

应用红外光谱技术研究中药水蛭的炮制过程

李冰宁^{1,2}, 武彦文^{2*}, 欧阳杰¹, 孙素琴³, 陈舜琮²

- 1 北京林业大学生物科学与技术学院食品科学与工程系, 北京 100083
- 2 北京市理化分析测试中心, 北京 100089
- 3 清华大学化学系生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084

摘要 考察水蛭炮制前后化学成分产生的变化, 文章采用红外光谱(FTIR)二维相关红外谱图(2D-IR)对中药水蛭鲜品和制品进行了研究。结果表明: 水蛭具有明显的酰胺I和II带蛋白质特征峰, 其中鲜品的酰胺II带吸收峰在 1543 cm^{-1} , 而生品和炮制品的向低频位移至 1535 cm^{-1} ; 采用热微扰模拟水蛭炮制过程并分析水蛭的2D-IR, 结果显示水蛭鲜品中的酰胺I带与酰胺II带的自动峰的强度比炮制品的更为显著。说明水蛭在炮制过程中蛋白质的空间构象破损、氢键断裂, 导致变性失活, 部分脂肪酸和甾醇类组分在炮制中发生氧化分解。

关键词 水蛭; 炮制; 蛋白; 红外光谱; 二维相关谱

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)04-0979-04

引言

药典记载水蛭为水蛭科动物蚂蝗(*Whitmania pigra* Whitman)、水蛭(*Hirudo nipponica* Whitman)或柳叶蚂蝗(*Whitmania acranulata* Whitman)的干燥全体^[1]。其药性咸、苦、平; 有小毒, 归肝经; 具有破血、逐瘀、通经的功效, 用于血瘀经闭, 中风偏瘫, 跌打损伤等病症。国内外对水蛭的药理学研究及临床观察表明: 水蛭具有改善血液流变学、祛瘀、抗栓、降血脂等作用^[2]。近年发现水蛭制剂在防治心脑血管疾病和抗癌方面具有特效^[3]。水蛭作为传统的活血化瘀中药在临床上应用广泛已有2000余年的历史, 古人认为其生命力强, 恐入腹生子为害, 所以传统入药方式为经滑石粉烫制后方可入药, 也是现代药典规定的方法。炮制的目的主要是矫味、杀死虫卵, 便于保管和服用, 并能降低毒性, 增强散瘀作用^[4]。但自20世纪20年代起, 张锡纯先生主张水蛭生用, 他在《医学衷中参西录》中指出“此品纯系水蛭精华生成, 故最宜生用, 甚至忌火炙”^[5]。当代也有许多报道认为水蛭生用力专效宏, 制后效减^[6]。随着科学技术的发展, 水蛭的除味、粉碎、保藏等问题已经很容易解决。因此, 水蛭的炮制前后其成分发生了什么变化, 炮制是否科学合理成为人们研究的热点。

红外光谱法是鉴别化合物和确定物质结构的常用手段之一。红外光谱的优势在于无损、快速、重现性好等, 红外光谱能够提供单体化合物的丰富信息, 不同物质具有特征的红外光谱图, 传统上用于单体化合物的鉴定。而对于复杂的天然混合物体系, 其红外谱图中的峰位、峰形和峰强代表着整个体系中所含成分中相同或不同基团的谱峰叠加; 混合物组成的改变直接影响到整体谱图的变化, 由此构成了红外谱图的宏观指纹性^[7]。近年来, 已有研究表明, 红外光谱可以反映复杂混合物体系的化学成分变化和差别, 利用红外光谱可以对混合物进行真伪优劣鉴别, 炮制和配伍规律的研究等^[8,9]。本文为了研究中药水蛭炮制过程中蛋白质发生的变化, 通过比较水蛭炮制前后的红外谱图差异, 并结合热微扰的二维相关光谱模拟水蛭的炮制过程, 从而阐明水蛭主要组分在炮制过程中发生的一系列变化。

1 实验部分

1.1 样品

中药水蛭之蚂蝗(*Whitmania pigra* Whitman)购自江苏宿迁; 水蛭鲜品: 水蛭活体, 匀浆后冷冻干燥; 水蛭生品: 将水蛭活体经过沸水烫死后, 匀浆、冷冻干燥; 水蛭炮制品由水蛭活体经滑石粉加工炮制而成。滑石粉(北京试剂公

收稿日期: 2010-07-12, 修订日期: 2010-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30701107)资助

作者简介: 李冰宁, 1986年生, 北京林业大学生物科学与技术学院食品科学与工程系硕士研究生 e-mail: libin03_2@163.com

* 通讯联系人 e-mail: wuyanwenanal@hotmail.com

司), 溴化钾晶体(上海安谱科学仪器有限公司)。

1.2 主要仪器设备

Spectrum GX FTIR 光谱仪(Perkin Elmer 公司), 红外 DTGS 检测器, 光谱分辨率 4 cm^{-1} , 扫描范围 $4\ 000\sim\ 400\text{ cm}^{-1}$ 。扫描信号累加 32 次。扫描时扣除水和 CO_2 的干扰。

变温附件为北京市朝阳区自动化仪表厂的 CKW-II 型程序升温仪, Love Control 公司的 Portable Controller 可编程温度控制单元(50-886 型)。控温范围: $50\sim\ 120\text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.3 实验过程和数据处理

取水蛭各样品粉碎后过 40 目筛, 与 KBr 混合研磨均匀后, 压片测定, 获得系列水蛭样品的红外谱图。

将水蛭各样品粉末与 KBr 混合, 充分研磨均匀后压片, 然后将样品片放在变温池内, 通过程序控制升温, 以 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 为间隔, 在 $50\sim\ 200\text{ }^\circ\text{C}$ 温度范围内每隔 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 进行原位实时扫描红外谱图。采用的二维相关分析软件, 对系列瞬时红外光谱图进行分析, 获得二维相关红外谱图。

2 结果与讨论

已有的研究表明, 水蛭的主要活性成分为蛋白质, 包括水蛭素、溶纤素、待可森等, 此外还含有多种脂肪酸、甾醇、微量元素和矿物质等^[10]。水蛭的炮制过程一般要经过高温处理, 而高温处理会导致蛋白质的失活、变性^[11, 12]。为了表征和阐明水蛭成分在炮制过程中发生的变化, 本文采用红外谱图和二维相关分析技术进行了分析。

2.1 水蛭鲜品、生品和炮制品的红外光谱图分析

如图 1 所示, 水蛭的红外谱图中有明显的蛋白质特征峰, 如 $3\ 303\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 A 带、 $1\ 654\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 I 带和 $1\ 543\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 II 带, $1\ 238\text{ cm}^{-1}$ 附近也有微弱的酰胺 III 带出现, 这些均与水蛭的蛋白质含量丰富有关^[13]。酰胺 A 带受羟基的叠加影响, 不能区分出明显的吸收峰, 以肩峰的形式出现, 为 $\nu_{\text{N-H}}$ 的振动峰。谱图中的酰胺 I 带、酰胺 II 带的吸收峰均呈现出较宽的吸收峰, 这是由于蛋白质中含有多种二级结构, 包括 α -螺旋、 β -折叠、转角、环形和任意性较大的卷曲。其中 $1\ 654\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 I 带, 即肽链中 $\nu_{\text{C=O}}$ 振动峰的强度最大, 酰胺 I 带对应 α -螺旋结构, 说明水蛭中的蛋白质以 α -螺旋结构为主。此外, 谱图中还表现出 $1\ 540\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 II 带(以 $\delta_{\text{N-H}}$ 为主)、 $1\ 238\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 III 带(以 $\nu_{\text{C-N}}$ 为主), 表明蛋白的肽链中含有较多仲酰胺, 因为仲酰胺的 $\delta_{\text{N-H}}$ 和部分 $\nu_{\text{C-N}}$ 产生耦合作用, 分裂为上述两个谱带^[15]。谱图中还有 $3\ 230\sim\ 3\ 400\text{ cm}^{-1}$ 区间醇羟基 $\nu_{\text{O-H}}$ 与酰胺 A 带吸收叠加的振动峰, $1\ 080$ 和 $1\ 041\text{ cm}^{-1}$ 附近醇类 $\nu_{\text{C-OH}}$ 的弱吸收峰等, 对应水蛭中少量的甾醇类化合物。

对比水蛭鲜品、生品和炮制品的红外谱图发现: 三张谱图的相似度很高, 其酰胺 I 带的峰位相同, 但鲜品的酰胺 II 带的峰位与另外两种的不同, 即鲜品的位于 $1\ 543\text{ cm}^{-1}$, 生品和炮制品的吸收峰位于 $1\ 535\text{ cm}^{-1}$ 。这是由于水蛭生品和炮制品虽然经过 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 的高温处理, 其蛋白质的空间结构发生了改变, 但蛋白的一级结构并未受到影响, 因此羰基

$\nu_{\text{C=O}}$ 振动峰的峰位变化微弱。而酰胺 II 带的峰位变化是由于温度变化引起的蛋白质吸收能量超过了分子间作用力, 导致蛋白质空间构象被破坏, 维持和稳定空间构象的二硫键、氢键断裂, 整个蛋白质的螺旋链被破坏打开, 肽链转变成无规卷曲状态, 无序结构增加, 蛋白质变性, 因而使得 $\nu_{\text{N-H}}$ 和 $\delta_{\text{N-H}}$ 振动峰向低频红移, 结果水蛭生品、制品与鲜品相比, 谱峰从 $3\ 303\text{ cm}^{-1}$ 变为了 $3\ 292\text{ cm}^{-1}$, 位移了 11 cm^{-1} 。酰胺 II 带的峰位从 $1\ 543\text{ cm}^{-1}$ 变为 $1\ 535\text{ cm}^{-1}$, 位移了 8 cm^{-1} ^[14]。

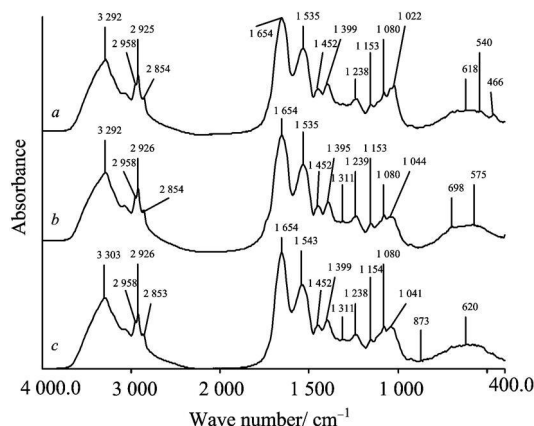


Fig 1 FTIR spectra of processed leech, crude leech and fresh leech

a: Processed leech; b: Crude leech; c: Fresh leech

水蛭鲜品在 $1\ 041\text{ cm}^{-1}$ 附近有弱的吸收峰, 生品在同样位置也有弱的吸收峰, 而炮制品的吸收峰从位移到 $1\ 022\text{ cm}^{-1}$ 附近, 位移了约 20 cm^{-1} , 谱峰的相对强度也有增加。这是由于水蛭炮制品在滑石粉中经过 $300\text{ }^\circ\text{C}$ 以上高温处理, 炮制品中的甾醇类化合物被部分氧化, 羟基占胆固醇比重继续减小, α -碳原子相连的基团电负性增强, 导致 $\nu_{\text{C-OH}}$ 吸收向低频移动^[15]。

2.2 水蛭炮制品与鲜品的二维相关红外光谱分析

二维相关红外光谱是通过外部微扰样品引起样品分子的激发, 改变样品各组分相关基团的分子振动, 而这种局部环境的变化会引起瞬态光谱的相应变化。二维相关谱表达了不同吸收峰之间的相关性, 热微扰的二维红外相关谱图反映了样品在升温过程中各组分基团的相互作用力随温度变化的情况。本文模拟水蛭的炮制过程, 将水蛭鲜品从 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 缓慢升至 $200\text{ }^\circ\text{C}$ (水蛭炮制品作为对比), 并得到水蛭升温过程的二维相关红外谱图, 对变化较大的 $1\ 400\sim\ 1\ 700$ 和 $950\sim\ 1\ 300\text{ cm}^{-1}$ 区域的同步图进行了分析。

如图 2 所示, 在 $1\ 400\sim\ 1\ 700\text{ cm}^{-1}$ 范围内, 对热极为敏感的振动为蛋白质的酰胺振动, $1\ 625\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 I 带与 $1\ 550\text{ cm}^{-1}$ 附近的酰胺 II 带都显示出强的自动峰, 且形成一个 2×2 的峰组, 这说明水蛭蛋白质组分之间相互作用较强; 水蛭鲜品在 $1\ 550\text{ cm}^{-1}$ 处的自动峰比其炮制品的自动峰明显得多。鲜品蛋白质在加热过程空间构象逐渐破损, 维持空间构象的氢键、二硫键等逐渐断裂, $\delta_{\text{N-H}}$ 受热微扰影响大。而经炮制品的蛋白质空间结构已经发生改变, $\delta_{\text{N-H}}$ 受

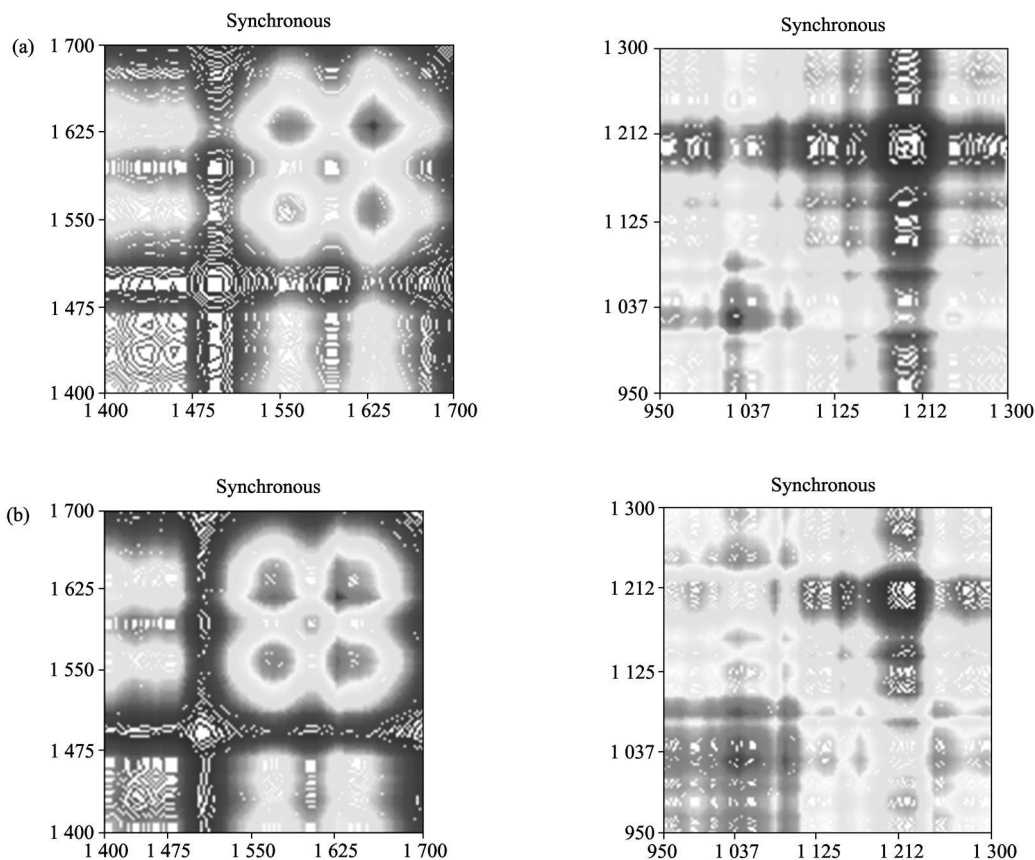


Fig 2 2D FT-IR synchronous correlation spectra of processed leech (a) and fresh leech (b) (1 400~ 1 700, 950~ 1 300 cm^{-1})

热微扰影响减小, 因此其二维谱图中蛋白质的自动峰表现的较为微弱。

在 $950\sim 1\,300\text{ cm}^{-1}$ 区域, 水蛭炮制品仅在 $1\,037\text{ cm}^{-1}$ 附近有一个较强的自动峰, 水蛭鲜品在 $1\,245, 1\,081, 1\,051, 1\,037, 983\text{ cm}^{-1}$ 附近均有自动峰, 且在对角线的两侧还出现较强的正交叉峰, 自动峰的个数明显多于水蛭炮制品。炮制品经历高温处理, 其中的脂肪酸、甾醇类化合物的组成已经发生改变, 甾醇的氧化产物有所增加, 而水蛭鲜品中的脂肪酸、甾醇类化合物的组分还未被氧化, 对热微扰更为敏感, 这与红外谱图分析的结论一致。

3 结论

本文将红外光谱法特有的宏观指纹特性与二维相关红外光谱结合, 研究了中药水蛭炮制前后成分变化, 分析了水蛭鲜品、生品、炮制品的红外谱图及模拟炮制过程的二维相关谱图。结果表明: 水蛭在炮制过程中其蛋白质的空间构象发生改变, 氢键断裂, 同时水蛭中脂肪酸和甾醇成分被部分氧化。

References

- [1] Pharmacopiea Committee of the Ministry of Health of the People's Republic of China(中华人民共和国国家药典委员会). Pharmacopiea the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2010. 77.
- [2] PAN He, GANG Hong-lin, WANG Zhi-guo(潘 贺, 刚宏林, 王志国). Acta Chinese Medicine and Pharmacology(中医药学报), 2006, 34(2): 60.
- [3] LI Ming, WU Ji-biao, LIU Cong-cong(李 明, 武继彪, 刘聪聪). Traditional Chinese Medicinal Research(中医研究), 2006, 19(8): 62.
- [4] LÜ Wen-hai, WANG Qi(吕文海, 王 琦). Journal of Chinese Medicinal Materials(中药材), 1994, 19(4): 28.
- [5] ZHANG Xi-chun(张锡纯). Discourses of Combining Chinese and Western Medicines(医学衷中参西录). Beijing: Peoples Medical Publishing House(北京: 人民卫生出版社), 1987. 383.
- [6] Monreal M, Costal J, Salva P. Drugs Aging, 1996, 8(3): 171.
- [7] Liu Hongxia, Sun Suqin, Lü Guanghua. Vib. Spectrosc., 2006, 40: 202.

- [8] Wu Yanwen, Sun Suqin, Zhao Jing. Journal of Molecular. Structure, 2008, 882(1- 3): 107.
- [9] TANG Hui-ying, YAN Dan, WU Yan-wen(唐慧英, 鄢丹, 武彦文). World Science Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine(世界科学技术-中医药现代化), 2009, 2: 283.
- [10] OU Chang-xing, CHEN Ke-yi(欧长兴, 陈可冀). The Clinical Progress on the Leech(水蛭的临床进展). Beijing: Ancient Chinese Medical Book Press(北京: 中医古籍出版社), 1994.
- [11] YAN Long-fei, SUN Zhi-rong(阎隆飞, 孙之荣). Molecular Structure of Protein(蛋白质分子结构). Beijing: Tsinghua University Press(北京: 清华大学出版社), 1999. 16.
- [12] LIU Li-fang, JIN Rong-luan, XU Guo-jun, et al(刘丽芳, 金荣鸾, 徐国钧, 等). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2001, 23(12): 880.
- [13] SUN Su-qin, ZHOU Qun, QIN Zhu(孙素琴, 周群, 秦竹). Atlas of Two-Dimensional Correlation Infrared Spectroscopy for Traditional Chinese Medicine Identification(中药二维相关红外光谱鉴定图集). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2003. 154.
- [14] WENG Shi-fu(翁诗甫). The Fourier Transform Infrared Spectroscopy(傅里叶变换红外光谱仪). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005. 253.
- [15] XIE Jing-xi, CHANG Jun-biao, WANG Xu-ming(谢晶曦, 常俊标, 王绪明). The Infrared Spectroscopy in Organic Chemistry and Drug Chemistry(红外光谱在有机化学和药物化学中的应用). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2001. 304.

Study on the Processing of Leech by FTIR and 2D-IR Correlation Spectroscopy

LI Bing-ning^{1, 2}, WU Yan-wen^{2*}, OUYANG Jie¹, SUN Su-qin³, CHEN Shu-cong²

1. Department of Food Science and Engineering, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2. Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China

3. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract The chemical differences of traditional Chinese medicine leech before and after processing were analyzed by FTIR and two-dimensional correlation infrared (2D-IR) spectroscopy. The result showed that the leech was high in protein, with characteristic peaks of amide I, II bands. Comparing the IR spectra of samples, the primary difference was that the characteristic peak of fresh leech was at 1543 cm^{-1} , while that of crude and processed leech was at 1535 cm^{-1} . A 2D-IR spectrum with heating perturbation was used to track the processing dynamics of leech. In the 2D-IR correlation spectra, fresh leech exhibited stronger automatic peaks of the amide I and II bands than that of processed leech, which indicates that the protein components of the fresh leech were more sensitive to heat perturbation than the processed one. Moreover, the result of FTIR and 2D-IR correlation spectra validated that the 3-dimensional structure of protein was damaged and hydrogen bonds were broken after processing, which resulted in the inactivation of protein. The fatty acids and cholesterol components of leech were also oxidized in this process.

Keywords Leech; Processing; Protein; FTIR; 2D-IR

(Received Jul. 12, 2010; accepted Oct. 18, 2010)

* Corresponding author