

編號：CCMP92-CT-04

市售丹參及（北）茵陳多酚類指紋圖譜的 建立及其指標成分的製備

林雲蓮

國立中國醫藥研究所

摘 要

中藥丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 和 (北) 茵陳 (*Origanum vulgare* L.) 均屬唇形科植物；丹參以根入藥, 具活血化癥作用, 其有效成分主要有脂溶性二萜類和水溶性酚酸類成分。近年來其水溶性多酚類成分被廣泛的注意到具有抗氧化、自由基清除、促進微循環、心血管保護作用等活性。茵陳正品是茵陳蒿 (*Artemisia capillaris* Thunb.) 又名綿茵陳, 長久以來台灣市售品多以北茵陳 (*O. vulgare*) 當作茵陳使用, 作為治療肝病的用藥。本研究主要目的是分析市售此兩者生藥及科學中藥中多酚類成分分佈及分別製備其中指標成分丹參酚酸 B 及 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside;

建立兩種市售藥材多酚類的指紋圖譜, 以確保市售品的品質並且製備丹參多酚類指標成分丹參酚酸 B 及北茵陳多酚類指標成分 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside。

本研究完成丹參及北茵陳的 HPLC 及 LC-MS 分析建立其多酚類指紋圖譜並且提供 1 克丹參酚酸 B 及 5 克 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) -phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside 指標成分。

關鍵詞：丹參、(北) 茵陳、多酚類、丹參酚酸 B、4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside

CCMP 92-CT-04

Fingerprint spectral establishment and marker component preparations of polyphenols in commercial available *Salvia miltiorrhiza* and *Origanum vulgare*

Yun-Lian Lin

National Research Institute of Chinese Medicine

ABSTRACT

Both *Salvia miltiorrhiza* and *Origanum vulgare* belong to Labiatae family. The roots of *S. miltiorrhiza* have been used as blood stasis for the treatment of atherosclerosis-related disease. Its chemical constituents contain lipophobic diterpenes and lipophilic polyphenols. Recently the lipophilic polyphenolic components have been extensively focused on its antioxidative, free-radical scavenging, improving cardio-cerebral circulation activities. The originality of Yin-Chen is *Artemisia capillaries* Thunb. (Compositae) for hepatic disease. *O. vulgare* has been widely used as an alternative in Taiwan and claimed to have anti-hepatitis effect. HPLC and LC-MS was used to establish the fingerprint spectra of polyphenolic components in both commercial products.

This project established the fingerprint spectra of polyphenolic components of both medicinal herbs and offered 1g of salvianolic acid B and 5 g of 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside, respectively.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*, *Origanum vulgare*, fingerprint spectra, Polyphenols, salvianolic acid B, 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside.

壹、前言

近年來由於科技的進步，自然療法興盛，各國在天然藥物的研發經費及研發人力的大量投入下，中醫藥的研究的確有相當的進展；由於西方藥理學的介入，使得一些中藥的活性不斷的被證明，丹參就是其中一例，它是中國大陸近代研發出來治療冠心病的冠心二號的主藥；近年來從心血管疾病到最近肝病的應用都相當被重視，藥理的研究也從早期的脂溶性二萜醌類轉而研究其水溶性酚酸類成分；再由於大陸本身對該藥材的需求量大，其市售品主要除了來自丹參 (*S. miltiorrhiza*)，常用該屬其他植物的根作為代用品；其化學成分及含量常有很大的差異。

丹參屬唇形科多年生草本植物，以根入藥，具活血祛瘀，清心除煩等作用。藥理研究主要作用有抗氧化作用、¹⁻³ 抗凝血抗血栓作用、⁴⁻⁹ 抗心腦缺血作用、¹⁰ 調血脂作用、⁸ 保肝作用^{11,12} 等。文獻上有關其成分研究有兩大類，一為具有抗菌、消炎、細胞毒活性之丹參酮類 (tanshinones)，^{9,14-24} 一為具有抗氧化活性之丹參酚酸類 (salvianolic acids) ²⁵⁻²⁷ 成分。藥檢局也以丹參酮 cryptotanshinone 和 tanshinone IIA 作為品質管制的檢測標準。以往文獻上有許多相關的活性研究報導多集中在丹參酮的研究；近年來大量研究報導集中在水溶性丹參酚酸類成分具有防止低密度脂蛋白氧化、⁸ 抑制生物細胞膜氧化損傷、²⁸ 減緩人類主動脈內皮細胞血管黏著分子-1 (vascular adhesion molecule-1, VCAM-1) 和細胞間細胞黏著分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表現²⁹ 等等，因此被認為具有抗發炎及抗冠狀動脈硬化作用。此外近來研究又轉移至肝病治療用藥，誘導肝癌細胞株 HepG2 程序凋亡 (apoptosis) 等。^{30,31} 申請人由初步篩選試驗發現其水溶性成分在 0.25 mg/ml 濃度下具有優異抗自由基清除活性並且能降低正常大白鼠肝細胞受氧化損傷的作用。其中主成分丹參酚酸 B 具有相當強的抗氧化活性；由於兩類成分化學及藥理性質不同，而且含量相當，因此假使能對市售品的品質完全掌握，可依不同需求進行不同的提取程序，對中藥品質的提升及業界都有相當的幫助。

北茵陳 (*O. vulgare*) 又名土香薷，屬唇形科，在台灣一直被廣泛地當作茵陳用，作為肝病的治療用藥，有關此植物成分的研究並不多，由於該藥材在西方國家被用來治療神經痛、祛痰、止咳藥，其相關的成分研究早期多集中於中低極性部份的成分研究，尤其是精油成分的研究。^{32,33} Nakatani 等人於 1987 年曾發表自北茵陳分離出三個酚性成分並且提及其中主成分 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl- O - β -D-glucopyranoside 的抗氧化活性以 ferric thiocyanate 方法測量比 α -tocopherol 強。^{34,35} 北茵陳在台灣雖然廣泛地被

使用，可是迄今藥政單位仍然沒有一個品質管制的標準；申請人由先期的研究確認上述兩種藥材的酒精/水萃取物對 DPPH 自由基具有優異的清除作用，而且對四氯化碳誘導大白鼠肝細胞損傷也具有很好的保護作用；因此提出本計畫的目的擬配合高效液相層析及液相層析質譜，建立此兩種藥材的指紋圖譜，找出其定量標準與定量條件，提供藥政單位將來作為品管的參考並且提供該多酚類指標成分。

貳、材料與方法

一、丹參 HPLC 分析：

市售丹參取樣：自市面不同商家購買五家丹參生藥材及五家科學中藥進行分析。

(一) 丹參科學中藥：

取 5g 科學中藥溶於 50ml 的 50%MeOH/H₂O



超音波振盪 30 分鐘



濾紙過濾



以定量瓶定量至 50 ml



以 filter 過濾



取 10 μl 注入分析

(二) 丹參片取樣

先將各家藥材經磨碎機打碎



取 5g 藥材溶於 50ml 的 50% MeOH /H₂O



超音波振盪 30 分鐘



濾紙過濾



以定量瓶定量至 50 ml



以 filter 過濾



取 10 μl 注入分析

HPLC 之分析條件:

Column: Phenyl column (Hypersil)

UV detector: 290nm

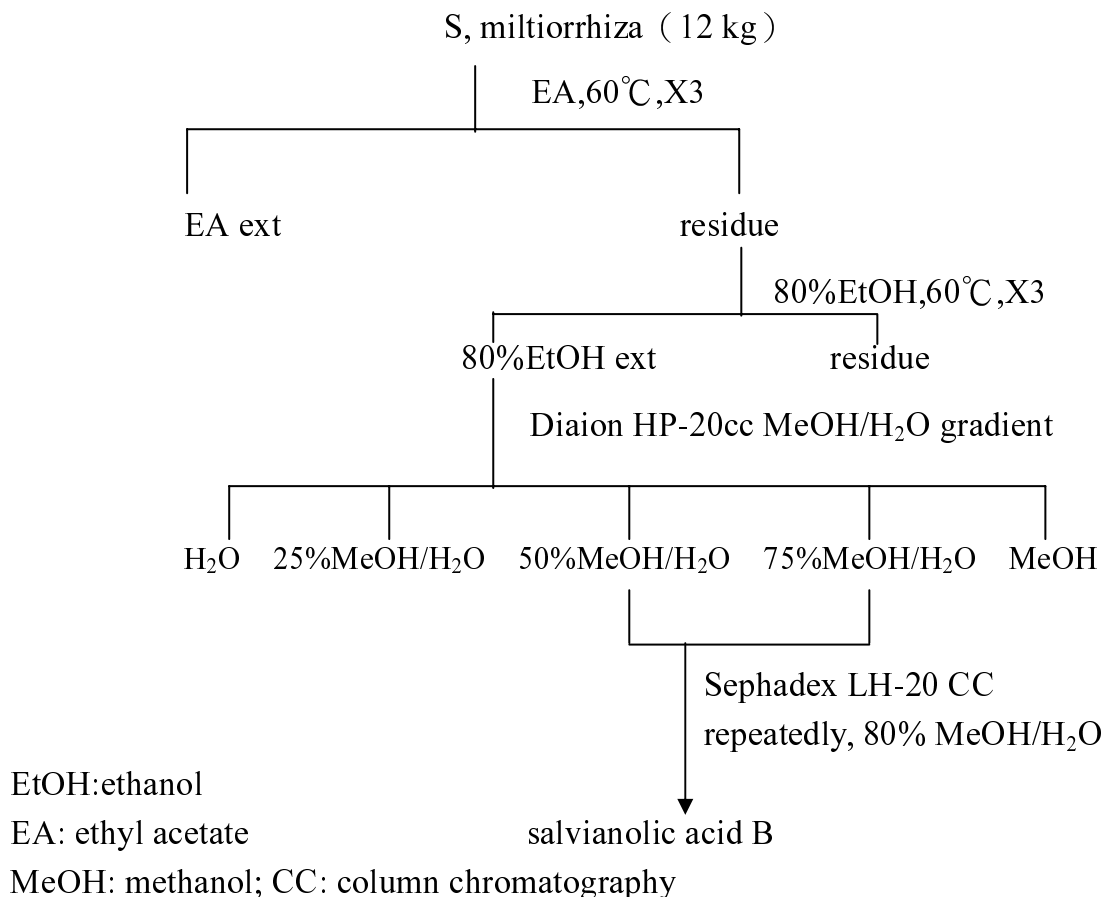
Flow rate: 1ml/min

Mobile phase : Acetonitril : Methanol : 20 mM NaH₂PO₄= 10 : 30 : 60
contain 0.1 mM octanesulfonic acid, pH 2.0

二、LC-MS 分析:

用 Zobax ODS 管柱分析條件, 流動相 0.1% trifluoroacetic acid/MeOH=60 : 40 (v/v) ~MeOH for 20 min, 將流速改為 0.5 ml/min 進行分析。

三、丹參酚酸 B 的分離:



Scheme 1

四、(北) 茵陳 HPLC 分析：

(北) 茵陳以類似丹參指紋圖譜分析方法進行分析，自市售品購得生藥五家及五家科學中藥進行分析。

(一) 茵陳科學中藥取樣：

取 1g 科學中藥溶於 10ml 的 80%MeOH/H₂O



超音波振盪 30 分鐘



濾紙過濾



以定量瓶定量至 10 ml



以 filter 過濾



取 10 μl 注入分析

(二) 茵陳藥材取樣

先將各家藥材經磨碎機打碎



取 1g 藥材溶於 10ml 的 80%MEOH/H₂O



超音波振盪 30 分鐘



濾紙過濾



以定量瓶定量至 10 ml



以 filter 過濾



取 10 μl 注入分析

HPLC 之條件:

Column: RP-18

UV detector: 254 nm

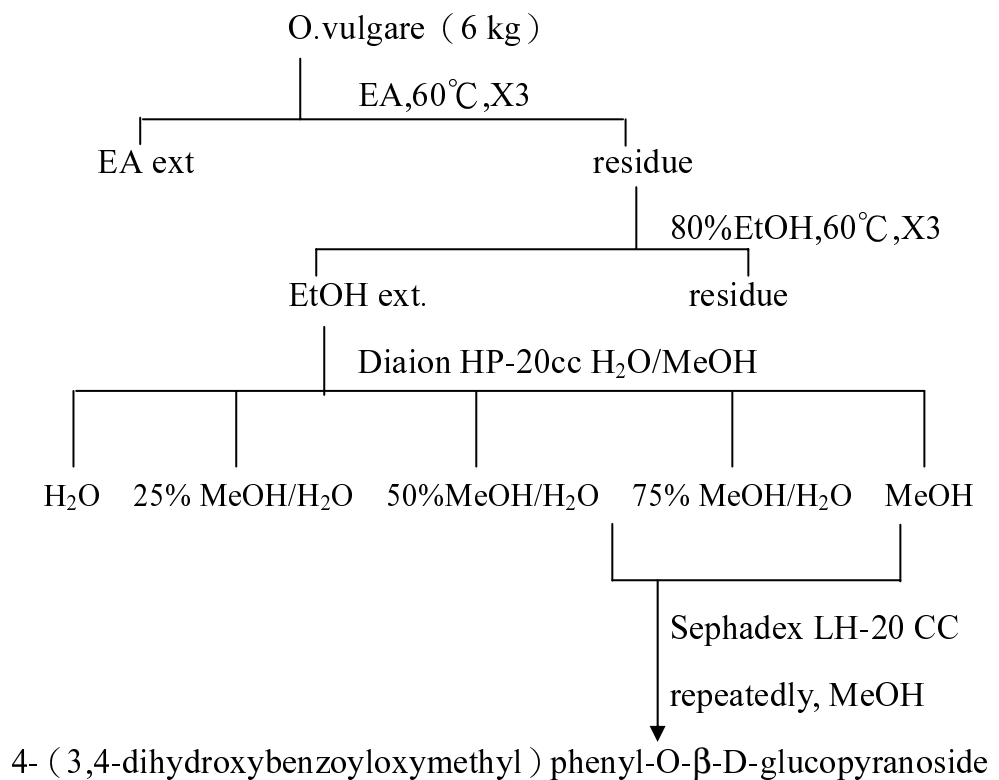
Flow rate: 1 ml/min

Mobile phase:	time	MeOH (%)
	0-20	30-60
	20-25	60-100

五、(北) 茵陳 LC-MS 分析:

依 HPLC 管柱分析條件將流速改為 0.5 ml/min 進行分析。

六、北茵陳多酚類指標成分的製備



Scheme 2

參、結果

1. 丹參 HPLC 指紋圖譜分析結果如圖一~圖四顯示無論生藥或科學中藥都有類似的圖譜,不同商家取得的材料分析的圖譜也得相似的結果,其中主成分都是丹參酚酸 B (salvianolic acid B);指標成分的含量以 290 nm 測得的結果來計算不同商家的含量最大和最小將近五倍之差;科學中藥的結果亦有將近 4.3 倍之差。
2. 1 克生藥材所含的丹參酚酸 B 介於百分之零點零幾至百分 0.09~0.67, 含量均低於 1%, 科學中藥則介於 0.6~2.76%之間, 不同商家間含量變異很大。不同廠商科學中藥建議用量均為 0.4~1.2 克計算丹參酚酸 B 的含量 2.1~9.2mg (以 0.4 克計) 至 7.54~33.06 (以 1.2 克計), 生藥材用量以每次 10 克計算丹參酚酸 B 的含量市售品介於 8.89~67.1mg 之間 (見表一)
3. 丹參酚酸 B 依 Scheme 1 流程製備, 其構造由各種光譜確認之 (圖五~九) 。HPLC 分析其純度大於 93%.
4. (北) 茵陳 HPLC 指紋圖譜分析結果如圖十~圖十五顯示無論生藥或科學中藥都有類似的圖譜,不同商家取得的材料分析所得的圖譜也相似。
5. (北) 茵陳 HPLC 分析於 254 nm 測得的指標成分 4- (3, 4-dihydroxy-benzoyloxymethyl) phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside 含量變異很大, 其含量介於 0.03~0.74%之間。(見表二)
6. 依 Scheme 2 流程製備 4- (3, 4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside, 其構造利用有機光譜 (圖十六~圖二十) 分析確認之。HPLC 分析其純度大於 95%.

肆、討論

由本計畫所得的結果顯示無論丹參 (或) 茵陳由不同商家購得的樣品, 無論是生藥材或科學中藥其多酚類相對含量類似, 指紋圖譜均類似, 惟其中指標成分丹參酚酸 B 或 4- (3, 4-dihydroxy-benzoyloxymethyl) phenyl-*O*- β -D-glucopyranoside 最大和最小有幾倍的差異。

伍、結論與建議

近年來多酚類成分由於其具有抗氧化,清除自由基等作用,普遍受到重視。建議以上多酚類成分可作為品質管制的參考。

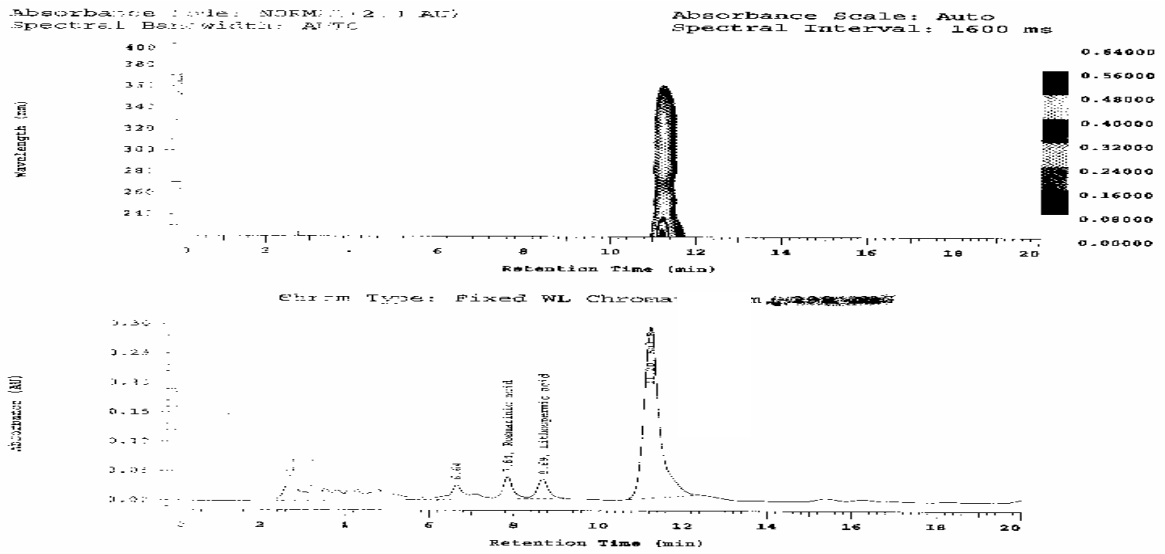
陸、參考文獻

- 1.Kang HS, Chung HY, Jung JH, Kang SS and Chiou. Antioxidant effects of *Salvia miltiorrhiza*. Arch. Pharm. Res. 1997; 20: 496-500.
- 2.Tezuka Y, Kasimu R, Basnet P, Namba T, Kadota S. Aldose reductase Inhibitory constituents of the root of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Chem. Pharm. Bull 1997; 45: 1306-1311.
3. Yokozawa T, Dong E, Chung HY, Oura H, Nishioka I. A Protective Action of Magnesium Lithospermate B on Renal Function after Ischemia-Reperfusion of Rats and Cultural Proximal Tubular Cells. Nat. Med. 1997; 51: 287-292.
- 4.Yokozawa T, Chung HY, Oura H, Nonaka GI, Nishioka I. Antihypertensive Effect of Magnesium Lithospermate B, a Component of *Salvia miltiorrhiza* Radix, in Spontaneously Hypertensive Rats. Nat. Med. 1995; 49: 164-167.
5. Nagai M, Noguchi M, Iizuka T, Otani K, Kamata K. Vasculdilator Effects of des (α-carboxy-3,4-dihydroxyphenethyl) lithospermic Acid (8-epiblechnic acid, a Derivative of Lithospermic Acid in *Salvia miltiorrhiza* Radix. Biol. Pharm. Bull. 1996; 19: 228-232.
6. Zhao BL, Jiang W, Zhao Y, Hou JW, Xin WJ. Scavenging Effects of *Salvia miltiorrhiza* on Free Radicals and Its Protection for Myocardial Mitochondrial Membranes from Ischemia-Reperfusion Injury. Biochem. Mol. Biol. Internat. 1996; 38: 1171-1182.
7. Wu H, Li J, Peng L, Teng B, Zhai Z. Effect of 764-3 on Aggregation and calcium movements in aequorin-loaded human platelets. Chin Med Sci J 1996; 11: 49-52.
8. Wu YJ, Hong CY, Lin SJ, Wu P, M. S. Shiao MS. Increase of Vitamin E Content in LDL and Reduction of Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits by a Water-

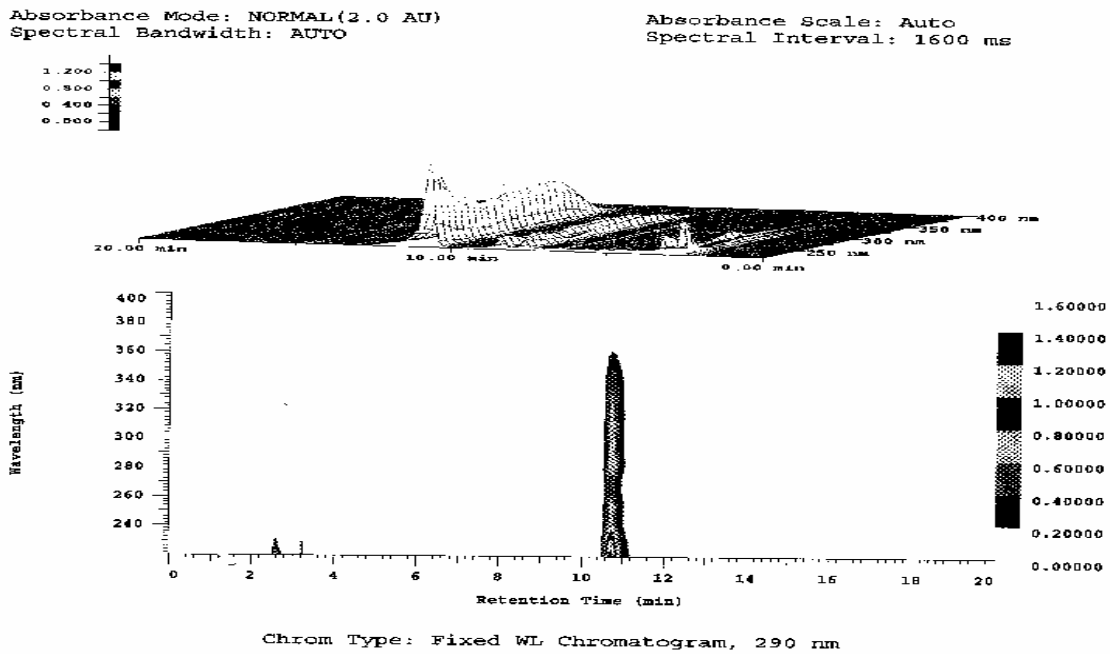
- Soluble Antioxidant-Rich Fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 481-486.
9. Onitsuka M, Fujiu M, Shinma N, Maruyama HB. New Platelet Aggregation Inhibitor from Tan-Shen: Radix of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem Pharm Bull* 1983; 31: 1670-1675.
 10. Lei XL, Chiou GCY. Studies on cardiovascular Actions of *Salvia miltiorrhiza*. *Am J Chin Med* 1986; 16: 26-32.
 11. Wasser S, Sian-Ho JM, Ang HK, Looi-Tan CE. *Salvia miltiorrhiza* reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J. Hepatol.* 1998; 29:760-771
 12. Liu P, Hu Y, Liu C, Zhu D. Effects of Salvianolic acid A (SA-A) on liver injury: SA-A action on hepatic peroxidation. *Liver* 2001; 21: 384-390
 13. Yokozawa T, Chung HY, Oura H, Nonaka GI, Nishioka I. Isolation of the Active Components Having the Uremia-Preventive Effect from *Salvia miltiorrhiza*. *Chem Pharm Bull* 1988; 36: 316-320.
 14. Ikeshiro Y, Mase I, Tomita Y. Abietane Type Diterpeneoids from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* 1989; 28: 3139-3141.
 15. Ryu SY, Lee CO, Choi SU. *In Vitro* Cytotoxicity of Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med* 1997; 63:339-342.
 16. Lin HC, Chang WL. A New Tanshinone from *Salvia miltiorrhiza*. *Chin Pharm J* 1993; 45:615-61.
 17. Lin HC, Chang WL. Phytochemical and Pharmacological Study on *Salvia miltiorrhiza* (I) . *Chin Pharm J* 1991; 43:11-17.
 18. Lin HC, Chang WL, Chen G. L. Phytochemical and Pharmacological Study on *Salvia miltiorrhiza* (II) . *Chin Pharm J* 1991; 43: 501-504.
 19. Lin HC, Chang WL. Phytochemical and Pharmacological Study on *Salvia miltiorrhiza* (III) . *Chin Pharm J.* 1991; 45: 21-27.
 20. Lin HC, Chang WL. Phytochemical and Pharmacological Study on *Salvia miltiorrhiza* (IV) . *Chin Pharm J* 1993; 45: 85-87.
 21. Lin HC, Chang WL, Wu PL, Wu TS. Tanshinketolactone, A New Tanshinone from *Salvia miltiorrhiza*. *J Chin Chem Soc* 1996; 43:199-201.
 22. Lin HC, Chang WL, Chen CF. Phytochemical and Pharmacological Study on *Salvia miltiorrhiza*(VI)-Cytotoxic Activity of Tanshinones. *Chin Pharm J* 1995;

- 47: 77-80.
- 23.Luo HW, Chen S, Lee J, Snvder JK. Epi Danshenspiroketallactone from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* 1988; 27: 290-292.
- 24.Ryu SY, No Z, Kim SH, Ahn JW. Two Novel Abietane Diterpenes from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.* 1997; 63: 44-46.
- 25.Li LN, Tan R, Chen WM. Salvianolic Acid A, a New Depside from Roots of *Salvia miltiorrhiza* .*Planta Med* 1984; 50: 227-228.
- 26.Ai CB, Li LN. Salvianolic Acids D and E: Two New Depsides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med* 1992; 58: 197-199.
- 27.Ai CB, Li LN. Stereostructure of Salvianolic acid B and Isolation of Salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza*. *J Nat Prod* 1988; 51:145-149.
- 28.Liu GT, Zhang TM, Wang BE, Wang YW. Protective Action of Seven Natural Phenolic Compounds against Peroxidative Damage to Biomembranes. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 43: 147-152.
- 29.Chen YH, Lin SJ, Ku HH, Shiao MS, Lin FY, Chen JW, Chen YL. Salvianolic acid B Attenuates VCAM-1 and ICAM-1 Expression in TNF-a-Treated Human Aortic Endothelial Cells. *J Cell Biochem* 2001; 82: 512-521.
- 30.Liu J, Shen HM, Ong CN. Role of intracellular thiol depletion, mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in *Salvia miltiorrhiza*-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Life Science* 2001; 69: 1833-1850.
- 31.Liu J, Shen HM, Ong CN. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Lett.* 2000; 153: 85-93.
- 32.Alves-Pereir IMS, IMS, Fernandes-Ferreira M. Essential Oils and Hydrocarbons from Leaves and Calli of *Origanum vulgare* ssp. *Virens*. *Phytochemistry* 1998; 48: 795-799.
- 33.Safsharypuor S, Sajjadi SE, Erfan-Manesh M. Volatile Constituents of *Origanum vulgare* ssp. *Viride* (syn. *O. heracleoticum*) from Iran. *Planta Med* 1997; 63: 179-180.
- 34.Kikuzaki. H, Nakatani n. Structure of a New Antioxidative Phenolic Acid from Oregano (*Origanum vulgare* L.) . *Agri Biol Chem* 1989; 53: 519-524.
- 35.Nakatani N, Kikuzaki H. A New Antioxidative Glucoside Isolated from Oregano (*Origanum vulgare* L.) .*Agri Biol Chem* 1987; 51: 2727-2732.

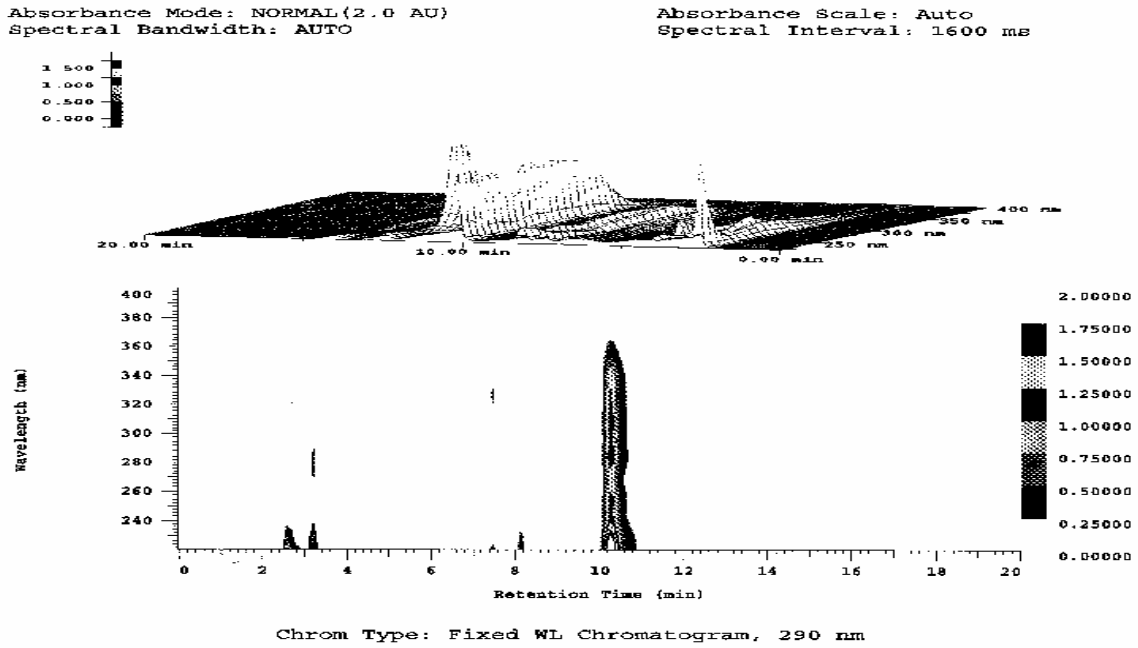
柒、圖、表



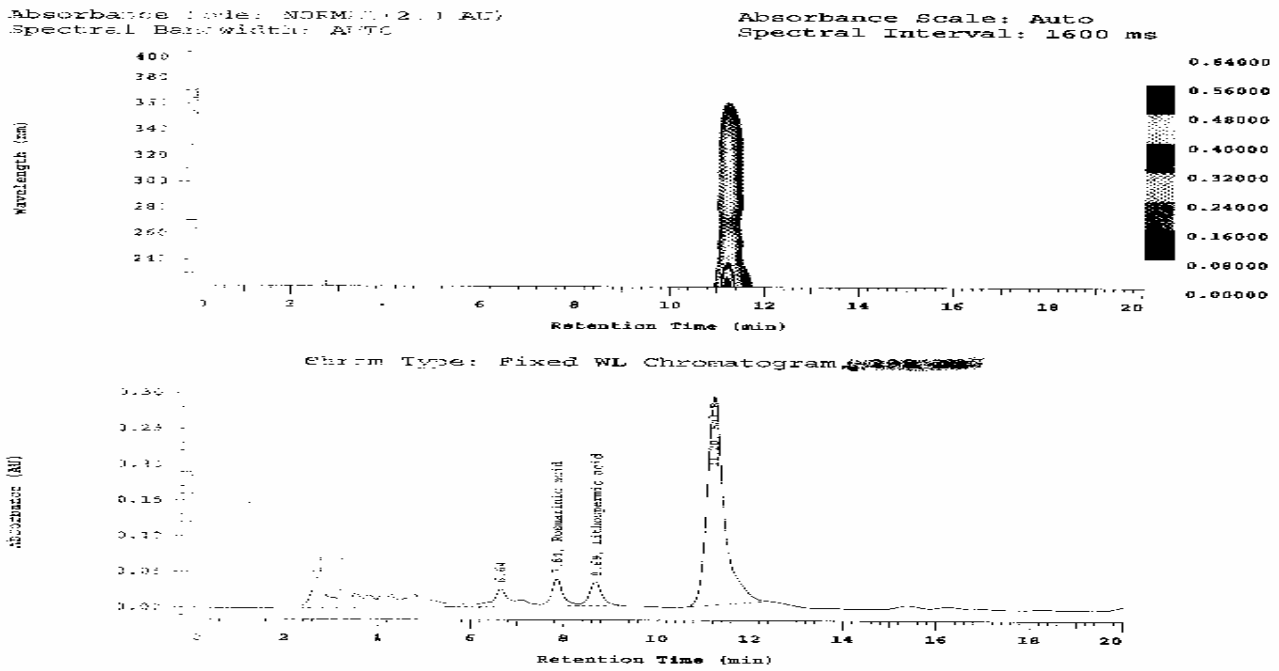
圖一. 丹參其中一生藥樣品之HPLC圖譜



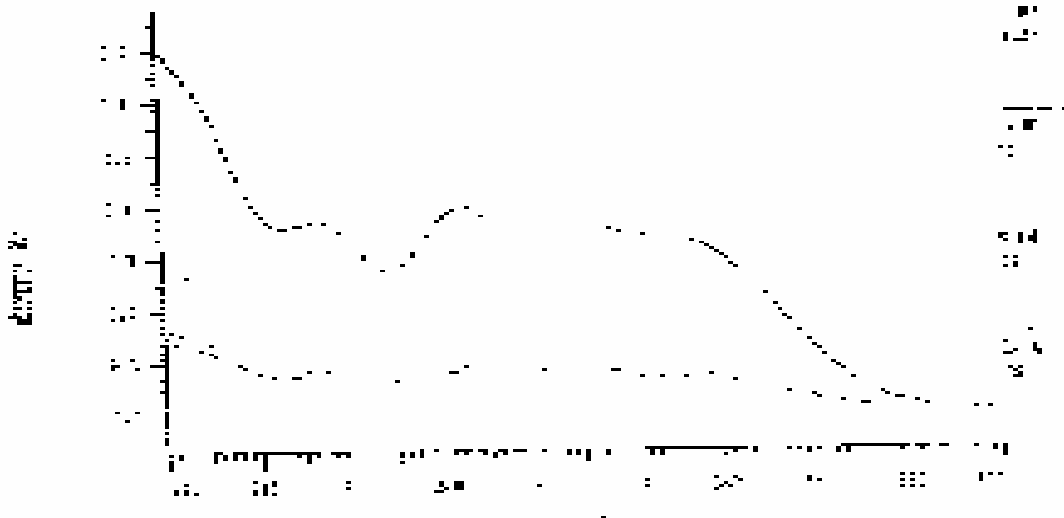
圖二. 丹參其中一生藥樣品之HPLC圖譜 (Photodiarray)



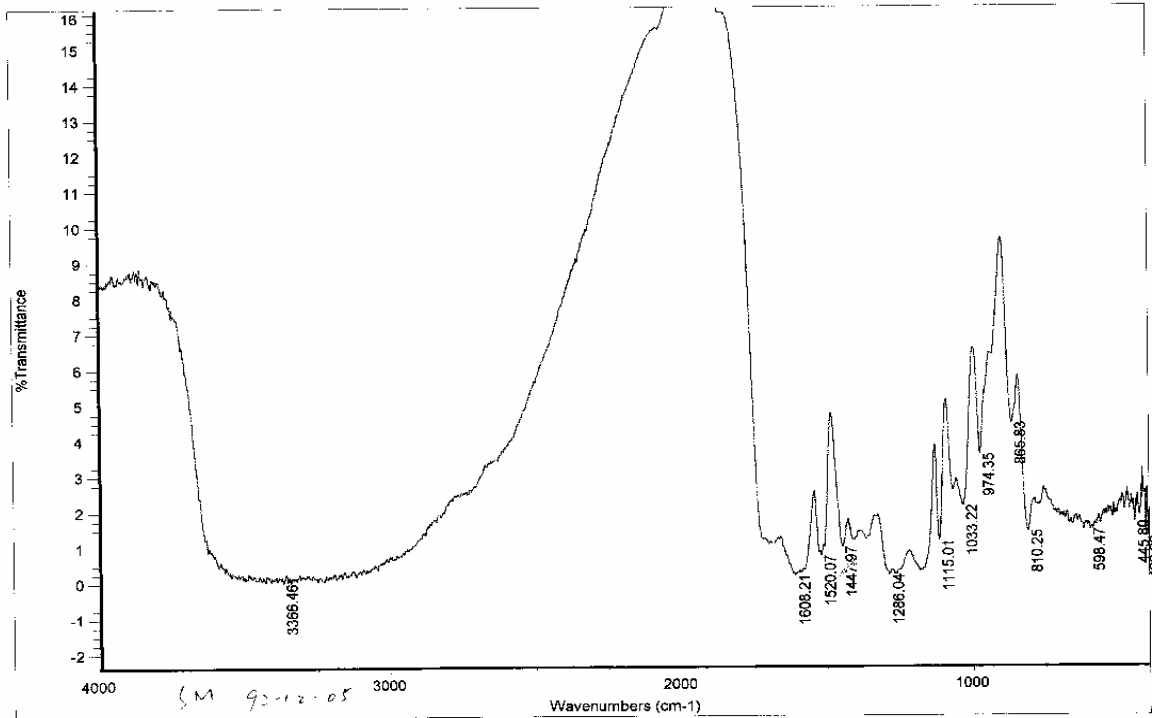
圖三. 丹參其中一科學中藥樣品之HPLC圖譜



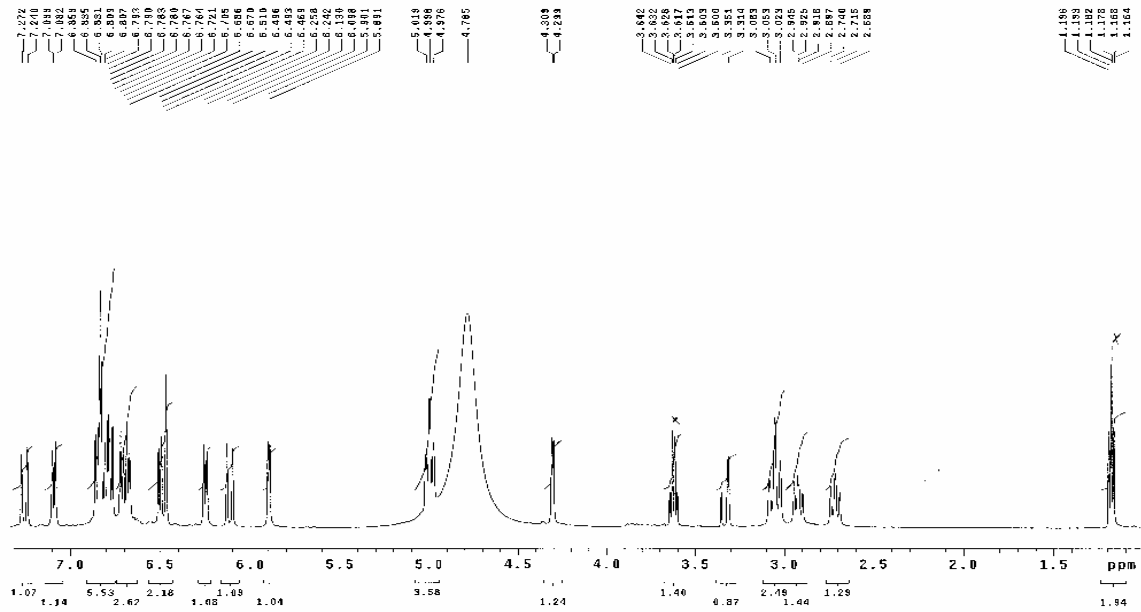
圖四. 丹參其中一科學中藥樣品之HPLC圖譜 (Photodiarray)



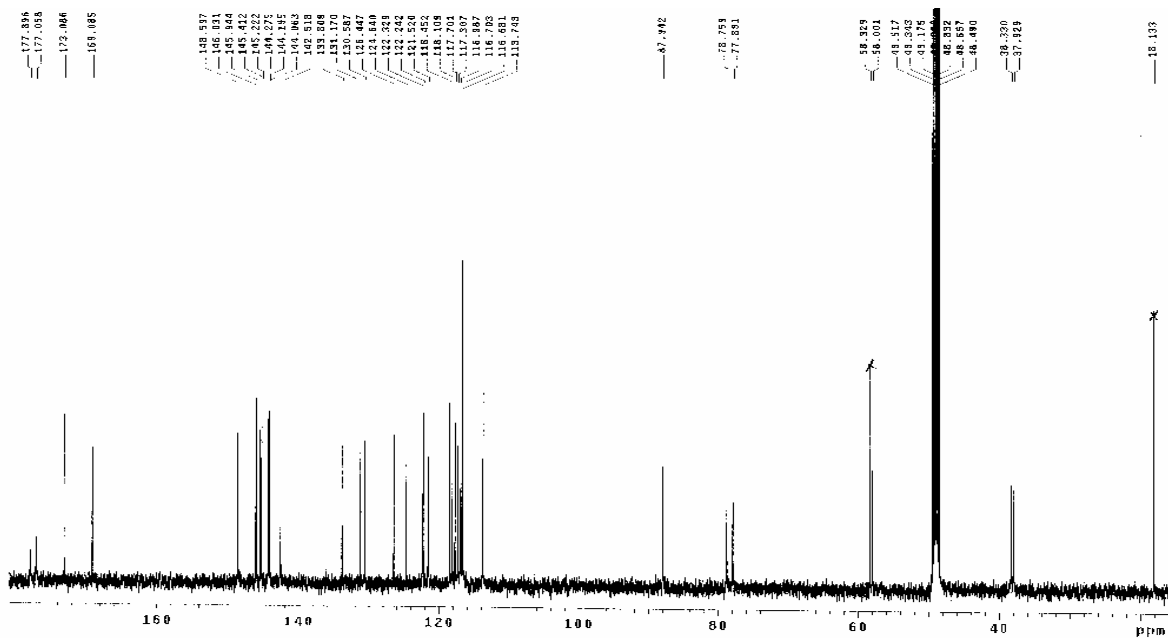
圖五. 丹參酚酸 B 之紫外光譜



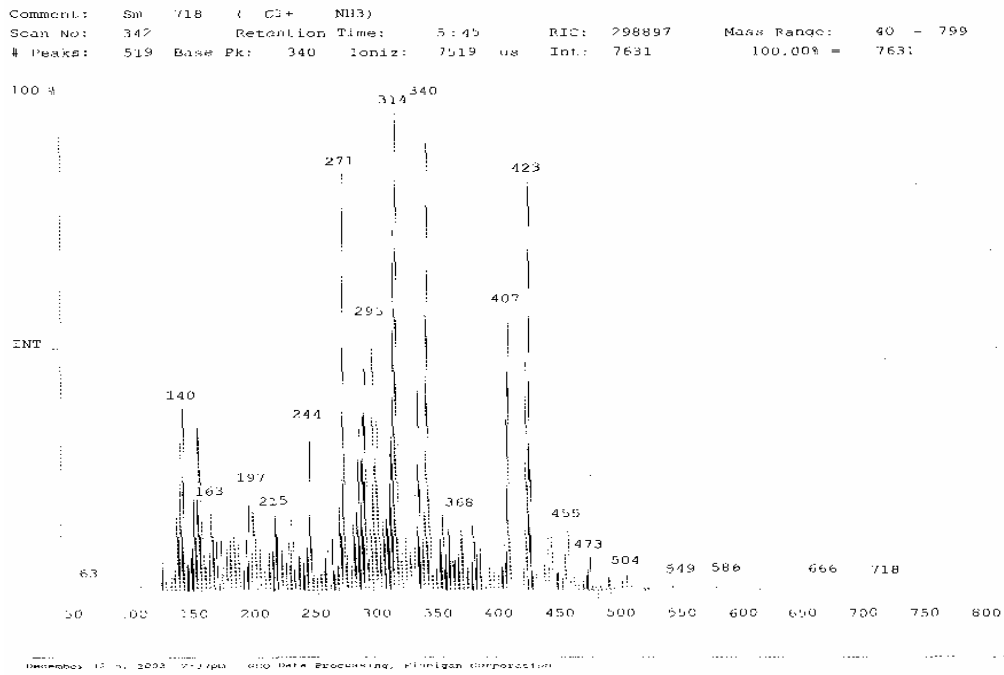
圖六. 丹參酚酸 B 之紅外光譜



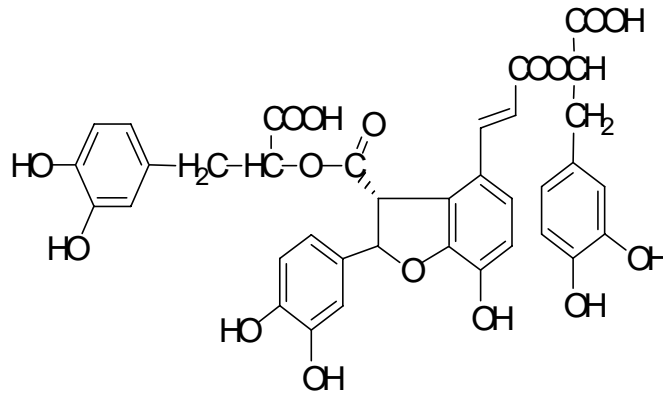
圖七. 丹參酚酸 B 之¹H NMR光譜



圖八. 丹參酚酸 B 之¹³C NMR光譜

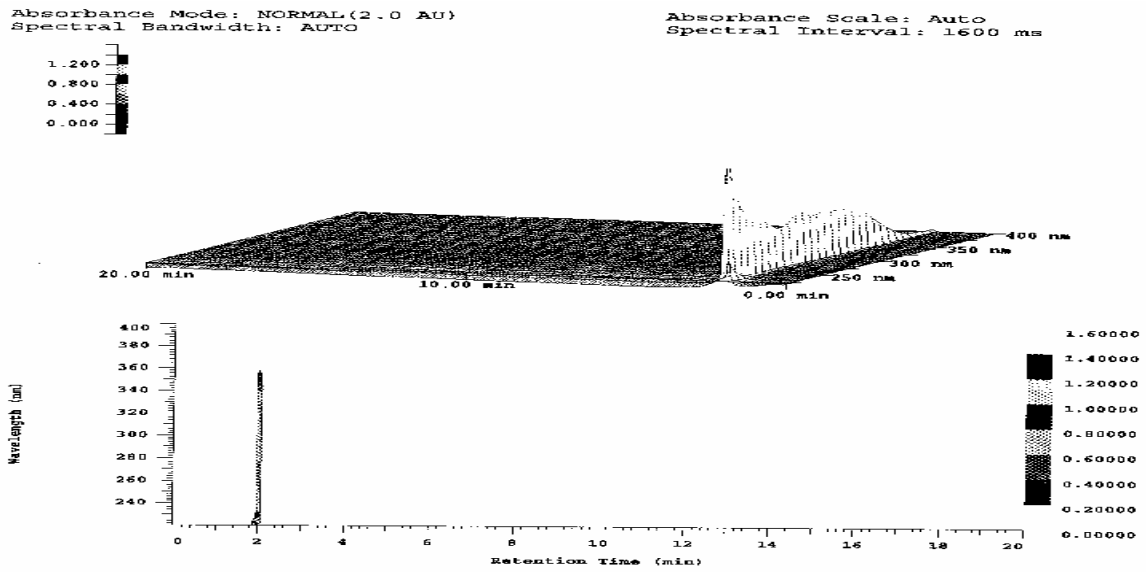


圖九. 丹參酚酸 B 之質譜

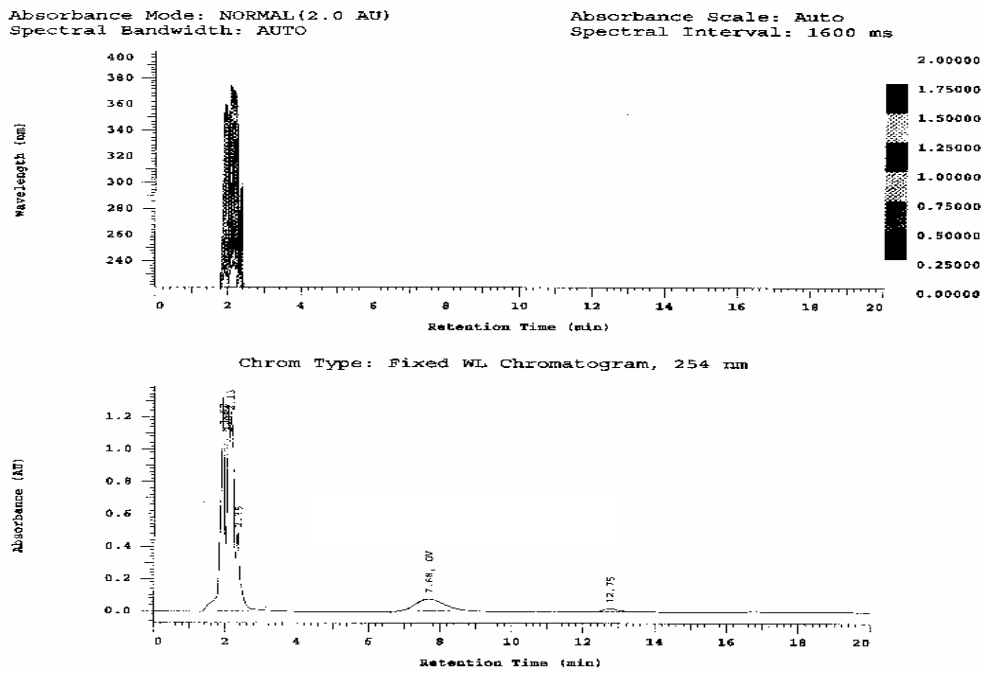


sal acid B

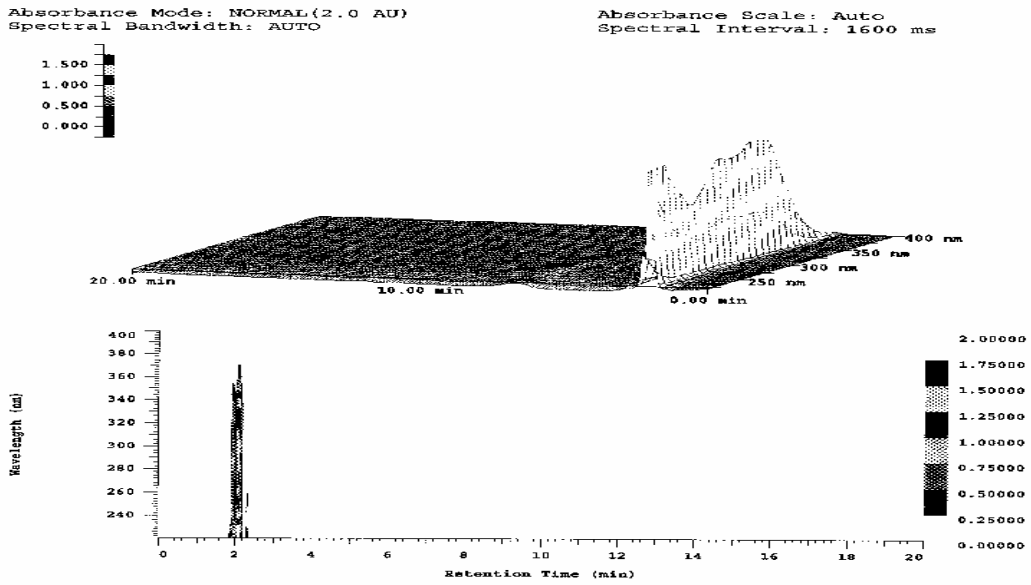
4-[2-[1-Carboxy-2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethoxycarbonyl]-vinyl]-2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-7-hydroxy-2,3-dihydro-benzofuran-3-carboxylic acid 1-carboxy-2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-ethyl ester



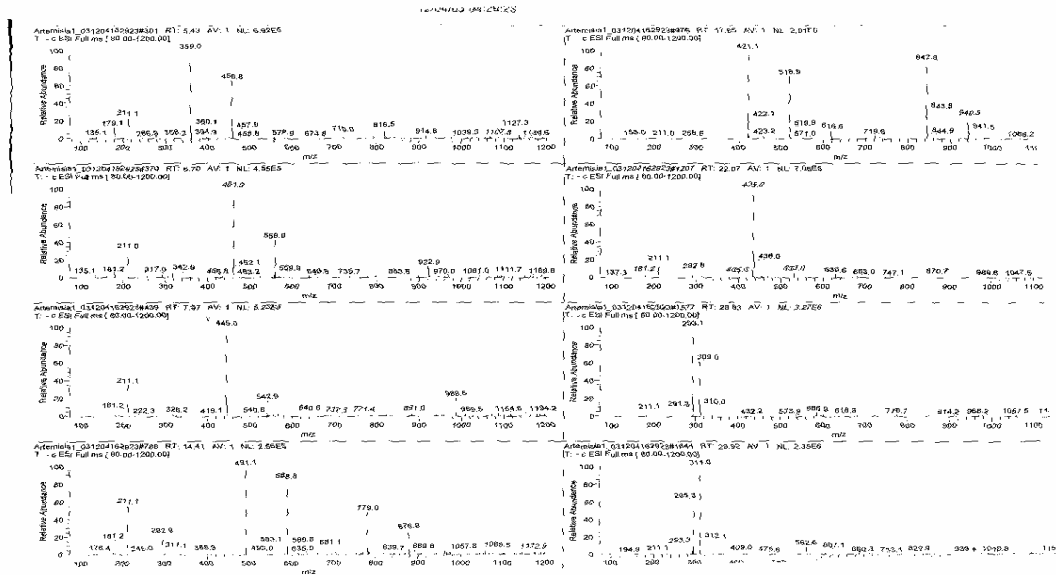
圖十. 茵陳其中一生藥樣品之HPLC圖譜



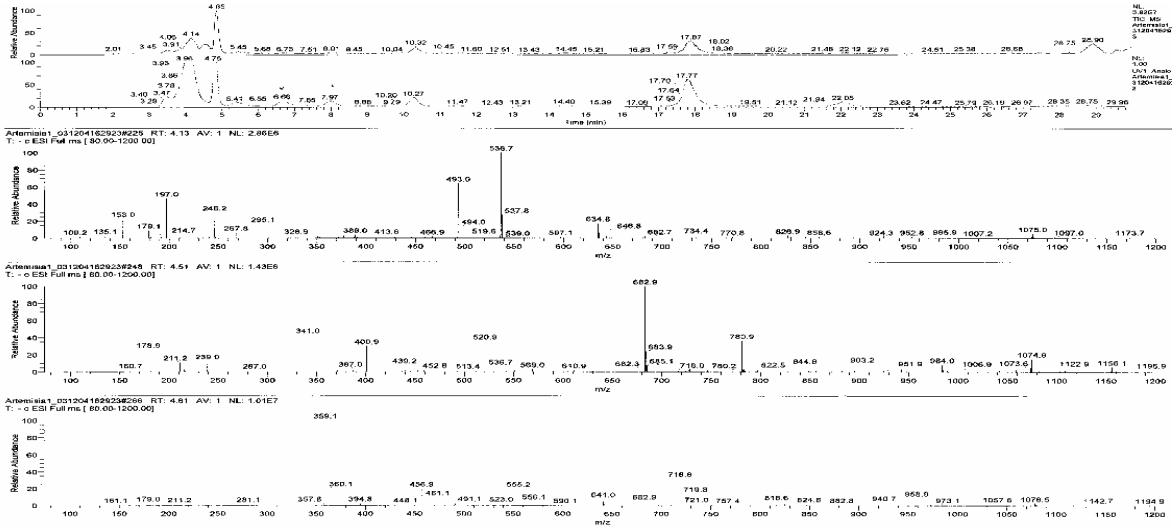
圖十一. 茵陳其中一生藥樣品之HPLC圖譜 (Photodiarray)



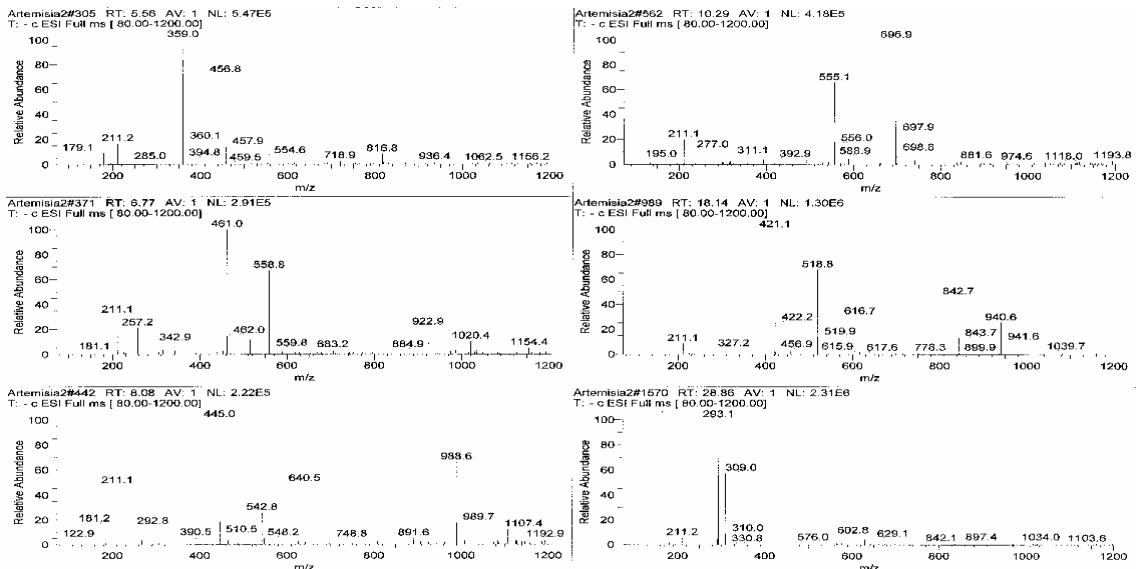
圖十二. 茵陳其中一科學中藥樣品之HPLC圖譜



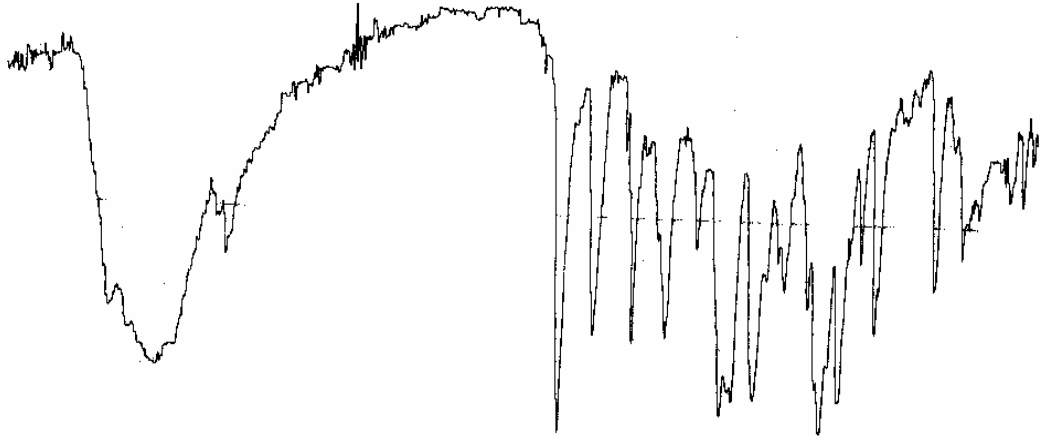
圖十三. 茵陳其中一科學中藥樣品之HPLC圖譜 (Photodiarray)



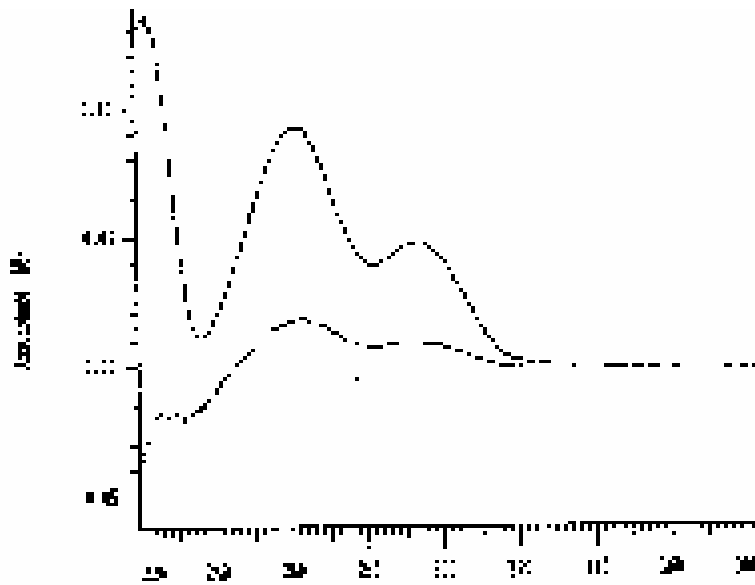
圖十四. 茵陳其中一生藥樣品之LC-MS圖譜



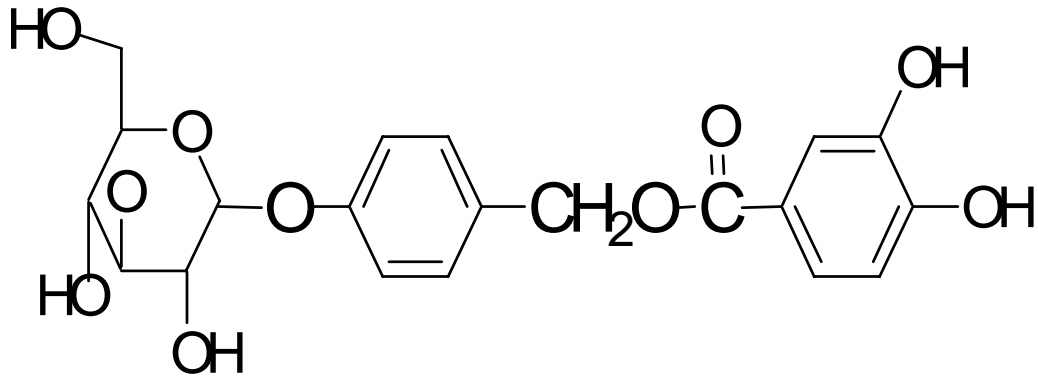
圖十五. 茵陳其中一科學中藥樣品之LC-MS圖譜



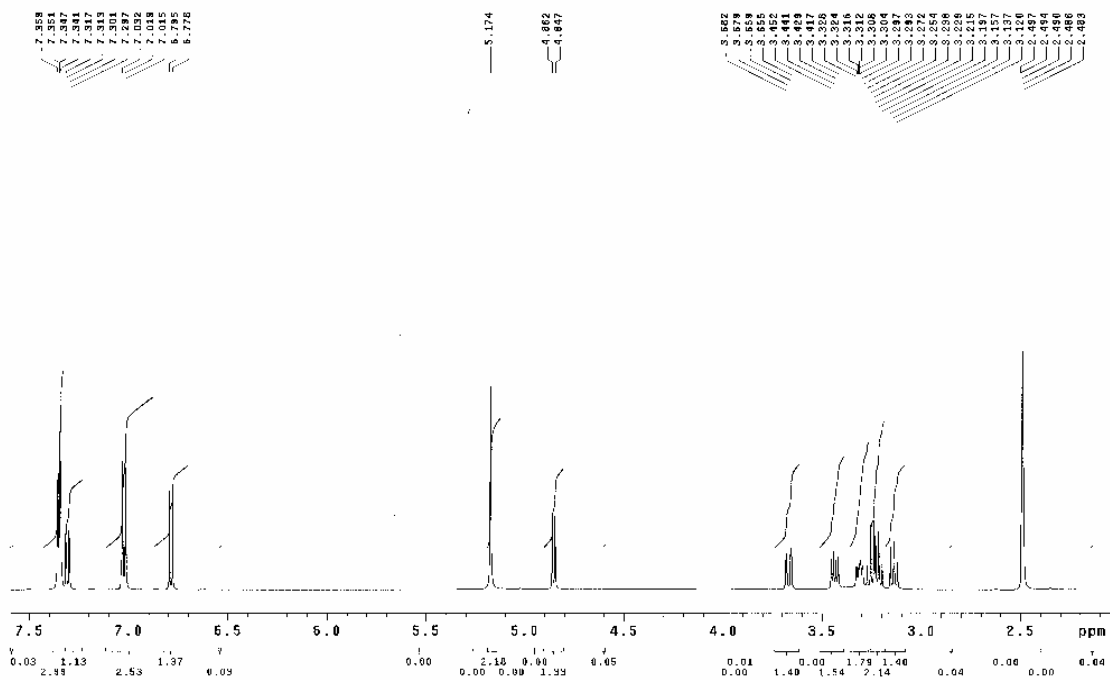
圖十六. (北) 茵陳指標成分4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-O-β-D-glucopyranoside之紅外光譜 (左)



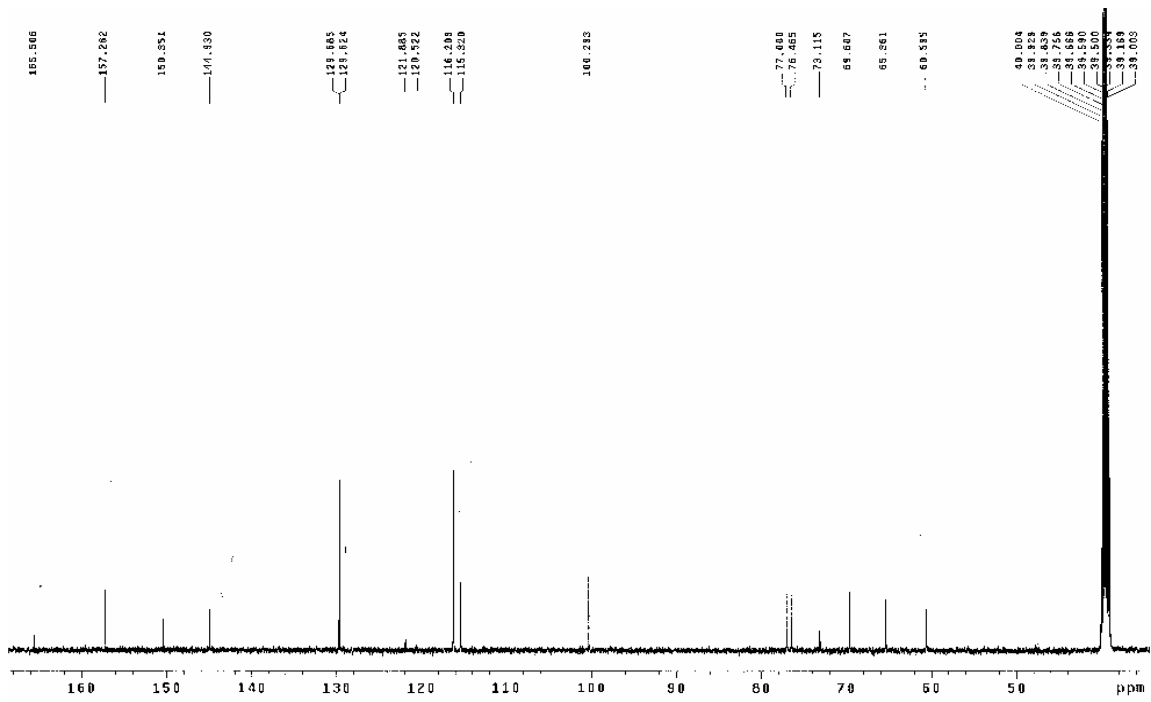
圖十七. (北) 茵陳指標成分4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-O-β-D-glucopyranoside之紫外光譜



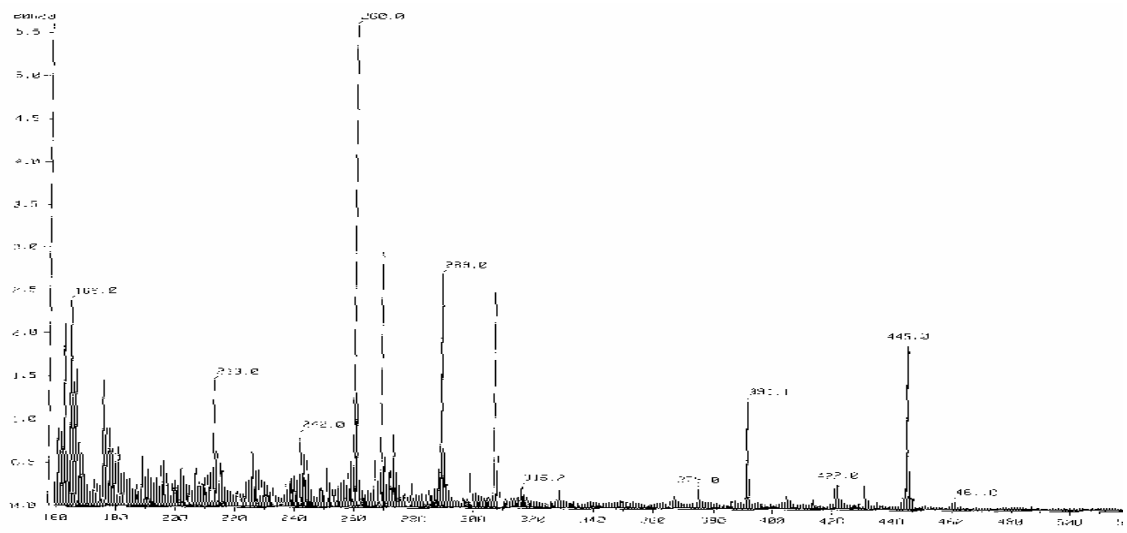
(北) 茵陳指標成分4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-O- β -D-glucopyranoside之構造式



圖十八. (北) 茵陳指標成分4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-O- β -D-glucopyranoside之 ^1H NMR光譜



圖十九. (北) 茵陳指標成分4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl-O-β-D-glucopyranoside之¹³C NMR光譜



圖二十. (北) 茵陳指標成分4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl-O-β-D-glucopyranoside之質譜

表一.市售丹參測得 salviaolic acid B 的含量 (290 nm)

Sample	salviaolic acid B at 290 nm (mg/g)
1	6.71 ± 0.35
2	1.17 ± 0.21
3	2.96 ± 0.18
4	1.11 ± 0.13
5	0.89 ± 0.22
6	7.21 ± 0.32
7	16.7 ± 1.0
8	27.5 ± 1.6
9	6.28 ± 0.27
10	6.96 ± 0.32

1~5：生藥材；6~10：科學中藥；每一數值為三次實驗結果的平均

表二.市售(北)茵陳測得的 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl) phenyl-O-β-D- glucopyranoside (DPG) 含量 (254 nm)

Sample	DPG at 254 nm (mg/g)
1	0.62 ± 0.07
2	2.20 ± 0.25
3	0.37 ± 0.12
4	0.63 ± 0.08
5	0.74 ± 0.11
6	2.85 ± 0.26
7	4.53 ± 0.36
8	0.31 ± 0.06
9	1.49 ± 0.22
10	0.55 ± 0.13

1~5：生藥材；6~10：科學中藥；每一數值為三次實驗結果的平均