

[8] Liu L, Xu X Y, Cheng D, *et al.* Preparative separation of polymethoxylated flavones from Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan) peel by high-speed countercurrent chromatography and their antifungal activities against *Aspergillus niger*[J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235(4): 631-635.

[9] Green C O, Wheatley A O, McGrowder D A, *et al.* Citrus peel polymethoxylated flavones extract modulates liver and heart function parameters in diet induced hypercholesterolemic rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 51(1): 306-309.

[10] 魏莹, 李文东, 杨武亮. HPLC 法测定不同贮存年限广陈皮药材中主要活性成分的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(15): 2131-2134.

[11] 杨秀梅, 王瑾, 黄勤挽, 等. “一测多评”法测定陈皮中 3 种黄酮类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 45-49.

[12] 杨洁, 孙婷, 姚华, 等. RP-HPLC-DAD 法测定陈皮中 3 种多甲氧基黄酮的质量分数[J]. 吉林大学学报: 理学版, 2014, 52(2): 348-352.

[13] 郑国栋, 蒋林, 杨得坡, 等. HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮成分[J]. 中草药, 2010, 41(4): 652-655.

[14] 杨宜婷, 罗璇捷, 叶勇树, 等. 不同储存年限广陈皮的多甲氧基黄酮提取研究[J]. 食品工业科技, 2011(9): 258-260.

[15] Zheng G D, Yang D P, Wang D M, *et al.* Simultaneous determination of five bioactive flavonoids in *Pericarpium Citri Reticulatae* from China by high performance liquid chromatography with dual wavelength detection[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(15): 6552-6557.

明矾及其炮制品中活性铝的体外消化

黎勇坤, 杨晓梅, 马莎*
(云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 研究明矾及其炮制品〔清半夏(自制和市购)、姜半夏、制天南星〕中活性铝在模拟人工胃肠液的透膜情况。**方法** 分别采用人工胃肠连续消化和胃/肠分步消化试验处理样品, 离心后, 分离消化液中的活性铝, 微乳液-8-羟基喹啉分光光度法测定其含量。**结果** 胃肠连续消化试验显示, 与明矾相比, 其炮制品均更容易溶出活性铝, 其含量在制天南星中最高(40.39%), 姜半夏中最低(1.77%), 但透膜活性铝均很少。胃/肠分步消化试验显示, 胃消化液中存在大量溶出活性铝, 并且大多是透膜活性铝, 其含量均在制天南星中最高(66.09%和54.88%), 清半夏(市购)最低(11.85%和10.13%); 经肠液消化后, 活性铝转化成 Al(OH)₃, 含量明显下降, 难以透膜; 但胃渣中又有少量活性铝溶出, 也以透膜活性铝为主。**结论** 人工胃液和肠液均能从明矾及其炮制品中溶出活性铝, 但其形态和含量差异较大。模拟肠壁生物膜可以防止大量活性铝透膜, 但与 8-羟基喹啉结合的不稳定铝可能通过其他方式进入, 需引起关注。

关键词: 明矾; 清半夏; 姜半夏; 制天南星; 活性铝; 体外消化

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0569-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.027

In vitro digestion of active Al in alum and alum-processed products

LI Yong-kun, YANG Xiao-mei, MA Sha*
(School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

KEY WORDS: alum; *Pinelliae Rhizoma praeparatum cum Alumine*; *Pinelliae Rhizoma praeparatum cum Zingibere et Alumine*; *Arisaematis Rhizoma preparatum*; active Al; *in vitro* digestion

铝对人体的潜在危害性已普遍受到重视, 而清半夏和制天南星的明矾用量较大, 2010 年版《中

收稿日期: 2016-05-12

基金项目: 云南省教育厅重点研究基金(2013Z006)

作者简介: 黎勇坤(1973—), 男, 硕士, 讲师, 从事天然产物化学、分析化学研究。

* 通信作者: 马莎(1975—), 女, 硕士, 副教授, 从事分析化学研究。E-mail: yunnanmasha@126.com

国药典》已对这些明矾炮制品中铝的含有量作出限量规定, 尽管未对姜半夏提出相关要求, 但是其铝含有量也较高。铝形态复杂, 规定中只测定总铝, 但铝的毒性与其化学形态密切相关, 故研究方便快捷的铝形态分析方法具有重要意义。

借鉴环境样品分析方法, 植物中常用的铝形态分离方法有两种, 一种是水分析的 Driscoll 法, 可以用于茶水或药材水提取液的分析^[1-2]; 另一种是土壤分析中的 Tisser 连续提取法, 可获取更多次级铝形态, 在中药材的元素形态分析中应用较多^[3-6]。但是, 它们都只针对药物自身进行分析, 并不能直观反映各种铝形态对于人体的危害, 因为只有一部分铝能经过消化吸收后进入人体, 故评价药材中铝的安全性有必要进行生物利用性方面研究。将体外消化模型用于研究人体经口生物利用率已引起人们关注^[7-8], 而且已有学者将其用于食品中微量元素可溶态的初级分离^[9-10], 形成一种更实用的元素形态分析思路。

课题组前期也进行了类似分析, 发现在模拟的人体胃肠系统作用下, 明矾炮制品水煎液中的可溶性铝 (含有毒性最大的无机单体铝) 急剧下降, 大量转变成颗粒态铝^[11], 其毒性明显下降, 但后续研究发现, 这些颗粒态铝并不稳定, 当遇到合适配体时, 仍然会被转化吸收。因此, 本实验根据能否与 8-羟基喹啉 (Driscoll 法中分离不稳定单体铝与稳定聚合铝的试剂) 反应来衡量各种铝形态的不稳定性 (活性), 尝试将体外消化模型与改进的 Driscoll 法^[12]相结合, 从人体吸收 (即物质溶出、穿透生物膜、与人体内特殊物质结合而被吸收) 角度出发, 建立一种简捷的铝形态分析法, 研究明矾及其炮制品中各形态铝在人体消化系统中的变化情况, 为此类药材中铝的安全性评价提供更加准确、合理的依据, 并为制定相关药材中铝限量方面的质量标准提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 UV-2450 紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); 电热恒温水浴锅 (江苏沙洲医疗器械厂); 800 型离心沉淀器 (上海手术器械十厂)。

1.2 试剂 胃液: 2.125 g 胃蛋白酶 (≥ 250 units/mg, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 用 pH1.7 的 HCl-KCl 缓冲溶液溶解, 定容于 50 mL 量瓶中; 肠液: 0.100 g 胰酶 ($4 \times \text{usp}$, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 用 pH6.8 的 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲溶液溶解, 定容于 50 mL 量瓶中。铝标准溶液: 1 000 $\mu\text{g/mL}$

Al 标准贮备溶液 (国家有色金属及电子材料分析测试中心), 工作时稀释成 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 操作液; 微乳液: Triton x-100 : 正丁醇 : 正庚烷 : H_2O (2.7 : 15 : 1.5 : 4) (有机溶剂源于国药集团化学试剂有限公司), 25 g/L 8-羟基喹啉 (上海三爱思试剂有限公司) 的 1 mol/L 乙酸溶液; 400 g/L 六亚甲基四胺 (天津光复精细化工研究所, 优级纯) 溶液; 0.2% 酚酞乙醇溶液; 0.45 μm 微孔滤膜 (使用前用超纯水浸泡 1 d)。硝酸为优级纯; 其他试剂均为分析纯。所用器皿用 5% HNO_3 浸泡 1 d, 蒸馏水冲洗干净备用。

1.3 样品 生半夏按《中国药典》规定方法, 以 8% 明矾炮制成清半夏 1; 清半夏 2 购于昆明富华大药房; 姜半夏和制天南星样品购于昆明市中医院, 均经云南中医学院中药学院赵荣华教授鉴定为正品。所有样品碾细, 过 80 目, 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥, 存放于干燥器中备用。

2 方法

2.1 活性铝消化和分离方法 样品中的铝经胃肠系统消化溶出, 离心后, 得到溶出铝, 进一步通过 0.45 μm 微孔滤膜 (模拟生物膜) 过滤, 得到小分子透膜铝, 利用 8-羟基喹啉 (模拟能与铝结合的体内特殊物质) 能与所有不稳定的活性铝发生反应的特点, 无需分离, 直接测定得到所有活性铝。

2.1.1 胃肠连续消化 精密称取样品 1 g, 精密加入 pH 1.7 的 HCl-KCl 缓冲溶液 10 mL, 超声 3 min, 加入 1 mL 胃蛋白酶, 封口, 于 39 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中振荡消化 3 h, 调节 pH 至 6.8 左右, 加入 pH6.8 的 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲溶液 10 mL 和肠液 1 mL, 封口, 同法振荡处理, 进行肠液消化, 离心 5 min (3 000 r/min), 离心液加水定容至 25 mL 或 50 mL, 即得胃肠消化液。

2.1.2 胃/肠分步消化试验 精密称取样品 1 g, 同法胃液消化, 离心后, 分离得到胃离心液和胃残渣, 离心液加水定容至 25 mL 量瓶中, 得到胃消化液。再分别对胃消化液和胃残渣同法进行肠液消化, 即得胃/肠消化液和胃渣肠消化液。

2.2 活性铝含有量测定 采用 8-羟基喹啉微乳液光度法测定。将上述各消化液直接测定, 即得溶出活性铝; 取上述各消化液适量, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 收集滤液, 即得透膜活性铝; 溶出活性铝减去透膜活性铝, 即得大分子活性铝。于 25 mL 比色管 (总体积超过 35 mL) 中加入适量试样溶液, 加

水稀释至 8 mL 左右,滴入 1 滴酚酞指示剂,0.5 mol/L氨水调至微红色,再用0.2 mol/L 盐酸返滴至红色刚好消失,补加 0.2 mol/L 盐酸 3 mL,再加 25 g/L 8-羟基喹啉溶液 0.25 mL,400 g/L 六亚甲基四胺溶液 1 mL,加水稀释至约 25 mL,摇匀,精密加入 8 mL 微乳液,萃取,72 ℃ 水浴加热 15 min,取出,冷却至室温,吸取上层微乳液,置

于 1 cm 石英比色皿中,以试剂空白为参比,于 376 nm 波长处测定吸光度。

3 结果与分析

表 1 显示,各样品总铝含量差异很大。为消除其对活性铝的影响,以活性铝占总铝的相对含量为指标,讨论各样品中活性铝分布情况。

表 1 活性铝含量测定结果 (μg/g, n =2)
Tab. 1 Results of content determination of active Al (μg/g, n =2)

样品	分离方式	胃肠连续消化试验		胃/肠分步消化试验		铝总量
		胃肠消化液	胃消化液	胃/肠消化液	胃渣肠消化液	
		(相对含量/%)	(相对含量/%)	(相对含量/%)	(相对含量/%)	
清半夏 1	溶出	1 030	2 505	206.1	131.5	3 897
		(26.43)	(64.28)	(5.29)	(3.37)	
	透膜	50.19	2 266	—	48.51	
制天南星	溶出	(1.29)	(58.15)		(1.24)	4 727
		1 909	3 124	219.1	220.4	
	透膜	(40.39)	(66.09)	(4.64)	(4.66)	
姜半夏	溶出	27.84	2 594	39.76	128.4	2 533
		(0.59)	(54.88)	(0.84)	(2.72)	
	透膜	44.93	1 059	10.27	70.84	
清半夏 2	溶出	(1.77)	(41.81)	(0.41)	(2.80)	314
		5.22	883.6		15.9	
	透膜	(0.21)	(34.88)	—	(0.63)	
明矾	溶出	6.4	37.2	7.0	9.6	56 872
		(2.04)	(11.85)	(2.23)	(3.06)	
	透膜	5.7	31.8	—	7.0	
	溶出	(1.82)	(10.13)		(2.23)	
		352	57 390	2 828	—	
	透膜	(0.62)	(100.9)	(4.97)		
	透膜	11.3	55 520	112	—	
		(0.02)	(97.62)	(0.20)		

注：—表示未检测出该成分

胃肠连续消化试验中,明矾中的铝均是毒性最大的无机单体铝,但经胃肠系统处理后,只有 0.62% 溶出,并且仅 0.02% 是透膜活性铝。与明矾不同,其炮制品更容易溶出活性铝。其中,清半夏 1 和制天南星的溶出活性铝较多 (26.43% 和 40.39%),姜半夏和清半夏 2 较少,但透膜活性铝都很少。由此可见,经胃肠系统连续消化处理后,各样品中溶出活性铝含量和形态转化程度存在很大差异,但透膜铝却都很少,即经过肠壁等生物膜的“屏蔽”,可排除大量的大分子形态铝的影响。

为进一步明确胃液和肠液对活性铝溶出的影响,又进行了胃/肠分步消化试验。胃消化液结果显示,样品均可被胃液溶出活性铝(制天南星最高,为 66.09%;清半夏 2 最低,为 11.85%),并且几乎都是透膜铝(制天南星 54.88%,清半夏 2 10.13%),而明矾中的铝全部溶出,故未进行胃

渣试验。胃消化液中各样品溶出铝和透膜活性铝的含量都明显高于胃肠连续消化液中,表明胃酸条件容易溶出大量活性铝。

胃/肠消化液结果显示,由于肠系的弱碱性环境,胃液溶出的无机单体铝转化成 Al (OH)₃ 而沉淀析出,溶出活性铝含量急剧下降,并且几乎不能透膜(仅在总铝量高的明矾和制天南星中被检出)。

但是,胃渣肠消化液结果却表明,胃液不能消化的胃渣中仍然存在活性铝,经肠液消化后被溶出,尽管相对含量很低 (2.80% ~4.66%),但也是以易吸收的透膜活性铝为主 (0.63% ~2.72%),并且与胃肠连续消化液相近。而胃/肠消化液中几乎检不出透膜活性铝,表明胃部和肠部透膜铝的来源不同,胃部透膜铝是胃液消化后溶出的大量无机单体铝,而肠部是在胃部不溶或聚合、

较稳定的有机形式，经肠液消化后，转化成小分子有机铝。

4 讨论和结论

胃液和肠液均可以从明矾及其炮制品中溶出活性铝，但两种消化溶出的铝形态和含有量差异较大，胃部产生的活性铝很多，影响很大，而肠部有所减少。因此，在研究铝对人体的毒性问题时，首先应当明确是胃部吸收还是肠部吸收。

由于小分子形式比大分子更容易被吸收，故结合力强的小分子无机单体铝毒性最强，而有机铝和聚合铝较弱。胃液中的铝主要是毒性大、易穿透的小分子活性铝，经肠液处理后，几乎全部转变成大分子铝，也称为“颗粒态铝”，由于不能直接通过“生物膜”，故往往认为是无害的，但现在发现它们具有很强的配位能力，仍然属于活性铝，不能忽视其毒性问题。

胃液溶出的活性铝受 pH 影响较大，在肠液酸性条件下，铝立即以 $Al(OH)_3$ 形式沉淀析出。但胃液不能消化的残渣在肠液中消化后，可得小分子有机态铝，其不易受溶液 pH 影响。

综上所述，在研究铝的安全性问题时，除了考察其形态、转化及含有量外，还需明确其在人体中的吸收部位、吸收机理（转运或渗透）等问题。

另外，2 批清半夏（自制和市购）中活性铝含有量差异较大，可能与炮制方法有关，具体有待作进一步研究。

参考文献：

[1] 罗明标, 刘 艳, 张国庆, 等. 茶汤中铝的浓度、形态和

生物可给性[J]. 茶叶科学, 2004, 24(3): 153-158.

[2] 马 莎, 杨晓梅, 赵荣华. 明矾炮制前后半夏中铝形态分析[J]. 光谱实验室, 2011, 28(6): 2983-2986.

[3] 徐 鹏, 孙建民, 孙汉文. 化学浸提法研究中药赤石脂中活性铝的溶出及形态分布[J]. 光谱学及光谱分析, 2003, 23(6): 1203-1205.

[4] 孙建民, 苑忠格, 石志红, 等. 化学浸提法研究中药茯苓中活性铝的形态分布[J]. 分析科学学报, 2008, 20(1): 111-113.

[5] 马 莎, 杨晓梅, 杨光宇. 灯盏花中铬、镉和镍的化学形态比例研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1348-1349.

[6] 杨 荣, 杨 红, 师 姣, 等. 7 种药材中重金属及有害元素的化学形态分析[J]. 中成药, 2015, 37(2): 350-354.

[7] 李筱薇, 云洪霄, 尚晓虹, 等. 大米中无机砷的生物可给性体外消化评价模型介绍[J]. 食品安全质量检测学报, 2010, 27(1): 7-11.

[8] 齐江宁, 胡广林, 庞京团, 等. 含朱砂口服中成药中汞的生物利用性及安全性评价[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2749-2751.

[9] 徐 飞, 黄茂芳, 李积华, 等. 体外消化模型下香蕉果肉中铬元素的初级形态分析[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 114-116.

[10] 徐 飞, 黄茂芳, 李积华, 等. 基于体外消化模型的香蕉果肉中可溶态 Ca 含量分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(4): 1120-1122.

[11] 马 莎, 杨晓梅, 薛咏梅, 等. 胃肠模拟系统对明矾炮制药材中铝的形态转变影响[J]. 光谱实验室, 2012, 29(5): 3103-3105.

[12] 干 宁, 毕树平, 邹公伟. 氯仿萃取 8-羟基喹啉荧光法测定天然水中的总单核铝和酸溶态铝[J]. 分析化学, 2000, 28(4): 461-465.