

不同炮制方法对益母草化学成分及活血化瘀作用的影响

唐木聪¹, 卢泳^{2,3}, 甘国兴^{2,3*},

邓桂珠^{2,3}, 龙国斌^{2,3}, 宋飞¹, 陈小锐⁴, 陈海明⁴

¹广州医科大学附属清远医院(清远市人民医院); ²清远市中医院;

³广东省鲜药民族医药工程技术研究中心; ⁴清远市食品药品检验所, 清远 511520

摘要: 研究不同炮制方法对益母草化学成分及活血化瘀作用的影响, 为合理用药提供指导。选择盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷为指标, 评价醋制、酒制、四制对益母草生物碱类和黄酮类成分的影响; 采用急性血瘀大鼠模型, 以凝血酶时间、纤维蛋白原、全血高切粘度、全血中切粘度、全血低切粘度、血浆粘度、全血高切还原粘度、全血中切还原粘度、全血低切还原粘度为指标, 评价醋制、酒制、四制对益母草活血化瘀作用的影响。结果显示不同方法炮制后益母草中盐酸益母草碱、盐酸水苏碱等生物碱类成分含量略有下降, 芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷等黄酮类成分含量明显下降; 不同方法炮制后益母草能不同程度改善模型大鼠的血液流变学指标。本研究表明不同炮制方法对益母草生物碱类成分的影响较小, 对黄酮类成分的影响较大; 不同炮制方法均能不同程度增强益母草的活血化瘀作用。

关键词: 炮制方法; 益母草; 化学成分; 活血化瘀

中图分类号: R283.1

文献标识码: A

Effects of different processing methods on chemical components and promoting blood circulation and removing blood stasis of Leonuri Herba

TANG Mu-cong¹, LU Yong^{2,3}, GAN Guo-xing^{2,3*}, DENG Gui-zhu^{2,3},

LONG Guo-bin^{2,3}, SONG Fei¹, CHEN Xiao-rui⁴, CHEN Hai-ming⁴

¹Qingyuan Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University (Qingyuan People's Hospital); ²Qingyuan

Hospital of Traditional Chinese Medicine; ³Engineering Technology Research Center of Fresh Medicine and

National Medicine of Guangdong Province; ⁴Food and Drug Inspection Institute of Qingyuan, Qingyuan

511520, China

Abstract: The effect of different processing methods on the chemical components of Leonuri Herba and the action of Leonuri Herba on promoting blood circulation and removing blood stasis was studied to provide guidance for

rational use of drugs. The Leonuri hydrochloride, Stachydrine hydrochloride, Rutin, Hyperin and Isoquercitrin were chose as the index to evaluate the effect of different processing methods on the alkaloid components and flavonoid components in Leonuri Herba. The thrombin time , fibrinogen , whole blood high shear viscosity , whole blood mid shear viscosity , whole blood low shear viscosity , whole blood high shear reduced viscosity , whole blood mid shear reduced viscosity , whole blood low shear reduced viscosity and plasma viscosity were chose as the index to evaluate the effect of different processing methods on the action of Leonuri Herba on promoting blood circulation and removing blood stasis based on acute blood stasis model rats. The results show that the contents of alkaloid components such as Leonurine hydrochloride and Stachydrine hydrochloride in Leonuri Herba were decreased slightly compared with before processing, and the flavonoid components such as Rutin, Hyperin and Isoquercitrin were decreased significantly. Leonuri Herba processed with different methods could differently improve the hemorheology index of acute blood stasis model rats. The study show that different processing methods have a little effect on the alkaloid components of Leonuri Herba, but have great effect on the flavonoid components. Different processing methods can differently improve the action of Leonuri Herba on promoting blood circulation and removing blood stasis.

Key words: processing method; Leonuri Herba; chemical components; promoting blood circulation and removing blood stasis

益母草是唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的新鲜或干燥地上部分，始载于《神农本草经》，具有活血调经，利尿消肿，清热解毒之功效。益母草炮制品的临床应用历史悠久，古代记载益母草的炮制方法多样，包括炒制、制炭、酒制、醋制、蜜制和四制等，现代主要有净制、酒制、醋制和四制^[1]。酒制能增强益母草的活血作用；醋制能增强益母草通利血脉，活血散瘀的作用；四制能增强益母草祛瘀生新和引药入肝肾的作用，并缓和其药性^[2]。不同炮制方法所得益母草的作用存在差异，其原因可能有两方面：一是炮制辅料的自身作用引起，二是炮制过程中化学成分变化引起。不同炮制方法对益母草化学成分和活血化瘀作用有何影响，本文通过研究不同炮制方法对益母草中盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的影响，阐明不同炮制方法对益母草生物碱类和黄酮类化学成分的影响；研究不同炮制方法对急性血瘀模型大鼠凝血功能和血液流变学指标的影响，阐明不同炮制方法对益母草活血化瘀作用的影响。以期为选择益母草的炮制方法提供依据，为临床合理应用益母草炮制品提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 药材与试剂

净制益母草饮片（亳州市华鑫中药饮片科技有限公司，产地：河南南阳，批号：02-20072401）。

黄酒（绍兴吴越酿酒有限公司酿造，酒精度 15% vol），9°米醋（山西老陈醋集团有限公司，总酸 ≥ 9.00 g/100 mL）；精制盐（食用盐，广东省盐业集团有限公司），白酒（酒精度，50% vol）和生姜（清远市先锋市场）；（江苏恒丰强生物技术有限公司，批号：20240301），盐酸肾上腺素注射液（远大医药中国有限公司，规格：1 mL:1 mg，批号：240209）；盐酸益母草碱（纯度：93.4%，批号：111823-201704）、盐酸水苏碱（纯度：99.2%，批号：110712-201916）、芦丁（纯度：90.2%，批号：10080-201408）、金丝桃苷（纯度：94.9%，批号：111521-201809）、异槲皮苷（纯度：92.9%，批号：111809-201403）对照品均购自中国食品药品检定研究院，1-辛烷磺酸钠（河南省万佳首化生物科技有限公司，批号：DE821040）；乙醇（广州化学试剂厂，批号：2019030118，分析纯）；磷酸（天津市富宇精细化工有限公司，批号：20150804B，分析纯）；乙腈（默克股份两合公司，色谱纯）等。

1.2 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪（美国沃特世公司），Agilent 1260 Infinity II 型蒸发光高效液相检测器（安捷伦公司），XS205 型电子分析天平（梅特勒-托利多公司），PS-100A 型超声波清洗器（东莞市洁康超声波设备有限公司），湘仪 TDZ5-WS 型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司），ABS 小型动物麻醉机（上海玉研科学仪器有限公司），CS-5100 型全自动凝血分析仪（日本希森美康），South 990FT3 全自动血液粘度动态分析仪（重庆南方数控设备股份有限公司）。

1.3 动物

48 只 SPF 级雌性 SD 大鼠，35~42 日龄，购自广东省医学实验动物中心，实验动物生产许可证号 SCXK（粤）2022-0002，动物合格证号 No.44007200135765。大鼠饲养于广州医科大学附属清远医院（清远市人民医院）实验动物中心屏障环境内，实验动物使用许可证号：SYXK（粤）2024-0206，给予普通标准饲料，自由摄食和饮水，饲养环境温度（ 23 ± 3 ）℃，相对湿度 $55\% \pm 15\%$ ，光/暗周期 12 h/12 h。动物实验经广州医科大学附属清远医院（清远市人民医院）实验动物伦理委员会批准，审批号：LAEC-2024-022。

1.4 炮制品制备方法

白酒制益母草（Leonuri Herba processed with Chinese Baijiu, LHB）：取净制益母草饮片 200 g，用 10%白酒喷洒拌匀，润透，文火炒干^[3,4]。

黄酒制益母草（Leonuri Herba processed with millet wine, LHM）：取净制益母草饮片 200 g，用 15%黄酒喷洒拌匀，润透，文火炒干^[5]。

醋制益母草 (Leonuri Herba processed with vinegar, LHV): 取净制益母草饮片 200 g, 用 20%米醋拌匀, 过夜, 取出, 蒸 1 h, 50 °C低温烘干。^[6]

姜酒制益母草 (Leonuri Herba processed with ginger and wine, LHGW): 取净制益母草饮片 200 g, 用 10% 黄酒、10%生姜汁混合液拌匀吸尽后, 蒸 2 h, 50 °C低温烘干^[7]。

广东四制益母草 (Guangdong Sizhi Leonuri Herba, LHDS): 取净制益母草饮片 200 g, 用 2%盐、10%米醋、10%黄酒、10%生姜汁混合液拌匀吸尽后, 蒸 2 h, 50°C低温烘干^[7]。

广西四制蒸益母草 (Guangxi Sizhizheng Leonuri Herba, LHXS): 取净制益母草饮片 200 g, 用 1%盐、10%米醋、5%黄酒、10%生姜汁混合液拌匀吸尽后, 蒸至圆气, 50°C低温烘干^[8]。

广西四制炒益母草 (Guangxi Sizhichao Leonuri Herba, LHXC): 取净制益母草饮片 200 g, 用 1%盐、10%米醋、5%黄酒、10%生姜汁混合液拌匀吸尽后, 文火炒干^[8]。

1.5 生物碱类成分含量测定方法

1.5.1 对照品溶液制备

盐酸水苏碱对照品溶液: 取盐酸水苏碱对照品适量, 精密称定, 加 70%乙醇制成每 1 mL 含约 0.5 mg 的溶液, 即得。

盐酸益母草碱对照品溶液: 取盐酸益母草碱对照品适量, 精密称定, 加 70%乙醇制成每 1 mL 含约 30 μg 的溶液, 即得。

1.5.2 供试品溶液制备

益母草炮制品粉末 (过 3 号筛) 约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 25 mL, 称定重量, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定重量, 用 70%乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

1.5.3 盐酸益母草碱含量测定

按照《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 2020 年版益母草含量测定项下方法测定盐酸益母草碱含量^[9]。采用 Phenomenex Kinetex[®]XB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) -0.4% 辛烷磺酸钠的 0.1% 磷酸溶液 (B) (24:76) 为流动相等度洗脱, 检测波长为 277 nm, 进样量为 10 μL, 柱温为 30 °C, 流速为 1 mL/min。分别精密吸取盐酸益母草碱对照品溶液和供试品溶液, 测定, 即得。

1.5.4 盐酸水苏碱含量测定

按照《中国药典》2020 年版益母草含量测定项下方法测定盐酸水苏碱含量^[9]。采用太玮科技 JADE-PAK 丙基酰胺键合硅胶 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.2%冰醋酸

溶液（80:20）为流动相等度洗脱，对照品溶液进样量分别为 5，10 μL ，供试品溶液进样量为 10 μL ，柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ ，流速为 1.0 mL/min，蒸发光散射检测器（漂移管温度 80 $^{\circ}\text{C}$ ，雾化器温度 60 $^{\circ}\text{C}$ ，氮气流速 1.6 L/min）。分别精密吸取盐酸水苏碱对照品溶液 5、10 μL ，供试品溶液 10 μL ，测定，即得。

1.6 黄酮类成分含量测定方法

1.6.1 色谱条件

采用 Phenomenex Kinetex[®]XB C₁₈（4.6 mm \times 250 mm，5 μm ）色谱柱，以乙腈（A）-0.1 磷酸（B）为流动相，梯度洗脱（0~15 min，12% A；15~20 min，12% \rightarrow 15% A；20~40 min，15% \rightarrow 17% A；40~42 min，17% \rightarrow 12% A；42~50 min，12% A），检测波长：355 nm，进样量：10 μL ，柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ，流速：1 mL/min。

1.6.2 对照品溶液制备

精密称取适量芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷对照品，置 50 mL 量瓶中，加入 70% 乙醇溶解并定容至刻度，制成每 1 mL 含芦丁 69.661 5 μg 、金丝桃苷 27.065 5 μg 、异槲皮苷 26.244 0 μg 的混合对照品溶液。

1.6.3 供试品溶液制备

精密称取益母草炮制品粉末 1.0 g（过 3 号筛），置 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 70% 乙醇 25 mL，密塞，称定重量，超声处理 60 min，冷却，称定重量，加 70% 乙醇补足减少的重量，摇匀，滤过，取续滤液即得。

1.6.4 方法学考察

1.6.4.1 定量限

取“1.6.2”项下的对照品溶液进行逐级稀释，进样分析，以信噪比（S/N）约为 10 时相应浓度确定其定量限。

1.6.4.2 检测限

取“1.6.2”项下的对照品溶液进行逐级稀释，进样分析，以信噪比（S/N）约为 3 时相应浓度确定其检测限。

1.6.4.3 线性关系考察

分别精密吸取芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的混合对照品溶液 1、2、4、5、6、8、10 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加 70%乙醇定容，摇匀。按“1.6.1”项下色谱条件进行测定，以进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y），确定各回归方程的线性关系及线性范围。

1.6.4.4 精密度试验

取上述混合对照品溶液，按“1.6.1”项下色谱条件进行测定，重复进样 7 次，记录芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的峰面积，计算其相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。

1.6.4.5 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别在第 0、1、2、4、8、12、24 h 后，按“1.6.1”项下色谱条件进行测定，记录芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的峰面积，计算其 RSD。

1.6.4.6 重复性试验

精密称取同一个益母草炮制品 7 份，制备供试品溶液，按“1.6.1”项下色谱条件进行测定，计算芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的含量及 RSD。

1.6.4.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的益母草炮制品 9 份，每份 1.0 g，以样品含量的约 50%、100%、150% 分别加入芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷对照品，按“1.6.3”项下方法制备供试品溶液，按“1.6.1”项下色谱条件进行测定，计算芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的回收率及 RSD。

1.6.5 样品含量测定

按“1.6.3”项下方法制备益母草炮制品供试品溶液，按“1.6.1”项下色谱条件测定芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的含量。

1.7 活血化瘀作用研究方法

1.7.1 药物制备

取净制益母草粉末（过 3 号筛）50 g，置圆底烧瓶中，加 30 倍量饮用水，加热回流提取 60 min，趁热用 200 目筛过滤，滤液减压浓缩至 200 mL，制成相当于生药 0.25 g/mL 的药液。醋制益母草、黄酒制益母草、广西四制蒸益母草药物制备方法同净制益母草。

1.7.2 动物分组及给药

SD 大鼠适应性饲养 7 d，按体质量随机分为正常组 (control, Con)、模型组 (model, Mod)、净制益母草组 (Leonuri Herba, LH)、醋制益母草组 (LHV)、黄酒制益母草组 (LHM)、广西四制蒸益母草组 (LHXS)，共 6 组，每组 8 只。除正常组和模型组大鼠灌胃纯净水外，其余各组大鼠灌胃给予相应药物 2.5 g/kg，灌胃体积均为 10 mL/kg。每天灌胃 1 次，连续 7 d。

1.7.3 急性血瘀大鼠模型制备

参考文献方法^[10]，最后一次给药后禁食不禁水饲养，正常组皮下注射等量生理盐水，其余各组皮下注射盐酸肾上腺素注射液 (0.8 mL/kg)，共 2 次，间隔 4 h，并在第 1 次皮下注射 2 h 后将大鼠浸入 0~2 °C 冰水浴 5 min，复制急性血瘀大鼠模型。

1.7.4 凝血功能及血液流变学指标检测

复制急性血瘀大鼠模型 12 h 后, 异氟烷麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 2 mL 真空采血管 (枸橼酸钠 1:9 抗凝) 收集全血 2 mL, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血浆, 全自动凝血分析仪测定凝血酶时间 (thrombin time, TT) 和纤维蛋白原 (fibrinogen, Fib); 5 mL 真空采血管 (肝素钠抗凝) 收集全血 5 mL, 全自动血液粘度动态分析仪检测全血高切粘度 (200/s) (whole blood high shear viscosity, HS)、全血中切粘度 (50/s) (whole blood mid shear viscosity, MS)、全血低切粘度 (1/s) (whole blood low shear viscosity, LS)、全血高切还原粘度 (200/s) (whole blood high shear reduced viscosity, HSR)、全血中切还原粘度 (50/s) (whole blood mid shear reduced viscosity, MSR)、全血低切还原粘度 (1/s) (whole blood low shear reduced viscosity, LSR) 以及血浆粘度 (plasma viscosity, PV) 等血液流变学指标。

1.8 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件对数据进行统计分析, 数据均以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。方差齐的, 采用单因素方差分析及 *t* 检验; 方差不齐的, 采用非参数秩和检验。

2 结果与分析

2.1 黄酮类成分含量测定方法学考察

定量限和检测限试验确定芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的定量限分别为 0.23、0.27、0.26 $\mu\text{g/mL}$, 检测限分别为 0.08、0.09、0.09 $\mu\text{g/mL}$ 。线性关系考察芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的 *r* 值均大于 0.999, 表明各回归方程线性关系良好, 结果见表 1; 精密度试验芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.94%、0.94%、0.93%, 表明仪器精密度良好; 稳定性试验芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 2.2%、2.3%、2.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定; 重复性试验芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的平均含量分别为 0.016 0%、0.012 3%、0.008 3%, RSD 分别为 0.83%、1.1%、1.1%, 表明该方法重复性良好; 加样回收率试验芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的平均加样回收率分别为 100.8%、100.6%、100.2%, RSD 分别为 2.1%、1.5%、1.3%, 表明该方法稳定可行, 结果见表 2。

表 1 各目标化合物的 HPLC 线性关系和范围结果

Table 1 The HPLC linear relationship and ranges of target compounds

化合物 Compound	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient (<i>r</i>)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/mL}$)
芦丁 Rutin	$y=24\ 680.763\ 6x+2\ 899.866\ 2$	0.999 9	6.967~69.665
金丝桃苷 Hypericin	$y=32\ 144.811\ 2x+1\ 142.443\ 7$	0.999 9	2.707~27.066

表 2 加样回收率试验结果

Table 2 The result of recovery rate test

化合物 Compound	编号 Reference number	称样量	样品含量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	
		Sample weight (g)	Sample amount (μg)	Added amount (μg)	Measured amount (μg)	Recovery rate (%)	Average recovery rate (%)	RSD (%)
芦丁 Rutin	1	1.015 1	157.544	78.369 2	235.429	99.38		
	2	1.015 1	157.544	78.369 2	240.474	105.8		
	3	1.015 1	157.544	78.369 2	236.015	100.1		
	4	1.076 6	167.088	156.738 3	321.181	98.31		
	5	1.076 6	167.088	156.738 3	325.234	100.9	100.8	2.1
	6	1.076 6	167.088	156.738 3	322.329	99.04		
	7	1.034 1	160.492	229.882 8	394.632	101.9		
	8	1.034 1	160.492	229.882 8	391.119	100.3		
	9	1.034 1	160.492	229.882 8	393.328	101.3		
金丝桃苷 Hypericin	1	1.015 1	121.112	60.897 3	181.947	99.90		
	2	1.015 1	121.112	60.897 3	180.960	98.28		
	3	1.015 1	121.112	60.897 3	183.307	102.1		
	4	1.076 6	128.449	121.794 7	252.548	101.9		
	5	1.076 6	128.449	121.794 7	249.083	99.05	100.6	1.5
	6	1.076 6	128.449	121.794 7	250.662	100.3		
	7	1.034 1	123.379	178.632 2	304.665	101.5		
	8	1.034 1	123.379	178.632 2	301.640	99.79		
	9	1.034 1	123.379	178.632 2	306.544	102.5		
异槲皮苷 Isoquercitin	1	1.015 1	81.726	39.366 0	120.628	98.82		
	2	1.015 1	81.726	39.366 0	120.358	98.14		
	3	1.015 1	81.726	39.366 0	121.679	101.5	100.2	1.3
	4	1.076 6	86.677	78.732 0	166.024	100.8		

5	1.076 6	86.677	78.732 0	165.025	99.51
6	1.076 6	86.677	78.732 0	165.942	100.7
7	1.034 1	83.255	157.464 0	241.943	100.9
8	1.034 1	83.255	157.464 0	243.883	102.0
9	1.034 1	83.255	157.464 0	239.370	99.14

2.2 不同炮制方法对益母草生物碱类成分的影响

炮制后益母草中盐酸益母草碱和盐酸水苏碱含量略有下降，不同炮制方法所致下降程度不同，表明不同炮制方法对益母草生物碱类成分的影响存在差异。黄酒和白酒炮制对益母草生物碱类成分的影响存在差异，具体原因有待进一步研究明确。炒制对益母草中生物碱类成分影响较大，原因可能是高温对生物碱类成分影响较大。广东四制益母草中生物碱类成分含量低于广西四制蒸益母草，主要原因可能是蒸制时间较长所致^[11]。醋制可以促进生物碱类成分溶出，但是醋制益母草中生物碱类成分含量略有下降，推测可能是蒸制受热所致，结果见表 3。

表 3 不同炮制方法对益母草生物碱类成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 The effects of different processing methods on the content of alkaloid components of Leonuri Herba ($\bar{x} \pm s, n=3$)

炮制品	盐酸益母草碱	盐酸水苏碱	生物碱类成分
Processed product	Leonurine hydrochloride (%)	Stachydrine hydrochloride (%)	Alkaloids component (%)
LH	0.277±0.001	1.970±0.012	2.247±0.013
LHV	0.264±0.001 ^{##}	1.945±0.018	2.209±0.017
LHB	0.271±0.003	1.823±0.050 [#]	2.094±0.053 [#]
LHM	0.256±0.000 ^{##}	1.660±0.020 ^{##}	1.916±0.020 ^{##}
LHGW	0.256±0.001 ^{##}	1.887±0.007 ^{##}	2.145±0.007 ^{##}
LHDS	0.250 ±0.003 ^{##}	1.885±0.032 [#]	2.135±0.034 [#]
LHXS	0.270±0.004	1.927±0.037	2.197±0.041
LHXC	0.251±0.006 [#]	1.820±0.020 [#]	2.071±0.009 ^{##}

注：与 LH 比，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

Note: Compared with LH, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。

2.3 不同炮制方法对益母草黄酮类成分的影响

不同方法炮制后，益母草中芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷等黄酮类成分含量均有不同程度减少，而且减少幅度较大，表明炮制对益母草黄酮类成分影响较大；不同炮制方法所致减少幅度不同，表明不同炮制方法对益母草黄酮类成分的影响存在差异。黄酒和白酒对益母草黄酮类成分的影响存在差异，具体原因有待进一步研究阐明。姜酒制和广东四制益母草黄酮类成分含量减少幅度较大，其原因可能是蒸制时间较长所致。广西四制益炒母草制比蒸制的黄酮类成分含量明显减少，推测可能是炒制时温度较高所致。结果见图 1、表 4。

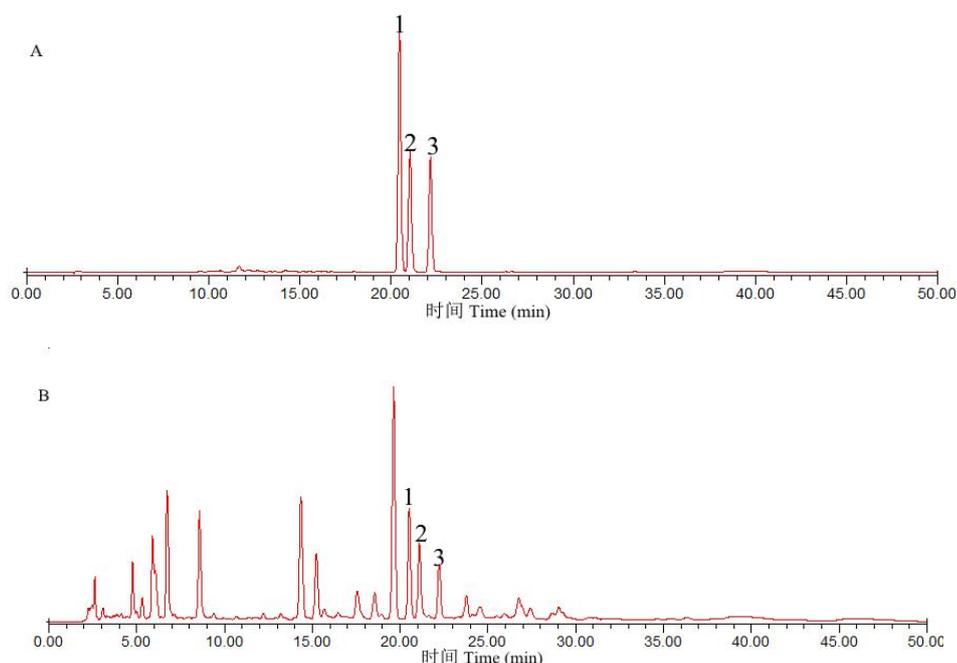


图 1 混合对照品 (A) 和益母草 (B) 的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed chemical reference standards(A) and Leonuri Herba(B)

注：1. 芦丁；2. 金丝桃苷；3. 异槲皮苷。

Note: 1. Rutin; 2. Hypericin; 3. Isoquercitin.

表 4 不同炮制方法对益母草黄酮类成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 The effects of different processing methods on the content of flavonoid components of Leonuri Herba

($\bar{x} \pm s, n=3$)

炮制品	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷	黄酮类成分
Processed product	Rutin (%)	Hypericin (%)	Isoquercitin (%)	Flavonoids (%)
LH	0.0214	0.0159	0.0104	0.0477
	± 0.0000	± 0.0000	± 0.0000	± 0.0000
LHV	0.0200	0.0134	0.0094	0.0428

	±0.000 1 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 3 [#]
LHB	0.018 1	0.012 4	0.008 6	0.039 2
	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]
LHM	0.015 0	0.010 2	0.007 0	0.032 2
	±0.000 1 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 2 [#]
LHGW	0.012 3	0.008 2	0.005 7	0.026 2
	±0.000 1 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 2 [#]
LHDS	0.012 7	0.008 6	0.005 9	0.027 2
	±0.000 1 [#]	±0.000 1 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 3 [#]
LHXS	0.019 5	0.013 8	0.009 3	0.042 6
	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 0 [#]
LHXC	0.017 2	0.010 8	0.008 0	0.036 0
	±0.000 1 [#]	±0.000 1 [#]	±0.000 0 [#]	±0.000 2 [#]

注：与 LH 比，[#] $P<0.05$ ，[#] $P<0.01$ 。

Note: Compared with LH, [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$ 。

2.4 不同益母草炮制品对急性血瘀模型大鼠凝血功能指标的影响

与正常组比较，急性血瘀模型大鼠凝血酶时间显著缩短 ($P<0.01$)，纤维蛋白原含量显著增加 ($P<0.01$)。与模型组比较，广西四制蒸益母草组大鼠凝血酶时间显著延长 ($P<0.05$)，纤维蛋白原含量显著减少 ($P<0.05$)，醋制益母草组和黄酒制益母草组大鼠凝血酶时间有延长的趋势。与净制益母草组比较，广西四制蒸益母草组大鼠凝血酶时间有延长的趋势，纤维蛋白原含量有减少的趋势，其余两个给药组变化不明显。结果见表 5。

表 5 不同益母草炮制品对急性血瘀模型大鼠凝血功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 5 Effects of different processed Leonuri Herba on the coagulation function index of acute blood stasis model

rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)		
组别 Group	凝血酶时间 TT(s)	纤维蛋白原 Fib(g/L)
Con	32.70±5.00 ^{▲▲}	2.96±0.47 ^{▲▲}
Mod	26.49±0.40	4.13±0.18
LH	26.83±0.17	4.08±0.10
LHV	27.18±0.65	4.13±0.11

LHM	27.51±0.70	4.08±0.12
LHXS	31.10±1.42 [▲]	3.27±0.45 [▲]

注：与 Mod 比较，[▲] $P<0.05$ ，^{▲▲} $P<0.01$ 。

Note: Compared with Mod, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$ 。

2.5 不同益母草炮制品对急性血瘀模型大鼠血液流变学指标的影响

与正常组比较，急性血瘀模型大鼠全血高切粘度、中切粘度、低切粘度明显升高($P<0.05$)，血浆粘度、全血高切还原粘度、中切还原粘度、低切还原粘度有升高的趋势，表明模型制备成功。与模型组比较，各给药组大鼠血浆粘度均有下降的趋势；净制益母草组大鼠全血高切粘度、中切粘度、低切粘度均有下降的趋势；醋制益母草组大鼠各项指标均有下降的趋势；黄酒制益母草组大鼠低切还原粘度显著下降($P<0.05$)，其余指标均有下降的趋势；广西四制蒸益母草组大鼠各项指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与净制益母草组比较，各给药组大鼠除血浆粘度外，其余各项指标均有不同程度改善，结果见表 6。

表 6 不同益母草炮制品对急性血瘀模型大鼠血液流变学指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 6 Effects of different processed Leonuri Herba on the hemorheology index of acute blood stasis model rats

($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)							
组别	全血高切粘度	全血中切粘度	全血低切粘度	血浆粘度	全血高切还原粘度	全血中切还原粘度	全血低切还原粘度
Group	HS (mPa.s)	MS (mPa.s)	LS (mPa.s)	PV (mPa.s)	HSR (mPa.s)	度 MSR (mPa.s)	LSR (mPa.s)
Con	6.84±0.36 [▲]	8.12±0.49 [▲]	20.99±1.73 [▲]	1.69±0.13	5.66±0.31	7.04±0.50	20.81±0.87
Mod	8.33±0.54	9.85±0.52	26.80±2.18	1.97±0.11	6.03±0.32	7.49±0.31	23.20±1.20
LH	7.83±0.36	9.09±0.38	25.78±0.57	1.74±0.08	6.27±0.28	7.56±0.26	24.92±1.03
LHV	7.18±0.55	8.56±0.60	24.93±1.64	1.83±0.14	5.33±0.41 [#]	6.70±0.42	22.91±1.15
LHM	7.16±0.49	8.48±0.36	22.19±1.79	1.83±0.10	5.21±0.31 [#]	6.50±0.35 [#]	19.90±1.36 ^{▲##}
LHXS	6.72±0.43 [▲]	7.91±0.52 ^{▲▲}	21.25±1.44 [▲]	1.84±0.05	4.59±0.24 ^{▲▲##}	5.70±0.29 ^{▲▲##}	18.26±0.45 ^{▲▲##}

注：与 Mod 比较，[▲] $P<0.05$ ，^{▲▲} $P<0.01$ ；与 LH 比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

Note: Compared with Mod, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$; Compared with LH, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。

3 讨论与结论

生物碱类成分是益母草的主要药效成分，具有利尿、抗血小板聚集、抗炎、抗氧化等生物活性^[12]；黄酮类成分是益母草的主要化学成分之一，具有抗氧化、抑菌、抗炎、保护子宫和心脑血管系统等药理作用^[13]。本研究结果表明不同炮制方法对益母草生物碱类和黄

酮类成分均有影响,对生物碱类成分影响相对较小,对黄酮类成分影响相对较大,不同的炮制方法影响程度不同,其影响因素可能与炮制辅料和工艺有关^[14,15]。本研究还发现不同种类的酒炮制对益母草生物碱类和黄酮类成分的影响存在差异,黄酒炮制后益母草生物碱类和黄酮类成分损失较大。

本研究结果显示不同方法炮制后益母草的活血化瘀作用增强,广西四制蒸益母草的活血化瘀作用尤其显著。黄酒制益母草的生物碱类成分和黄酮类成分含量明显低于醋制益母草,但是两者的活血化瘀作用相当;醋制益母草和广西四制蒸益母草的生物碱类成分和黄酮类成分含量相当,但是活血化瘀作用存在一定差异。Kendall's tau_b 和 Spearman's rho 分析发现,净制益母草、醋制益母草、黄酒制益母草、广西四制蒸益母草与凝血功能指标呈极显著的正相关关系,与血液流变学指标呈极显著的负相关关系;盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的含量与凝血功能指标和血液流变学指标没有明显相关性。不同炮制方法增强益母草活血化瘀作用的机制是什么,还需进一步研究阐明。

本文研究醋制、酒制、四制等不同炮制方法对益母草生物碱类和黄酮类化学成分的影响,阐释不同炮制方法对益母草活血化瘀作用的影响,为选择益母草的炮制方法提供依据,为临床合理应用益母草炮制品提供参考。但是,益母草的化学成分种类丰富,本文仅研究了不同炮制方法对益母草中盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的影响,尚未研究不同炮制方法对益母草其它化学成分的影响,今后将进一步深入研究予以阐明。不同炮制方法均可以增强益母草的活血化瘀作用,但是具体机制尚未明确,还有待今后进一步深入研究阐明。

参考文献

- 1 Liu X,Xu C,Guo XH,et al.Processing history and modern pharmaceutical research progress of Leonuri Herba[J].Chin Pharm(中国药房),2017,28:3147-3150.
- 2 Ma EY.Study on the processing technology and the quality of four system *Leonurus japonicus*[D].Guangzhou:Guangzhou University of Chinese Medicine(北京中医药大学),2018.
- 3 Food and Drug Administration of Chongqing.Chinese herbal pieces processing norms and standards of Chongqing(重庆市中药饮片炮制规范及标准)[M].Chongqing:Health Bureau of Chongqing,2006:381-382.
- 4 Drug Administration of Sichuan.Chinese Herbal Pieces Processing Norms of Sichuan Province(四川省中药饮片炮制规范)[M].Chengdu:Drug Administration of Sichuan,2015:456-457.
- 5 Ministry of Public Health of the People's Republic of China.Traditional Chinese medicine processing norms of China(全国中药炮制规范)[M].Beijing:People's Medical Publishing House,1988:234-235.

- 6 Health Department of Guangdong Province.Traditional Chinese Medicine Processing Norms of Guangdong Province(广东省中药炮制规范)[M].Guangzhou:Health department of Guangdong province,1984:198.
- 7 Health Department of Guangdong province.Chinese Herbal Processing Manual of Guangdong province(广东省中药材饮片加工炮制手册)[M].Guangzhou:Health department of Guangdong Province,1977:142.
- 8 Food and Drug Administration of Guangxi Zhuang Autonomous Region.Chinese Herbal Pieces Processing Norms of Guangxi Zhuang Autonomous Region(广西壮族自治区中药饮片炮制规范)[M].Nanning:Guangxi Science Press,2007:299-300.
- 9 Chinese Pharmacopoeia Commission.Pharmacopoeia of the People's Republic of China:Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M].Beijing:China Medical Science Press,2020:290-291.
- 10 Qiao JJ,Wu QN,Xue M,et al.Comparison between traditional and integrated processing technology of Leonuri Herba based on chemical composition and pharmacological effect[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2019,25:101-107.
- 11 Li TA,Wang YS,Wang Y,et al.Research progress of chemical composition,pharmacological action and predictive analysis of quality markers of Leonuri Herba[J/OL].Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊):1-35[2024-10-22].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240626.1138.009.html>.
- 12 Liu LY,Hong WM,Zhang ZP,et al.Study on the quality standard of fresh *Leonurus japonicus* Houtt. formula granules based on standard decoction[J/OL].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发):1-25[2024-10-22].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20240820.1324.004.html>.
- 13 Long GB,Gan GX,Xiang YF,et al.Effects of steaming and soaking on the active ingredient of Sizhi Yimucao[J].Chin Med Mod Dis Edu China(中国中医药现代远程教育),2022,20:151-154.
- 14 Weng ZP,Liang JJ.The quality research of different processed products of *Leonurus heterophyllus*[J].Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药),2019,28:31-34.
- 15 Gan GX,Zhu WX,Long GB,et al.Scientific evaluation of processing excipients of Sizhi Leonuri Herba based on pharmacodynamic ingredients[J].Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学),2021,38:572-575.

收稿日期: 2024-07-29 接受日期:

基金项目: 广东省中医药局科研项目(20221464)

*通信作者 Tel:18211320398; E-mail:guoxinggan@126.com