·中药工业·

蒸制工艺对酒女贞子外观性状和主要成分的影响△

徐文娟[1]，董海鹏[2a]，韩婷[1]，屈文佳[1]，李春帅[1]，魏锋[3*]，李向日[1*]，林瑞超[1]

1. 北京中医药大学 中药炮制研究中心/北京市中药品质评价重点实验室，北京　102488；
2. 国家知识产权局 专利局复审和无效审理部，北京　100088；
3. 中国食品药品检定研究院 中药民族药检定所，北京　100050

［摘要］ **目的：**探究女贞子酒制过程中外观性状及主要成分随蒸制时间的变化规律，为修订《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）2015 年版酒女贞子含量测定的方法提供依据。**方法：**按《中国药典》2015 年版方法制备不同蒸制时间的酒女贞子样品，结合 PANTONE 色卡观察酒女贞子性状变化，采用高效液相色谱法（HPLC）对样品中特女贞苷、红景天苷、酪醇、松果菊苷、毛蕊花糖苷、芦丁 6 个成分含量进行测定，采用统计软件分析酒女贞子蒸制过程中性状、主要成分随蒸制时间的变化规律。**结果：**随蒸制时间的增加，酒女贞子颜色逐渐加深，并伴有白霜，酒蒸 6 ~ 24 h 的样品符合《中国药典》2015 年版酒女贞子性状标准，蒸制时间超过 12 h 时，酒女贞子的性状不再发生变化；女贞子在酒蒸过程中，特女贞苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷含量降低，芦丁含量略有下降，红景天苷和酪醇含量升高。**结论：**经酒制后，女贞子外观性状、内在成分均发生明显变化，两者存在一定相关性，可反映女贞子的炮制质量，建议以含量相对较高、含量差异较小且生物活性强的红景天苷作为酒女贞子含量测定的指标成分。

［关键词］ 酒女贞子；蒸制时间；外观性状；化学成分；质量标准

［中图分类号］ R283. 1　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1673-4890(2021)08-1437-07

doi：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20200929001

Effects of Steaming on Characters and Main Components of Wine-fried Ligustri Lucidi Fructus

XU Wen-juan[1], DONG Hai-peng[2a], HAN Ting[1], QU Wen-jia[1], LI Chun-shuai[1], WEI Feng[3*], LI Xiang-ri[1*], LIN Rui-chao[1]

1. *Centre of Traditional Chinese Medicine Processing Research*, *Beijing University of Chinese Medicine/Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Materia Medica*, *Beijing* 102488, *China*;
2. *Reexamination and Invalidation Department of the Patent Office*, *China National Intellectual Property Administration*, *Beijing* 100088, *China*;
3. *Institute for Control of Chinese Traditional Medicine and Ethnic Medicine*, *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050, *China*

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the changes of characters and six main components of Ligustri Lucidi Fructus with steaming time and to provide a reference for revising its content determination method in the *Chinese Pharmacopoeia* (2015). **Methods**: The wine-fried Ligustri Lucidi Fructus samples under different steaming time were prepared according to the *Chinese Pharmacopoeia* (2015). The characters were observed combined with Pantone color card and the content of specnuezhenide, salidroside, tyrosol, echinacoside, verbascoside, and rutin in wine-fried Ligustri Lucidi Fructus was determined by HPLC. The changes in characters and main components with steaming time were analyzed by the statistical software. **Results**: The color of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus gradually deepened with steaming time, accompanied by the appearance of white frost. The characters of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus steamed for 6-24 h met the criteria in the *Chinese Pharmacopoeia* (2015). The characters of samples steamed for more than 12 h showed no obvious changes

△［基金项目］ 2018年国家药典委员会药品标准制修订研究课题（2018Z009）

*［通信作者］ 李向日，教授，研究方向：中药炮制；Tel：（010）84738616，E-mail：lixiangri@sina.com
魏锋，研究员，研究方向：中药质量控制；Tel：（010）67095432，E-mail：weifeng@nifdc.org.cn

a　并列第一作者

anymore. During wine steaming, the content of specnuezhenide, echinacoside, and verbascoside decreased and that of rutin decreased slightly, while the content of salidroside and tyrosol increased. **Conclusion**: After steaming with wine, the characters and internal components of Ligustri Lucidi Fructus changed considerably. There was a certain correlation between the characters and components, which could reflect the processing quality of Ligustri Lucidi Fructus. Salidroside was suggested as the index component for the content determination of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus due to its high content, small content difference, and strong biological activity.

[**Keywords**]　wine-fried Ligustri Lucidi Fructus; steaming time; characters; components; quality standard

女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实，始载于《神农本草经》，列为上品，具有滋补肝肾、明目乌发之效[1-2]。女贞子经酒蒸或酒炖为酒女贞子后，其“形如女贞子，表面黑褐色或灰黑色，常附有白色粉霜，微有酒香气”[1]。传统认为[3]，女贞子生品性凉，可清肝明目、滋阴润燥，用于治疗肝热目眩、阴虚肠燥便秘等症，如菊女饮（《辨证录》）、女贞汤（《医醇剩义》）等。酒制后，补肝肾作用增强且其寒凉之性得以缓解，多用于腰膝酸软、须发早白、目暗不明等症，如二至丸（《医方集解》）、缪仲淳乌发明目丸（《续名医类案》）等。酒女贞子在现代临床应用广泛，可用于治疗慢性肝炎、高脂血症、更年期综合征、老年性便秘、不孕、心悸等，亦可作为放化疗辅助药物。

女贞子主要活性成分为萜类、苯乙醇苷类和黄酮类化合物，具有抗骨质疏松、抗肿瘤、保肝、调节免疫、降血糖、调血脂、抗炎、抗菌、抗衰老等作用[4]。现代研究发现，酒制对脂溶性萜类齐墩果酸、熊果酸含量无明显影响[5]，但对环烯醚萜类与苯乙醇类等化合物含量影响显著。酒制的 24 h 内，环烯醚萜类化合物除女贞酸含量逐渐升高后趋于稳定外，特女贞苷、女贞苷、橄榄苦苷等含量均有降低的趋势[6-7]；除松果菊苷、毛蕊花糖苷等含量下降外，多数苯乙醇类化合物含量呈现上升或先升后降的趋势[5,7-8]。女贞子酒制后，其药理作用也发生了明显的变化，抗骨质疏松、抗炎抑菌、升白、调节免疫等作用增强，并减缓了肠道的蠕动，可缓解生品所致滑肠泻下的不良反应[9-10]。可见，女贞子与酒女贞子在化学成分和药理作用上存在明显差异。然而，《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）2015 年版中女贞子、酒女贞子均以特女贞苷作为含量测定的指标成分，且含量限度一致，均为“含特女贞苷（$C_{31}H_{42}O_{17}$）不得少于 0. 70%”，难以体现女贞子酒制的炮制原理，亦难以全面评价酒女贞子的质量，无法保证临床有效用药。

评价中药质量的方法主要包括传统鉴别法和有效成分含量评价法，两者各有利弊。前者主观性强，难以统一标准，后者因忽略性状，常被指责为“唯成分论”，结合两者优势，才能更加全面客观评价中药质量。课题组前期对女贞子药材的性状与化学成分之间的关系进行研究，发现女贞子成分与其颜色、百粒质量等存在一定关系[11-12]。本研究基于前期研究，进一步探究酒女贞子在蒸制过程中，其外观性状（颜色、白霜）及特女贞苷、红景天苷、酪醇、松果菊苷、毛蕊花糖苷、芦丁 6 个成分含量的变化规律（图 1），并对《中国药典》2015 年版酒女贞子含量测定的方法提出建议。

1　材料

1. 1　仪器

Waters 2489 型高效液相色谱仪；Agilent Zorbax SB-C_{18}（250 mm×4. 6 mm，5 μm）色谱柱；FW-100 型高速万能粉碎机（北京科伟永兴仪器有限公司）；KQ-600DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；AG 型分析天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；PANTONE 色卡 C 版（深圳千通彩色彩管理有限公司）。

1. 2　试药

对照品特女贞苷（批号：111926-201404，纯度：97. 3%）、红景天苷（批号：110818-201708，纯度：98. 8%）、芦丁（批号：1000-200702，纯度：90. 5%）均购自中国食品药品检定研究院；对照品松果菊苷（批号：16102103，纯度≥98. 0%）、毛蕊花糖苷（批号：16102103，纯度≥98. 0%）均购自成都普菲德生物技术有限公司；对照品酪醇（批号：J0621RA13，纯度≥98. 0%）购自上海源叶生物技术有限公司；甲醇为色谱纯；娃哈哈纯净水；其余试剂均为分析纯。

女贞子药材（产地：河南，批号：022170501）

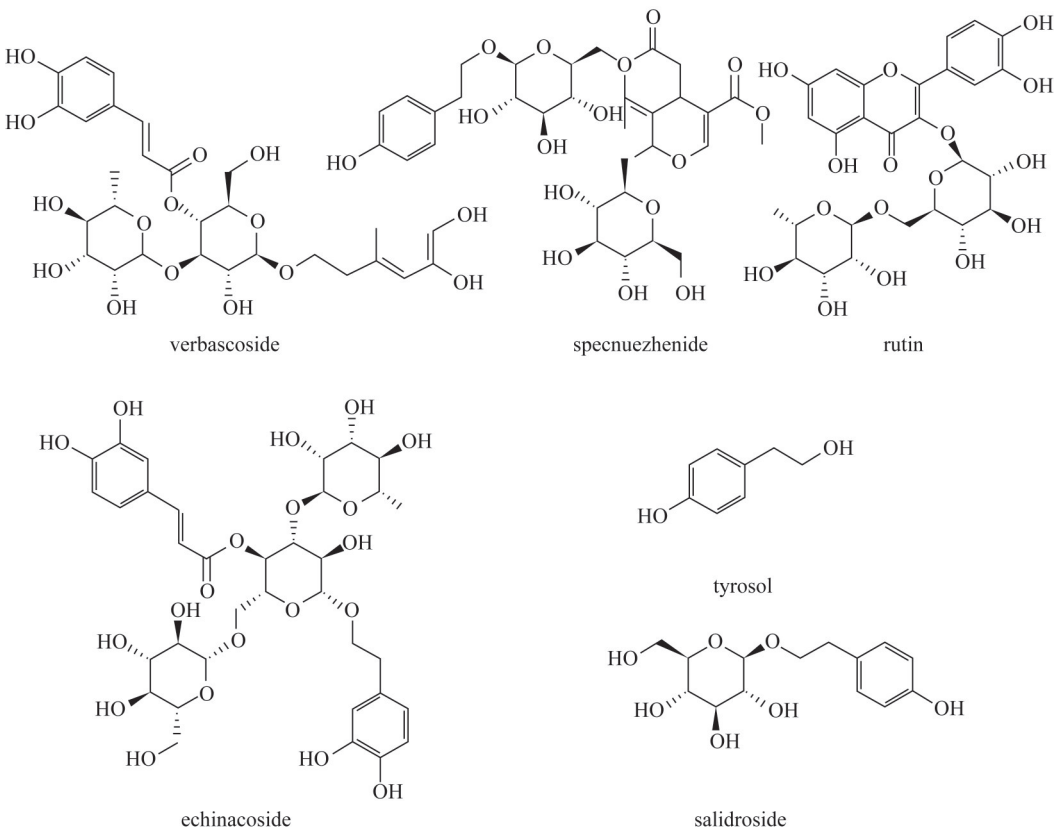


图 1　女贞子中 6 个成分结构

由河北橘井药业有限公司提供，经北京中医药大学李向日教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实。

2　方法

2.1　不同蒸制时间酒女贞子样品的制备

参照《中国药典》2015 年版及《北京市中药饮片炮制规范》2008 年版中的炮制方法对女贞子药材进行炮制，分别蒸制 2、6、12、16、20、24 h，干燥，得不同蒸制时间的酒女贞子样品。

2.2　蒸制时间对酒女贞子外观性状的影响

观察酒女贞子颜色及白霜随蒸制时间的变化，并结合 PANTONE 色卡对其颜色进行评价。

2.3　蒸制时间对酒女贞子中主要成分的影响

按照课题组前期研究建立的方法，对酒女贞子中特女贞苷、红景天苷、酪醇、松果菊苷、毛蕊花糖苷、芦丁的含量进行测定[11]。

2.3.1　色谱条件　Agilent Zorbax SB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱；乙腈（A）-0.1% 磷酸水（B）为流动相，梯度洗脱（0～15 min，4%A；15～35 min，4%～6%A；35～60 min，6%～15%A；60～100 min，15%～20%A；100～130 min，20%～40%A）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；柱温为 30 ℃；检测波长分别为 230、350 nm；进样量为 10 μL。

2.3.2　对照品溶液的制备　分别取对照品特女贞苷、红景天苷、酪醇适量，精密称定，加入甲醇稀释至特女贞苷、红景天苷、酪醇分别为 0.33、0.31、0.36 mg·mL^{-1}的混合对照品溶液（a）；分别取对照品松果菊苷、芦丁、毛蕊花糖苷适量，精密称定，加入甲醇稀释至松果菊苷、芦丁、毛蕊花糖苷分别为 0.31、0.30、0.31 mg·mL^{-1}的混合对照品溶液（b）。

2.3.3　供试品溶液的制备　取女贞子样品中粉约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密量取 70% 甲醇 50 mL，称定质量，超声处理 30 min。再次称定质量，用 70% 甲醇补足减失质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3.4　样品含量测定　自制酒女贞子样品中粉按 **2.3.3** 项下方法制备供试品溶液，按 **2.3.1** 项下色谱条件测定，计算样品含量。

3　结果与分析

3.1　蒸制时间对酒女贞子外观性状的影响

不同蒸制时间的酒女贞子样品见图2，性状结果见表1。由图2及表1可知，在蒸制过程中，随着蒸制时间的延长，女贞子的颜色逐渐加深，酒蒸0～6 h，其颜色由棕褐色转变为黑褐色，并伴有少量白霜；酒蒸6～12 h，颜色变为灰黑色，白霜明显可见；酒蒸12～24 h，酒女贞子性状无明显变化；自制酒女贞子均微有酒香气。有研究表明，白霜为齐墩果酸，酒制可使女贞子质地酥脆，促进齐墩果酸的溶出，从而增强疗效[13]。女贞子酒蒸过程中颜色加深可能与其发生美拉德反应有关，有研究发现，女贞子在酒炖24 h内，其多糖及多数环烯醚萜类化合物含量呈下降趋势[5-7]，水溶性低分子糖含量在酒炖0～24 h内呈升高趋势而后显著下降[5]，5-羟甲基糠醛（5-HMF）含量逐渐升高且在酒炖20 h后含量升高最为明显[5]，表明女贞子酒制过程中多糖及环烯醚萜苷类化合物水解产生的低分子糖可能参与美拉德反应，从而导致饮片颜色加深。另外，环烯醚萜苷类化合物水解产生的苷元可进一步发生氧化、聚合等反应，亦有可能导致女贞子酒制过程中颜色发生变化[14]。综上，女贞子酒蒸过程中颜色变化可能与其多糖及环烯醚萜类成分存在一定关系，后续可量化颜色指标，对此进一步研究[15-16]。女贞子酒蒸6～24 h后，其外观性状符合《中国药典》2015年版酒女贞子性状标准，表明酒女贞子的蒸制时间应不少于6 h。

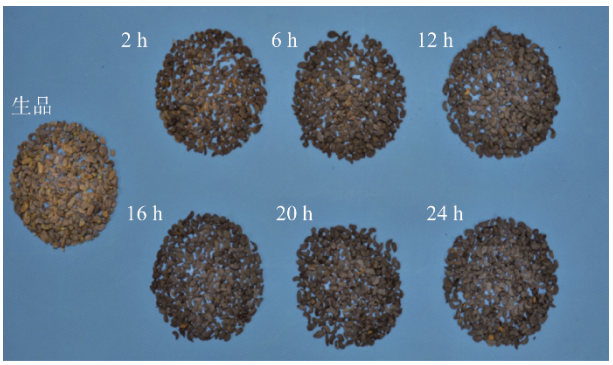


图2　不同蒸制时间的酒女贞子样品

3.2　蒸制时间对酒女贞子中主要成分的影响

女贞子及不同蒸制时间的酒女贞子样品6个成分含量测定结果见表2及图3。由表2及图3可知，

表1　不同蒸制时间酒女贞子性状

炮制时间/h	颜色	色卡编号	有无白霜
生品	棕褐色	7512	无
2	棕褐色，深于生品	7517	无
6	黑褐色	7519	少有
12	灰黑色	7533	明显
16	灰黑色	7533	明显
20	灰黑色	7533	明显
24	灰黑色	7533	明显

注：各色卡对应颜色7512；7517；7519；7533。

随着蒸制时间的延长，裂环环烯醚萜类成分特女贞苷含量显著下降，苯乙醇类成分红景天苷、酪醇含量随之升高，与文献[5-7]报道结果一致，这与特女贞苷水解生成红景天苷，红景天苷进一步水解转化为酪醇有关[6]，其转化规律见图4。亦有研究表明，红景天苷、酪醇含量的升高与女贞苷G13、女贞苷、女贞次苷、oleopolynuzhenide A、oleonuezhenide等环烯醚萜类化合物的水解有关；另外，随着时间的延长，苯乙醇类成分松果菊苷、毛蕊花糖苷含量也呈现下降的趋势；黄酮类成分芦丁含量较少且略有下降[17]。

表2　不同蒸制时间酒女贞子的含量测定结果（n=2）

%

炮制时间/h	质量分数					
	酪醇	红景天苷	特女贞苷	松果菊苷	芦丁	毛蕊花糖苷
生品	0.04	0.14	2.03	0.15	0.02	0.08
2	0.07	0.15	1.97	0.14	0.02	0.07
6	0.08	0.21	1.65	0.14	0.02	0.05
12	0.09	0.28	1.34	0.13	0.01	0.05
16	0.10	0.43	1.30	0.13	0.01	0.05
20	0.11	0.60	0.63	0.11	0.01	0.03
24	0.12	0.73	0.49	0.11	0.01	0.03

目前，已明确酒女贞子蒸制过程中特女贞苷、红景天苷、酪醇三者间的转化关系；结构上，松果菊苷仅比毛蕊花糖苷多1分子葡萄糖，表明松果菊苷在女贞子蒸制过程中可能发生水解生成毛蕊花糖苷；松果菊苷、毛蕊花糖苷受热水解可生成羟基酪醇、咖啡酸等化合物，芦丁受热水解可生成槲皮素。采用SPSS 23.0统计分析软件对酒女贞子蒸制过程中6个成分含量的变化趋势进行相关性分析，结果见表3。从表3中可以发现，6个成分含量变化呈强相关，表明6个成分间在含量变化趋势上存在相关

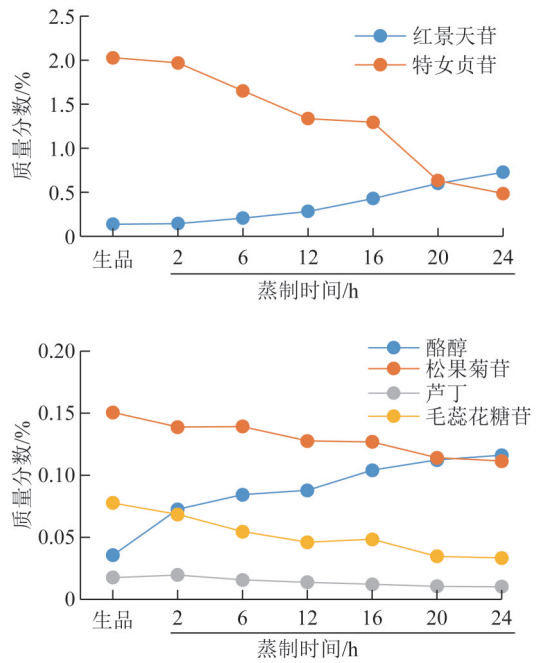


图 3　酒女贞子蒸制过程中 6 个成分的含量变化

性。目前未见女贞子产生不良反应的相关报道，其经酒制后疗效增强与有效成分含量升高关系密切。由于红景天苷、酪醇含量变化趋势成极显著正相关（Y=0. 1X+0. 05，r=0. 849）且酪醇含量较低，而红景天苷含量较高、活性强，具有保肝、保肾、保护神经系统、保护心血管、抗衰老[18]等作用，与酒女贞子的功效一致，说明红景天苷是酒女贞子的主要药效成分，故建议将红景天苷作为酒女贞子含量测定的指标成分。

《北京市中药饮片炮制规范》2008 年版规定，酒女贞子蒸制时间为 15 ~ 24 h[19]。本研究表明，女贞子酒蒸 6 ~ 24 h 后，其外观性状符合《中国药典》2015 年版酒女贞子性状标准，同时，红景天苷含量随酒蒸时间的增加而不断升高，进一步证实《北京市中药饮片炮制规范》2008 年版对女贞子酒蒸时间规定的科学性与合理性。

4　讨论

本实验基于前期研究基础，研究酒女贞子在蒸制过程中外观性状及特女贞苷、红景天苷、酪醇等 6 个成分含量的变化规律。结果表明随蒸制时间的增加，酒女贞子颜色逐渐加深，酒蒸 6 ~ 24 h 的样品符合《中国药典》2015 年版酒女贞子性状标准，蒸制时间超过 12 h 时，酒女贞子的性状不再发生明显变化。6 个成分除芦丁含量略有下降外，红景天苷、酪醇的含量呈升高趋势，特女贞苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量呈现下降趋势，可见，酒女贞子与女贞子间成分含量差异显著。而《中国药典》2015 年版并未对女贞子及酒女贞子的含量测定方法及限度标准进行区分，难以体现女贞子酒制的炮制原理。因此，有必要重新建立酒女贞子含量测定的方法，

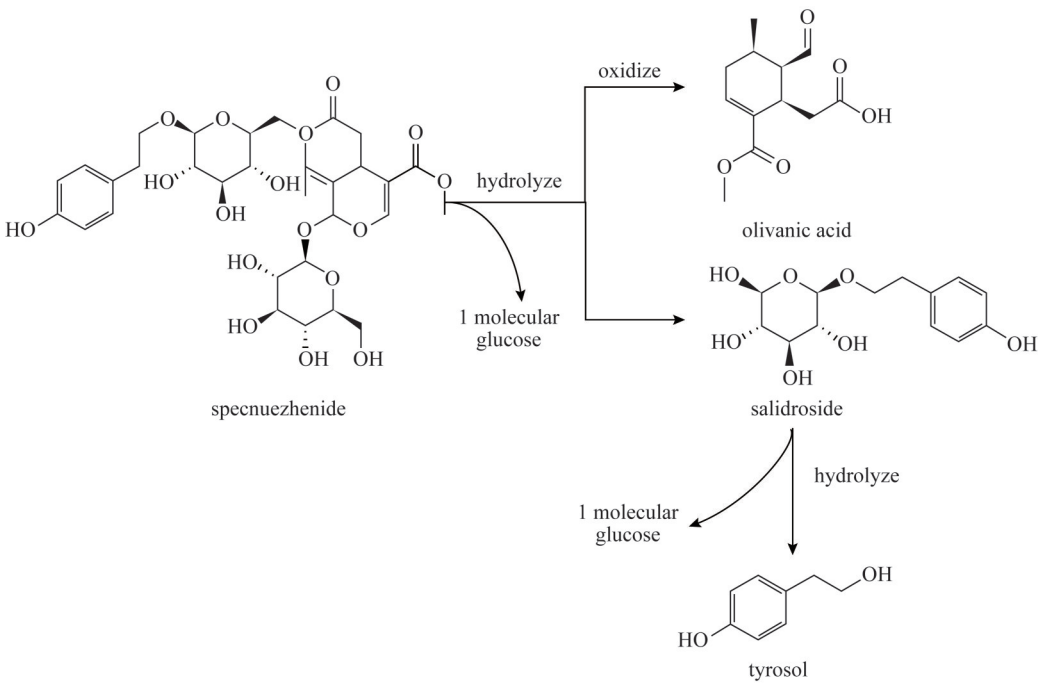


图 4　特女贞苷的水解

表3　酒女贞子蒸制过程中各成分含量变化的相关性分析

成分	特女贞苷	红景天苷	酪醇	松果菊苷	芦丁	毛蕊花糖苷
特女贞苷	1.000	-1.000**	-1.000**	0.964**	0.964**	0.964**
红景天苷	-1.000**	1.000	1.000**	-0.964**	-0.964**	-0.964**
酪醇	-1.000**	1.000**	1.000	-0.964**	-0.964**	-0.964**
松果菊苷	0.964**	-0.964**	-0.964**	1.000	0.893**	0.929**
芦丁	0.964**	-0.964**	-0.964**	0.893**	1.000	0.929**
毛蕊花糖苷	0.964**	-0.964**	-0.964**	0.929**	0.929**	1.000

注：**P<0.01。

从而规范炮制工艺、提升饮片质量。关联各成分含量变化趋势，发现每2种成分含量变化均成强相关（P<0.01），由于红景天苷含量相对较高、活性强，且本课题组前期研究发现，各批次女贞子及酒女贞子中特女贞苷的含量差异较大，故建议用红景天苷替换特女贞苷作为酒女贞子含量测定的指标成分。

传统中医理论以药物的外观性状认知药性，而药物的功效则是对药性的具体体现，现代中药理论多以药效物质基础即化学成分组成与含量确定药物的作用[20]，古今分别通过外观性状和化学成分说明药物的药性、作用，可见，药物的外观性状与其内在成分存在一定相关性，通过炮制，药物的外观性状达到古人要求的同时，其内在成分也会发生相应转化，从而使得药物发挥作用的侧重有所不同。女贞子生用以“清虚热”，酒制后则用以“补肝肾”。本研究发现，女贞子在酒制过程中外观性状、内在成分均发生了显著变化。目前，对于女贞子炮制过程中成分转化机制的研究较多，关于其外观性状变化研究及外观性状变化与内在成分间关联研究的报道则相对较少。通过文献研究发现，女贞子酒制过程中颜色变化可能与其受热发生美拉德反应有关，美拉德反应广泛存在于食品加工及中药炮制的过程中，其反应过程主要为还原糖等羰基化合物和氨基酸等氨基化合物之间经缩合、聚合等反应生成类黑精等褐色物质，是一种非酶褐变反应，可导致食品或中药色泽、香味等发生变化[21]。多糖、环烯醚萜苷类化合物水解产生的小分子糖可为美拉德反应提供丰富的底物，环烯醚萜苷水解生成的酚类化合物可增强体系酸性，从而加快美拉德反应的速度[21]。此外，环烯醚萜苷类化合物水解产生的苷元可发生氧化、聚合等反应，亦有可能导致女贞子酒制过程中颜色发生变化。综上表明，女贞子酒蒸过程中的颜色变化与其多糖、环烯醚萜苷类等成分相关，后续可将颜色指标量化，与多糖、环烯醚萜苷类等成分含量及美拉德反应理化参数进行相关性分析，进一步阐释女贞子酒制的炮制机制。

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.

[2] 佚名. 神农本草经[M]. 成都:四川科技出版社,2008:151-152.

[3] 吴皓,李飞. 中药炮制学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2016:350-351.

[4] 刘亭亭,王萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(14):228-234.

[5] 侯杰. 女贞子炮制前后主要有效成分变化规律研究[D]. 济南:山东中医药大学,2009.

[6] 李转梅,张学兰,李慧芬,等. 女贞子酒蒸过程中新女贞苷、木樨榄苷-11-甲酯和女贞酸的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(12):14-17.

[7] 霍雨佳,岳琳,刘颖,等. 酒制对女贞子饮片主要化学成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(1):26-30.

[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] 周爱香,富杭育,沈鸿,等. 女贞子不同炮制品药理作用的比较[J]. 中药材,1993,16(8):25-29.

[10] 黄君梅. 酒制女贞子治疗骨质疏松症的物质基础和作用机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2013.

[11] 刘欢,熊慧,薛雪,等. 全国资源普查女贞子药材质量特征关系探究及对《中国药典》女贞子药材标准规定的思考[J]. 中国中药杂志,2019,44(1):68-76.

[12] 高岩,刘薇,贾天颖,等. 全国中药资源普查女贞子药材质量现状研究[J]. 药物分析杂志,2019,39(2):361-369.

[13] 李曼玲,刘美兰. 建立模拟炮制样品阐明女贞子酒制意义[J]. 中国中药杂志,1995,20(8):471-472.

[14] 周莉莉,刘志强,吴国光,等. 山茱萸炮制过程中环烯

醚萜苷类成分的质谱研究[J]. 化学学报,2008,66(24):2712-2716.
[15] 屈文佳,贾天颖,王海丽,等. 不同蒸制时间下红参颜色及3种常见人参皂苷的转化规律研究[J]. 北京中医药大学学报,2020,43(9):769-775.
[16] 刘梦楠,杨晓燕,屈文佳,等. 基于偏最小二乘判别分析建立熟三七粉的质量评价方法[J]. 中草药,2019,50(21):5319-5327.
[17] 张学兰,宋梦晗,姜秋,等. 女贞子炮制前后环烯醚萜苷类成分转化机制研究[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(12):2602-2604.
[18] 吴秀专,毕晓华,王燕芳,等. 红景天苷药理作用研究进展概述[J]. 中国药师,2018,21(8):1460-1462.
[19] 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,2010:269-270.
[20] 薛雪,王浩,贾天颖,等. 不同生长方式及年限防风饮片质量的比较研究及对《中国药典》防风饮片标准的思考[J]. 中国中药杂志,2019,44(18):4034-4042.
[21] 宫瑞泽,霍晓慧,张磊,等. 美拉德反应对中药品质的影响及调控研究进展[J]. 中草药,2019,50(1):243-251.

(收稿日期:2020-09-29 编辑:王笑辉)