

一种用于追踪中药有效成分(群)的组合式色谱柱及其初步应用

周元雳, 龙飞*, 卫莹芳, 董小萍, 吴纯洁, 凌智群

成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室一省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137

摘要:为追踪中药(天然药物)活性成分(群),同时提高传统柱色谱的分离效率,课题组研制出一套组合式色谱柱。该装置由至少2根分离小柱组合而成,分离小柱间通过密封固定器上下连通,小柱的材质为石英玻璃,长度、数量可根据实际需要进行定制。该装置结构简单、易操作,可快速分离得该中药(天然药物)的各类成分(群),为基于“多组分,多靶点”的中药(天然药物)活性研究,方便快速地提供“多组分”。本文将该装置用于中药厚朴的成分分离与活性部位追踪,结合药效学实验,初筛得厚朴“下气除满”功效的活性部位。

关键词:组合式色谱柱;中药;天然药物;活性成分(群);分离;追踪;厚朴

中图分类号: O657.71

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.029

A Combined Column Chromatography for Tracking Active Ingredients (group) of Chinese Medicine and Its Preliminary Application

ZHOU Yuan-li, LONG Fei*, WEI Ying-fang, DONG Xiao-ping, WU Chun-jie, LING Zhi-qun

Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine; Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—Key Laboratory Breeding Base Co-founded by Sichuan Province and Chinese Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China

Abstract: A combined column chromatography is developed which is assembled by at least two columns and one connector with the sealing rings. Each of the two tubes is linked by connector. The column is made of quartz glass. The length and quantity of the column can be adjusted according to different aims. The device is used for preliminary separation and active compounds tracking of *Magnoliae officinalis* Cortex in this study and active compounds have been screened by using this device. It could provide a new method for tracking active compounds of TCMs and Natural drugs.

Key words: combined column chromatography; TCMs; natural drugs; active compounds; separation; tracking; *Magnoliae officinalis* Cortex

近几十年来,我国色谱学科在色谱基础理论、分离分析方法与技术、新型色谱柱和富集材料等相关开发与应用方面取得了许多有价值的研究成果。而色谱作为一种常用的分离分析手段,也在生命科学、环境科学、药学等领域发挥着越来越重要的作用^[1-4]。尤其是在中药或天然药物研究中,目前主要是运用 TLC、HPLC 等色谱或色谱联用技术研究其药效物质基础^[5-7]。经典的做法是先将中药(天然药物)通过溶剂萃取,分为不同极性部位,进行药理

初步筛选,采用经典柱色谱对活性部位进行分离、精制,得若干单体化合物,再将这些化合物逐一进行药效验证,确定其活性。但实际情况往往是投入大量人力物力分离得到的化合物单体的活性与该中药功效或天然药物药效的相关性不佳,究其原因,是中药(天然药物)的化学成分十分复杂,药效作用不单是某一个或几个化学成分,而是多个化学组分与人体内多个相应受体进行作用的综合反应结果,导致中药药理作用的多样性、复杂性和广泛性。目前中药(天然药物)研究正朝着“多组分,多靶点”新模式转变,而不是沿用“单成分、单靶点”的旧模式^[8,9]。为更便于追踪中药(天然产物)有效成分(群),本研究

发明了一种组合式色谱柱^[10],可快速分离得该中药(天然药物)的各类化学成分部位群,为基于“多组分,多靶点”的中药(天然药物)活性研究方便快速地提供“多组分”;同时可将各组分进行药理实验,初筛出活性部位,再进行数次“色谱分离-药理筛选”,直至追踪到其有效成分(群)。

1 装置设计

该组合式色谱柱至少由2根分离小柱组合而成,分离小柱间通过密封固定器上下连通,固定座上设有固定支架;最底端的分离小柱底部设有放液阀。分离小柱的长度、数量可根据不同实验需要作出适应性调节。分离小柱的材质为石英。密封固定器由中空固定座和置于固定座内的密封圈组成;固定座材质为聚四氟乙烯,内壁上有一环状凸起,2条密封圈分别置于环状凸起两端;分离小柱和密封圈的外径均与固定座内径适配。环状凸起、密封圈和分离小柱三者的内径相同,保证该组合式色谱柱内壁光滑,减少管壁效应(装置简图参见图1)。

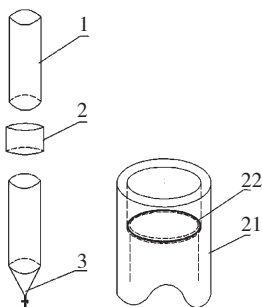


图1 设备简图

Fig. 1 Equipment diagram

2 应用实例

课题组将该装置运用于厚朴促胃肠运动物质基础初步研究,方法如下:

2.1 柱色谱操作

取3根分离小柱,组装备用,从下至上,分别以1,2,3编号。固定相为硅胶(100目),湿法装柱,干法上样,洗脱系统为石油醚:乙酸乙酯1:3。洗脱至前沿色带达柱子底端时,关闭阀门,停止洗脱,拆卸小柱。乙醇超声提取各柱中硅胶吸附物至提取液无色,浓缩,分别得A1、A2、A3样品。将剩余上柱样品取出,同法提取、浓缩,得样品A0。

2.2 胃肠推进药效学实验^[9-13]

营养性半固体糊的制备 取10 g 羧甲基纤维

素钠,溶于250 mL蒸馏水中,分别加入16 g奶粉,8 g淀粉和2 g活性炭末,搅拌均匀,配制成300 mL,约300 g的黑色半固体糊状物,冰箱冷藏,用时恢复至室温。

动物分组及试验 将110只SPF级小鼠(雌雄各半,20±2 g)按性别分为共11组,即空白组、阳性药组、A0-A3各2个剂量组(含生药量分别为0.75、1.5 g/kg,相当于人最高给药剂量的5、10倍)、药材水提组,每组10只。实验前一天小鼠禁食18 h,末次给药,20 min后给予小鼠营养性半固体糊(碳粉末)0.3 mL/只。20 min后脱颈处死,处死的小鼠腹腔剖开,结扎胃贲门和幽门,取胃,用滤纸拭干后称取全重,然后沿胃大弯剪开胃体,洗去胃内容物后拭干,称净重。计算胃残留率(%)=[(胃全重-胃干重)/半固体营养糊重0.539g]×100%。并将至盲肠处取出的小肠,不加牵引的平铺于洒有水的玻璃板上,分别量取自幽门括约肌至碳糊最前端及至盲肠的距离。计算小肠推进率(%)=[碳糊移动距离/幽盲至盲肠的长度]×100%。用SPSS 17.0软件对各组的胃残留率及肠推进率进行单因素方差分析,结果见表1。

3 结果与讨论

柱色谱是中药(天然药物)成分分离的有力手段,也是医药化工研究开发和生产应用的重要常规装置。本课题组设计该组合式色谱柱的目的是便于追踪中药(天然产物)有效成分(群),同时提高洗脱效率。中药(天然产物)所含的各类型化学成分对于不同的色谱系统,其分离、扩散、分配、吸附等行为特征不同,导致被洗脱过程中,在各分离小柱中的相对浓度不同(如洗脱系统或者分离小柱的规格选择适当,理论上可将不同成分群分配到不同分离小柱),将小柱中提取物进行药理实验筛选活性部位,再进行“色谱分离-药理实验”(根据需要进行数次),直至追踪到有效成分(群),各步骤均可重复和追溯。常规柱色谱分离通常用一根单柱,各化学成分(群)通过洗脱从色谱柱底端流出,研究人员通过TLC检识,合并流分,再上柱再洗脱,直至分离得化合物单体,洗脱时间较长且耗费试剂。

最初的柱色谱分离技术也曾采用柱体切割法对色谱柱(尼龙材质)进行切割、分段,可操作性和重复性不佳,且尼龙也对有机溶剂有一定溶解性。该装置中的分离小柱长度和内径可根据实际需求调

表1 厚朴不同部位对小鼠肠推进和胃排空影响

Table 1 Effect of intestinal propulsion and gastric emptying caused by different extractions of *M. officinalis*

组别 Group	肠推进率 Intestinal propulsion rate	胃残留率 Gastric remnant rate	肠推进差异 P Difference of intestinal propulsion(P)	胃排空差异性 P Difference of Gastric remnant(P)
空白组 BG	56.21% ± 1.80%	73.49% ± 1.35%		
对照组 CG	71.52% ± 2.36% *	53.12% ± 3.60% *	0.014	0.03
A1 高剂量组 HDG	69.62% ± 3.20%	58.12% ± 1.75%	0.066	0.176
低剂量组 LDG	72.82% ± 2.08% **	56.32% ± 4.41% *	0.005	0.04
A2 高剂量组 HDG	68.44% ± 1.52%	55.85% ± 2.30%	0.051	0.062
低剂量组 LDG	71.37% ± 1.08% **	52.17% ± 7.35% *	0.009	0.043
A3 高剂量组 HDG	67.78% ± 1.71%	60.22% ± 4.04%	0.089	0.094
低剂量组 LDG	71.45% ± 1.21% *	60.42% ± 3.95%	0.016	0.166
A0 高剂量组 HDG	65.67% ± 2.25%	62.90% ± 3.79%	0.126	0.259
低剂量组 LDG	71.54% ± 1.62% *	49.57% ± 4.91% *	0.015	0.011
水提组 Water extraction group	78.28% ± 2.77% **	49.57% ± 4.92%	0.001	0.268

注:与空白组比较,计量资料以均数 ± 标准差表示,统计数据采用单因素方差分析以 * $P < 0.05$ 为有显著差异,以 ** $P < 0.01$ 为有极显著差异。
Note: compared with BG, data was shown in Mean ± SD, * $P < 0.05$ indicated significant difference, ** $P < 0.01$ indicated extremely significant difference.

整,小柱间通过密封固定器联接,易安装,洗脱后易拆卸;分离小柱柱体为石英材质,如被洗脱成分(成分群)有紫外吸收,可通过紫外光灯进行在线定位;固定相根据不同分离需求,可为硅胶、氧化铝、离子交换树脂、聚酰胺、凝胶或大孔吸附树脂等填料。利用以上特性,能让研究者快速对中药(天然药物)目标成分(群)进行分离和富集,且可控性、重现性良好。此外,还可尝试用于中药(天然药物)制剂的工艺研究和生产,提高生产效率。

运用该装置进行厚朴促胃肠运动物质基础的初步研究中,由表1可知,吗丁啉组,即阳性对照组和部分低剂量组有显著差异。在肠推进方面,A1-低剂量组,A2-低剂量组及药材水提组均有极显著差异。同时,各段洗脱物进行TLC和GC-MS检测结果表明各段洗脱物成分(群)有较大差异性。课题组正将所得活性部位重复进行“组合式色谱柱分离-药效筛选”实验,并结合LC-MS等手段追踪有效成分(群),进一步探索厚朴“下气除满”功效的物质基础。

中药(天然药物)的活性有可能是不同类型的成分(群)共同作用的结果而不是某个单一成分。运用该装置可快速得到不同类型的成分群,且操作简易,可重复,可追溯。为追踪中药(天然药物)活性成分(群)提供了一种新方法,也为探究中药(天然药物)的有效作用机制提供了一个平台。

课题组正对装置结构进行优化,分离小柱选择不同填料,并结合紫外、红外光谱,尝试进行了易混

淆中药、不同炮制规格中药饮片、不同产地同种药材等的快速定性鉴别初步研究。目前,已在中药“白芍-赤芍”,“厚朴-姜朴”快速定性鉴别方面取得一定进展。

参考文献

- 1 Da SL(达世禄). Introduction to chromatography(色谱学导论). Wuhan: Wuhan University Press, 1999.
- 2 Liu GQ(刘国詮), Yu ZL(余兆楼). Column technology(色谱柱技术). Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- 3 Zhang XM(张祥民), Zhang LH(张丽华), Zhang YK(张玉奎). Recent advances of chromatographic in China. *J Chromatogr A* (色谱), 2012, 30: 222-231.
- 4 Yang J(杨洁), Suo XD(索习东). Research progress of hyphenated chromatographic techniques. *Shanghai Chemical Industry* (上海化工), 2012, 37(1): 28-30.
- 5 Tu PF(屠鹏飞), Shi SP(史社坡), Jiang Y(姜勇). Strategies and approaches on exploring material basis of Chinese materia medica. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43: 209-215.
- 6 Xu R(许睿), Wei S(韦松). Progress in recent 20 years in the extraction and separation of chemical constituents from traditional Chinese. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2006, 28: 1646-1651.
- 7 Zhang W(张威), Liu J(刘嘉), Yang HJ(杨海军), et al. Characterization of the overall properties with multiple components of traditional Chinese medicine. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 2015, 32: 125-128.