

- [11] Li A F ,Sun A L ,Liu R M. Preparative isolation and purification of costunolide and dehydrocostuslactone from *Aucklandia lappa* Decne by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A* ,2005 ,1076( 1-2): 193-197.
- [12] 张仲平,邵林. 香椿中多酚类化合物的 TLC 研究[J]. 山东中医杂志,2000,19(4): 237-238.
- [13] Jang D S ,Han A R ,Jhon G J , et al. Flavonoids and aromatic compounds from the rhizomes of *Zingiber zerumbet* [J]. *Arch Pharm Res* ,2004 ,27( 4): 386-389.
- [14] Maria H R ,Massayoshi Y , et al. Neolignans , styrylpyrones and flavonoids from an aniba species [J]. *Phytochemistry* ,1997 ,45( 6): 1263-1269.
- [15] Consolacion Y R ,Maria C L ,Jadz J L , et al. Secondary metabolites from *Tectona philippinensis* [J]. *Nat Prod Res* ,2008 ,22( 9): 820-824.

## 维药没食子血清药化初步研究

霍仕霞, 彭晓明, 高莉, 周露, 斯拉甫·艾白\*

(新疆维吾尔医药研究所, 新疆维吾尔医方剂学实验室, 新疆乌鲁木齐 830049)

**摘要:**目的 对维药没食子进行血清药物化学的初步研究。方法 建立维药没食子及口服没食子后大鼠血清指纹图谱的高效液相色谱分析方法,比较没食子水提取物、没食子常规的粉末含药血清、超微粉含药血清、提取物含药血清和空白血清 HPLC 指纹图谱,推断口服没食子后,大鼠血清中的原型成分及代谢产物。结果 口服没食子后,在大鼠血清中发现了4个入血成分,其中3个为没食子中的原型成分,1个可能为原型成分的代谢产物。结论 入血成分及移行成分可能成为没食子在体内的直接作用物质,对其进行进一步的分离、鉴定,能更好地阐明没食子的作用物质。

**关键词:** 没食子; 血清药物化学; HPLC 指纹图谱

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)10-1754-04

## Pharmacochemistry of traditional Uighur medicine *Galla Turcica*

HUO Shi-Xia , PENG Xiao-ming , GAO Li , ZHOU Lu , Silafu · Aibai\*

(Xinjiang Institute of Traditional Uighur Medicine , Prescription Laboratory of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine , Urumqi 830049 , China)

**KEY WORDS:** *Galla Turcica*; serum pharmacochemistry; fingerprint

中药血清药化是以血液中的有效成分为研究对象,采用现代分析方法鉴定口服中药后血清中药源性成分及移行成分,它能够直观地分析中药口服后的血液中的形态表现,快速寻找药效物质基础。没食子 *Galla Turcica* 是新疆维吾尔医常用药,它是没食子蜂科昆虫没食子蜂 *Cynips gallae-tinctorice* Oliv. 的幼虫,寄生于壳斗科植物没食子树 *Quercus infectoria* Oliv. 幼枝上,所产成的虫瘿。没食子富含鞣质,约占50%~70%,其次为没食子酸、丙酸、树脂等。其中没食子鞣质具有收敛、抗炎、镇痛、抗免疫、抗病毒、降血脂、降血糖<sup>[1-2]</sup>等作用。而没食子鞣质是在

体内以何种形式发挥作用,至今尚未见有报道,本研究在建立没食子高效液相色谱指纹图谱的同时,应用血清药物化学方法,分析比较没食子粉末与提取物含药血清指纹图谱,快速分析和筛选没食子活性成分,研究其可能的作用物质基础。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

高效液相色谱仪: Waters1525 二元泵高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Waters2996 紫外检测器, Empower 数据采集系统(美国); TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂制造);

收稿日期: 2011-03-01

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAI48B06); 新疆维吾尔自治区科技支疆工程资助项目(200840102-34)

作者简介: 霍仕霞(1983—),女,助理研究员,主要从事仪器分析新方法 & 新药研究。Tel: 13565889322, E-mail: huoshixia2010@sina.com。

\* 通信作者: 斯拉甫·艾白,男,教授,研究员,硕士生导师,主要从事药理毒理学研究和新药开发。Tel: (0991) 2563702, E-mail: aibai@263.net。

SGT7200HBT型超声清洗器(上海冠特超声仪器有限公司); Milli-Q超纯水纯化系统(18 MΩ, Millipore公司); BS110S电子天平(北京赛多利斯有限公司)。

### 1.2 试药

没食子购于新疆维吾尔自治区维吾尔医医院,经鉴定为没食子蜂科昆虫没食子蜂 *Cynips gallae-tinctoriae* Olivier的幼虫寄生于没食子树上的虫瘿。没食子酸对照品(批号:110831-200803)购于中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯(美国Fisher公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯;磷酸(优级纯,天津市化学试剂三厂);普通氮气( $\geq 99\%$ ,新疆康迪实业发展有限公司)。

### 1.3 动物

清洁级 Wistar 大鼠 6~8 周龄,质量(200 ± 20) g 雄性,由新疆实验动物研究中心提供,许可证号:SYXK(新)2003-0003。每组各 5 只。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[3]</sup>

通过对比选择不同检测波长、柱温、不同流动相和洗脱方法,对供试品溶液进行 HPLC 分析,对所获取的供试品色谱图中所呈现色谱峰的个数、分离度、峰对称性、峰面积等参数进行比较和分析,最终确定色谱条件为: Waters symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液; 检测时间 50 min; 柱温 30 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 20 μL; 检测波长 270 nm; 梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间/min	甲醇/%	0.2% 磷酸水溶液/%
0	20	80
10	40	60
30	45	55
50	50	50

### 2.2 供试品溶液的制备<sup>[4]</sup>

2.2.1 没食子供试液的制备 取没食子粉末(过 40 目筛) 5 g, 加入水溶液 50 mL, 超声提取两次, 料液比 1:10, 时间 60 min 和 30 min, 过滤, 合并滤液, 再用双蒸水定容到 250 mL 棕色量瓶中(母液 C = 10 mg/mL), 溶液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取滤液 20 μL 进行 HPLC 分析。

### 2.2.2 没食子灌胃液的制备

(1) 没食子粉末灌胃液制备 没食子药材常规

粉碎, 过 100 目筛, 用 CMC-Na 制备成混悬液, 浓度为 40%, 备用。

(2) 没食子超微粉灌胃液制备 没食子药材经常规粉碎后, 进一步超微粉碎, 经检测, 平均粒径 75 μm 以内, 用 CMC-Na 制备成混悬液, 浓度为 40%, 备用。

(3) 没食子提取物 没食子药材粉碎成粗粉(过 40 目筛), 水溶液回流提取两次, 每次 1 h, 合并滤液, 70 °C 浓缩, 55 °C 真空干燥, 粉碎成细粉, 用 CMC-Na 制备成混悬液, 浓度为 24% (按出膏率折算等效剂量), 备用。

### 2.3 对照品溶液的制备

取没食子酸对照品适量, 精密称定, 置于棕色量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含 3 μg 的溶液, 即得。

### 2.4 血清样品的采集和处理<sup>[5-6]</sup>

2.4.1 给药与采血 Wistar 大鼠随机分为给药组和空白组, 每组 5 只, 禁食 12 h (自由饮水), 给药组以药液量 20 mL/kg 灌胃, 空白组给予同体积的蒸馏水, 每日 2 次, 连续 3 d。末次给药后 1.5 h, 乙醚麻醉, 大鼠腹主动脉采血, 低速离心, 分离血清, 置 -20 °C 冰箱中冷冻备用。

2.4.2 血清样品的处理 取空白及给药组血清各 2 mL, 加 10 mL 甲醇, 摇匀后, 微量振荡器振荡 5 min, 放置 4~5 h, 自然沉淀蛋白, 吸取上清液, 置 10 mL 试管中, 用氮气浓缩约 0.5 mL, 用甲醇冲洗全部转移至 1.5 mL EP 管中, 氮气吹干, 残渣用 0.2 mL 甲醇溶解(若浑浊可 10 000 r/min 离心处理), 上清液过 0.45 μm 滤膜, 取 20 μL 经 HPLC 分析。

### 2.5 高效液相色谱分析

按 2.1 项下液相色谱条件, 分别测定没食子供试液、没食子常规粉末含药血清、没食子超微粉含药血清、没食子提取物含药血清和空白血清的高效液相色谱指纹图谱(见图 1)。本课题组前期研究<sup>[7]</sup>建立了没食子药材指纹图谱, 标定了 7 个共有峰, 故本研究以这 7 个共有峰为研究入血的主要考察峰。通过比较没食子含药血清与空白血清色谱峰, 3 种含药血清均出现了 3 个相同的新色谱峰, 即 1, a, 5 号峰, 超微粉含药血清中出现 1 个不同的新色谱峰, 即 3 号峰, 结果见图 1(B, C, D)。与没食子供试液的指纹图谱比对, 1, 3, 4, 5 号峰分别一一对应, 表明没食子中有 4 个成分以原型的形式吸收入血。而峰 a 是没食子含药血清的特有峰, 原因可能是没食子经大鼠口服后在体内的代谢产物。研究中采用没食子酸标准品, 进行色谱峰比对, 发现 1 号峰的保留时间

与没食子酸标准品的色谱峰保留时间吻合,由此可知,给予大鼠没食子后,血液中的确有没食子酸的存在;而在没食子含药血清色谱图中b号峰位置,没食子供试液和空白血清在相近位置上都出现此峰,该色谱峰仅是血清中的固有成分,还是血清固有成分与没食子原型成分的叠加,有待采用质谱及核磁共振波谱等检测方法做进一步考察<sup>[8-11]</sup>。

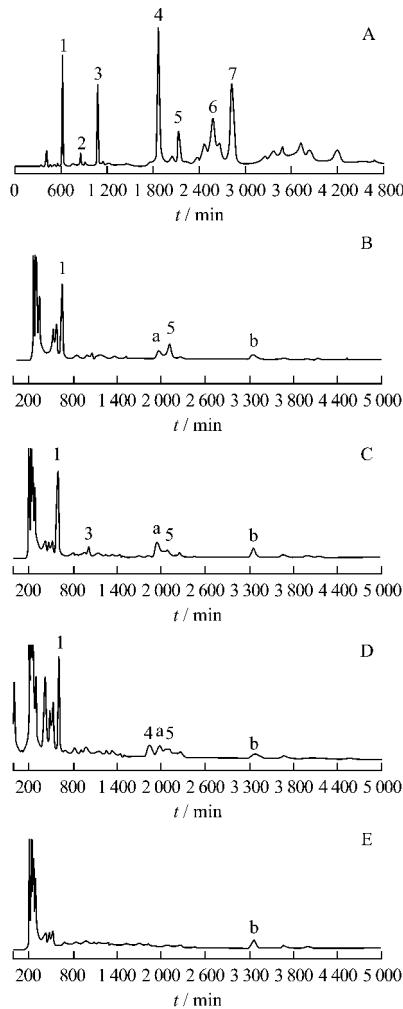


图1 各供试品指纹图谱

A. 没食子供试品 B. 没食子常规粉末含药血清 C. 没食子超微粉含药血清 D. 没食子提取物含药血清 E. 空白血清

Fig. 1 The fingerprint of the samples

A. sample B. conventional powder containing serum C. serum containing ultrafine D. extracts containing serum E. blank serum

### 3 讨论

本研究在分析没食子供试品和血清样品时,均采用了完全相同的色谱条件,因此,建立的没食子供试品 HPLC 指纹图谱与含药血清的 HPLC 指纹图谱中的色谱峰能够满足一一对应的关系,同时进行了方法学考察,均满足分析检测的要求。在处理血清样品时,考察了有机试剂沉淀法、热水浴法,考虑处

理方法对色谱峰的干扰影响,最终确定采用甲醇沉淀法处理血清样品,用氮气低温浓缩法富集血中的成分,以便获得更多的信息。

本研究采用血清药物化学的方法对维药没食子进行研究;通过比较没食子水提取物、没食子常规粉末、超微粉、提取物含药血清和空白血清 HPLC 指纹图谱的差异,确定 5 个血中移行成分,其中 4 个为原型成分,1 个可能为原型成分的代谢产物,4 个入血成分可能为没食子的体内直接作用物质,对其进行深入的研究,将有助于阐明没食子药效物质基础及药效机制。在测定没食子粉末、超微粉、提取物中的鞣质及水解前后的没食子酸时,发现没食子中的主要成分以没食子鞣质为主,且鞣质质量分数大于 50%,水解前没食子酸的质量分数仅为 2% 左右,水解后没食子鞣质降解为没食子酸存在,故在本次研究中发现 3 种含药血清中均含有没食子酸峰,很有可能是没食子鞣质在大鼠体内经过胃肠道作用,在不同的 pH 环境下,降解为没食子酸,吸收入血,这提示没食子的作用物质有可能是没食子鞣质在体内降解后的没食子酸。

没食子超微粉含药血清中的 3 号峰与供试液有对应关系,而其他两种含药血清均无对应关系,表明 3 号峰所对应的成分经超微粉碎后,在实现药材细胞级破壁微粉碎的同时,使其从细胞内暴露出来,药物的释放速度及释放量增加,大幅度提高了吸收的速度,故在血清指纹图谱比较时,超微粉含药血清色谱峰中的 3 号峰能够与没食子供试液吻合。而常规粉末和提取物的含药血清的色谱峰中却无此峰,没食子提取物虽然经过溶剂浸泡提取的过程,但该成分很可能在提取的过程中被破坏,均表明超微粉碎有其独到的优势,更有利于药物有效成分的在机体内的吸收、利用,提高生物利用度<sup>[12-13]</sup>。提取物含药血清中 4 号峰与供试液有对应关系,表明该峰所对应的成分经水溶液煎煮后,形成特定的状态,更有利于大鼠吸收,优于超微粉;可见,选择合适的制备工艺,其有效成分是否能够被机体吸收利用是最重要的。

通过血清药化的研究方法初步研究没食子的入血成分及代谢产物,为研究其作用物质及有效成分的代谢吸收提供有力的证据。4 个直接入血成分的性质及药理作用,后续研究将继续从原药材中制备、分离、纯化入血成分,代谢产物及其前体化合物的推导,进一步通过液质联用及液核联用技术进行相关的考察,以期获得更多的信息,为开发维药没食子提

供技术支持。

参考文献:

[1] 王教玉,张起辉,邓旭明,等.没食子的药理研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(10):2570-2572.  
[2] 徐勤.鞣质的研究进展[J].华夏医学,2004,17(1):113-115.  
[3] 孙波,孙涛.高效液相色谱法在中药指纹图谱中的应用现状及分析[J].时珍国医国药,2006,17(1):109-110.  
[4] 杜瑞莲,杨中林.五倍子中鞣质提取工艺研究[J].中成药,2008,30(6):839-841.  
[5] 唐泓皓,王伟,刘斌,等.单味中药土茯苓血清药物化学的初步研究[J].中华中医药杂志,2005,20(6):342-342.  
[6] 黄从善,陈婧,刘焱文.复方酸枣仁汤有效部位大鼠血清化

学成分分析[J].中国医院药学杂志,2006,26(5):522-524.  
[7] 周露,斯拉甫·艾白,李治建,等.没食子药材 HPLC 指纹图谱研究[J].中草药,2011,42(5):919-922.  
[8] 王宇卿,闫明,陈文,等.补骨脂血清药物化学的初步研究[J].中国新药杂志,2008,17(5):396-399.  
[9] 刘晓东,闫明,张兰兰,等.驱虫斑鸠菊血清药物化学的初步研究[J].医药导报,2009,28(6):713-715.  
[10] 李满郁,王喜军.山茱萸富集产物中血清中移行成分的含量测定[J].中医药学报,2005,33(3):4-6.  
[11] 张梅,邱丰,谢学军,等.葛根血中移行成分高效液相分析[J].中华中医药杂志,2008,23(3):215-217.  
[12] 胡学军,蔡光先,杨永华,等.中药超微粉碎研究进展与思考[J].世界科学技术-中医药现代化,2002,4(5):62-65.  
[13] 赵钟祥,王菊英,阮金兰,等.中药超细粉和细粉溶出特点的对比研究[J].医药导报,2003,22(11):810-812.

## 中药中赭曲霉毒素 A 的测定

郑 荣, 简龙海, 毛 丹, 王少敏, 王 柯, 季 申  
(上海市食品药品监督管理局, 上海 201210)

摘要:目的 建立豆豉、防己、薏苡仁、补骨脂、麦芽、稻芽、白扁豆、绿豆和赤小豆中赭曲霉毒素 A 的测定方法。方法 样品经提取、过免疫亲和柱净化后,用高效液相色谱-荧光检测器进行分析,阳性样品采用 LC-MS/MS 确证。结果 赭曲霉毒素 A 在 1~20 ng/mL 范围内线性关系良好  $r > 0.999$ 。回收率在 60%~110% 之间,定量限为 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,检测限为 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论 该方法快速、简便、准确,可用于测定以上 9 味中药的赭曲霉毒素 A。

关键词:中药;赭曲霉毒素 A;免疫亲和柱;HPLC;LC-MS/MS

中图分类号:R927.2

文献标志码:A

文章编号:1001-4528(2011)10-1757-04

## Determination of ochratoxin A in traditional Chinese medicine

ZHENG Rong, JIAN Long-hai, MAO Dan, WANG Shao-min, WANG Ke, JI Shen  
(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201210, China)

**KEY WORDS:** traditional Chinese medicine; ochratoxin A; immunoaffinity column; HPLC; LC-MS/MS

赭曲霉毒素是赭色曲霉属 *Ochraceors* 和几种青霉属真菌产生的一种毒素,包括 A、B、C 等 7 种结构类似的化合物,其中赭曲霉毒素 A (ochratoxin A) 被公认为是目前致癌力最强的天然物质之一。毒理学资料表明,这种致癌作用主要体现在肝脏与肾脏,并被认为与人类的巴尔干肾病有关,国际癌症研究机构 IARC 将其定为 2B 类致癌物<sup>[1-2]</sup>。

目前对赭曲霉毒素的研究多集中在谷物、粮油

等食品样本中<sup>[3]</sup>,各国针对粮食中的赭曲霉毒素也制定了严格的限度标准。而在与食品具有类似基质的中药中尚未建立相应的检测方法与标准。2000 年 6 月 8 日,美国《新英格兰医学杂志》报道了 43 位服用含有马兜铃属中草药及千金藤、玉木兰减肥药而出现严重肾功能衰竭,其中 4 例有赭曲霉毒素(存在于千金藤)中毒的证据。为此,建立中药中赭曲霉毒素 A 的检测方法,不仅可以确保人民用药安

收稿日期:2011-02-09

作者简介:郑 荣(1978—),女,主管药师,主要从事中药质量控制和安全性检测检验研究。Tel: (021) 38839900 × 26605, E-mail: zhen-grong1978@gmail.com