

黄精炮制过程中新产生成分分离及含量变化

曾林燕¹, 宋志前¹, 魏征², 曹玉娜², 张琳琳¹, 杜智勇¹, 刘振丽^{1*}

1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

摘要: 目的 分离黄精炮制过程中新产生的化学成分并研究其量变化规律。方法 采用提取分离和 LC-MS 法确定产生的 2 种化学成分的结构, 通过 HPLC 法分析 3 个品种黄精炮制前后以及不同炮制时间 2 种成分量的变化, 测定市售 15 个批次酒黄精中 2 种成分的量。HPLC 色谱条件: Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (8:92); 体积流量 10 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 45 °C。结果 炮制过程中新产生的 2 种成分为 5-羟甲基麦芽酚 (DDMP) 和 5-羟甲基糠醛 (5-HMF)。多花黄精中 DDMP 的量随着炮制时间的延长逐渐升高, 至炮制 24 h 达到最高, 随后开始逐渐降低; 5-HMF 的量随着炮制时间的延长逐渐升高。3 个品种黄精炮制后均产生这 2 种成分。15 个批次市售酒黄精中, 有 13 个批次中 DDMP 的量在 1.395%~5.265%, 14 个批次中 5-HMF 的量在 0.079%~0.708%; 自制 3 个品种酒黄精 (16 h) 中 2 种成分的量均在上述范围内。结论 酒黄精中 2 种成分的量随着炮制时间的变化而变化, 研究结果为酒黄精饮片标准的制定提供依据, 并为酒黄精炮制时间终点的确定提供了一定参考。

关键词: 黄精; 炮制; 5-羟甲基麦芽酚; 5-羟甲基糠醛; 酒黄精

中图分类号: R283.1; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)12-1584-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.12.012

Isolation of chemical constituents produced in processing of *Polygonati Rhizoma* and their content changes

ZENG Lin-yan¹, SONG Zhi-qian¹, WEI Zheng², CAO Yu-na², ZHANG Lin-lin¹, DU Zhi-yong¹, LIU Zhen-li¹

1. The Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To isolate the chemical constituents newly produced in processing of *Polygonati Rhizoma* and to analyze the content changes during its processing. **Methods** Two new chemical constituents were isolated from the processed *Polygonati Rhizoma* by using chemical extraction and identified by LC-MS. Then HPLC analysis was performed to analyze the content changes of the two newly produced constituents in three species of wine-processed *Polygonati Rhizoma* during different processing periods. The contents of the two compounds in 15 batches of commercially available wine-processed *Polygonati Rhizoma* were determined. The HPLC was performed on a Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with methanol-water (8:92) as the mobile phase at 1.0 mL/min, detection wavelength was 280 nm, and column temperature at 45 °C. **Results** The newly produced chemical constituents were 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP) and 5-hydroxymethyl-furfural (5-HMF). The content of DDMP in *Polygonatum cyrtoneura* increased to the top when processed to 24 h and then decreased. The content of 5-HMF was increased gradually throughout the processing. The two chemical constituents were found in the three kinds of wine-processed *Polygonati Rhizoma*. In the 15 batches of commercially available *Polygonati Rhizoma*, the range of DDMP in 13 batches was from 1.395% to 5.265%, and the range of 5-HMF in 14 batches was from 0.079% to 0.708%. Moreover, the contents of the two constituents in the three kinds of wine-processed *Polygonati Rhizoma* (16 h) were within the above ranges. **Conclusion** The contents of the two chemical constituents in *Polygonati Rhizoma* change with the processing time. Therefore, these results could provide the basis for making the quality standard and defining the processing time endpoint of *Polygonati Rhizoma*.

Key words: *Polygonati Rhizoma*; processing; DDMP; 5-HMF; wine-processed *Polygonati Rhizoma*

收稿日期: 2012-12-11

基金项目: 国家自然科学基金面上课题 (81073050)

作者简介: 曾林燕 (1986—), 女, 江西吉安人, 硕士研究生, 从事中药分析研究。E-mail: linyanz-2009@163.com

*通信作者 刘振丽, 研究员。Tel: (010)64014411-2503 E-mail: zhenli_liu@sina.com.cn

网络出版时间: 2013-05-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130516.1042.009.html>

黄精为百合科黄精属植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *P. sibiricum* Red. 或多花黄精 *P. cyrtonema* Hua 的干燥根茎。具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效^[1]。主要含有多糖、皂苷、氨基酸等活性成分^[2-3]，有关黄精炮制后化学成分的变化，已有一些研究报道，如其中的多糖和薯蓣皂苷类的量降低^[4-5]。

前期在对黄精炮制前后二氯甲烷提取液 HPLC 图谱对比分析中发现，黄精炮制后明显增加 2 个色谱峰，且峰面积随炮制时间变化而变化。本实验对这 2 个新产生的化合物进行分离纯化，LC-MS 分析确定为 5-羟甲基麦芽酚 (DDMP) 和 5-羟甲基糠醛 (5-HMF)，进一步采用 HPLC 法对同一品种黄精中 2 种成分的量随炮制时间的变化、不同品种黄精炮制前后是否有相同变化、以及市售 15 个批次酒黄精中这 2 种成分的范围进行了研究，为酒黄精饮片质量标准的制定及阐明黄精炮制前后物质基础的变化提供科学依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪；G1322A 脱气机，G1311A 四元泵，G1313A 自动进样器，G1316A 恒温箱，G1315B DAD 检测器，HP 化学工作站；Agilent 1200 SL 型高分离度快速液相色谱仪；G1322A 在线脱气机，G1312B SL 型二元泵，G1316B SL 型恒温箱，G1315CDAD SL 型检测器，G1367C SL 型自动进样器，HP 化学工作站，Agilent 6320 型离子阱质谱仪；Agilent 1200 制备液相色谱仪；G1361A 四元泵，G2260A 自动进样器，G1315D 检测器，HP 化

学工作站；FW—80 微型高速万能试样粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司），TCQ—250 超声波清洗器（北京医疗设备二厂），CP225D 电子天平（德国 Sartorius 集团），超纯水系列（美国 Thermo Scientific Nanopure），FD—1D—50 冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）。

绍兴黄酒（瓜渚湖黄酒，绍兴县第三酒厂，2010-11-20 生产），甲醇及二氯甲烷（分析级，国药集团化学试剂有限公司），水为超纯水，甲醇（色谱级，国药集团化学试剂有限公司），5-羟甲基麦芽酚（2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4-氢-吡喃-4-酮，DDMP）为课题组从制何首乌中制备得到，质量分数 95% 以上^[6]，5-羟甲基糠醛（5-HMF，批号 111626-200402）对照品购于中国食品药品检定研究院。

黄精购于贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县，经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定，分别为百合科黄精属植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 和多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua 的根茎。各品种酒黄精为依照《中国药典》2010 年版方法自制，多花黄精分别炮制 4、8、16、24、32 h，得到不同时间的酒黄精，滇黄精与黄精炮制 16 h 得到各自酒黄精。市售黄精饮片均为酒黄精，各黄精药材及其饮片来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 炮制品制备^[1]

黄精：除去杂质，洗净，略润，切厚片（2~4 mm），干燥，即得。

表 1 黄精及酒黄精来源

Table 1 Sources of *Polygonati Rhizoma* and wine-processed *Polygonati Rhizoma*

编号	名称	来源	品种	编号	名称	来源	品种
1	酒黄精	北京永安堂	未知	13	酒黄精	深圳仁济堂大药房	未知
2	酒黄精	北京仟草饮片有限公司	未知	14	酒黄精	天津桐君阁大药房	未知
3	酒黄精	江西南昌圣爱国药馆	未知	15	酒黄精	江西昌帮中药行	未知
4	酒黄精	北京京隆堂大药房	未知	16	酒黄精	贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县， 实验室自制（16 h）	滇黄精
5	酒黄精	北京同仁堂	未知	17	酒黄精	贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县， 实验室自制（16 h）	黄精
6	酒黄精	广州二天堂大药房	未知	18	酒黄精	贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县， 实验室自制（4、8、16、24、32 h）	多花黄精
7	酒黄精	天津华丰大药房	未知	19	黄精	贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县	滇黄精
8	酒黄精	江西南昌敦寿堂大药房	未知	20	黄精	贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县	黄精
9	酒黄精	天津天士力大药房	未知	21	黄精	贵州省黔西南布依族苗族自治州兴仁县	多花黄精
10	酒黄精	北京康中福大药房	未知				
11	酒黄精	天津老百姓大药房	未知				
12	酒黄精	天津敬一堂	未知				

酒黄精：取净黄精，加黄酒（每100 kg黄精，用黄酒20 kg），拌匀，闷润过夜至酒吸尽，置适宜容器内，隔水加热，分别炖至不同时间取出，干燥，即得。

2.2 DDMP与5-HMF提取分离及结构鉴定

2.2.1 提取分离 取酒黄精粉末50 g，加10倍量二氯甲烷超声提取3次，每次40 min，滤过，合并滤液，减压收干，残渣加甲醇10 mL使溶解，0.45 μm滤膜滤过，吸取100 μL续滤液，注入制备液相色谱仪。色谱条件：色谱柱为Zorbax SB-C₁₈ PrepHT柱（250 mm×21.2 mm，7 μm），流动相为甲醇-水（10：90），体积流量10 mL/min，检测波长280 nm，柱温35℃，进样量100 μL。重复进样，接收并合并相应2个色谱峰（色谱峰1和2）流分，适当低温减压浓缩后，冷冻干燥，得到色谱峰1和2对应的成分。

2.2.2 LC-MS分析及结构鉴定 LC-MS色谱条件：色谱柱为Zorbax SB-C₁₈柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液（6：94），体积流量0.6 mL/min，检测波长280 nm，柱温35℃，进样量5 μL。离子源为电喷雾离子源（ESI）；正离子检测模式；毛细管口电压4 000 V，温度350℃；扫描方式：全扫描和子离子全扫描；扫描范围 m/z ：20~700；干燥气（氮气）体积流量9 L/min；柱后分流，分流比3：1。

色谱峰1和2与DDMP和5-HMF保留时间、紫外图谱以及裂解规律一致，故确定其结构。

2.3 HPLC法测定炮制过程中DDMP与5-HMF量的变化

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Zorbax SB-C₁₈柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为甲醇-水（8：92），体积流量1.0 mL/min，检测波长280 nm，柱温35℃，进样量5 μL。在此色谱条件下，样品中DDMP和5-HMF能达到基线分离。色谱图见图1。

2.3.2 混合对照品溶液的制备和线性关系考察 分别取DDMP、5-HMF对照品适量，精密称定，加甲醇溶解制成含DDMP 292.6 μg/mL、5-HMF 16.0 μg/mL的溶液，即得。混合对照品溶液低温、避光保存，备用。

分别精密吸取混合对照品溶液1、5、10、15、20 μL，注入液相色谱仪，以测得的峰面积积分值为纵坐标（Y），进样量为横坐标（X）进行线性回归，得回归方程：DDMP $Y=52.478 X-1.39$ ， $r=0.999 9$ ；

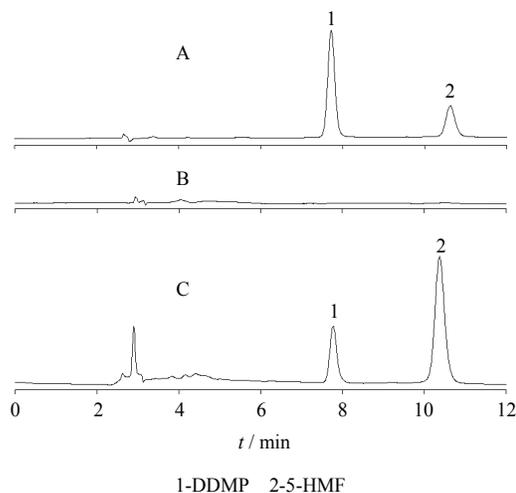


图1 混合对照品(A)、黄精(B)及酒黄精(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), *Polygonati Rhizoma* (B), and wine-processed *Polygonati Rhizoma* (C)

5-HMF $Y=7 786.3 X-17.08$ ， $r=0.999 8$ ；结果表明DDMP在0.292 6~5.852 μg、5-HMF在0.016~0.32 μg，进样量与峰面积积分值具有良好的线性关系。

2.3.3 供试品溶液的制备 取黄精和酒黄精粉末各0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25 mL，称定质量，超声（功率250 W，频率30 kHz）提取30 min，放冷，用甲醇补足减失的质量，摇匀，0.45 μm滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.3.4 精密度试验 精密吸取序号为1的供试品溶液重复进样6次，结果DDMP峰面积积分值的RSD为0.65%，5-HMF峰面积积分值的RSD为2.85%。

2.3.5 稳定性试验 取序号为1的供试品溶液，分别在制备后0、2、4、6、8、12、24 h进样测定，结果显示24 h内DDMP峰面积积分值的RSD>3%。在12 h内DDMP峰面积积分值的RSD为1.04%，5-HMF峰面积积分值的RSD为2.76%。表明溶液在12 h内稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 取序号为1的供试品粉末，按照供试品溶液制备方法处理，进行定量测定，结果DDMP质量分数的RSD为1.25%，5-HMF质量分数的RSD为0.95%。

2.3.7 回收率试验 取序号为1的供试品粉末约0.1 g，6份，精密称定，分别精密加入含DDMP和5-HMF各3.20、0.36 mg的对照品溶液，按供试品溶液处理，进行定量测定，计算回收率。结果DDMP的平均回收率为97.19%，RSD为1.80%，5-HMF

的平均回收率为 99.71%，RSD 为 2.69%。

2.3.8 样品测定 各供试品溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液。精密吸取各对照品溶液和续滤液 2~50 μL，注入液相色谱仪，测定，计算 DDMP 和 5-HMF 的量。

多花黄精不同时间炮制品中 DDMP 和 5-HMF 量的变化见表 2。结果显示，随炮制时间的延长，DDMP 的量逐渐升高，至炮制 24 h 达最高为 8.228%，随后降低；而 5-HMF 的量随炮制时间的延长一直呈递增趋势。

3 个品种黄精及相应酒黄精（炮制 16 h）中 DDMP 和 5-HMF 的量见表 3。结果显示，《中国药典》收载的 3 个品种黄精生品中都不含有 DDMP 和 5-HMF，而炮制 16 h 后，都产生了这 2 种成分，且其量在品种间有一定差异。

15 批市售酒黄精中 DDMP 和 5-HMF 的定量测

表 2 多花黄精中 DDMP 和 5-HMF 的量随着炮制时间的变化 (n=3)

Table 2 Content variations of DDMP and 5-HMF with processing time changing in *P. cyrtoneura* (n=3)

炮制时间 / h	质量分数 / %		RSD / %	
	DDMP	5-HMF	DDMP	5-HMF
0	—	—		
4	1.301	0.011	1.82	1.97
8	1.533	0.097	1.45	1.17
16	4.053	0.322	0.36	2.03
24	8.228	0.491	2.43	2.34
32	7.057	0.681	0.59	0.69

“—”表示未检测到，下表同

“—” means undetectable, same as below

表 3 3 个品种黄精及相应炮制 16 h 酒黄精中 DDMP 和 5-HMF 的量 (n=3)

Table 3 Content variations of DDMP and 5-HMF in three kinds of *Polygonati Rhizoma* and their 16 h-wine-processed products (n=3)

样品	质量分数 / %		RSD / %	
	DDMP	5-HMF	DDMP	5-HMF
滇黄精生品	—	—		
滇黄精炮制 16 h	4.242	0.232	1.22	1.73
黄精生品	—	—		
黄精炮制 16 h	3.919	0.339	2.01	2.08
多花黄精生品	—	—		
多花黄精炮制 16 h	4.053	0.322	0.36	2.03

定结果见表 4。结果显示，15 批市售酒黄精中 DDMP 的量只有序号为 8 和 15 的样品中非常高，分别为 11.231% 和 9.473%，其余 13 个批次的量均在 1.395%~5.265%；5-HMF 的量只有序号为 11 的样品中很高，为 2.025%，其余 14 个批次中的量均在 0.079%~0.708%。

表 4 市售酒黄精中 DDMP 和 5-HMF 的量 (n=3)

Table 4 Contents of DDMP and 5-HMF in samples of commercially available wine-processed *Polygonati Rhizoma* (n=3)

序号	质量分数 / %		RSD / %	
	DDMP	5-HMF	DDMP	5-HMF
1	3.068	0.364	0.07	1.55
2	1.395	0.079	2.22	1.97
3	4.827	0.188	2.37	2.82
4	5.265	0.551	0.56	0.35
5	2.698	0.248	0.93	0.46
6	4.906	0.454	2.49	2.36
7	2.593	0.135	1.34	1.22
8	11.231	0.263	1.89	1.33
9	1.446	0.081	2.18	2.74
10	4.601	0.439	1.76	1.23
11	3.030	2.025	2.45	2.58
12	3.052	0.151	1.97	2.24
13	2.504	0.467	2.05	2.62
14	4.753	0.440	0.98	0.99
15	9.473	0.708	1.52	1.84

3 讨论

本研究经对黄精炮制后二氯甲烷提取物中增加的 2 个色谱峰分离纯化，确定 2 个成分为 DDMP 和 5-HMF，后者已在酒黄精中发现^[7]。定量测定结果显示，2 种成分的量随炮制时间呈不同变化，这与其结构有关。DDMP 和 5-HMF 都为麦拉德反应 (Maillard reaction) 产物，即单糖与氨基酸或蛋白质在一定条件下发生化学反应经结构转化产生^[8]，DDMP 并非反应的最终产物，在不同的温度和 pH 值条件下它可以继续转化为其他 50 多种化学成分，如 5-HMF 即是其转化成分之一^[9]。因此表现为其量随炮制时间的延长先升高后降低。5-HMF 同时也可由糖热降解产生，因此，随着炮制时间的延长其量呈现升高趋势。

关于黄精的炮制时间终点，《中国药典》2010

年版中没有明确规定,而全国各地炮制规范^[10-12]中涉及的炮制时间为8~24 h。因此对多花黄精分别炮制4、8、16、24、32 h,以研究2种成分量的变化。初步研究显示,炮制16 h的酒黄精与其它炮制时间相比,抗氧化活性最强,因此,对《中国药典》2010年版收载的其他2个品种黄精即滇黄精和黄精也分别炮制16 h后得到酒黄精。结果显示,炮制后都产生了DDMP和5-HMF。表明《中国药典》2010年版收载的3个品种黄精,经炮制后物质组成都发生了改变。

15批市售酒黄精中2种成分的量的差异(表4),除了与药材产地、采收期等有关外,由于全国各地黄精炮制时间为8~24 h^[10-12],也会造成成分量的差异。将测定结果偏高的2批次市售样本去除,并与实验室自制不同炮制时间酒黄精2种成分的量对比,显示炮制16 h多花黄精DDMP的量在市售的13批酒黄精DDMP的量范围内,其他炮制时间点均超出此范围;而炮制8、16、24 h的多花黄精中5-HMF的量都在市售的14批范围内。滇黄精和黄精炮制16 h的炮制品中2种成分的量均在上述大批次市售品范围内,表明黄精炮制16 h与市售品中DDMP、5-HMF量相近。为酒黄精炮制时间终点的确定提供了一定参考。

目前《中国药典》2010年版仅以多糖的量作为黄精和酒黄精质量评价的标准^[1]。研究表明,DDMP是一种强抗氧化剂,在体外具有抗氧化活性^[13-14],5-HMF具有抗氧化、改善血液流变学^[15]、抗炎^[16]等作用。2种成分在黄精炮制后都呈规律性变化。因此可以考虑将DDMP和5-HMF作为酒黄精饮片质量控制的指标成分,以完善酒黄精饮片质量标准,同时可以用于区别黄精生品与炮制品。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 林琳, 林寿全. 黄精属药用植物聚类分析 [J]. 中药材, 1994, 17(6): 12-18.
- [3] 徐德平, 齐斌, 崔斌, 等. 黄精中三萜皂苷的提取分离与结构鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 1470-1472.
- [4] 冯卫生, 郑晓珂, 冯云霞, 等. 炮制加工对黄精中多糖含量的影响 [A] // 中国药学会全国多糖类药物研究与应用研讨会论文集 [C]. 北京: 《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社, 2008.
- [5] 钟凌云, 周焯, 龚千锋. 炮制对黄精薯蓣皂苷元影响的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(3): 538-540.
- [6] Liu Z L, Chao Z M, Liu Y Y, et al. Maillard reaction involved in the steaming process of the root of *Polygonum multiflorum* [J]. *Planta Med*, 2009, 75: 84-88.
- [7] 冯云霞. 炮制加工对黄精化学成分的影响及其饮片质量研究 [D]. 郑州: 河南中医学院, 2008.
- [8] Brands C M J, Alink G M, van Boekel M A J S, et al. Mutagenicity of heated sugar-casein systems: Effect of the Maillard reaction [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(6): 2271-2275.
- [9] Kim M O, Baltes W. On the role of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in the Maillard reaction [J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(1): 282-289.
- [10] 邓来送, 刘荣禄. 实用中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医出版社, 1993.
- [11] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2005.
- [12] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区中药饮片炮制规范 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2007.
- [13] Yu X X, Zhao M Y, Liu F, et al. Identification of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4-H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose-histidine Maillard reaction products [J]. *Food Res Int*, 2013, 51(1): 397-403.
- [14] Yu X X, Zhao M Y, Liu F, et al. Antioxidants in volatile Maillard reaction products: Identification and interaction [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2013, 53(1): 22-28.
- [15] 耿放, 王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛 (5-HMF) 在中药复方中的研究现状及相关药效探讨 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(6): 52-56.
- [16] Kim H K, Choi Y W, Lee E N, et al. 5-Hydroxymethyl-furfural from black garlic extract prevents TNF α -induced monocytic cell adhesion to HUVECs by suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression, reactive oxygen species generation and NF- κ B activation [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(7): 965-974.