

图 3 SA-BSA 结合程度参数和理化特性参数的拟合曲线图

Fig 3 Correlation between SA-BSA binding parameter Y and physicochemical property parameters

时分子的极性表面积减小,与蛋白的结合作用将增强;在游离羟基数目一定的情况下,相对分子质量增大,将使单位相对分子质量下的分子极性表面积减小,其与蛋白的结合作用将增强。因此,分子中结构中羟基数目和分子体积综合影响 SA-BSA 的相互作用,疏水性和氢键结合能力是与丹参酚酸-BSA 结合程度相关的两个理化特性。

3 讨论

本实验研究结果表明,对于天然的小分子 SA 类化合物,在药物设计中,综合考虑脂-水分配系数和单位相对分子质量下的拓扑分子极性表面积这两个理化参数来预测其与蛋白的结合作用程度,将可以获得切实可靠的参考数据。

参考文献:

- [1] 曹 斌, 韩凤梅, 陈 勇. 电喷雾离子阱质谱法研究射干苷与血浆蛋白的非共价结合[J]. 中草药, 2007, 38(10): 1473-1476
- [2] 周 能, 梁逸曾, 王 平, 等. 荷花碱与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析化学, 2008, 36(8): 1066-1070.
- [3] 刘雪锋, 夏咏梅, 曹玉华. 香豆素类中药有效成分与牛血清白蛋白结合的构效关系[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(1): 150-152
- [4] 屈凌波, 王 玲, 陈晓岚, 等. 葛根素及其衍生物与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 化学学报, 2007, 65(21): 2417-2422
- [5] 崔 艳, 陈建秋, 严拯宇. 盐酸土霉素与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 光谱实验室, 2010, 27(3): 1064-1069
- [6] 黎莲娘, 张均田. 丹参及其同属植物的水溶性活性成分[J]. 医学研究通讯, 2001, 30(7): 1-4
- [7] 张白嘉, 刘 榴. 丹参水溶部分药理研究进展[J]. 中草药, 1996, 27(10): 634-636
- [8] 刘 杰, 高秀梅, 王 怡, 等. 丹酚酸 B 对急性心肌梗死大鼠血流动力学的影响及作用分子机制研究[J]. 中草药, 2006, 37(3): 409-412
- [9] 杨宇杰, 程晓亮, 吕英超, 等. 双氢丹酚酸 B 对大鼠急性心肌梗死的治疗作用[J]. 中草药, 2010, 41(3): 447-449
- [10] Owen C S, Shuler R L. Spectral evidence for non-calcium interactions of intracellular Indol-1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 163: 328-333
- [11] Flaster T. *Modern Quantum Chemistry* [M]. New York: Academic Press, 1996
- [12] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096-3102

半夏白术天麻汤提取液的血清指纹图谱研究

王淑玲¹, 孙秀梅², 张兆旺², 谢 恬^{1*}

(1 杭州师范大学 生物医药与健康研究中心, 浙江 杭州 310012; 2 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250014)

摘 要: 目的 比较半夏白术天麻汤 4 种方法提取液的血清指纹图谱。方法 取大白兔, ig 半仿生-生物酶提取 (SBEE) 液, 采集不同时刻的血样, 分离含药血清, 用 HPLC 法和 UV 法测定, 将 HPLC 色谱峰数目、峰总面积以及紫外吸光度平均值标准化处理, 加权求和后得综合评判 Y 值, 以 Y 值大者为较佳采血时刻; 然后对 4 种方法提取液此时刻的含药血清进行指纹图谱比较。结果 给药后 2 h 的含药血清综合评判 Y 值最大; 4 种方法提取液 2 h 含药血清以 SBEE 液综合评判 Y 值最大。结论 SBEE 液含药血清较水提法、醇提法、SBE 法提取液含药血清中成分量高。

关键词: 半夏白术天麻汤; 4 种提取液; 含药血清指纹图谱

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1274-06

Comparison of serum fingerprint in extract solution from Banxia Baizhu Tianma Decoction

WANG Shu-ling¹, SUN Xiu-mei², ZHANG Zhao-wang², XIE Tian¹

(1 Biomedicine and Health Institute of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310012, China; 2 College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective Comparing the serum fingerprint of four kinds of extract solution from Banxia

* 收稿日期: 2009-10-29

作者简介: 王淑玲 (1972-), 女, 山东东营人, 讲师、博士, 1995 年获山东中医药大学学士学位, 2005 年获江西中医学院中药学硕士学位, 2009 年获山东中医药大学药学院中药学博士学位, 从事中药新药研究与中药炮制原理研究的科研、教学工作。

Tel: (0671) 28868269 E-mail: wsling000@163.com

Baizhu Tianma Decoction. Methods Taking rabbits as experiment animals, collecting blood, and separating serum after drenching semi-bionic enzyme extracting (SBEE) solution. HPLC was used to detect the fingerprints of medicated serum at different blood-collecting time in order to optimize the best blood collecting time, then the serum fingerprints of four kinds of solution collected were compared. **Results** HPLC showed that when blood collecting time was 2 h, the number and total area of chromatographic peak had the maximum value; SBEE Solution had the the maximum number and total area of chromatographic peak in the four kinds of solution at the best blood collecting time. **Conclusion** The component content in SBEE medicated serum is higher than that by other method.

Key words: Banxia Baizhu Tianma Decoction; four kinds of extract solution; serum fingerprint

半夏白术天麻汤来源于清代程国彭的《医学心悟》，是中医临床治疗风痰证的常用方。目前该方的提取方法仍采用水提法。水提法易导致挥发性成分的流失。半仿生-生物酶提取 (Semi-bionic enzyme extraction, SBEE) 法是在 SBE 法的基础上加入适宜的生物酶形成的, SBEE 法是 SBE 法的进一步仿生化, 可以最大程度的提取活性混合物, 克服水提法的缺点^[1,2]。笔者采用 SBEE 法对半夏白术天麻汤进行了研究, 优选了 SBEE 法提取工艺条件和较佳组合方式, 然后对 4 种方法 (水提法、醇提法、SBE 法、SBEE 法) 提取液的指标成分、提取液指纹图谱进行比较。由于中药发挥药效的物质基础, 可能是中药提取液中的原型成分, 也可能是代谢产物, 对于口服中药而言, 只有那些被吸收入体内的化学成分才可能是真正发挥药效的物质。在以上研究的基础上, 本实验以新西兰大白兔为试验动物, 采用 HPLC 和 UV 两种测试方法, 对 4 种方法提取液的含药血清进行指纹图谱的分析比较。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (美国), G1311A 四元泵, Agilent 1100 LC 色谱工作站, G1315A/BDAD 检测器, G1316A 柱温箱, Agilent 1100LC 在线真空脱气机; UV-2450 紫外可见分光光度仪 (日本岛津); pH S-3C 型精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂); LC5-10B 高速离心机 (北京医用离心机厂); AE240S 电子天平 (瑞士 METTLER); 定量取液器 (上海金林生化试剂仪器厂)。

乙腈色谱纯 (天津四友公司), 其他试剂均为分析纯。新西兰大白兔, 健康未孕, 雌性, 体质量 (2.5 ± 0.1) kg, 购自山东中医药大学实验动物中心, 合格证号: SCXK (鲁) 20080015。

2 方法与结果

2.1 样品液的制备: 由本课题组提供, 浓缩至相当于半夏白术天麻汤处方药材 1.415 g/mL。

2.2 色谱条件: Diamonsil TM (钻石) C₁₈ 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-水 (B), 线性梯度洗脱, 0 → 45 min (A: 5% → 45%), 45 → 60 min (A: 45% → 100%); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 220、250、280 nm; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL。

2.3 不同采血时刻含药血清 HPLC 指纹图谱的测绘^[3]: 取新西兰大白兔, 禁食 12 h 后, 给药, 剂量 22 g/kg, 分别于 0、0.5、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 h 心脏取血, 每次 5 mL, 血液凝固后 3 000 r/min 离心 10 min, 用一次性吸管分离出血清 A。精密吸取血清 2 mL, 按 0.5 mL/mL 血清加入 10% 三氯乙酸沉淀蛋白, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液真空冷冻干燥 1~2 d, 加入乙腈得含药血清 B。分别进样, 即得 3 个检测波长下 0、2.0 h 含药血清指纹图谱, 见图 1。可见保留时间在 10~52 min 空白血清对含药血清的 HPLC 指纹图谱干扰较小, 故只取 10~52 min 色谱峰进行比较。

对每个检测波长下不同时刻的峰总面积和峰个数按公式 $X'_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}_j) / S_j$ 进行标准化处理^[4] (式中 X_{ij} 为不同时刻的峰总面积, $\bar{X}_j$ 为 7 个时刻总面积的平均值, S_j 为不同时刻峰总面积的标准偏差, 即 $S_j = \sqrt{\frac{\sum (X_{ij} - \bar{X}_j)^2}{n-1}}$, X'_{ij} 为标准化后的值), 按照公式 $Y_{220} = (Y_A + Y_n) / 2$ 即得综合评价指标 Y_{220} 值 (Y_{220} 为在 220 nm 检测波长处的特征值; Y_A 为总面积的标准化值; Y_n 为峰个数的标准化值)。不同时刻 3 个检测波长含药血清的色谱峰、总面积及 Y 值见表 1~3。

2.4 不同采血时刻含药血清的紫外光谱测定: 取含药血清 A, 用紫外分光光度仪在 200~700 nm 处, 20~300 min 内全程扫描, 测定吸光度。对不同采血时刻的含药血清吸光度的平均值做标准化处理得特征值 (Y_U)。结果见表 4。

2.5 采血时刻的确定: 为了消除量纲和单位不同带

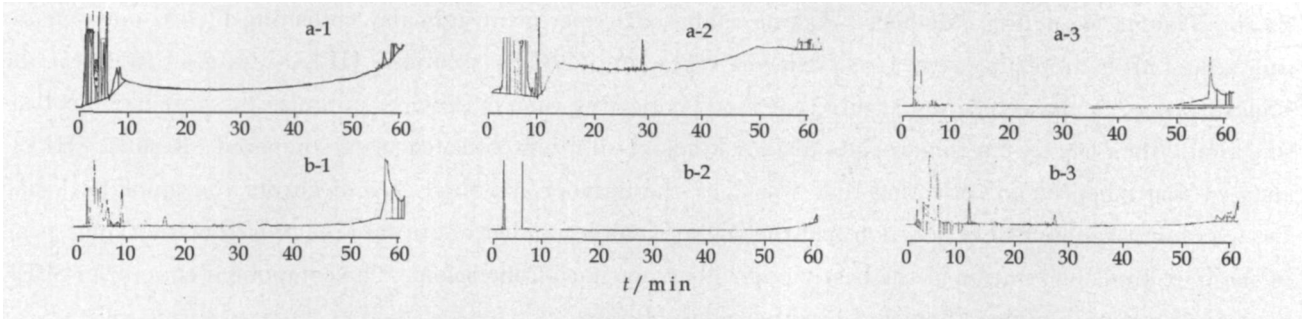


图 1 空白血清(a)在 220 nm(a-1)、250 nm(a-2)、280 nm(a-3)以及半夏白术天麻汤 SBEE-2 h 血清(b)在 220 nm (b-1)、250 nm(b-2)、280 nm(b-3) 的指纹图谱

Fig 1 Fingerprint of blank serum (a) at 220 nm (a-1), 250 nm (a-2), 280 nm (a-3) wavelength, and Banxia Baizhu Tianma Decoction SBEE-2h serum (b) at 220 nm (b-1), 250 nm (b-2), and 280 nm (b-3) wavelength

表 1 SBEE 液不同采血时刻含药血清 HPLC 测定结果(220 nm)

Table 1 Serum fingerprint of SBEE solution at different blood-collecting time by HPLC (220 nm)

峰序	0 5 h		1 5 h		2 0 h		3 0 h		4 0 h		6 0 h		8 0 h	
	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积
1	11.64	706.37	11.65	954.84	11.652	1261.19	11.43	688.79	11.40	504.53	11.28	708.86	11.45	345.53
2	16.25	23.99	16.30	43.55	16.26	45.48	15.96	40.01	15.96	18.71	15.90	27.48	11.79	10.46
3	24.11	14.71	16.92	31.49	16.90	47.47	16.61	24.65	16.74	25.10	16.79	37.57	15.78	123.06
4	26.02	24.96	22.28	16.45	18.23	20.95	24.19	14.33	25.17	13.39	22.11	13.96	16.80	20.69
5	26.89	356.75	24.11	17.56	20.68	13.67	24.83	20.79	26.49	962.96	24.20	20.30	22.73	19.71
6	27.39	12.81	25.02	28.10	22.28	21.37	25.18	14.05	27.55	30.51	25.10	22.81	26.62	249.99
7	51.26	67.80	25.46	12.77	24.15	21.08	26.49	211.92	51.05	18.81	26.38	1311.12	27.94	19.11
8			26.04	29.09	25.02	34.08	27.57	16.97			27.57	25.63		
9			26.94	349.59	25.48	17.66								
10			27.40	16.46	26.03	31.15								
11			51.25	47.14	26.93	368.40								
12					27.43	12.22								
总面积	1 207.39		1 547.05		1 894.72		1 031.52		1 574.00		2 167.73		788.56	
峰个数	7.00		11.00		12.00		8.00		7.00		8.00		7.00	
<i>Y_A</i>	- 0.518 7		0.182 3		0.899 8		- 0.881 6		0.237 9		1.463 3		- 1.383 1	
<i>Y_n</i>	- 0.759 1		1.173 1		1.656 2		- 0.276 0		- 0.759 1		- 0.276 0		- 0.759 1	
<i>Y₂₂₀</i>	- 0.638 9		0.677 7		1.278 0		- 0.578 8		- 0.260 6		0.593 6		- 1.071 1	

表 2 SBEE 液不同采血时刻含药血清 HPLC 测定结果(250 nm)

Table 2 Serum fingerprint of SBEE solution at different blood-collecting time by HPLC (250 nm)

峰序	0 5 h		1 5 h		2 0 h		3 0 h		4 0 h		6 0 h		8 0 h	
	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积	<i>t_R</i> /min	峰面积
1	11.63	46.66	11.65	63.57	10.28	5.00	11.43	45.23	11.40	34.57	11.28	51.15	11.45	23.62
2	12.67	58.42	12.70	79.48	11.65	81.98	12.40	62.03	12.44	52.09	11.88	41.36	14.12	36.01
3	16.16	74.51	16.22	121.23	12.64	90.57	15.87	94.93	15.96	51.14	15.91	55.57	16.24	22.40
4	25.03	16.09	25.01	16.70	16.19	130.74	24.86	12.98	26.49	52.29	26.38	76.13	26.62	14.79
5	26.90	24.43	26.95	24.77	20.74	3.05	26.50	11.72	51.06	15.96			45.01	14.93
6	51.27	14.72	51.27	9.81	25.07	20.00								
7					25.97	5.73								
8					26.92	27.77								
9					34.09	3.13								
10					45.06	7.15								
11					51.28	4.01								
总面积	234.83		315.56		379.14		226.89		206.05		225.21		111.76	
峰个数	6.00		6.00		11		5		5.00		4.00		5.00	
<i>Y_A</i>	- 0.093 8		0.859 4		1.610 2		- 0.187 6		- 0.433 7		- 0.207 4		- 1.547 1	
<i>Y_n</i>	0.00		0.00		2.165 1		- 0.433 0		- 0.433 0		- 0.866 0		- 0.433 0	
<i>Y₂₅₀</i>	- 0.046 9		0.429 7		1.887 6		- 0.310 3		- 0.433 3		- 0.546 7		- 0.990 0	

表 3 SBEE 液不同采血时刻含药血清 HPLC 测定结果(280 nm)

Table 3 Serum fingerprint of SBEE solution at different blood-collecting time by HPLC (280 nm)

峰 序	0.5 h		1.5 h		2.0 h		3.0 h		4.0 h		6.0 h		8.0 h	
	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积
1	11.634	115.67	11.64	157.75	10.08	2.47	11.43	113.70	11.40	83.15	11.28	119.58	11.28	121.12
2	16.13	20.80	12.77	18.05	11.65	196.89	15.94	21.28	16.00	12.93	15.85	15.91	15.85	15.93
3	22.28	5.76	16.27	27.29	12.68	21.55	21.88	6.20	21.87	5.59	16.76	7.99	21.73	6.45
4	26.89	71.79	22.33	6.25	16.24	29.97	25.18	3.89	26.49	184.58	21.74	6.46	26.38	258.36
5	51.27	7.05	25.47	4.59	16.90	10.79	26.50	36.55	51.06	9.31	26.38	259.06		
6			26.47	4.90	22.32	7.47								
7			26.94	69.96	25.47	5.39								
8			51.28	4.35	25.97	3.38								
9					26.93	73.52								
10					51.27	2.01								
总面积	221.07		293.13		353.46		181.60		295.56		409.00		401.86	
峰个数	5		8		10		5		5		5		4	
Y_A	-1.0034		-0.1712		0.5255		-1.4592		-0.1431		1.1669		1.0845	
Y_n	-0.4629		0.9258		1.8516		-0.4629		-0.4629		-0.4629		-0.9258	
Y_{280}	-0.7332		0.3773		1.1886		-0.9611		-0.3030		0.3520		0.0793	

表 4 SBEE 液不同采血时刻含药血清吸光度测定结果

Table 4 Serum fingerprint of SBEE solution at different blood-collecting time by absorbance

峰 序	0.5 h		1.5 h		2.0 h		3.0 h		4.0 h		6.0 h		8.0 h	
	nm	A	nm	A	nm	A	nm	A	nm	A	nm	A	nm	A
1	576	-0.069	576	-0.036	576	0.051	576	0.032	576	0.071	576	0.030	576	0.072
2	541	-0.073	540	-0.037	541	0.062	541	0.019	541	0.061	541	0.023	541	0.061
3	413	0.392	413	0.696	414	1.720	414	1.270	414	1.530	414	1.103	421	0.404
4	214	1.335	283	2.445	280	3.045	281	3.024	281	2.603	283	1.996	345	0.141
5					271	2.963	265	3.035					204	0.991
6					265	2.973	256	2.994						
7					250	2.927	248	2.996						
$\bar{X}$		0.396		0.767		1.963		1.910		1.066		0.788		0.334
Y_U		-0.9551		-0.3979		1.3982		1.3186		0.0511		-0.3664		-1.0483

来的影响,将指纹图谱的总峰面积和峰的个数进行标准化处理,再按照关系式 $Y = (Y_A + Y_n) / 2$ 加权求和,得 3 个检测波长的 HPLC 血清指纹图谱的标准化值 Y_{200} 、 Y_{250} 、 Y_{280} ,将紫外吸光度的平均值进行标准化处理得标准化值 Y_U ,再按照关系式 $Y_{\text{总}} = (Y_{200} + Y_{250} + Y_{280} + Y_U) / 4$ 加权求和后的得 $Y_{\text{总}}$ 。根据 $Y_{\text{总}}$ 的大小确定较佳取血时间。结果显示不同取血时刻的含药血清指纹图谱 $Y_{\text{总}}$ 有明显差异,以 2 h 的 $Y_{\text{总}}$ 最大,故较佳采血时刻确定为给药后 2 h。见表 5。

表 5 不同采血时刻各指标标准化值及综合评价

Table 5 Standardized value and comprehensive evaluation value of each index at different blood-collecting time

时间/h	Y_{200}	Y_{250}	Y_{280}	Y_U	$Y_{\text{总}}$
0.5	-0.6389	-0.0469	-0.7332	-0.9551	-0.5935
1.5	0.6777	0.4297	0.3773	-0.3979	0.2717
2.0	1.2780	1.8876	1.1886	1.3982	1.4381
3.0	-0.5788	-0.3103	-0.9611	1.3186	-0.1329
4.0	-0.2606	-0.4333	-0.3030	0.0511	-0.23645
6.0	0.5936	-0.5367	0.3520	-0.3664	0.0106
8.0	-1.0711	-0.9900	0.0793	-1.0483	-0.7575

2.6 4 种方法提取液含药血清 HPLC 指纹图谱的比较:取新西兰大白兔,禁食 12 h 后,用 SBEE 液、SBE 液、水提(WE)液、醇提(AE)液,ig 给药,剂量为 22 g 生药/kg 体质量,药后 2 h,心脏取血 5 mL,制备含药血清 A、B,测定,结果见表 6~8。结果 3 个检测波长下均以 SBEE 液的 Y 值最大。

2.7 4 种方法提取液含药血清紫外吸光度的比较:取含药血清 A,用紫外分光光度仪在 200~700 nm 处全程扫描,测定吸光度。对不同提取液的含药血清吸光度的平均值做标准化处理得特征值(Y_U)。结果 SBEE 液的 Y_U 最大,见表 9。

结果显示,不同方法提取液的含药血清指纹图谱 $Y_{\text{总}}$ 有明显差异,以 SBEE 液的 $Y_{\text{总}}$ 最大,大小顺序为 $Y_{\text{SBEE}} > Y_{\text{WE}} > Y_{\text{SBE}} > Y_{\text{AE}}$ 。进一步验证了半夏白术天麻汤用 SBEE 法提取与其他 3 种方法相比较为佳。见表 10。

3 讨论

实验用 HPLC 法和 UV 法对半夏白术天麻汤的 4 种方法提取液(SBEE 法、SBE 法、WE 法、AE

表 6 4 种方法提取液含药血清 HPLC 测定结果(220 nm)

Table 6 Serum fingerprint of four kinds of extracting solution by HPLC (220 nm)

峰 序	SBEE 法		SBE 法		WE 法		AE 法	
	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积
1	11.65	1 261.19	11.75	353.78	11.75	21.47	11.68	92.77
2	16.26	45.48	15.60	4.53	16.10	117.07	15.99	53.65
3	16.90	47.47	16.09	49.55	22.23	3.04	22.05	43.90
4	18.23	20.95	22.24	2.22	24.04	9.20	25.45	9.63
5	20.68	13.67	23.99	9.67	24.29	5.42	26.99	447.47
6	22.28	21.37	25.48	5.57	25.53	6.60	31.78	13.48
7	24.15	21.08	25.91	12.67	27.11	888.86		
8	25.02	34.08	27.10	1 400.44	28.69	7.21		
9	25.48	17.66	28.69	6.44	32.66	5.61		
10	26.03	31.15	31.85	3.58				
11	26.93	368.40						
12	27.43	12.22						
总面积		1 894.72		1 848.46		1 064.50		660.90
峰个数		12.00		10.00		9.00		6.00
Y_A		0.871 1		0.794 7		- 0.499 7		- 1.166 1
Y_n		1.100		0.300		- 0.100		- 1.300
Y_{220}		0.985 6		0.547 4		- 0.299 9		- 1.233 1

表 7 4 种方法提取液含药血清 HPLC 测定结果(250 nm)

Table 7 Serum fingerprint of four kinds of extracting solution by HPLC (250 nm)

峰 序	SBEE 法		SBE 法		WE 法		AE 法	
	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积
1	10.28	5.00	9.21	29.77	9.30	7.22	12.05	70.65
2	11.65	81.98	11.75	26.25	9.94	10.23	16.06	120.61
3	12.64	90.57	12.10	21.26	12.17	197.62	25.04	5.02
4	16.19	130.74	16.25	92.21	16.16	182.72	26.99	65.42
5	20.74	3.05	25.09	7.85	25.09	12.92	44.67	17.46
6	25.07	20.00	27.10	73.16	27.12	48.23	50.48	23.51
7	25.97	5.73	45.00	11.01	44.96	8.36	51.28	26.16
8	26.92	27.77			51.30	4.89		
9	34.09	3.13						
10	45.06	7.15						
11	51.28	4.01						
总面积		379.14		261.51		472.20		328.84
峰个数		11		7		8		7
Y_A		0.210 9		- 1.114 6		1.259 6		- 0.355 9
Y_n		1.452 7		- 0.660 3		- 0.132 1		- 0.660 3
Y_{250}		0.831 8		- 0.887 5		0.563 8		- 0.508 1

表 8 4 种方法提取液含药血清 HPLC 测定结果(280 nm)

Table 8 Serum fingerprint of four kinds of extracting solution by HPLC (280 nm)

峰 序	SBEE 法		SBE 法		WE 法		AE 法	
	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积	t_R/min	峰面积
1	10.08	2.47	9.22	4.99	9.30	3.10	11.69	19.38
2	11.65	196.89	11.75	56.53	11.75	37.95	12.07	18.68
3	12.68	21.55	16.27	20.98	12.16	46.75	16.10	30.21
4	16.24	29.97	27.10	273.63	16.17	48.29	22.07	12.72
5	16.90	10.79	51.30	3.11	22.53	2.33	26.99	80.07
6	22.32	7.47			27.11	165.79	50.47	6.17
7	25.47	5.39			51.29	2.09	51.28	4.86
8	25.97	3.38						
9	26.93	73.52						
10	51.27	2.01						
总面积		353.46		359.23		306.30		172.09
峰个数		10		5		7		7
Y_A		0.639 6		0.705 8		0.098 0		- 1.443 3
Y_n		1.333 9		- 1.091 4		- 0.121 3		- 0.121 3
Y_{280}		0.986 7		- 0.192 8		- 0.011 7		- 0.782 3

表9 4种方法提取液含药血清吸光度测定结果

Table 9 Serum fingerprint of four kinds of extracting solution by absorbance

峰序	SBEE 法		SBE 法		WE 法		AE 法	
	nm	A	nm	A	nm	A	nm	A
1	576.0	0.051	576.0	0.053	576.0	0.057	576.0	0.055
2	541.0	0.062	540.0	0.059	542.0	0.078	541.0	0.078
3	414.1	0.720	413.2	0.480	414.1	0.630	280.2	0.050
4	280.3	0.045	280.3	0.120	281.2	0.580	272.1	0.930
5	271.2	0.963	270.3	0.070	271.2	0.350	265.2	0.450
6	265.2	0.973	265.2	0.270	265.3	0.010	251.2	0.530
7	250.2	0.927	250.2	0.030	250.3	0.680		
8			204.1	0.298				
$\bar{X}$		1.963		1.798		1.874		1.489
Y_U		0.8834		0.0825		0.4514		-1.4174

表10 4种方法提取液血清指纹图谱标准化值

Table 10 Standardized value of serum fingerprint in four kinds of extracting solution

方 法	Y_{200}	Y_{250}	Y_{280}	Y_U	$Y_{总}$
SBEE	0.9856	0.8318	0.9867	0.8834	0.9219
SBE	0.5474	-0.8875	-0.1928	0.0825	-0.1126
WE	-0.2999	0.5638	-0.0117	0.4514	0.1759
AE	-1.2331	-0.5081	-0.7823	-1.4174	-0.9852

法)的血清指纹图谱进行研究比较,对指纹图谱峰面积和个数以及紫外吸收度进行了标准化处理,加权求和后得标准化值,结果以新西兰兔用药后2h含药血清的指纹图谱的综合Y值最大,4种方法提取液给药后2h含药血清的综合Y值,以SBEE液最大,进一步说明半夏白术天麻汤用SBEE法提取较其他3种提取方法优越。

通过DAD检测器和紫外全波长扫描,该样品在220、250、280 nm处有较强吸收,故分析这3个检

测波长下的血清指纹图谱。

4种方法提取液220 nm处含药血清HPLC指纹图谱的标准化值Y的大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{SBE} > Y_{WE} > Y_{AE}$;250 nm处的标准化值Y的大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{WE} > Y_{SBE} > Y_{AE}$;280 nm处的标准化值Y的大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{WE} > Y_{SBE} > Y_{AE}$ (WE和SBE的Y值无显著性差异, $P > 0.05$);吸光度的标准化值Y的大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{WE} > Y_{SBE} > Y_{AE}$;4种方法提取液血清指纹图谱的综合Y值大小顺序为: $Y_{SBEE} > Y_{WE} > Y_{SBE} > Y_{AE}$ 。说明SBE液中吸收短波长的成分较多,WE液吸收较长波长的成分较多。SBEE液无论短波长还是长波长,均有较强吸收,说明SBEE液中成分的数量和种类多于其他3种提取液,能较大程度的提取活性混合成分。

不同的分析方法只能检测到相应结构的成分,应该使用多种分析方法,多角度分析验证。这个问题有待继续研究探讨。对于指纹图谱中各个峰位所对应的成分的确定也有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 王淑玲,孙秀梅,张兆旺,等.半夏白术天麻汤4种方法提取液指纹图谱比较[J].杭州师范大学学报:自然科学版,2010,9(2):127-134
- [2] 王淑玲,张兆旺,孙秀梅,等.半仿生-酶法提取的半夏白术天麻汤中甘草次酸的含量测定[J].承德医学院学报,2008,25(2):119-120
- [3] 李小娜,王巧,张国华,等.山茱萸提取液指纹图谱及其不同有效部位的血清指纹图谱研究[J].中华中医药杂志,2006,21(10):617-619
- [4] 孙秀梅,张兆旺,郭婕,等.黄精不同炮制品半仿生提取液与水提取液成分的比较[J].中草药,2007,38(11):1648-1651

正交试验优选人参中人参皂苷 R_{g1} 的酶解工艺研究

赵啸虎¹,张红梅³,杨金崑¹,郭建鹏^{1,2*}

(1 延边大学药学院,吉林 延吉 133000;2 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室,吉林 延吉 133002;
3 长春市人民医院 药剂科,吉林 长春 130000)

摘要:目的 优化酶解法提取人参皂苷 R_{g1} 的工艺条件。方法 采用高效液相色谱法为测定方法,以人参皂苷 R_{g1} 提取率为指标,通过正交设计试验进行优选。结果 纤维素酶酶解为最优方法,且酶用量、酶解时间、酶解温度对人参皂苷 R_{g1} 提取率有显著性影响;提取人参皂苷 R_{g1} 的最佳工艺条件为:纤维素酶用量为1.4%,酶解60 min,酶解温度为45℃。结论 优化后的提取工艺简单、稳定、提取率高。

关键词:人参;人参皂苷 R_{g1} ;正交设计;酶解;高效液相色谱

中图分类号:R286.02 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)08-1279-04

* 收稿日期:2009-10-12

基金项目:吉林省中医药管理局中医药科技资助项目(08SYS-102)

作者简介:赵啸虎(1984—),男,硕士研究生,研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: xiaohu2062@tom.com

* 通讯作者 郭建鹏 T el: (0433) 2660607 E-mail: gjp807@ybu.edu.cn