

# 何首乌与制何首乌补血作用及 HPLC 指纹图谱的比较

金嘉文<sup>1</sup>, 陈有军<sup>2</sup>, 刘梅<sup>1</sup>, 侯少贞<sup>1</sup>, 许冬瑾<sup>3</sup>, 马兴田<sup>3</sup>, 向飞军<sup>2,3\*</sup>

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东康美药物研究院有限公司, 广州 510006;  
3. 康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515300)

**[摘要]** **目的:**通过比较何首乌、制何首乌水煎液的补血作用及其 HPLC 指纹图谱,初步探索两者药效不同的物质基础。**方法:**将大鼠分为 4 组,除正常组外,对其他 3 组大鼠于实验第 2 和第 6 天分别 sc 0.015, 0.03 g·kg<sup>-1</sup>剂量的乙酰苯肼,并于第 6 天起每天 ip 0.03 g·kg<sup>-1</sup>剂量环磷酰胺,持续 3 d,建立大鼠贫血动物模型,并于造模期间每天对相应组别大鼠灌胃何首乌、制何首乌水煎液各 2 g·kg<sup>-1</sup>,造模结束后取血检测给药后大鼠外周血象红细胞计数(RBC),血红蛋白测定(Hgb),红细胞压积(HCT)的变化。通过高效液相色谱分析法,制定并建立何首乌与制何首乌的 HPLC 指纹图谱。**结果:**与正常对照组比较,贫血模型组大鼠 RBC, Hgb, HCT 均显著降低( $P < 0.01$ ),说明造模成功;何首乌组大鼠 RBC, Hgb, HCT 与贫血模型组比较,差异无统计学意义,仅 HCT 显著高于模型组( $P < 0.05$ );制何首乌组大鼠 RBC, Hgb, HCT 与模型组比较,均显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。指纹图谱比对则发现制何首乌与何首乌有成分的差异,同时也有共有成分含量的差异。**结论:**制何首乌具有显著的补血功效,研究结果提示制何首乌中所含有的新的化学成分很有可能为麦拉德反应的产物,制何首乌较何首乌具有更佳补血功效有可能是该部分产物与较为温和的药性共同作用的结果。

**[关键词]** 何首乌; 制何首乌; 补血作用; 高效液相色谱法; 指纹图谱

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0206-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013080206

## Comparison on Effect of Anemia Animal Model and HPLC Fingerprint Chromatogram between Polygoni Multiflori Radix and Polygoni Multiflori Radix Preparata

JIN Jia-wen<sup>1</sup>, CHEN You-jun<sup>2</sup>, LIU Mei<sup>1</sup>, HOU Shao-zhen<sup>1</sup>, XU Dong-jin<sup>3</sup>, MA Xing-tian<sup>3</sup>, XIANG Fei-jun<sup>2,3\*</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Kangmei Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510006, China;

3. Kangmei Pharmaceutical Co., Ltd, Puning 515300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare effect of blood deficiency and HPLC fingerprint chromatogram between Polygoni Multiflori Radix and Polygoni Multiflori Radix Preparata, and to find out the material foundation of effects. **Method:** According to random design, rats were divided into 4 groups. Except the normal control group, the other groups were subcutaneously injected acetyl phenyl hydrazine 0.015 g·kg<sup>-1</sup> and 0.03 g·kg<sup>-1</sup> in the 3rd day and the 6th day. From the 6th day, rats were intraperitoneally injected CTX for 3 day. During the period of modeling, treatment groups received corresponding drugs at dose of 2 g·kg<sup>-1</sup>. Then, the effect of Polygoni Multiflori Radix and Polygoni Multiflori Radix Preparata were observed, and the fingerprint chromatogram of the water extracted from Polygoni Multiflori Radix and Polygoni Multiflori Radix Preparata, respectively, were established by HPLC. **Result:** Compared with the normal control group, the results showed that the red blood cell

**[收稿日期]** 20121111(002)

**[基金项目]** 国家发改委 2010 年现代中药高技术产业发展专项项目(发改办高技[2011]51号)

**[第一作者]** 金嘉文, 硕士研究生, 从事中药新药研究与开发, E-mail: jitung21@hotmail.com

**[通讯作者]** \* 向飞军, 教授, 高级工程师, Tel: 020-39379898, E-mail: xfj@kangmei.com.cn

count (RBC), hemoglobin (Hgb), hematocrit (HCT) figures in model group rats declined significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the results showed that Polygoni Multiflori Radix could not increase RBC and Hgb in anemia model rats, but the HCT was increased ( $P < 0.05$ ), while Polygoni Multiflori Radix Preparata could rise RBC Hgb and HCT significantly in anemia model rats ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The fingerprint chromatograms result revealed that there were differences not only in chemical consistence but in determination of constituents between two herbals. **Conclusion:** The results illustrate that Polygoni Multiflori Radix Preparata has significant blood-nourishing ability. Additionally, the result of the fingerprint chromatogram indicates that the product of Maillard reaction and moderate drug properties are both the possible reason why Polygoni Multiflori Radix Preparata has the better efficacy on blood deficiency.

[**Key words**] Polygoni Multiflori Radix; Polygoni Multiflori Radix Preparata; blood-nourished ability; HPLC; fingerprint chromatogram

何首乌为蓼科植物何首乌的干燥块根,具有解毒、消痈、润肠通便之功效<sup>[1]</sup>。经炮制后为制何首乌,清代黄宫绣的《本草求真》<sup>[2]</sup>论述“首乌……专入肝经以为益血祛风之用,其兼补肾者,亦因补肝而兼及也。……系调补后天营血之需,以为常服,长养精神,却病调元之饵”。认为何首乌具有养血益肝兼及补肾作用。而祖国医学“肾藏精,主骨生髓”、“生精化血”、“精血同源”的理论,也说明肾精与血液的生成密切相关<sup>[3]</sup>。因此,补血功效是何首乌的主要功效之一,并且临床用于补血的多为何首乌的炮制品。何首乌和制何首乌均为常用中药饮片,都主要以汤剂入药。笔者拟通过使用常用剂量的何首乌与制何首乌水煎液对大鼠血虚模型进行灌胃数天后观察血虚大鼠模型的外周血象指标的变化来评价两种药材对血虚大鼠的补血功效。《中国药典》2010年版采用2,3,4,5-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷作为何首乌质量的评价指标<sup>[1]</sup>,但是一般多认为仅凭单一化学成分难以全面反映药材的药效,单纯一种成分的变化并不能全面解释整个单味药功效的改变<sup>[4]</sup>,故笔者使用近年来流行的天然药物的研究方法,其优点在于可全面反映中药复杂的化学成分及其相对比例的中药材指纹图谱研究法<sup>[5-7]</sup>,建立何首乌与制何首乌煎煮成药液后的指纹图谱来对照两者成汤剂后的药效成分差异,全面对照其化学成分异同的含量差异,从而从药材化学成分差异的角度探索何首乌与制何首乌在补血功效上药效差异的原因。

## 1 材料

**1.1 仪器与试剂** Shimadzu UV-20A 高效液相色谱仪, Sartorius BT5S 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司), KQ-500DE 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司), 乙腈(Sigma-aldrich 公

司, 色谱纯), 怡宝纯净水, 其他试剂均为分析纯。

**1.2 动物** SD 大鼠, 雄性, 40 只, 体重(200 ± 20 g) 购于广州中医药大学实验动物中心。许可证号 0086744。

**1.3 药物** 何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb 由康美药业提供, 批号 20100627; 制何首乌(何首乌的干燥块根在 110 °C 高压与黑豆汁炮制 8 h 而成; 康美药业提供, 批号 20100627); 乙酰苯肼(aladdin chemistry Co. Ltd, 批号 18921); 注射用环磷酰胺(山西普德药业有限公司, 批号 20091102); 2,3,4,5-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷, 购自中国药品生物制品检定所, 批号 110844-200908。何首乌和制何首乌经广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波教授鉴定为正品。

## 2 方法

### 2.1 对血虚大鼠模型的药效评价

**2.1.1 供试品溶液制备** 称取药材 200 g, 加入 2 L 蒸馏水煎煮 1 h, 浓缩至 1 000 mL, 放冷, 制成含生药 0.2 g·mL<sup>-1</sup> 的母液, 4 °C 冰箱保存备用。

**2.1.2 血虚模型的建立与给药** 将 40 只 SD 大鼠按体重随机分组, 每组 10 只, 分别为正常组, 模型组, 生何首乌组, 制何首乌组。除正常组外, 其余各组均采用化学法造大鼠血虚模型: 分别于实验第 2 天动物皮下注射乙酰苯肼 0.015 g·kg<sup>-1</sup>, 第 6 天再次注射 0.03 g·kg<sup>-1</sup>; 第 6 天起腹腔注射环磷酰胺 0.03 g·kg<sup>-1</sup>, 连续 3 d。造模期间正常对照组在上述时间点分别皮下和腹腔注射等量生理盐水<sup>[8]</sup>。于大鼠造模期间各组每天给药 1 次, 剂量均为 2 g·kg<sup>-1</sup>, 连续 10 d。受试药物组给药 10 mL·kg<sup>-1</sup>; 模型组和正常对照组给予蒸馏水 10 mL·kg<sup>-1</sup>。第 10 天给药后 2 h, 各组动物在麻醉状态下采取眼眦静脉丛取血法, 检测血常规的各项指标。

**2.1.3 统计方法** 实验结果使用 SPSS 13.0 进行数据分析。数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,各指标采用单因素方差分析及 *t* 检验。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

**2.2 何首乌与制何首乌煎煮液的指纹图谱的建立**

**2.2.1 色谱条件** 岛津 C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 100 mm, 4.6 μm); 流动相乙腈 (A) - 0.2% 磷酸 (B) 梯度洗脱, 梯度条件: 0 → 60 min, A (%) 90% → 10%, B (%) 10% → 90%, 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 检测波长 254 nm, 进样量为 10 μL。

**2.2.2 对照品溶液制备** 精密称取二苯乙烯苷对照品 5.03 mg, 加甲醇定容至 5 mL, 摇匀。以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得 (每 1 mL 含二苯乙烯苷约 1 mg), 冷藏备用。

**2.2.3 方法学考察**

**2.2.3.1 精密密度试验** 取同 1 份何首乌生品供试品溶液 10 μL, 连续测定 6 次, 以特征峰的峰面积计算 RSD 1.6%, 低于 3%, 符合指纹图谱要求, 表明仪器精密密度良好。

**2.2.3.2 稳定性试验** 分别取同 1 份何首乌生品和首乌炮制品供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 h 进行检测, 考察主要色谱峰的峰面积的一致性, 计算出何首乌生品和何首乌炮制品供试品溶液各主要色谱峰的相对峰面积的 RSD 分别为 1.3% 和 2.0%, 均低于 3%, 表明药材的稳定性良好。

**2.2.3.3 重复性试验** 取同 1 批号何首乌生品药材 5 份, 按 2.2 项下制成供试品溶液, 同法检测, 考察主要色谱峰的峰面积, 结果表明, 各主要色谱峰的峰面积的 RSD 1.2%, 低于 3%, 表明此实验方法重现性良好。

**2.2.4 指纹图谱的制定** 分别精密吸取二苯乙烯苷对照品、生品何首乌与高压豆制 8 h 何首乌供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 按选定的色谱条件进行检测, 在同一色谱条件下, 测定其 HPLC 色谱图。将何首乌与制何首乌的 HPLC 指纹图谱的色谱峰进行标定, 并再将两者液相图谱合并对照。

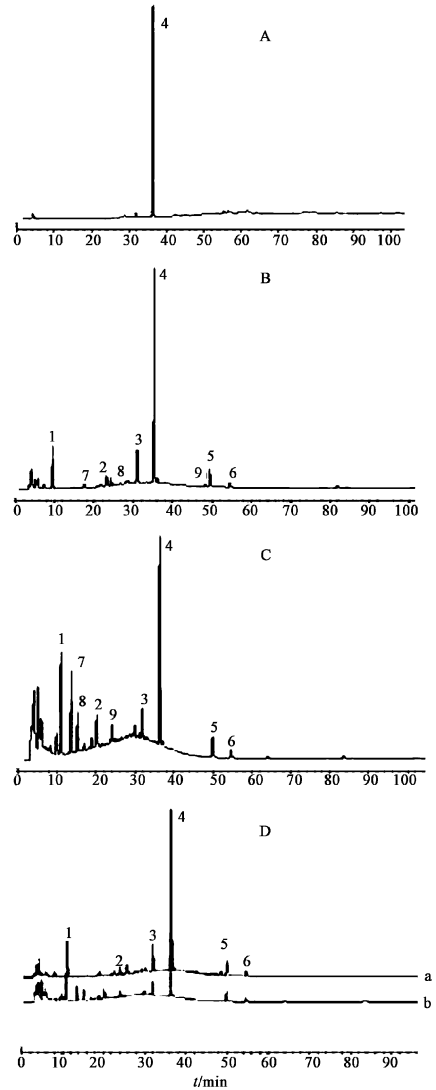
**3 结果**

**3.1 何首乌与制何首乌补血药效** 贫血模型组红细胞 (RBC), 血红蛋白 (Hgb), 红细胞压积 (HCT) 均比正常组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 说明造模成功; 而给药组中, 2 g · kg<sup>-1</sup> 何首乌对大鼠的 RBC, Hb 无显著改善, 仅 HCT 高于模型组 ( $P < 0.05$ ); 而 2 g · kg<sup>-1</sup> 制何首乌组大鼠的 RBC, Hgb, HCT 水平均显著高于贫血模型组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 1。

表 2 同剂量何首乌与制何首乌对贫血大鼠外周血象的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g · kg <sup>-1</sup>	n	RBC / × 10 <sup>12</sup> /L	Hgb /g · L <sup>-1</sup>	HCT
正常	-	10	7.65 ± 0.29	138.2 ± 8.8	0.457 ± 0.024
模型	-	8	2.61 ± 0.79 <sup>2)</sup>	52.4 ± 16.6 <sup>2)</sup>	0.157 ± 0.048 <sup>2)</sup>
何首乌	2	9	2.91 ± 0.50	55.3 ± 11.7	0.230 ± 0.061 <sup>3)</sup>
制何首乌	2	10	3.74 ± 0.65 <sup>4)</sup>	74.7 ± 16.6 <sup>3)</sup>	0.256 ± 0.059 <sup>4)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。



A. 二苯乙烯苷; B. 何首乌; C. 制何首乌;  
D. 何首乌与制何首乌对照图 (a. 何首乌; b. 制何首乌)

图 1 何首乌与制何首乌水提液的 HPLC 指纹图谱

**3.2 何首乌与制何首乌水提液的 HPLC 指纹图谱的对照** 将何首乌与制何首乌的 HPLC 指纹图谱的色谱峰进行标定, 并再将两者液相图谱合并对照, 结果如图 1 所示, 何首乌图谱中的 1, 2, 3, 4, 5, 6 号峰

在炮制后有了明显的量的变化,峰面积明显减小,另外 7,8,9 号峰消失,而首乌炮制品图谱中 7,8,9 号峰为炮制后新出现的成分峰。其中 4 号峰为何首乌中的主要药效成分二苯乙烯苷,经测定何首乌样品中主要药效成分二苯乙烯苷含量为  $21.85 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,制何首乌中二苯乙烯苷含量为  $16.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

#### 4 讨论

在前期研究中,我们发现何首乌不同炮制品中以高压豆制 8 h 的制何首乌对血虚动物的补血效果略为突出,因此在本实验中采用高压豆制 8 h 的制何首乌作为研究对象。本实验中,采用蒸馏水作为提取溶媒,主要因为何首乌常以汤剂入药,故以水提煎煮方式提取出来的何首乌化学成分更贴近实际口服药液中的成分。在色谱条件优化过程中,经实验比较,以水与乙腈为流动相,按上述条件进行梯度洗脱,能较好地使何首乌样品中各色谱峰分离;采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察,记录并比较不同波长的色谱图,结果在 254 nm 检测波长下,何首乌色谱图中色谱峰较多,信息丰富,故选择 254 nm 为检测波长。

本研究结果显示,生何首乌几乎没有补血功效,而制何首乌则能明显改善血虚大鼠模型的各项血细胞指标。究竟两种同源药材为何在炮制前后为何存在如此巨大的药效差异,通过观察两者煎煮液的液相图谱不难发现何首乌的 HPLC 指纹图谱中分别有 9 个主要色谱峰,制何首乌的 HPLC 指纹图谱也有 9 个色谱峰,两者的 HPLC 色谱图及其相似,其中有 6 个一致的色谱峰,从两者液相图谱的这一特点可以看出何首乌与制何首乌的同源性。而何首乌与制何首乌者的液相图谱所反映的区别主要有两方面:①共同化学成分的含量差异:何首乌中含有的共有化学成分较制何首乌更高,而 4 号色谱峰是近年来作为何首乌主要药效成分被研究,具有保护肝脏和脑组织作用的二苯乙烯苷。何首乌中二苯乙烯苷含量较制何首乌高,这应与二苯乙烯苷为热不稳定成分,其含量会随炮制过程中温度的升高而降低。而其他几个共有色谱峰笔者推测为蒽醌类成分,而其具体的化学结构组成将在以后的实验进行探索,就目前研究表明蒽醌类成分的含量变化与炮制后药效变化并无直接相关性<sup>[3]</sup>故暂不作为何首乌炮制前后药效差异的讨论对象。②部分化学成分的差异:从制何首乌煎煮液的色谱图可以看出,标号为 7,8,9 的色谱峰所代表的化学成分是何首乌中不具有的,有研究认为这是麦拉德反应的产物<sup>[9]</sup>,为何首乌

在炮制加热过程中除了何首乌本身即含有的糖类成分外,其在炮制的过程中何首乌中含有的其他种类的化学成分发生结构转换,如结合蒽醌类成分转变为游离蒽醌类<sup>[10]</sup>,使单糖类成分分解出来,与辅料黑豆中丰富的氨基酸类物质发生麦拉德反应,产生的化学成分<sup>[9,11]</sup>,但具体制何首乌煎煮液液相图谱中标号为 7,8,9 的 3 个色谱峰所代表的化学成分,现阶段因条件所限未能够准确测定其具体的化学式,但这应是制何首乌中具有药效作用的关键成分,至于其具体是什么,如何从制何首乌中分离出来,则有待进一步的探索与研究。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 122.
- [2] 清·黄宫绣. 本草求真[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987:421.
- [3] 丘小惠, 宋艳刚, 孙景波, 等. 不同炮制工艺制何首乌对大鼠血虚模型的作用研究[J]. 中药材, 2008, 31(1):14.
- [4] 宋永强, 谌乐刚. 36 批何首乌药材质量的 HPLC 指纹图谱评价研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(4):257.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 关于印发 5 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)6 的通知[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671.
- [6] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 141.
- [7] 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与应用[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 135.
- [8] 苗明山, 张丽萍, 方晓艳, 等. 当归补血汤多糖对环磷酸胺和乙酰苯胺联用致小鼠血虚模型的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(12): 46.
- [9] 刘振丽, 李林福, 巢志茂, 等. 何首乌炮制后化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 239.
- [10] Kim Mo, BaItes W. On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-One in the Maillard reaction[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 282.
- [11] Thomas D, Nathalie C, Stepharlie D, et al. Simultaneous quantitative analysis of Maillard reaction precursors and products by high-performance anion exchange chromatography [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 7259.

[责任编辑 聂淑琴]