

药所需剂量大,且有肝脏首过效应,药品起效相对慢,实验结果个体差异较大。而 ip 由于在腹腔给药部位和深浅的不同,极易造成局部血药浓度过高,导致在检测时得出错误的结论。相对而言,舌下静脉 ip 给药,药物直接入血,干扰因素较少,数据更为可靠。目前临床上所用的华蟾蜍毒素制剂以注射液为主,静脉给药的研究方法对临床更有指导意义。

提取条件的选择:组织中提取华蟾蜍毒素时,笔者参照前期血清中蟾蜍灵测定研究方法,采用混合有机溶剂萃取的方法提取血清样品中的华蟾蜍毒素^[5,6]。即取匀浆后的组织,加入内标后,加入提取液乙醚-醋酸乙酯(5:1)4mL,漩涡混合器上间断振荡混合 3 min,是为了让组织的匀浆液及血清与提取液之间充分混合,间断振荡是为了减少组织匀浆液的乳化,从而使样品易于提取充分。

肺组织按照同样的方法进行实验,未测得华蟾蜍毒素;肾上腺组织质量过轻,无法获取足够组织匀浆液进行进一步分析,因此实验结果中没有这两个组织的数据。

参考文献:

[1] 高艳荣,张莉,张磊,等.蟾酥及其有效成分的药理作用及机制研究进展[J].武警医学院学报,2003,12(5):406-408.
 [2] 程国华.蟾酥质量研究及其药理临床应用进展[J].中草药,2001,32(2):184-186.
 [3] 张磊,齐刚,张莉,等.高效液相色谱法测定大鼠血清中华蟾素浓度[J].中国医院药学杂志,2006,26(6):692-694.
 [4] 张磊,齐刚,张莉,等.大鼠舌下静脉给药华蟾毒配基的药动学研究[J].中草药,2007,38(2):199-202.
 [5] 张莉,白雪,齐刚,等.RP-HPLC法测定大鼠血清中蟾蜍灵浓度[J].药物分析杂志,2004,24(5):523-525.
 [6] Zhang L, Qi G, Bai X. Pharmacokinetics of bufalin in male rats [J]. Asia J Drug Metab Pharmacokinet, 2003, 3(4): 297-300.

大黄不同炮制品指纹特征的识别研究

孙玉琦^{1,2},马永刚²,肖小河^{2*},刘晓娟¹

(1.辽宁医学院药学院,辽宁 锦州 121001; 2.中国人民解放军中药研究所,北京 100039)

摘要:目的 建立大黄不同炮制品的 HPLC 指纹图谱,为 大黄炮制品的质量评价和炮制机制研究提供依据。方法 采用梯度洗脱 HPLC 法,建立大黄不同炮制品指纹图谱,运用中药指纹图谱相似度评价方法与样品聚类分析方法,对其指纹特征进行研究。结果 该方法重复性良好,大黄不同炮制品指纹图谱共有峰特征明显,不同炮制品指纹特征存在差异,其化学成分发生了不同程度的变化。其中生大黄与酒大黄、醋大黄差异较小,与熟大黄、清宁片存在差异,与 大黄炭差异明显。结论 建立的大黄不同炮制品的指纹图谱可以识别大黄不同炮制品的归属特征,可有效控制内在质量,探讨炮制机制,并可进一步进行大黄的安全性评价和指导临床合理用药。

关键词:大黄;炮制;指纹图谱;HPLC 法

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0725-04

大黄中主要含有蒽醌类、多糖类、鞣质等 80 多种成分。大黄所含有的大黄素等蒽醌类成分有肝肾毒性和致癌性的潜在危险,长期应用大黄停药后有继发性便秘之虞^[1]。中药炮制是中医用药的一大特色和优点,炮制减毒是中药合理制用的有效途径和手段。大黄的炮制品主要有生大黄、酒大黄、醋大黄、熟大黄、清宁片、大黄炭。大黄经炮制后,其化学组分、药性和毒性都将发生相应的变化。色谱指纹图谱是通过比较各样本间色谱图的差异来反映样品化学成分的差异^[2]。本实验通过对大黄不同炮制品指纹图谱的识别研究,旨在阐明大黄因炮制而产生

的成分变化规律,有效控制大黄的内在质量、探索大黄的炮制机制,进而为大黄的不同炮制品的成分与药效间建立联系,为大黄临床的安全、有效应用提供依据。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪,配有 DAD;25 μL 微量进样器(美国 Hamilton);瑞士 Mettler Toledo AL204 微量分析天平。

纯净水(乐百氏纯净水公司),乙腈为色谱纯试剂,磷酸、甲醇等为分析纯试剂。大黄素、大黄酚、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素甲醚对照品由中国药品生

* 收稿日期:2008-07-11

基金项目:“十五”国家科技攻关项目(2004BA721A14)

作者简介:孙玉琦(1978—),辽宁省大连市人,研究方向为中药新剂型新技术。E-mail:cpusyq@163.com

*通讯作者 肖小河 Tel:(010)66933322 Fax:(010)63825768

物制品检定所提供,批号分别为 110756-200110、110796-200310、0757-200206、110795-200504、110758-200509。大黄药材产自甘肃省礼县,经中国人民解放军中药研究所肖小河研究员鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 不同炮制品的制备:参照《中国药典》2005 年版一部和《现代中药炮制手册》中大黄的不同炮制法,以生大黄为原料进行炮制,分别得到酒大黄、醋大黄、熟大黄、清宁片、大黄炭。各取干燥后的大黄 6 种不同炮制品 200 g,分别加入 95%乙醇回流提取 3 次,每次乙醇量 1 000 mL,时间 1 h,提取液滤过;后加入水 1 600 mL,回流提取 1 h,提取液滤过,合并滤液,浓缩,真空干燥,即得。

2.2 对照品溶液的制备:分别精密称取各对照品适量,置于同一量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得含大黄素 40 μg/mL、大黄酸 39 μg/mL、大黄酚 39 μg/mL、芦荟大黄素 43 μg/mL、大黄素甲醚 41 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取不同炮制品的提取物约 50 mg,置 50 mL 量瓶中,加入甲醇使溶解,稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 色谱条件:瑞典 Kromasil 色谱柱 (250 mm ×

4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液,采用二元梯度洗脱,0~20 min, 20%乙腈,20~50 min, 20%~85%乙腈,50 min 以后,85%乙腈;检测波长:254 nm;体积流量:1 mL/min;进样量:10 μL;柱温:30;采样时间:60 min。对照品各峰理论板数不小于 20 000,各峰的分离度均大于 1.5,对称因子 0.85~1.15,峰形基本对称。

2.5 不同炮制品指纹图谱的建立:大黄含有蒽醌、二蒽酮、芪、苯丁酮、鞣质、萜、色酮等不同类型的化合物,大体上分为蒽醌类、多糖类、鞣质。其中蒽醌类化合物包括大黄素等游离型蒽醌,大黄素苷等结合型蒽醌,番泻苷等双蒽醌类成分^[3]。从生大黄、酒大黄、醋大黄、熟大黄、清宁片、大黄炭的 HPLC 指纹图谱在中药指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会主持开发)中所生成的对照图谱上可以辨认出 21 个色谱峰,见图 1。将色谱峰分为 3 个区,峰数构成为 7+6+8,1~7 号峰为 I 区(保留时间在 1~24 min,极性成分),8~13 号峰为 II 区(保留时间 25~34 min,结合蒽醌),16~21 号峰为 III 区(保留时间 34~52 min,游离蒽醌,15-芦荟大黄素甲醚,16-大黄酸,18-大黄酚,20-大黄素,21-大黄素甲醚)以峰面积作为“表观丰度”,观察指纹图谱中各特征峰之间的大小、顺序和相互之间的比例关系,以辨认大黄不同炮制品指纹图谱的“整体面貌”。

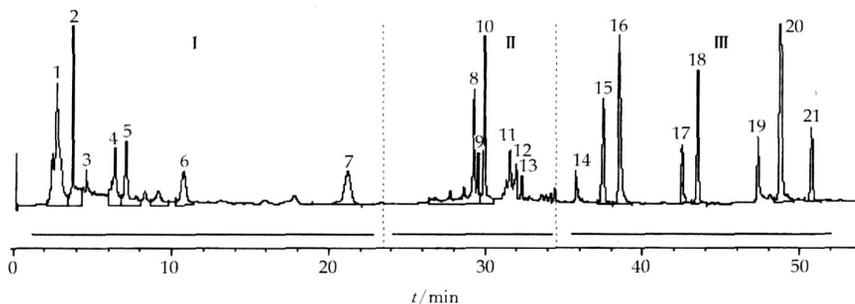


图 1 大黄炮制品的指纹对照图谱

Fig.1 Reference fingerprint of processed samples of Radix et Rhizoma Rhei

2.6 大黄不同炮制品指纹特征识别:制备供试品溶液,测定样品的峰面积,对结果进行分析,指纹图谱见图 2。

大黄不同炮制品的指纹图谱中,共有峰 12 个(1、2、8、9、10、11、15、16、18、19、20、21),非共有峰 9 个(3、4、5、6、7、12、13、14、17),其中共有峰表现出大黄不同炮制品的共性。指纹图谱中的非共有峰和峰面积的变化则表现出大黄经炮制后其理化性质和成分组成的变化情况。

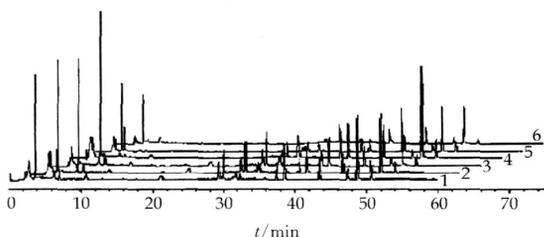
生大黄共产生 18 个明显色谱峰,与对照图谱相

比较,缺少 3、14、17 号峰,分别在分区中的 I、II、III 区,说明大黄经炮制后,各类成分都发生了变化。

酒大黄 I 区的峰面积不同程度的减少,说明酒制对大黄中的水溶性成分有一定破坏,对结合蒽醌与游离蒽醌的影响不明显。

醋大黄色谱峰构成与酒大黄一致,醋大黄 II 区峰面积增加,醋制对游离蒽醌的量产生影响。

与生大黄比较,熟大黄 1、2、11 号峰显著增大,产生 3 号峰,并且 4、5、6、7、12、13 号峰消失, III 区 8、9、10 号峰面积减小 30%左右。 III 区游离蒽醌的峰



1-生大黄 2-醋大黄 3-酒大黄 4-熟大黄 5-清宁片 6-大黄炭
1-raw rhubarb 2-vinegar rhubarb 3-wine rhubarb
4-prepared rhubarb 5-Qingning Tablet 6-charred rhubarb

图 2 大黄炮制品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC Fingerprints of processed samples of Radix et Rhizoma Rhei

面积增大约 50%。提示大黄熟制水溶性成分转化为水溶性更强的物质,结合蒽醌有一部分水解成游离蒽醌。

清宁片色谱峰的构成与熟大黄相同,与生大黄相比,除 1 号峰面积略有增大外,其他峰都明显减小, 区结合蒽醌变化最大,10 号峰减小了 69.5%,12、13 号峰则完全消失。生大黄炮制成清宁片,结合蒽醌遭到较严重破坏。

大黄炭与生大黄相比产生了 3、14、17 号 3 个明显的色谱峰,消失了 5、6、7、12、13 个色谱峰, 区峰面积减少不很明显,但考虑到得率因素, 区峰面积很大程度的减少。应该注意,大黄炒炭后, 区中的 11 号峰面积增大,其炮制机制以及与药效的关系有待进一步研究。

2.7 不同炮制品指纹图谱数据分析:按各色谱峰的保留时间和峰面积的均值作为共有模式,使用中药指纹图谱相似度计算软件(国家药典委员会主持开发),以夹角余弦为测度,得到色谱峰相似度分析,结果酒大黄、醋大黄、熟大黄、清宁片、大黄炭与生大黄指纹图谱的相似度分别为 0.988、0.991、0.891、0.858、0.719。由相似度分析结果可知,生大黄与醋大黄、酒大黄间的相似度大于 95%,可以认为它们之间差异较小;生大黄与其他炮制品之间的相似度小于 90%,它们之间存在差异,其中生大黄与大黄炭的相似度为 0.719,差异最明显。

利用 SAS 样品聚类分析软件对 6 种炮制品指纹图谱各峰峰面积进行分析,运用聚合距离(Euclidean,)作为样品的测度,结果见图 3。由聚类分析结果可知,当分类阈值取聚合距离 = 1.5 时,6 种炮制品划分为 4 类, = {生大黄、醋大黄、酒大黄}; = {熟大黄}; = {清宁片}; {大黄炭},当

分类阈值取聚合距离 = 6.3 时,6 种炮制品样品划分为两类, = {生大黄、醋大黄、酒大黄、熟大黄、清宁片}; = {大黄炭}。生大黄、醋大黄、酒大黄首先聚成一类,说明它们的理化性质与化学组成比较相近;熟大黄与清宁片在 = 4.5 时聚成一类,说明两种炮制方法有一定的共性;大黄炭最后自成一类,说明大黄炭已经表现出与大黄其他炮制品不同的性质。

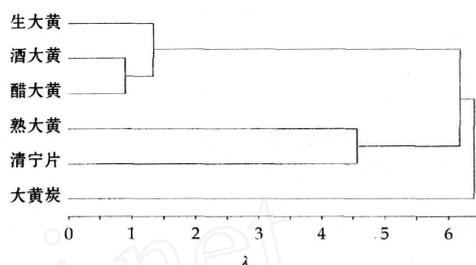


图 3 大黄炮制品的聚类谱系图

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis figure of processed samples of Radix et Rhizoma Rhei

3 讨论

大黄不同炮制品样品的制备工艺,其中醇提方法以生大黄为考察对象,乙醇体积分数、乙醇用量和提取次数为考察因素,以总蒽醌的转移率为考察指标,采用正交试验法,确定最佳醇提工艺,生大黄总蒽醌的转移率为 91.5%。最终选择醇提与水提相结合的样品制备方法,旨在保持中药的整体性和样品的一致性。

在实验过程中采用 DAD 检测器,提取了样品 190~600 nm 的三维扫描图,分别选择波长 220、254、280、400 nm 检测,通过对峰形、峰数、峰面积的考察,最终确定检测波长为 254 nm;流动相分别考察了甲醇、乙腈,不同比例的乙酸-水、磷酸-水的组合,结果表明乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱系统为最佳,各色谱峰分离度较好,保留时间适中。

生大黄作用峻烈,泻火解毒力强。醋大黄泻下作用稍缓,以消积化痰为主。酒大黄泻下作用稍缓,以清上焦实热为主。熟大黄泻下作用缓和,可增强活血祛瘀之功。清宁片泻下作用缓和,具缓泻而不伤气、逐瘀而不伤正之功。大黄炭泻下作用极微,有止血作用^[4]。大黄泻下的有效成分为蒽醌类衍生物(结合蒽醌),蒽酚(酮)的苷泻下效力较强,游离蒽醌较弱,游离蒽醌更次^[5]。通过色谱指纹图谱可以直观地反映大黄不同炮制品中成分的组成和量情况。采用色谱指纹图谱可以为中药炮制过程的成分变化与药效学间建立联系。

大黄不同炮制品中指纹图谱中不仅存在峰面积

的差异,也产生了峰数量的差异,它们反映了大黄各种炮制品内在的质量差别。大黄经过炮制后,其醇提物中的游离蒽醌类成分发生了变化。本实验建立的 HPLC 指纹图谱方法可以为大黄不同炮制品的鉴定提供依据,可以作为大黄不同炮制品的内在质控方法和标准。该方法亦可进一步为大黄的成分和疗效间建立联系,为大黄的安全性评价与临床合理应用提供参考。

参考文献:

- [1] Mueller S O. Gentoxicity of the laxative drug components emodin, aloë-emodin and danthron in mammalian cells: eopoisomerase II mediated [J]. *Mutat Res*, 1996, 371:165.
- [2] 石 荣,王少云,姜维林,等.大豆异黄酮 HPLC 指纹图谱研究[J]. *中草药*, 2006, 37(2):202-205.
- [3] 李秀才.大黄的研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 1998, 33(10):581.
- [4] 叶定江,张世臣,潘三红. *中药炮制学* [M]. 北京:中国中医药出版社, 1999.
- [5] 高学敏. *中药学* [M]. 北京:人民卫生出版社, 2000.

半枝莲酸性多糖 SBPs 的纯化、性质及抗氧化活性研究

王志远,戴 玲*,朱业云,廖洪梅,张 凯

(安徽大学生命科学学院,安徽省中药研究与开发重点实验室,安徽 合肥 230039)

摘要:目的 研究半枝莲酸性多糖 SBPs 的纯化、性质及抗氧化活性。方法 半枝莲烘干粉碎,经热水浸提,醇析,去蛋白,去单寡糖后依次经 DEAE-Cellulose-52 和 Superdex 200 纯化,所得多糖 SBPs 经快速色谱纯化系统 (FPLC) 和聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度,并利用 FPLC 测定相对分子质量,苯酚-硫酸法测定总糖的量,间羟苯法测定酸性糖的量,GC-MS、红外光谱等方法对其组成和性质进行研究。同时采用邻苯三酚法及 Fenton 体系测定 SBPs 对 O₂ 和 ·OH 的清除作用。结果 SBPs 为均一组分,总糖、酸性糖的量分别为 96.02% 和 19.90%,平均相对分子质量约为 1.11 × 10⁴,GC-MS 分析其单糖组成为:鼠李糖、岩藻糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖,物质的量的比依次为 1.00 0.13 0.80 0.10 0.34 0.56 3.04。SBPs 清除 O₂ 和 ·OH 作用明显,IC₅₀ 分别为 800.00、90.42 μg/mL。结论 SBPs 为酸性杂多糖,表现出较好的体外抗氧化活性,提示其可能具有抗衰老作用。

关键词:半枝莲;酸性多糖;纯化;理化性质;抗氧化活性;自由基

中图分类号:R284.2;R286.02;R286.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0728-04

半枝莲来源于唇形科黄芩属植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草,具有解热、抗癌、免疫调节等药理作用,其主要化学成分为黄酮类、二萜类、多糖类等^[1]。早期研究表明从半枝莲中提取的多糖组分在体外可促进 Con A 诱导的小鼠脾细胞淋巴细胞转化^[2],另有报道从半枝莲中提取的多糖组分 SPS₄ 对 S₁₈₀ 肉瘤细胞及腹水肝癌细胞均有一定的抑制作用^[3]。本实验从半枝莲中分离纯化得到一酸性多糖 SBPs,并对其性质和抗氧化作用进行了研究,以期半枝莲资源的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料:快速色谱纯化系统 (FPLC) 为 AKTA Purifier 10 (瑞典 Pharmacia Biotech);气质联用仪为 Shimadzu GC/MS2010, DB-5 MS 毛细管柱;红

外光谱仪为 Nexus-870 (美国 Nicolet);紫外/可见分光光度计为 Ultrospec 3100 pro (瑞典 Pharmacia Biotech);电泳仪/槽为 Power/PAC3000 和 Mini PROTEAN3 Cell (美国 Bio-Rad);凝胶成像系统 Image MasterVDS (瑞典 Pharmacia Biotech)。冻干干燥机为 ALPHA 1-2 (德国 Christ)。半枝莲购自安徽合肥市皖健药房,由安徽大学生命科学学院何家庆教授鉴定为半枝莲 *S. barbata* D. Don; Superdex 200 10/300 GL 预装柱,Pharmacia 公司产品;标准葡聚糖 (Dextran) T500、T70、T40、T10 及蓝葡聚糖 2000 均为 Sigma 公司产品;DEAE-Cellulose-52 为 Whatman 公司产品,其他试剂和标准单糖均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 半枝莲多糖的提取:称取 40 烘干粉碎的

* 收稿日期:2008-09-19

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(03043301)

作者简介:王志远(1981→),男,安徽人,硕士研究生,从事生化与分子生物学研究。E-mail: wangzhiyuan_810913@126.com

*通讯作者 戴 玲 Tel:(0551)5107341 E-mail:dialing2@ah163.com