

一种利用制备液相色谱特异性去除 北细辛毒性成分的新方法*

□程孟春 张峰 徐青 肖红斌** 梁鑫森
(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘要:目的:应用高效液相制备色谱技术特异性去除北细辛中的毒性成分黄樟醚。方法:采用高效液相制备色谱技术对北细辛正己烷提取物中的强毒性成分黄樟醚进行目标去除,并保留其它活性成分。采用霍恩氏法(Horn's法)和二甲苯所致小鼠耳壳肿胀试验对去除黄樟醚前后的提取物进行急性毒性及抗炎活性检测。结果:HPLC检测结果显示黄樟醚已基本被去除。北细辛的LD₅₀值由去除前的1.47ml·kg⁻¹(可信限为0.951~2.27)增大为2.37 ml·kg⁻¹(可信限为1.48~3.80),毒性明显降低;对二甲苯所致小鼠耳壳肿胀的抑制率由40.00%增大为84.28%,抗炎活性明显增强。结论:采用高效液相制备色谱技术可以在基本保留其他活性成分的基础上特异性地去除中药毒性成分,从而达到减毒增效的目的。

关键词:高效液相 色谱技术 北细辛 黄樟醚 减毒增效

细辛为常用中药,具有解热抗炎,镇痛,镇静等药理活性,主要药效成分为挥发油。细辛有毒,现代毒理研究表明,细辛挥发油中黄樟醚的毒性较大,具有麻痹动物呼吸中枢的作用,也是致癌物质。这一结果与临床中细辛粉末的毒性大于煎剂的毒性相印证:随着煎煮时间的延长,强挥发性的黄樟醚将逐渐减少。有学者建议采用长时间煎煮的方法降低细辛的毒性^[1],近年来还出现了采用精馏法去除黄樟醚的研究^[2],但结果均不甚理想:去除黄樟醚的同时甲基丁香酚等细辛的主要药效成分也被除掉

了。本文采用高效液相制备色谱技术对北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.的正己烷提取物中强毒性成分黄樟醚进行了目标去除,并采用霍恩氏法和二甲苯所致小鼠耳壳肿胀试验对去除前后的提取物进行急性毒性及抗炎药理活性研究。

一、实验材料

1. 仪器与试剂

Waters Delta Prep 4000 制备液相色谱仪(Waters公司,美国);Waters Alliance 2690 高效液相色谱系统(Waters公司,美国);Eyela 3200 中压层析仪(Eyela

收稿日期:2005-11-22

修回日期:2006-01-18

* 中科院知识创新工程重要方向性项目(KGCX2-SW-213-02):基于现代理论和技术的复方中药系统研究,负责人:肖红斌。

** 联系人:肖红斌,研究员,主要研究方向:色谱基础理论、色谱新技术、方法和中药现代化的研究,Tel:0411-84379667,Fax:0411-84379756,E-mail:hbxiao@dicp.ac.cn。

公司,日本);JPSD-100 粉碎机(上海嘉定粮油检测仪器厂);JJ500 型精密电子天平(双杰兄弟有限公司,美国);正己烷、乙酸乙酯(分析纯,北京三环化学试剂厂);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂);异丙醇(色谱纯,Tedia 公司,美国);超纯水(Milli-Q 制备);硅胶(100~200 目,青岛海洋化工厂)。

2. 药品与动物

北细辛购于大连美罗药房;黄樟醚标准品(四川宜宾川汇香料公司);吐温-80(大连医药集团化玻公司);阿司匹林肠溶片(沈阳万隆药业有限公司,每片 50 mg,批号 030603);二甲苯(天津市科密欧化学试剂开发中心);昆明种小鼠,18~22g,雌雄均有,合格证号 SCXK(辽)2004-0017,由大连医科大学实验动物中心提供。

3. 样品的制备

黄樟醚 HPLC 分析样品:黄樟醚标准品溶于甲醇中,定容至 $0.1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

北细辛正己烷提取物:将北细辛样品的根于 60°C 下恒温干燥 20 min,粉碎至 50 目,准确称取 400 g,用 2 L 正己烷超声提取 3h,过滤,用旋转蒸发器浓缩至呈油状,即为正己烷总提物(记为 A)。

正己烷提取物 HPLC 分析样品:取部分总提物溶于甲醇中,定容至 $0.1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 待 HPLC 分析。

毒理学实验样品:取 4 g 总提物溶于正己烷,按照文献方法^[1]进行硅胶柱中压层析,采用梯度洗脱方法(正己烷:乙酸乙酯=10:3~1:3),收集富含黄樟醚的馏分,合并,浓缩,上制备型 HPLC。色谱柱为日本资生堂 C18 制备色谱柱(250×25 mm, $5\mu\text{m}$),流动相采取与分析 HPLC 相同的梯度条件(见实验方法部分),流速 $20\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 286 nm,进样体积 5 mL,柱温为室温,准确去除保留时间为 15.82 min 的色谱峰(即黄樟醚馏分);将去除的黄樟醚组分合并,合并后的总馏分用正己烷萃取,浓缩至呈油状,即为黄樟醚馏分(记为 C)。其他馏分(中压层析剩余及制备 HPLC 剩余)合并,萃取,浓缩至呈油状,即为北细辛正己烷提取物去除黄樟醚后的总馏分(记为 B)。馏分 A、B、C 实验时分别用 5%吐温-80 配成所需浓度。

二、实验方法与结果

1. 北细辛正己烷提取物中黄樟醚去除前后的成分比较分析

分析 HPLC 条件:Hypersil ODS2 C18 色谱柱(250×4.6 mm, $5\mu\text{m}$,大连依利特公司)。流动相梯度洗脱初始条件为 40%甲醇-水,20 min 升至 100%甲醇,并持续 10 min。流速 $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 286 nm(黄樟醚的紫外最大吸收波长),进样体积 10 μL ,柱温为 35°C 。

北细辛正己烷提取物的 HPLC 分析见图 1(A),与黄樟醚标准品的 HPLC 分析(图略)对照,可以确定图中保留时间为 15.82 min 的色谱峰(标 * 者)为黄樟醚。为了目标去除黄樟醚成分,进行了提取物的高效液相制备色谱分离,采用与分析 HPLC 相同的梯度条件,将保留时间为 15.82 min 的色谱峰(即黄樟醚馏分)另行收集。去除黄樟醚后的总馏分在与提取物相同的分析条件下进行了 HPLC 分析,如图 1(B)所示。在图 1(B)中,除图 1(A)中与黄樟醚未能基线分离的色谱峰强度有所降低外,其它主要的色谱峰都可以观察到,且强度均与图 1(A)中近似相等,但黄樟醚已经基本消失了,这说明经过制备 HPLC 的分离,黄樟醚已经被特异性去除,而其它组分均被保留。

2. 去除黄樟醚前后的急性毒性研究

取健康昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,18~22g,随机分成 12 组,每组 5 只。实验前禁食 16 h,不禁水。采用国家标准规定的霍恩氏法^[4]测定 A、B、C3 个样品灌胃给药后的半数致死量即 LD_{50} 。灌胃后,中毒小鼠主要表现为暂时性兴奋,然后抑制,随意运动减少,翻正反射消失,大部分在 48h 内死亡。未死亡小鼠观察 7d 后处死。解剖死亡小鼠未见肉眼可见病变。与霍恩氏法 LD_{50} 计算用表对照,可以得到 3 个样品的 LD_{50} 值,分别为:A 为 $1.47\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,可信限为 0.951~2.27; B 为 $2.37\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,可信限为 1.48~3.80; C 为 $1.26\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,可信限为 0.775~2.05。结果表明:去除黄樟醚后,北细辛正己烷提取物的半数致死量从 $1.47\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 增加到 $2.37\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,毒性大大减小。切下的黄樟醚馏分毒性最大, LD_{50} 值为

1.26 mL·kg⁻¹。

3. 去除黄樟醚前后对二甲苯所致鼠耳肿胀的抑制作用^[5]

健康昆明种小鼠,18~22g, 雄性, 实验前禁食16h,不禁水。随机分成4组,每组8只,阳性对照灌胃阿司匹林 300 mg·kg⁻¹, A组灌胃 A 0.2 mL·kg⁻¹, B组灌胃 B 0.4 mL·kg⁻¹, 阴性对照组灌胃同体积5%吐温-80(均为 0.4 mL·20kg⁻¹ 体重)。灌胃后1h,小鼠右耳均匀涂二甲苯 0.05 mL致炎,左耳不作处理。4h后断髓处死,沿耳基线剪下双耳,用7 mm打孔器在双侧耳壳同一位置打下圆形耳片,称重。左右耳重量之差为炎症肿胀度。

肿胀抑制率=(阴性对照组重量-给药组重量)/阴性对照组重量×100%

结果如表1,A组肿胀度相对于阴性对照有显著意义(P<0.01),肿胀抑制率为40.00%,提示北细辛正己烷提取物具有明确的抗炎活性;B组肿胀度与阴性对照组相比差异极为显著(P<0.001),肿胀抑制率为84.28%,提示北细辛正己烷提取物去除黄樟醚后的总馏分具有非常明显的抗炎活性,且活性明显高于北细辛正己烷提取物及阳性对照组的阿司匹林(其肿胀抑制率为48.57%)。

三、讨论

本文采用高效液相制备色谱这种现代技术手段对北细辛正己烷提取物中的强毒性成分黄樟醚进行了目标去除,HPLC检测的结果表明采用该方法能特异性去除毒性黄樟醚成分。去除黄樟醚前后北细辛正己烷提取物的急性毒性实验及抗炎活性实验表明,去除黄樟醚后可以显著增大样品的半数致死量,明显增强抗炎作用。其抗

炎活性增强可能与毒性成分去除后有效成分富集和该样品毒性降低后安全剂量范围的增大有关。由于药理实验所需样品量较大,药理实验所用样品是按照文献方法采用中压柱层析结合高效液相制备色谱纯化的方法得到。

总之,高效液相制备色谱目标去除中药毒性成分的方法可以特异性地去除目标成分,与传统的煎煮减毒方法相比具有活性成分损失小、去除效率高、可控性好等特点,能够达到减毒增效的目的,为中药减毒提供了一种现代化的新方法。

参考文献

- 1 李述文.细辛治疗坐骨神经痛.中医杂志,1993,34(7):391.
- 2 蔡国琴,周俊,徐运.除去细辛挥发油中有害物质黄樟醚方法的研究

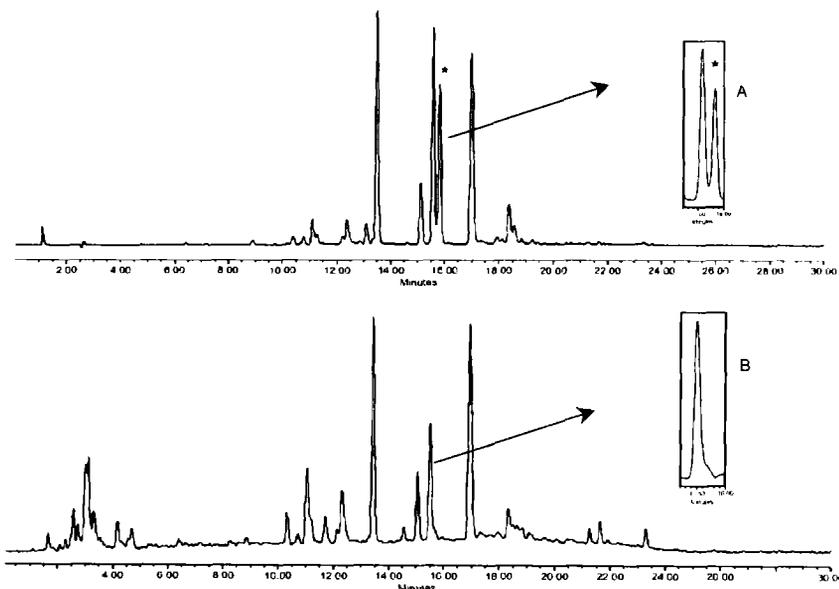


图1 北细辛正己烷提取物(A)、去除黄樟醚后的总馏分(B)的HPLC图

表1 北细辛正己烷提取物去除黄樟醚前后对小鼠二甲苯耳壳炎的作用($\bar{x} \pm s$ n=8)

组别	剂量	肿胀度/mg	肿胀抑制率
阴性对照组	-	7.0±2.6	-
阳性对照组	300 mg/kg	3.6±1.2**	48.57%
A组	0.2 ml/kg	4.2±1.5**	40.00%
B组	0.4 ml/kg	1.1±0.4***	84.28%

与阴性对照组比较:***P<0.001,**P<0.01

- 究.中成药,1997,19(7):37.
- 3 Takasaki M, Konoshima T, Yasuda I, Hamano T, Tokuda H. Inhibitory effects of shouseiryu-to on two-stage carcinogenesis. II. Anti-tumor-promoting activities of lignans from *Asiasarum heterotropoides* var. *mandshuricum*. Biol. Pharm. Bull. 1997, 20(7): 776~780.
- 4 中华人民共和国国家标准. GB 15193.3-2003.
- 5 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学, 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.

A New Method for Detoxication of *Asarum Heterotropoides* Fr. Var.

Mandshuricum (Maxim.) Kitag. of A Chinese Medicinal Plant by Preparative HPLC Technology

Chen MENCHUN, Zhang Feng, Xu Qing, Xiao Hongbin and Liang Xinmiao

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

Objective To get rid of safrole, a toxic component in the Chinese medicinal plant *Asarum Heterotropoides* Fr. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. by preparative HPLC technology. **Method** To take away the strongly toxic safrole from the extract of hexane in *Asarum Heterotropoides* by the preparative HPLC technology and preserve its active constituents and then test the acute toxicity and anti-inflammatory activity of the extracts with and without doing away safrole respectively by Horm's method and the experiment of inducing auricular edema of mice by dimethyl benzene. **Result** The HPLC analysis indicates that safrole is basically done away from the extract. The LD₅₀ value of *Asarum Heterotropoides* rises to 2.37 ml · Kg⁻¹ (with 1.48 ml · Kg⁻¹–3.80 ml · Kg⁻¹ of confidence limit) in extract through desafrole from 1.47 ml · Kg⁻¹ (with 0.951 ml · Kg⁻¹–2.27 ml · Kg⁻¹ of confidence limit) in the extract without desafrole and hence its anti-inflammatory activity can be remarkably strengthened. **Conclusion** The preparative HPLC technology can afford to get away the toxic components of Chinese drugs tangibly while keeping their other active constituents in order to attain the goal of reducing the toxicity and increasing the effect of Chinese medicine.

Key Words: preparative HPLC technology, *Asarum Heterotropoides*; Fr. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag., safrole, reducing; toxicity and increasing effect of Chinese medicine

(责任编辑:左 向, 责任编审:果德安, 责任译审:秦光道)

(Continued from page 16)

Chinese medicine is able to lower down the expression of MMP9 in 24h as well as that of TIMP1 in 48h. **Conclusion** The drug-containing serum prepared from the compound prescription Biejiarangan is able to inhibit the expression of MMP9 of cells in their early stage and reduce epithelial-mesenchymal transformation caused by the damage of MMP9 to the basement of cells in its early stage while lowering down the expression of TIMP1 in its later stage, thus advancing the degradation of cell epimatrix. The role of bilateral adjustment of this Chinese medicine as described above may be one of its mechanisms in the prevention and treatment of interrenal fibrosis.

Key Words: compound prescription Biejiarangan, MMP9, TIMP1, Tubular epithelial cell

(责任编辑:付建华, 责任编审:叶祖光, 责任译审:秦光道)