

金荞麦中原花青素 B₂ 和表儿茶素 在人工胃肠液中的含量变化

盛华刚*, 朱立俏, 张津萌
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:研究金荞麦中原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃肠液中的含量变化,为金荞麦的体内物质基础研究提供依据。方法:采用 HPLC 测定金荞麦提取液中原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃液和人工肠液中的含量变化。结果:原花青素 B₂ 和表儿茶素在酸性的人工胃液中含量的含量随时间延长明显增加,胃蛋白酶对原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量影响不大。原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工肠液 NE(无胰蛋白酶)中含量的含量增加,胰酶能够降低原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量,对原花青素 B₂ 含量影响尤为明显。结论:酸性的人工胃液是引起金荞麦提取液中原花青素 B₂ 和表儿茶素含量上升的主要原因,胰酶与原花青素 B₂ 和表儿茶素发生结合是降低原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量的主要原因。

[关键词] 金荞麦; 原花青素 B₂; 表儿茶素; 人工胃液; 人工肠液

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0077-04

[doi] 10.11653/syfj2014040077

Changes of Procyanidin B₂ and Epicatechin of Fagopyri Dibotryis Rhizoma in Artificial Gastric Juice and Artificial Intestinal Juice

SHENG Hua-gang*, ZHU Li-qiao, ZHANG Jin-meng
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[收稿日期] 20130127(006)

[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(J11LF30)

[通讯作者] * 盛华刚, 讲师, 博士, 从事中药新制剂的研究, Tel:0531-89628590, E-mail:shenghuagang@sina.com

实验过程中所采集的竹叶柴胡样品生长年限有一年及两年,但含量测定结果尚未发现其含量与生长年限间的相关性,且各产地含量差异较大,这可能与产地的生态环境、人工栽培技术等有关,这也证实了中药材规范化种植的重要性,只有严格的进行中药材的规范化种植,才可能保证中药材质量的均一、稳定。

若仅从药效成分含量测定结果来看,竹叶柴胡符合《中国药典》的法定要求,但竹叶柴胡能否作为药典柴胡品种补充,还需进一步将其与药典收录的柴胡品种在药理学等方面进行更为系统的对比研究。

[参考文献]

- [1] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准[S]. 成都:四川出版集团·四川科学技术出版社, 2011:250.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S].

北京:中国医药科技出版社,2010:263.

- [3] 梁之桃,秦民坚,王峥涛. 竹叶柴胡化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报,2003, 34(4):305.
- [4] 林海霞,王书林,王砚,等. HPLC 测定竹叶柴胡中黄酮类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(15):76.
- [5] 汪琼,徐增莱,王年鹤,等. 竹叶柴胡地上部分的化学成分研究[J]. 植物资源与环境学报,2007, 16(4):71.
- [6] 张婷婷,周颈松,王强,等. 竹叶柴胡地上部分指纹图谱研究[J]. 中药材,2011,34(8):1203.
- [7] 王建科,张永萍,李玮,等. 竹叶柴胡药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房,2011,22(47):4462.
- [8] 赵晓辉,蒋福全,周剑波,等. HPLC 法测定柴胡地上部分的黄酮苷元[J]. 分析实验室,2007,26(1):46.
- [9] 林海霞,王砚,孙翠萍,等. 竹叶柴胡规范化种植标准操作规程(SOP)[J]. 中国医药指南,2011, 9(31):380.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] Objective: To study the changes of procyanidin B₂ and epicatechin in artificial gastric juice and artificial intestinal juice. **Method:** The content of procyanidin B₂ and epicatechin in artificial gastric juice and artificial intestinal juice was determined by HPLC. **Result:** The content of procyanidin B₂ and epicatechin in the acidic artificial gastric juice increased significantly with time, and the pepsin had little effect on them. The content of procyanidin B₂ and epicatechin in artificial intestinal juice without trypsin also increased, and the trypsin could reduce the content and had some effect on procyanidin B₂. **Conclusion:** Acidic artificial gastric juice may be the main reason for the increased content of procyanidins B₂ and epicatechin in the Fagopyri Dibotryis Rhizoma extraction, and the binds of pancreatin and procyanidin B₂ and epicatechin may be the main reason of the reduced content.

[Key words] Fagopyri Dibotryis Rhizoma; procyanidin B₂; epicatechin; artificial gastric juice; artificial intestinal juice

金荞麦为蓼科植物 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara 的干燥根茎, 功效清热解毒、排脓祛瘀^[1], 主治咽喉肿痛、痈疮、瘰疬、肝炎、肺痈、胃痛、菌痢、痛经、闭经等。金荞麦提取物具有明显的抗肿瘤作用, 其抗肿瘤活性成分是一类原花色素缩合性单宁混合物, 称为金 E^[2], 主要由(-)-表儿茶素及其二聚体原花青素 B₂ 和多聚体组成。多酚类化合物在体内易受酸、碱、酶等影响, 故需要对其在胃肠道环境中的含量变化进行研究。采用人工胃、肠液在体外模拟体内消化道环境的试验方法被广泛应用^[3-7]。前期研究表明 AB-8 型大孔树脂对金荞麦中有效成分具有较好的纯化效果^[8]。本文对金荞麦提取液中的原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃液、人工胃液 NE(无胃蛋白酶)、人工肠液、人工肠液 NE(无胰蛋白酶)等体外模拟胃肠道条件下的含量变化进行考察, 为进一步阐明金荞麦的体内药效物质提供参考。

1 材料

日立 L-2000 型高效液相色谱仪(日本日立公司), Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), AB-8 型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司)。表儿茶素对照品(供含测用, 批号 878-2001102) 购于中国药品生物制品检定所; 原花青素 B₂(供含测用, 天津尖峰天然产物研究开发有限公司)。金荞麦药材购自济南建联中药店, 经山东中医药大学周凤琴教授鉴定。乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试液的配制

2.1.1 人工胃液的配制^[1] 取稀盐酸 16.4 mL, 加水约 800 mL 与胃蛋白酶 10 g 加水稀释成 1 000 mL, 即得。

2.1.2 人工胃液 NE 的配制 取稀盐酸 16.4 mL,

加水稀释成 1 000 mL, 即得。

2.1.3 人工肠液的配制^[4] 取磷酸二氢钾 6.8 g, 加水 500 mL 使溶解, 用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 6.8; 另取胰酶 10 g, 加水适量使溶解, 将两液混合后, 加水稀释至 1 000 mL, 即得。

2.1.4 人工肠液 NE 的配制 取磷酸二氢钾 6.8 g, 加水 500 mL 使溶解, 用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 6.8, 加水稀释至 1 000 mL, 即得。

2.2 供试品溶液的制备 金荞麦粉碎成粗粉, 加 70% 乙醇, 加热回流提取 3 次, 第 1 次加 10 倍量, 提取 3 h, 第 2 次加 5 倍量, 提取 1.5 h, 第 3 次加 5 倍量, 提取 1.5 h, 合并提取液, 回收乙醇, 浓缩, 加水定容至浓度为 1 mL 相当于生药材 0.2 g, 摇匀, 作为上样药液。上样药液 15 mL 通过大孔树脂柱(1.5 cm × 11 cm), 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 用 100 mL 水洗脱, 弃去水洗脱液, 而后用 100 mL 70% 乙醇洗脱^[3], 收集洗脱液, 洗脱液流速为 0.5 mL·min⁻¹, 洗脱液蒸干, 残渣加甲醇转移至 5 mL 量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量测定

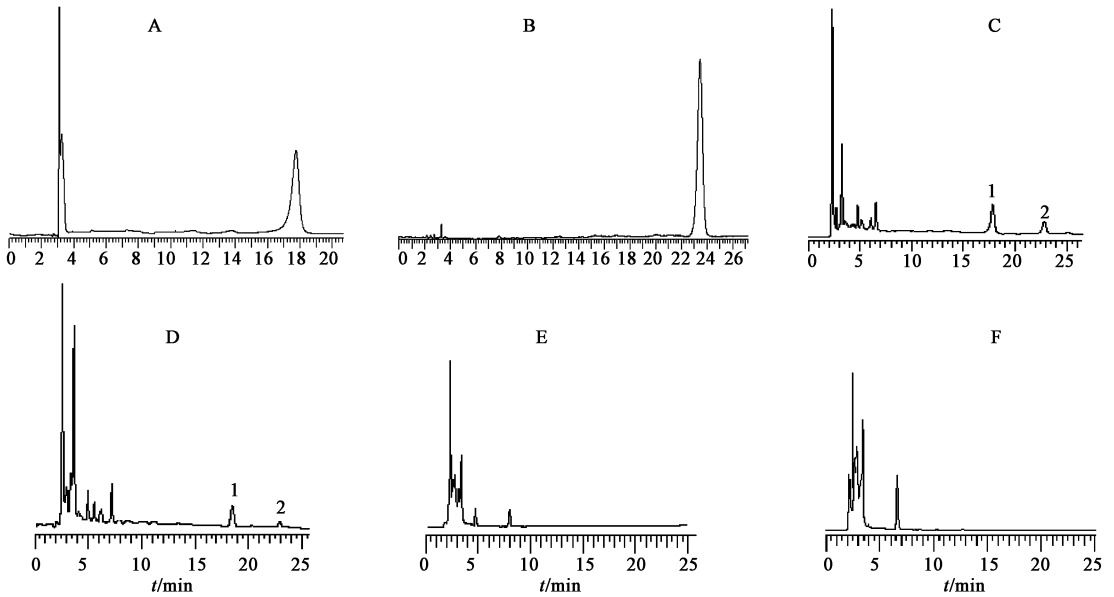
2.3.1 色谱条件 流动相乙腈-0.01% 磷酸溶液(10:90), 检测波长 280 nm, 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。

2.3.2 表儿茶素标准曲线的绘制 精密称量表儿茶素对照品 7.60 mg 置 50 mL 量瓶, 加乙腈-0.01% 磷酸溶液(10:90)溶解并稀释至刻度, 摇匀。再分别精密量取上述对照品溶液 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈-0.01% 磷酸溶液(10:90)至刻度。吸取各溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪。结果表儿茶素在 3.8 ~ 91.2 mg·L⁻¹ 呈较好的线性关系, 回归方程 $Y = 5\,583.3X - 1\,330$ ($r = 0.999\,8$)。

2.3.3 原花青素 B₂ 标准曲线的绘制 精密称量原花青素 B₂ 对照品 5.63 mg 置 25 mL 量瓶中,加乙腈-0.01% 磷酸溶液(10:90)溶解并稀释至刻度,摇匀。再分别精密量取上述对照品溶液 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 5 mL 置 5 mL 量瓶中,加乙腈-0.01% 磷酸溶液(10:90)至刻度。各吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪,测定峰面积。结果原花青素 B₂ 在 11.26 ~ 225.2 mg·L⁻¹ 呈较好的线性关系,回归方程

$$Y = 843.5X + 415.8 (r = 0.9999)$$

2.3.4 专属性考察 吸取人工胃液混合对照品溶液、人工肠液混合对照品溶液、空白人工胃液、空白人工肠液 2 mL(用 0.45 μm 滤膜过滤),用甲醇稀释至 5 mL,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过。再分别吸取原花青素 B₂ 对照品溶液、表儿茶素对照品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,结果空白人工胃肠液没有相应峰,说明人工胃肠液没有干扰。结果见图 1。



A. 原花青素 B₂; B. 表儿茶素; C. 人工胃液; D. 人工肠液; E. 空白人工胃液; F. 空白人工肠液; 1. 原花青素 B₂; 2. 表儿茶素

图 1 不同溶液中原花青素 B₂ 及表儿茶素的 HPLC

2.3.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,按 2.3.1 项下方法连续测定 6 次,结果原花青素 B₂、表儿茶素峰面积 RSD 分别为 1.22%, 1.75%。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,按 2.3.1 项下方法测定,结果原花青素 B₂、表儿茶素在 12 h 内均稳定,峰面积 RSD 分别为 1.93%, 2.07%, 说明供试品在 12 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 精密吸取同一供试品溶液,连续取样 5 次,按 2.3.1 项下方法测定,结果原花青素 B₂、表儿茶素 RSD 分别为 2.32%, 1.60%。

2.3.8 回收率试验 采用加样回收率试验,结果原花青素 B₂ 平均加样回收率为 99.2%, RSD 为 2.13%; 表儿茶素平均加样回收率 101.5%, RSD 为 1.08%。

2.3.9 供试品溶液中原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量测定 精密吸取 2.2 项下供试品溶液 0.5 mL 置 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,微孔滤膜

(0.45 μm) 滤过,续滤液测定含量。结果供试品溶液中原花青素 B₂ 含量为 500.92 mg·L⁻¹, 表儿茶素含量为 29.71 mg·L⁻¹。

2.4 原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃肠液中的含量变化 精密吸取 2.2 项下供试品溶液 5 mL, 共 5 份, 置于 25 mL 量瓶中, 分别加甲醇、人工胃液、人工胃液 NE、人工肠液、人工肠液 NE 至刻度, 摇匀。人工胃肠液样品置于 37 °C 水浴中, 于不同时间点取样 5 mL, 滤过, 取续滤液 2 mL 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 测定原花青素 B₂ 和表儿茶素含量, 与甲醇定容样品液相比较, 计算百分含量变化。见表 1, 2。

表 1 原花青素 B₂ 在人工胃肠液中的含量变化 (n=3) %

t/h	人工胃液	人工胃液 NE	t/h	人工肠液	人工肠液 NE
0	100	100	0	100	100
0.5	118	166	1	16	144
1	258	328	2	17	144
2	289	348	4	17	168
3	278	314	8	19	166
4	302	333	24	20	159

表 2 表儿茶素在人工胃肠液中的含量变化 (n=3) %

t/h	人工胃液	人工胃液 NE	t/h	人工肠液	人工肠液 NE
0	100	100	0	100	100
0.5	284	269	1	62	239
1	587	591	2	72	239
2	650	709	4	119	242
3	705	735	8	124	219
4	792	789	24	99	209

由表 1,2 可知,原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃液的酸性环境中含量随时间延长明显增加,胃蛋白酶对原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量影响不大。原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工肠液 NE 中含量也会增加,含有胰酶的人工肠液能够明显降低原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量,对原花青素 B₂ 含量影响尤为明显。

3 讨论

原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃液 NE 和人工胃液中含量明显提高,这可能与金荞麦中所含的(-)-表儿茶素多聚体在酸性条件下发生分解,生成表儿茶素及其二聚体原花青素 B₂ 有关,这也反映出原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃液中稳定性较好。胃蛋白酶不是影响原花青素 B₂ 和表儿茶素含量变化的主要因素,人工胃液的酸性环境才是引起金荞麦提取液中原花青素 B₂ 和表儿茶素含量上升的主要原因。

原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工肠液 NE 中含量也呈现增加趋势,4 h 含量达到最高,随后逐步降低,这表明金荞麦中所含的(-)-表儿茶素多聚体在人工肠液 NE 的 pH 条件下会发生少量分解,生成原花青素 B₂ 和表儿茶素。原花青素 B₂ 在人工肠液中含量明显降低,24 h 以内处于 20% 以下;表儿茶素在人工肠液中含量也无明显增加,4 h 前含量处于较低水平,但这并不表明人工肠液中的胰酶能够降解原花青素 B₂ 和表儿茶素。试验发现,供试品溶

液 0.5 mL 加入人工肠液定容后会产生明显浑浊,这说明胰酶可能与原花青素 B₂ 和表儿茶素发生结合,降低了溶液中原花青素 B₂ 和表儿茶素的含量,此作用可能会影响到原花青素 B₂ 和表儿茶素的体内作用。

药物在胃肠道环境下的稳定性测定是药物研发过程中重要的研究步骤,尤其对中药中含有不稳定基团的同类化合物,制成口服制剂时研究其在胃肠道中的含量变化是非常必要的。通过人工胃肠液的体外模拟,可以对金荞麦中含有的多酚类化合物原花青素 B₂ 和表儿茶素在胃肠道的含量变化进行初步评价,为金荞麦的体内物质基础研究提供参考,在体内的具体含量变化情况尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:203,附录ⅩⅢA:72.
- [2] 陈晓峰,顾振纶. 金荞麦抗肿瘤作用研究进展[J]. 中草药,2000,31(9):715.
- [3] 江慎华,蔡志鹏,廖亮,等. 丁香抗氧化活性物质提取及人工胃肠液对其活性的影响[J]. 农业机械学报,2012,43(7):149.
- [4] 陆景坤,陈朝军,周昊菲,等. 寒水石生品、炮制品在人工胃肠液中的溶出率[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):23.
- [5] 彭文,刘文洁,曾里,等. 灵芝孢子粉多糖在人工胃肠液中溶出率的研究[J]. 食品工业,2008,29(4):14.
- [6] 肖瑶,曹俊涵,赵书文,等. 盐酸美金刚胺前药 MeN-1 和 MeN-2 在人工胃肠液中的稳定性研究[J]. 华西药理学杂志,2011,26(4):389.
- [7] 朱礼根,鲁传华,林腾,等. 醇溶蛋白在人工胃肠液中降解性及其对苦参碱释药行为的影响[J]. 安徽中医学院学报,2010,29(1):70.
- [8] 盛华刚,朱立俏. 不同型号大孔树脂对金荞麦中有效成分的纯化工艺考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):16.

[责任编辑 邹晓翠]