

# 锁阳药材质量标准研究

刘增根<sup>1,2</sup> 党军<sup>1,2</sup> 江磊<sup>1,2</sup> 邵赞<sup>1\*</sup> 梅丽娟<sup>1</sup> 陶燕铎<sup>1</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 目的 对锁阳药材的质量标准进行研究, 着重建立锁阳中的儿茶素含量测定方法和 TLC 鉴别方法。方法 采用 TLC 法定性鉴别锁阳; 按《中国药典》规定方法检测锁阳的水分、总灰分、水溶性浸出物及醇溶性浸出物; 采用 HPLC 法建立锁阳中儿茶素的含量测定方法。结果 HPLC 法测定, 儿茶素在 0.2 ~ 2.4  $\mu\text{g}$  ( $r=0.9998$ ) 范围内线性关系良好, 平均回收率为 100.25%  $RSD$  为 1.67%; 确定了锁阳药材中水分、灰分、浸出物及儿茶素的含量限度; TLC 鉴别结果满意。结论 该方法可以准确地进行定性、定量检测, 操作简便快速、结果可靠、重复性好, 可完善 2010 年版《中国药典》(I 部), 并有效控制锁阳的质量。

**关键词:** 锁阳; 高效液相色谱法; 质量标准; 儿茶素; 熊果酸

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2012.03.042

中图分类号: R283; R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2012)03-0609-02

锁阳 *Cynomorium songaricum* Rupr. 又名不老药、地毛球、锈铁棒, 为锁阳科锁阳属 *Cynomorium* L. 寄生植物锁阳的干燥肉质茎, 常寄生于蒺藜科白刺属 *Nitraria* L. 植物根部, 多生长于干旱与盐碱的沙地, 主产于内蒙古、甘肃、青海、新疆等西北部地区, 是中蒙药中的常用药。锁阳味甘性温, 具有补肾益精、润肠养筋之功效, 中医用于治疗阳痿、遗精、不孕、腰膝酸软、肠燥便秘等<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明, 锁阳具有提高机体免疫力、清除自由基、抑制人体免疫缺陷病毒<sup>[2,3]</sup>、抑制血小板聚集<sup>[4]</sup>等多种药理活性。根据其主要的药理作用, 常艳旭等<sup>[5]</sup>认为锁阳中以儿茶素为代表的黄酮类, 熊果酸为代表的三萜类, 多糖及鞣质可以看作是指标性成分。《中国药典》(I 部) 2010 年版中锁阳含量测定指标未给予描述, 不利于有效控制锁阳药材的质量。为此, 我们采用反相高效液相色谱法建立了锁阳药材中儿茶素的含量测定方法, 同时规定了其含量限度, 并建立了锁阳药材的 TLC 鉴别方法, 从而进一步完善其相关质量标准, 为更好的开发利用锁阳药材这一西北地区丰富资源提供科学指导。

## 1 仪器与材料

SK5200HP 科导超声波清洗器; WP800SL23-2 微波实验仪 (带回流、磁力搅拌); UPT-1-5 优普超纯水机; RE-52 旋转蒸发仪; HH-6 数显恒温水浴锅; Agilent1200LC 高效液相色谱仪; AG204 电子分析天平; 101A-2E 电热鼓风干燥箱; 硅胶 HSGF254 薄层板 (烟台市芝罘黄务硅胶开发实验厂)。儿茶素对照品 (批号为 877-200001, 中国药品生物制品检定所); 熊果酸对照品 (批号为 110709-200304, 中国药品生物制品检定所); 甲醇 (色谱纯, 山东禹王试剂公司); 超纯水; 磷酸 (优级纯, 天津兴华化学试剂厂); 其余试剂均为分析纯。

锁阳药材分 10 批, 于 2010 年 7 月采自青海、甘肃、内蒙古等西北部地区。经中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟高级工程师鉴定为锁阳 *Cynomorium songaricum* Rupr.。

收稿日期: 2011-02-23; 修订日期: 2011-10-20

基金项目: 国家科技部科技支撑计划 (No. 2007BA145B00)

作者简介: 刘增根 (1987-), 男 (汉族), 江西萍乡人, 现任中国科学院西北高原生物研究所在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事天然药物化学及药物分析研究工作。

\* 通讯作者简介: 邵赞 (1962-), 女 (汉族), 安徽宿县人, 现任中科院西北高原生物研究所研究员, 博士学位, 主要从事天然药物化学及药物分析研究工作。

## 2 方法与结果

**2.1 薄层鉴别** 准确称取干燥锁阳粉末 (过 40 目筛) 适量置 100 ml 烧杯中, 按料液比 1: 15 (锁阳质量与溶剂之比  $g: ml$ ) 加入醋酸乙酯, 超声提取 40 min, 趁热过滤, 滤液减压浓缩至 1 ml, 作为样品溶液。另取熊果酸对照品, 加入甲醇制成每毫升含 0.5 mg 熊果酸的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法试验, 用毛细管吸取 0.5 mg/ml 的熊果酸对照品溶液和样品溶液适量, 分别点于同一硅胶 HSGF254 薄层板上, 以甲苯-醋酸乙酯-甲酸-水 (20: 5: 1: 0.5) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同的浅紫红色斑点。薄层色谱图如图 1 所示, 其中  $R_f$  值为 0.33。



1 2 4 5. 供试品 3. 对照品

图 1 薄层色谱图

**2.2 水分、灰分检查** 依据《中国药典》2010 年版 (I 部) 附录规定的水分测定法第 1 法 (烘干法)、灰分测定法, 对锁阳 10 个批次样品进行水分、总灰分的测定。结果见表 1。依照《中国药典》中药质量标准研究制定技术要求, 并根据表 1 测定结果, 按其平均值的  $\pm 20\%$  作为限度的制定幅度, 初步制定限量标准: 水分不得过 12.0%, 总灰分不得过 14.0%。

**2.3 浸出物测定** 依据《中国药典》2010 年版 (I 部) 附录规定的水溶性浸出物测定法项下的冷浸法、醇溶性浸出物测定法项下的热浸法, 对锁阳 10 个批次样品进行水溶性浸出物、醇溶性浸出物的测定。测定结果见表 1。根据表 1 测定结果, 依照《中国药典》中药质量标准研究制定技术要求, 按其平均值的  $\pm 20\%$  作为限度的制定幅度, 初步制定限量标准: 水溶性浸出物不得少于 15.0%, 醇溶性 (95% 乙醇) 浸出物不得少于 14.0%。

## 2.4 儿茶素含量测定

**2.4.1 色谱条件及系统适应性试验** 色谱柱为 PLATISIL<sup>TM</sup>-ODS (250 mm  $\times$  4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈-0.3% 磷酸溶液

(10: 90); 流速 1.0 ml/min; 柱温 30℃; 检测波长 210 nm; 理论塔板数按儿茶素峰计算应不低于 3 000。

**2.4.2 儿茶素对照品溶液的制备** 精密称取儿茶素对照品 2.0 mg 置于 10 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 0.2 mg/ml 的儿茶素对照品溶液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜后作为对照品溶液。

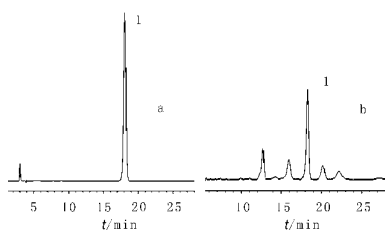
表 1 锁阳药材中水分、灰分及浸出物测定结果 %

样品批号	水分	总灰分	水溶性浸出物	醇溶性浸出物
100701	8.94	11.02	18.95	17.42
100702	8.79	11.15	18.91	17.65
100703	9.10	11.16	19.36	16.96
100704	9.23	10.33	19.33	16.87
100705	9.19	11.28	17.81	18.45
100706	9.43	11.50	19.10	18.75
100707	10.58	10.59	20.08	17.86
100708	9.67	12.07	18.22	18.01
100709	9.92	11.76	19.45	18.90
100710	9.80	10.62	18.96	18.41
平均值	9.47	11.15	19.02	17.93
幅度	7.58~11.37	8.92~13.38	15.22~22.83	14.35~21.52

n = 2

**2.4.3 供试品溶液的制备** 准确称取干燥锁阳粉末(过 40 目筛)适量, 置 250 ml 平底烧瓶中, 按料液比 1: 6(g: ml) 加入 70% 乙醇, 室温浸泡约 60 min 后微波加热回流提取 16 min。趁热过滤, 取滤渣, 再在相同条件下微波回流提取 1 次, 趁热过滤, 收集 2 次过滤液减压浓缩至小体积后, 加甲醇定容至 25 ml, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

**2.4.4 线性关系考察** 分别精密吸取对照品溶液 1.0 2.0 4.0, 5.0 6.0 8.0 10.0 12.0 μl, 按上述色谱条件依次进样, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程为:  $Y = 8991.2X + 156.27$  ( $r = 0.9998$ ), 儿茶素在 0.2 ~ 2.4 μg 范围内成良好的线性关系。对照品溶液与供试品溶液高效液相色谱图见图 2。



a - 对照品溶液 b - 供试品溶液 1. 儿茶素(catechin)

图 2 高效液相色谱图

**2.4.5 精密度实验** 分别精密吸取上述对照品溶液 5.0 μl, 按上述色谱条件日内连续进样 5 次, 并测定 5 d, 记录儿茶素的峰面积。计算儿茶素的日内、日间 RSD 分别为 0.81% 和 1.03% (n = 5), 表明仪器精密度良好。

**2.4.6 重复性实验** 取同一批样品(批号为 100709) 按供试品溶液制备方法制备 5 份供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 5.0 μl, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录儿茶素的峰面积。计算儿茶素含量的 RSD 为 1.06% (n = 5), 表明实验方法的重复性良好。

**2.4.7 稳定性实验** 取重复性试验下的同一供试品溶液, 分别在 2 6 8 12 16 24 h 后按上述色谱条件测定, 记录儿茶素的峰面积, 计算儿茶素峰的保留时间和相对峰面积。结果表明, 儿茶素峰相对保留时间和相对峰面积稳定, 计算 RSD 分别为 1.43% 和

1.58% (n = 6), 表明样品溶液至少在 24 h 内稳定。

**2.4.8 加样回收率实验** 采用加样回收法。取同一批样品(批号为 100709) 适量, 精密称定, 共 5 份, 分别置 250 ml 烧瓶中, 精确加入一定量的儿茶素对照品溶液(0.2 mg/ml), 按样品测定方法测定。结果见表 2。

表 2 回收率实验结果

样品含量	加入量	实测量	回收率	平均回收率	RSD
m/mg	m/mg	m/mg	(%)	(%)	(%)
0.025 5	0.020 0	0.045 8	101.50	100.25	
0.025 2	0.020 0	0.0449	98.50		
0.024 9	0.040 0	0.064 7	99.50	1.67	
0.025 3	0.040 0	0.065 0	99.25		
0.025 0	0.080 0	0.107 0	102.50		

n = 5

**2.4.9 样品儿茶素测定** 依“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液与不同批次供试品溶液各 5 μl, 注入色谱仪, 按外标法计算每批样品中儿茶素含量。结果见表 3。

表 3 含量测定结果

采集地点	样品批号	海拔 /m	含量(%)
内蒙古阿拉善右旗	100701	1 612	0.140
内蒙古阿拉善左旗	100 702	1310	0.169
甘肃民勤	100703	1 377	0.197
甘肃永登	100704	2 184	0.172
甘肃武威	100705	1 535	0.145
甘肃永昌	100706	1 530	0.156
青海大通	100707	2 514	0.144
青海巴隆	100708	3 006	0.191
青海都兰	100709	3 518	0.248
青海诺木洪农场	100710	2792	0.212

### 3 讨论

**3.1 原料选择** 锁阳多生长于干旱与盐碱的沙地, 因我国西北部地区有其独特的资源地理环境优势, 所产锁阳药材质量较好, 所以作者选择了青海、甘肃、内蒙古等不同地点的 10 批次锁阳药材作为样品, 进行了相关质量标准研究, 综合考虑, 规定锁阳药材中儿茶素的含量不得低于 0.1%。

### 3.2 HPLC 法及 TLC 鉴别讨论

**3.2.1 提取方法的选择** 比较了乙醇加热回流提取法、乙醇微波回流提取法(带磁力搅拌)和乙醇超声提取法 3 种提取法。结果表明, 10 批次药材微波法提取率均大于加热回流法和超声提取法, 而且与其他提取方法相比, 微波提取法热效率高、升温快速而均匀, 能显著缩短提取时间、提高效率, 而且操作简便快捷, 溶剂消耗及废物产生量低, 故而被广泛用于天然植物活性物质的提取中<sup>[6]</sup>。实验过程中比较了提取时间(8, 12, 16 min)、料液比(1: 6, 1: 10, 1: 14)和乙醇浓度(60%、70%、80%)对锁阳儿茶素提取率的影响。结果表明提取时间 16 min、料液比 1: 6 时提取率相对稍高, 而乙醇浓度为 70% 时提取率高于 60% 和 80%, 因此, 采用微波提取法, 乙醇浓度为 70%、料液比为 1: 6 时提取 16 min 对样品进行提取制样。

**3.2.2 色谱条件的优化** 本实验通过摸索乙腈与磷酸水溶液、甲醇与磷酸水溶液按一定比例混合作为流动相, 考察其分离度, 结果以乙腈-0.3% 磷酸水溶液(10: 90)为流动相, 流速 1.0 ml/min, 柱温 30℃ 的色谱条件下样品中儿茶素峰与其他共存组分峰能达到良好的分离。故本实验最终确定此色谱条件。

**3.2.3 TLC 鉴别** 本实验以熊果酸为对照品对锁阳药材进行薄层定性鉴定, 操作简便、结果可靠, 薄层色谱图清晰。通过对比不同比例的醋酸乙酯-甲酸(3: 1; 4: 1; 5: 1)、甲苯-醋酸乙酯

- 甲酸 - 水 (10: 5: 1: 1; 15: 5: 1: 0.5; 20: 5: 1: 0.5) 及醋酸乙酯 - 甲酸 - 水 (10: 2: 1), 苯 - 甲醇 - 醋酸 (20: 5: 2) 等不同展开剂, 结果表明甲苯 - 醋酸乙酯 - 甲酸 - 水 (20: 5: 1: 0.5) 能展开清晰斑点且能完全分开, 重复性好, 故采用此展开剂。

本实验建立了锁阳药材中儿茶素的 HPLC 含量测定方法, 并对其进行了 TLC 定性鉴别及水分、总灰分、浸出物检测, 该方法操作简便、结果可靠、重复性好, 可完善 2010 年版《中国药典》(I 部) 中锁阳药材的质量控制, 并为其化学成分的研究提供了科学依据。

#### 参考文献:

[1] 林佳. 锁阳的研究进展[J]. 国外医学·中医中药分册, 2003, 25(6): 332.

[2] Yakuqaku Zasshi. Inhibitory effects of some traditional medicines on proliferation of HIV - 1 and its protease [J]. Nakamura N, 2004, 124(8): 519.

[3] Ma C, Nakamura N, Miyashiro H, et al. Inhibitory effects of constituents from cynomorium songaricum and related triterpene derivatives on HIV - 1 protease [J]. Chem Pharm Bull, 1999, 47(2): 141.

[4] Zhang C Z, Wang S X, Zhang Y, et al. In vitro estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used for the management of menopausal symptoms [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 98(3): 295.

[5] Chang Y X, Su G E. Discuss on effective and targeted component of Cynomorium songaricum Rupr. [J]. Res Pract Chin Med, 2005, 19(3): 55.

[6] 买买提江·依米提, 艾合买提·沙塔尔, 张大海, 等. 微波提取法与索氏提取法提取杏仁油的比较研究[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(4): 731.

## 中医药抗器官移植排斥反应机制的初步研究

吴勤荣 时 军\*

(江西省人民医院, 江西南昌 330006)

**摘要:** 器官移植已经成为治疗终末期疾病的有效手段, 而移植排斥反应仍然是困扰器官移植的难题之一。现代免疫抑制剂虽然免疫抑制力强, 但是不良反应多, 价格昂贵。而中药具有低毒, 价格低廉, 确切的免疫抑制作用等优点, 因此中药免疫抑制剂的研究可能是未来免疫抑制剂研究的重要内容。

**关键词:** 中医药; 器官移植; 排斥反应; 机制

DOI 标识: doi: 10. 3969/j. issn. 1008-0805. 2012. 03. 043

中图分类号: R285. 5; R273 文献标识码: B 文章编号: 1008-0805(2012)03-0611-03

器官移植已经成为治疗器官终末期病变的有效手段, 但移植手术后的排斥反应仍然是困扰器官移植的主要难题之一。现代免疫抑制剂(如钙调磷酸酶类免疫抑制剂等)的使用是器官移植界的重大突破, 它使早期移植器官失败的危险性大幅度下降, 但却并不能延长整个移植病人的存活期<sup>[1, 2]</sup>。虽然现代免疫抑制剂的免疫抑制作用强, 但是由于其选择性和特异性低, 它在治疗移植排斥反应的过程中会抑制患者的免疫系统, 损伤造血功能及其肝肾功能, 造成神经和内分泌功能紊乱等。而中药具有丰富的自然资源, 其低廉的价格、低毒性的优点和确切的免疫抑制作用可能使其在抗器官移植排斥反应中发挥巨大的作用。

从中医理论的角度来看, 器官移植的排斥反应会使机体处于气虚、血瘀、痰湿互结的状态, 因此, 祛风类药物、补益类药物、活血化瘀类药物等是临床上抗移植排斥反应中最常见且最有效的中药。现将国内外对上述中药在抗排斥反应机制方面的研究综述如下。

### 1 祛风类药物在抗移植排斥反应中的应用

**1.1 雷公藤和青风藤** 它们是最常见的应用于临床的中药类免疫抑制剂, 许多动物实验及临床应用证明它们具有良好的抗器官

移植排斥反应的作用。雷公藤内酯、雷公藤多苷和雷公藤总苷均是中药雷公藤的有效成分。Xin 等<sup>[3]</sup>报道雷公藤内酯不仅可以延长小鼠移植胰腺存活期, 而且对胰腺功能无损害作用。(5R)-5-羟基三萜酸类化合物(LLDT-8)是从雷公藤内酯分离出来的新型化合物, 无论是在体外试验还是体内研究中 LLDT-8 均显示良好的免疫抑制功能<sup>[4]</sup>。Li<sup>[5]</sup>则在大鼠同种异体心脏移植模型中, 对移植后的大鼠分别给予安慰剂、不同浓度的雷公藤内酯、FK506 及联合使用不同浓度的雷公藤内酯和 FK506, 而后观察大鼠的中位生存时间, 结果发现, 雷公藤内酯的使用可以大大减少 FK506 的使用剂量, 即使低于 FK506 的有效浓度, 也可以发挥很好的免疫抑制作用, 说明两者具有良好的协同免疫抑制作用。Wang 等<sup>[6]</sup>研究证实雷公藤内酯或者联合低剂量的他克莫司可明显延长小鼠移植肾的存活期, 其机制可能为雷公藤内酯通过抑制补体激活和 T 淋巴细胞渗入来减轻急性体液排斥反应。有实验发现雷公藤内酯还可以通过抑制 T 淋巴细胞 MHC - II 分子、B7 - 1、B7 - 2 及其胞转录因子 NK - kB 的表达, 阻断 T 细胞的活化信号, 发挥免疫抑制效应<sup>[7]</sup>。雷公藤多苷可以通过抑制大鼠脾淋巴细胞的转化并抑制外周血中白细胞介素 2 受体的作用而抑制鼠肾移植排斥反应, 虽其抑制作用不如环孢素 A, 但与环孢素 A 合用有协同作用<sup>[8]</sup>。

**1.2 青风藤(Caulis Sinomenii)** 它的主要有效成分为青藤碱、青风藤碱、双青藤碱、木兰碱及微量 N-乙酰青藤碱。目前关于青藤碱在抗器官移植排斥反应方面的研究有不少的报道<sup>[9, 10]</sup>。青藤碱与 CsA 联合用药, 可使移植心脏存活时间明显延长, 同时明显改善移植心脏的形态学特征<sup>[11, 12]</sup>。亦有动物实验证明青藤碱能够延长移植心脏的生存时间和减轻移植排斥反应可能与对环氧化酶 2 活性的抑制有关<sup>[13]</sup>。杨帆等<sup>[14]</sup>则通过建立大鼠心脏移植模型表明, 移植心脏 ICAM - 1 和 L - 2 的表达水平与排斥

收稿日期: 2011-04-12; 修订日期: 2011-10-12

基金项目: 江西省科技厅主要学科学术带头人培养计划基础和临床应用研究(No. 2008DD0111001)

作者简介: 吴勤荣(1986-), 男(汉族), 江西余干人, 现为南昌大学医学院在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事器官移植与中药抗移植排斥反应的研究工作。

\* 通讯作者简介: 时 军(1957-), 男(汉族), 北京人, 现任江西省人民医院主任医师, 硕士研究生导师, 博士学位, 主要从事器官移植研究的工作。