

丹参中的主要有效成分有脂溶性成分和水溶性成分。其中水溶性成分多具有酚酸性结构,而脂溶性成分以丹参酮类化合物为主。丹参酮类化合物以改善血液循环、抗菌和抗炎作用为主;而丹酚酸类化合物的抗氧化、抗凝血和细胞保护作用特别突出^[3]。体外抑菌实验研究发现丹参酮对金黄色葡萄球菌及其耐药菌株有较强的抑制作用^[9-10],本实验结果显示丹参及炮制品不仅对 SA 和 MRSA 有较强的抑制作用,对 ESBLs 也有较好的抑制作用。有研究表明,不同炮制品中丹参酮 II A 的含有量为醋丹参>酒丹参>生丹参>米炒丹参>炒丹参>丹参炭。炒制品丹参酮 II A 的量均低于生品。另外,酒丹参、醋丹参的水溶性总酚酸含量也比生丹参高^[11]。本实验证明丹参酮类化合物受不同炮制方法的影响较大,文献多报道炮制后丹参酮 II A 的变化,提示我们有必要对炮制后其余丹参酮类化合物的变化进行研究并且探讨互相作用的机理。

本实验证明丹参不同炮制品对 SA、MRSA、ESBLs 的抑制作用明显。不同炮制方法对丹参的抗菌作用产生了影响,临床上可以根据患者感染的病原菌来选择相应的用药方案。另外丹参含有多种有效成分,而有效成分之间也相互作用,所以丹参炮制品有效成分之间的作用机制以及有效成分的抑菌机理有待进一步研究,本实验为其进一步的研究和临床

应用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:70-71.
- [2] 中国医学科学院药用植物研究所. 中国药材图鉴-中药材及混伪品鉴别[M]. 北京:中医古籍出版社,2008:161.
- [3] 杜冠华,张均田. 丹参现代研究概况与进展[J]. 医药导报,2004,23(7):435-440.
- [4] Abd E I S, Chen H S, Bates R B, et al. Isolation of two highly potent and non-toxic inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Antiviral Res*, 2002, 55(1): 91-106.
- [5] 卫生部中医研究院中药研究所, 卫生部药品生物制品检定所. 中药炮炙经验集成[M]. 北京:人民卫生出版社,1963:26-27.
- [6] 河南省革命委员会卫生局. 河南省中药材炮制规范[M]. 河南:河南人民出版社,1974:40-41.
- [7] 中药大辞典编纂委员会. 中药大辞典[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006:643-649.
- [8] 康文艺,刘瑜新,宋艳丽,等. 尼泊尔酸模 α -葡萄糖苷酶抑制活性及抗菌活性研究[J]. 中成药,2010,32(7):1249-1251.
- [9] 高玉桂,宋玉梅,杨友义,等. 丹参酮药理[J]. 药学报,1979,14(2):75.
- [10] 房其年,张佩玲,徐宋沛. 丹参抗菌有效成分的研究[J]. 化学学报,1976,34(3):197.
- [11] 顾瑶华,朱悦. 丹参不同炮制品中丹参酮 II A 的含量差异研究[J]. 中成药,2010,32(2):252-254.

酒蒸不同时间肉苁蓉中 6 种苯乙醇苷类成分的变化

马志国^{1,2}, 谭咏欣^{1,3}

(1. 暨南大学 药学院, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学 中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室, 广东 广州 510632; 3. 澳门科技大学 中医药学院, 澳门)

摘要: 目的 研究酒蒸不同时间肉苁蓉中 6 种苯乙醇苷类成分的变化情况。方法 采用 HPLC 法测定肉苁蓉酒蒸不同时间(0、4、8、12、16、20 h) 的炮制品中松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C、2'-乙酰基毛蕊花糖苷的量。结果 随炮制时间的延长,肉苁蓉苷 A 的量先升高后降低,其余 5 种成分的量逐渐降低,且在 $t_R = 4.3$ min 处出现 1 个明显的色谱峰。结论 肉苁蓉中苯乙醇苷类成分在酒蒸过程中发生了量和质的变化,为进一步揭示肉苁蓉的炮制原理提供了初步的实验依据。

关键词: 酒蒸; 肉苁蓉; 苯乙醇苷类成分

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2011)11-1951-04

收稿日期: 2011-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30902001)

作者简介: 马志国(1979—), 讲师, 从事中药药剂与中药炮制相关性研究。Tel: (020) 85223784, E-mail: mzg79@hotmail.com

Contents changes of six phenylethanoid glycosides under steaming time spans with wine in Desertliving Cistanche

MA Zhi-guo^{1,2}, TAN Yong-xin^{1,3}

(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM & New Drugs Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Faculty of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the contents changes of six phenylethanoid glycosides from Desertliving Cistanche affected by different steaming time spans with wine. **METHODS** The contents of echinacoside, cistanoside A, acteoside, isoacteoside, cistanoside C and 2'-acetylacteoside in Desertliving Cistanche were determined by HPLC under processing time span in 0, 4, 8, 12, 16 and 20 h. **RESULTS** The content of cistanoside A increased at first and then decreased as steaming with wine time prolonged, while the other five components decreased throughout the steaming process, and there was an obvious chromatographic peak appeared at 4.3 min. **CONCLUSION** There are both quantitative and qualitative alteration in phenylethanoid glycosides in Desertliving Cistanche as steaming with wine, this could provide original experimental evidence to elucidate the mechanism of processing Desertliving Cistanche.

KEY WORDS: steaming with wine; Desertliving Cistanche; phenylethanoid glycosides

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 或管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎,为临床常用补益中药,具有补肾阳、益精血、润肠通便的功效^[1]。肉苁蓉多酒蒸后应用,可增强补肾助阳之力^[2]。中国药典 2010 年版一部肉苁蓉项下即收载其酒蒸品种酒苁蓉。有关肉苁蓉炮制的现代研究多为炮制前后单个指标成分的质量分数变化研究^[3-4]、药理活性比较研究^[5-8]、炮制工艺研究^[9-11],而有关肉苁蓉酒蒸可增强补肾助阳作用的机理至今尚不清楚。研究表明,肉苁蓉补肾阳作用的有效成分为苯乙醇苷类成分^[12]。本研究以 6 种苯乙醇苷类成分为考察指标,采用 HPLC 法测定并比较 6 种成分在酒蒸过程中量和质的变化情况,为今后肉苁蓉炮制原理的进一步阐明,提供实验依据。

1 试验材料

1.1 仪器与试剂 Agilent 1200 型高效液相色谱仪。甲醇(上海晶纯实业有限公司)为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂为分析纯。黄酒(浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司)。松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C、2'-乙酰基毛蕊花糖苷为实验室自制(利用¹H-NMR、¹³C-NMR、MS 等波谱技术鉴定了化学结构),HPLC 检出纯度均大于 98%。

1.2 药材来源与炮制 肉苁蓉药材购自广州清平

药材市场,经中国中医科学院中医药发展研究中心图雅教授鉴定为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 的干燥带鳞叶的肉质茎。取原药材 3 kg,切成约 3 mm 厚片,平均分成 6 份,取 1 份为生品 40℃干燥,粉碎,过 65 目筛,备用;其余 5 份分别置不锈钢饭盒中,加入 30% 黄酒拌匀,闷润,密闭,置蒸锅中隔水蒸制,分别蒸 4、8、12、16、20 h,取出 40℃干燥,粉碎,过 65 目筛,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Agilent TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱,柱温为室温;流动相为甲醇(A) - 0.1% 甲酸(B),梯度洗脱(0 min 30% A; 45 min 45% A),体积流量 1.0 mL/min;检测波长: 330 nm;进样量 20 μL。在该色谱条件下,6 种苯乙醇苷类成分分离度良好,见图 1。

2.2 对照品溶液 取松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C、2'-乙酰基毛蕊花糖苷适量,精密称定,加 30% 甲醇制成每 1 mL 含松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C、2'-乙酰基毛蕊花糖苷分别为 0.169、0.133、0.144、0.127、0.128、0.117 mg 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液 取各药材粉末(65 目) 1 g,精密称定,加 70% 甲醇溶液 50 mL,密塞,称定质量,浸泡 30 min 后,超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用

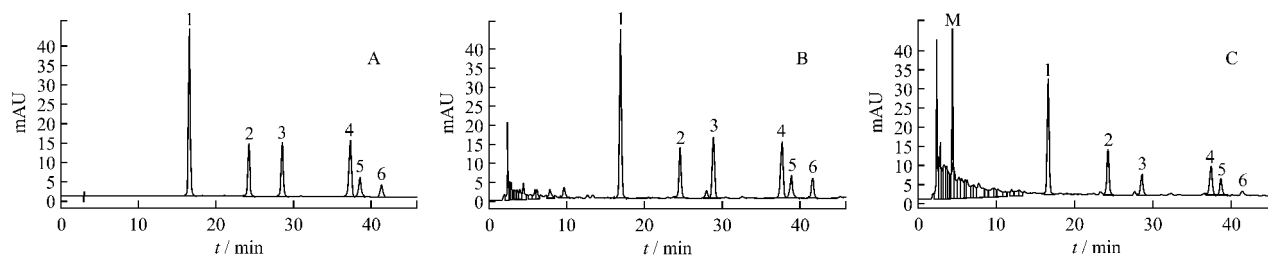


图 1 6 种苯乙醇苷对照品 (A)、生品 (B) 和制品 20 h (C) HPLC 图

1. 松果菊苷 2. 肉苁蓉苷 A 3. 毛蕊花糖苷 4. 异毛蕊花糖苷 5. 肉苁蓉苷 C 6. 2'-乙酰基毛蕊花糖苷 M. 酒蒸后增加的成分 ($t_R = 4.3$ min)

Fig. 1 Chromatograms of six phenylethanoid glycosides mixed reference standards (A), raw herbal pieces (B) and steamed with wine for 20 h (C)

1. echinacoside 2. cistanoside A 3. acteoside 4. isoacteoside 5. cistanoside C 6. 2'-acetylacteoside M. new components ($t_R = 4.3$ min)

70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 以 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 线性关系 分别精密吸取对照品溶液 0.1、0.2、0.5、1、2、5 mL 置 5 mL 量瓶中, 以 30% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得不同浓度的对照品混合溶液。分别精密吸取 20 μL 按上述色谱条件进样测定色谱峰面积, 以对照品进样量 (μg) 为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 进行线性回归。结果表明各成分在各自进样范围内线性关系良好, 见表 1。

表 1 6 种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationship of the 6 phenylethanoid glycosides

化合物	回归方程	r	线性范围/ μg
松果菊苷	$Y = 941.61X - 18.805$	0.999 8	0.067 6 ~ 3.38
肉苁蓉苷 A	$Y = 1361.5X - 35.029$	0.999 8	0.053 2 ~ 2.66
毛蕊花糖苷	$Y = 1276.3X - 31.651$	0.999 7	0.057 6 ~ 2.88
异毛蕊花糖苷	$Y = 1705.9X - 42.176$	0.999 8	0.050 8 ~ 2.54
肉苁蓉苷 C	$Y = 1697.3X - 41.369$	0.999 8	0.051 2 ~ 2.56
2'-乙酰基毛蕊花糖苷	$Y = 1725.7X - 47.858$	0.999 8	0.046 8 ~ 2.34

2.5 精密度试验 准确吸取同一混合对照品溶液 20 μL 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 测定松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C、2'-乙酰基毛蕊花糖苷峰面积积分值, 计算 RSD 分别为 0.69%、0.55%、0.78%、0.73%、0.77%、0.56%。结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (生品) 20 μL 于制备后 0、2、4、8、12 h 分别进样测定松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C、2'-乙酰基毛蕊花糖苷峰面积积分值, 计算 RSD 分别为 1.74%、0.28%、1.12%、2.33%、2.91%、2.13%。结果表明供试品溶液在 12 h 内稳

定。

2.7 重复性试验 精密称取同一样品 (生品) 6 份, 照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样 20 μL 测定计算松果菊苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C、2'-乙酰基毛蕊花糖苷的平均值 ($n = 6$) 分别为 0.43%、0.079%、0.14%、0.11%、0.049%、0.039%; RSD 分别为 0.85%、1.44%、2.53%、2.73%、2.28%、2.68%。结果表明方法重复性较好。

2.8 加样回收率试验 取 2.7 项下已测知含量的药材粉末 (生品) 6 份, 每份 0.5 g 精密称定, 分别精密加入一定量的 6 种对照品溶液, 再以 70% 甲醇补足至 50 mL 然后按 2.3 项下方法制备供试液, 进样分析。结果见表 2。

2.9 样品测定 分别称取肉苁蓉生品和不同炮制时间的药材粉末 1 g 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 测定结果见表 3。

3 讨论

3.1 苯乙醇苷类化合物分子结构中有酚羟基及苷键, 易发生氧化及水解而被破坏, 通过对不同酒蒸时间的肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的测定, 结果发现松果菊苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C、2'-乙酰基毛蕊花糖苷 5 种成分随着蒸制时间的延长呈现逐渐降低的趋势; 其中 2'-乙酰基毛蕊花糖苷降低幅度最大, 酒蒸 16 h 时下降约 77%; 松果菊苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 C 4 种成分酒蒸 20 h 也下降 50 ~ 70%; 而肉苁蓉苷 A 在酒蒸的前 12 h 呈现逐渐增加的趋势, 然后又逐渐降低。以上结果表明, 不同的成分在酒蒸一定时间后量均降低, 但热稳定性和变化趋势不完全一致, 而且可能存在其他成分向肉苁蓉苷 A 转化的情况。

表 2 加样回收率试验结果 (n=5)

Tab. 2 The results of recovery test (n=5)

各成分	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
松果菊苷	2.141	2.151	4.264	98.7	97.2	2.08
	2.153	2.151	4.205	95.4		
	2.157	2.151	4.228	96.3		
	2.146	2.151	4.297	100.0		
	2.162	2.151	4.221	95.7		
	0.393 3	0.392 4	0.768 8	95.7		
肉苁蓉苷 A	0.395 5	0.932 4	0.778 1	97.5	96.1	1.94
	0.396 3	0.392 4	0.765 5	94.1		
	0.394 3	0.932 4	0.780 8	98.5		
	0.397 2	0.392 4	0.768 8	94.7		
	0.697 1	0.713 0	1.427	102.4		
	0.701 0	0.713 0	1.410	99.5		
毛蕊花糖苷	0.702 3	0.713 0	1.395	97.2	100.2	2.33
	0.698 7	0.713 0	1.405	99.1		
	0.703 9	0.713 0	1.436	102.7		
	0.547 7	0.549 2	1.094	99.5		
	0.550 8	0.549 2	1.102	100.4		
	0.551 8	0.549 2	1.099	99.6		
异毛蕊花糖苷	0.549 0	0.549 2	1.108	101.8	100.5	1.03
	0.553 1	0.549 2	1.110	101.4		
	0.244 0	0.245 2	0.477 7	95.3		
	0.245 3	0.245 2	0.489 3	99.5		
	0.245 8	0.245 2	0.479 0	95.1		
	0.244 5	0.245 2	0.481 6	96.7		
肉苁蓉苷 C	0.246 4	0.245 2	0.492 6	100.4	97.4	2.49
	0.194 2	0.193 4	0.386 4	99.4		
	0.195 3	0.193 4	0.380 0	95.5		
	0.195 6	0.193 4	0.379 5	95.1		
	0.194 6	0.193 4	0.389 4	100.7		
	0.196 1	0.193 4	0.391 4	101.0		

3.2 同时在比较生品与不同酒蒸时间的炮制品 HPLC 色谱图时发现,酒蒸后保留时间为 4.3 min 处有 1 新的色谱峰出现,且随着酒蒸时间的延长此色谱峰峰面积逐渐增加,表明肉苁蓉酒蒸后不但有已知成分量的变化,更存在内在成分质的改变,而酒蒸后新产生成分可能是肉苁蓉炮制后补肾阳作用增强的主要药效成分之一,其结构以及药理活性仍有待进一步研究。

表 3 测定结果 (n=2)

Tab. 3 The results of sample determination (n=2)

炮制 时间	松果 菊苷	肉苁蓉 苷 A	毛蕊花 糖苷	异毛蕊 花糖苷	肉苁蓉 苷 C	2'-乙酰基 毛蕊花糖苷
0 h	0.43	0.079	0.14	0.11	0.049	0.039
4 h	0.37	0.079	0.11	0.098	0.033	0.032
8 h	0.34	0.087	0.11	0.098	0.033	0.018
12 h	0.33	0.092	0.097	0.087	0.030	0.008 9
16 h	0.31	0.069	0.077	0.070	0.022	0.009 1
20 h	0.21	0.061	0.042	0.038	0.021	—

注:药材中 6 种成分质量分数均是扣除水分后的质量分数;
“—”含有量较低,未进行测定。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 126.
- [2] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 300-301.
- [3] 张思巨, 陈妙华, 刘 丽. 肉苁蓉生品及不同炮制品麦角甾苷含量比较研究[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(6): 335-337.
- [4] 张淑运, 巢志茂, 陈妙华. 肉苁蓉炮制前后甜菜碱的含量测定[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(7): 409-410.
- [5] 张百舜, 赵学文, 陈双厚, 等. 肉苁蓉分离部位通便作用的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(11): 31-32.
- [6] 张百舜, 陈双厚, 赵学文, 等. 肉苁蓉提取物半乳糖醇通便作用的量效研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(12): 28-29.
- [7] 何 伟, 舒小奋, 宗桂珍, 等. 肉苁蓉炮制前后补肾壮阳作用的研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(9): 534-537.
- [8] 张 勇, 吴 焕, 王顺年, 等. 肉苁蓉类药材及其炮制品通便作用的比较研究[J]. 中成药, 1993, 15(5): 20-21.
- [9] 陈妙华, 张思巨, 张淑云, 等. 肉苁蓉最佳炮制方法的筛选[J]. 中药材, 1996, 19(10): 508-510.
- [10] 钱学勤, 何学龙. 肉苁蓉炮制方法的改进[J]. 西北药学杂志, 1996, 11(1): 94-95.
- [11] 余南才, 段富奎, 管竞环. 肉苁蓉炮制方法的研究[J]. 中成药, 1990, 12(7): 20-21.
- [12] 宋志宏, 雷 丽, 屠鹏飞. 肉苁蓉属植物的药理活性研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(9): 附 16-48.