

女贞子酒蒸过程中5种苯乙醇类成分的变化规律

姜秋, 蒋海强, 李慧芬, 张学兰*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**探讨女贞子酒蒸过程中5种苯乙醇类成分的动态变化规律。**方法:**采用HPLC同时测定女贞子生品及酒蒸不同时间(4, 8, 12, 16, 20, 24 h)炮制品中松果菊苷、毛蕊花糖苷、红景天苷、酪醇及羟基酪醇的含量。**结果:**在24 h内, 随着酒蒸时间的延长, 松果菊苷含量逐渐降低, 红景天苷含量逐渐增加, 酪醇、羟基酪醇含量均先逐渐升高后达到稳定状态, 而毛蕊花糖苷含量呈先升高后降低的趋势, 以红景天苷含量变化最为显著。**结论:**炮制对女贞子中苯乙醇类成分含量具有显著影响; 女贞子酒蒸后, 松果菊苷、毛蕊花糖苷产生质变, 红景天苷、酪醇、羟基酪醇发生量变。为揭示女贞子的炮制机制与女贞子饮片的规范化炮制及研发提供了实验依据。

[关键词] 女贞子; 酒蒸; 动态变化; 松果菊苷; 毛蕊花糖苷; 红景天苷; 酪醇及羟基酪醇

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160060

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0946.102.html>

[网络出版时间] 2014-06-26 11:10

Contents Changes of Five Phenylethanols Under Steaming Time Spans with Wine in Ligustri Lucidi Fructus

JIANG Qiu, JIANG Hai-qiang, LI Hui-fen, ZHANG Xue-lan*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** This study was to investigate the dynamic changes of five phenylethanols from Ligustri Lucidi Fructus affected by different steaming time spans with wine. **Method:** The contents of echinacoside, acteoside, salidroside, tyrosol and hydroxytyrosol in Ligustri Lucidi Fructus were determined by HPLC in crude Ligustri Lucidi Fructus and wine-steamed Ligustri Lucidi Fructus after different processing time (4, 8, 12, 16, 20 and 24 h). **Result:** Within 24 h, as wine-steamed time prolonged, the content of echinacoside decreased, while Salidroside increased throughout the steaming process, tyrosol and hydroxytyrosol increased before they reach the stable state, however acteoside increased at first and then decreased. Obviously, salidroside showed the greatest change of the five phenylethanols. **Conclusion:** The contents of phenylethanols from Ligustri Lucidi Fructus changed significantly after processing. In Ligustri Lucidi Fructus, echinacoside and acteoside were in qualitative alteration and salidroside, tyrosol and hydroxytyrosol were in quantitative alteration after alcohol-steaming. This could provide experimental evidence to the processing mechanism, as well as to the processing standardization and research of the slices of Ligustri Lucidi Fructus.

[Key words] Ligustri Lucidi Fructus; steaming with wine; dynamic changes; echinacoside; acteoside; salidroside; tyrosol; hydroxytyrosol

[收稿日期] 20131029(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373968)

[第一作者] 姜秋, 硕士生, 从事中药新药研发与中药炮制原理研究, Tel: 18765880650, E-mail: jiangqiu09@163.com

[通讯作者] * 张学兰, 硕士, 教授, 从事中药炮制与中药新药研发研究, Tel: 0531-89628170, E-mail: zhang8832440@sina.com

女贞子为临床常用中药,具有滋补肝肾、明目乌发的功效,用于肝肾阴虚、眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明、内热消渴、骨蒸潮热^[1]。古代对女贞子的炮制方法主要有蒸、酒蒸、酒拌九蒸九晒等,现代主要采用酒蒸法炮制,酒蒸时间一般为2~8 h,北京市中药饮片炮制规范要求“加黄酒,加适量水,密封,蒸15~24 h”^[2-3]。酒蒸女贞子可缓和其寒滑之性,增强其滋补肝肾的功效,故女贞子临床应用多以酒制品入药。但由于各地酒蒸时间不统一,造成各地酒蒸女贞子质量相差较大,严重影响了其临床疗效。女贞子主要含有环烯醚萜苷类、三萜类、苯乙醇类等成分,苯乙醇类化合物为其重要的活性成分,其中,红景天苷及其苷元酪醇具有增强免疫、抗衰老、抗肝纤维化、抗肾间质纤维化等作用^[4-5]。松果菊苷和毛蕊花糖苷均具有保肝、增强免疫、抗衰老等作用^[6-7]。羟基酪醇具有降血糖、抗骨质疏松作用^[8-9]。炮制研究表明,女贞子酒蒸后特女贞苷含量明显降低,而红景天苷、酪醇含量显著升高^[10-11],女贞子酒蒸品免疫调节、升高白细胞作用明显强于生品^[12-13]。但女贞子酒蒸过程中苯乙醇类成分的动态变化未见系统研究,迄今女贞子酒蒸增效的机制尚未阐明。本研究在对女贞子生、制品化学成分HPLC-MS鉴别的基础上,建立HPLC同时测定女贞子炮制品中松果菊苷、毛蕊花糖苷、红景天苷、酪醇和羟基酪醇含量的方法,探讨女贞子酒蒸过程中苯乙醇类成分动态变化的规律,为女贞子饮片的规范化炮制及新产品开发提供实验依据。

1 材料

L-2000型高效液相色谱仪(日本日立公司),FA1604N型电子天平(1/10万,上海精密科学仪器有限公司)。

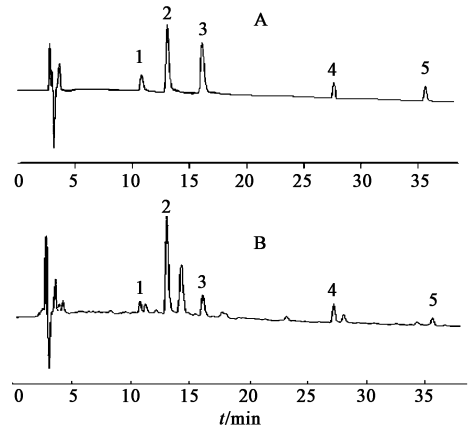
红景天苷、酪醇对照品(中国食品药品检定研究院,含量测定用,批号分别为110818-200404,111676-200401),松果菊苷、毛蕊花糖苷、羟基酪醇对照品(上海源叶生物科技有限公司,纯度均>98%,批号分别为20130517,20120528,20121112),黄酒(山东即墨黄酒厂,乙醇度 $\geq 16.5\%$,批号20120203),乙腈(色谱纯),娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

女贞子药材购自山东百味堂中药饮片有限公司,经山东中医药大学中药鉴定教研室周凤琴教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实。生女贞子:取原药材,除去杂质,洗净,50℃烘干。酒蒸女贞子:取净女贞子共6份,各

100 g,分别加黄酒20 g(加水稀释至40 g),置不锈钢饭盒中,闷润4 h,密闭,置蒸锅中,隔水蒸制4,8,12,16,20,24 h,取出,50℃烘干。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~13 min, 6%~12% A, 13~40 min, 12%~23% A),柱温30℃,检测波长224 nm,流速1.0 mL·min⁻¹。在此条件下,女贞子中5种苯乙醇类成分与其他组分均能达到基线分离,见图1。



A. 混合对照品; B. 供试品

1. 羟基酪醇; 2. 红景天苷; 3. 酪醇;
4. 松果菊苷; 5. 毛蕊花糖苷

图1 女贞子HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称取松果菊苷2.88 mg、毛蕊花糖苷2.28 mg、红景天苷3.76 mg、酪醇3.92 mg、羟基酪醇2.02 mg,分别置于10, 10, 5, 10, 10 mL量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,得5种对照品储备液。精密吸取上述对照品储备液各2.5 mL,置于同一5 mL量瓶中,加50%甲醇制成含松果菊苷0.144 g·L⁻¹、毛蕊花糖苷0.114 g·L⁻¹、红景天苷0.376 g·L⁻¹、酪醇0.196 g·L⁻¹、羟基酪醇0.101 g·L⁻¹的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取女贞子各炮制品粉末(过60目筛)各约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇20 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,取出,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,以微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取上述混合对照品溶液0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mL,置2 mL量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀。按上述色谱条件,分别进样10 μL,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X)

为横坐标,进行线性回归,结果各成分在各自进样范围内线性关系良好,见表 1。

表 1 5 种成分的线性关系

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
松果菊苷	$Y = 1\ 000\ 000X + 4\ 232$	0.999 6	0.072 0 ~ 1.44
毛蕊花糖苷	$Y = 627\ 014X - 2\ 136.4$	0.999 9	0.057 0 ~ 1.14
红景天苷	$Y = 655\ 948X - 6\ 525.6$	0.999 9	0.188 0 ~ 3.76
酪醇	$Y = 1\ 000\ 000X - 47\ 481$	0.999 7	0.098 0 ~ 1.96
羟基酪醇	$Y = 640\ 691X - 8\ 881.1$	0.999 7	0.050 5 ~ 1.01

2.5 精密度试验 精密吸取生女贞子供试品溶液 10 μL ,按上述色谱条件,连续进样 6 次,测定松果菊苷、毛蕊花糖苷、红景天苷、酪醇、羟基酪醇峰面积,结果 RSD 分别为 1.09% ,1.26% ,0.91% ,1.01% ,1.43% 。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取生女贞子供试品溶液 10 μL ,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样测定松果菊苷、毛蕊花糖苷、红景天苷、酪醇、羟基酪醇峰面积,结果 RSD 分别为 1.19% ,1.19% ,1.06% ,1.13% ,1.51% 。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取生女贞子粉末(过 60 目筛)6 份,各约 0.5 g,精密称定,制备成供试品溶液,按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算松果菊苷、毛蕊花糖苷、红景天苷、酪醇、羟基酪醇的含量,结果 6 次测定的 RSD 分别为 1.29% ,1.60% ,1.70% ,1.20% ,1.96% 。表明方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验 取已测知含量的生女贞子粉末(过 60 目筛)6 份,各约 0.5 g,精密称定,分别精密加入松果菊苷(0.836 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、毛蕊花糖苷(0.313 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、红景天苷(0.340 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、酪醇(0.133 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、羟基酪醇(0.169 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)对照品溶液各 1 mL,再以 50% 甲醇补足至 20 mL,按 2.3 项下方法制备供试液,进样分析,结果见表 2。

2.9 样品含量测定 取女贞子各炮制品,依法制备成供试品溶液,精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪分析测定,按干燥品计算样品中各指标成分的含量,结果见表 3。

3 小结与讨论

本研究采用 HPLC 梯度洗脱的方法同时测定女贞子炮制品中 5 种苯乙醇类成分含量,结果表明,该方法灵敏可靠、重复性好。丰富了女贞子饮片的质量评价指标。结果显示,在酒蒸过程中,女贞子中 5 种苯乙醇类成分含量均发生明显变化,但变化趋势不一;在 24 h 内,随着酒蒸时间的延长,松果菊苷含

表 2 女贞子中 5 种成分的加样回收率

化合物	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
松果菊苷	0.792 5	0.836	1.617 6	98.70	99.84	1.32
	0.854 3	0.836	1.692 2	100.23		
	0.838 6	0.836	1.664 1	98.74		
	0.851 1	0.836	1.676 2	98.71		
	0.793 3	0.836	1.643 1	101.65		
毛蕊花糖苷	0.843 3	0.836	1.687 9	101.03	100.30	1.52
	0.309 4	0.313	0.621 8	99.81		
	0.311 7	0.313	0.626 1	100.45		
	0.321 5	0.313	0.633 1	99.55		
	0.308 7	0.313	0.622 2	101.16		
红景天苷	0.313 4	0.313	0.626 8	101.28	99.83	2.49
	0.309 7	0.313	0.634 5	103.77		
	0.385 4	0.340	0.715 1	96.97		
	0.380 6	0.340	0.725 3	101.38		
	0.378 2	0.340	0.721 5	100.97		
酪醇	0.378 7	0.340	0.709 3	97.24	99.31	2.46
	0.368 1	0.340	0.705 3	99.18		
	0.359 1	0.340	0.710 2	103.26		
	0.138 2	0.133	0.269 4	98.65		
	0.137 3	0.133	0.264 5	95.64		
羟基酪醇	0.128 7	0.133	0.265 2	102.63	98.02	2.18
	0.131 5	0.133	0.263 4	99.17		
	0.130 9	0.133	0.261 9	98.50		
	0.124 5	0.133	0.259 2	101.28		
	0.170 2	0.169	0.338 7	99.70		
	0.169 5	0.169	0.333 6	97.10		
	0.168 9	0.169	0.340 1	101.30		
	0.171 3	0.169	0.336 5	97.75		
	0.167 7	0.169	0.331 4	96.86		
	0.160 1	0.169	0.321 3	95.38		

量逐渐降低,红景天苷含量逐渐增加,酪醇、羟基酪醇含量均先逐渐升高后达到稳定状态,而毛蕊花糖苷含量呈先升高后降低的趋势,且以红景天苷含量变化最为显著。说明松果菊苷、毛蕊花糖苷在酒蒸过程中性质不稳定而发生质变;而红景天苷、酪醇、羟基酪醇对黄酒和加热性质稳定,不易被转化;且存在其他成分向毛蕊花糖苷、红景天苷、酪醇及羟基酪醇转化的情况。

本研究结果表明,女贞子酒蒸 16 h 以后,随着蒸

表3 女贞子中5种苯乙醇类成分含量 %

样品	松果菊苷	毛蕊花糖苷	红景天苷	酪醇	羟基酪醇
生品(0 h)	0.164	0.062 4	0.075 8	0.060 2	0.033 8
酒蒸 4 h	0.153	0.104	0.239	0.126	0.060 4
酒蒸 8 h	0.147	0.106	0.318	0.140	0.070 6
酒蒸 12 h	0.144	0.132	0.626	0.154	0.092 6
酒蒸 16 h	0.139	0.112	0.752	0.162	0.101
酒蒸 20 h	0.133	0.087 7	0.825	0.166	0.100
酒蒸 24 h	0.115	0.077 6	0.961	0.169	0.103

制时间的延长,酪醇和羟基酪醇含量不再明显增加,而红景天苷含量逐渐增加,松果菊苷、毛蕊花糖苷含量逐渐减低,说明女贞子在酒蒸过程中,松果菊苷、毛蕊花糖苷分子中的醇苷键均不可能水解生成其苷元羟基酪醇,红景天苷分子中的醇苷键也不可能水解生成其苷元酪醇。酯苷的苷键既有缩醛的性质又有酯的性质,易被稀酸和稀碱水解^[14]。有文献报道,在口服松果菊苷的大鼠体内代谢物中检出咖啡酸和去咖啡酰基毛蕊花糖苷。作者曾用 pH 计测定本实验用黄酒的 pH 值,结果为 4.1。本课题组前期研究也表明,女贞子酒蒸和清蒸后咖啡酸含量均升高。我们分析,在酒蒸过程中,松果菊苷和毛蕊花糖苷分子中的酯苷键水解生成咖啡酸。至于女贞子酒蒸后是何种成分转化为毛蕊花糖苷有待深入探讨。

环烯醚萜苷类化合物为女贞子的主要成分,且以裂环环烯醚萜苷类为主,该类化合物的结构特点是其分子中的环烯醚萜部分大多通过其裂环上的酯键与红景天苷或酪醇或羟基酪醇等苯乙醇类化合物相连。环烯醚萜类化合物性质不稳定,易被水解,卜文文等报道,橄榄苦苷经酸、碱水解后可获得羟基酪醇^[15]。本课题组前期研究表明,特女贞苷在大鼠胃肠道内均可代谢为红景天苷,特女贞苷在大鼠胃与小肠的吸收率明显低于红景天苷^[16]。据此推测,女贞子中环烯醚萜酯苷类成分性质不稳定,经酒蒸后酯苷键水解,生成其次级苷红景天苷或者苷元酪醇(或羟基酪醇)。

本实验测定的 5 种苯乙醇类化合物均有很强的生物活性,且在酒女贞子中具有较高的含量,女贞子酒蒸后补肝肾作用增强,分析与该类成分的变化密切相关,苯乙醇类成分可能是酒女贞子的主要活性成分。因此,深入研究女贞子酒蒸过程中环烯醚萜类和苯乙醇类成分的变化规律、转化机制,对揭示女

贞子酒蒸增效的机制具有重要意义,对制定客观科学的女贞子饮片质量标准具有重要参考价值,并为女贞子饮片的开发提供了线索和实验依据。

[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,2010:43.
- [2] 徐苹,张学兰. 女贞子炮制历史沿革研究[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(3):263.
- [3] 北京市药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范(2008年版)[M]. 北京:化学工业出版社,2010:31.
- [4] 张明发,沈雅琴. 红景天苷及其苷元酪醇的抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用[J]. 药物评价研究,2013,36(3):228.
- [5] 李妍,张慧锋,李晓光. 红景天苷药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2007,28(3):175.
- [6] 戴亮,郝海平,汪玉馨,等. 松果菊苷药动/药效研究进展与思考[J]. 中国临床药理学与治疗学,2010,15(3):342.
- [7] 赵薇,潘英妮. 肉苁蓉苯乙醇苷类成分药理作用研究进展[J]. 亚太传统医学,2013,9(5):77.
- [8] HAMDEN K, ALLOUCHE N, DAMAK M, et al. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste *in vitro* and in rats[J]. Chem Biol Interact,2009,180(3):421.
- [9] HAGIWARA K, GOTO T, ARAKI M, et al. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss[J]. Eur J Pharmacol,2011,662:78.
- [10] 张学兰,侯杰,李慧芬,等. 炮制对女贞子中特女贞苷含量的影响[J]. 中药材,2009,32(4):498.
- [11] 王瑞芳,张学兰,鹿栋尧,等. 女贞子不同工艺炮制品中红景天苷和酪醇含量比较[J]. 中成药,2009,31(1):85.
- [12] 范秦鹤,朱爱华,吕兰熏,等. 女贞子不同炮制品免疫作用的比较[J]. 陕西中医学院学报,1999,22(2):34.
- [13] 范秦鹤,侯亚玲,朱爱华,等. 女贞子不同炮制品升高白细胞耐缺氧作用及毒性比较[J]. 西北药学杂志,2004,19(1):20.
- [14] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:67, 229.
- [15] 卜文文,刘常金,田仕夫. 盐酸法和 β -葡萄糖苷酶法水解橄榄叶提取物制备羟基酪醇的比较[J]. 食品工业科技,2008,20(2):8.
- [16] 李慧芬,张学兰. 特女贞苷与红景天苷的大鼠在体胃肠吸收比较[J]. 中国中药杂志,2014,39(6):167.

[责任编辑 顾雪竹]