

山茱萸中马钱子苷的研究进展

曹 岗¹, 邵玉蓝¹, 张 云¹, 丛晓东¹, 蔡宝昌^{1,2}

(1. 浙江中医药大学 中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 310053; 2. 南京中医药大学

江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210049)

摘要:山茱萸为常用中药, 具有补益肝肾、涩精固脱等功效。马钱子苷作为山茱萸中环烯醚萜类的主要成分, 具有免疫调节、抗休克等作用。综述了山茱萸中马钱子苷的提取、分离、鉴别、测定方法及其药理作用、药代动力学等方面的研究进展。

关键词:山茱萸; 马钱子苷; 分离; 分析; 药理学

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)05-0272-04

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 具有补益肝肾、涩精固脱等功效, 常用于治疗眩晕耳鸣、腰膝酸痛、阳痿遗精、遗尿尿频、崩漏带下、大汗虚脱、内热消渴等症^[1]。近年来, 对山茱萸药理作用的进一步研究表明, 马钱子苷作为山茱萸中环烯醚萜类的主要成分, 具有免疫调节、抗休克、抗过氧化脂质、抑制前脂肪细胞分化等作用。目前该成分已成为对山茱萸研究的热点, 具有广阔的开发前景。

马钱子苷(loganin, 又称 loganoside), 又名马钱素, 番木鳖苷^[2]。就山茱萸中马钱子苷的提取与分离、鉴别及测定方法, 药理作用与药代动力学等方面的研究做一综述。

1 提取与分离

俞坚等^[3]以山茱萸为原料, 在微波场的作用下, 进行了不同微波提取溶剂、料液比、提取时间、提取温度、提取功率对山茱萸中马钱子苷提取率的影响以及正交优化实验等研究。结果表明: 影响微波提取的因素依次为提取时间、提取温度、提取功率; 优选方案为: 微波提取溶剂为水, 料液比 1:30, 提取时间 10 min, 提取温度 70℃, 提取功率 300 W, 在此条件下山茱萸马钱子苷的提取率为 0.80%。励建荣等^[4]通过溶剂回流法和超声波法对山茱萸中马钱子苷的提取工艺进行了研究: 采用单因素法确定提取溶剂种类等参数后, 以提取温度、提取时间、95%乙醇用量等为因素, 选用 L16(4³×2⁶) 和 L9(3⁴) 正交表进行工艺优化设计, 马钱子苷以 HPLC 法外标定量。结果表明, 超声波法的提取效率高于溶剂提取, 最佳工艺条件是: 提取温度为 75℃, 提取时间为 240 min, 95%乙醇用量为 50 mL。用此提取工艺,

马钱子苷的提取效率较高, 可达 14.05 mg/g。皮文霞等^[5]以山茱萸总苷中主要有效成分莫诺苷及马钱子苷为考察指标, 用 HPLC 法观察大孔树脂及活性炭富集山茱萸总苷的最佳工艺条件。结果显示, 以 30%、50% 乙醇洗脱大孔树脂柱, 以 30%、50%、70% 乙醇洗脱活性炭柱为最佳分离工艺, 大孔树脂富集山茱萸总苷优于活性炭, 前者对莫诺苷和马钱子苷的洗脱率约为 96%, 后者约为 85%。

2 鉴别与测定

2.1 鉴别^[6]

取山茱萸粉末 2 g, 加乙醇 20 mL, 水浴加热 15 min, 滤液浓缩至 5 mL, 点于硅胶 G 薄层板上, 以正丁醇-乙醇-水(15:3:2)为展开剂, 展开后, 喷以 10% 香草醛溶液, 之后再喷以 72% 的硫酸, 于 105℃ 烘 5 min 显色。结果在供试品色谱图中, 在与马钱子苷对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点。

取山茱萸粉末 0.5 g, 加甲醇 5 mL, 冷浸 24 h, 滤过, 滤液点于硅胶 G 薄层板上, 以氯仿-甲醇(16:4)为展开剂, Godin 试剂为显色剂, 于 80~90℃ 烘 5 min, 结果显 8 个斑点, 其中显紫红色斑点位置与马钱子苷对照品显色位置一致。

2.2 测定

2.2.1 薄层扫描法

取山茱萸粉末 5 g, 加乙醇 30 mL, 水浴加热 1 h, 滤液回收至无醇味, 加甲醇定容至 10 mL。取样品液 2 μL 点于硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以氯仿-甲醇(4:1)为展开剂展开 8 cm, 在紫外灯下呈紫红色斑点。双波长反射法锯齿扫描, λ_s=235 nm, λ_r=300 nm。马钱子苷的线性范围为 2.08~10.40 μg。

2.2.2 HPLC 法

宋平顺等^[7]建立了山茱萸不同炮制品中马钱子苷的 HPLC 分析方法,以提高山茱萸炮制品的质量标准。采用大连依利特色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);乙腈-水(15:85)为流动相;检测波长为 240 nm;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为室温。结果发现,马钱子苷在 0.085~0.595 μg 呈良好的线性关系;平均回收率为 96.48%,RSD 为 1.00% (n=6)。表明此方法准确、灵敏度高、重现性好,适用于山茱萸炮制品的质量控制。张振凌等^[8]采用 RP-HPLC 法比较山茱萸炮制前后马钱子苷量的变化。结果显示,河南不同产地山茱萸生品和酒制品中马钱子苷的量有一定差异。因而表明炮制(酒制)对山茱萸马钱子苷的量有一定影响。

王花红等^[9]以马钱子苷、熊果酸、齐墩果酸为对照品,采用 HPLC 法建立了山茱萸药材的指纹图谱。色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)及其 C₁₈ 保护柱;流动相:乙腈-0.4%磷酸水溶液,梯度洗脱;柱温:室温;体积流量:1 mL/min;检测波长:210 nm;进样量:10 μL。张延妮等^[10]采用高效液相色谱-电化学(库仑电极)阵列检测技术,以马钱子苷、熊果酸、齐墩果酸为分析对象,对不同产地山茱萸的指纹图谱进行了初步研究。色谱条件:Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)及其 C₁₈ 保护柱;流动相 A:30 mmol/L 磷酸二氢钠水溶液(pH 值为 5)-5%乙腈,流动相 B:30 mmol/L 磷酸二氢钠水溶液(pH 值为 5)-70%乙腈;体积流量 1.0 mL/min,线性梯度洗脱,洗脱程序为 100% A 保持 30 min,线性洗脱 100 min→30% A 为 0,保持 40 min。十六通道电化学阵列检测器的检测电位为 50~850 mV,以 60 mV 递增。戴冰等^[11]采用 RP-HPLC 法检测不同来源山茱萸中马钱子苷的量:色谱柱 Hypersil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 25 °C,体积流量 1.0 mL/min,检测波长 240 nm。结果发现,各药材马钱子苷的量在 1.21%~1.62%,其中以河南宛西山茱萸中马钱子苷的量最高,为 0.1~0.8 μg,马钱子苷回归方程为:Y=0.900 0 X+1.390 3 (r=0.999 8)。

杨剑芳等^[12]建立了测定山茱萸及其保健酒中马钱子苷量的 HPLC 法。样品用 80% 甲醇回流提取并用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,色谱柱为 Phenomil C₁₈ BDS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温为 35 °C,马钱子苷的检测波长为 236 nm,流动相为乙腈-水(14:86),体积流量为 1 mL/min。该方法测得

马钱子苷的线性范围为 0.092~0.92 μg/mL,回归方程为:Y=1 264.1 X+18.992 (r=0.999 7),平均回收率为 99.82%,RSD=1.95% (n=5);山茱萸及其保健酒中马钱子苷的量分别为 1.378%、0.703%。此法准确、快捷、重现性好,适合于马钱子苷的测定。

许丹等^[13]为了进一步开发陕南山茱萸资源、明确不同生长期和不同产地的山茱萸中马钱子苷的量,采用 HPLC 法对山茱萸不同药材进行测定。结果显示,不同产地和不同生长期山茱萸中马钱子苷的量差异较大。不同产地山茱萸果实中马钱子苷的量为 0.408%~2.617%,其中以西北大学果园产样品的量为最高;在不同生长期中,以 11 月中旬(果实脱落之前)采集物中的马钱子苷的量最高。实验还表明,利用 HPLC 法进行测定,操作简单、快速、重现性好。苏喆等^[14]采用 HPLC 法建立了山茱萸有效成分马钱子苷的测定方法。试验条件为:Phenomsil C₁₈ BDS 色谱柱;柱温 35 °C;马钱子苷检测波长为 236 nm;流动相为乙腈-水(14:86);体积流量为 1.0 mL/min。经方法学考察表明,该测定方法精密度高、稳定性好。

3 药理作用

3.1 抗休克

王天山等^[15]在研究中发现,马钱子苷具有缓慢升高并维持休克模型家兔血压、改善肾血流量及延长动物生存时间等作用。给重症失血性休克模型家兔 iv 马钱子苷 1.0 mg,在升高血压、提高心率、改善肾血流量、提高动物存活率等方面效果显著;当其与辛弗林合用时,效果更好。

3.2 免疫调节

山茱萸总苷是一种免疫抑制剂,体内、体外实验均显示抑制淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)增殖、IL-2 产生,抑制小鼠和人混合淋巴细胞反应(MLR)等作用。无论在体内、体外,适当浓度的马钱子苷促进淋巴细胞转化,高浓度时则有抑制作用,提示马钱子苷对免疫反应有双相调节作用^[16]。赵武述等^[17]在研究中也发现,无论在体外还是体内实验,合适浓度的马钱子苷对淋巴细胞转化、IL-2 产生、LAK 细胞生成均有促进作用,高浓度时则有抑制作用。

3.3 对神经细胞作用

王文等^[18]利用噻唑蓝(MTT)代谢率测定肿瘤细胞存活率,以筛选马钱子苷促进神经细胞生长的最佳有效浓度;以 MTT 代谢率、乳酸脱氢酶

(LDH)渗出率、细胞轴突长度、胞体面积为指标,观察马钱子苷对人神经母细胞瘤株 SY5Y 生长的影响。结果显示,马钱子苷浓度为 0.1~1.0 mol/L 时,可增加 SY5Y 细胞存活率;与正常对照组相比,给药组 SY5Y 细胞轴突长度和胞体面积均增加,MTT 代谢率、LDH 渗出率降低。因此表明马钱子苷对 SY5Y 细胞具有神经营养作用。

3.4 抑制前脂肪细胞分化

戴冰等^[19]探讨马钱子苷对大鼠前脂肪细胞增殖与分化的影响。采用原代培养大鼠前脂肪细胞,以 MTT 法检测马钱子苷对大鼠前脂肪细胞增殖的影响;以酶组织化学提取法检测其对大鼠前脂肪细胞分化过程中磷酸甘油脱氢酶(GPDH)的影响;以油红 O 染色方法检测其对大鼠前脂肪细胞分化过程中细胞内脂肪积聚的影响。结果显示,马钱子苷 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 能够促进大鼠前脂肪细胞的增殖,抑制其分化过程中 GPDH 的升高和脂肪积聚,且明显呈量效关系。因而表明马钱子苷具有促进大鼠前脂肪细胞增殖,抑制大鼠前脂肪细胞分化的作用。

4 药代动力学

研究中药活性成分在体内吸收、分布、代谢和排泄等过程的动态变化规律,对阐明中药的有效性,探求中药功效的物质基础和作用机制等都具有重要意义^[20]。汤继辉等^[21]以 HPLC 法研究大鼠 ig 山茱萸后,马钱子苷的体内药代动力学特点。采用岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪,浙江智达 N2000 工作站, Hypersil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-甲醇-0.1%磷酸溶液(10:5:85),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 236 nm。结果显示,马钱子苷的药代动力学模型为单室模型一级吸收,其药代动力学参数为 $K_a=0.06/\text{min}$, $K_e=0.013/\text{min}$, $T_{(\text{peak})}=33.90 \text{ min}$, $t_{1/2ka}=12.47 \text{ min}$, $t_{1/2ke}=52.45 \text{ min}$ 。

李小娜等^[22]研究大鼠血浆中马钱子苷浓度的测定方法,并比较了 ig 马钱子苷单体和山茱萸提取液后,马钱子苷在大鼠体内的药代动力学过程;考察了马钱子苷单体 ig 后的绝对生物利用度。采用 HPLC 法,色谱柱为反相 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(32:68),体积流量 1 mL/min,检测波长 236 nm。结果,线性范围为 15.25~76.5 ng/mL,日内与日间 RSD<15%,回收率 93.5%~109.3%。动物 ig 给药后,马钱子苷单体消除 $t_{1/2}$ 为 93.6 min,绝对生物利用度为 13.2%;山

茱萸提取液中马钱子苷消除 $t_{1/2}$ 为 99.4 min,相对于马钱子苷单体的生物利用度为 19.4%。结果表明,马钱子苷单体经口给药的生物利用度较低。上述结果表明,用 HPLC 法研究山茱萸或马钱子苷 ig 给药后马钱子苷在大鼠体内的药代动力学,专属性强、结果可靠,灵敏度高,操作方便。

谢跃生等^[23]研究六味地黄汤不同配伍对马钱子苷药代动力学的影响。给小鼠一次性 ig 六味地黄汤、三补汤(组分山茱萸、山药、地黄)、一补一泻汤(组分山茱萸、丹皮)、(单味)山茱萸汤后,用 HPLC 法测定马钱子苷的血药浓度-时间曲线,用梯形法计算血药浓度-时间曲线下面积(AUC),比较马钱子苷的吸收速度及程度。结果显示,以 C_{max} /AUC、 T_{max} 和 $t_{1/2ka}$ 为吸收速度指标,马钱子苷的吸收速度以一补一泻汤最快,其次为三补汤及六味地黄汤,山茱萸汤最慢;以 AUC 及 C_{max} 为吸收程度指标,马钱子苷的吸收程度以山茱萸汤的最高,一补一泻汤最低。结果表明,六味地黄汤不同配伍会影响马钱子苷药代动力学参数。

李文兰等^[24]考察药物浓度、肠段、pH 及 P-糖蛋白(P-gp)对马钱子苷肠吸收机制的影响规律。将大鼠分为 10 组:马钱子苷高、中、低剂量(0.1、0.025、0.0125 mg/mL)的整肠段(十二指肠上部至回肠下部)组;十二指肠、空肠及回肠段组(马钱子苷给药均为 0.013 mg/mL);整肠段循环灌流液 pH 值分别为 6、7、8 组(马钱子苷给药均为 0.013 mg/mL);诱导剂利福平(0.0125 mg/mL)组。采用大鼠在体循环灌流法,应用 HPLC 法测定肠吸收循环液中马钱子苷的浓度;用 UV 法测定肠吸收循环液中即时酚红浓度。结果显示,马钱子苷质量浓度为 0.0125~0.1 mg/mL 时,其吸收量与药物质量浓度呈线性关系,且各质量浓度吸收速率基本不变;pH 对马钱子苷的吸收没有显著影响;各个肠段对马钱子苷的吸收速率及吸收量顺序为回肠>十二指肠>空肠。此外,P-gp 诱导剂利福平对马钱子苷的吸收有明显的抑制作用。此项研究结果表明,马钱子苷在肠道的吸收呈一级动力学过程,推断吸收机制为被动扩散;马钱子苷具有特定的吸收部位,宜制成胃肠道滞留型定位释药系统;该成分为 P-gp 底物,可以通过与 P-gp 抑制剂合用提高其生物利用度。

5 结语

马钱子苷是重要的天然化合物,深入研究其在体内的药代动力学和代谢转化情况,对于指导新药

设计、临床用药,提高药物的疗效和安全性有重要意义。对山茱萸中马钱子苷的研究虽已取得很大进展,但远未达到深入了解药物在体内的吸收分布、代谢转化和排泄等过程,以提高药物临床控制程度的目的。目前对马钱子苷的研究也相对较少,且由于研究方法比较简单,难以了解、解决大多数以马钱子苷类为主要成分的中成药的药物代谢问题。

随着科学技术的不断进步,许多新技术如液-质联用技术、核磁共振、超临界流体萃取、在体微透析技术、生物电阻抗技术等对中药化合物的检测和标记方面的应用取得了可喜的发展,这将促进和加强山茱萸中马钱子苷类药物的体内代谢的研究。

参考文献

- [1] 戴建子,张志豪,唐 蕾,等. 山茱萸化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国药业,2006,15(2):74-75.
- [2] Du W F, Cai H, Wang M Y, et al. Simultaneous determination of six active components in crude and processed *Fructus Corni* by high performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(1):194-197.
- [3] 俞 坚, 励建荣, 郑群雄, 等. 微波提取山茱萸马钱素的工艺研究[J]. 浙江工商大学学报, 2007, 85(4):46-50.
- [4] 励建荣, 郑群雄, 夏道宗, 等. 山茱萸中马钱素的提取工艺研究[J]. 中国食品简报, 2005, 5(3):61-66.
- [5] 皮文霞, 蔡宝昌, 潘 扬, 等. 大孔树脂与活性炭富集山茱萸总苷的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8):583-584.
- [6] 林朝展, 祝晨薇, 徐米雪, 等. 中药山茱萸的薄层色谱指纹图谱鉴别研究[C]//全国中药标准研究学术研讨会论文集. 珠海:中国中西医结合学会, 2005:86-92.
- [7] 宋平顺, 王兰霞, 丁永辉. HPLC测定山茱萸不同炮制品中马钱子苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(5):707-708.
- [8] 张振凌, 呼海涛, 刘 博, 等. 不同工艺酒制山茱萸马钱素、莫诺苷含量比较[J]. 中药材, 2007, 30(10):1217-1219.
- [9] 王花红, 郭五保, 顾 莹, 等. 山茱萸药材指纹图谱的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(10):17-18.
- [10] 张延妮, 王吉之, 杜昱光, 等. 高效液相色谱-库仑电极阵列法检测山茱萸的指纹图谱研究[J]. 西安交通大学学报, 2006, 33(3):75-77.
- [11] 戴 冰, 王诚元, 邹双华, 等. 不同来源山茱萸中马钱子苷含量的测定[J]. 湖南中医学院学报, 2006, 26(1):21-22.
- [12] 杨剑芳, 王春霞, 路福平, 等. HPLC法测定山茱萸及其保健酒中马钱子苷的含量[J]. 中国酿造, 2008, 182(5):75-77.
- [13] 许 丹, 樊宝娟, 孙文基. 不同生长期和不同产地山茱萸中马钱子苷的测定[J]. 西北大学学报:自然科学版, 2008, 38(4):602-604.
- [14] 苏 喆, 王斌哲. 山茱萸保健酒发酵工艺初步研究及有效成分马钱子苷含量测定[J]. 太原科技大学学报, 2008, 29(1):70-74.
- [15] 王天山, 潘 扬, 殷 飞, 等. 马钱素与辛弗林对家兔重症失血性休克模型的作用[J]. 南京中医药大学学报, 1999, 15(6):345-346.
- [16] 付桂香, 李建民, 周 勇, 等. 山茱萸总苷抗炎免疫抑制作用及其机理的大鼠实验研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(4):314-320.
- [17] 赵武述, 张玉琴, 赵世萍, 等. 山茱萸成分的免疫活性研究[J]. 中草药, 1990, 21(3):113-116.
- [18] 王 文, 黄文婷, 艾厚喜, 等. 莫诺苷和马钱素对人神经母细胞瘤株 SY5Y 生长的影响[J]. 中国药理通讯, 2007, 24(2):13.
- [19] 戴 冰, 肖子曾, 刘 磊, 等. 马钱子苷对大鼠前脂肪细胞增殖与分化的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(6):448-450.
- [20] 周莉莉, 吴国光, 刘志强. 高效液相色谱法测定山茱萸与五味子配伍前后马钱苷、没食子酸及五味子醇甲的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4):782-783.
- [21] 汤继辉, 胡容峰, 怀素丽. 山茱萸中马钱子苷大鼠体内药动学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(1):31-33.
- [22] 李小娜, 王 巧, 张兰桐. 山茱萸中马钱子苷在大鼠体内的药动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(1):4-7.
- [23] 谢跃生, 张振清, 乔善义, 等. 六味地黄汤不同配伍对马钱素药动力学的影响[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2004, 7(8):87-88.
- [24] 李文兰, 扈正婷, 季宇彬, 等. 马钱子苷肠吸收机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9):68-72.

(收稿日期 2009-03-13)

本 刊 启 事

本刊入编“中国核心期刊(遴选)数据库”和“CNKI 中国期刊全文数据库”,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付,不再另行发放。作者如不同意将文章入编上述数据库,投稿时敬请说明,我们将另行处理。

《现代药物与临床》编辑部