

酒制对女贞子饮片主要化学成分含量的影响

霍雨佳¹, 岳琳², 刘颖², 苏慧¹, 扶埕东², 李丽^{2*}, 王成永^{1*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230038; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:分析酒制对女贞子饮片中主要化学成分含量的影响,为完善女贞子及酒女贞子饮片的质量标准提供实验依据。方法:采用HPLC,流动相乙腈-水梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长224 nm,柱温35℃,对女贞子及酒女贞子饮片中主要化学成分进行定量分析。结果:与相同企业或同一企业同一批次女贞子饮片比较,酒女贞子饮片中特女贞苷和橄榄苦苷的含量均明显降低,红景天苷、酪醇和羟基酪醇的含量有不同程度的升高;其中红景天苷、酪醇及羟基酪醇的质量分数分别升高了200%,5%,40%以上。结论:酒制后女贞子饮片化学成分含量的变化主要是由于特女贞苷在高温及水蒸气的作用下会水解生成红景天苷,红景天苷进一步水解生成酪醇;橄榄苦苷在高温下不稳定,同样发生水解,生成羟基酪醇;从而导致特女贞苷和橄榄苦苷的含量显著降低,红景天苷、酪醇和羟基酪醇的含量增高。

[关键词] 女贞子; 饮片; 酒女贞子; 水解反应; 羟基酪醇; 特女贞苷; 橄榄苦苷

[中图分类号] R283.3;R943.1;R284;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0026-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010026

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170921.1623.002.html>

[网络出版时间] 2017-09-21 16:23

Effect of Processing with Wine on Content of Main Chemical Components in Ligustri Lucidi Fructus Decoction Pieces

HUO Yu-jia¹, YUE Lin², LIU Ying², SU Hui¹, FU Ya-dong², LI Li^{2*}, WANG Cheng-yong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effect of processing with wine on the content of main chemical components in Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces, and provide experimental basis for improving the quality standard of crude and wine-baked Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces. **Method:** HPLC was performed by taking acetonitrile-water as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ for gradient elution, the column temperature was set at 35℃ and the detection wavelength was monitored at 224 nm. Contents of effective components in crude and wine-baked Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces were measured. **Result:** Compared with Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces from the same enterprises or the same batch in a enterprise, the contents of specnuezhenide and oleuropein dropped significantly, but the contents of salidroside, tyrosol and hydroxytyrosol was increased by over 200%, 5% and 40% after being wine-baked, respectively. **Conclusion:** The content of components in wine-baked Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces is changed owing to specnuezhenide is hydrolyzed to salidroside under the effect of high temperature and water vapor, and then through further hydrolyzed to form tyrosol; what's more, oleuropein is unstable at high temperature, it will be hydrolysis to

[收稿日期] 20170622(001)

[基金项目] 国家科技基础性科研专项重点项目(2014FY111100)

[第一作者] 霍雨佳,在读硕士,从事中药炮制及质量评价研究,Tel:15810048925,E-mail:l1105514794@qq.com

[通信作者] *李丽,博士,研究员,从事中药炮制及质量评价研究,Tel:010-84040221,E-mail:lili7755@163.com;

*王成永,教授,硕士生导师,从事中药制剂研究,Tel:0551-5169237,E-mail:chyw_hf@163.com

form hydroxytyrosol.

[Key words] Ligustri Lucidi Fructus; decoction pieces; wine-baked Ligustri Lucidi Fructus; hydrolysis; hydroxytyrosol; specnuezhenide; oleuropein

饮片入药,生熟异治,是中药的鲜明特色,也是中医临床辨证施治的根本保障,而炮制则是实现饮片生熟异治的根本途径。女贞子具有滋补肝肾、明目乌发的功效,临床多用于治疗肝肾阴虚、眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明、内热消渴、骨蒸潮热等证^[1]。女贞子饮片历代应用的炮制方法有 10 余种,但临床上以生品和酒制品的应用最为广泛^[2]。生女贞子饮片以清肝明目、滋阴润燥为主,酒制后滋补肝肾作用显著增强^[3]。而这些改变必然与其内在物质基础的变化密切相关。女贞子中主要含有环烯醚萜苷类、苯乙醇类、黄酮类、多糖类等成分^[4]。2015 年版《中国药典》(一部)女贞子项下,药材与饮片(女贞子及酒女贞子)均以环烯醚萜苷类成分特女贞苷作为含量测定指标,且含量限度也完全相同,缺乏专属性,既无法客观反映女贞子中药饮片炮制原理的科学内涵,也无法体现中药饮片“生熟异治”的独特临床应用基础。关于女贞子的研究报道显示,女贞子酒制后特女贞苷含量较生品显著降低,且随着酒制时间的延长,特女贞苷的含量呈逐渐降低的趋势^[5]。因此,以相同指标和相同标准评价女贞子药材及饮片显然是不太客观的,也无法实现中药饮片的专属性质量评价。

近年来,有学者以齐敦果酸、特女贞苷和 5-羟甲基糠醛等单一化学成分为指标^[6-7],探究炮制对女贞子化学成分含量的影响;还有学者对女贞子酒蒸 24 h 内苯乙醇类成分^[8]和环烯醚萜苷类成分^[9]的含量动态变化规律分别进行了研究,但都未对女贞子饮片酒制前后各主要化学成分含量进行系统研究,尤其是对酒制前后橄榄苦苷和羟基酪醇的含量变化研究更为少见。LC-MS 技术已被应用到女贞子生品和炮制品的化学成分分析当中^[10-11],但对于建立女贞子中药标准饮片的质量标准来说,采用 HPLC 更加简单、快捷。

前期对女贞子及酒女贞子饮片特征图谱的研究表明,环烯醚萜苷类和苯乙醇类成分是女贞子的主要活性成分,酒制前后这两类主要化学成分的变化差异显著。本实验以委托北京盛世龙药业有限公司严格按照 2015 年版《中国药典》炮制通则和 2008 年版《北京市中药饮片炮制规范》炮制加工而成的 3 批女贞子及酒女贞子候选标准饮片(今后有望作为

一种标准物质投入使用)为研究对象,采用 HPLC,在同一色谱条件下,同时以环烯醚萜苷和苯乙醇这两类成分中的主要化学成分为指标,对女贞子酒制前后主要化学成分的含量进行测定,以揭示酒制对女贞子饮片主要化学成分含量的影响;同时,为了排除女贞子及酒女贞子饮片在采集加工、炮制和属性识别过程中的偶然性因素和误差,收集市售的 5 批女贞子饮片和 9 批酒女贞子饮片,对建立的候选标准饮片的酒制前后主要化学成分含量变化情况进行验证,为进一步完善女贞子及酒女贞子饮片的质量标准提供科学依据。

1 材料

2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),XS105 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),FA2204B 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。女贞子及酒女贞子饮片购自北京盛世龙药业有限公司等企业,经中国中医科学院中药研究所肖永庆研究员鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* 干燥成熟果实的不同炮制品;黄酒(北京京通黄酒有限公司),特女贞苷、红景天苷、酪醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111926-201102,110818-201005,111676-200602,纯度均 $\geq 98\%$),羟基酪醇、橄榄苦苷对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-16061503,MUST-16052512,纯度均 $\geq 98\%$),水为娃娃哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

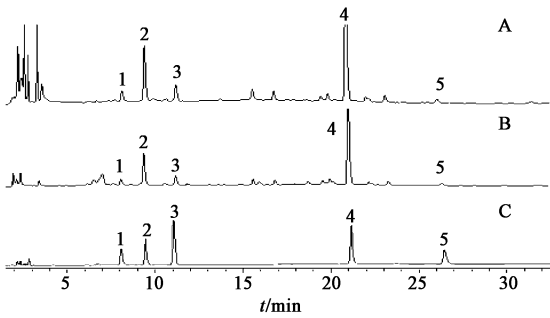
2.1 样品的制备

2.1.1 女贞子饮片的炮制加工 按照 2015 年版《中国药典》,在女贞子冬季果实成熟时采收,除去枝叶,稍蒸或至沸水中略烫,干燥。

2.1.2 酒女贞子饮片的炮制加工 按照 2015 年版《中国药典》和 2008 年版《北京市中药饮片炮制规范》,取女贞子药材,洗净去杂,加黄酒拌匀,闷润 3 h 左右,置密封蒸罐内蒸 15 ~ 24 h,至色泽黑润时取出,晾干。

2.2 色谱条件 Aglient Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 15% B; 10 ~ 15 min,

15% ~ 20% B; 15 ~ 18 min, 20% ~ 22% B; 18 ~ 20 min, 22% ~ 23% B; 20 ~ 27 min, 23% ~ 24% B; 27 ~ 35 min, 24% ~ 30% B), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 224 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。见图 1。



A. 女贞子饮片; B. 酒女贞子饮片; C. 混合对照品; 1. 羟基酪醇; 2. 红景天苷; 3. 酪醇; 4. 特女贞苷; 5. 橄榄苦苷

图 1 女贞子不同炮制产品的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of different processed products of Ligustri Lucidi Fructus

2.3 对照品溶液的制备 精密称取羟基酪醇、红景天苷、酪醇、特女贞苷、橄榄苦苷对照品适量, 分别加甲醇制成每 1 mL 含羟基酪醇 0.799 mg, 红景天苷 4.191 mg, 酪醇 1.003 mg, 特女贞苷 36.051 mg 和橄榄苦苷 1.556 mg 的对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取女贞子及酒女贞子饮片粉末(过 50 目筛, 下同)各 0.5 g, 置于 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 10 mL, 称定质量, 超声(250 W, 40 kHz)提取 20 min, 取出, 放至室温, 称定质量, 用 80% 甲醇溶液补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 空白溶剂的考察 吸取 80% 甲醇适量, 按 2.2 项下色谱条件测定, 结果表明溶剂对待测样品无干扰。

2.6 线性关系考察 以 2.3 项下对照品溶液为母液, 加甲醇稀释至质量浓度分别为母液的 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 按 2.2 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 1。

2.7 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液适量, 按 2.2 项下条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果羟基酪醇、红景天苷、酪醇、特女贞苷、橄榄苦苷峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 1.7%, 0.8%, 0.9%, 1.2%, 表明仪器的精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 按 2.2 项下条件进样分析, 结果羟

表 1 女贞子饮片中各指标成分的线性关系考察

Table 1 Linear relationship of five components in Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces

成分	回归方程	R ²	线性范围/μg
羟基酪醇	$Y = 2.182 \times 10^6 X - 25\,522.208$	0.999 9	0.050 ~ 0.799
红景天苷	$Y = 1.444 \times 10^6 X + 67\,014.167$	0.999 8	0.262 ~ 4.191
酪醇	$Y = 3.062 \times 10^7 X + 60\,800.042$	0.999 1	0.063 ~ 1.003
特女贞苷	$Y = 1.166 \times 10^6 X + 3\,308.917$	0.999 5	2.253 ~ 36.051
橄榄苦苷	$Y = 1.168 \times 10^6 X - 52\,977.000$	0.999 4	0.097 ~ 1.556

基酪醇、红景天苷、酪醇、特女贞苷、橄榄苦苷峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.6%, 1.8%, 1.6%, 2.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 精密称取同一批次女贞子饮片粉末 6 份, 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, 记录峰面积, 计算羟基酪醇、红景天苷、酪醇、特女贞苷、橄榄苦苷的平均质量分数分别为 0.775, 4.532, 0.682, 14.905, 0.368 mg·g⁻¹, RSD 依次为 3.8%, 2.4%, 2.2%, 0.8% 和 2.0%, 表明该方法的重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取已知指标成分含量的同一批次女贞子饮片样品 6 份, 并随机分为 3 组, 每组 2 份, 3 组分别依次加入低、中、高质量浓度的对照品溶液, 使对照品加入量分别为样品中指标成分含量的 0.8, 1.0, 1.2 倍, 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, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表 2。

2.11 样品测定 精密称取女贞子及酒女贞子饮片粉末适量, 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, 采用外标法, 以干燥品计算各目标成分的含量, 见表 3, 4。结果发现酒制对各成分的含量有着不同程度的影响。与相同企业或同一企业同一批次女贞子饮片比较, 酒女贞子饮片中特女贞苷和橄榄苦苷的含量均明显降低, 红景天苷、酪醇和羟基酪醇的含量有不同程度的升高; 其中红景天苷的质量分数升高了 2 倍以上, 酪醇的质量分数升高了 5% 以上, 羟基酪醇的质量分数升高了 40% 以上。

3 讨论

本文建立了同时测定女贞子和酒女贞子饮片中环烯醚萜苷类(特女贞苷、红景天苷、橄榄苦苷)及苯乙醇类(酪醇、羟基酪醇)成分的含量测定方法, 出峰时间短、专属性强, 且 HPLC 操作简便, 为后期

表 2 5 个指标成分的加样回收试验

Table 2 Recovery test of five components

成分	称样量 /g	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
羟基酪醇	0.253 0	196.08	154.94	356.21	103.35	101.31	1.9
	0.253 2	196.23	154.94	356.61	103.51		
	0.253 8	196.70	193.68	387.53	98.53		
	0.253 6	196.54	193.68	389.94	99.86		
	0.253 3	196.31	232.41	432.36	101.57		
	0.253 5	196.46	232.41	431.34	101.06		
红景天苷	0.253 0 1	147.50	906.34	2 043.25	98.83	98.97	1.7
	0.253 2 1	147.05	906.34	2 030.60	97.49		
	0.253 8 1	150.22	1 132.93	2 296.33	101.16		
	0.253 6 1	149.32	1 132.93	2 291.92	100.85		
	0.253 3 1	147.96	1 359.52	2 479.83	97.97		
	0.253 5 1	148.86	1 359.52	2 474.60	97.52		
酪醇	0.253 0	172.55	136.30	310.83	101.45	100.67	2.7
	0.253 2	172.68	136.30	311.80	102.07		
	0.253 8	172.96	170.38	337.82	96.76		
	0.253 6	173.09	170.38	340.61	98.32		
	0.253 3	172.82	204.45	386.34	104.44		
	0.253 5	172.75	204.45	379.18	100.97		
特女贞苷	0.253 0 3	770.97	2 980.94	6 649.11	96.55	96.75	0.9
	0.253 2 3	773.95	2 980.94	6 613.65	95.26		
	0.253 8 3	779.91	3 726.17	7 379.05	96.59		
	0.253 6 3	779.91	3 726.17	7 424.60	97.81		
	0.253 3 3	776.93	4 471.40	8 122.17	97.18		
	0.253 5 3	775.44	4 471.40	8 116.04	97.07		
橄榄苦苷	0.253 0	93.18	73.63	165.84	98.68	100.77	1.3
	0.253 2	93.14	73.63	168.00	101.67		
	0.253 8	93.32	92.04	185.63	100.29		
	0.253 6	93.32	92.04	185.71	100.38		
	0.253 3	93.25	110.45	206.08	102.15		
	0.253 5	93.29	110.45	205.34	101.45		

候选标准饮片质量标准制定时指标成分的选择提供参考依据。

在供试品溶液的制备过程中,根据所测化学成分的的性质,选择了 30% 甲醇,50% 甲醇,80% 甲醇和甲醇作为提取溶剂进行考察,结果表明 80% 甲醇作为提取溶剂时,可最大程度地提取出目标成分,故将其确定为提取溶剂。在色谱条件考察时,对流动相系统乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸、甲醇-水和甲醇-0.02% 磷酸进行了考察,最终发现乙腈-水作为流动相系统时的基线平稳,各色谱峰分离度和峰形较好,故选择流动相乙腈-水。

女贞子饮片中主要化学成分含量的变化与其化学结构有着密切关系,特女贞苷和橄榄苦苷同属环烯醚萜苷类化合物,在酒制过程中,特女贞苷的糖苷键、酯键在高温和水蒸气的作用下不稳定,水解断裂生成次级苷红景天苷,而红景天苷本身对高温也不稳定,在蒸制条件下进一步水解,生成其苷元——酪醇,见图 2;此外,橄榄苦苷的结构中也有酯键的存在,在酒制过程中受水蒸气的影响,水解断裂生成羟基酪醇,见图 3。从而导致酒制后特女贞苷和橄榄苦苷的含量降低,红景天苷、酪醇和羟基酪醇的含量增加。至于不同企业生产的女贞子及酒女贞子饮片中特女贞苷和橄榄苦苷含量下降的幅度呈现较大差异,这不仅与原料本身的质量有关,同时也与生产企业酒制工艺参数(加热方式、蒸制时间等)的实际控制不同有关。

综上,女贞子及酒女贞子饮片的物质基础存在

表 3 不同厂家女贞子饮片中指标成分的含量测定

Table 3 Determination of five components in Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces from different manufacturers

mg·g⁻¹

厂家	批号	特女贞苷	红景天苷	酪醇	橄榄苦苷	羟基酪醇
北京盛世龙药业有限公司	20150702	16.313	1.030	0.276	0.702	0.121
北京盛世龙药业有限公司	20150729	16.511	1.029	0.278	0.731	0.121
北京盛世龙药业有限公司	20150811	16.709	1.025	0.278	0.703	0.119
亳州市沪谯药业有限公司	1609280272	32.102	0.877	0.351	0.548	0.105
洛阳康鑫中药饮片有限公司	161101	22.976	0.766	0.504	0.728	0.617
河北百草康神药业有限公司	1704011	25.437	0.724	0.207	0.705	0.139
广东和翔制药有限公司	HX16B01	32.440	1.121	0.572	0.570	0.236
安徽友信药业有限公司	161201	17.509	0.657	0.512	0.356	0.212

显著差异,因此其质量评价标准也应有所不同,除 2015 年版《中国药典》现有质量评价指标特女贞苷外,还应考虑增加红景天苷、橄榄苦苷、酪醇及羟基酪醇等成分为评价指标,以实现女贞子不同饮片

的专属性质量评价。后期为进一步验证酒制对女贞子饮片主要化学成分含量的影响,拟对女贞子中的单一化学成分特女贞苷和橄榄苦苷进行程序升温、水解转化试验,以探求其化学成分含量的变化规律。

表 4 不同厂家酒女贞子饮片中指标成分的含量测定

Table 4 Determination of five components in wine-baked Ligustri Lucidi Fructus decoction pieces from different manufacturers $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

厂家	批号	特女贞苷	红景天苷	酪醇	橄榄苦苷	羟基酪醇
北京盛世龙药业有限公司	20150702	15.505	4.969	1.026	0.376	0.648
北京盛世龙药业有限公司	20150729	15.483	5.318	1.035	0.380	0.652
北京盛世龙药业有限公司	20150811	14.858	5.222	1.014	0.380	0.642
亳州市沪谯药业有限公司	1604190182	18.844	5.098	0.684	0.411	0.282
洛阳康鑫中药饮片有限公司	160701	20.477	2.703	0.532	0.653	0.885
河北百草康神药业有限公司	1703011	18.212	3.394	0.931	0.591	0.604
广东和翔制药有限公司	HX16C01	21.594	3.748	1.303	0.356	0.616
四川新荷花中药饮片股份有限公司	1611028	17.578	8.130	0.696	0.559	0.332
北京市双桥燕京中药饮片厂	1610046	24.276	5.793	0.967	0.663	0.414
上海德华国药制品有限公司	2016113003	26.387	4.798	0.439	0.417	0.370
亳州市豪门中药饮片有限公司	161001	13.944	3.378	1.055	0.544	0.546
四川省中药饮片有限责任公司	161110	17.937	2.045	0.486	0.348	0.384

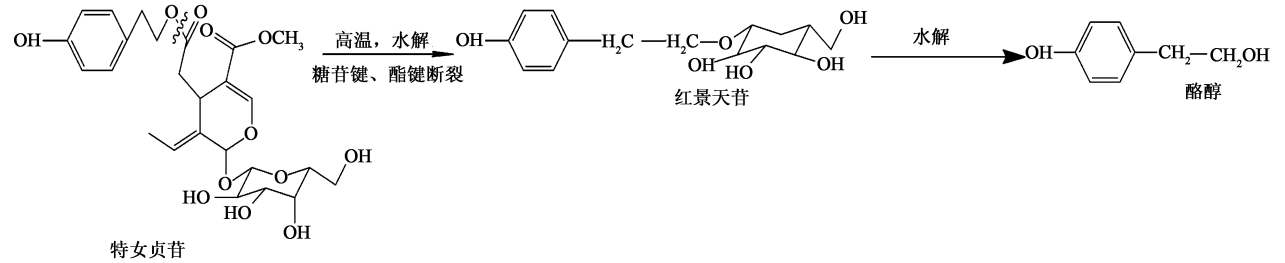


图 2 特女贞苷的成分转化示意

Fig. 2 Chemical conversion diagram of specnuezhenide

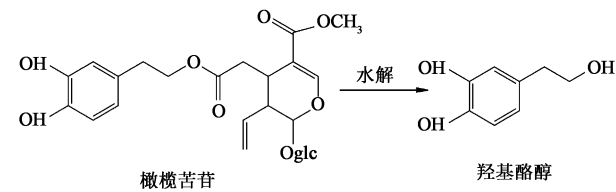


图 3 橄榄苦苷的成分转化示意

Fig. 3 Chemical conversion diagram of oleuropein

[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: 45-46.

[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): 263-264.

[3] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 278-279.

[4] 黄新苹, 王武朝. 中药女贞子的化学成分研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(1): 47-51.

[5] 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): 498-500.

[6] 侯杰, 张学兰. 炮制对女贞子中多糖和 5-羟甲基糠醛含量的影响[J]. 中成药, 2009, 31(4): 572-575.

[7] 曹延杰, 李飞, 谭鹏, 等. 女贞子炮制前后 5-羟甲基糠醛的含量变化[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 2929-2930.

[8] 姜秋, 蒋海强, 李慧芬, 等. 女贞子酒蒸过程中 5 种苯乙醇类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 60-63.

[9] 姜秋, 蒋海强, 李慧芬, 等. 女贞子酒蒸过程中 4 种裂环烯醚萜苷类成分的动态变化[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2561-2564.

[10] 宋梦晗, 张学兰, 李慧芬, 等. LC-TOF/MS 快速鉴定女贞子 4 种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16): 14-17.

[11] 占方玲, 张学兰, 蒋海强, 等. 女贞子生制品化学成分的 HPLC-ESI/MS 分析[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2707-2710.

[责任编辑 刘德文]