

# 不同盐制方法对牛膝中有效成分含量的影响

张振凌\*, 胡婷婷, 田双双, 吴金婷

(河南中医药大学药学院, 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046)

**[摘要]** **目的:**比较盐粒拌炒和盐水炙牛膝2种不同方法对牛膝中 $\beta$ -蜕皮甾酮, 25R-牛膝甾酮和25S-牛膝甾酮含量的影响, 为牛膝盐制工艺研究提供参考。**方法:**采用HPLC测定 $\beta$ -蜕皮甾酮, 25R-牛膝甾酮和25S-牛膝甾酮的含量, 流动相乙腈-水-甲酸(16:84:0.1), 检测波长250 nm。以牛膝生品为参考, 考察2种盐制方法对牛膝中指标成分含量的影响。**结果:**盐水炙样品中以每100 g牛膝加食盐1 g, 在150~180℃下炒制15 min的含量最高, 盐粒拌炒样品以每100 g牛膝加食盐2 g, 150~180℃炒制4 min的含量最高。盐水炙样品中 $\beta$ -蜕皮甾酮, 25R-牛膝甾酮, 25S-牛膝甾酮质量分数均以3号样品为最高, 分别为0.083%, 0.015 7%, 0.010%; 盐粒拌炒样品中三者的最高质量分数分别为0.100%, 0.019 1%, 0.012 3%。**结论:**盐粒拌炒牛膝的样品中3种甾酮类成分的含量均大于生品和盐水炙牛膝的样品, 2种不同盐制方法对牛膝中有效成分均有影响, 为牛膝盐制工艺的确定提供参考。

**[关键词]** 牛膝; 盐水炙; 盐粒拌炒;  $\beta$ -蜕皮甾酮; 25R-牛膝甾酮; 25S-牛膝甾酮; 炮制工艺

**[中图分类号]** R283.3; R284.1; R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0010-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030010

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1054.034.html>

**[网络出版时间]** 2016-08-04 10:54

## Effect of Different Salting Methods on Content of Effective Components in *Achyranthis Bidentatae Radix*

ZHANG Zhen-ling\*, HU Ting-ting, TIAN Shuang-shuang, WU Jin-ting

(Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare effect of stir-frying with sized salt and baked with salt solution on contents of  $\beta$ -hydroxyecdysone, 25R-inokosterone and 25S-inokosterone in *Achyranthis Bidentatae Radix*. **Method:** HPLC was adopted to determine contents of  $\beta$ -hydroxyecdysone, 25R-inokosterone and 25S-inokosterone with mobile phase of acetonitrile-water-formic acid (16:84:0.1) and detection wavelength of 250 nm. Raw products of *Achyranthis Bidentatae Radix* was used as reference to examine effect of these two salting technologies on contents of index ingredients. **Result:** Contents of index ingredients in samples baked with salt solution were the highest when 1 g of salt was included in 100 g of *Achyranthis Bidentatae Radix*, and being fried for 15 mins at 150-180℃; those in samples stir-fried with sized salt were the highest when 2 g of salt was included in 100 g of *Achyranthis Bidentatae Radix*, and being fried for 4 mins at 150-180℃. Contents of  $\beta$ -hydroxyecdysone, 25R-inokosterone and 25S-inokosterone in No. 3 samples were the highest among samples baked with salt solution, which were 0.083%, 0.015 7% and 0.010%; the highest contents of these three ingredients of samples stir-fried

**[收稿日期]** 20160529(005)

**[基金项目]** 国家科技基础性工作专项(2014FY111100-7);河南中医学院科研苗圃工程项目(MP2015-86);呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心研究生科研创新基金项目(教科技[2013]638号)

**[通讯作者]** \*张振凌, 博士生导师, 从事中药饮片及新药研究, Tel:0371-65680970, E-mail: zzhzzy@126.com

with sized salt were 0.100%, 0.0191%, 0.0123%, respectively. **Conclusion:** Contents of three kinds of ketosteroid ingredients in samples stir-fried with sized salt are more than those in raw products and samples baked with salt solution, different salting technologies both have effect on effective ingredients in *Achyranthis Bidentatae Radix*.

[**Key words**] *Achyranthis Bidentatae Radix*; baked with salt solution; stir-frying with sized salt;  $\beta$ -hydroxyecdysone; 25R-inokosterone; 25S-inokosterone; processing technology

牛膝始载于《神农本草经》<sup>[1-2]</sup>,具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行之功效,用于腰膝酸痛、筋骨无力、经闭癥瘕、肝阳眩晕等证。牛膝中含有皂苷类、甾酮类、多糖类、甜菜碱和多种微量元素等,其中以齐墩果酸型三萜皂苷、蜕皮甾酮和多糖类为其主要活性成分<sup>[3]</sup>。文献表明牛膝经盐炙后能够增强补肝肾、强筋骨之功效<sup>[4]</sup>,而药理研究证实牛膝中甾酮类物质(主要包括 $\beta$ -蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮和25S-牛膝甾酮等)有促进成骨样细胞增殖作用<sup>[5]</sup>,这与盐牛膝补肝肾、强筋骨之效相吻合。

《全国中药炮制规范》1988年版虽然记载了盐牛膝的炮制方法,但未规定其关键的炮制参数<sup>[6]</sup>。部分省炮制规范也收载有盐牛膝,在《上海市中药饮片炮制规范》2008年版中,盐炒牛膝炮制方法为取牛膝,照炒法(附录I)用盐拌炒至鼓起,筛去食盐<sup>[7]</sup>;而《贵州省中药饮片炮制规范》2005年版中盐牛膝的炮制方法为取净牛膝段,照盐水炙法(附录收载的炮制通则),炒干<sup>[8]</sup>。目前用盐水炙牛膝的文献报道较多,但对于盐粒拌炒牛膝的研究尚未见报道。现代关于盐牛膝工艺的研究中主要针对齐墩果酸型皂苷类成分<sup>[9-10]</sup>,而对于其甾酮类成分的研究鲜有报道。本实验将盐水拌炒和盐粒拌炒2种炮制方法分别进行研究,以牛膝中 $\beta$ -蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮和25S-牛膝甾酮的含量为评价指标,采用正交试验考察加盐量、炮制温度、炮制时间等因素对盐牛膝中甾酮类成分含量的影响,为牛膝盐制的规范化炮制提供参考依据。

## 1 材料

e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),LHP-10-H型实验室超纯水器(重庆力德高端水处理设备研发有限公司),DK-98-11型电热恒温水浴锅(上海光学仪器厂),BSA224S-CW型1/1万电子天平(上海光学仪器厂),BT25S型1/10万电子天平[赛多利斯科技仪器(北京)有限公司],FW-200型高速万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)。

牛膝药材购自于河南省武陟县大丰乡架部四村,经河南中医药大学药教研室陈随清教授鉴定

为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* 的干燥根; $\beta$ -蜕皮甾酮(成都普思生物科技股份有限公司,批号PS14053001),齐墩果酸对照品(成都曼思特生物科技股份有限公司,批号MUST-16030105),25R-牛膝甾酮和25S-牛膝甾酮对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为151225,151220),水为超纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

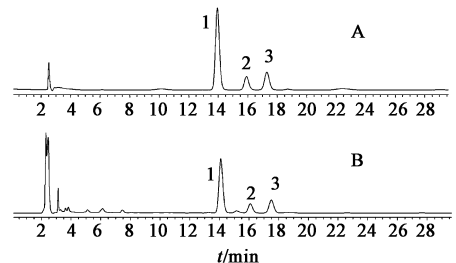
## 2 方法与结果

**2.1 样品的制备** 取牛膝药材,切去芦头,抢水洗净,闷润1~2h至软化(弯曲法检查对折不折断),切6mm短段,60℃烘4~6h,至干(含水量7%~13%)。

**2.1.1 盐水炙牛膝** 称取牛膝生品饮片100g,加入含水8mL的0.9%生理盐水,闷润一定时间,置热锅内翻炒一定时间,取出放凉,筛去食盐,即得。

**2.1.2 盐粒拌炒牛膝** 取一定量食盐,置热锅内,翻动,待其炒至滑利,投入事先称好的牛膝生品饮片,炒至表面微具焦斑,稍鼓起,取出,筛去食盐,放凉,即得。

**2.2 色谱条件** ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6mm×250mm,5 $\mu$ m),流动相乙腈-水-甲酸(16:84:0.1),流速1.0mL·min<sup>-1</sup>,柱温35℃,检测波长250nm,进样量10 $\mu$ L,见图1。



A. 供试品; B. 对照品; 1.  $\beta$ -蜕皮甾酮; 2. 25R-牛膝甾酮; 3. 25S-牛膝甾酮

图1 牛膝 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Achyranthis Bidentatae Radix*

**2.3 对照品溶液的制备** 分别精密称取 $\beta$ -蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮对照品2.66,0.56,0.74mg,置于25mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至

刻度,得混合对照品溶液。

**2.4 供试品溶液的制备** 分别取盐牛膝饮片粉末(过三号筛)及盐制留样的粉末 1.0 g,每个样品取 2 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入水饱和的正丁醇溶液 30 mL,密塞,浸泡过夜,超声处理(300 W,40 kHz)30 min,滤过,用甲醇 10 mL 分数次洗涤容器及残渣,合并滤液和洗液,置水浴上蒸干,残渣加甲醇使溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.5 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品溶液 5,10,15,20,25 μL,按 2.2 项下色谱条件检测,以进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标,得 β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮回归方程分别为  $Y = 1.00 \times 10^6 X - 11\ 650 (R^2 = 0.999\ 98)$ ,  $Y = 1.00 \times 10^6 X - 4\ 124.4 (R^2 = 0.999\ 99)$ ,  $Y = 1.00 \times 10^6 X - 6\ 898.3 (R^2 = 0.999\ 99)$ ,线性范围依次为 0.532 ~ 2.66,0.112 ~ 0.56,0.148 ~ 0.74 μg。

**2.6 精密度试验** 取同一供试品溶液,按 2.2 项下

色谱条件重复进样 6 次,结果 β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮峰面积积分值的 RSD 分别为 0.4%,0.9%,0.9%,表明仪器精密度良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一样品的供试品溶液,分别在 0,3,6,9,12,24 h 按 2.2 项下色谱条件测定,结果 β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮峰面积积分值的 RSD 分别为 1.8%,1.6%,2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 重复性试验** 取同一样品的供试品溶液 6 份,按 2.2 项下色谱条件测定,结果 β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮峰面积积分值的 RSD 均为 1.5%,表明该方法重复性良好。

**2.9 加样回收试验** 精密称取同一批已知指标成分含量的样品 6 份,每份 0.5 g,各精密加入 β-蜕皮甾酮(0.561 g·L<sup>-1</sup>),25R-牛膝甾酮(0.105 g·L<sup>-1</sup>),25S-牛膝甾酮(0.164 g·L<sup>-1</sup>)对照品溶液 1 mL,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件测定,计算加样回收率,见表 1。说明该方法准确可靠。

表 1 牛膝中 β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮的加样回收率试验

Table 1 Recovery tests of β-hydroxyecdysone,25R-inokosterone and 25S-inokosterone in Achyranthis Bidentatae Radix

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
β-蜕皮甾酮	0.500 4	0.560	0.561	1.114	98.72	98.78	0.9
	0.500 8	0.561	0.561	1.111	97.99		
	0.500 6	0.561	0.561	1.122	100.02		
	0.500 4	0.560	0.561	1.117	99.12		
	0.500 5	0.561	0.561	1.116	98.99		
	0.500 1	0.560	0.561	1.108	97.62		
25R-牛膝甾酮	0.500 4	0.108	0.105	0.211	98.23	98.57	1.0
	0.500 8	0.108	0.105	0.210	97.67		
	0.500 6	0.108	0.105	0.212	99.45		
	0.500 4	0.108	0.105	0.211	98.94		
	0.500 5	0.108	0.105	0.212	99.32		
	0.500 1	0.108	0.105	0.213	100.21		
25S-牛膝甾酮	0.500 4	0.165	0.164	0.325	97.46	98.48	0.7
	0.500 8	0.165	0.164	0.326	97.89		
	0.500 6	0.165	0.164	0.327	98.45		
	0.500 4	0.165	0.164	0.327	98.64		
	0.500 5	0.165	0.164	0.328	99.54		
	0.500 1	0.165	0.164	0.326	98.42		

**2.10 样品测定** 按 2.4 项下方法制备同一批次牛膝不同盐制方法的供试品溶液(n=3),根据水分测定结果换算为干燥品中 β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮的含量,见表 2。结果显示盐水炙样品中 β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮含量

均以 3 号样品为最高;盐粒拌炒样品中 β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮的含量以 15 号样品最高。

### 3 讨论

本文结果显示盐水炙样品中 3 号样品含量

表2 牛膝中β-蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮,25S-牛膝甾酮的含量测定(n=3)

Table 2 Determination of β-hydroxyecdysone, 25R-inokosterone and 25S-inokosterone in *Achyranthis Bidentatae Radix* (n=3)

样品	A 食盐 /g	B 闷润时间 /min	C 锅底温度 /°C	D 炒制时间 /min	β-蜕皮甾酮 /%	25R-牛膝甾酮 /%	25S-牛膝甾酮 /%
1	1	30	90 ~ 120	5	0.077	0.014 9	0.009 4
2	1	60	120 ~ 150	10	0.077	0.014 9	0.009 4
3	1	90	150 ~ 180	15	0.083	0.015 7	0.010 0
4	2	30	120 ~ 150	15	0.074	0.014 2	0.009 0
5	2	60	150 ~ 180	5	0.073	0.014 1	0.009 0
6	2	90	90 ~ 120	10	0.079	0.015 0	0.009 6
7	3	30	150 ~ 180	10	0.073	0.013 9	0.008 8
8	3	60	90 ~ 120	15	0.081	0.015 7	0.009 9
9	3	90	120 ~ 150	5	0.076	0.014 5	0.009 2
10	1	-	90 ~ 120	4	0.091	0.017 5	0.011 2
11	1	-	120 ~ 150	8	0.091	0.017 2	0.011 0
12	1	-	150 ~ 180	12	0.087	0.016 1	0.010 5
13	2	-	90 ~ 120	8	0.096	0.018 0	0.011 7
14	2	-	120 ~ 150	12	0.091	0.017 4	0.011 2
15	2	-	150 ~ 180	4	0.100	0.019 1	0.012 3
16	3	-	90 ~ 120	12	0.099	0.017 9	0.011 8
17	3	-	120 ~ 150	4	0.094	0.017 9	0.011 6
18	3	-	150 ~ 180	8	0.093	0.018 0	0.011 7
0	-	-	-	-	0.079	0.015 4	0.009 7

注:1~9号为盐水炙牛膝样品,10~18为盐粒拌炒牛膝样品,0号为牛膝生品样品。

最高,即每100g牛膝加食盐1g,闷润时间90min,在150~180℃炒制15min;盐粒拌炒样品中15号样品含量最高,即每100g牛膝加食盐2g,在150~180℃炒制4min。结果表明盐粒拌炒牛膝中3种甾酮类成分的含量均大于生品和盐水炙牛膝。本文研究结果与之前有关牛膝盐炙的报道结果相一致,即牛膝盐炙后,其甾酮类成分含量显著提高。但之前牛膝盐炙文献仅有传统盐炙方法研究,而尚无文献对盐粒拌炒方法进行研究,本研究在传统盐炙牛膝方法的基础上,探讨了盐粒拌炒牛膝的炮制研究。

通过研究发现,影响主要成分含量的主要因素为炒制温度和时间,而用盐量较前两者影响不是很大。当温度为150~180℃时,盐水炙样品和盐粒拌炒样品均最优,低于此温度(90~120,120~150℃)的其他样品含量相对较低;盐水炙样品的最佳炒制时间为15min,而盐粒拌炒样品的最佳炒制时间为4min,不宜过长。这可能与盐粒拌炒的实验操作条件相对盐水拌炒更容易控制有关。在盐水拌炒牛膝过程中,盐水闷润牛膝后,牛膝中一部分水溶性成分溶出并在炒制过程中导致锅底黏湿、焦糊,继而温度也不易控制,温度过低达不到盐炙效果,过高则易炒焦。本文仅考察了不同盐制方法对牛膝中主要

甾酮类成分含量的影响,但具体作用机制还有待进一步研究确认。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:72.

[2] 孙星衍. 神农本草经[M]. 天津:天津古籍出版社,1982:14.

[3] 吴海燕. 牛膝类药材的化学成分与药理作用的研究进展[J]. 吉林畜牧兽医,2009,30(12):13-14.

[4] 孙传鑫,郭晶,王秋红,等. 牛膝性味演变的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(19):208-211.

[5] 孙奋勇,潘秋辉,洪岸. 牛膝促进成骨细胞增殖的作用与机理研究[J]. 中药材,2004,27(4):264-266.

[6] 国家药政管理局. 全国中药炮制规范[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:22.

[7] 上海市食品药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范[M]. 上海:科学技术出版社,2008:15.

[8] 贵州省食品药品监督管理局. 贵州省中药饮片炮制规范[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:28.

[9] 祝启飞,朱京档,杨玉琴,等. 综合评分法优选牛膝盐炙工艺[J]. 中国民族民间医药,2009,18(21):16-18.

[10] 罗霄山,孙冬梅,张诚光,等. 正交实验优选盐炙怀牛膝的最佳炮制工艺[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(4):311-313.

[责任编辑 刘德文]