

不同干姜炮制品姜酚类成分含量的研究

A quantitative analysis of the different contents of gingerols in different processed zingiberis rhizoma

高伟城 王小平* 沈晓华 柯庆辉
(漳州卫生职业学院, 福建 漳州, 363000)

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2020) 34-0022-04

【摘要】目的: 对干姜不同炮制品中 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚 4 种姜酚类成分进行含量测定, 比较姜酚类成分含量的差异, 为临床用药提供实验依据。方法: 采用反相高效液相色谱法, 使用 Agilent TC-C₁₈ 柱 (5μm, 4.6 mm×250 mm), 流动相为乙腈-水溶液, 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 ℃, 进样量 20 μL。结果: 干姜不同炮制品中 4 个成分的色谱峰均达到基线分离, 不同炮制方法中姜酚类成分含量依次为: 干姜生品>土炒干姜>清炒干姜>姜炭>炮姜, 其中 6-姜烯酚的含量差异, 依含量高低依次为: 干姜生品>炮姜>姜炭>土炒干姜>清炒干姜。结论: 本含量测定方法能够准确测定干姜不同炮制品姜酚类的含量, 可为干姜不同炮制品的质量控制提供研究方法; 不同干姜炮制品中姜酚类成分含量存在差异。

【关键词】土炒干姜; 干姜炮制品; 姜酚; 含量测定

【Abstract】 Objective: To determine 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol in zingiberis rhizoma with different processing methods and compare the different contents of gingerols, to provide experimental basis for clinical medication. Methods: Samples were analyzed on an Agilent TC-C₁₈ column (5μm, 4.6 mm×250 mm) with the mobile phase of acetonitrile and water in a gradient elution. The flow rate of the mobile phase, detection wavelength, column temperature and injection volume were set at 1.0 mL/min, 280 nm, 30 ℃ and 20 μL, respectively. Results: The chromatographic peaks of the 4 components in zingiberis rhizoma with different processing methods were all separated at baseline. The contents of gingerols in different processing methods were as follows by decreasing order: zingiberis rhizoma, soil-processed zingiberis rhizoma, stir-fried zingiberis rhizoma, carbon ginger, zingiberis rhizoma praeparatum. The contents of 6-shogaol were as follows by decreasing order: zingiberis rhizoma, zingiberis rhizoma praeparatum, carbon ginger, soil-processed zingiberis rhizoma, stir-fried zingiberis rhizoma. Conclusion: The method can be used to determine the contents of gingerols in different processed zingiberis rhizoma and can be used for the quality control of different processed zingiberis rhizoma. The contents of gingerols in different zingiberis rhizoma processed products were different.

【Keywords】 Soil-processed zingiberis rhizoma; Different processed zingiberis rhizoma; Gingerols; Content determination
doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2020.34.007

干姜始载于《神农本草经》, 列为中品, 为姜科植物姜 (*Zingiber officinale* Rosc.) 的干燥根茎, 趁鲜切片晒干或低温干燥者, 具有温中散寒, 回阳通脉, 温肺化饮的功效, 用于脘腹冷痛, 呕吐泄泻, 肢冷脉微, 寒饮喘咳^[1]。

干姜历代炮制方法有炒干姜 (炒黄、土炒、麸炒)、炮姜炭、蜜干姜、盐干姜等 4 种方法^[2-4]。《福建省中药炮制规范》(1998 年版) 收载干姜、炮姜、姜炭、土炒干姜^[5]。2015 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 仅收载干姜、姜炭、炮姜^[1]。因而, 有关干姜炮制品的研究文献集中在干姜生品、炮姜、姜炭。而土炒干姜首载于《类编朱氏集验方》^[4], 收载于《福建省中药炮制规范》(1998 年版)。目前尚无福建土炒干姜的相关研究报道。

干姜化学成分主要包括挥发油和姜辣素的成分。干姜中最主要的辛辣成分为姜酚, 其中含量占比最多的是 6-姜酚, 其次是 10-姜酚, 8-姜酚。此外, 6-姜烯酚和姜酮也占有较大比重^[2]。现代研究表明姜酚类物质具有抗氧化、抗肿瘤、抗神经损伤和细胞保护、抗呕吐等多种生理活性^[3]。然而干

姜在临床应用以汤剂入药居多, 笔者推断, 非挥发性成分的变化是干姜不同炮制品的药效物质基础, 因此本文对干姜不同炮制品非挥发性成分主要之一姜酚类成分的含量进行研究。

采用高效液相色谱法测定干姜生品、清炒干姜、土炒干姜、炮姜、姜炭等不同炮制方法中 6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚的含量, 对不同炮制品干姜中姜酚类成分含量差异性进行比较, 为福建土炒干姜的炮制传承、后续炮制工艺及炮制原理研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国); METTLER-TOLEDO AB265-S 型电子分析天平 (瑞士); FST-III-10 精密型超纯水机 (上海富诗特); OHAUS AR2140 电子分析天平 (上海); KQ5200 超声波清洗器 (昆山)。

1.2 材料

干姜生品, 购自江西药都堂中药饮片有限公司, 产地: 四

川, 产品批号: 20180801, 经本院中药教研室王小平教授鉴定为姜科植物姜的干燥根茎。6-姜酚(批号: MUST-19080704)、8-姜酚(批号: MUST-19032804)、10-姜酚(批号: MUST-19063004), 6-姜烯酚(批号: MUST-19032101)购自成都曼斯特生物科技有限公司, 含量 $\geq 99\%$ 。试剂除高效液相色谱法(HPLC)用乙腈为色谱纯外, 其他均为分析纯。

1.3 炮制样品制备

干姜生品的制备: 取原药材, 除去杂质, 略泡, 洗净, 润透, 切厚片或块, 干燥, 筛去碎屑。

清炒干姜样品的制备: 取净干姜片, 置锅内用文火加热, 炒至表面呈黄色时, 取出, 筛去灰屑, 放凉, 依《甘肃省中药炮制规范》(2009年版)^[6]。

土炒干姜样品的制备: 取干姜片, 照土炒法炒至透出香气, 尽染土色, 依《福建省中药炮制规范》(1998年版)制备^[5]。

炮姜样品的制备: 先将净砂置炒制容器内, 用武火加热, 炒至灵活状态, 再加入于姜片或块, 不断翻动, 炒至鼓起, 表面棕褐色, 取出, 筛去砂, 晾凉, 依《北京市中药饮片炮制规范》(2008年版)制备^[7]。

姜炭样品的制备: 取干姜片或块, 置炒制容器内, 用武火加热, 炒至表面焦黑色, 内部棕褐色, 喷淋少许清水, 灭尽火星, 略炒, 取出, 晾干, 筛去碎屑, 依《中国药典》(2015年版)制备^[1]。

表 1 干姜不同炮制品性状特征及炮制依据

序号	品名	性状描述	制备依据
1	干姜生品	呈扁平块状, 具指状分枝, 长3~7 cm, 厚1~2 cm。表面灰黄色或浅灰棕色, 粗糙, 具纵皱纹和明显的环节。分枝处常有鳞叶残存, 分枝顶端有茎痕或芽。质坚实, 断面黄白色或灰白色, 粉性或颗粒性, 内皮层环纹明显, 维管束及黄色油点散在。气香、特异, 味辛辣。	《中国药典》(2015年版) ^[1]
2	清炒干姜	表面黄色, 气香味辛辣。	《甘肃省中药炮制规范》(2009年版) ^[6]
3	土炒干姜	形如干姜片, 尽染土色, 断面色略深。	《福建省中药炮制规范》(1998年版) ^[5]
4	炮姜	呈不规则膨胀的块状, 具指状分枝。表面棕黑色或棕褐色。质轻泡, 断面边缘处显棕黑色, 中心棕黄色, 细颗粒性, 维管束散在。气香、特异, 味微辛、辣。	《北京市中药饮片炮制规范》(2008年版) ^[7]
5	姜炭	形如干姜片块, 表面焦黑色, 内部棕褐色, 体轻, 质酥脆。味微苦, 微辣。	《中国药典》(2015年版) ^[1]

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C₁₈ 柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 流动相: 乙腈(C) - 水(D) 溶液, 梯度洗脱(0~15 min: 38% C \rightarrow 68% C, 15~30 min: 68% C \rightarrow 70% C, 30~40 min: 70% C \rightarrow 95% C, 40~60 min: 95%~92%); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备

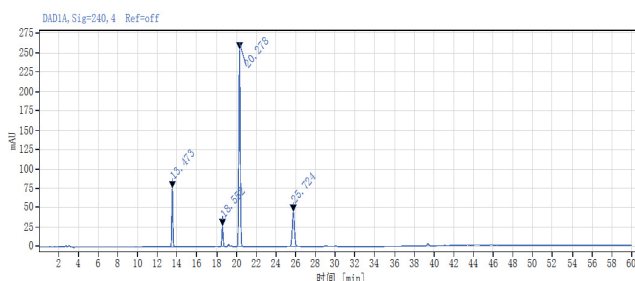
精密称取6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚对照品适量, 置于10 mL容量瓶中, 加75%甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别制成每1 mL分别含53.5 μ g、22.5 μ g、56.75 μ g、69.25 μ g的混合对照品储备溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备

分别取不同炮制品干姜适量, 粉碎过50目, 称取各粉末约0.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加75%甲醇20 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取(功率250 W, 频率40 kHz) 40 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用75%甲醇补足减失的质量, 提取液经13 000 r/min条件离心10 min, 滤过, 取续滤液, 摇匀, 即得。

2.3 测定

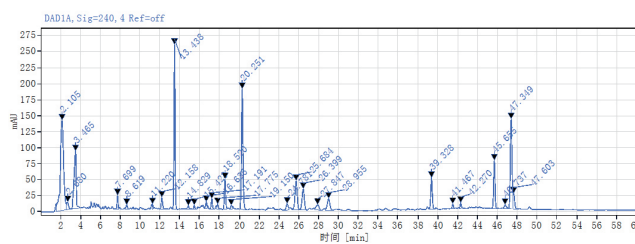
取2.2.1项下混合对照品储备溶液, 适当稀释, 精密吸取稀释液与供试品溶液20 μ L, 注入色谱仪进行分析, 记录色谱图。结果见图1~图6。



注: a: 6-姜酚, b: 8-姜酚, c: 6-姜烯酚, d: 10-姜酚。

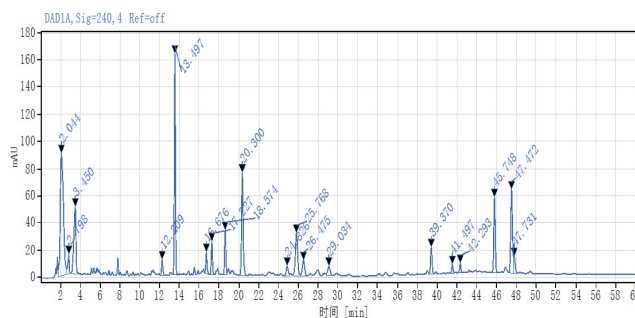
图1 干姜混合标准品HPLC图谱

由图1可知, 在该色谱条件下, 6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚的保留时间分别为13.4 min、18.5 min、20.2 min、25.7 min, 与相邻色谱峰均能达到基线分离, 峰形良好, 且保留时间与色谱分析时间适宜。



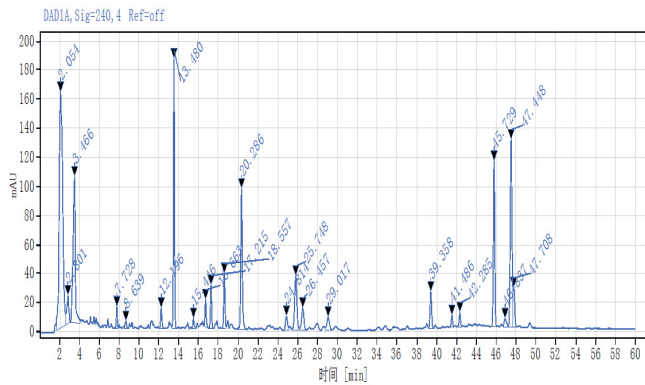
注: a: 6-姜酚, b: 8-姜酚, c: 6-姜烯酚, d: 10-姜酚。

图2 干姜生品HPLC图谱



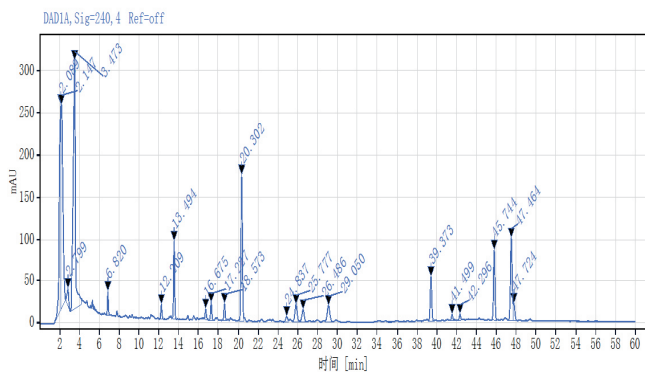
注: a: 6-姜酚, b: 8-姜酚, c: 6-姜烯酚, d: 10-姜酚。

图3 清炒干姜生品HPLC图谱



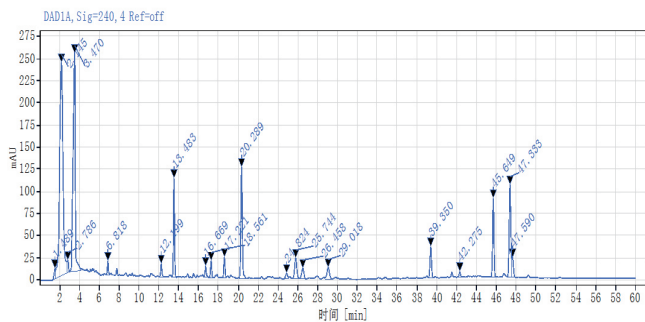
注: a: 6-姜酚, b: 8-姜酚, c: 6-姜烯酚, d: 10-姜酚。

图4 土炒干姜生品HPLC图谱



注: a: 6-姜酚, b: 8-姜酚, c: 6-姜烯酚, d: 10-姜酚。

图5 炮姜生品HPLC图谱



注: a: 6-姜酚, b: 8-姜酚, c: 6-姜烯酚, d: 10-姜酚。

图6 姜炭生品HPLC图谱

2.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品储备溶液 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、10 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 20 μL, 依次注入液相色谱仪, 测定。以进样量 X (μg) 对峰面积 A 进行线性回归, 回归方程分别为: 6-姜酚: $A = 531.32X + 1.093$, $r = 0.9999$; 8-姜酚: $A = 498.26X + 0.8514$, $r = 0.9998$; 6-姜烯酚: $A = 2258.8X + 17.478$, $r = 0.9997$; 10-姜酚: $A = 487.56X + 26.456$, $r = 0.9996$ 。可知 6-姜酚在 0.107 ~ 1.07 μg、8-姜酚在 0.045 ~ 0.45 μg、6-姜烯酚在 0.1135 ~ 1.1354 μg、10-姜酚在 0.1385 ~ 1.385 μg 范围内峰面积与进样量呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

吸取同一浓度的混合对照品溶液 20 μL, 重复进样测定 5 次, 记录色谱图, 结果 6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜

酚峰面积的 RSD 分别为 0.28%、0.82%、0.11%、0.24%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密称取干姜生品 0.5 g, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 于室温放置 0 h、2 h、4 h、8 h、16 h 和 24 h 后分别取样测定, 结果 6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚峰面积的 RSD 分别为 0.18%、0.44%、0.25%、0.64%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取干姜生品 0.5 g, 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 结果按干燥品计算, 样品中 6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚的平均质量分数 (ω_B) 分别为 7.360 mg/g (RSD = 1.79%)、1.618 mg/g (RSD = 1.89%)、1.720 mg/g (RSD = 1.05%)、2.705 mg/g (RSD = 1.02%)。

2.8 加样回收率试验

精密称取 6 份已知含量的干姜生品样品 0.25 g, 每份分别精密加入每 1 mL 含 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚为 1.84 mg、0.411 mg、0.428 mg、0.677 mg 的混合对照品溶液 1 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定。结果 6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚平均回收率分别为: 97.61% (RSD = 0.22%); 99.88% (RSD = 0.71%); 97.67% (RSD = 0.32%); 98.87% (RSD = 1.54%)。

2.9 样品含量测定

分别精密称取不同炮制方法干姜样品, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 依法测定。用外标法, 按干燥品计算样品中 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚的平均质量分数 (ω_B)。结果见表 2。

表 2 不同干姜炮制品中 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚含量测定结果 (mg/g)

品种	6-姜酚	8-姜酚	6-姜烯酚	10-姜酚	总量
干姜生品	7.361	1.644	1.712	2.707	13.424
土炒干姜	5.406	1.328	0.918	2.331	9.983
清炒干姜	4.682	0.879	0.708	1.934	8.203
炮姜	2.627	0.705	1.536	1.235	6.103
姜炭	3.270	0.834	1.182	1.437	6.722

由表 2 可知, 不同炮制品中总姜酚类的含量有差异, 依含量高低依次为: 干姜生品 > 土炒干姜 > 清炒干姜 > 姜炭 > 炮姜。6-姜烯酚的含量差异, 依含量高低依次为: 干姜生品 > 炮姜 > 姜炭 > 土炒干姜 > 清炒干姜。姜酚类成分的含量是 6-姜酚含量最高、其次是 10-姜酚, 炮姜则是 6-姜酚含量最高, 其次是 6-姜烯酚。其中, 土炒干姜的总姜酚类含量明显高于其他炮制品。

3 讨论

测定波长、流动相和提取条件的选择 在查文献、借鉴前人的研究结果基础上^[8-9], 采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察, 6-姜酚、8-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚皆在 280 nm 附近有较大吸收, 故选定 280 nm 为测定波长; 分别考察甲醇-水、乙腈-水等度、梯度洗脱, 发现乙腈-水梯度洗脱, 分离度好, 峰形对称, 且考虑色谱柱使用寿命。分别比较超声不同时间和甲醇浓度下, 干姜不同炮制品的提取效果, 结果发现以 75% 甲醇超声提取 40 min, 姜酚类成分提取效果较好。

干姜药材中所含的姜酚类成分主要以 6-姜酚、8-姜酚、

10-姜酚、6-姜烯酚为主,本研究表明,干姜炮制前后姜酚类成分有差异,说明姜酚类成分受热不稳定,随炮制火制和炮制工艺,含量逐渐降低,其中土炒干姜的总姜酚类含量明显高于其他炮制品。

在酸性条件下,姜酚 C-4 的活泼氢极易与 C-5 的羟基一起脱水形成姜烯酚^[10]。本文研究表明:干姜生品 6-姜烯酚与 6-姜酚含量比为 0.23,炮姜为 0.58,姜炭为 0.36,炮姜与姜炭的 6-姜烯酚转化率有所上升,可能与其加热时间较长有关。有研究表明,6-姜酚诱导体温降低^[11],而炮姜、姜炭的 6-姜酚含酚含量明显低于干姜生品,炮姜、姜炭的温中作用比干姜生品强可能与此有关。Heba 等研究表明^[12],6-姜酚、8-姜酚和 10-姜酚和 6-姜烯酚是干姜止呕作用药效物质基础。本文研究表明,不同炮制方法总姜酚类成分含量均得以不同程度降低,与干姜长于止呕相吻合。

2015 版《中国药典》一部规定干姜、炮姜、姜炭的含量测定均以 6-姜辣素为检测指标,但是对其质量控制并不全面,本文采用高效液相色谱法同时测定干姜不同炮制品中 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚、6-姜烯酚的 4 个姜酚类成分含量,结果表明,该方法精密性、稳定性和重复性均良好,可有效控制干姜炮制品质量,为完善其质量标准提供实验依据。

参考文献:

- [1]国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].一部.北京:中国医药科技出版社,2015:14.
- [2]亓雪,张颖颖.干姜的化学、药理研究进展[J].山东化工,2018,47(14):41-42.
- [3]薛丹丹,张科卫,钱璠.干姜、姜皮和姜炭的 HPLC 指纹图谱比较[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(5):57-60.
- [4]中医研究院中药研究所.中药炮制经验集成(第2版)[M].北京:人民卫生出版社,1974:109.

[5]福建省卫生局.福建省中药饮片炮制规范[M].福州:福建科学技术出版社,1998:30-31.

[6]甘肃省卫生局.甘肃省中药饮片炮制规范[M].兰州:甘肃文化出版社,2009:5.

[7]北京市药品监督管理局.北京市中药饮片炮制规范[M].北京:化学工业出版社,2008:4.

[8]李鹏辉,严辉,朱邵晴,等.干姜 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定[J].中成药,2019,41(9):2246-2251.

[9]龙全江,李文涛,张颖,等.不同加工法制得的干姜片及炮制品高效液相色谱指纹图谱比较研究[J].甘肃中医药大学学报,2019,36(2):23-27.

[10]姜程曦,林良义,宋娇,等.姜中姜酚和姜醇的研究进展[J].中草药,2015,46(16):2499-2501.

[11]Bhattarai S, Tran, VH, *et al.* The stability of gingerol and shogaol in aqueous solution[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences,2001,90(10):1658-1664.

[12]Ueki S, Miyoshi M, Shido O, *et al.* Systemic administration of 6-gingerol, a pungent constituent of ginger, induces hypothermia in rats via an inhibitory effect on metabolic rate[J]. European Journal of Pharmacology, 2008,584(1):87-92.

基金项目:

漳州市科技局科技重大专项(ZZ2018ZD2019);福建省教育厅中青年教师教育科研项目(科技类)(JZ180849);漳州卫生职业学院院级科研项目(项目编号:ZWYZ202009)。

作者简介:

王小平,通讯作者,博士,教授,主要从事中药炮制及中药新制剂研究。高伟城,硕士,讲师,从事中药质量标准研究。

编辑:张怀锦 编号:EA-4200426263(修回:2020-12-09)

富硒黄芪多糖对白血病 K562 细胞凋亡诱导作用

The inducing effects of Se-enriched astragalus polysaccharides on apoptosis of K562 cells of leukemia

王永胜¹ 杨丽霞² 周思彤^{1*} 孟祥云¹ 黄聪琳¹ 郭敏¹ 王晓琳¹

(1. 甘肃省中医院,甘肃 兰州,730050; 2. 甘肃省中医药研究院,甘肃 兰州,730050)

中图分类号: R733.7 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2020) 34-0025-04 证型: BGAI

【摘要】目的:研究富硒黄芪多糖对白血病 K562 细胞的凋亡诱导作用。方法:采用水提醇沉法制备富硒黄芪多糖。靶细胞选择白血病 K562 细胞,富硒黄芪多糖作用 K562 细胞后,采用四甲基偶氮唑蓝(Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT)比色法检测细胞增殖活性。采用流式细胞术测定 K562 细胞凋亡率。采用流式细胞术测定 Caspase-3 活性。结果:标准曲线法测定所提取的黄芪多糖含量。普通黄芪多糖含量:37.90%,富硒黄芪多糖含量:48.70%。富硒黄芪多糖表现出浓度依赖性地抑制 K562 细胞增殖作用,24 h、48 h 和 72 h 的 IC₅₀ 值分别为 376.52 μg/mL、283.19 μg/mL 和 197.75 μg/mL。200 μg/mL 和 400 μg/mL 富硒黄芪多糖作用 K562 细胞 48 h 后,流式细胞术采用 Annexin V/PI 双染色方法,结果显示出凋亡细胞含量明显增高,凋亡率分别是 13.35% 和 72.70%,且均以晚期凋亡细胞为主。200 μg/mL、400 μg/mL 富硒黄芪多糖处理 K562 细胞 12 h 和 24 h 后细胞后 Caspase-3 活性增高到 72.54%。结论:富硒黄芪多糖具有诱导白血病 K562 细胞凋亡作用。

【关键词】富硒黄芪多糖;白血病;K562 细胞;细胞凋亡