10 min, 0% A;柱温为 35℃;体积流量为 0.3 mL/min;进样量为 5 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),多反应监测模式(MRM)。以氮气作为雾化、锥孔气,体积流量为 8 L/min,加热器 350℃;流量正、负离子同时扫描模式;雾化器压力 137.895 kPa(20 psi),碰撞气压力 48.263 kPa(7 psi);离子源喷雾电压 5 500 V,离子源温度 600℃;毛细管电压:正、负离子模式均为 3 500 V;正离子模式下每个离子对停留时间 30 ms,负离子模式下每个离子对停留时间 73 ms。12 个成分的质谱参数见表 1。

2.5 UPLC-QqQ-MS/MS 成分分析

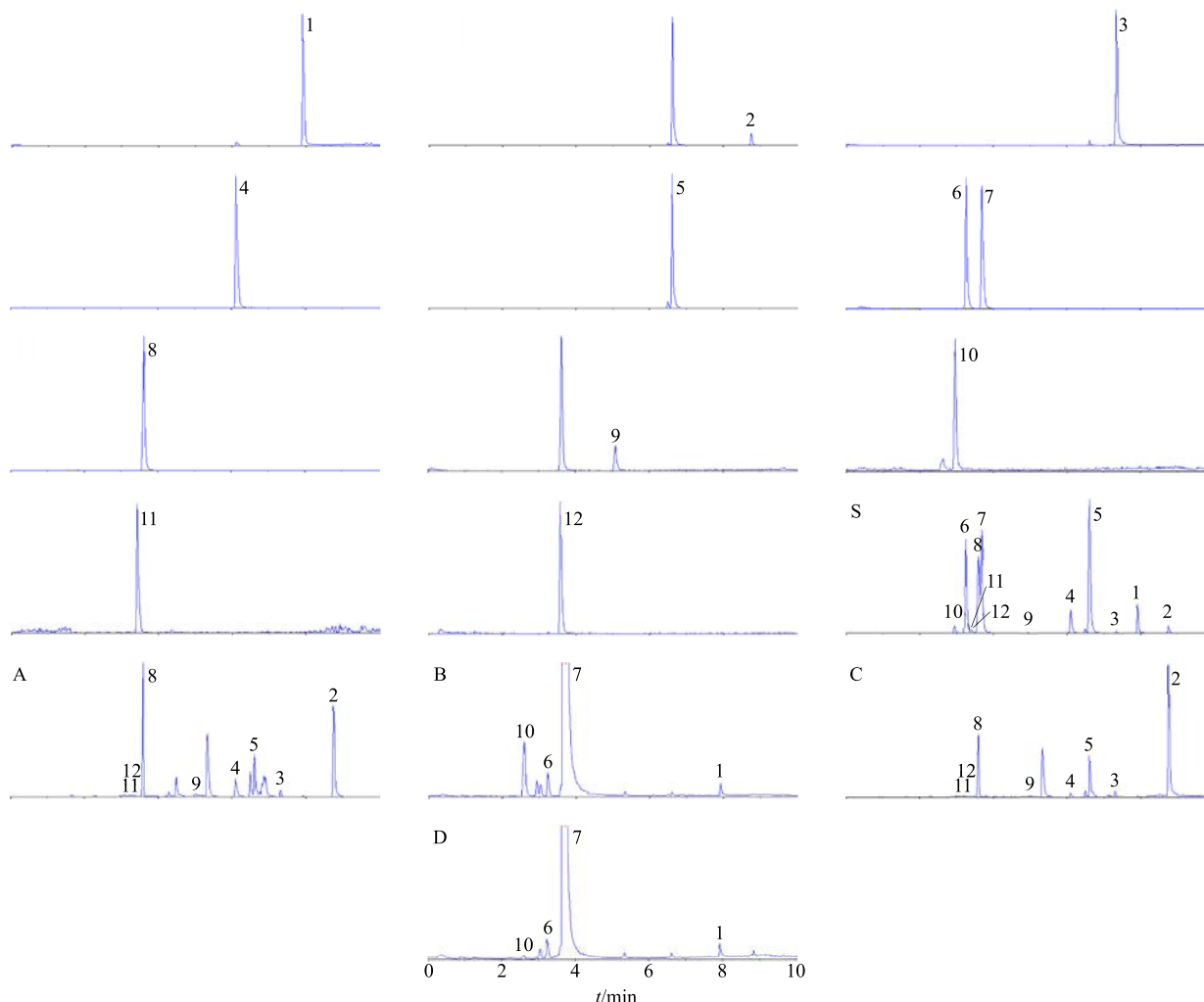
取“2.2”和“2.3”项下的供试品溶液和对照品溶液,采用“2.4”项下的条件进样分析,得到 UPLC-QqQ-MS/MS 多反应监测模式图,见图 1。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 取适量的“2.3”项下的 12 个成分的对照品混合储备液,加入 70%甲醇逐级稀释,得到一系列不同质量浓度的混合对照品溶液。

表 1 12 个成分的质谱分析参数
Table 1 MS/MS parameters of 12 components

化学成分	分子式	去簇电 压/V	碰撞电 压/eV	离子对 MRM (<i>m/z</i>)	离子源	化学成分	分子式	去簇电 压/V	碰撞电 压/eV	离子对 MRM (<i>m/z</i>)	离子源
大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-25	-46	269.0/225.0	ESI ⁻	<i>cis</i> -THSG	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	-44	-22	404.8/242.9	ESI ⁻
大黄素甲醚	C ₂₅ H ₃₈ O ₄ Si ₃	+56	+58	285.0/139.1	ESI ⁺	<i>trans</i> -THSG	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	-44	-22	404.8/242.9	ESI ⁻
大黄酸	C ₁₅ H ₈ O ₆	-24	-30	282.8/210.9	ESI ⁻	虎杖苷	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	-16	-26	389.3/227.1	ESI ⁻
大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> - 葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-10	-20	432.1/269.0	ESI ⁻	白藜芦醇	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	-42	-16	226.9/185.0	ESI ⁻
大黄素甲醚-8- <i>O</i> - β- <i>D</i> -葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	-7	-16	445.1/283.1	ESI ⁻	表儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	+22	+16	290.9/138.9	ESI ⁺
						芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	+30	+18	610.9/302.9	ESI ⁺
						金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-26	-28	463.1/300.7	ESI ⁻



1-大黄素 2-大黄素甲醚 3-大黄酸 4-大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 5-大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 6-*cis*-THSG 7-*trans*-THSG 8-虎杖苷
9-白藜芦醇 10-表儿茶素 11-芦丁 12-金丝桃苷
1-emodin 2-phycion 3-rhein 4-emodin-8-*O*-β-*D*-glucoside 5-phycion-8-*O*-β-*D*-glucoside 6-*cis*-THSG 7-*trans*-THSG 8-polydation
9-resveratrol 10-epicatechin 11-rutin 12-hyperoside

图 1 12 种对照品 (1~12)、混和对照品 (S)、生何首乌 (A-未稀释、B-稀释) 和制何首乌 (C-未稀释、D-稀释) 的多反应离子监测色谱图

Fig. 1 Representative multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of standard references (1—12), mixed standard references (S), raw (A-undiluted, B-diluted) and processed (C-undiluted, D-diluted) *Polygoni Multiflora Radix*

按照“2.4”项下的色谱与质谱条件,进样分析,以峰面积为纵坐标(Y),以质量浓度为横坐标(X),计算得到各个成分的标准曲线回归方程,见表 2。

表 2 12 个化学成分的线性回归方程、线性范围、检测限和定量限

Table 2 Linear regression equation, linear range, limits of detection and limits of quantification of 12 components

化学成分	线性回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	R^2	检测限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
大黄素	$Y=5\,882.11\,X+106\,954.02$	15.60~1 000	0.999 2	0.23	0.65
大黄素甲醚	$Y=833.30\,X+65.04$	7.80~500	0.999 7	1.25	3.80
大黄酸	$Y=5\,534.77\,X+5\,755.17$	3.12~200	0.999 8	0.56	2.20
大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷	$Y=310.86\,X-8\,039.50$	312.50~40 000	0.999 0	3.30	11.10
大黄素甲醚-8- O - β -D-葡萄糖苷	$Y=5\,830.40\,X+612\,126.44$	250.00~16 000	0.999 0	2.90	9.75
<i>cis</i> -THSG	$Y=23\,729.93\,X+33\,908.60$	3.91~500	0.999 6	0.32	0.84
<i>trans</i> -THSG	$Y=21\,621.80\,X+745\,321.46$	62.50~8 000	0.999 9	4.12	12.48
虎杖苷	$Y=17\,427.00\,X+418\,229.89$	31.25~2 000	0.999 1	0.35	0.12
白藜芦醇	$Y=932.11\,X-614.86$	25.00~1200	0.999 8	6.25	20.00
表儿茶素	$Y=10\,658.68\,X+10\,837.01$	1.56~100	0.999 8	0.21	0.75
芦丁	$Y=6\,549.92\,X+1\,800.00$	3.12~200	0.999 8	0.50	1.56
金丝桃苷	$Y=5\,741.33\,X+12\,291.95$	12.50~800	0.999 5	0.15	0.50

量浓度对照品溶液,按照“2.4”项下的色谱与质谱条件,连续进样 6 次,记录峰面积,计算平均日内精密密度;连续 3 d 进样分析,计算平均日间精密密度。大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- O - β -D-葡萄糖苷、*cis*-THSG、*trans*-THSG、虎杖苷、白藜芦醇、表儿茶素、芦丁和金丝桃苷的低、中、高质量浓度的平均日内和日间精密度的 RSD 分别为 1.23%、2.45%、1.53%、2.38%、1.46%、2.03%、1.88%、2.24%、1.01%、1.33%、1.44%、2.82%、0.89%、1.65%、0.81%、0.93%、1.78%、1.83%、1.39%、2.69%、0.73%、4.58%、2.19%、2.14%,均少于 3%,表明仪器精密密度良好。

2.6.3 重复性、稳定性考察 取何首乌生品粉末,按照“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,进样分析,采用随行标准曲线的方法,计算样品中 12 个成分的质量分数,进行重复性考察,大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- O - β -D-葡萄糖苷、*cis*-THSG、*trans*-THSG、虎杖苷、白藜芦醇、表儿茶素、芦丁和金丝桃苷质量分数的 RSD 分别为 3.63%、0.88%、0.85%、3.82%、2.77%、1.19%、4.83%、3.62%、2.99%、2.38%、1.40%、2.92%,各个成分质量分数的 RSD 均少于 5%,说明实验方法的重复性良好。

取何首乌生品供试品溶液在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样分析,计算峰面积的 RSD 分别为

结果表明,12 个成分在相应的线性范围内,质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.6.2 精密度考察 取 12 个成分的低、中、高质

3.57%、3.10%、1.92%、2.85%、2.22%、3.57%、2.20%、2.08%、1.66%、1.62%、3.58%、3.39%,均少于 4%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.4 加样回收率考察 称取已知 12 个成分含量的何首乌生品粉末 0.2 g,精密称定,加入适量质量浓度的对照品溶液,使加入的 12 个对照品质量约为样品中 12 个成分质量的 0.5 (低)、1.0 (中) 和 1.5 (高) 倍。按照“2.2”项下方法,制备供试品溶液,每种样品平行制备 3 份,采用随行标准曲线法计算样品中各个成分的测得量,计算 12 个成分的平均加样回收率。12 个成分的加入对照品质量和样品中成分质量低、中和高比例的平均加样回收率 (RSD) 分别为大黄素 100.33% (2.30%)、100.18% (0.25%)、99.67% (0.54%), 大黄素甲醚 101.74% (5.24%)、101.81% (2.46%)、101.79% (4.61%), 大黄酸 97.33% (0.92%)、99.51% (3.06%)、100.55% (6.27%), 大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷 101.10% (5.09%)、103.30% (0.24%)、102.51% (0.53%), 大黄素甲醚-8- O - β -D-葡萄糖苷 103.82% (2.26%)、102.84% (0.24%)、102.03% (0.53%), *cis*-THSG 95.74% (3.55%)、99.44% (4.97%)、100.26% (3.12%), *trans*-THSG 102.30% (1.82%)、102.48% (2.35%)、102.21% (2.63%), 虎杖苷 98.50% (6.18%)、97.80% (1.56%)、95.83% (0.38%), 白藜芦醇 104.83% (1.25%)、106.75% (1.74%)、108.32% (1.04%), 表儿茶素

103.98%(2.07%)、96.85%(1.21%)、96.52%(3.48%)，
 芦丁 102.43%(3.25%)、100.30%(4.94%)、98.07%
 (3.57%)，金丝桃苷 100.25%(4.75%)、99.09%
 (4.25%)、99.69%(4.94%)。低、中和高比例的平均
 加样回收率范围为 95.74%~104.83%、96.85%~
 106.75%和 95.83%~108.32%，RSD 均小于 6.30%，
 表明方法的准确度良好。

2.7 12 个成分的含量测定与动态变化趋势

按照“2.2”项下供试品溶液的制备方法，制备
 “2.1”项下所有样品的供试品溶液，按“2.4”项下

的条件进样分析，采用随行标准曲线的方法，计算
 得到不同蒸制方法与蒸制时间的何首乌中 12 个成
 分的质量分数，结果见表 3。在此实验条件下测得
 大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡
 萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、*cis*-THSG、
trans-THSG、虎杖苷、白藜芦醇、表儿茶素、芦丁、
 金丝桃苷的质量分数分别为 670.58~2 058.74、
 275.75~482.53、0.17~0.94、295.25~811.25、
 57.40~174.06、102.85~2526.62、5 870.05~36
 203.43、13.38~40.98、6.41~19.50、73.76~210.13、

表 3 不同蒸制方法和蒸制时间的何首乌中 12 个成分的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 3 12 components content in *Polygoni Multiflori Radix* steamed by different methods and different time ($\bar{x} \pm s, n=9$)

样品	炮制时 间/h	蒽醌类成分/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						二苯乙烯类成分/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
		大黄素	大黄素甲醚	大黄酸	大黄素-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	大黄素甲醚-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	<i>cis</i> -THSG	
生品	0	1 251.63 $\pm$ 16.89	328.05 $\pm$ 0.89	0.94 $\pm$ 0.01	614.80 $\pm$ 2.14	163.11 $\pm$ 0.95	244.34 $\pm$ 6.77	
古法黑豆	8	954.55 $\pm$ 18.92	275.75 $\pm$ 1.91	0.30 $\pm$ 0.01	629.74 $\pm$ 4.38	163.42 $\pm$ 0.12	557.05 $\pm$ 2.73	
蒸晒品	16	928.02 $\pm$ 17.52	339.92 $\pm$ 3.04	0.29 $\pm$ 0.01	601.28 $\pm$ 4.01	156.77 $\pm$ 0.30	473.04 $\pm$ 3.06	
	24	851.83 $\pm$ 14.53	342.21 $\pm$ 1.13	0.29 $\pm$ 0.01	595.76 $\pm$ 4.48	144.21 $\pm$ 0.21	397.09 $\pm$ 2.49	
	32	867.02 $\pm$ 20.49	366.89 $\pm$ 1.96	0.23 $\pm$ 0.01	502.51 $\pm$ 3.38	126.38 $\pm$ 0.32	242.16 $\pm$ 2.72	
	40	1 005.85 $\pm$ 20.49	369.78 $\pm$ 2.49	0.29 $\pm$ 0.01	455.83 $\pm$ 3.30	117.55 $\pm$ 0.13	209.97 $\pm$ 4.42	
	48	1 073.57 $\pm$ 25.89	395.50 $\pm$ 2.43	0.37 $\pm$ 0.01	398.17 $\pm$ 4.01	104.64 $\pm$ 0.11	170.14 $\pm$ 2.73	
	56	1 239.43 $\pm$ 42.96	404.21 $\pm$ 1.96	0.48 $\pm$ 0.01	382.41 $\pm$ 4.29	100.10 $\pm$ 0.22	167.42 $\pm$ 3.06	
	64	1 333.32 $\pm$ 20.49	430.98 $\pm$ 1.07	0.45 $\pm$ 0.01	351.80 $\pm$ 4.77	98.81 $\pm$ 0.28	136.13 $\pm$ 2.60	
	72	1 590.07 $\pm$ 20.49	448.84 $\pm$ 1.07	0.29 $\pm$ 0.01	321.61 $\pm$ 4.48	95.05 $\pm$ 0.17	102.85 $\pm$ 2.42	
黑豆汁蒸 晒品	8	670.58 $\pm$ 15.14	311.73 $\pm$ 4.65	0.17 $\pm$ 0.01	616.83 $\pm$ 11.19	174.06 $\pm$ 0.58	750.65 $\pm$ 9.54	
	16	695.85 $\pm$ 16.27	326.51 $\pm$ 2.44	0.28 $\pm$ 0.01	684.19 $\pm$ 2.14	155.47 $\pm$ 0.52	743.03 $\pm$ 3.62	
	24	697.96 $\pm$ 15.14	350.68 $\pm$ 8.06	0.36 $\pm$ 0.01	597.38 $\pm$ 10.11	148.27 $\pm$ 2.42	612.18 $\pm$ 16.11	
	32	849.58 $\pm$ 44.68	374.78 $\pm$ 3.03	0.39 $\pm$ 0.02	581.38 $\pm$ 2.42	139.52 $\pm$ 0.67	600.07 $\pm$ 10.12	
	40	1 179.91 $\pm$ 15.14	388.37 $\pm$ 2.44	0.40 $\pm$ 0.01	530.85 $\pm$ 9.08	125.70 $\pm$ 1.10	532.07 $\pm$ 4.02	
	48	1 251.35 $\pm$ 23.89	412.05 $\pm$ 1.43	0.52 $\pm$ 0.01	396.52 $\pm$ 5.88	121.38 $\pm$ 1.69	345.28 $\pm$ 9.53	
	56	1 354.40 $\pm$ 15.14	432.74 $\pm$ 1.43	0.71 $\pm$ 0.01	375.23 $\pm$ 4.80	117.40 $\pm$ 4.77	248.87 $\pm$ 9.53	
	64	1 500.00 $\pm$ 20.39	456.68 $\pm$ 2.98	0.76 $\pm$ 0.02	354.74 $\pm$ 5.88	79.43 $\pm$ 0.52	182.75 $\pm$ 4.02	
药典黑豆 汁蒸品	72	1 383.60 $\pm$ 14.76	482.53 $\pm$ 1.96	0.66 $\pm$ 0.01	334.75 $\pm$ 2.31	67.88 $\pm$ 0.84	172.17 $\pm$ 3.62	
	8	1 472.63 $\pm$ 24.01	295.46 $\pm$ 1.07	0.56 $\pm$ 0.01	811.25 $\pm$ 4.39	164.27 $\pm$ 0.21	2 526.62 $\pm$ 10.58	
	16	1 379.39 $\pm$ 25.89	308.38 $\pm$ 3.59	0.59 $\pm$ 0.01	688.49 $\pm$ 4.38	159.34 $\pm$ 0.17	2 096.66 $\pm$ 4.93	
	24	1 116.61 $\pm$ 18.92	334.67 $\pm$ 1.47	0.61 $\pm$ 0.01	622.35 $\pm$ 2.69	141.57 $\pm$ 0.22	1 567.64 $\pm$ 3.28	
	32	1 079.67 $\pm$ 18.92	362.09 $\pm$ 4.15	0.62 $\pm$ 0.01	593.67 $\pm$ 4.48	131.28 $\pm$ 0.36	1 284.08 $\pm$ 2.49	
	40	1 239.66 $\pm$ 24.01	389.66 $\pm$ 1.47	0.67 $\pm$ 0.01	526.80 $\pm$ 2.69	99.89 $\pm$ 0.24	1 007.09 $\pm$ 4.19	
	48	1 384.29 $\pm$ 20.82	419.07 $\pm$ 1.07	0.71 $\pm$ 0.01	413.72 $\pm$ 3.64	84.65 $\pm$ 0.23	736.43 $\pm$ 2.38	
	56	1 590.80 $\pm$ 17.52	432.24 $\pm$ 5.21	0.88 $\pm$ 0.01	379.82 $\pm$ 1.46	70.68 $\pm$ 0.23	609.86 $\pm$ 2.38	
	64	1 733.98 $\pm$ 17.52	437.75 $\pm$ 1.47	0.80 $\pm$ 0.01	348.52 $\pm$ 4.01	66.54 $\pm$ 0.26	494.73 $\pm$ 3.47	
	72	2 058.74 $\pm$ 18.92	459.39 $\pm$ 0.74	0.77 $\pm$ 0.01	295.25 $\pm$ 3.56	57.40 $\pm$ 0.13	356.95 $\pm$ 2.49	

续表 2

样品	炮制时间/h	二苯乙烯类成分/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			黄酮类成分/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
		<i>trans</i> -THSG	虎杖苷	白藜芦醇	表儿茶素	芦丁	金丝桃苷
生品	0	36 203.43 $\pm$ 70.15	33.74 $\pm$ 0.08	15.79 $\pm$ 0.38	210.13 $\pm$ 2.70	0.49 $\pm$ 0.01	2.93 $\pm$ 0.13
古法黑豆	8	24 170.36 $\pm$ 142.85	34.73 $\pm$ 0.09	14.77 $\pm$ 0.50	193.07 $\pm$ 2.56	0.17 $\pm$ 0.01	6.63 $\pm$ 0.11
蒸晒品	16	24 002.22 $\pm$ 91.82	32.66 $\pm$ 0.09	14.53 $\pm$ 0.32	184.26 $\pm$ 2.74	0.18 $\pm$ 0.01	6.86 $\pm$ 0.11
	24	22 445.00 $\pm$ 142.85	29.07 $\pm$ 0.09	12.76 $\pm$ 0.33	171.33 $\pm$ 2.74	0.16 $\pm$ 0.01	6.72 $\pm$ 0.11
	32	19 184.74 $\pm$ 127.80	27.96 $\pm$ 0.16	12.68 $\pm$ 0.30	159.66 $\pm$ 2.81	0.16 $\pm$ 0.01	5.78 $\pm$ 0.11
	40	17 783.90 $\pm$ 127.80	25.70 $\pm$ 0.17	12.59 $\pm$ 0.31	133.40 $\pm$ 2.33	0.14 $\pm$ 0.01	5.45 $\pm$ 0.11
	48	13 227.92 $\pm$ 91.82	23.95 $\pm$ 0.30	11.34 $\pm$ 0.31	125.65 $\pm$ 2.74	0.12 $\pm$ 0.01	5.64 $\pm$ 0.11
	56	11 895.14 $\pm$ 125.21	22.37 $\pm$ 0.13	10.49 $\pm$ 0.31	114.16 $\pm$ 3.29	0.12 $\pm$ 0.01	5.67 $\pm$ 0.11
	64	8 274.86 $\pm$ 133.98	19.76 $\pm$ 0.31	9.10 $\pm$ 0.31	109.62 $\pm$ 3.29	0.10 $\pm$ 0.01	4.86 $\pm$ 0.11
	72	5 870.05 $\pm$ 160.84	13.38 $\pm$ 0.13	6.41 $\pm$ 0.31	93.03 $\pm$ 2.56	0.08 $\pm$ 0.01	4.01 $\pm$ 0.11
黑豆汁蒸	8	31 508.66 $\pm$ 281.55	37.89 $\pm$ 0.18	14.14 $\pm$ 0.39	168.89 $\pm$ 4.30	0.32 $\pm$ 0.01	8.19 $\pm$ 0.13
晒品	16	30 012.53 $\pm$ 119.19	36.50 $\pm$ 0.09	16.23 $\pm$ 0.44	160.48 $\pm$ 2.52	0.26 $\pm$ 0.01	7.50 $\pm$ 0.11
	24	22 274.54 $\pm$ 119.19	29.26 $\pm$ 0.12	13.09 $\pm$ 0.44	130.60 $\pm$ 6.45	0.19 $\pm$ 0.01	6.39 $\pm$ 0.11
	32	17 663.51 $\pm$ 99.76	26.80 $\pm$ 0.12	11.81 $\pm$ 0.35	117.03 $\pm$ 2.52	0.18 $\pm$ 0.01	4.87 $\pm$ 0.13
	40	14 640.83 $\pm$ 281.55	26.73 $\pm$ 0.13	11.54 $\pm$ 0.39	111.86 $\pm$ 2.52	0.13 $\pm$ 0.01	4.23 $\pm$ 0.15
	48	12 066.28 $\pm$ 119.19	22.40 $\pm$ 0.13	9.41 $\pm$ 0.34	103.88 $\pm$ 2.52	0.12 $\pm$ 0.01	4.23 $\pm$ 0.14
	56	10 693.89 $\pm$ 53.69	22.01 $\pm$ 0.12	9.29 $\pm$ 0.34	101.18 $\pm$ 4.20	0.14 $\pm$ 0.01	4.15 $\pm$ 0.11
	64	9 884.87 $\pm$ 53.69	20.93 $\pm$ 0.13	9.06 $\pm$ 0.32	88.20 $\pm$ 6.45	0.11 $\pm$ 0.01	4.19 $\pm$ 0.15
	72	9 705.93 $\pm$ 99.76	20.41 $\pm$ 0.13	8.79 $\pm$ 0.35	73.76 $\pm$ 2.52	0.11 $\pm$ 0.01	4.13 $\pm$ 0.11
药典黑豆	8	33 976.78 $\pm$ 179.08	40.98 $\pm$ 0.13	19.50 $\pm$ 0.31	189.77 $\pm$ 2.96	0.26 $\pm$ 0.02	8.65 $\pm$ 0.11
汁蒸品	16	29 455.58 $\pm$ 56.43	39.19 $\pm$ 0.09	17.30 $\pm$ 0.32	164.30 $\pm$ 3.04	0.25 $\pm$ 0.01	7.93 $\pm$ 0.11
	24	26 700.56 $\pm$ 200.23	32.15 $\pm$ 0.13	14.77 $\pm$ 0.31	157.33 $\pm$ 2.81	0.23 $\pm$ 0.01	6.47 $\pm$ 0.11
	32	21 776.77 $\pm$ 234.69	30.02 $\pm$ 0.12	13.38 $\pm$ 0.32	143.34 $\pm$ 2.81	0.19 $\pm$ 0.01	6.18 $\pm$ 0.11
	40	14 252.94 $\pm$ 55.46	25.72 $\pm$ 0.12	11.37 $\pm$ 0.33	140.35 $\pm$ 2.74	0.16 $\pm$ 0.01	5.54 $\pm$ 0.11
	48	11 553.12 $\pm$ 141.96	24.21 $\pm$ 0.13	11.51 $\pm$ 0.31	124.42 $\pm$ 2.74	0.14 $\pm$ 0.01	5.27 $\pm$ 0.11
	56	8 429.23 $\pm$ 133.98	21.20 $\pm$ 0.08	9.77 $\pm$ 0.30	114.08 $\pm$ 2.74	0.11 $\pm$ 0.01	4.12 $\pm$ 0.11
	64	8 707.84 $\pm$ 272.22	20.79 $\pm$ 0.09	9.24 $\pm$ 0.30	106.11 $\pm$ 2.56	0.11 $\pm$ 0.01	4.07 $\pm$ 0.11
	72	7 686.57 $\pm$ 91.82	16.58 $\pm$ 0.08	7.53 $\pm$ 0.30	93.53 $\pm$ 2.74	0.09 $\pm$ 0.01	3.37 $\pm$ 0.11

0.08~0.49、2.93~8.65 $\mu\text{g/g}$ 。

选取代表性蒸制时间的样品：最短 8 h、最长 72 h 和居中的时间点 40 h，将 12 种成分的质量分数进行不同炮制方法的比较，见图 2，同时结合表 3 的结果可以发现，与生品中相应成分的含量比较，随着蒸制时间的延长，游离蒽醌大黄素、大黄素甲醚和大黄酸在 3 种方法样品中呈现先降低后升高的趋势；结合蒽醌苷大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷则呈现先升高后逐渐降低的趋势，游离蒽醌与结合蒽醌呈相反的变化趋势。二苯乙烯苷类成分 *cis*-THSG 和虎杖苷在 3 种方法蒸晒/制 8 h 时含量明显升高，随后含量逐渐降低；

trans-THSG 和白藜芦醇则随着炮制时间的延长含量逐渐降低，药典法样品白藜芦醇呈现先升高后降低的趋势。黄酮类成分表儿茶素和芦丁的质量分数随着炮制时间的延长逐渐降低；金丝桃苷的质量分数则在蒸制 8 h 时升高，随着蒸制时间的延长逐渐降低，但均高于何首乌生品。

为了比较古今炮制方法所得制何首乌中成分质量分数的高低和差异，采用 SPSS 25.0 软件中将现代药典法采用的黑豆汁作为辅料连续蒸制与古法用黑豆作为辅料“九蒸九晒”相同蒸制时间样品中 12 种成分的质量分数进行两两配对 *t* 检验。结合表 3 和图 2，可以发现药典法所有时间点样品的大黄素、

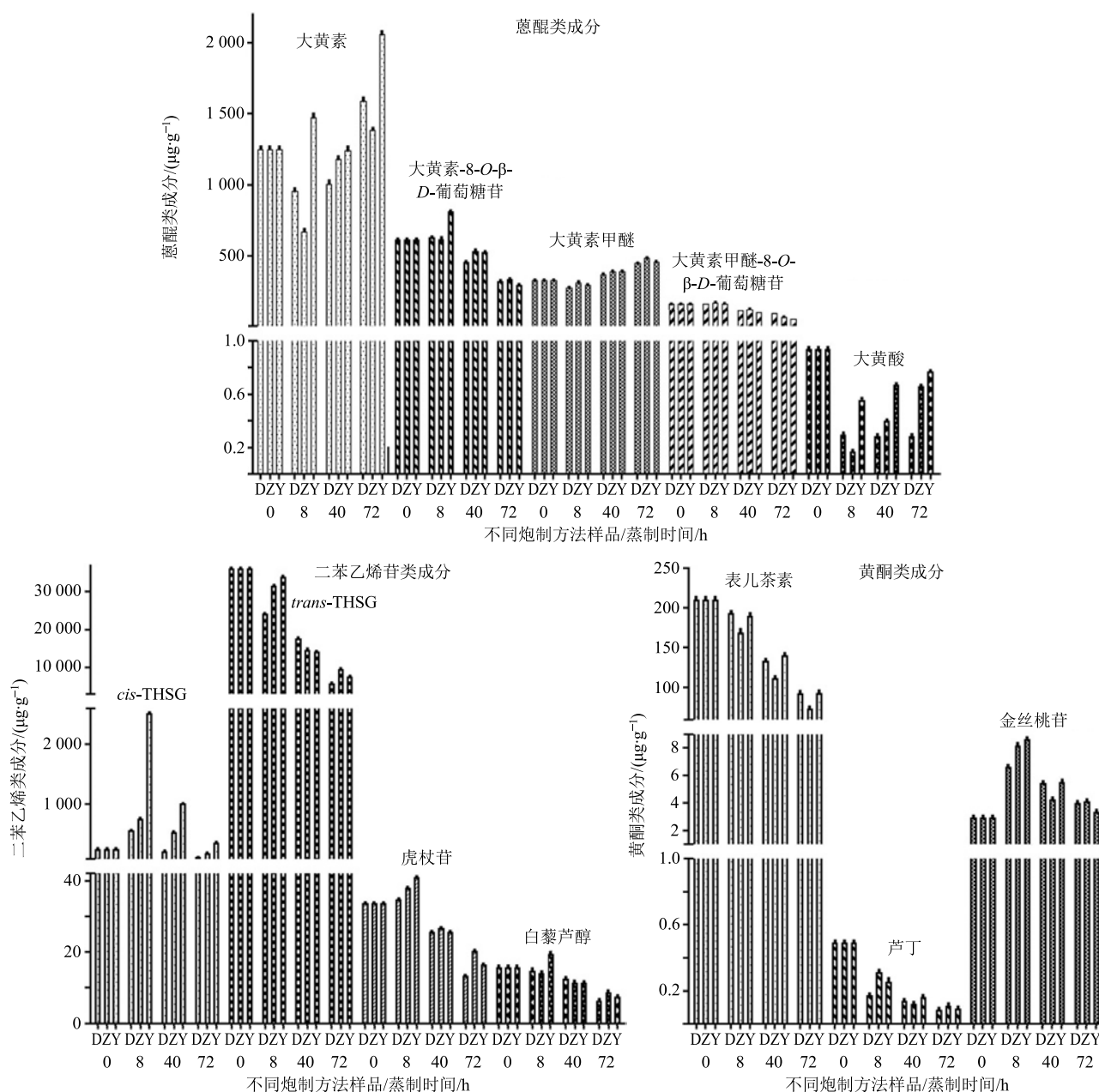


图 2 不同蒸制方法 (D-古法黑豆蒸晒品、Z-黑豆汁蒸晒品、Y-药典黑豆汁蒸品) 和蒸制时间 (0、8、40、72 h) 何首乌中 12 个成分的变化趋势

Fig. 2 Dynamic change trend of 12 components content in *Polygoni Multiflori Radix* steamed by different methods (D-samples processed by ancient method steaming with black bean and drying, Z-samples processed by method steaming with black bean decoction and drying, Y-samples processed by pharmacopoeia method continuous steaming with black bean decoction) and different time (0, 8, 40 and 72 h)

大黄酸、*cis*-THSG 均显著高于古法 ($P < 0.05$)；大黄素甲醚除蒸制 16~32 h 样品显著低于古法 ($P < 0.05$) 外，其他时间点样品均显著高于古法 ($P < 0.05$)；大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷在蒸制 8~48 h 样品均显著高于古法 ($P < 0.05$)，56~72 h 样品低于古法，但无显著差异 ($P > 0.05$)；大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷在蒸制 24~72 h 样品显著低于古法

($P < 0.05$)，8~16 h 样品显著高于古法 ($P < 0.05$)；*trans*-THSG 在蒸制 40~56 h 样品中显著低于古法 ($P < 0.05$)，其他时间点显著高于古法 ($P < 0.05$)；虎杖苷蒸制 40~56 h 样品中低于古法，无显著性差异 ($P > 0.05$)，其他时间点显著高于古法 ($P < 0.05$)；白藜芦醇在蒸制 40~64 h 低于古法，48、64 h 样品无显著性差异 ($P > 0.05$)，其他时间点样品显著高

于古法 ($P < 0.05$); 表儿茶素除 40 h 药典法样品显著高于古法外 ($P < 0.05$), 其他时间点均低于古法, 8、48~72 h 与古法无显著性差异 ($P > 0.05$); 芦丁 56~72 h 样品与古法无显著性差异 ($P > 0.05$), 其他时间点样品均显著高于古法 ($P < 0.05$), 金丝桃苷除在 40 h 样品中显著高于古法 ($P < 0.05$) 外, 其他时间点均低于古法, 8、48~72 h 与药典法无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.8 主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)

2.8.1 PCA

进一步整体考察现代的炮制方法与古法的差异, 将何首乌中 12 个成分的含量导入 SIMCA 14.1 软件进行非监督模式的 PCA, 见图 3-A, 由各个样品的位置可以发现, 何首乌生品远离其他炮制品, 说明炮制方法明显改变了何首乌中的质量; 3 种方法蒸制 8~72 h 的样品, 随着蒸制时间的延长呈相同的规律, 各个黑豆汁蒸晒品居于古法黑豆蒸晒品与药典黑豆汁蒸制品之间, 黑豆汁蒸制 8~48 h

样品与古法蒸晒品距离较近, 离药典黑豆汁蒸制品较远, 说明从一蒸一晒到六蒸六晒, 操作方法的的影响大于辅料的影响; 56~72 h 的黑豆汁蒸晒样品接近药典方法制备的样品, 说明随着蒸制时间的延长, 操作方法的的影响变小, 相同的辅料制备的样品具有一定程度的趋同性。

2.8.2 OPLS-DA

根据 PCA-X 分析结果的提示, 以 OPLS-DA 模式对 3 种不同方法和时间样品的 12 个成分含量进行分析, 其中 $R^2_X = 0.968$, $R^2_Y = 0.867$, $Q^2 = 0.617$, 表明数据模型稳定且预测能力较强, 其得分图见图 3-B。同样可以发现, 生品远离各种炮制品, 在有监督模式的 OPLS-DA 得分图中, 3 种炮制方法的样品各自聚集, 现代和古法蒸晒得到的样品有部分交叉, 黑豆汁蒸晒 56、64、72 h 的样品与药典法样品略近, 说明操作方法的的影响大于辅料的影响。分析 OPLS-DA 模型的变量权重值 (VIP), 筛选对何首乌影响显著的化学成分, 其中 $VIP > 1.0$ 的成分有 *cis*-THSG、虎杖苷、芦丁、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄素, 可以认为在该模型中造成 3 种炮制方法差异的成分主要为这 5 种成分。

3 讨论

炮制何首乌的方法有多种, 其中黑豆作为辅料的历史比较悠久, 现代人简化了古人用黑豆与何首乌交叉铺放蒸制的“九蒸九晒”法, 演变为直接拌入黑豆汁后进行蒸制, 省略了蒸后分离除去黑豆和反复蒸后晒制的步骤, 现代的工艺更利于大生产的操作, 但是简化的工艺是否会对药效物质基础产生影响? 本实验建立了 UPLC-QqQ-MS/MS 同时测定何首乌中蒽醌、二苯乙烯苷和黄酮类成分的分析方法, 对采用黑豆和黑豆汁作为辅料, 蒸晒或连续蒸的不同操作方法所得制何首乌的药效成分进行了测定。分析发现, 在高温和高湿的蒸制过程中, 现代药典法和古法炮制所得制何首乌的成分处于动态变化中, 成分的变化趋势是一致的, 但成分的含量具有明显差异; 制何首乌的质量与蒸制用的辅料、操作方法和炮制时间密切相关, 黑豆和黑豆汁蒸晒 8~48 h 的样品之间具有一定的相似度, 与药典黑豆汁连续蒸制法所得样品的质量相比, 具有明显差异, 体现了蒸后晒制与连续蒸制的不同操作方法对何首乌质量的影响大于辅料黑豆与黑豆汁的影响; 古今两种方法所得样品中成分的质量分数在炮制较短时间 8~40 h 出现无规律的高低差异, 大多数成分在药典法所得样品中的含量较高, 炮制时间高于 48 h

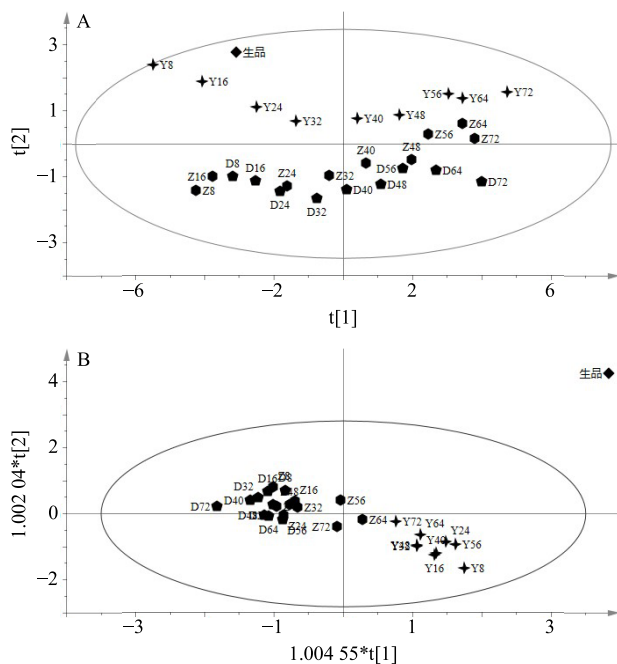


图 3 不同蒸制方法 (D-古法黑豆蒸晒品、Z-黑豆汁蒸晒品、Y-药典黑豆汁蒸品) 所得制何首乌的 PCA-X (A) 和 OPLS-DA (B) 得分图

Fig. 3 PCA (A) and OPLS-DA (B) score plot of raw and different processed *Polygoni Multiflori Radix* (D-samples processed by ancient method steaming with black bean and drying, Z-samples processed by method steaming with black bean decoction and drying, Y-samples processed by pharmacopoeia method continuous steaming with black bean decoction)

或56 h后,药典法所得样品中成分低于或与古法所得样品相近,提示保证足够的炮制时间,现代方法与古法所制何首乌的质量差距会缩小,本研究结果与将“六蒸六晒作为何首乌九蒸九晒法的炮制终点”的报道具有一定的相似性^[10]。

古今2种不同炮制方法会造成制何首乌的质量存在差异,OPLS-DA证明不同的炮制方法对 *cis*-THSG、虎杖苷、芦丁、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷和大黄素的影响较大,其原因是因为古法蒸制一定时间后再晒,内在成分间的转变程度与药典法的连续加热蒸制肯定是不一样的,特别是苷类成分和对热、光敏感的成分;另外古法黑豆蒸晒时,黑豆从生品至熟品与何首乌在蒸制过程中互相影响,与药典法直接拌入黑豆汁相比,何首乌吸收黑豆成分的程度会有差异。

本研究测定的3类成分为何首乌中的主要有效成分。蒽醌类成分具有抗氧化、调血脂、抗动脉粥样硬化、抗炎、脑损伤保护、防止肾纤维化、保肝利胆^[12]、抗血小板凝集^[12]等药理作用;结合蒽醌具有泻下作用^[13],炮制后将转化为游离型蒽醌,游离蒽醌有诱导癌细胞凋亡、逆转肿瘤多药耐药性、抑制金黄色葡萄球菌生长等药理活性^[14-15]。二苯乙烯苷具有抗衰老、抗动脉粥样硬化、调血脂、保肝、抗炎^[11,16]、抗氧化^[17]等药理活性;*cis*-THSG在体内生物利用度与 *trans*-THSG 相比较^[18],调血脂作用优于 *trans*-THSG^[19]。黄酮类成分表儿茶素、芦丁和金丝桃苷均具有抗氧化作用^[17],表儿茶素还具有调节免疫、抗肿瘤等功能^[20],芦丁和金丝桃苷能够保护肝肾功能^[21-22]。该3类成分分别与润肠燥、补肝肾、强筋骨和解毒截疟的功效相关联^[23],也是毒性的物质基础。大黄素^[24-27]、大黄素甲醚^[24,26-28]、大黄酸^[24-27]、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷^[26-28]、大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷^[9]、*cis*-THSG^[26,28]、*trans*-THSG^[26,28]和儿茶素^[26,28]对人肝祖细胞 Hepa RG 或对人肝 L02 细胞有体外细胞毒作用,或影响大鼠原代肝微组织的增殖^[27],二苯乙烯苷是何首乌中毒性最大的化学成分^[29]。蒽醌类大黄素和大黄素甲醚总量、*trans*-THSG 为《中国药典》2020年版何首乌的质量控制指标^[1]。所以,12个检测成分包涵了何首乌中的主要有效成分和毒性成分。研究发现,在蒸制过程中,何首乌中游离蒽醌的质量分数出现先降低后升高,而结合蒽醌苷则出现先升高后降低的趋势,与在加热过程中结合态转化为游离态有关系;

二苯乙烯苷类成分 *cis*-THSG 出现先升高后降低的变化趋势,暴露于热和光条件下的 *trans*-THSG 时很容易异构化为 *cis*-THSG^[33],故蒸制第1个蒸制周期8 h时 *cis*-THSG 含量增加,但 *cis*-THSG 和 *trans*-THSG 都容易水解,所以出现含量持续下降的变化趋势;各个炮制品种金丝桃苷的含量均高于何首乌生品。

古人归纳的何首乌“生用则流利,制用则固补”的功效描述,体现了炮制对其疗效的影响。药效成分的差异决定着药物的有效与安全。蒸制时间40~56 h的现代药典黑豆汁连续蒸制品中大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、*cis*-THSG、芦丁的含量高于古法黑豆蒸晒品,而大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、*trans*-THSG、虎杖苷、白藜芦醇、表儿茶素和金丝桃苷的含量则低于古法黑豆蒸晒品。结合成分含量的高低和成分的药理作用,从有效性和安全性推测,药典法所制得的制何首乌在补益作用方面略胜,但从 *cis*-THSG 是何首乌特异性肝损伤的重要易感物质^[34-35],其肝毒性大于 *trans*-THSG^[36],*cis*-THSG 和 *trans*-THSG 能免疫协同产生特异质肝毒性^[37]的角度分析,毒性也会略大于古法制何首乌。本研究根据古今炮制方法所得制何首乌成分的差异进行了初步推测,何首乌作为一个成分复杂的体系,古今2种炮制方法孰优孰劣,2种方法得到的制何首乌是否等效,需要从不同的药效作用和毒理方面进行深入细致综合研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S].一部.2020.
- [2] 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.
- [3] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 第4版. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [4] 李晓菲, 李娜, 涂灿, 等. 基于内毒素特异质模型的首乌与制首乌肝毒性比较研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(10): 1481-1486.
- [5] 马致洁, 李晓菲, 吕旸, 等. 基于肝细胞毒价检测的首乌炮制工艺比较研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(12): 2325-2329.
- [6] Xia X H, Yuan Y Y, Liu M. The assessment of the chronic hepatotoxicity induced by *Polygoni Multiflori Radix* in rats: A pilot study by using untargeted metabolomics method [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 203: 182-190.

- [7] 马宁辉, 陈 依, 许陈思涵, 等. 何首乌相关肝损伤研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(15): 3594-3602.
- [8] 明·李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [9] 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.
- [10] 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): 5151-5158.
- [11] 王靖越, 张语凡, 柴冲冲, 等. 何首乌饮片的颜色与蒽醌类和二苯乙烯苷含量的相关性研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(4): 635-640.
- [12] 何 琴, 涂 灿, 王伽伯, 等. 基于谱效相关的何首乌抗血小板聚集药效物质研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9): 1679-1684.
- [13] 曲 毅, 王伽伯, 李会芳, 等. 蒽醌类中药的致泻强度与化学含量相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 806-808.
- [14] Li W Y, Ng Y F, Zhang H, *et al.* Emodin elicits cytotoxicity in human lung adenocarcinoma A549 cells through inducing apoptosis [J]. *Inflammopharmacology*, 2014, 22(2): 127-134.
- [15] 夏启松, 孙仁宇, 修瑞娟. 大黄素抗肿瘤分子机制的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(1): 85-88.
- [16] Tong Y, Wang K, Sheng S, *et al.* Polydatin ameliorates chemotherapy-induced cognitive impairment (chemobrain) by inhibiting oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis in rats [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(6): 1201-1210.
- [17] Liu M Z, Li X J, Liu Q, *et al.* Preparative isolation and purification of 12 main antioxidants from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. using high-speed countercurrent chromatography and preparative HPLC guided by 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl-HPLC [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(8): 1415-1422.
- [18] 董立华, 郭盼盼, 闫文英, 等. 顺、反式二苯乙烯苷在小鼠体内药动学及组织分布的对比研究 [J]. 中药材, 2014, 37(9): 1627-1632.
- [19] 董立华, 郭盼盼, 闫文英, 等. 顺式二苯乙烯苷与反式二苯乙烯苷降血脂作用的对比 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(12): 989-993.
- [20] 童观珍, 付晓萍, 杨 艳, 等. 表儿茶素的分布及药理活性研究进展 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2018, 33(2): 343-349.
- [21] Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 305-312.
- [22] Liu B, Tu Y, He W, *et al.* Hyperoside attenuates renal aging and injury induced by D-galactose via inhibiting AMPK-ULK1 signaling-mediated autophagy [J]. *Aging* (Albany NY), 2018, 10(12): 4197-4212.
- [23] 冯紫薇, 张 媛, 孟 磊, 等. 定向加工对何首乌药材质量的影响研究 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(5): 741-746.
- [24] 王呈谕, 刘晓璇, 李轶群, 等. 何首乌、虎杖、大黄水提物中游离蒽醌含量的测定及对入正常肝细胞的毒性作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2020, 32(3): 215-220.
- [25] 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.
- [26] 刘亚蕾, 郜 丹, 李晓菲, 等. 不同辅料对何首乌炮制减毒效果对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 330-337.
- [27] 汪 祺, 张茜蕙, 文海若, 等. 基于肝微组织考察何首乌主要单体潜在肝毒性 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2954-2959.
- [28] 郜 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.
- [29] 林 艳, 肖 榕, 尹林子, 等. 基于粗糙集理论构建“谱毒”关系研究何首乌特异质肝毒性物质基础 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 509-517.
- [30] 赵 琴, 黄惠红, 汪颖舒, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析不同黑豆汁蒸制方法对何首乌中成分的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(8): 2211-2217.
- [31] Liang L, Xu J, Zhou W W, *et al.* Integrating targeted and untargeted metabolomics to investigate the processing chemistry of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 934.
- [32] Meng Y K, Li C Y, Li R Y, *et al.* Cis-stilbene glucoside in *Polygonum multiflorum* induces immunological idiosyncratic hepatotoxicity in LPS-treated rats by suppressing PPAR- γ [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(10): 1340-1352.
- [33] Li C Y, Niu M, Bai Z F, *et al.* Screening for main components associated with the idiosyncratic hepatotoxicity of a tonic herb, *Polygonum multiorum* [J]. *Front Med*, 2017, 11(2): 1-13.
- [34] 李婷婷, 李瑞红, 刘振兴, 等. 基于类器官 3D 培养的何首乌易感物质肝毒性评价 [J]. 药学报, 2017, 52(7): 1048-1054.
- [35] He L Z, Yin P, Meng Y K, *et al.* Immunological synergistic mechanisms of trans-/cis-stilbene glycosides in Heshouwu-related idiosyncratic liver injury [J]. *Sci Bull*, 2017, 62(11): 748-751.