

引用:何秀娟,王璇,黄蓉,彭若威,李晓欣,刘永刚,谭鹏.基于UPLC-Q-TOF-MS法分析何首乌不同炮制品化学成分及其抗衰老作用[J].中医药导报,2025,31(2):35-40.

基于UPLC-Q-TOF-MS法分析何首乌不同炮制品化学成分及其抗衰老作用*

何秀娟¹,王璇¹,黄蓉¹,彭若威¹,李晓欣¹,刘永刚¹,谭鹏^{1,2}

(1.北京中医药大学中药学院,北京 102488;

2.北京市科委中药生产过程控制与质量评价北京市重点实验室,北京 102488)

[摘要] 目的:分析何首乌生品、《北京市中药饮片炮制规范》品(北京炮规品)、《中华人民共和国药典》品(《中国药典》品)之间的成分差异及其抗氧化、抗衰老作用。方法:基于UPLC-Q-TOF-MS法对何首乌不同炮制品成分进行分析;测定1,1-二苯基-2-苦肼基自由基(DPPH)清除率,评价何首乌不同炮制品体外抗氧化能力;观察秀丽隐杆线虫脂褐素水平,分析何首乌不同炮制品的抗衰老作用。结果:鉴定出的何首乌不同炮制品成分共30种,3种炮制品共有成分20种。生品、《中国药典》品、北京炮规品的半数清除率分别为0.0069、0.0436、0.0330 mg/mL。生品组、北京炮规品组、《中国药典》品组秀丽隐杆线虫体内的荧光强度均低于空白组($P<0.001$)。结论:何首乌不同炮制品均具有良好的抗氧化和抗衰老能力,且北京炮规品优于《中国药典》品。

[关键词] 何首乌;秀丽隐杆线虫;高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱;抗氧化;抗衰老

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)02-0035-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.02.007

The Chemical Components of Heshouwu (*Polygonum multiflorum*) and Different Products Based on the UPLC-Q-TOF-MS Method and Their Effects on Anti-Aging

HE Xiujuan¹, WANG Xuan¹, HUANG Rong¹, PENG Ruowei¹, LI Xiaoxin¹, LIU Yonggang¹, TAN Peng^{1,2}

(1.School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2.Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Production Process Control and Quality Evaluation, Beijing Municipal Science and Technology Commission, Beijing 102488, China)

[Abstract] Objective: The composition differences and anti-oxidation and anti-aging effects of Heshouwu (*Polygonum multiflorum*) raw product, *Beijing Traditional Chinese Medicine Preparation Standard* processed product (*Beijing processed product*) and *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* processed product (*China Pharmacopoeia* processed product) were analyzed. Methods: Based on the ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) method, the components of different prepared products of Heshouwu (*Polygonum multiflorum*) were analyzed. DPPH free radical scavenging rate was determined to evaluate the antioxidant capacity of different prepared Heshouwu (*Polygonum multiflorum*) *in vitro*. The lipofuscin level of *C. elegans* was observed to analyze the effects of different products of Heshouwu (*Polygonum multiflorum*) on anti-aging. Results: A total of 30 different components were identified from different Heshouwu (*Polygonum multiflorum*) product, and 20 components were found in 3 different product. The half clearance rate of raw product, *China Pharmacopoeia* processed product and *Beijing processed product* were 0.0069, 0.0436 and 0.0330 mg/mL respectively. The raw product group, *Beijing processed product* group and *China Pharmacopoeia* processed product group showed lower fluorescence intensity of *caenorhabditis elegans* than blank group ($P<0.001$). Conclusion: The different products of Heshouwu (*Polygonum multiflorum*) have good antioxidant and anti-aging ability, and the *Beijing processed product* is superior to the *China Pharmacopoeia* processed product.

[Keywords] Heshouwu (*Polygonum multiflorum*); *C. elegans*; ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight high resolution mass spectrometry; anti-oxidation; anti-aging

*基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(2018YFC1706500)

通信作者:谭鹏,男,副教授,研究方向为中药炮制机制

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根,具有解毒、消痈、截疟、润肠通便的作用^[1]。何首乌的主要成分为蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类、鞣质类、磷脂类等^[2]。何首乌经炮制后,成分发生改变,肝肾毒性降低^[3]。《北京市中药饮片炮制规范》(后文简称“北京炮规”)是北京市药品监督管理局为规范饮片炮制,提升饮片质量,制定的具有北京炮制特色的炮制规范^[4]。北京炮规法制何首乌主要采用黑豆汁和黄酒拌匀闷润后蒸制,《中华人民共和国药典》(后文简称《中国药典》)法制何首乌主要分为黑豆汁拌蒸、黑豆汁拌匀后炖两种炮制方法。北京炮规法和《中国药典》法制何首乌的炮制方法略有不同,各具特色。

《开宝本草》指出,何首乌久服可长筋骨,益精髓,延年不老^[5]。现代药理研究表明,何首乌具有神经保护、抗氧化^[6]、抗衰老^[7]等药理活性。秀丽隐杆线虫目前广泛应用于抗衰老研究。相比于其他传统的动物模型,线虫易于培养、生命周期短且和人类有高度相似的同源基因^[8]。秀丽隐杆线虫已经成为研究衰老的成熟系统^[9]。目前,氧化能力减弱、脂褐素含量上升等指标能作为线虫衰老的标志^[10-12]。

本研究采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱对何首乌生品、《北京市中药饮片炮制规范》品(北京炮规品)、《中国药典》品甲醇提取物进行化学成分分析,并研究不同炮制方法对何首乌药效成分、抗氧化、抗衰老能力的影响。

1 材 料

1.1 主要仪器 Waters Acquity UPLCTM型液相色谱仪(配有四元高压泵、自动进样器及柱温箱),链接Waters Synapt G2-S QTOF质谱仪(配有电喷雾离子源及MassLynx V4.1质谱工作站)购自美国Waters公司;SB25-12型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率720 W,频率40 kHz);D2012 plus型高速离心机[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司];BSA224S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];TH4-200型荧光倒置显微镜(日本OLYMPUS公司);Epoch型多功能微孔板酶标仪(美国BioTek Instruments Inc公司)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯,批号:F22M3M202,纯度99.95%)、甲酸(色谱纯,批号:192549,纯度91.5%)、乙腈(质谱纯,批号:225022,纯度99.9%)均购自Fisher公司;水为屈臣氏饮用水;蛋白胨(批号:20220720)、琼脂粉(批号:20231120)、胰蛋白胨(批号:20180206)均购自北京奥博星生物技术有限责任公司;胆固醇(北京奥博拓达科技有限公司,批号:160612,纯度99%);酵母菌提取物(英国OXOID公司,批号:1149159);1,1-二苯基-2-苦肼基自由基(DPPH)[梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,批号:GTBXB-QP,纯度97%];维生素C(上海鸿柏科技有限公司,批号:KN653205,纯度98%);氯化钠(批号:20230401,纯度99.5%)、磷酸二氢钾(批号:20230114,纯度99.5%)、磷酸氢二钾(批号:20200403,纯度99%)均购自天津市光复科技发展有限公司;硫酸镁(批号:20150317,纯度99%)、氯化钙(批号:C651386C6,纯度96%)、氢氧化钾(批号:20161124,纯度85%)均购自北京化工厂。

1.3 线虫及菌株 野生型秀丽隐杆线虫N2、尿嘧啶缺陷型

大肠埃希菌OP50均由中科院遗传与发育生物学研究所惠赠。

1.4 药物 何首乌(北京芝参堂药业有限公司,批号:213230501)经北京中医药大学刘勇教授鉴定为蓼科植物何首乌的干燥块根;黑豆(北京市双桥燕京中药饮片厂,批号:2304002);黄酒(浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司,批号:20210825)。

2 方 法

2.1 样品的制备

2.1.1 炮制品的制备 (1)生品何首乌的制备:取何首乌生品饮片,除去杂质,打粉,过四号筛,备用。(2)黑豆汁的制备:参照2020年版《中国药典》及2008年版《北京市中药饮片炮制规范》的方法,制备黑豆汁。(3)《中国药典》法制何首乌:取何首乌块200 g,用50 g黑豆汁拌匀,置炖锅内,炖32 h,后放入60 ℃烘箱内干燥12 h,打粉,过四号筛,备用。(4)北京炮规法制何首乌:参照2008年版《北京市中药饮片炮制规范》,取何首乌块200 g,加入50 g黑豆汁和50 g黄酒拌匀,闷润8 h,装入蒸罐内,加入2倍量的水,密封,蒸24 h,中间倒罐1次。后放入60 ℃烘箱内干燥12 h,打粉,过四号筛,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 取上述样品粉末1 g,置离心管中,加入10 mL甲醇,超声45 min(功率720 W,频率40 kHz),冷却,补足减失的质量。取超声后的溶液,3 000 r/min(离心半径为6 cm)离心10 min。弃去下层粉末,取上清液13 000 r/min(离心半径为6 cm)离心15 min,得上清液,用于后续的质谱分析。

取上述样品粉末50 g,置烧杯中,加入10倍量的甲醇,超声提取45 min(功率720 W,频率40 kHz)。抽滤,减压浓缩,冻干,得何首乌生品、炮制品粉末,用于后续线虫实验。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100.0 mm,1.7 μm);流动相:0.1%的甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~2 min,98%~85%A;2~4 min,85%~65%A;4~6 min,65%~55%A;6~8 min,55%~20%A;8~15 min,20%~2%A。流速为0.3 mL/min,柱温35 ℃,进样量5 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)负离子模式,雾化气体为氮气。质量扫描范围 m/z 50~1 500,毛细管电压2.5 kV,锥孔电压40 V,离子源温度100 ℃,脱溶剂气温350 ℃,锥孔气流量40 L/h,脱溶剂气流量600 L/h,雾化气压力6.5 kPa。

2.3 体外自由基清除实验 参考文献[13]的方法。(1)精密称取DPPH 0.1 mg于小烧杯中,用甲醇溶解后转移至25 mL容量瓶中,不断润洗,保证DPPH全部转移至容量瓶内,用甲醇定容至25 mL,再从中吸取10 mL至100 mL容量瓶中,用甲醇定容,最终得到0.04 mg/mL的DPPH贮备液。采用维生素C(VC)作为阳性对照。精密称取VC粉末10 mg于小烧杯中,用甲醇溶解后再转移至10 mL容量瓶中,不断润洗,保证VC全部转移至容量瓶内,用甲醇定容至10 mL。再取VC母液稀释成所需不同浓度的VC样品溶液。精密称取何首乌不同炮制品粉末10.0 mg于小烧杯中,用甲醇溶解后再转移至10 mL容量瓶中,不断润洗,保证样品全部转移至容量瓶内,加甲醇定容至10 mL。再取母液稀释成所需不同浓度的何首乌不同炮制品样品溶液。

(2) 移取1 mL不同浓度的供试品溶液,加入1 mL配制好的DPPH溶液,混合均匀,放入避光处,反应40 min,记为Ai;移取1 mL DPPH溶液,加入1 mL甲醇,混合均匀,同样避光反应40 min,记为A0;移取1 mL不同浓度的供试品溶液,加入1 mL甲醇,避光反应40 min,记为Aj。分别移取避光反应后的不同反应液放于96孔板中,在517 nm处测定其吸光度。每组样品平行3次,取平均值代入公式,计算DPPH自由基清除率。DPPH自由基清除率=[1-(Ai-Aj)/A0]×100%。

2.4 秀丽隐杆线虫的培养

2.4.1 秀丽隐杆线虫的同步化 将处于产卵期的成虫用S-basal缓冲液(每1 L含5.85 g氯化钠,1.00 g磷酸氢二钾,6.00 g磷酸二氢钾)冲洗至1.5 mL离心管内,线虫自然沉降后,吸去上层液体,加入缓冲液冲洗3次。后加入1 mL Bleach裂解液(每10 mL由500 μL氢氧化钠和500 μL次氯酸钠加9 mL去离子水组成),涡旋15 min,离心后吸去裂解液,使用缓冲液冲洗4次,放于20 ℃培养箱内培养过夜备用。

2.4.2 秀丽隐杆线虫体内脂褐素含量的测定 将秀丽隐杆线虫分为空白组、生品组、北京炮规品组、《中国药典》品组,生品、北京炮规品、《中国药典》品粉末用时使用DMSO助溶,空白组使用相同含量的DMSO作为对照,使最终给药浓度为2 mg/mL,DMSO用量为0.1%。将经同步化得到的线虫培养28 h至L4时期,分别置于给药组和空白组培养基中持续暴露4 d。各组随机挑选30条线虫,将线虫转移至载玻片上制片,于荧光显微镜下使用激发波长340~380 nm、发射波长430 nm观察并拍照,每组实验平行3次。参照文献[10],使用Image J软件测

量,绘制柱状图。

2.5 数据分析 使用Masslynx V4.1软件进行数据采集分析,得到生何首乌、制何首乌在负离子模式下的基峰强度(BPI)色谱图。使用ChemDraw进行结构式查询,结合UNIFI等多种数据库及相关文献^[14-21]建立何首乌数据库,将样品数据和数据库导入UNIFI 1.8中进行成分鉴定。将原始数据导入MS-Convert中提取,再将提取后的数据导入MS-DIAL中,进行滤燥、峰对齐、归一化处理,并将分析结果与UNIFI结果进行比对,得到最后的生何首乌、制何首乌成分鉴定结果。应用SPSS 20.0软件分析数据,计量资料符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析,应用GraphPad Prism8软件作图。

3 结 果

3.1 生何首乌、制何首乌成分分析 根据设定的色谱-质谱条件,所得生何首乌、制何首乌总离子流图。(见图1)结合文献[7]共鉴定出30种成分,其中二苯乙烯类化合物4种,蒽醌类成分11种,黄酮类成分5种,其他类成分10种。(见表1)

参考文献[22],以生何首乌、制何首乌共有成分峰面积作为变化指数评价成分含量的变化情况。变化指数大于1,说明炮制后含量增加;变化指数小于1,说明炮制后含量降低。20种共有成分中,12种成分经过加工炮制后含量降低、8种成分含量升高。(见表2)通过UNIFI分析,得到峰12的分子离子峰为[M-H]⁻/m/z 405.119 1,其分子离子峰丢失一分子糖得到m/z 243.066 9的碎片离子,再丢失一分子H₂O得到m/z 225.057 3的碎片离子,确认峰12为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-吡喃葡萄糖苷。二苯乙烯苷类裂解规律见图2。

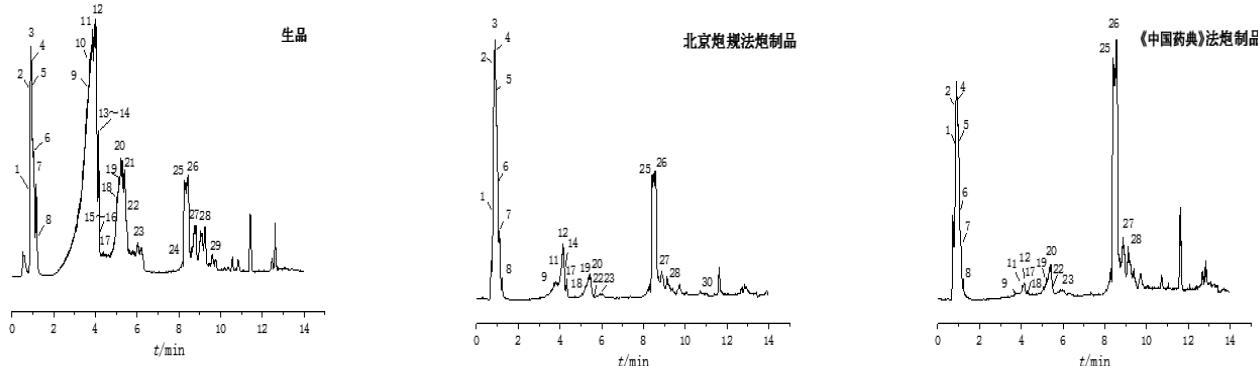


图1 负离子模式下生何首乌、制何首乌总离子流图

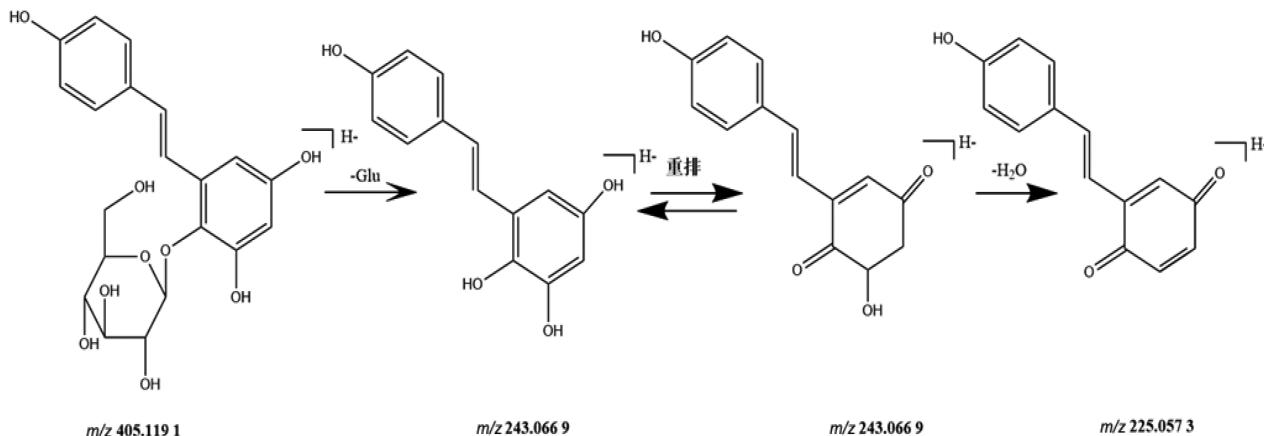


图2 二苯乙烯苷类化合物裂解规律图

表 1 负离子模式下生何首乌、制何首乌成分鉴定表

峰号	保留时间 /min	化合物	分子量偏差 /mDa	分子式	[M-H] ⁻	二级碎片	生品	《中国药典》品	北京炮规品
1	0.85	Glucosyl-glucose	0.3	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.109 2	119.0407,161.0271	+	+	+
2	0.89	Gulonic acid	-0.4	C ₆ H ₁₂ O ₇	195.050 6	113.025 1,101.025 1	+	+	+
3	0.90	Citric acid	1.4	C ₆ H ₈ O ₇	191.021 1	111.008 8,129.022 4	+	ND	+
4	0.91	Quinic acid	-0.9	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.055 2	191.012 6,87.009 4	+	+	+
5	0.96	Gallic acid	0.5	C ₇ H ₆ O ₅	169.014 7	108.902 5,125.025 0	+	+	+
6	1.03	Malic acid	0.1	C ₄ H ₆ O ₅	133.014 3	71.014 7,115.004 5	+	+	+
7	1.05	儿茶素	1.2	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.072 9	161.027 1,137.025 1	+	+	+
8	1.12	3-hydroxybenzoic acid	0.7	C ₇ H ₆ O ₃	137.025 1	108.021 0	+	+	+
9	3.58	大黄酚-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	2.1	C ₂₁ H ₃₀ O ₉	415.105 5	295.063 8,267.068 3	+	+	+
10	3.69	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2,3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	2.4	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₄	567.174 3	405.117 8,243.064 3	+	ND	ND
11	3.92	salicylaldehyde	0.6	C ₇ H ₆ O ₂	121.030 1	-	+	+	+
12	4.00	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	0.0	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	405.119 1	243.066 9,225.057 3	+	+	+
13	4.11	Polygoniminin B	3	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.122 1	255.066 5,213.057 0	+	ND	ND
14	4.11	Quercetin	1.9	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.037 3	257.049 3,287.058 8	+	ND	+
15	4.16	Catechingallate	3.8	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442.094 3	169.067 8	+	ND	ND
16	4.16	槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	-2.7	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	463.085 5	124.017 2,109.030 2	+	ND	ND
17	4.25	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-(6'-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷	-2.6	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	447.127 1	125.024 9,177.020 9	+	+	+
18	4.77	反-N-(4-羟基苯乙基)阿魏酸酰胺	2.9	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	312.127 0	245.084 2,109.035 7	+	+	+
19	5.07	torachrysone-8-O-glucoside	0.7	C ₂₉ H ₃₂ O ₉	407.135 5	245.083 0,230.059 6	+	+	
20	5.11	Emodin-1-O-beta-D-glucoside	0.1	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	431.098 4	269.038 8,225.057 1	+	+	+
21	5.53	虎杖苷	0.0	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	389.131 5	449.145 3,227.035 6	+	ND	ND
22	5.55	苜蓿素(小麦黄素)	1.7	C ₇ H ₁₄ O ₇	329.068 3	313.040 6	+	+	+
23	6.03	大黄素-8-甲醚	0.6	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.061 8	240.043 7,254.060 6	+	+	+
24	8.04	大黄素-8-O-(6'-O-乙酰基)-β-D-葡萄糖苷	0.8	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	458.122 7	311.057 9	+	ND	ND
25	8.19	2-乙酰基大黄素	1.2	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	311.057 3	269.048 8,225.052 4	+	+	+
26	8.43	芦荟大黄素	0.1	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 7	225.056 1,241.050 4,	+	+	+
					182.038 7				
27	8.84	Emodin	1.0	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.046 5	225.200 0	+	+	+
28	8.9	ω-羟基大黄素	1.4	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.041 9	257.045 8,150.982 6	+	+	+
29	9.61	1,8-二羟基-3-甲基蒽醌(大黄酚)	1.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.059 7	240.045 5	+	ND	ND
30	11.22	β-胡萝卜苷(胡萝卜苷)	1.7	C ₃₃ H ₅₀ O ₆	575.440 7	621.438 9	ND	ND	+

注：“+”为有该种化合物；“ND”为无该种化合物。

表 2 生何首乌、制何首乌共有成分含量变化表

化合物	分子式	变化指数		化合物	分子式	变化指数	
		北京炮规品	《中国药典》品			北京炮规品	《中国药典》品
Glucosyl-glucose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.360 0	0.012 0	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-(6'-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	0.007 4	0.007 7
Gulonic acid	C ₆ H ₁₂ O ₇	2.608 0	4.795 0	反-N-(4-羟基苯乙基)阿魏酸酰胺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	0.029 0	0.021 0
Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	8.119 0	86.677 0	torachrysone-8-O-glucoside	C ₂₉ H ₃₂ O ₉	0.001 9	0.007 9
Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	18.294 0	9.226 0	Emodin 1-O-beta-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	0.080 0	0.067 0
Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	0.286 0	0.161 0	苜蓿素(小麦黄素)	C ₇ H ₁₄ O ₇	0.100 0	0.084 0
儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	0.300 0	0.010 0	大黄素-8-甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	0.330 0	0.163 0
3-hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	3.002 0	6.558 0	2-乙酰基大黄素	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	0.358 0	0.246 0
大黄酚-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₁ H ₃₀ O ₉	17.834 0	16.080 0	芦荟大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	12.389 0	8.329 0
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₄	0.784 0	0.067 0	大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0.585 0	0.691 0
salicylaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	3.826 0	5.535 0	ω-羟基大黄素	C ₃₃ H ₅₀ O ₆	15.975 0	33.084 0

经过分析,共鉴别出了30种化学成分,二苯乙烯类化合物4种。以峰面积作为变化指数,其含量在炮制之后均呈下降趋势。蒽醌类成分11种,其中8种为共有成分。Polygonimitin B、1,8-二羟基-3-甲基蒽醌2种成分只在生品中检出。芦荟大黄素、 ω -羟基大黄素、大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷在炮制后含量升高,其余炮制后各有所降低。黄酮类成分5种,其中1种成分槲皮素为生品、北京炮规品均检测到,但《中国药典》品中未检测到。其他类成分10种,大多数酚酸类成分为炮制品含量高于生品,尤其是奎宁酸和没食子酸。《中国药典》品和北京炮规品分别显著增加10倍以上。

3.2 生何首乌、制何首乌对DPPH清除率的影响 测定DPPH清除率是目前最常用的评价何首乌体外抗氧化能力的方法之一。图3为VC在不同浓度下对DPPH的清除率,图4为生何首乌、制何首乌在不同浓度下对DPPH的清除率。根据清除率曲线方程求得VC、生品、《中国药典》品、北京炮规品的IC₅₀(半数清除率)分别为0.00425、0.00693、0.04360、0.03300 mg/mL。生何首乌、制何首乌都具有显著的抗氧化活性。在低浓度范围内,生品的抗氧化能力强于炮制品,但是,随着浓度的增大,炮制品的抗氧化活性也随之增大。当质量浓度达到0.4 mg/mL时,制品的抗氧化能力也达到95%以上,超过生品。且《中国药典》品和北京炮规品其体外抗氧化能力趋势一致。

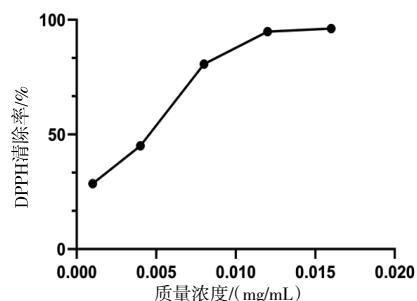


图3 VC不同浓度下DPPH清除率曲线

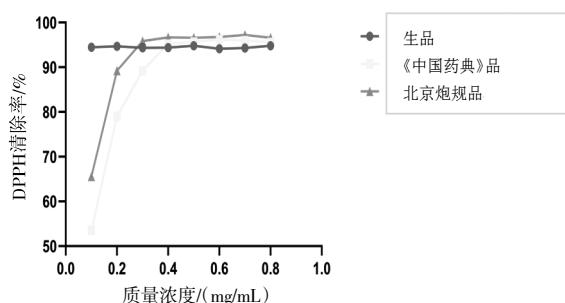


图4 生何首乌、制何首乌不同浓度下DPPH清除率曲线

3.3 生何首乌、制何首乌对线虫脂褐素含量的影响 线虫体内氧化水平的升高会导致线虫寿命的缩短^[23]。生何首乌、制何首乌表现出了良好的抗氧化作用,揭示了甲醇提取物可能具有抗衰老作用。线虫体内脂褐素的含量随着其年龄的增长而增加,可作为线虫机体衰老的标志物^[10]。生品组、北京炮规品组、《中国药典》品组秀丽隐杆线虫体内的荧光强度均低于空白组($P<0.001$);与空白组比较,生品降低了23.61%,北京炮规品降低了13.27%,《中国药典》品降低了12.82%。说明何首乌不同炮制品能够降低线虫体内脂褐素的含量,具有延缓线虫衰老的作用。(见图5~6)

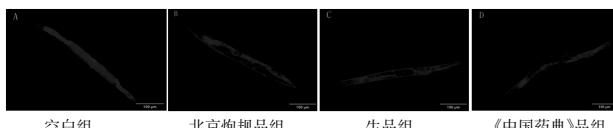
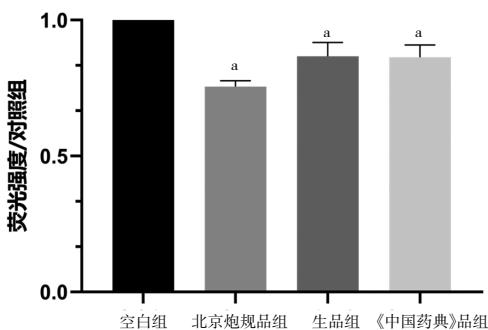


图5 各组线虫体内脂褐素荧光图



注:与空白组比较, $^aP<0.001$ 。

图6 各组秀丽隐杆线虫体内的荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s, n=30$)

4 讨论

何首乌是典型的生熟异用中药,制何首乌为何首乌的炮制加工品。何首乌经过炮制之后成分发生改变,且使用不同炮制方法炮制后的何首乌,其成分和药理药效也不同。本研究基于UPLC-Q-TOF法对生何首乌、制何首乌甲醇提取物成分进行分析,共鉴别出30种化学成分,其中生何首乌、制何首乌共有成分20种。同时本研究通过MS-DIAL结合UNIFI进行分析比对,以峰面积变化作为确定其含量变化的指标,确定生何首乌、制何首乌共有成分含量的差异。质谱分析结果显示,生何首乌、制何首乌含有抗氧化成分。为进一步确认生何首乌、制何首乌甲醇提取物是否具有抗氧化能力,本研究通过DPPH清除率实验进行验证。结果表明,何首乌生品、北京炮规品、《中国药典》品均具有强抗氧化能力。较强的抗氧化能力暗示着其具有抗衰老能力的可能,而脂褐素水平又为抗衰老能力的标志之一,故本研究以秀丽隐杆线虫为模式生物,通过测定生何首乌、制何首乌是否具有降低线虫体内脂褐素含量的能力来探究其是否具有抗衰老能力。结果表明,生何首乌、制何首乌甲醇提取物都具有显著的抗氧化、抗衰老能力。

影响何首乌抗氧化能力的成分主要有二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、槲皮素、儿茶素、虎杖苷、总蒽醌苷等成分^[13,24],这与本研究结果一致。在不同浓度范围内,《中国药典》品、北京炮规品抗氧化能力变化趋势一致,但北京炮规品抗氧化能力强于《中国药典》品。两种何首乌不同炮制品多数成分变化趋势基本一致,但在成分种类、含量上存在差异。北京炮规品所含柠檬酸、槲皮素、 β -胡萝卜苷均为《中国药典》品未检出成分,且变化指数结果显示,北京炮规品中二苯乙烯苷、没食子酸、儿茶素、大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷含量均高于《中国药典》品。所含成分种类的区别、相同成分含量上的差异可能是北京炮规品抗氧化能力强于《中国药典》品的原因。何首乌生品中二苯乙烯苷类化合物、大黄素、槲皮素、儿茶素、虎杖苷、总蒽醌苷类含量较高,这与何首乌生品抗氧化能力>北京炮规品抗氧化能力>《中国药典》品抗氧化能力结果一致。

生何首乌、制何首乌均能显著降低线虫体内荧光强度。线虫体内的荧光强度由其肠道内的衰老色素——脂褐素决定。荧光强度越强,脂褐素含量越高,线虫衰老越明显。结果证明生何首乌、制何首乌甲醇提取物具有抗衰老作用。生品何首乌降低脂褐素能力稍强于两种制何首乌,北京炮规品抗衰老能力稍强于《中国药典》品。这与前期抗氧化能力结果一致,为进一步挖掘北京特色炮制何首乌提供了依据。质谱分析结果结合文献[25]分析表明,生何首乌、制何首乌甲醇提取物发挥抗衰老作用的成分可能为大黄素、大黄素甲醚、儿茶素、二苯乙烯苷、没食子酸等。本研究可为后续何首乌不同炮制品甲醇提取物抗衰老作用机制研究奠定基础。

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:中国医药科技出版社,2020:183-184.
- [2] 黄孟秋,孙连娜,董志颖,等.产地加工炮制一体化与传统何首乌饮片化学成分的比较研究[J].中草药,2022,53(17):5293-5304.
- [3] 王硕,钟凌云,王卓,等.何首乌的肝毒性分析及炮制减毒研究[J].中华中医药学刊,2023,41(2):231-237.
- [4] 北京市药品监督管理局.北京市中药饮片炮制规范[S].北京:化学工业出版社,2008.
- [5] 卢多逊.开宝本草:辑复本[M].尚志钧,辑校.合肥:安徽科学技术出版社,1998:335,336,367.
- [6] 张涛,张金莲,张青,等.何首乌炮制历史沿革及现代研究进展[J].中成药,2023,45(7):2308-2316.
- [7] 王卓,钟凌云,解杨,等.基于“生熟异用”何首乌的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J].中草药,2022,53(3):882-897.
- [8] PAPAEVGENIOU N, CHONDROGIANNI N. Anti-aging and anti-aggregation properties of polyphenolic compounds in C. elegans[J]. Curr Pharm Des,2018,24(19):2107-2120.
- [9] DENZEL M S, LAPIERRE L R, MACK H I D. Emerging topics in C. elegans aging research: Transcriptional regulation, stress response and epigenetics[J]. Mech Ageing Dev,2019,177:4-21.
- [10] 高雅婷,陈旭,范潇晓,等.基于秀丽隐杆线虫模型的棉子糖抗衰老作用研究[J].药物评价研究,2024,47(2):339-344.
- [11] 李立英,刘晓笔,陈志松,等.基于多糖含量的滇黄精炮制工艺及抗衰老活性研究[J].中国现代中药,2023,25(12):2492-2498.
- [12] 陈旭,梁佳政,李志恒,等.水苏糖抗衰老活性及机制研究[J].中国现代中药,2023,25(10):2103-2108.
- [13] 朱敏,姚毅.何首乌炮制前后及其主要成分体外抗氧化活性研究[J].中国医院药学杂志,2018,38(20):2119-2123.
- [14] 郭忠会,贾志鑫,陈奎奎,等.基于UPLC-Q-TOF-MS分析何首乌提取物体内外成分[J].中国中药杂志,2018,43(13):2796-2805.
- [15] 罗益远,刘娟秀,王锋,等.基于UPLC-Triple TOF-MS/MS技术分析何首乌代谢物积累的动态变化[J].中草药,2017,48(10):2105-2110.
- [16] 李妍怡,汪祺,杨建波,等.不同生长年限与采收季节对何首乌中14个成分含量的影响[J].中国现代中药,2023,25(8):1769-1775.
- [17] 罗益远,刘娟秀,刘训红,等.超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱分析不同加工何首乌中差异化学成分[J].分析测试学报,2017,36(1):73-79.
- [18] 周铭.基于LC-MS和化学计量学的何首乌鉴别及炮制水蒸液成分转移研究[D].北京:北京中医药大学,2022.
- [19] 王敏,王晶,杨娜,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS代谢组学技术研究炮制前后何首乌化学成分变化[J].辽宁中医杂志,2022,49(2):149-153,224-225.
- [20] 靳宝芬,叶昊,王凤云,等.基于UPLC/Q-TOF MS法分析生何首乌药材的化学成分[J].广东药科大学学报,2020,36(4):473-478.
- [21] 罗益远,刘娟秀,刘训红,等.基于UPLC-Triple TOF MS/MS技术分析不同产地何首乌的差异化学成分[J].质谱学报,2017,38(6):678-689.
- [22] 王艳霓,邹宏,骆利平,等.基于UPLC-Q/TOF-MS法研究“建昌帮”炒何首乌主成分差异[J].中南药学,2022,20(9):2052-2058.
- [23] SENCHUK M M, DUES D J, VAN RAAMSDONK J M. Measuring oxidative stress in Caenorhabditis elegans: Paraquat and juglone sensitivity assays[J]. Bio Protoc, 2017,7(1):e2086.
- [24] 林艳,肖蓉,吴萍,等.生/制何首乌中蒽醌部位UPLC指纹图谱和抗氧化活性研究[J].中华中医药杂志,2022,37(2):745-749.
- [25] 李学林,张帆,唐进法,等.何首乌炮制品有效成分与抗衰老功效的相关性研究[J].中国新药杂志,2018,27(9):1040-1046.

(收稿日期:2024-06-05 编辑:蒋凯彪)

(上接第34页)

- [24] 陈洁,缪静,周鑫斌,等.大鼠动脉粥样硬化痰瘀互结病证结合模型的建立及方药干预研究[J].中国比较医学杂志,2015,25(9):22-27,87.
- [25] 张方申,彭欣,秦林,等.痰瘀互结型动脉粥样硬化大鼠视网膜和肠系膜微循环观察[J].微循环学杂志,2015,25(1):

10-13,22,83.

- [26] 林丰夏,李亮,曾志聪,等.动脉粥样硬化动物模型研究进展与中医病证结合的造模思路探析[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(21):3338-3342.

(收稿日期:2024-07-01 编辑:蒋凯彪)