

不同种类酒炮炙对牛膝饮片指纹图谱的影响

吴国学^{1,2} 张振凌²

(1 郑州人民医院药学部, 郑州, 450003; 2 河南中医药大学药学院, 郑州, 450008)

摘要 目的: 比较牛膝生品、蒸馏水炙品及不同乙醇浓度酒炙品指纹图谱差异, 研究不同乙醇浓度酒炮炙对牛膝饮片的影响。方法: 采用 HPLC, 以岛津 VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱, 乙腈-水为流动相梯度洗脱, 流速 0.8 mL/min, 柱温 25 ℃, 检测波长 243 nm, 进样量 15 μL, 采集 90 min。结果: 牛膝各酒炙品大部分峰面积较生品的要稍高, 蒸馏水炙品的较生品稍低, 但不是很明显。结论: 酒炙有利于本实验建立指纹图谱中的牛膝大部分有效成分的溶出, 高浓度乙醇炙品在有效成分溶出方面优于低浓度乙醇炙品。

关键词 牛膝; 指纹图谱; 酒炙; HPLC; 蜕皮甾酮; 不同浓度乙醇

Effect of Different Types of Ethanol Processing Method on Fingerprint of Medicinal Cyathula Root

Wu Guoxue^{1,2}, Zhang Zhenling²

(1 Pharmacy department, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, China; 2 Pharmacy School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

Abstract Objective: To compare the fingerprints among Medicinal Cyathula Root raw products, distilled by solid water and different concentrations of ethanol, so as to stud the effects of Medicinal Cyathula Root products processed by different concentration of ethanol. **Methods:** By using HPLC method, taking the SHIMADZU VP-ODS (4.6 × 250 mm, μm) as the chromatographic column, acetonitrile-water as mobile phase gradient elution, flow rate 0.8 mL/min, column temperature 25 ℃, detection wavelength 243 nm, sample volume 15 μL, acquisition for 90 min. **Results:** Most of the peak area of Medicinal Cyathula Root that processed by ethanol were slightly higher than raw products; raw products were lower than the distilled water products, but not very obviously. **Conclusion:** In this experiment, Medicinal Cyathula Root processed by ethanol is conducive to the dissolution of most active ingredient, high concentration ethanol processed product is better than the low concentration ethanol in the terms of the active ingredients dissolution.

Key Words Medicinal Cyathula Root; Fingerprints; Ethanol processing; HPLC; Ecdysterone; Different concentrations of ethanol

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.06.058

牛膝系苋科植物牛膝 (*Achyranthes bidentate* BL.) 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 并被列为上品。牛膝的主产地“河南温县、武陟、博爱、沁阳”旧称怀庆府, 故又称怀牛膝, 并为享有盛誉的“四大怀药”之一。牛膝所含的化学成分比较多, 主要为齐墩果酸型三萜皂苷类化合物、甾酮类化合物、多糖类化合物等化合物, 另外还含有有机酸、生物碱、黄酮、环二肽、甾醇等^[1]。本实验采用高效液相色谱法比较不同辅料用酒炙牛膝及其生品饮片指纹图谱的差异, 判断牛膝炮炙前后化学成分在种类和数量上的改变, 初步评价牛膝炮炙作用, 为牛膝炮制作用机制

提供初步数据, 并且对控制牛膝饮片质量, 筛选炮炙辅料用酒提供初步依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 高效液相色谱分析仪岛津 LC-20AT, SPD-20A 检测器, Chromato-Solution Light 色谱数据处理系统, 数控超声波清洗器 (KQ-500DV 型, 昆山市超声仪器有限公司)。十万分之一电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 试药 药材采购于亳州药材市场, 经河南中医药大学药学院张振凌教授鉴定为苋科植物牛膝 (*Achyranthes bidentata* BL.) 的干燥根。其中牛膝生

品、黄酒(16.5%)炙品、黄酒(16%)炙品、黄酒(22%)炙品、白酒炙品、蒸馏水炙品饮片均为按文献^[2]中1.1项下的方法制备的样品,依将该批样品编号为样品“1,2,3,4,5,6”,即牛膝生品为1号、黄酒(16.5%)炙品为2号、黄酒(16%)炙品为3号、黄酒(22%)炙品为4号、白酒(56%)炙品为5号、蒸馏水炙品为6号。对照品:蛻皮甾酮(β -ecdysone)(批号:20070226)购于中国科学院昆明植物研究所,纯度>98%。

1.3 试剂 甲醇(天津市永大化学试剂开发中心,批号:20080320,分析纯),甲醇(天津市四友精密化学有限公司,批号:080520,色谱纯),乙腈(美国Tedia公司,批号:08045020,色谱纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:岛津 VP-ODS (4.6×250 mm);流动相:乙腈:水;流速:0.8 mL/min;柱温:25℃;检测波长:243 nm;流动相:乙腈(A)-水(B);梯度洗脱:0.01~10 min:98-95A,10~20 min:95-95A,20~35 min:95-81A,35~50 min:81-81A,50~65 min:81-65A,65~80 min:65-58A;进样量15 μ L;采集90 min。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取蛻皮甾酮对照品5.03 mg,置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(每毫升含蛻皮甾酮0.503 mg)。

2.3 供试品溶液的制备 取牛膝各样品粉末(过20目筛)约5 g,精密称定,加入50 mL甲醇超声(500 w,40 kw)30 min,静置后过滤,滤渣再加入甲醇50 mL,重复上面操作,过滤,并以少量甲醇分次洗涤容器和残渣,合并过滤液,置水浴上挥发至干,残渣加色谱甲醇定溶至10 mL容量瓶中,用0.45 μ m为微孔滤膜过滤既得供试品溶液。

2.4 精密度试验 精密吸取同一供试品[牛膝黄酒(22%)炙品]溶液15 μ L,在2.1项色谱条件下连续进样5次,记录色谱图,计算各样品中共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 1.68\%$,相对峰面积的 $RSD \leq 1.91\%$,表明仪器的精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一供试品试液[牛膝黄酒(22%)炙品]分别于制备后0、6、12、18、24、48 h在2.1项色谱条件下进样15 μ L,计算各样品中共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 1.73\%$,相对峰面积的 $RSD \leq 1.66\%$,表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.6 重复性实验 取同一批样品[牛膝黄酒

(22%)炙品]5份,每份约5.0 g,精密称定,照2.3方法制成五份供试品溶液,按2.1项下的色谱条件,依次进样15 μ L,计算各样品中共有峰的相对保留时间和相对峰面积。各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 1.39\%$,相对峰面积的 $RSD \leq 1.76\%$,表明该方法重复性良好。

2.7 指纹图谱的建立 分别将按2.3项下方法把牛膝生品、黄酒(16.5%)炙品、黄酒(16%)炙品、黄酒(22%)炙品、白酒(56%)炙品及蒸馏水炙品饮片制备成供试品溶液,并在2.1项色谱条件下进行进样分析,按2.2项下制得蛻皮甾酮对照品同样进样分析,记录色谱图,结果见图1、图2。

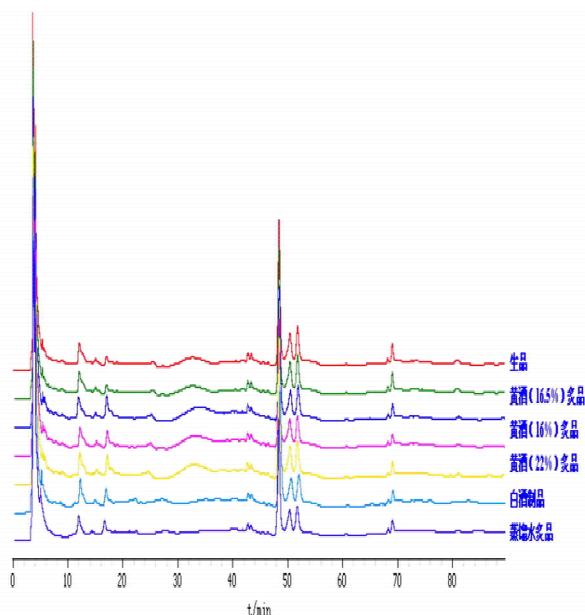


图1 牛膝各样品饮片指纹图谱2D视图

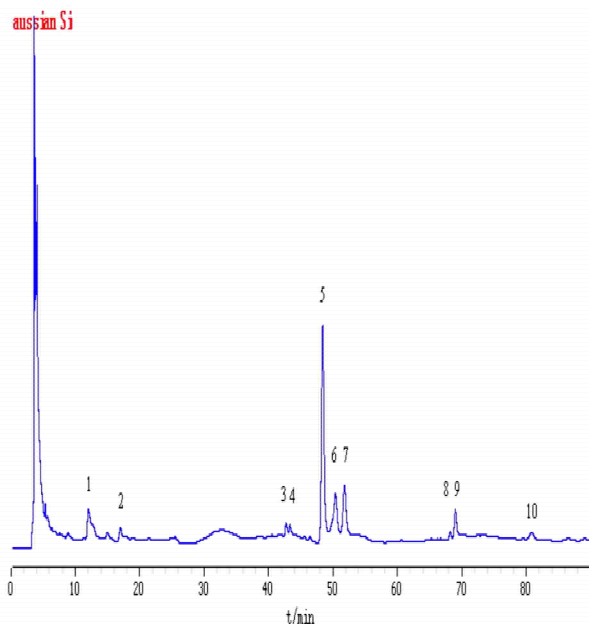


图2 牛膝饮片标准指纹图谱

2.8 共有峰的标定 分析牛膝各样品指纹图谱,确定共有峰 10 个。其中 5 号峰为蜕皮甾酮的峰。见图 3。该峰质量分数最高且比较稳定,将其作为参比峰,计算其他各峰的相对保留时间、相对峰面积,结果见表 1、表 2。

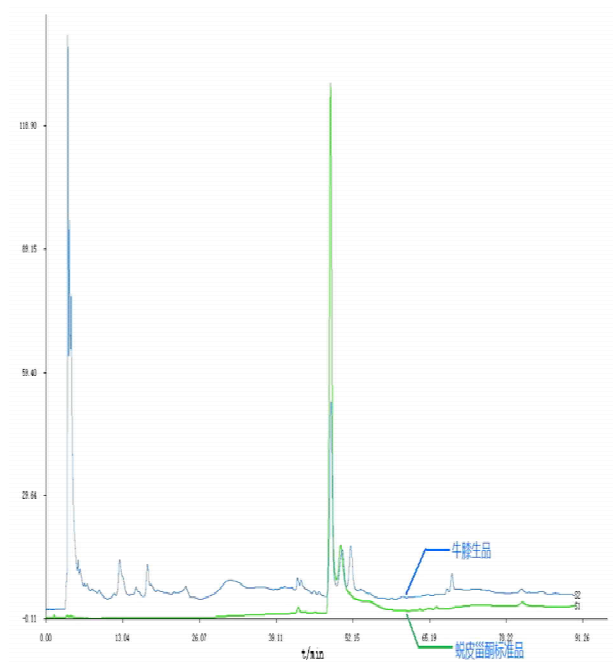


图 3 牛膝生品饮片与蜕皮甾酮标准品指纹图谱

表 1 各样品共有峰相对保留时间

样品 标号	相对保留时间									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	12.10	17.05	42.68	43.28	48.37	50.31	51.69	68.15	68.93	80.81
2	11.95	17.00	42.67	43.30	48.25	50.30	51.64	68.18	68.98	80.85
3	12.00	17.05	42.70	43.31	48.45	50.44	51.84	68.22	69.05	81.08
4	11.89	17.04	42.78	43.29	48.33	50.29	51.70	68.17	68.95	80.84
5	12.20	17.15	42.71	43.27	48.34	50.33	51.73	68.15	69.02	81.00
6	12.45	17.12	42.65	43.25	48.35	50.32	51.68	68.20	68.96	80.83

表 2 各样品共有峰相对峰面积

样品 标号	相对峰面积									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.43	0.12	0.10	0.12	1.70	0.63	0.61	0.04	0.16	0.03
2	0.48	0.19	0.10	0.08	1.73	0.67	0.64	0.04	0.12	0.05
3	0.45	0.17	0.09	0.07	1.75	0.67	0.63	0.04	0.14	0.04
4	0.50	0.20	0.11	0.10	1.76	0.68	0.65	0.04	0.12	0.03
5	0.56	0.26	0.12	0.11	1.79	0.73	0.68	0.05	0.11	0.05
6	0.38	0.12	0.08	0.08	1.60	0.53	0.45	0.04	0.19	0.02

2.9 相似度计算 利用 Chromafinger 2005 Beta 0.1 色谱软件对牛膝生品、蒸馏水炙品及各酒炙品的指纹图谱进行处理,得到各样品指纹图谱相似度分析结果。见表 3。结果表明牛膝各样品相似度 > 0.90,各样品比较相似。用该软件处理得出牛膝生品与各酒炙品饮片镜像图谱。见图 4(各对图谱相似度均较高,仅选一对图谱显示),结果同样显示牛膝生品与各酒炙品饮片指纹图谱相似较高。

表 3 牛膝饮片指纹图谱相似度分析结果

样品编号	相关系数法	夹角余弦法
1	1.000 0	1.000 0
2	0.938 8	0.947 2
3	0.977 1	0.980 3
4	0.975 9	0.979 0
5	0.962 7	0.967 7
6	0.928 9	0.937 2

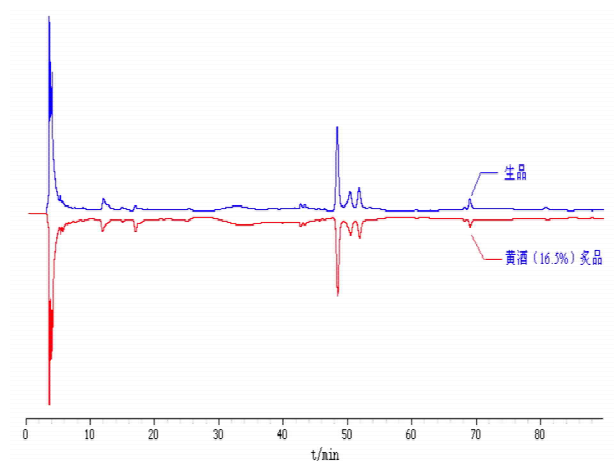


图 4 牛膝与黄酒(16.5%)炙牛膝饮片 HPLC 指纹图谱比较

从 2.8 项下的实验数据分析,除 4 号、9 号、3 号(仅 16% 黄酒炙品)共有峰外牛膝各酒炙品其他共有峰相应的峰面积较生品的要稍高,除 2 号、9 号共有峰外牛膝蒸馏水炙品的其他共有峰的峰面积较生品的要稍低,并且整体上各样品大部分共有峰相应的峰面积随炮炙用辅料用酒的浓度的提高而增高,但不是特别明显。另外从本实验的整个图谱上来看,牛膝各样品指纹图谱相似度较高,在峰的数目和保留时间方面没有太大改变。

3 讨论

从图谱分析发现,牛膝各样品指纹图谱没有太大区别,只是在含量上稍有不同。生品与炙品,炙品之间的差别都不是太明显,在峰的数目与保留时间方面没有太大改变,经相似度计算表明,牛膝各饮片的相似性较好,相关系数和夹角余弦都 > 0.9,说明牛膝生品饮片与酒炙品饮片、酒炙品饮片之间无明显差异,牛膝、酒牛膝饮片在本实验建立的指纹图谱上没有太大的改变。有文献报道牛膝生品饮片与各炮炙品饮片在蜕皮甾酮含量上的差别^[2],而通过本实验得到的各样品指纹图谱蜕皮甾酮的峰面积基本与文献报道的规律一致,即白酒(56%)炙品 > 黄酒(22%)炙品 > 黄酒(16%)炙品 > 黄酒(16.5%)炙品 > 生品 > 蒸馏水炙品,也就是蜕皮甾酮的含量随

着炮炙用酒乙醇浓度的提高而增高。

牛膝生品大部分共有峰的峰面积要比相应保留时间上炙品的要稍小,但不是很明显,这可为牛膝酒炙后增强活血化瘀作用的机制提供实验上的数据;另外酒味甘、辛,性大热,酒炙过程中酒“能升能散、宣行药势”的药性^[3]可为酒炙能增加药物溶出作用提供理论上的依据。牛膝蒸馏水炙品大部分共有峰的峰面积要比相应保留时间上生品的要小,这可能是牛膝生品饮片在与蒸馏水加热的过程中,药材中蛋白质的凝固以及淀粉粒的糊化影响了有效成分的溶出。实验结果显示大部分共有峰相应的峰面积随着炮炙辅料中乙醇含量的升高而增加,这说明高乙醇浓度辅料用酒炮炙有利于本实验建立的指纹图谱中各成分的溶出,这为牛膝饮片炮炙辅料用酒的筛选提供一定的依据。

本实验采用的检测波长为 243 nm,这个波长为蜕皮甾酮的检测波长,因而在控制蜕皮甾酮的方面有着一定的作用。另外牛膝中还含有三萜皂苷、生物碱、多糖、黄酮、有机酸等成分,其中齐墩果酸的检测波长为 215 nm 左右^[4];而甜菜碱在低紫外区 195 nm 才有吸收^[5],且其极性较大,需用正相柱,因而用

该实验建立的检测条件不能同时监控牛膝的各个成分,牛膝指纹图谱有待进一步研究。鉴于蒸发光检测器几乎可以检测所有的物质,因而在以后研究中可以考虑用 HPLC-蒸发光散器来建立牛膝的指纹图谱,该方法可为阐明牛膝酒炙炮制机制提供试验参数;另外正相柱可更直观的显示牛膝酒炙前后水溶性成分的改变,因而今后的研究同时可以考虑建立牛膝正相柱的指纹图谱,这也可作为牛膝酒炙的炮制机制提供试验数据,同时为牛膝、酒牛膝饮片的质量监控提供参数。

参考文献

- [1] 沈舒,王琼,李友宾.牛膝的化学成分和药理作用研究进展[J].海峡药学,2011,23(11):1-6.
- [2] 张振凌,吴国学,许真真,等.不同种类酒炮炙对牛膝饮片蜕皮甾酮含量的影响[J].中药材,2009,32(9):1369-1371.
- [3] 龚千锋,丁安伟,孙秀梅,等.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2006:167.
- [4] 张振凌,吴国学,李君丽.不同种类酒炮炙对牛膝饮片齐墩果酸含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):39-41.
- [5] 赵素霞,吴国学,张振凌,等.不同种类酒炙对牛膝饮片甜菜碱含量的影响[J].中药材,2011,34(5):690-692.

(2017-02-08 收稿 责任编辑:张文婷)

“国风养心杯”有奖征文通知

为了更好的交流养心氏片临床使用经验,为临床医生提供一个交流学术平台,《世界中医药》编辑委员会与上海医药集团青岛国风药业股份有限公司决定自 2016 年 5 月 1 日起,共同举办“国风养心杯”有奖征文活动,征文具体要求如下:

征文内容:1. 养心氏片临床疗效观察:

例如:养心氏片在改善稳定性冠心病及 PCI 术后心功能不全体征及症状、心律失常、糖尿病等相关并发症,围绝经期综合征,躯体症状障碍等临床疗效观察。

2. 同类产品比较应用的研究总结。

征文要求:1. 论文具有创新性和科学性,论点鲜明、论证充分、逻辑严谨、结果真实可靠,5000 字以内为宜,未公开发表及未在全国性会议上交流过。

2. 论文请按“题目、姓名、作者单位、邮编、摘要、关键词(以上中英文)、正文、参考文献”的顺序排列。如多名作者,请在姓名右上角标明第一作者、第二作者及第三作者的数字序号,每篇论文作者一般不超过 5 人。

3. 论文摘要为 300~400 字,包括“研究目的、方法、结果、结论”四部分简要内容。

4. 论文后可附参考文献,书写格式如:

①(书)作者姓名、书名、出版社名、出版年月、页码;

②(期刊)作者姓名、文章名、期刊名、年份、卷(期)、页码。

5. 论文标题下请注明作者姓名、职称、工作单位、联系方式、邮箱及邮编。参选者请保留底稿。

稿件评审:本次活动的所有征文均由《世界中医药》杂志编辑部组织专家进行审阅并评选出优秀论文,获奖者均可获得一定的奖励。获奖文章将在 2016-2017 年《世界中医药》杂志正式发表,刊发前将专函通知获奖论文的第一作者,如有其他发表需求请电函。上海医药集团青岛国风药业股份有限公司将保留上述活动的解释权利,并拥有对来稿的处理权和各种媒体的使用权。

投稿方式:所有论文请以 Microsoft

Word 电子文件形式,发至 growfulmkt@163.com,并注明“养心氏片有奖征文”字样;或致电:0532-86058972

18660222858,

联系人:刘先生。

截至时间:2017 年 12 月 31 日(以电子邮箱收到日期为准);所有征文恕不退稿,请自留底稿。

凡参加本项活动的第一作者均可获得上海医药集团青岛国风药业股份有限公司赠送的精美纪念品。

欢迎广大临床医生踊跃参加本项活动!