

基于建立成分活性权重函数的当归酒炙工艺评价研究

王莹¹, 孙嘉辰², 李霞³, 高文远^{3,4*}

1. 太原科技大学化学与生物工程学院, 山西 太原 030024

2. 天津商业大学, 天津 300134

3. 天津大学 天津市现代药物传递及功能高效化实验室, 天津 300072

4. 青海民族大学药学院, 青海 西宁 810007

摘要:目的 考察文火 120 °C 和中火 150 °C 酒炙当归的过程中成分与凝血酶抑制活性随时间的变化规律, 建立成分与活性的权重函数, 确定最佳酒炙工艺。方法 采用 HPLC 对样品中阿魏酸、5-羟甲基糠醛、对香豆酸、Z-藜本内酯、咖啡酸、绿原酸、山柰酚、香草醛、原儿茶酸、香草酸、茴香醛 11 种成分进行定量分析, 采用凝血酶抑制活性测定样品的活血活性, 决定系数 (R^2) 表示单体化合物的贡献率。结果 在炮制 12~28 min 的过程中, 阿魏酸、绿原酸、香草醛、5-羟甲基糠醛和藜本内酯的含量均先增加后降低, 其他 6 种成分的含量没有明显的变化趋势。120 °C 制备的酒当归属凝血酶抑制活性高于 150 °C 制备的样品, 藜本内酯的贡献率最高 ($R^2=0.643 2$), 其次为阿魏酸。成分群和凝血酶抑制活性的权重函数为 $W_s=2.635 C_1+107.200 C_4-40.850 C_{11}$ 。结论 确定了 120 °C 炮制 20 min 为最佳炮制工艺, 验证了传统炮制中采用文火炮制的科学性, 建立了一种能够通过简单测试初步评估当归及其炮制品整体质量的方法。

关键词: 当归; 酒炙; 凝血酶抑制活性; 权重函数; 活血活性; 阿魏酸; 5-羟甲基糠醛; 对香豆酸; Z-藜本内酯; 咖啡酸; 绿原酸; 山柰酚; 香草醛; 原儿茶酸; 香草酸; 茴香醛

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)10-3014-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.011

Quantitative evaluation of *Angelicae Sinensis Radix* processed with yellow wine based on composition-activity weight function method

WANG Ying¹, SUN Jia-chen², LI Xia³, GAO Wen-yuan^{3,4}

1. School of Chemical and Biological Engineering, Taiyuan University of Science and Technology, Taiyuan 030024, China

2. Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China

3. Tianjin Key Laboratory for Modern Drug Delivery and High-Efficiency, Tianjin University, Tianjin 300072, China

4. College of Pharmacy, Qinghai Minzu University, Xining 810007, China

Abstract: Objective To investigate the changes of ingredients and thrombin inhibitory activity in the process of wine-roasting Danggui (*Angelica sinensis*) at 120 °C and 150 °C. The weight function of the ingredients and the activity was established, as well as the best roasting process was determined. **Methods** Quantitative analysis of 11 components in samples, including ferulic acid, 5-hydroxymethylfurfural, *p*-coumaric acid, Z-ligustilide, caffeic acid, chlorogenic acid, kaempferol, vanillin, protocatechuic acid, vanillic acid, and anisaldehyde, was carried out by HPLC. Thrombin inhibitory activity was used to evaluate the bioactivity of the samples. The values of determination coefficient (R^2) represented the contribution rate of compounds. **Results** During the processing of 12–28 min, the contents of ferulic acid, chlorogenic acid, vanillin, 5-hydroxymethylfurfural and Z-ligustilide increased first and then decreased, and the others had no obvious trend. Thrombin inhibitory activity of *A. sinensis* wine-roasted at 120 °C was higher than that of the sample roasted at 150 °C. The contribution rate of Z-ligustilide was the highest ($R^2=0.643 2$), followed by ferulic acid. The

收稿日期: 2021-11-24

基金项目: 天津市科技计划项目 (19YFZSY00170); 青海省科技计划项目 (2021-SF-150); 来晋工作优秀博士奖励基金 (20212018); 太原科技大学科研启动基金 (20202067); 山西省高等学校科技创新项目 (2021L337)

作者简介: 王莹 (1988—), 女, 博士, 研究方向为中药炮制。Tel: 17835114050 E-mail: wangyingwangxing11@163.com

*通信作者: 李霞, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制、中药化学研究。Tel: (022)87401895 E-mail: lixia2008@tju.edu.cn

高文远, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源、中药炮制、中药化学研究。Tel: (022)87401895 E-mail: pharmgao@tju.edu.cn

weight function of compounds and thrombin inhibitory activity was shown as $W_s = 2.635 C_1 + 107.200 C_4 - 40.850 C_{11}$. **Conclusion** The best processing technology was wine-roasted for 20 min at 120 °C, which verified the scientific of processing with gentle fire in the traditional method. This study established a simple method to evaluate the quality of *A. sinensis* and its processed products in the first-level test.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; stir-frying with yellow wine; thrombin inhibitory activity; weighting function; blood activating activity; ferulic acid; 5-hydroxymethylfurfural; *p*-coumaric acid; *Z*-ligustilide; caffeic acid; chlorogenic acid; kaempferol; vanillin; protocatechuic acid; vanillic acid; anisaldehyde

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 具有补血活血的功效, 可用于调经止痛, 广泛应用于中药配伍^[1]。酒当归的活血作用增强, 作为当归的主要炮制品被历版《中国药典》收录。酒当归的品质与其炮制温度及炮制时间息息相关, 在传统炮制理论中, 将炮制分为文火 (80~120 °C)、中火 (120~150 °C) 和武火 (220 °C)^[2]。当归中挥发性成分含量较高, 《中国药典》及各省饮片炮制标准中酒当归均采用文火炮制。中药饮片多成分、多靶点的特征使其质量标准难以参考化学药的标准建立, 即仅通过一种有效成分难以实现质量标准与生物效价的统一。中药饮片多成分之间的互相影响也导致了量效关系的复杂性^[3]。因此, 选择中药饮片的活性成分群, 开展活性成分-药效的综合评价, 才能更好地评价中药饮片的生物有效性。

目前, 酒炙工艺的关键参数仍缺乏数据化, 采用文火炮制的科学性没有得到证实, 同时缺乏成分-药效集于一体的质量评价。因此, 本实验主要考察酒当归在文火 120 °C 和中火 150 °C 炮制时成分及凝血酶抑制作用随炮制时间的变化, 建立成分-药效的权重函数, 阐明炮制机制, 为建立科学的质量评价标准奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 HPLC/6310 MS 高效液相色谱-质谱联用, 美国安捷伦科技公司; HPLC-PAD, 岛津 LC-2030C 3D 系统控制器; Sunrise 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; RE-200A 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; CP225D 型十万分之一电子分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; SN2105T 型电磁炉, 美的集团有限公司; KQ-500E 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; H1650 型离心机, 湖南湘仪有限公司; ZNHW 型智能恒温数显电热套, 上海弘懿仪器设备有限公司。

1.2 材料

对照品葡萄糖 (批号 110833-201205)、没食子

酸 (批号 110831-201204)、藁本内酯 (批号 111737-201305)、阿魏酸 (批号 110773-201614)、绿原酸 (批号 110753-201415)、咖啡酸 (批号 110885-200102)、香草酸 (批号 110776-200402)、香草醛 (批号 100491-201902)、原儿茶酸 (批号 110809-201205)、对香豆酸 (批号 140711-200702)、山柰酚 (批号 110861-201310)、茴香醛 (批号 100147-200302)、5-羟甲基糠醛 (5-HMF, 批号 111626-201308), 质量分数均 ≥ 98%, 购自中国食品药品检定研究院。甲醇、磷酸、冰醋酸、浓硫酸、苯酚、Na₂CO₃ 购自天津江天有限公司; 色谱乙腈购自天津康科德公司; 人原凝血酶、发光底物 S-2238、福林酚购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 黄酒购自浙江塔牌绍兴酒业有限公司。

当归饮片, 批号 YN-1-1, 购自甘肃天士力中天饮片厂, 经天津大学生药学科苏艳芳教授鉴定为伞形科当归属植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels 新鲜根茎的炮制加工品, 经检测符合《中国药典》2020 年版质量要求。

2 方法与结果

2.1 酒当归样品的制备

取当归饮片 2 份 (各 1000 g), 各喷洒黄酒 100 g 并拌匀, 闷润 1 h^[4]。置于炒药锅中, 温度分别设置为 120 °C 和 150 °C, 预热后炒制, 在炮制 12~28 min 时每 2 min 取出约 30 g 样品, 置晾药盘内放凉。每个样品平行制备 3 份, 粉碎机分别粉碎后, 过 60 目筛, 常温保存, 备用。

2.2 总酚酸含量的测定

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末 0.1 g, 加入 5 mL 70% 甲醇, 超声提取 30 min, 放冷, 离心, 残渣再加入 5 mL 70% 甲醇, 超声提取 30 min, 放冷, 离心后合并上清液。上清液用 70% 甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀后 4 °C 保存, 用于总酚和 11 种单体化合物的测定。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定没食子酸对照品适量, 加 70% 甲醇超声溶解, 配制质量浓度为 0.4 mg/mL 的溶液, 分别精密量取 0、0.1、0.2、0.3、

0.4、0.5、0.6、0.7 mL 置于 1 mL 量瓶中并用 70% 甲醇定容，摇匀备用。

2.2.3 测定方法 参考 Chen 等^[4]建立的方法进行总酚含量的测定。取对照品溶液（50 μL ）和 Folin-Ciocalteu 试剂（15 μL ）混匀，3 min 后加入 Na_2CO_3 溶液（10%，75 μL ）和蒸馏水（100 μL ）混匀后静置 20 min，于 765 nm 处测定吸光度（ A ）值。70% 甲醇溶液作为空白对照。以没食子酸对照品质量浓度为横坐标（ x ）， A 值为纵坐标（ y ）绘制标准曲线，得回归方程为 $y=0.0423x+0.0687$ ， $R^2=0.9967$ 。样品测试方法同上，结果以没食子酸当量表示。制备的酒当归样品中总酚含量多高于当归。在炮制温度为 120 $^{\circ}\text{C}$ 和 150 $^{\circ}\text{C}$ 时，总酚含量均随炮制时间的增加先升高后降低，分别在炮制 22 min 和 24 min 时含量最高，如图 1-a 所示。

2.3 总多糖含量的测定

2.3.1 供试品溶液的制备 准确称取样品粉末 0.5 g，置圆底烧瓶中，加蒸馏水 20 mL，加热回流 1 h 并滤过，如上操作重复提取 1 次，合并 2 次滤液置于 50 mL 量瓶中，并用蒸馏水定容，摇匀备用。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥后的葡萄糖对照品 10 mg，加蒸馏水溶解并定容到 100 mL 量瓶中。摇匀后分别精密量取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 置于 1 mL 量瓶中，加蒸馏水定容，摇

匀，备用。

2.3.3 测定方法 供试品溶液稀释 100 倍后按照苯酚-硫酸法进行总多糖含量的测定^[4]，用蒸馏水配制 6% 苯酚溶液。取葡萄糖对照品溶液 20 μL ，6% 苯酚溶液 20 μL 和浓硫酸 100 μL 混匀后在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 10 min，冷却后于 490 nm 处测定 A 值，蒸馏水作为空白对照，以葡萄糖对照品质量浓度为横坐标（ x ）， A 值为纵坐标（ y ），绘制标准曲线，得回归方程为 $y=0.0059x+0.0247$ ， $R^2=0.9988$ ，样品总多糖含量按回归方程计算。当归酒炙过程中总多糖含量的变化趋势如图 1-b 所示。炮制温度为 120 $^{\circ}\text{C}$ 和 150 $^{\circ}\text{C}$ 时，酒当归中总多糖含量均随炮制时间的增加先升高后降低，在炮制 18 min 时含量最高，炮制时间超过 24 min 时含量低于当归样品。

2.4 化合物的定性和定量测定

2.4.1 化合物的定性分析 采用 Agilent 1200 HPLC/6310 MS 高效液相色谱-质谱联用仪结合文献报道对“2.2.1”项中制备的当归 70% 甲醇提取物定性分析，质谱为电喷雾离子源，分别在正离子（3.0 kV）和负离子（-2.5 kV）模式下扫描；喷雾气压 0.20 MPa，样品锥孔电压 30 V，毛细管电压 4.0 kV，离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$ ，干燥气温度 300 $^{\circ}\text{C}$ ，质量范围 m/z 100~1000，梯度洗脱条件与 HPLC 相同。通过 LC-MS 结合文献报道^[5-7]对当归中化学成分进行定性分析，总离子流图如图 2-a、b 所示，分析结果如表 1、2 所示。LC-MS 正离子模式大致推断出 19 个化合物可能的结构信息，主要为挥发油类；负离子模式大致推断出 19 个化合物可能的结构信息，主要为酚酸类；阿魏酸在正、负离子模式下均出峰。

2.4.2 11 种单体化学成分的定量分析

(1) 供试品溶液的制备：为“2.2.1”项中制备的 70% 甲醇提取物。

(2) 对照品溶液的制备：取 11 种对照品适量，精密称定，分别置于棕色量瓶中，加 70% 甲醇制成藁本内酯、阿魏酸、绿原酸、咖啡酸、香草酸、香草醛、原儿茶酸、对香豆酸、山柰酚、茴香醛、5-羟甲基糠醛质量浓度分别为 0.167、0.235、0.286、0.342、0.333、0.165、0.146、0.299、0.370、0.166、0.260 mg/mL 的溶液，保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，备用。

(3) 测定方法：按照陈健等^[8]建立的方法进行定量分析。采用岛津 LC-2030C 3D 系统，配备 Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱（250 mm \times 4.6 mm，5 μm ）；0.1% 甲酸水溶液-乙腈作为流动相，梯度洗脱：0~

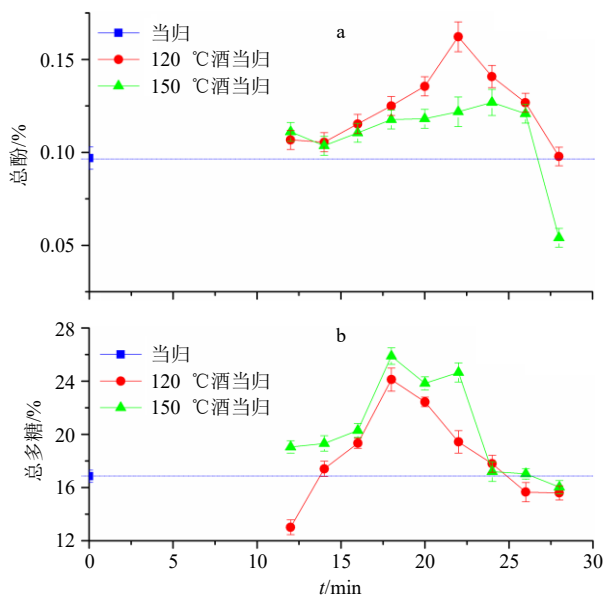


图 1 120 $^{\circ}\text{C}$ 和 150 $^{\circ}\text{C}$ 当归酒炙过程中总酚 (a) 和总多糖 (b) 含量的变化

Fig. 1 Changes of total phenols (a) and total polysaccharides (b) during *A. sinensis* processing with wine at 120 $^{\circ}\text{C}$ and 150 $^{\circ}\text{C}$

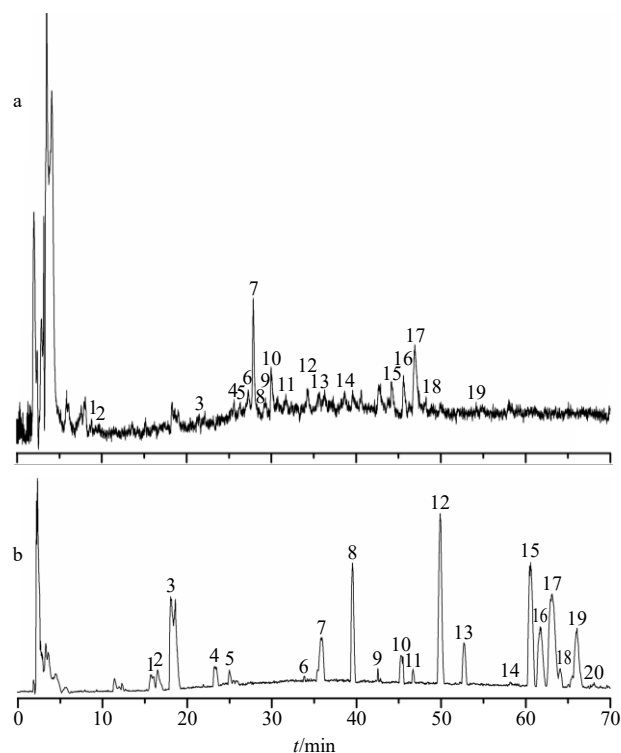


图 2 当归 70% 甲醇提取物负离子 (a) 和正离子 (b) 模式下的总离子流图

Fig. 2 TIC of 70% methanol extract from *A. sinensis* in negative (a) and positive (b) ESI modes

表 1 MS/MS 负离子模式鉴定当归中化学成分

Table 1 MS/MS data from (-) ESI-MS for identification of compounds of *A. sinensis*

峰号	化合物名称	分子式	t/min	[M-H] ⁻ (m/z)	文献
1	丁二酸	C ₄ H ₆ O ₄	8.97	117	5
2	对甲氧基苯甲酸	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	9.64	151	5
3	原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	20.75	165	5
4	阿魏酸己糖苷	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	26.33	355	6
5	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	26.92	353	6
6	阿魏酸松柏酯	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	27.31	193	5
7	对羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	27.66	137	6
8	邻苯二甲酸	C ₈ H ₆ O ₄	29.27	165	6
9	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	29.96	167	5
10	烟酸	C ₆ H ₅ NO ₂	30.74	122	5
11	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	31.01	178	5
12	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	34.32	255	5
13	对香豆酸	C ₉ H ₈ O ₃	37.19	163	5
14	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	39.77	193	5
15	3,5-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	44.52	515	7
16	3,4-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	46.51	515	7
17	迷迭香酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	47.87	356	5
18	亚叶酸	C ₂₀ H ₂₃ N ₇ O ₇	48.76	472	5
19	1,5-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	59.14	515	7

表 2 MS/MS 正离子模式鉴定当归中化学成分

Table 2 MS/MS data from (+) ESI-MS for identification of volatile oil compounds of *A. sinensis*

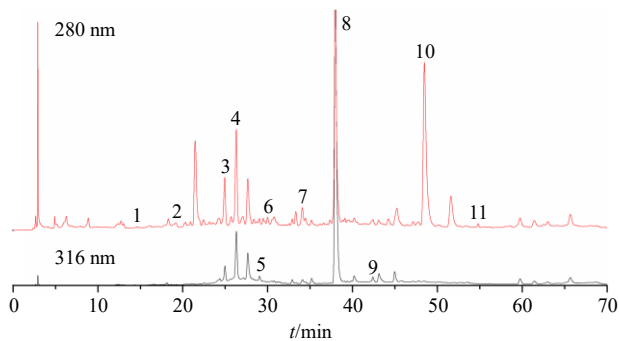
峰号	化合物名称	分子式	t/min	MS/MS (m/z)	文献
1	5-羟甲基糠醛	C ₆ H ₆ O ₃	16.20	127 [M+H] ⁺	5
2	2-(1-氧戊基)-苯甲酸甲酯	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	16.53	221 [M+H] ⁺ , 189 [M+H-OCH ₃] ⁺	7
3	色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	18.61	205 [M+H] ⁺ , 188 [M+H-H ₂ O] ⁺	6
4	Z-藁本内酯二聚体	C ₂₅ H ₁₆ O ₄	25.33	381 [M+H] ⁺ , 191 [M+H-C ₁₂ H ₁₄ O ₂] ⁺	7
5	阿魏酸松柏酯	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	27.31	379 [M+Na] ⁺	7
6	5-O-阿魏酰奎宁酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	34.64	369 [M+H] ⁺	7
7	Z,Z'-6,8',7,3'-双藁本内酯	C ₂₅ H ₁₆ O ₄	36.19	381 [M+H] ⁺ , 191 [M+H-C ₁₂ H ₁₄ O ₂] ⁺	7
8	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	39.57	195 [M+H] ⁺	7
9	3-丁烯基-7-羟基四氯苯酐	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	43.03	205 [M+H] ⁺	7
10	E-藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	45.94	191 [M+H] ⁺	7
11	Z-丁烯基苯酐	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	47.35	189 [M+H] ⁺	7
12	Z-藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	49.51	191 [M+H] ⁺	7
13	洋川芎内酯 I	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	53.08	225 [M+H] ⁺ , 207 [M+H-H ₂ O] ⁺	7
14	Z-6-羟基-7-甲氧基二氢藁本内酯	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	58.20	239 [M+H] ⁺	7
15	洋川芎内酯 H	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	61.05	225 [M+H] ⁺ , 207 [M+H-H ₂ O] ⁺	7
16	洋川芎内酯 A	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	62.02	215 [M+Na] ⁺	7
17	洋川芎内酯 F	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	63.07	189 [M+H-H ₂ O] ⁺	7
18	Z-6,7-环氧藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	64.54	207 [M+H] ⁺	7
19	Z,Z'-3,3',8,8'-双藁本内酯	C ₂₅ H ₁₆ O ₄	66.53	381 [M+H] ⁺	7
20	丁基苯酐	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	68.03	191 [M+H] ⁺	7

10 min, 3%乙腈; 10~20 min, 3%~10%乙腈; 20~35 min, 10%~20%乙腈; 35~70 min, 20%~30%乙腈; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 在 280、316 nm 波长处同时检测。

当归样品在波长为 280、316 nm 时的 HPLC 图谱如图 3 所示。采用外标法对其中的 11 种化学成分进行定量分析。文火和中火 2 个炮制温度下, 阿魏酸、绿原酸、香草醛、5-HMF 和 藜本内酯的含量均先增加后降低, 如图 4-a、b 所示。对香豆酸、咖啡酸、山柰酚、香草酸、原儿茶酸、茴香醛 6 种成分在 120、150 °C 炮制过程中含量没有很明显的变化趋势, 如图 4-c、d 所示。

2.5 凝血酶抑制活性的测定

2.5.1 供试品溶液的制备 精密量取“2.2.1”项中制备的 70% 甲醇提取液 5 mL, 置于 50 °C 旋蒸蒸干



1-5-羟甲基糠醛 2-原儿茶酸 3-茴香醛 4-绿原酸 5-香草酸
6-咖啡酸 7-对香豆酸 8-阿魏酸 9-山柰酚 10-Z-藜本内酯
11-香草醛
1-5-HMF 2-protocatechuic acid 3-anisaldehyde 4-chlorogenic acid
5-vanillic acid 6-caffeic acid 7-p-coumaric acid 8-ferulic acid
9-kaempferol 10-Z-ligustilide 11-vanillin

图 3 当归 70% 甲醇提取物 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC of 70% methanol extract from *A. sinensis*

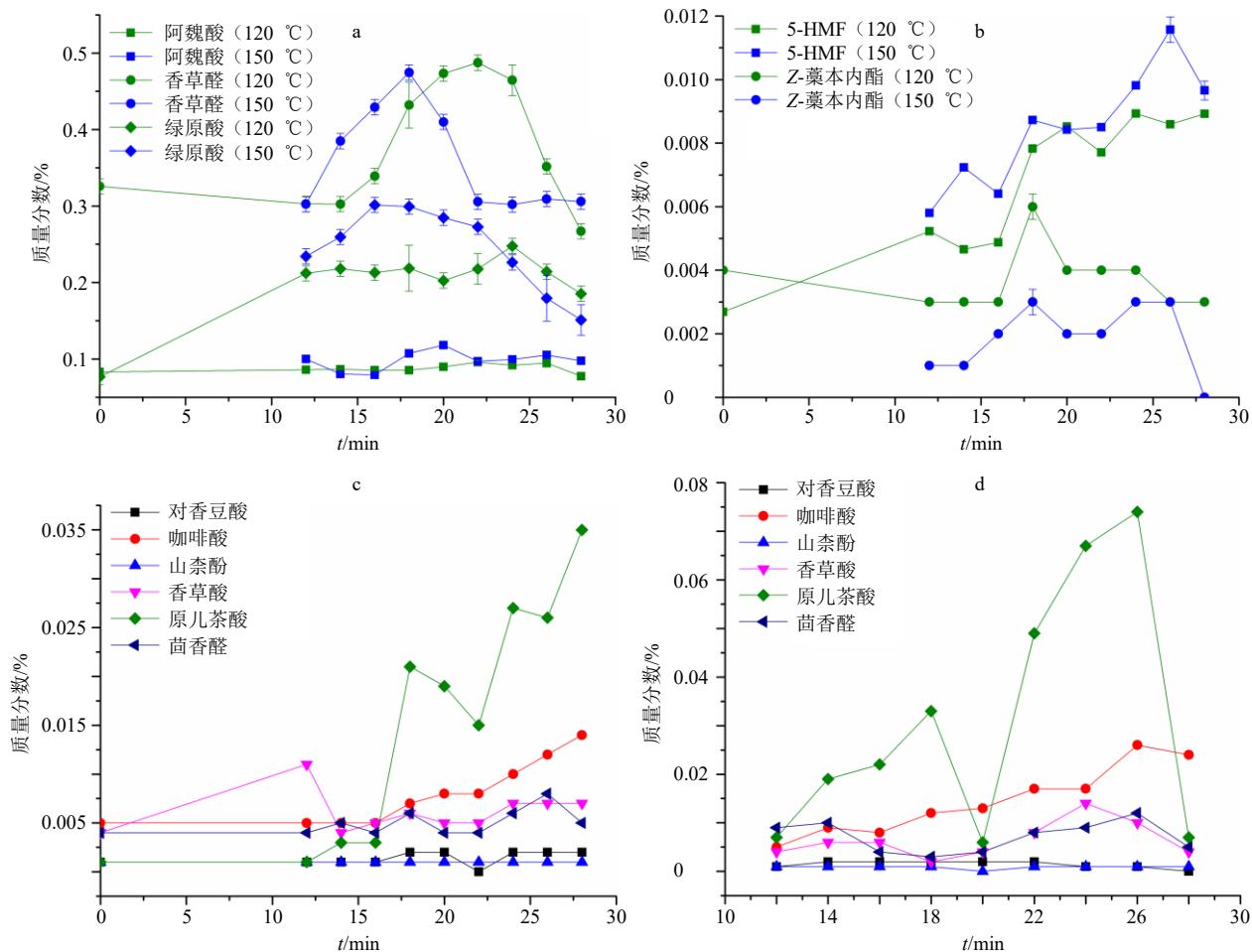


图 4 阿魏酸、香草醛、绿原酸 (a) 及 5-HMF、Z-藜本内酯 (b) 在炮制过程中含量的变化以及对香豆酸、咖啡酸、山柰酚、香草酸、原儿茶酸、茴香醛在 120 °C (c) 和 150 °C (d) 炮制过程中含量的变化

Fig. 4 Content changes of ferulic acid, vanillin, chlorogenic acid (a), 5-HMF, Z-ligustilide (b), and cumaric acid, caffeic acid, kaempferol, vanillic acid, protocatechuic acid, anisaldehyde at 120 °C (c) and 150 °C (d) during *A. sinensis* processing with wine

后,准确量取 50 μL DMSO 溶解置于 5 mL 量瓶中,加入蒸馏水清洗并定容,摇匀后备用。

2.5.2 测定方法 按照 Chuang 等^[9]建立的方法,用 0.9% NaCl 水溶液配制凝血酶 (1 mg/mL) 及发光底物 S-2238 (10 mg/mL),样品倍数稀释 6 个质量浓度。分别精确量取各质量浓度样品溶液 150 μL 和凝血酶溶液 30 μL 加入 96 孔板中混匀。于 25 °C 水浴中孵育 10 min 后加入 75 μL S-2238 溶液,继续孵育 10 min,于 405 nm 处测定其 A 值。0.9% NaCl 代替酶溶液作空白对照,抑制活性按公式 (1) 计算。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{空白}} \quad (1)$$

$A_{\text{空白}}$ 为空白对照溶液的 A 值, $A_{\text{样品}}$ 为当归提取物的 A 值

凝血酶抑制活性以 pIC_{50} [$\text{pIC}_{50} = -\lg(\text{IC}_{50} \times 0.001)$], IC_{50} 值为抑制率达到 50% 时,化合物的质量浓度] 值来表示,结果如图 5 所示。当归的 pIC_{50} 值为 1.585,随炮制时间的延长,酒当归的 pIC_{50} 值均先增加后减少,分别在炮制 18 min 和 20 min 时 pIC_{50} 值最高。

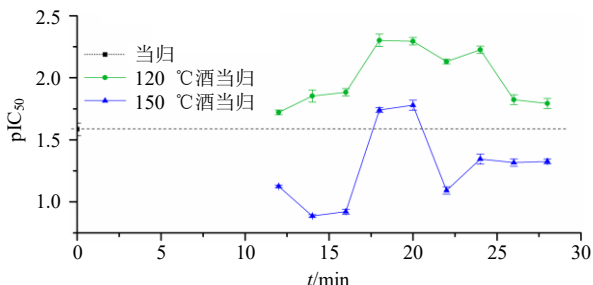


图 5 当归及 120、150 °C 炒制过程中酒当归的凝血酶抑制活性

Fig. 5 Changes of thrombin inhibiting activities of *A. sinensis* processed with wine at 120 °C and 150 °C

2.6 综合评价模型的建立

按照 Chen 等^[10]建立的方法,以 pIC_{50} 值最大的样品作为阳性对照,通过 R^2 , 及其他样品中各化合物浓度与阳性对照样品中该化合物质量浓度的比值计算得到权重 (W_s)。以 pIC_{50} 值为横坐标, W_s 为纵坐标作图得到线性回归方程,样品中各成分的权重系数及加权方程如公式 (2) 所示。

$$W_s = \sum_{i=1}^n R^2 \times \frac{C_i}{C_s} = a \times \text{pIC}_{50} + b \quad (2)$$

R^2 为权重系数,即单体化合物和凝血酶抑制活性的决定系数; C_i 为各化合物质量浓度; C_s 为凝血酶抑制活性最强的样品中各化合物质量浓度; n 为化合物的个数

采用相关系数检验法对表 3 中化合物质量浓度与 pIC_{50} 值拟合得到的一元线性方程进行回归效果

检验,样品个数为 19, $\alpha=0.05$ 时,阿魏酸、藜本内酯、茴香醛的质量浓度与 pIC_{50} 值所得的经验公式有意义。因此,权重与单体化合物质量浓度的关系如公式 (3) 所示。

$$W_s = 2.635 C_1 + 107.200 C_4 - 40.850 C_{11} \quad (3)$$

C_1 为阿魏酸质量浓度, C_4 为藜本内酯质量浓度, C_{11} 为茴香醛质量浓度

如表 3 所示,以 pIC_{50} 值为横坐标, W_s 为纵坐标确定当归样品的凝血酶抑制活性综合评价模型为 $W_s = 0.411 8 \text{pIC}_{50} - 0.579 9$, $R^2 = 0.701 2$ (公式 4)。权重与 pIC_{50} 值的拟合方程相关系数 $r = 0.837 4$ ($P < 0.01$),说明得到的经验公式有意义。已知当归中藜本内酯、阿魏酸和茴香醛的质量浓度,可以通过公式 (3) 计算得到权重值,再用公式 (4) 计算样品凝血酶抑制活性,即 IC_{50} 值。

表 3 化合物的质量浓度及权重与 pIC_{50} 值的拟合方程
Table 3 Fitting equations between mass concentration of compounds, W_s and pIC_{50} values

化合物/ W_s	线性方程	R^2
阿魏酸	$y = 0.008 5 x + 0.074 5$	0.324 0
5-HMF	$y = -8 \times 10^{-6} x + 0.007 6$	8×10^{-6}
对香豆酸	$y = -9 \times 10^{-5} x + 0.001 5$	0.007 0
Z-藜本内酯	$y = 2 \times 10^{-4} x$	0.643 2
咖啡酸	$y = -3 \times 10^{-4} x + 0.001 6$	0.070 3
绿原酸	$y = 0.030 6 x + 0.339 3$	0.039 4
山柰酚	$y = -8 \times 10^{-5} x + 9 \times 10^{-4}$	0.022 0
香草醛	$y = -0.019 2 x + 0.254 4$	0.025 9
原儿茶酸	$y = -8 \times 10^{-4} x + 0.003 7$	0.028 6
香草酸	$y = -0.001 1 x + 0.008 1$	0.028 8
茴香醛	$y = -0.002 8 x + 0.010 7$	0.345 1
W_s	$y = 0.411 8 x - 0.579 9$	0.701 2

3 讨论

3.1 总酚、总多糖含量变化分析

炮制过程中的高温会破坏当归的细胞结构使酚类物质不断溶出,结合酚类发生水解成为游离酚使总酚含量增加^[11]。酚类物质在持续的高温下难以保持稳定的化学结构,如绿原酸和 3,5-二咖啡酰奎宁酸均会被水解为咖啡酸^[12]。结果表明,酒当归中总酚含量高于当归,150 °C 制备的酒当归其含量低于 120 °C。

酒当归的总多糖含量高于当归,在 2 个炮制温度下均随炮制时间的增加先升高后降低,在炮制 18

min 时总多糖含量均达到最高, 分别为 25.89% 和 24.11%。以 120 °C 炮制过程中总多糖含量随炮制时间的变化趋势为例进行分析, 发现在炮制 12 min 时总多糖含量低于当归, 主要是由于细胞中半纤维素和木质素的结构不稳定发生降解, 如橡木蒸制后总多糖含量下降, 最高可下降 36%^[13]。在炮制 12~18 min, 总多糖含量随炮制时间的延长而增加, 主要是由于高温使细胞壁被破坏而释放出多糖^[14]。长时间的高温使多糖发生降解且部分多糖的碳化都会使多糖含量下降。在 150 °C 炮制时更有益于多糖的快速溶出使得其总多糖的含量略高于 120 °C 制备的酒当归。

3.2 11 种单体化合物的定量分析

在 120、150 °C 炮制时, 阿魏酸含量均先增加后降低。阿魏酸可与阿拉伯木聚糖形成酯键结合于细胞壁, 加热使酯键断裂, 游离的阿魏酸含量逐渐增加。同时, 当归中含有的阿魏酸松柏酯性质不稳定, 高温条件下易转化为阿魏酸与松柏醇^[15]。阿魏酸含量分别在炮制超过 24、22 min 时有所降低, 说明继续加热其结构被高温破坏。文献报道阿魏酸在光照或升温时均会发生降解^[16]。

香草醛含量随炮制时间的延长呈先升高后降低的趋势, 均高于当归, 是由于木质素在高温时可降解生成香草醛。木质素最佳降解温度为 240~280 °C^[17], 因此 150 °C 炮制时香草醛含量增加更快。绿原酸含量变化与前两者有相同趋势, 其含量增加主要是结合态转化为游离态, 如大量的共轭酚和结合酚水解, 而后的降低则是加热过程中发生水解和分子内酯基的迁移而异构化^[11]。

5-HMF 是由葡萄糖或果糖在加热过程中脱水生成的, 因此含量会随炮制温度的升高和时间的延长而增加。在 150 °C 炮制 28 min 时 5-HMF 含量降低, 是由于其分子中含有的醛基和羟甲基可发生酯化、聚合和水解, 分解为乙酰丙酸和甲酸^[18]。藁本内酯的含量降低, 主要是发生聚合反应形成了二聚体, 而在炮制 18 min 时藁本内酯含量有一定增加, 可能是二聚体水解^[19]。

3.3 凝血酶抑制活性分析

随着炮制时间的延长, 酒当归的 pIC₅₀ 值均先增加后减少, 分别在炮制 18、20 min 时 pIC₅₀ 值较高, 主要是由于此时阿魏酸及藁本内酯的含量均较高。120 °C 炮制条件下的酒当归凝血酶抑制活性高于当归, 而 150 °C 炮制条件下的酒当归多低于当

归。文献报道酒炙会减少总挥发油的含量, 但是挥发油中藁本内酯的相对百分含量增加^[19-20]。

从图 5 可以看出对凝血酶抑制活性的贡献率从高到低依次为 Z-藁本内酯、阿魏酸, 说明阿魏酸、藁本内酯是当归活血作用的主要活性成分, 茴香醛含量与凝血酶活性呈负相关性。其他 8 种化合物含量与凝血酶抑制活性的决定系数 R² 均较小, 没有显著相关性。姚艺新^[21]通过灰色关联度分析发现川芎中藁本内酯、洋川芎内酯和阿魏酸与活血活性之间有较强的关联系数。

当归具有补血活血的功效, 酒炙后活血活性增强, 与其酚酸类、多糖类成分相关。前期考察了多糖对凝血酶活性的影响, 发现抑制率较低, 而且可能是物理包埋作用, 使得酶活位点难以发挥作用^[22]。多糖的活血作用可能主要表现在提高造血能力、抗血小板聚集方面, 需要进一步实验验证。本实验考察了当归及 120、150 °C 分别炮制 12~28 min 制备的酒当归共 19 个样品的成分含量和凝血酶抑制活性的变化。本实验验证了传统炮制中采用文火炮制的科学性, 发现藁本内酯、阿魏酸是发挥活血作用的主要成分。炮制条件对于结合态阿魏酸到游离态的转变, 及阿魏酸松柏酯分解为阿魏酸均有较大影响, 因此, 仅以阿魏酸含量为指标难以完整地反映当归整体质量特征。

本实验解释了炮制过程中主要成分含量和凝血酶抑制活性的变化规律, 建立了成分与凝血酶抑制活性的权重函数, 使通过测定成分含量来计算当归及其炮制品的凝血酶抑制活性成为可能, 解决了用 1 种小分子成分难以综合评价中药饮片质量的问题。通过对药效物质基础的初步研究, 为当归和酒当归质量的有效评价提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 133.
- [2] 北京市药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: II.
- [3] 陆兔林, 石上梅, 蔡宝昌, 等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2525-2529.
- [4] Chen X T, Lu J, Li X, *et al.* Effect of blanching and drying temperatures on starch-related physicochemical properties, bioactive components and antioxidant activities of yam flours [J]. *LWT Food Sci Technol*, 2017, 82: 303-310.
- [5] Yi L Z, Liang Y Z, Wu H, *et al.* The analysis of *Radix*

- Angelicae Sinensis* (Danggui) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1991-2001.
- [6] Wu Y Y, Shang M Y. Characterization of principal compositions in the roots of *Angelica sinensis* by HPLC-ESI-MSⁿ and chemical comparison of its different parts [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 393-402.
- [7] Lin L Z, He X G, Lian L Z, et al. Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 810(1/2): 71-79.
- [8] 陈健, 张越, 王洪兰, 等. 当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(20): 4942-4949.
- [9] Chuang Y C, Lin Y S, Liu H S, et al. Molecular mimicry between dengue virus and coagulation factors induces antibodies to inhibit thrombin activity and enhance fibrinolysis [J]. *J Virol*, 2014, 88(23): 13759-13768.
- [10] Chen C Y C. Weighted equation and rules: A novel concept for evaluating protein-ligand interaction [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2009, 27(3): 271-282.
- [11] Sharma K, Ko E Y, Assefa A D, et al. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(2): 243-252.
- [12] Chen P X, Dupuis J H, Marcone M F, et al. Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of cooked regular and nondarkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on bioaccessibility, phenolic composition, and antioxidant activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(48): 10448-10458.
- [13] Geffert A, Výbohá E, Geffertová J. Changes in the chemical composition of oak wood due to steaming [J]. *Acta Fac Xylogiae Zvolen*, 2019, 61(1): 19-29.
- [14] Shen C, Mao J, Chen Y Q, et al. Extraction optimization of polysaccharides from Chinese rice wine from the Shaoxing region and evaluation of its immunity activities [J]. *J Sci Food Agric*, 2015, 95(10): 1991-1996.
- [15] Ramírez-Jiménez A K, Rangel-Hernández J, Morales-Sánchez E, et al. Changes on the phytochemicals profile of instant corn flours obtained by traditional nixtamalization and ohmic heating process [J]. *Food Chem*, 2019, 276: 57-62.
- [16] 任淑萌. 阿魏酸的降解作用规律和机理研究及其在药物质量控制中的应用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2009.
- [17] 秦昆明. 牛蒡子质量评价及炮制过程化学成分变化规律研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [18] 傅紫琴, 王明艳, 蔡宝昌. 5-羟甲基糠醛(5-HMF)在中药中的研究现状探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(3): 508-510.
- [19] 刘凤臣, 蔡广知, 杨建龙, 等. 川芎、当归炮制前后挥发性成分分析 [J]. *长春中医药大学学报*, 2012, 28(1): 164-166.
- [20] 滕菲, 张学兰, 徐鑫, 等. 炮制对当归中挥发油和阿魏酸含量及其提取率的影响 [A] // 中华中医药学会中药炮制分会 2008 年学术研讨会论文集 [C]. 南昌: 中华中医药学会中药炮制分会, 2008: 346-349.
- [21] 姚艺新. 川芎基于抗血小板聚集作用与药效成分的质量评价 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [22] Wang Y, Li X, Chen X T, et al. Effect of stir-frying time during *Angelica Sinensis Radix* processing with wine on physicochemical, structure properties and bioactivities of polysaccharides [J]. *Process Biochem*, 2019, 81: 188-196.

[责任编辑 郑礼胜]