

饮片炮制 甘遂不同炮制品中二萜类成分的变化研究

李征军, 李 媛, 高 兰, 丁安伟, 张 丽*

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘要: 目的 比较甘遂炮制前后各炮制品中二萜类成分甘遂萜酯 B 和甘遂萜酯 A 含有量的变化, 以期揭示上述成分与甘遂醋炙减毒作用的关联性。方法 采用 HPLC 法测定甘遂各炮制品中二萜类成分甘遂萜酯 A、甘遂萜酯 B, 以 X Terre RP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm) 为固定相; 流动相为甲醇(A)-水(B) 二元梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 235 nm, 柱温 38 ℃。结果 假白榄烷型二萜类成分甘遂萜酯 A 和甘遂萜酯 B 经炮制后均有所降低, 其质量分数高低顺序为生品>清炒品>醋润品>醋炙品。结论 甘遂醋炙前后甘遂萜酯 A 与甘遂萜酯 B 的含有量变化与甘遂醋炙减毒有一定的关联性。

关键词: 甘遂萜酯 B; 甘遂萜酯 A; 二萜; 甘遂; 醋甘遂

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 1001-528(2011) 12-2122-04

Change of diterpenoids in different processed products of *Euphorbia kansui*

LI Zheng-jun, LI Yuan, GAO Lan, DING An-wei, ZHANG Li*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT: **AIM** To compare the contents change of kansuine B and kansuine A in *Kansui Radix* before and after being processed with vinegar, and to reveal the correlation between the composition and detoxication of *Kansui Radix* stir-frying with vinegar. **METHODS** HPLC was used to detect the contents of kansuine B and kansuine A with X Terre RP C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase was gradient eluant of methanol and H₂O with the flow rate 1.0 mL/min, and the detection wavelength was set at 235 nm and with column temperature of 38 ℃. **RESULTS** The contents of kansuine A and kansuine B decreased after being pro-

收稿日期: 2011-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30973940); 江苏政府留学奖学金资助(JS-2009-061); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSXX-2010)

作者简介: 李征军, 硕士生, 研究方向: 中药炮制。Tel: 15250980738, E-mail: lizhengjun404@126.com

*** 通信作者:** 张 丽(1971—), 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药炮制与质量控制。Tel: (025) 85811519, E-mail: zhangli@njutcm.edu.cn

- [2] Cao J X, Zhang Q Y, Cui S Y, et al. Hypnotic effect of jujubosides from *Ziziphi spinosae Semen* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 163-166.
- [3] You Z L, Xia Q, Liang F R, et al. Effects on the expression of GABAA receptor subunits by jujuboside A treatment in rat hippocampal neurons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 419-423.
- [4] 陈百泉, 杜钢军, 许启泰. 酸枣仁皂苷的镇静催眠作用 [J]. *中草药*, 2002, 25(6): 429-430.
- [5] Yogeeswari P, Stritam D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(6): 657-666.
- [6] 陈 子, 吴秋玲, 陈 燕, 等. 白桦脂酸对人 Raji 淋巴瘤细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(4): 556-559.
- [7] Wang L E, Cui X Y, Cui S Y, et al. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Ziziphi spinosae Semen*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT_{1A} receptors [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(6): 404-409.
- [8] Peng W H, Hsieh M T, Lee Y S, et al. Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse models of anxiety [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(3): 435-441.
- [9] Zeng W Z, Bai Y J, Zhang Q Y, et al. Chromatographic fingerprint analysis of *Ziziphi spinosae Semen* by HPLC-DAD Method [J]. *Anal Lett*, 2009, 42(2): 205-215.
- [10] Zhao J, Li S P, Yang F Q, et al. Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujuba* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1108(2): 188-194.

cessed with vinegar, their contents from high to low was as follows: the crude *Kansui Radix*, simple stir-frying *Kansui Radix*, *Kansui Radix* infiltrated with vinegar, *Kansui Radix* stir-frying with vinegar. **CONCLUSION** The contents change of kansuine A and kansuine B may point out that there is a certain correlation between terpenoids contents and detoxication of vinegar-preparation.

KEY WORDS: kansuine B; kansuine A; diterpenoids; *Kansui Radix*; *Kansui Radix* stir-frying with vinegar

甘遂为大戟科大戟属植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根^[1], 具有泻水逐饮的功效。其味苦, 性寒, 有毒, 生品仅限外用, 内服必须炮制。历版中国药典均采用醋炙来降低甘遂毒性, 但有关其醋炙减毒的物质基础研究报道相对较少。研究表明, 甘遂中的二萜类成分为其毒效部位^[2-4], 其中的假白榄烷型二萜类成分甘遂萜酯 A 和甘遂萜酯 B 除具有一定的抗癌^[5]及镇痛作用^[6-7]外, 尚具有一定的致炎毒性^[8-9], 因此, 本实验以假白榄烷型二萜类成分甘遂萜酯 B 和甘遂萜酯 A 为指标, 考察甘遂醋炙各操作程序对上述二萜类成分的影响, 以期揭示上述成分与甘遂醋炙减毒作用的关联性。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 515 高效液相色谱仪配 Waters 2996DAD 检测器, Waters 717 自动进样器, Empower 色谱工作站(美国沃特斯公司), AY220 型电子天平(精确到 0.1 mg)、Sartorius BP211D 型电子天平(精确到 0.01 mg), 高速万能粉碎机(天津泰斯特)。

1.2 试药 甘遂药材采自陕西宝鸡赤沙乡, 经南京中医药大学王春根教授鉴定为大戟科 Euphorbiaceae 植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根。甘遂生品(取生甘遂数个, 大小分档, 打粉); 甘遂清炒品(取生甘遂数个, 将炒锅加热到

260 ℃ 左右, 不断翻炒, 9 min 后出锅, 放凉, 打粉); 甘遂醋润品(取生甘遂数个, 大小分档, 加醋拌匀, 闷透, 待醋被吸尽后, 晾干, 打粉); 甘遂醋炙品(取生甘遂数个, 大小分档后, 用 30 % 量米醋拌匀, 闷透, 待醋被充分吸尽后, 晾干, 置已加热到 260 ℃ 的炒锅中, 不断翻炒, 9 min 后取出, 放凉, 打粉)。

对照品甘遂萜酯 B(自制, 纯度经 HPLC 归一化法测定为 98.35%) 和甘遂萜酯 A(自制, 纯度经 HPLC 归一化法测定为 98.28%), 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 X Terre RP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 甲醇(A)-水(B)二元梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 235 nm; 柱温 38 ℃; 进样量 20 μL。梯度流程见表 1, 色谱图见图 1。

表 1
Tab. 1 流动相梯度洗脱表
The gradient elution

时间/min	甲醇/%	水/%
0	57	43
23	57	43
28	95	5
37	95	5
42	57	43
48	57	43

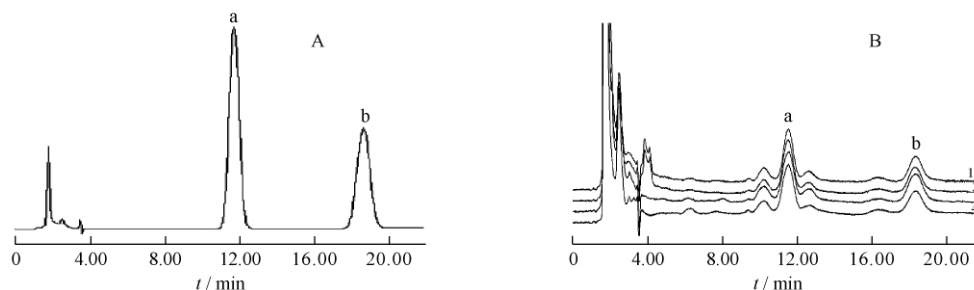


图 1 甘遂萜酯 B 和甘遂萜酯 A 混合对照品与各样品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of kansuine B, kansuine A and samples

A. 甘遂萜酯 B 和甘遂萜酯 A 对照品 B. 甘遂各样品 1. 甘遂醋润品 2. 甘遂醋炙品 3. 甘遂生品 4. 甘遂清炒品 a. 甘遂萜酯 B b. 甘遂萜酯 A

A. mixed standards B. samples 1. *Kansui Radix* infiltrated with vinegar 2. *Kansui Radix* stir-baked with vinegar 3. the crude *Kansui Radix* 4. *Kansui Radix* stir-baked a. kansuine B b. kansuine A

2.2 对照品溶液的制备 取 50 °C 减压干燥至恒定质量的甘遂萜酯 B、甘遂萜酯 A 各约 10 mg,精密称定,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,得质量浓度为 1.056 mg/mL 的甘遂萜酯 B、1.078 mg/mL 的甘遂萜酯 A 对照品贮备液。再分别精密吸取上述对照品贮备液适量,加甲醇制成每 1 mL 分别含甘遂萜酯 B 为 0.211 2 mg,甘遂萜酯 A 为 0.215 6 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取甘遂各炮制品中粉(过 65 目筛)约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz) 30 min,再次称定,以甲醇补足损失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取上述混合对照品溶液 4、8、16、24、32、40 μ L,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰面积 Y 为纵坐标,对照品浓度 X 为横坐标,绘制标准曲线。得甘遂萜酯 B 回归方程: $Y = 136\ 351.657X - 68\ 482.043\ 8$ ($r = 0.999\ 5$);甘遂萜酯 A 回归方程为 $Y = 84\ 086.871\ 3X - 47\ 055.175\ 34$ ($r = 0.999\ 5$)。结果表明甘遂萜酯 B 在 0.844 8 ~ 8.448 μ g 范围内呈良好的线性关系;甘遂萜酯 A 在 0.862 4 ~ 8.624 μ g 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度考察 精密吸取混合对照品溶液 8

μ L,重复进样 6 次,按 2.1 项下色谱条件,测定峰面积,结果甘遂萜酯 B、甘遂萜酯 A 的 RSD 分别为 2.6% 和 2.8%,表明本法精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取甘遂醋炙品约 0.5 g,平行 6 份,按照 2.3 项方法制备供试品溶液,依法测定,得甘遂醋炙品中甘遂萜酯 B 和甘遂萜酯 A 的 RSD 分别为 2.3% 和 1.9%。结果表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一甘遂醋炙品供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 进样 20 μ L 测定,得甘遂萜酯 B 与甘遂萜酯 A 峰面积的 RSD 分别为 0.4% 和 0.7%。表明供试液中甘遂萜酯 B 与甘遂萜酯 A 在 8 h 内稳定性较好。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含有量的醋炙甘遂粉末 6 份,每份 0.25 g,精密加入 1 mL 混合对照品溶液,按 2.3 项制成供试品溶液,依法测定,计算回收率。得甘遂萜酯 B 的加样回收率为 100.2%,RSD 为 0.9%;甘遂萜酯 A 的加样回收率为 102.7%,RSD 为 0.6%。

2.9 样品测定 取甘遂各炮制品,按 2.3 项下供试品溶液的制备方法依法制备,以平均峰面积,采用标准曲线法利用回归方程计算甘遂萜酯 A 和甘遂萜酯 B 的量,测定结果见表 2。

表 2 甘遂各不同炮制品中甘遂萜酯 B 和甘遂萜酯 A 测定结果 ($n = 3$)

Tab. 2 Determination of kansuininA and kansuinin B in different processed products of *Euphorbia kansui* ($n = 3$)

炮制品	KB /(mg/g)	KB 平均量 /(mg/g)	RSD/%	KA /(mg/g)	KB 平均量 /(mg/g)	RSD/%
生品	0.836 6	0.827 2	1.40	0.921 3	0.917 1	1.54
	0.814 3			0.910 3		
	0.830 6			0.919 7		
	0.764 6			0.837 6		
加热品	0.781 2	0.780 7	2.04	0.862 6	0.857 2	0.64
	0.796 4			0.871 3		
	0.778 1			0.806 1		
	0.752 9			0.802 7		
醋润品	0.767 5	0.766 2	1.65	0.805 9	0.804 9	0.24
	0.688 0			0.762 3		
	0.714 5			0.793 8		
	0.706 1			0.784 8		

3 讨论

实验结果表明,假白榄烷型二萜类成分甘遂萜酯 A 和甘遂萜酯 B 经炮制后含有量均有所降低,其高低顺序均为:生品 > 清炒品 > 醋润品 > 醋炙品,结合甘遂萜酯 A 和甘遂萜酯 B 的致炎毒性,推测甘遂醋炙前后二萜类成分的质量分数变化与甘遂醋炙减毒有一定关联性。

甘遂因其毒性,所以历代及历版中国药典均炮制以降低其毒性,亦有醋炙工艺的相关文献^[4]及醋炙减毒机理的初步探讨^[1],但其炮制减毒机制迄今尚未完全清晰。文献研究表明^[12-13],甘遂醋炙前后化学成分有所变化,但相关变化成分的具体量变尚不十分清晰,本实验通过对甘遂各炮制品中假白榄烷型二萜类成分甘遂萜酯 A 和甘遂萜酯 B 炮制前

后量的差异分析,考察了甘遂醋炙过程中清炒和醋润两个炮制程序对其所含假白榄烷型二萜类成分的影响,实验结果表明清炒和醋润两个炮制程序均会引起二萜类成分甘遂萜酯 A 和甘遂萜酯 B 含有量的降低,二者在甘遂醋炙过程中可能起一定的协同作用,上述实验结果为后续甘遂醋炙减毒物质基础的深入研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 81.
- [2] 郑维发. 甘遂提取物抗病毒活性成分及其毒性研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 1998.
- [3] 王立岩. 甘遂的化学成分及其生物活性的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2003.
- [4] 程显隆, 刘军玲, 肖新月, 等. 甘遂药材有毒成分、有效成分及其质量控制标准研究现状 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(3): 6-11.
- [5] Chang Jongsun, Lee Seungwoong, Park Mihye, et al. Kansuine A and kansuine B from *Euphorbia kansui* L. Inhibit IL-6-induced Stat3 Activation [J]. *Planta Med*, 2010, 76(14): 1544-1549.

- [6] Uemura D, Hirata Y. The structure of kansuine A, a new multi-oxygenated diterpene from *Euphorbia kansui* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1975(21): 1697-1700.
- [7] Uemura D, Katayama C, U no E, et al. Kansuine B, a novel multi-oxygenated diterpene from *Euphorbia kansui* Liou [J]. *Tetrahedron Lett*, 1975(21): 1703-1706.
- [8] Shu Xiaoyun, Yu Li, Tang Yuping, et al. Bioassay-guided separation of the proinflammatory constituents from the roots of *Euphorbia kansui* [J]. *J Nat Med*, 2010, 64(1): 98-103.
- [9] Zhang Li, Shu Xiaoyun, Ding Anwei, et al. LC-DAD-ESI-MS-MS separation and chemical characterization of the inflammatory fraction of the roots of *Euphorbia kansui* [J]. *Chromatographia*, 2009, 70(5/6): 805-810.
- [10] 张 丽, 束晓云, 唐于平, 等. 醋甘遂饮片炮制工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 681-684.
- [11] 颜晓静, 李 璘, 李征军, 等. 甘遂醋炙前后对脾淋巴细胞活性和巨噬细胞释放 NO 的量效关系比较研究 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 629-631.
- [12] 任树林, 张楠楠, 刘竹兰, 等. 甘遂炮制前后整体化学成分变化的研究 [J]. 中药材, 2007, 30(6): 639-640.
- [13] 修彦凤, 吴 强, 王海颖, 等. HPLC-ELSD 指纹谱法研究甘遂炮制前后成分差异 [J]. 中成药, 2009, 31(2): 249-252.

HPLC 法测定茜草及不同炮制品中大叶茜草素

杨宇婷, 康文艺*

(河南大学中药研究所, 河南 开封 475004)

摘要: 目的 测定茜草及炮制品中大叶茜草素。方法 Purospher STAR RP-18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-四氢呋喃(90:9.3:0.7); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 250 nm; 柱温 25 ℃。结果 茜草生品中大叶茜草素的质量分数为 0.52%, 炒茜草为 1.07%, 茜草炭为 0.66%。结论 不同的炮制方法对大叶茜草素的量产生不同的影响。

关键词: HPLC; 茜草; 炮制; 大叶茜草素

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)12-2125-03

Determination of rubimaillin contents in *Rubia Cordifolia* L and different processed products by HPLC

YANG Yu-ting, KANG Wen-yi*

(Institute of Chinese Materia Medica, Henan University, Kaifeng 475004, China)

KEY WORDS: HPLC; *Rubia cordifolia* L.; processing; rubimaillin

收稿日期: 2011-05-12

基金项目: 河南省科技厅重点项目(102102310019)

作者简介: 杨宇婷(1987—), 女, 硕士生, 研究方向: 中药化学与质量分析。Tel: 15993336807, E-mail: beautyting324@126.com

* 通信作者: 康文艺, 副教授。Tel: (0378) 3880680, E-mail: kangwenyi@hotmail.com