

葛根组分库的构建^{*}

□张 岩 徐 青 薛兴亚 章飞芳 梁鑫森^{**}

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘 要:本文采用组分中药的研究模式,以发展构建中药组分库为核心,选取葛根为研究对象,探讨了组分的分离与表征方法。应用工业色谱及相关技术,发展了高效的规模组分制备分离方法,获取了 18 个正丁醇部位的制备组分。利用高效液相色谱,获取了 18 个组分化学指纹谱,与标准品对照,对组分进行了初步表征。

关键词:葛根 组分库 葛根色谱图 工业色谱 高效液相色谱

一、引 言

世界各国的药物研究者在经过长期艰苦的工作后,已经认识到通过化学合成手段寻找新药,不仅盲目,而且难度越来越大,因此对天然化合物的研究将成为新药开发的热点之一。新药开发的核心是药效组分的发现,拥有大量的化合物资源,将在新药研究中占据极为有利的地位。一般来说,一种新药从发现到上市费时费力,要经过 8~10 年的时间,为了加速新药研发的速度,欧美制药公司不间断的采用和开发先进技术。例如,采用组合化学方法快速生产建立包含成千上万化合物的库;采用各种快速高效的筛选检测方法去发现药物前体。我国的中药资源种类繁多,历史悠久,为了加快中药现代化进程,尽快促进中药国际化进程,应结合中医药自身特点,建立高效的药物研发新模式。

在现代中药系统研究中,既不能采用单一成分的西药模式,也不能采用不经任何去粗存精的粗放式传统模式,应该在这两者之间创建一个新的研究模式,而这种模式首先必须符合多成分、多靶点、整合调节的中医药基本思想,又能以现代技术进行有效的科学表征。对此,我们提出了组分中药的研究模式^[1],即以组分为切入点,以标准组分替代中药材(饮片),以组分配伍替代饮片配伍的现代中药创制模式。

中药组分库的构建,可以为创新中药的持续发展提供物质资源和信息资源。中药组分被赋予了化学特征和生物学特征后,将化学指纹谱图库与生物指纹谱图库进行相关性分析,进一步重组、优化组分,形成功能组分库。在中医药理论指导下,用化学与生物学技术和方法阐明组分中药药效物质基础。

当组分实现标准化后,不仅库中的数据可以实现共享,大大加快中药理论的基础研究和中药现代化的研究进程,而且可以提供药材和组分的质量标准、实验室研究的规范化标准、可与生产工艺相对接

收稿日期:2005-09-07

修回日期:2005-11-16

^{*} 国家自然科学基金重点项目(20235020):中药药效组分指纹图谱分析方法的研究,负责人:梁逸曾;中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213):基于现代理论和技术的复方中药系统研究,负责人:梁鑫森。

^{**} 联系人:梁鑫森,博士,研究员,主要从事组分中药的研究, Tel:0411-84379529, Fax:0411-84379519, Email: liangxm@dicp.ac.cn.

62 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

的标准化方法,进而开创现代中药研究的新途径。

葛根是我国的传统中药,为豆科葛属植物的干燥根。葛根中含有多种有效成分,主要为异黄酮,包括葛根素、大豆甙元、大豆苷、染料木苷、染料木素等,其中又以葛根素的含量最高^[2],具有降低血管阻力,改善心、脑血液循环,减慢心率,降低心肌耗氧量等药理作用^[3-4]。

本文构建了葛根醇提物的正丁醇部位组分库。中药可以看作是不同极性组分组成的复杂混合物,可以根据极性不同,选择性的差异进行分级精制。利用不同极性溶剂对粗提物进行萃取,是中药中常用的粗分离方法,简便快速。精分离主要由工业级反相高效液相色谱按照一定的时间间隔进行组分切割完成。获取的组分利用各种分析手段和生物检测手段分别进行化学表征和生物学表征,则建立了葛根的组分信息库。本文主要介绍了葛根正丁醇部位组分的制备方法并建立了组分的化学指纹图谱库,为各种生物活性的筛选模型提供了大量的组分资源及信息资源。

二、实验部分

1. 仪器与试剂

Milli-Q 纯净水,甲醇为 HPLC 级(沈阳联邦),乙腈为 HPLC 级(美国 TEDIA),乙酸为 HPLC 级(美国 Alfa Aesar),葛根购于大连群益药房,产地广西。大豆苷(daidzin),染料木苷(genistin)购自 Sigma;葛根素(puerarin)购于中国药品生物制品检定所。

Waters 2690 高效液相色谱仪,Millennium 32 工作站,Waters 996 检测器。Varian 高效液相制备仪(包括 Responder 工作站,SD-2 泵,紫外检测器,530 控制模块)。

2. 正丁醇部位的制备

将葛根 70%乙醇提取物混悬在适量水中,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取 4~5 次。将正丁醇部位旋转蒸发待用。

3. 正丁醇部位的预处理

将 C18 湿法装柱(无定型,45~60 μm ,300 mm $\times$ 10 mm, i.d.),取约 5 g 正丁醇部位样品用甲醇溶解,

上样,减压洗脱。用 650 ml 水冲洗,接着用 600 ml 甲醇洗脱。旋转蒸发甲醇洗脱液,干燥后待用,记作 ZC18。

4. 优化分析型液相色谱条件

色谱分析在 Waters 2690 高效液相色谱仪上进行;色谱柱为 Varian C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 10 μm)(美国 Varian);梯度洗脱条件为:甲醇浓度以线性梯度在 20 min 以内从 25%升到 35%,45%保持 25 min,10 min 梯度升到 100%后保持 5 min,流速为 0.8 ml/min;检测波长 260 nm;样品浓度 0.25 g/ml(经 0.45 μm 滤膜过滤);柱温为室温。

5. 制备色谱分离条件

组分的分离制备在 Varian 高效液相制备仪上进行,色谱柱为 Varian Load & Lock C18 柱(140 mm $\times$ 77 mm i.d., 10 μm)(美国 Varian);梯度洗脱条件同 4;流速为 120 ml/min;检测波长 260 nm;样品浓度 0.25 g/ml(经 0.45 μm 滤膜过滤);进样体积 3.75 ml;柱温为室温。

6. 制备组分的收集

前 12 min 每 4 min 收集一个组分,12 min 至 34 min 之间每 2 min 收集一个组分,依次记作 ZC18-01, ZC18-02...ZC18-14,34~46 min 每 4 min 收集一个组分依次记作 ZC18-15,ZC18-16,ZC18-17,46~65 min 收集成一个组分,记作 ZC18-18。减压浓缩至 2 ml 左右,氮气吹干。

7. 制备组分的 HPLC 分析

制备组分的 HPLC 分析在 Waters 2690 高效液相色谱仪上进行,色谱柱为 Kromasil C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm);流动相为乙腈/水体系,两相均含有 0.1%乙酸;梯度洗脱条件见表 1。二极管阵列检测器 UV 扫描范围:190~400 nm。

表 1 制备组分的 HPLC 分析条件

Step	Time (min)	Flow (ml/min)	ACN (0.1% acetic acid)	Water (0.1% acetic acid)
1	0	1	5%	95%
2	33	1	35%	65%
3	50	1	100%	0%
4	55	1	100%	0%

三、结果与讨论

1. 正丁醇部位的预处理

粗提物中一般含有数量较多的干扰杂质,例如多糖或脂溶性成分等,一般采取顺序提取、液-液分配或固相萃取的方法除去^[5-6]。正丁醇部位经过了顺序提取即对葛根总提物按照石油醚-乙酸乙酯-正丁醇等不同极性溶剂进行了萃取,已经去除了脂溶性成分。通过自制的 C18 预处理柱,多糖等杂质可通过水的洗脱而除去,从而可以减少对后续工作的干扰,并且减少了对制备型色谱柱的污染。

2. 分析条件的优化

在固定相填料没有差别的情况下,制备色谱的性能容易从分析柱到制备柱放大,即在分析柱上获得的优化条件同样能在制备柱上重现,因此,在使用制备色谱前,充分优化和利用已建立的分析方法,将大大提高工作效率,减少投入,加快速度。因此,对分析条件优化时使用与制备柱相同填料和粒度的 Varian C18 柱。从经济成本考虑,流动相采用甲醇/水体系。由于分离对象成分较为复杂,因此采用梯度洗脱方式。由于制备色谱上流速较大,在分离度比较好的情况下分离时间应尽可能缩短,本实验在 65 min 内完成。在样品配制上,尽可能配制成高浓度的样品,则在制备色谱柱上上样量一定的情况下,减少了上样体积,从而减少了溶剂扩散对柱效的影响。在浓度一定的情况下,在分析柱上逐步加大进样体积,在分离度较好的情况下确定最大上样量。在上样体积为 20 μl 时,分离度较好(见图 1),25 μl 时开始超载,但分离度尚可,因此在分析型液相色谱上选择最大上样体积为 25 μl 。

3. 线性放大到制备型色谱

线性放大技术的发展是分析型的液相色谱与制备型的液相色谱联系的桥梁。线性放大的基本条件是分析柱和制备柱具有相同的填料型号和填料粒度。在柱高、单位体积担体的上样量、洗脱剂梯度的分级幅度等参数恒定的情况下,即可将经过优化的分析型分离条件直接线性放大至制备色谱的分离^[7-8]。在上述条件下,可用下面的公式(1)、(2)和(3)分别计算制

备型色谱系统中的线性放大因子、上样量和洗脱液的流速:

放大因子:

$$S_f = r_p^2 \cdot L_p / r_a^2 \cdot L_a \quad (1)$$

其中, S_f = 放大因子; r_p = 制备型色谱柱的半径; r_a = 分析型色谱柱的半径; L_p = 制备型色谱柱的长度; L_a = 分析型色谱柱的长度。

上样量:

$$m_p = m_a \cdot S_f \quad (2)$$

其中, m_p = 制备型色谱上样量; m_a = 分析型色谱上样量。

流速:

$$F_p = F_a \cdot S_f \quad (3)$$

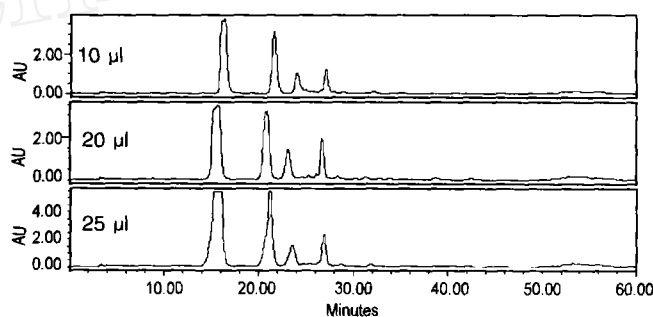


图 1 正丁醇部位(ZC18)在不同上样体积条件下的液相色谱
(流速 0.8ml/min, 260nm 检测)

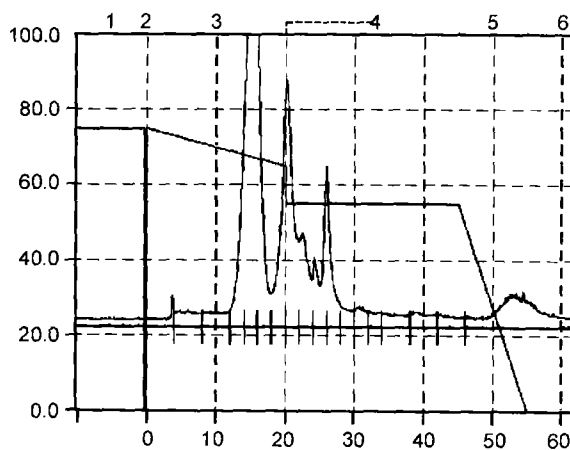


图 2 正丁醇部位(ZC18)的液相色谱-紫外制备色谱图
(流速 120 ml/min, 260 nm 检测)

其中, F_p = 制备型色谱流速; F_a = 分析型色谱流速。

由公式(1),(2)和(3)可以计算在本实验中由分析柱到制备柱的放大因子约为150,因此,制备色谱的流速从分析柱的0.8 ml/min上升到120 ml/min,上样量由25 μ l加大到3.75 ml,梯度洗脱条件不变。由图1和图2可以看出,制备色谱图与分析谱图极为相似,说明制备色谱的柱效很高。同时可以说明从分析条件到制备条件的线性放大是可行的。从图中可以看出,二者在保留时间上略有差异,这可能是由于梯度延迟造成的,另外室温的差别也可能引起这种差异。

4. 组分收集

按照时间顺序,在65 min内共收集18个组分ZC18-1~ZC18-18。每个组分均在毫克级,可供生物筛选和化学分析。

5. 葛根正丁醇部位制备组分的化学指纹谱

正丁醇部位制备的18个组分,在统一的色谱条件下(表1)进行了液相色谱的分析,各组分的色谱图如图3~5所示。从图中可以看出,正丁醇部位主要含有的是异黄酮苷类化合物,与标准品进行对照,峰1,2,3分别为葛根素、大豆苷和染料木苷。葛根素在组分ZC18-5和ZC18-6的含量很高,分别高达99.47%和

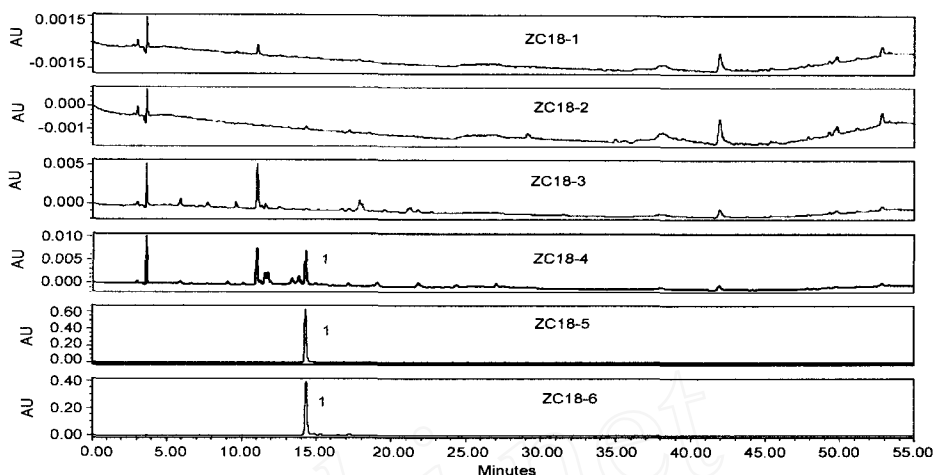


图3 正丁醇制备组分ZC18-1~ZC18-6的HPLC-UV在260 nm处的色谱图(1:葛根素)

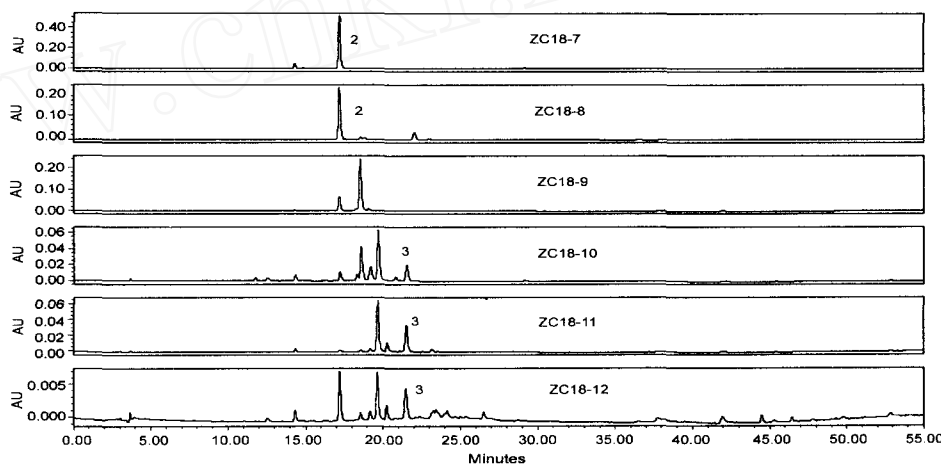


图4 正丁醇制备组分ZC18-7~ZC18-12的HPLC-UV在260 nm处的色谱图(2:大豆苷;3:染料木苷)

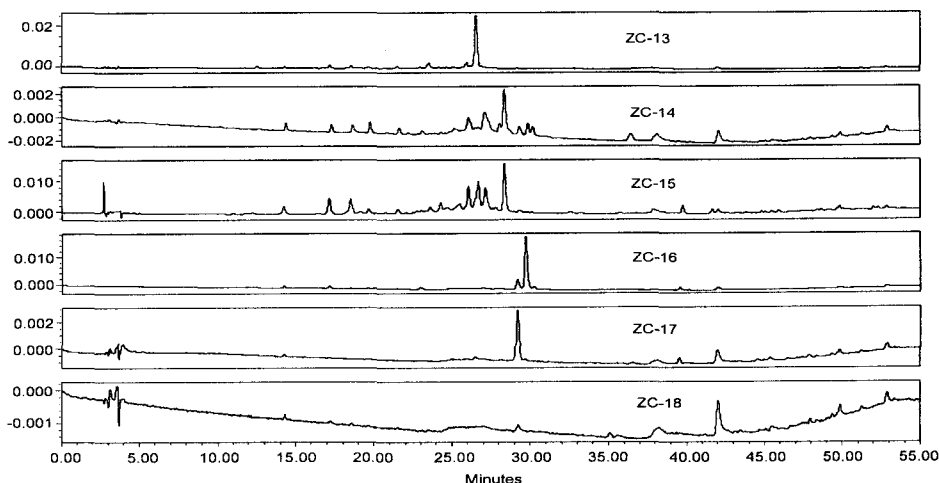


图5 正丁醇制备组分ZC18-13~ZC18-18的HPLC-UV在260 nm处的色谱图

94.36%,可作为标准品使用;大豆苷在组分 ZC18-7 中的含量可达到 85.5%。

其它化合物的鉴定还需要借助质谱等其它分析手段,我们下一步的工作将不断的充实组分库的信息。

四、小 结

1. 建立了葛根正丁醇部位的组分库

首先采用溶剂分配的方法对葛根粗提物进行了粗分离,选定葛根的正丁醇部位作为精分离的研究对象。以线性放大技术为基础,将优化后的分析条件直接放大至制备级高效液相色谱进行制备,通过时间段切割的方法,在 65 min 内,将正丁醇部位共切割成 18 个组分,将各组分进行浓缩,干燥后称重,均在毫克级,可供生物活性筛选和化学分析用。

2. 建立了葛根组分色谱信息库

利用 Waters 2690 的自动进样系统,对以上 18 个组分在总提物的优化条件下进行了高通量的 HPLC 分析,获取了化学指纹谱,通过对照标准品,可以对组分中的主要色谱峰进行初步的化学表征,由此建立了葛根组分色谱信息库。

葛根的组分库的建立,为各种生物模型的筛选提供了样品资源,葛根组分库的化学信息,为说明活性组分的物质基础提供了一定的理论依据,随着分析手段的不断加强,对葛根成分的不断挖掘与认识,将会逐步的充实组分库的信息资源。

参考文献

- 1 梁鑫淼,徐青,章飞芳.中药现代化研究的几点思考.中国科学院院刊,2004,19(3):218~220.
- 2 Chen G, Zhang J, Ye J, J. Chromatogr. A, 2001, 923 (1-2): 255~262.
- 3 荆涛,王绿娅,王伟,等.葛根素调节血管平滑肌细胞凋亡相关基因在斑块组织中表达的研究.中国药理学杂志,2003,38(9):667~670.
- 4 董丽萍,王天佑.葛根素抗谷氨酸对小鼠神经细胞兴奋毒的作用.中国药理学报,1998,19:339~342.
- 5 Heinonen IM, Lehtonen PJ, Hopia AI., J. Agric. Food Chem., 1998, 46 (4): 25~31.
- 6 Soleas GJ, Diamandis EP, Karumanchiri A, Goldberg DM, Anal. Chem., 1997, 69 (21): 4405~4409.

- 7 K.霍斯泰特曼, A.马斯顿, M.霍斯泰特曼.制备色谱技术-在天然产物分离中的应用.科学出版社,2000.
- 8 张晓哲.基于构库思想的中药分离与表征方法的研究.中国科学院化学物理研究所博士学位论文,2004.

(责任编辑:王 瑀)

(上接第 78 页)

(3)运输。

种子运输时,注意不能与其他种子混杂;运输工具必须清洁、干燥,具有较好的通气性。除保持干燥外,须有防晒、防潮等措施。

三、小 结

通过对黄芪栽培特点以及种子生产中存在的主要问题的调查研究,查阅技术资料,深入产区总结经验等,初步制订了黄芪种子的 SOP 和质量标准。为黄芪种子规范化生产提供了操作规程。随着科研的进展,黄芪种子规范化生产的操作规程也将逐步完善和充实。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典委员会编著.中华人民共和国药典(一部).北京:化学工业出版社,2005:212.
- 2 国家科技部生命科学技术发展中心.《中药材规范化种植项目实施指导原则及验收标准》资料,2001.
- 3 陈瑛.实用中药种子技术手册.北京:人民卫生出版社,1999:236.
- 4 张丽萍,杨春清,王瑞芳,等.181 种药用植物繁殖技术.北京:中国农业出版社,2004.
- 5 中国医学科学院药用植物资源研究所.中国药用植物栽培学.北京:农业出版社,1991:91~99.
- 6 中国药材公司.中国常用中药材.北京:科学出版社,1995:494.
- 7 中华人民共和国国家标准.(GB/T3543.1~3543.7~1995).农作物种子检验规程.北京:中国标准出版社,1995.
- 8 张丽萍,杨世林,杨春清,等.我国药材种子种苗产业存在的问题及其发展对策.中国中药杂志,1999,24(10):579~581.

(责任编辑:左 向)

从 2006 年第 1 期起,本刊价格有所调整,调整后每册定价 25.00 元,全年定价 150.00 元,欢迎订阅。

action mechanism

Present situation of study on 5-hydroxymethyl-2-furfural

Geng fang and wang xijun

(heilongjiang university of traditional Chinese medicine, Harbin 150040)

This article summarizes the general process of the formation of 5-HMF compound and the status quo of its existence, sums up its pharmacological action and briefly describes the present situation of the study of 5-HMF in compound prescriptions of traditional Chinese medicine. And on this basis the authors of the article hold that 5-HMF may be an unknown active component and can produce original effect in TCM compound prescriptions.

Key words 5-hydroxymethyl-2-furfural, traditional Chinese medicine

Exploration of Factors Exerting Influence on Pharmacological Action and Clinical Effect of Prescriptions of Traditional Chinese Medicine

Sun Xiaobo and Xu Huibo

(Jilin Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021)

Based on medicinal materials, human body and environment this article describes the factors which are able to exert influence on the pharmacological action and clinical effect of the prescriptions of traditional Chinese medicine, thus providing pharmacological study with more references. It tells people to assess the role of TCM prescriptions in a scientific way so as to give a better play to their effect of treatment.

Key Words Prescription, pharmacological action, clinical effects, influencing factors

Construction of component library of kudzu root

Zhang Yan, Xu Qing, Xue Xingya, Zhang Feifang and Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

In this study TCM components are taken for its model, the construction and development of TCM component library are regarded as its core and the root of kudzu is chosen as its object to explore the method for the separation and characterization of TCM components. As a result a method for efficient preparation and separation of scale components has been developed and 18 components from n-butyl alcohol fraction have been obtained due to the application of industrial chromatograph and other related techniques, and 18 fingerprints of component chemistry have been achieved by HPLC, which have been preliminarily characterized via comparison of them with standard ones.

Key words component library, kudzu root, industrial chromatograph, HPLC