

样品溶液 3 mL。正交试验因素与水平见表 2,正交试验结果见表 3,方差分析结果见表 4。

表 2 正交试验因素与水平

Tab 2 Factors and levels of orthogonal test			
水平	因素		
	A(树脂柱径高比)	B(药液质量浓度),g/mL	C(吸附体积流量),BV/h
1	1:3	0.5	1
2	1:5	0.75	2
3	1:7	1.0	4

表 3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test					
试验序号	因素				指标
	A	B,g/mL	C,BV/h	D	TSTR 质量,mg
1	1	1	1	1	111.63
2	1	2	2	2	227.22
3	1	3	3	3	242.79
4	2	1	2	3	161.51
5	2	2	3	1	223.98
6	2	3	1	2	293.28
7	3	1	3	2	160.78
8	3	2	1	3	220.96
9	3	3	2	1	293.58
K ₁	581.64	433.92	625.87	629.19	
K ₂	678.77	672.16	682.31	681.28	
K ₃	675.32	829.65	627.55	625.26	
R	32.38	131.91	18.81	18.67	

表 4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis				
方差来源	方差平方和	自由度	均方	P
A	2 024.68	2	1 012.34	3.41
B	26 462.63	2	13 231.31	40.59
C	687.44	2	343.72	1.05
D(误差)	651.89	2	325.95	1.00

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$
Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$
由表 3、表 4 可知,各因素对试验结果的影响程度依次为 B>A>C,其中因素 B 对试验结果具有显著影响($P<0.05$)。由此确定最佳组合为 A₂B₃C₂,由于因素 C 对试验结果的影响最小,出于降低成本的要求,确定最终最佳水平组合为 A₂B₃C₁,即树脂柱径高比为 1:5,药液质量浓度为 1.0 g/mL,吸附体积流量为 1 BV/h。

2.3.2 饱和吸附量的确定 取 20 g HPD100 型大孔吸附树脂,经预处理后湿法装柱,备用。准确移取“2.1.1”项下 1.0 g/mL(以生药计)TSTR 样品溶液 100 mL,在树脂柱径高比为 1:5,药液质量浓度为 1.0 g/mL,吸附体积流量为 1 BV/h 条件下装柱、上样,每 5 mL 作为 1 个流分,等体积收集 16 份。按“2.1”项下方法操作并计算每一流分中 TSTR 的质量,以收集的流分序号为横坐标,以 TSTR 的质量为纵坐标,并绘制泄漏曲线,结果见图 1。

由图 1 可知,从流分 6 开始树脂柱出现明显的泄露现象,流分 6 中 TSTR 的质量是流分 5 中的 3.3 倍,故 20 g HPD100 型大孔树脂吸附上样液的最大体积为 25 mL,

即相当于 25 g 生药,因此,可推知 HPD100 型大孔树脂的饱和吸附量为每 1 g 树脂可吸附 1.25 g 生药。

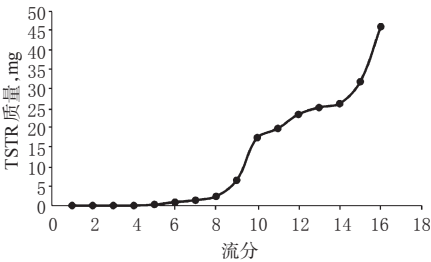


图 1 TSTR 在 HPD-100 型大孔吸附树脂上的泄漏曲线
Fig 1 Leakage curve of TSRT on HPD-100 macro-porous adsorption resin

2.4 HPD100 型大孔树脂对 TSTR 解吸附的影响因素考察

2.4.1 解吸溶剂体积分数的考察 取 40 g 预处理后的 HPD100 型大孔树脂,湿法装柱。量取 50 mL 质量浓度为 1.0 g/mL(以生药计)的 TSTR 样品溶液,以 1 BV/h 的流速通过树脂柱,先用纯水洗至 Molish 反应为阴性,然后依次用 1 BV 体积分数为 15%、30%、45%、60%、75%、90% 乙醇,以 3 BV/h 的流速洗脱,每 21 mL 作为 1 个流分,等体积收集 18 份。从每个流分中精密移取 1 mL 置于 10 mL EP 管中,按“2.1”项下方法操作并计算每一流分中 TSTR 的质量,以收集的流分序号为横坐标,以 TSTR 的质量为纵坐标,并绘制洗脱曲线,结果见图 2。

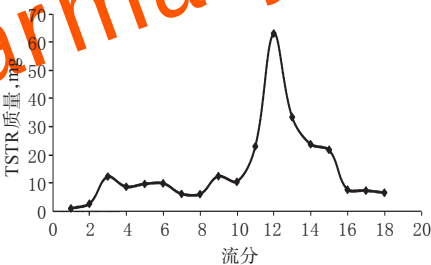


图 2 不同体积分数乙醇洗脱后 TSTR 的质量变化曲线
Fig 2 Mass curve of TSRT after eluting with ethanol of different volume fractions

由图 2 可知,TSTR 主要集中在 60%~75% 乙醇洗脱液中,总量占全部乙醇洗脱液中 TSTR 质量的 66.54%。由于 75% 乙醇具有良好的洗脱能力,而 90% 乙醇洗脱液中 TSTR 含量偏低,仅占 TSTR 总量的 7.97%,从经济成本考虑,洗脱时先用纯水洗去糖类极性大的杂质,再用 30% 乙醇溶液洗去极性较大的杂质,最后用 75% 乙醇溶液洗脱 TSTR。

2.4.2 解吸溶剂体积分数的考察 按照以上优化条件装 4 根 HPD100 型大孔吸附树脂柱,准确量取 4 份等体积质量浓度为 1.0 g/mL(以生药计)的上样液,以 1 BV/h 的流速通过树脂柱,先用 5.5 BV 的纯水洗脱至 Molish 反应为阴性。然后分别用 8 BV 的 75% 乙醇以 1、2、3、4 BV/h 的解吸体积流量进行洗脱,收集洗脱液,每份精密移取

1 mL置于10 mL EP管中,按照“2.1”项下方法操作并计算每一流分中TSTR的质量,结果,当解吸体积流量分别为1、2、3、4 BV/h时,TSTR质量分别为106.31、106.73、109.66、106.99 mg。

当解吸体积流量为3 BV/h时,洗脱液中TSTR质量最大为109.66 mg,解吸体积流量从1~3 BV/h时,得到TSTR的质量与解吸体积流量的大小呈正相关关系,解吸体积流量增大至4 BV/h时,所得TSTR的质量开始下降,所以最佳的解吸体积流量为3 BV/h。

2.4.3 解吸溶剂体积的考察 精密量取13 mL质量浓度为1.0 g/mL(以生药计)的上样液,按照以上优化条件进行试验,吸附完全后,先用5.5 BV的纯净水洗至Molish反应为阴性,然后用75%乙醇以3 BV/h的流速进行洗脱,流出液每流出1 BV时精确移取1 mL于10 mL EP管中,连续取样7次,按照“2.1”项下方法操作并计算每一流分(解吸溶剂体积为1、2、3、4、5、6、7 BV时)中TSTR的质量,结果见图3。

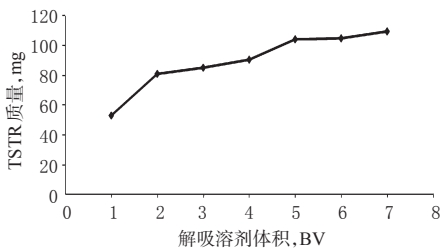


图3 解吸溶剂体积的考察

Fig 3 Study on the volume of desorption solvent

由图3可知,当解吸溶剂体积为7 BV时流出液中TSTR的质量是最大的,从5~7 BV解吸曲线增高趋势变缓,最终所得TSTR的质量相差不大,从经济成本上考虑,解吸时解吸溶剂的体积为5 BV时较佳。

2.5 工艺验证试验

配制质量浓度为1.0 g/mL(以生药计)的TSTR样品溶液30 mL,取3根树脂柱用HPD100型大孔树脂湿法装柱,经预处理后,各取10 mL样品溶液过树脂柱,树脂柱径高比为1:5,药液质量浓度为1.0 g/mL,吸附体积流量为1 BV/h条件进行吸附,5.5 BV纯净水洗去极性较大的杂质,然后再用5 BV的75%乙醇溶液洗脱,分别收集乙醇洗脱液。按“2.1”项下方法操作并计算每一份洗脱液中TSTR的质量并计算解吸保留率(洗脱后TSTR的质量/吸附量×100%),结果见表5。

表5 TSTR的解吸保留率计算结果(n=3)

Tab 5 Results of desorption retention of TSTR(n=3)

编号	样品溶液中TSTR的质量,mg	吸附量,mg	洗脱后TSTR的质量,mg	解吸保留率,%	平均解吸保留率,%	RSD,%
1	237.30	135.74	106.24	78.27		
2	237.30	135.74	105.30	77.57	77.96	0.46
3	237.30	135.74	105.93	78.04		

前期试验证实,10 mL(含生药1.0 mg/mL)的上样液过径高比1:5的HPD100型大孔树脂柱的解析保留率为

57.20%。由表5可知,当上样液为10 mL时,TSTR的平均解吸保留率为77.96%(RSD=0.46%,n=3),说明用HPD100型大孔树脂富集纯化TSTR的最优工艺稳定可行。

2.6 TSTR的制备

取赤菴根生药材700 g(即生药量为700 g),按“2.1.1”项下方法制备TSTR干膏,按照树脂柱径高比为1:5,药液质量浓度为1.0 g/mL,吸附体积流量为1 BV/h纯化工艺装柱、上样,依次用5.5 BV纯水、4 BV 30%乙醇、5 BV 75%乙醇洗脱,收集75%乙醇洗脱液,减压浓缩,浓缩液于80℃烘箱中烘干,并测定其中TSTR的纯度,结果见表6。

表6 TSTR的含量测定结果(n=3)

Tab 6 Results of content determination of TSRT(n=3)

编号	生药量,g	TSTR干膏的质量,g	纯化后TSTR质量,g	纯度,%	平均纯度,%	RSD,%
1	700	97.37	51.11	52.49		
2	700	97.81	51.32	52.47	52.47	1.53
3	700	97.67	51.24	52.46		

由表6可知,所制备的TSTR干膏中TSTR的纯度为52.47%(RSD=1.53%,n=3),纯度大于50%,说明采用本法富集、纯化TSTR的工艺合理、可行。

3 讨论

大孔树脂为一类新型非离子型高分子化合物,能够选择性吸附有机物,具有吸附容量大、解吸速度快、洗脱率高、再生容易等优点^[1]。已有研究发现,用大孔吸附树脂富集、纯化玉竹、人参、木瓜、黄芪等总皂苷效果较为理想^[10-11]。目前已广泛应用于天然药物的分离与富集,尤其适用于水溶性化合物,如皂苷、黄酮等成分。

树脂径高比、药液质量浓度及吸附体积流量,这三者可以直接影响大孔吸附树脂的吸附性能。合理的径高比可以提高树脂对植物有效成分的吸附与分离。对于药液质量浓度,若药液质量浓度过高,则黏度较大,被吸附的物质往树脂内部扩散传质速度变慢,杂质与有效成分或有效成分之间产生竞争吸附,易导致树脂过饱和;若药液质量浓度过低,则黏度较小,在一定上样流速下溶液通过柱床流速较快,大于传质速度,传质未进行彻底即可能泄露^[15]。对于吸附体积流量,若流量过快时,可能会导致树脂对样品有效成分吸附不充分,从而造成样品有效成分的泄露;流量过慢时,吸附速率会下降,时间消耗增加,使生产周期延长,成本提高。因此,本试验考察树脂径高比、药液质量浓度及吸附体积流量这3种因素的不同水平对结果的影响,得出3因素的最优水平组合为树脂柱径高比为1:5,药液质量浓度为1.0 g/mL(以生药计),吸附体积流量为1 BV/h。

赤菴根的主要成分为三萜皂苷类成分,迄今为止已经从赤菴根中分离并鉴定出多个皂苷类成分,主要为齐墩果酸类化合物。本试验对9种具有极性、非极性、弱极性的大孔吸附树脂对TSTR的吸附、解吸性能进行了

救必应酸的单体制备及RP-HPLC法测定救必应药材及精制品中3种活性成分的含量

王 圆^{1*},高 兵¹,陈 华²,张 雷^{1#}(1.华南理工大学生物科学与工程学院,广州 510006;2.广东省药品检验所,广州 510180)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0326-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.09

摘 要 目的:制备高纯度的救必应酸并测定救必应药材及精制品中3种活性成分紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的含量。方法:采用醇提法制备救必应皂苷,以甲醇和氢氧化钠进一步水解,并经重结晶后得到救必应酸单体。采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定救必应药材及精制品1和精制品2中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的含量。色谱柱为Agilent XDB C₁₈,流动相为水-乙腈(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为1.2 mL/min,检测波长为210 nm,进样量为10 μL。结果:所制救必应酸纯度达99%以上。紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸进样量分别在0.18~3.22、0.59~10.36、0.20~3.53 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 均为0.999 9),精密度、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于2.0% ($n=6\sim7$),平均加样回收率为96.08%~100.81% (RSD≤1.98%, $n=6$)。紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的含量在救必应药材中分别为1.61%、7.26%、1.29% (RSD≤1.08%, $n=3$),在精制品1中分别为0.8259%、4.18% (RSD≤1.67%, $n=3$);在精制品2中分别为0.7329%、7.41% (RSD≤1.15%, $n=3$)。结论:所制救必应酸纯度高、制备方法简单且安全环保。建立的RP-HPLC法简单、可靠,可满足快速测定救必应药材及其精制品含量的要求。

关键词 救必应;紫丁香苷;长梗冬青苷;救必应酸;制备;反相高效液相色谱法

考察,确定了HPD100型大孔吸附树脂分离纯化TSTR的效果比较理想,通过梯度洗脱,先采用低浓度30%乙醇溶液洗去极性较大的杂质,然后再用75%乙醇溶液洗脱获得纯度为52.47%的TSTR。由于30%乙醇洗脱液中含有一定量的皂苷,故将30%乙醇洗脱液收集,浓缩,80℃烘干后得到干膏,用于进一步的分离纯化研究。从结果上分析,TSTR的含量由原来的干膏中的30.92%提高到洗脱物中的52.47%,纯化工艺稳定可行。

综上分析,HPD100型大孔吸附树脂对TSTR具有良好的纯化性能,且工艺条件稳定,可为TSTR的工业化生产提供理论参考,同时也为TSTR类物质的分离、鉴定及其应用研究提供了依据。

参考文献

[1] 张玉玲,赵波,陈建双,等.赤霄根镇痛作用及有效部位研究[J].时珍国医国药,2010,21(10):2483-2484.
[2] 刘永平,陈建双,张玉玲,等.赤霄根总皂苷镇痛作用研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(5):993-995.
[3] 陈建双,于海荣,张玉玲,等.赤霄根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠血清细胞因子的影响[J].时珍国医国药,2012,23(5):1097-1098.
[4] 刘永平,陈建双,赵波,等.赤霄根总皂苷对实验性佐剂性关节炎镇痛作用的研究[J].辽宁中医杂志,2011,38(8):1659-1661.

* 硕士研究生。研究方向:医药生物。电话:020-39380678。
E-mail:yuanyuan03_03@163.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:新药创制与开发、医药生物学。电话:020-39380678。E-mail:lzhangce@scut.edu.cn

[5] 祝晴晴,梅爱敏,刘永平,等.赤霄根总皂苷对类风湿性关节炎大鼠NF-κB p65和IL-6表达的影响[J].中药药理与临床,2015,31(6):62-66.
[6] 刘春楠,洪文婷,祝晴晴,等.不同产地赤霄根中总皂苷含量的比较分析[J].承德医学院学报,2015,32(5):371-373.
[7] 刘敏彦,王玉峰,叶晓红,等. HPD300型大孔吸附树脂纯化白芍总苷的工艺研究[J].中国医院药学杂志,2010,30(3):201-204.
[8] 赵惠茹,龙静,杨黎彬,等. HPD-300大孔吸附树脂对山茱萸总皂苷分离工艺的优化[J].中成药,2014,36(2):416-419.
[9] 黄怀鹏,刘彩霞,高国领,等.大孔树脂纯化积雪草总苷的工艺研究[J].中药材,2008,31(7):1072-1074.
[10] 陈红专,张静. AB-8大孔树脂分离纯化积雪草总苷的工艺研究[J].中医药信息,2011,28(2):33-35.
[11] 王晓林,李珍,钟方丽.大孔树脂法纯化玉竹总皂苷的工艺研究[J].食品科学,2012,33(18):83-87.
[12] 王辉,何伟,任军.大孔吸附树脂纯化人参皂苷类成分的工艺研究[J].中国药房,2009,20(24):1865-1867.
[13] 郭婵元,杨小明,马海乐,等.大孔树脂分离纯化宣木瓜总皂苷[J].食品工业科技,2015,36(1):140-143.
[14] 金乾兴,李艳芳,杨洁红,等.大孔树脂吸附法优化分离纯化黄芪总皂苷的实验研究[J].中华中医药学刊,2014,32(11):2599-2601.
[15] 彭青,李晓刚,刘亚明.大孔吸附树脂研究进展[J].实用中医药杂志,2013,29(5):409-412.

(收稿日期:2017-04-09 修回日期:2017-12-11)
(编辑:刘明伟)

Preparation of Rotundic Acid Monomer and Content Determination of 3 Components in *Ilicis rotundae* and Its Refined Products by RP-HPLC

WANG Yuan¹, GAO Bing¹, CHEN Hua², ZHANG Lei¹ (1.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2.Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare high-purity rotundic acid, and to determine the contents of syringoside, peduncloside and rotundic acid in *Ilicis rotundae* and its refined products. METHODS: *I. rotundae* saponins was prepared by ethanol extraction method and hydrolyzed with methanol and sodium hydroxide; rotundic acid monomer was obtained after recrystallization. The contents of syringoside, peduncloside and rotundic acid in *I. rotundae*, its refined product 1 and its refined product 2 were determined by RP-HPLC. The determination was performed on an Agilent XDB C₁₈ column with mobile phase consisted of water-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.2 mL/min. The column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was set at 210 nm. The sample size was 10 µL. RESULTS: The purity of rotundic acid exceeded 99%. The linear ranges of syringing, peduncloside and rotundic acid were 0.18-3.22, 0.59-10.36 and 0.20-3.53 µg, respectively ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were all lower than 2.0% ($n=6-7$). The average recoveries were 96.08%-100.81% ($RSD\leq 1.98\%, n=6$). The contents of syringoside, peduncloside and rotundic acid in *I. rotundae* were 1.61%, 7.26%, 1.29% ($RSD\leq 1.08\%, n=3$); those of refined product 1 were 0, 82.59%, 4.18% ($RSD\leq 1.67\%, n=3$); those of refined product 2 were 0, 73.29%, 7.41% ($RSD\leq 1.15\%, n=3$), respectively. CONCLUSIONS: Prepared rotundic acid has high purity and is simple in preparation, safe and environmentally-friendly. RP-HPLC method that established is simple and reliable, and can meet the requirements for rapid analysis of *I. rotundae* and its refined products.

KEYWORDS *Ilicis rotundae*; Syringoside; Peduncloside; Rotundic acid; Preparation; RP-HPLC

救必应(*Ilicis rotundae* Cortex)为冬青科植物铁冬青(*Ilex rotunda* Thunb)的干燥树皮,收载于2015年版《中国药典》(一部)^[1]。现代药理学研究表明,救必应药材中的活性成分分别为紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸,在治疗心血管疾病^[2-4]、抗肿瘤^[5]、消肿止痛^[6-9]等方面具有明显作用。在已报道的文献中,从救必应药材中采用水解和柱层析法精制得到救必应酸,总收率约为5%^[6]。另在分析研究中,已报道的采用高效液相色谱(HPLC)法测定救必应药材中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸、丁香脂素4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷4种成分的含量的方法分析时间较长,救必应酸的出峰时间在40 min后,且流动相中的无机酸可能造成救必应苷的水解而影响含量测定准确性^[11-12]。文献中纯化救必应酸过程采用硅胶分离方法,操作较为烦琐,展开剂使用量大^[6]。本研究改善制备工艺以制备救必应酸单体,并进一步优化含量测定的HPLC条件,为药材及精制品中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量测定提供更准确、快速的评价方法。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪(美国Agilent公司);SB-3200DT型超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);TP-114型电子天平[丹佛仪器(北京)有限公司];Quattro Micro API型三重四级杆串联质谱仪(美国Waters公司);600 MHz Advance型核磁共振(NMR)波谱仪(德国Bruker公司)。

1.2 药材与试剂

救必应药材(广州清平药材市场,经中山大学药学院苏薇薇教授鉴定为冬青科植物铁冬青*Ilex rotunda* Thunb.的干燥树皮,密封干燥常温保存);紫丁香苷对照品(批号:111574-201504,纯度:94.9%)、长梗冬青苷对照品(批号:11868-201001,纯度:89.3%)均购自中国食品药品检定研究院;救必应酸为华南理工大学生物科学与工程学院医药生物学实验室自制(面积归一化法检测质量分数大于99%);采用甲醇溶剂降温重结晶方法代替文献[6]中的硅胶柱层析方法得到救必应精制品1;采用甲醇饱和溶液加水析晶方法代替文献[6]中的硅胶柱层析方法得到救必应精制品2(华南理工大学生物科学与工程学院医药生物学实验室自制);乙腈为色谱纯(德国Merck公司);水为超纯水;其余试剂均为化学纯。

2 方法与结果

2.1 救必应酸的制备及结构确证

按文献[6]的提取工艺得到救必应皂苷。将10.0 g救必应皂苷先后溶解于20 mL甲醇和100 mL的2 mol/L的氢氧化钠溶液中,回流反应2 h。然后用盐酸酸化反应液,静置过滤。向滤渣中加入30 mL水和10 mL乙醇,在50 °C下重结晶2次,干燥得救必应酸。采用Quattro Micro API型三重四级杆串联质谱仪和600 MHz Advance型NMR波谱仪确证救必应酸的结构,并测定其纯度。救必应酸的高分辨质谱图见图1。

电喷雾电离质谱(ESI-MS)显示准分子离子峰,其质荷比 m/z 为511.340 5($[M+Na]^+$,理论值为511.341 2),纯化产物核磁共振氢谱(¹H-NMR)和核磁共振碳谱

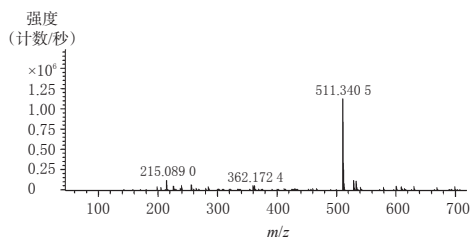


图1 救必应酸的高分辨质谱图

Fig 1 High resolution mass spectrometry of rotundic acid

(^{13}C -NMR)核磁数据与文献中数据对照一致^[13]。经面积归一化法得出自制救必应酸纯度达99.0%。本研究采用重结晶方法代替文献[6]中硅胶分离法,操作更简单,同时还能减少展开剂使用。同时救必应酸单体在甲醇中溶解度大,向甲醇溶液中加水后会析出救必应酸,方便纯化。另外,采用17%甲醇回流,相比较文献30%乙醇,有机溶剂使用量减少,符合环保的要求。

2.2 反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量

2.2.1 混合对照品溶液制备 取紫丁香苷对照品、长梗冬青苷对照品、救必应酸对照品适量,精密称定,加甲醇配制含紫丁香苷0.09 mg/mL、长梗冬青苷0.30 mg/mL、救必应酸0.10 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备^[1] 取适量干燥的救必应药材粉碎,过3号筛。精密称定0.1 g粉末,加入甲醇25 mL,超声(功率:180 W,频率:40 kHz)提取30 min,待冷却后用甲醇补充超声前后的差量,滤过,取续滤液即得。

2.2.3 色谱条件与系统适用性考察 色谱柱:Agilent XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:30 ℃;流动相:水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min,10%~12% B;5~20 min,12%~50% B;20~30 min,50% B);流速:1.2 mL/min;检测波长:210 nm;进样量:10 μL。取“2.2.1”“2.2.2”项下溶液进样分析,结果显示,其他成分对紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的测定无干扰。理论板数以3种待测成分计均大于3 000,且紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸与相邻峰分离度均大于1.5。对照品和供试品的色谱图见图2。

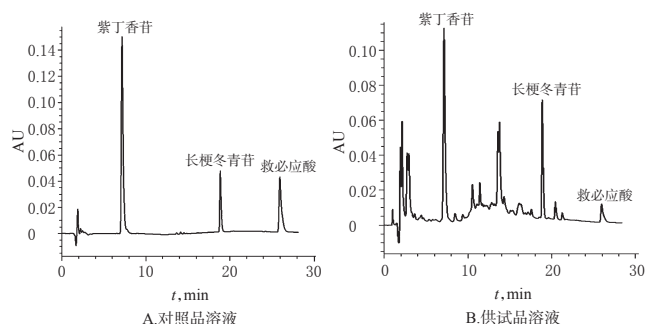


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.2.4 线性关系考察 分别吸取2、5、10、15、20、25、30、35 μL混合对照品溶液进样测定。以进样量(μg)为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的回归方程分别为 $y=1\ 606.92x+53.85$ 、 $y=172.44x+0.52$ 、 $y=248.21x-1.97$ (r 均为0.999 9)。结果表明,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸检测进样量线性范围为0.18~3.22、0.59~10.36、0.20~3.53 μg。

2.2.5 定量限与检测限考察 将对照品溶液逐步稀释,进样。在信噪比为10时测定紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的定量限分别为14.2、95.0、176.9 ng,在信噪比为3时测得3种物质的检测限分别为4.1、49.4、67.3 ng。

2.2.6 精密度的试验 重复进样混合对照品溶液6次,记录3种成分的峰面积,并计算RSD。结果,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸峰面积RSD分别为1.22%、0.63%、0.94%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 精密称量6份药材粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定3种成分的量。结果,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的质量分数平均值分别为1.61%、7.24%、1.30%($n=6$),对应RSD分别为0.83%、1.54%、1.97%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液室温放置。分别于0、2、4、8、12、16、24 h进样测定。结果,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量的RSD分别为0.47%、0.96%、0.41%($n=7$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 平行称量6份已知含量的救必应药材0.1 g,根据救必应药材中3种成分的含量分别加入一定量的单个对照品溶液,按“2.2.2”项下制备供试品溶液。进样测定3种成分的含量,计算加样回收率。结果,紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的加样回收率分别为98.90%、100.81%、96.08%($n=6$),RSD分别为1.72%、1.55%、1.98%($n=6$),表明本法测定准确度良好,符合含量测定要求。

2.2.10 样品测定 取救必应药材、精制品1和精制品2制备的供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进行测定,以外标法计算各样品中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的量,结果见表1。

由表1可见,救必应药材中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量分别为1.61%、7.26%、1.29%。与救必应药材比较,精制品1和精制品2中均未检测到紫丁香苷成分,长梗冬青苷、救必应酸因精制工艺不同而含量不同。

3 讨论

本研究优化了救必应酸提取纯化方法和3种成分含量测定的RP-HPLC方法,采用重结晶方法代替普通硅胶柱分离救必应酸成分,减少展开剂使用,工艺更简单;回流提取过程采用17%甲醇代替30%乙醇。本研究是

表1 救必应药材及其精制品中紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸的含量测定结果(n=3)

Tab 1 Content determination of syringin, pedunclo-side and rotundic acid in *I. rotundae* and its re-fined products(n=3)

样品	紫丁香苷,%			长梗冬青苷,%			救必应酸,%		
	测定值	平均值	RSD	测定值	平均值	RSD	测定值	平均值	RSD
救必应	1.62	1.61	0.86	7.24	7.26	0.31	1.29	1.29	1.08
	1.61			7.29			1.29		
	1.59			7.27			1.31		
精制品1	0	0	0	82.22	82.59	0.79	4.15	4.18	1.67
	0			83.34			4.26		
	0			82.21			4.13		
精制品2	0	0	0	73.12	73.29	0.23	7.44	7.41	1.15
	0			73.29			7.47		
	0			73.46			7.31		

通过救必应提取纯化制备救必应酸单体作为研究对象,意在开发救必应酸这一单体药物(化学1.1类新药),提取工艺研究中使用的甲醇。将在后续制备产品过程中检查甲醇残留量,使之符合国家规范。救必应酸制备过程中筛选了不同的提取溶液。救必应酸在甲醇中溶解度大,且在后续处理过程中在加入水后会析出救必应酸,方便纯化救必应酸单体。另甲醇基本可以100%回收利用,符合环保的要求,故在制备中选用甲醇为提取液。

为改善色谱峰形状,文献[12]中采用了加入无机酸的方法。本文建立的RP-HPLC方法则将文献中流速1.0 mL/min 提高为1.2 mL/min,既能起到改善峰形作用,又能缩短分析时间,所有成分可在30 min内完成含量测定。

采用精制工艺获得的救必应精制品作为纯化救必应酸的原料,在精制过程中通过碱水解、抗溶剂化结晶方法去除紫丁香苷成分,所以精制品中紫丁香苷成分含量为0。虽然长梗冬青苷和救必应酸的含量因精制工艺而明显不同,但是工艺稳定性很好。大多数研究多以紫丁香苷、长梗冬青苷两种成分的含量评价救必应药材及其制剂的质量^[1,14-15]。救必应酸作为药材中治疗心血管疾病的活性成分,且为长梗冬青苷在体内的水解产物,因此也应控制其在救必应药材及其制剂中的含量。2015年版《中国药典》(一部)规定救必应药材中紫丁香苷、长梗冬青苷含量不得少于1.0%、4.5%,并未规定救必应酸的含量。不同产地救必应药材中救必应酸的含量差别大,所以设定药材和制剂中救必应酸含量的最低限度还需大量测定不同产地救必应药材,并依据药材或制剂的药效确定。本研究建立的RP-HPLC法满足同时测定紫丁香苷、长梗冬青苷、救必应酸含量的需要,方法快速准确、重复性好,为救必应药材和制剂的质量控制

提供了科学的依据。

本试验尚未比较经不同的提取精制工艺后长梗冬青苷、救必应酸的含量变化,下一步计划设计多种工艺比较二者的含量差异;另外,计划通过体内外试验探讨救必应酸单体在治疗心血管疾病方面的活性,为开发救必应酸单体药物奠定试验基础。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:312-313.

[2] 董艳芬,梁燕玲,罗集鹏.救必应不同提取物对血压影响的实验研究[J].中药材,2006,29(2):172-174.

[3] 谭晓斌,贾晓斌,沈明勤,等.结合药效的刺五加纯化工艺优选[J].中国药房,2007,18(12):902-904.

[4] 赵全成.救必应药物组合物及其用途:中国,201010607-550.1[P]. 2011-06-01.

[5] LEE TH, JUANG SH, HSU FL, et al. Triterpene acids from the leaves of planchonella duclitan (Blanco) Bakhui-zan [J]. J Chin Chem Soc, 2005, 52(6):1275-1280.

[6] 赫玉芳.救必应酸的制备及其衍生物的设计、合成和抗肿瘤活性研究[D].长春:吉林大学,2013.

[7] 许睿.救必应化学成分研究及抗肿瘤活性成分初步筛选[D].广州:广州中医药大学,2009.

[8] 张丽芬,刘志承,索娟,等.活血舒筋贴膏剂的质量标准研究[J].中国药房,2011,22(11):1012-1014.

[9] 常艳茹,南敏伦,赵昱玮,等.救必应化学成分及药理活性研究进展[J].黑龙江医药,2015,28(1):11-14.

[10] 黄闻健.救必应的民间应用[J].江西中医药,1996(2):147.

[11] 顾利红,毕福钧,陈蔼.不同来源救必应药材的质量评价[J].中草药,2013,44(5):622-625.

[12] 朱锦萍,杨宝,杨滔,等. HPLC法同时测定救必应药材中4种成分的含量[J].中药新药与临床药理,2015,26(4):558-560.

[13] NAKATANI M, HATANAKA S, KOMURA H, et al. The structure of rotungenoside, a new bitter triterpene gluco-side from Ilex rotunda[J]. Bull Chem Soc Jpn, 1989, 62(2):469-473.

[14] 王军宪,张元媛,贾晓妮,等. HPLC法测定救必应药材中紫丁香苷的含量[J].药物分析杂志,2008,28(5):788-789.

[15] 王晓博,张俏,曹爱兰,等.铁冬青不同产地不同部位质量分析[J].中南药学,2016,14(7):728-730.

(收稿日期:2017-04-05 修回日期:2017-11-30)

(编辑:余庆华)

金钗石斛叶中总黄酮的提取分离及体外抗阿尔茨海默病活性研究[△]

李艳萍^{1*}, 李海燕¹, 纪晓婉¹, 岑志芳¹, 颜金武², 吴剑峰^{1#} (1.佛山科学技术学院口腔医学院医药工程学院, 广东佛山 528000; 2.华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

中图分类号 R961 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0330-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.10

摘要 目的:对金钗石斛叶中总黄酮进行提取分离,并考察其体外抗阿尔茨海默病(AD)活性。方法:采用超声提取法提取金钗石斛叶中总黄酮,将所得浸膏用水分散后分别用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,采用显色反应和薄层色谱法对各极性提取物进行定性分析,硝酸铝-亚硝酸钠法定量分析各提取物中总黄酮含量。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除试验考察各提取物的体外抗氧化活性,硫黄素T法考察各提取物对A β ₄₂蛋白聚集的抑制作用,紫外-可见光谱扫描法测定各提取物对金属离子(Cu²⁺, Fe³⁺和Zn²⁺)的螯合能力,以考察其体外抗AD活性。结果:乙酸乙酯、正丁醇、水提取物中均含有黄酮成分,含量分别为0.03、0.12、0.05 mg/mL。3种提取液对DPPH自由基的半数清除浓度(IC₅₀)分别为0.021、0.011、0.013 mg/mL,对A β ₄₂蛋白聚集的抑制率分别为43.77%、52.28%、38.42%,对金属离子具有一定的螯合能力,其中尤以对Cu²⁺的螯合作用最为明显。结论:金钗石斛叶中总黄酮具有较好的抗氧化、抑制A β ₄₂蛋白聚集及螯合金属离子的能力,具有一定的体外抗AD活性,且以正丁醇提取物效果最明显。

关键词 金钗石斛叶;黄酮成分;阿尔茨海默病;抗氧化;A β ₄₂蛋白

Separation and Extraction of Total Flavonoids from *Dendrobium nobile* Leaves and Study on Its Anti-Alzheimer's Disease Activity *in vitro*

LI Yanping¹, LI Haiyan¹, JI Xiaowan¹, CEN Zhifang¹, YAN Jinwu², WU Jianfeng¹ (1.School of Medical Engineering, College of Stomatology, Foshan University, Guangdong Foshan 528000, China; 2.School of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To separate and isolate total flavonoids from *Dendrobium nobile* leaves, and to investigate its anti-Alzheimer's disease (AD) activity *in vitro*. METHODS: Total flavonoids were obtained by ultrasonic extraction method and extracted by chloroform, ethyl acetate and butyl alcohol after the obtained extract was dispersed with water. Qualitative analysis was carried out with color reaction and TLC. The content of total flavonoids in extracts was analyzed quantitatively by Aluminum nitrate-sodium nitrite method. Antioxidant activity of extract was investigated by DPPH radical scavenging assay; the inhibitory effect of each extract on A β ₄₂ protein aggregation was investigated by Thioflavin T assay. Metals (Cu²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺) chelating property was studied by UV-vis spectrum scanning to investigate the anti-AD activity *in vitro*. RESULTS: The flavonoids were found in ethyl acetate, butyl alcohol and aqueous extracts, and their flavonoids contents were 0.03, 0.12, 0.05 mg/mL, respectively. IC₅₀ of three extracts to DPPH free radicals were 0.021, 0.011, 0.013 mg/mL. Inhibitory rates of them to A β ₄₂ protein aggregation were 43.77%, 52.28%, 38.42%, respectively. Three extracts exerted metal chelating ability which was best in Cu²⁺. CONCLUSIONS: The total flavonoids from *D. nobile* leaves have good antioxidant activities, A β ₄₂ aggregation inhibitory activities and metal chelating activity, show certain anti-AD activity *in vitro* especially in butyl alcohol extract.

KEYWORDS *Dendrobium nobile* leaves; Flavonoids; Alzheimer's disease; Antioxidant; A β ₄₂ protein

金钗石斛(*Dendrobium nobile*)作为我国传统名贵中

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.21502056);广东省普通高校青年创新人才项目(No.2014KQNCX182)

* 助教,博士。研究方向:药物有效成分的筛选与机制研究。电话:0757-82836985。E-mail:lypfosu@126.com

通信作者:教授,博士。研究方向:天然活性成分的研究与开发。电话:0757-82836985。E-mail:jianfeng839@sina.com

药,为兰科石斛属植物,始载于《神农本草经》,被列为上品,主要以新鲜或干燥茎入药^[1],是2015年版《中国药典》(一部)中药用石斛的首要来源。一直以来,人们主要对其茎部开展相关化学成分和药理作用研究,发现有效成分主要是石斛碱和多糖类物质,药理活性主要有增强免疫力和抗肿瘤等。至今,对金钗石斛叶和花部位的

研究很少。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,其发病率占老年性痴呆的60%~80%,目前AD尚无有效的治疗药物^[2]。由于AD的病理特征复杂,多靶点抗AD研究已成为抗AD药物研发的热门方向,其主要靶点包括胆碱酯酶、A β 蛋白、自由基以及金属离子等^[3]。黄酮是一类天然抗氧化剂,具有抗氧化、降血糖和保护心血管等作用。近年来,多种黄酮类物质被发现具有良好的抗AD活性。有研究指出,日常饮食中摄入一定量的黄酮成分有助于AD的治疗^[4]。相比茎部来说,金钗石斛叶中黄酮类成分含量更高^[5]。本研究拟通过提取分离手段获得金钗石斛叶中总黄酮,并对其进行初步的体外抗AD活性评价,为金钗石斛叶这一资源的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BS-110S 电子分析天平(德国赛多利斯公司);RE52-99 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);硅胶G板(德国Merck公司);TLC Visualizer 薄层色谱数码成像系统(瑞士CAMAG公司);UV-1600 PC 紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);WFY-28 荧光分光光度计(天津市拓普仪器有限公司);RT-6100 酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

1.2 药材与试剂

金钗石斛叶(广东国方医药有限公司,批号:2016-05-28,经佛山科学技术学院李海燕副教授鉴定为真品);芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-200707,纯度:99.0%);A β ₄₂蛋白(上海强耀生物有限公司,批号:2016-01-20,纯度:>95%);1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、姜黄素、硫磺素T(美国Sigma-Aldrich公司,批号:101585784、1002008101、1002-142019,纯度:>97%、>98%、60%~75%);水溶性维生素E(Trolox,上海阿拉丁生物科技有限公司);石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇(天津市富宇精细化工有限公司);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 金钗石斛叶中总黄酮的提取

将新鲜金钗石斛叶清洗、烘干至恒质量,研碎成粉末。精确称取粉末4 g,用滤纸包好放入索氏提取器中,加入140 mL 石油醚回流脱脂^[6],虹吸至提取液接近无色。取出滤渣,置于锥形瓶中,加80%乙醇室温下超声提取,每次35 min,直至提取液颜色接近无色。合并提取液,于旋转蒸发仪旋干溶液,得浸膏。将浸膏悬浮于水,分别用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取,每种溶剂连续萃取至无色,合并相同溶剂的萃取液,分别减压浓缩后得到4种提取物。然后将4种提取物分别用80%乙醇溶解并定容至25 mL 量瓶中,得到氯仿提取物溶液(A溶

液)、乙酸乙酯提取物溶液(B溶液)、正丁醇提取物溶液(C溶液)和水提取物溶液(D溶液)。

2.2 黄酮成分的定性分析

2.2.1 显色反应法 分别采用盐酸-镁粉反应法、碱性试剂显色反应法、铝盐反应法、醛糖形成反应(Molish反应)和三氯化铁反应法^[7]定性分析4种提取物溶液中含黄酮成分情况。结果,A溶液在盐酸-镁粉反应和三氯化铁反应中显色不明显,在碱性试剂显色反应和铝盐反应中呈阴性,仅在Molish反应中呈阳性;而B、C、D溶液在5种显色反应中均呈阳性。结果提示,B、C、D溶液中含有黄酮成分。

2.2.2 薄层色谱法 取A、B、C、D溶液点样在硅胶G薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(4:1:5, V/V/V,下同)为展开剂展开后,取出,自然晾干,喷1% AlCl₃溶液^[8],挥干后在薄层色谱数码成像中观察斑点情况。结果,B、C、D溶液中均有出现条带,而A溶液中没有。结合显色反应与薄层色谱结果,表明除了A溶液,其余3种提取液中均存在黄酮类成分。薄层色谱图见图1。

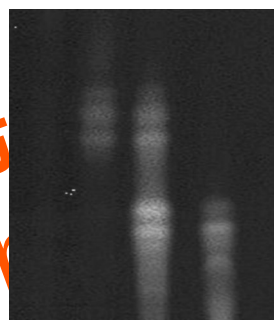


图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC spectrum

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 标准曲线的绘制 精密称取芦丁对照品0.010 1 g,用80%乙醇定容至50 mL 量瓶中,摇匀,得对照品溶液。精密量取对照品溶液1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL,分别置于10 mL 量瓶中,不足5 mL的加80%乙醇补足5 mL;精密加入5%亚硝酸钠溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min;然后加入10%硝酸铝溶液0.3 mL,摇匀,放置6 min;再加入1 mol/L 氢氧化钠溶液4 mL,最后用80%乙醇定容,摇匀,放置15 min^[9-10]。在510 nm 波长处测定其吸光度,以吸光度为纵坐标(y)、芦丁质量浓度为横坐标(x)作标准曲线,用最小二乘法进行线性回归,得回归方程 $y=13.526x-0.013\ 95$ ($R^2=0.998\ 8$)。结果表明,芦丁检测质量浓度线性范围为0.02~0.10 mg/mL。

2.3.2 含量测定 精密量取B、C、D溶液各2 mL 于10 mL 量瓶中,按“2.3.1”项下方法进行测定,并由回归方程计算各样品中总黄酮含量。结果,B、C、D溶液中总黄酮含量分别为0.03、0.12、0.05 mg/mL,折算成每克叶中的含量分别为0.38、1.57、0.63 mg/g。从结果可知,各提取

物中总黄酮含量大小顺序为C溶液>D溶液>B溶液。

2.4 DPPH 自由基清除能力

2.4.1 溶液的制备 (1)DPPH 溶液:称取0.001 1 g的DPPH,用80%乙醇溶解并定容于25 mL量瓶中,摇匀,得浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液,保存于冰箱中,备用^[11-12]。(2)Trolox 溶液:称取0.009 7 g的Trolox,用无水乙醇溶解并定容于5 mL量瓶中,摇匀。然后稀释至80、60、40、20 $\mu\text{mol/L}$,备用。(3)样品溶液:精密量取B溶液250、200、150、100、50、20 μL ,C溶液150、125、100、75、50、25 μL ,D溶液225、200、175、150、125、100 μL ,分别置于离心管中,再分别加入80%乙醇补足体积至500 μL 。

2.4.2 DPPH 自由基清除试验 量取以上稀释好的Trolox 溶液和B、C、D样品液各100 μL ,再加入100 μL 的DPPH 溶液。空白溶液为80%乙醇,阴性对照为100 μL 的80%乙醇与100 μL 的DPPH 溶液的混合液。充分混合后,室温避光放置50 min,然后用酶标分析仪于517 nm波长处测定其吸光度(A),所有样品均重复3次。计算DPPH 自由基清除率。清除率(%)=[($A_{\text{对}}-A_{\text{空}}$)-($A_{\text{样}}-A_{\text{空}}$)]/($A_{\text{对}}-A_{\text{空}}$),式中, $A_{\text{对}}$ 为阴性对照的 A , $A_{\text{样}}$ 为样品溶液与DPPH 反应后的 A , $A_{\text{空}}$ 为空白溶液的 A 。根据清除率与各样品浓度的拟合曲线计算其半数清除浓度(IC_{50})。结果表明,对照品Trolox 对DPPH 自由基的 IC_{50} 为28.85 $\mu\text{mol/L}$ (0.007 mg/mL),B、C、D溶液对DPPH 自由基的 IC_{50} 分别为0.021、0.011、0.013 mg/mL。

2.5 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制活性

精密称取 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白0.2 mg,用1% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液100 μL 溶解,然后用20 mmol/L的磷酸盐缓冲液稀释至20 $\mu\text{mol/L}$ 。取B、C、D溶液各150 μL ,分别加入150 μL 的 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白溶液作为样品溶液,阴性对照为150 μL 的 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白溶液与150 μL 磷酸盐缓冲液,阳性对照为20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素溶液。样品空白分别为B、C、D溶液以及姜黄素溶液各150 μL 与150 μL 缓冲溶液的混合液,背景空白为300 μL 的缓冲溶液与2 700 μL 的硫磺素T溶液的混合液。将上述溶液混匀后,在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应72 h,然后分别加入2 700 μL 的硫磺素T溶液(5 $\mu\text{mol/L}$,用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制),混匀,反应2 min。最后测试荧光吸收值,其中激发波长为450 nm、发射波长为482 nm^[13]。每个样品均重复3次,计算 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制率[$\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制率(%)=(1-IFI/IFc)×100%。式中,IFI指样品扣除样品空白后的荧光吸收值,IFc指阴性对照扣除背景空白后的荧光吸收值]。结果显示,对照品姜黄素的 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制率为50.35%,B、C、D溶液的 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集抑制率分别为43.77%、52.28%、38.42%。结果提示,B、C、D溶液对 $\text{A}\beta_{42}$ 蛋白聚集均有较好的抑制活性,其中活性大小顺序为C溶液>B溶液>D溶液。

2.6 金属离子螯合能力

称取0.002 5 g的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.002 7 g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和0.002 9 g的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,分别用80%乙醇溶解并定容至10 mL量瓶中,制备浓度均为1 mmol/L的 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 溶液。精密量取B、C、D溶液各1 mL,置于不同EP管中,加入80%乙醇溶液4 mL进行稀释,摇匀。各取3份上述稀释液1 mL置于试管中,分别加入 Cu^{2+} 溶液200 μL 、 Fe^{3+} 溶液200 μL 和 Zn^{2+} 溶液400 μL ,然后用80%乙醇溶液稀释至4 mL。参比溶液为以80%乙醇为溶剂的等浓度同种离子溶液^[13]。混匀后室温放置30 min^[14]。常温下用紫外-可见分光光度计进行扫描,波长范围为200~500 nm,波长间隔为1 nm,扫描速率为200 nm/min。各溶液对金属离子螯合能力测定结果见图2。

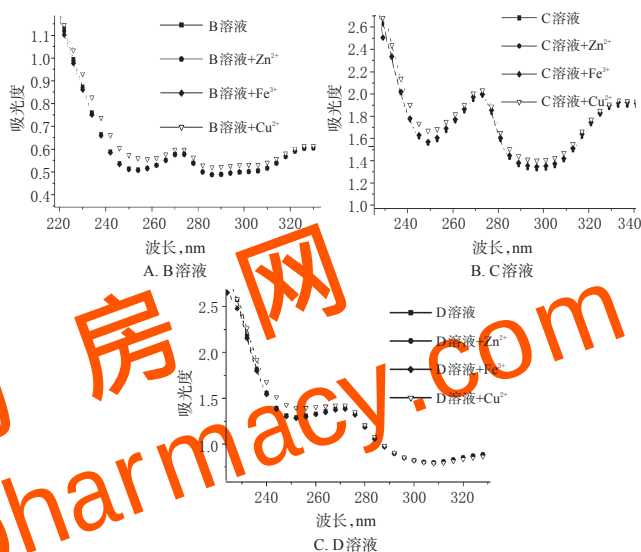


图2 3种提取液金属离子螯合能力的测定结果

Fig 2 The chelating activities of three extracts to Cu^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+}

由图2可知,B、C、D溶液与 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Zn^{2+} 作用后吸收光谱均出现一定的变化,其中与 Cu^{2+} 作用后吸光谱改变最为明显。可知,这3种溶液对 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 等金属离子均表现出一定的螯合能力,且以对 Cu^{2+} 螯合能力最强。

3 讨论

3.1 总黄酮的提取与分离方法

本文在提取总黄酮前,先用石油醚进行脱脂,以便除去叶绿素等脂溶性色素,减少对显色反应和其他试验结果的影响。另外,本文曾对比回流法与超声法的提取效率^[15],发现后者提取效率是前者的3倍多,因此采用后者作为总黄酮的提取方法。本研究的萃取试剂选用氯仿、乙酸乙酯和正丁醇这3种不同极性的溶剂,目的是分离不同极性的黄酮类成分,获得黄酮苷与苷元。在萃取过程中,正丁醇与水层之间容易出现乳化,加大正丁醇和水层之间的比例或者静置过夜可有效减少乳化现象。

3.2 金钗石斛叶中黄酮成分的性质

在薄层色谱试验中,笔者曾尝试以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)、正丁醇-醋酸-水(6:1:5)、甲醇-水(1:1)、氯仿-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(50:5:10:1)、氯仿-甲醇-水(4:1:0.1)、氯仿-甲醇-甲酸(15:5:1)等为展开剂,发现以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)分离效果最好,斑点清晰,故最终采用此条件。定性试验结果表明,乙酸乙酯、正丁醇和水提取物中均存在黄酮类成分,而氯仿提取物中则没有,并且黄酮含量大小顺序为正丁醇提取物>水提取物>乙酸乙酯提取物。这表明金钗石斛叶中黄酮类物质的极性较大,并且极性大的成分含量比较高,可能主要以黄酮苷的形式存在。目前鲜有金钗石斛叶中黄酮化学成分的报道,这一研究结果对于笔者后续进行黄酮单体成分的分离具有重要的指导意义。

3.3 金钗石斛叶中黄酮成分的体外抗AD活性

本研究初步考察了金钗石斛叶中黄酮成分对AD的靶点—— $A\beta_{42}$ 蛋白、自由基以及金属离子的影响。其中, $A\beta_{42}$ 蛋白是AD患者脑部淀粉样斑块的主要成分,是一个大约4.2 kDa的短肽, $A\beta_{42}$ 蛋白的聚集是其产生神经毒性的前提。自由基的产生和清除失衡会导致细胞中DNA、脂质、多糖和蛋白质过度损伤,是引发AD患者神经元功能障碍的重要原因^[16]。在AD患者脑部,金属离子 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 的浓度异常升高,这些金属离子可以与 $A\beta_{42}$ 蛋白结合而促进其聚集,并且能够催化活性氧的产生,导致氧化应激反应^[17]。因此,抑制 $A\beta_{42}$ 蛋白的聚集、清除自由基以及金属离子将有利于AD的治疗。结合含量测定和活性研究结果可以看出,含有黄酮成分的乙酸乙酯、正丁醇和水提取物在抗氧化、抑制 $A\beta_{42}$ 蛋白聚集和螯合金属离子方面均表现出良好的活性,并且活性大小顺序基本与黄酮含量大小顺序一致。其中正丁醇提取物中黄酮成分的含量最高,活性也最好,值得进行下一步的单体成分的分离研究。

目前国内外对金钗石斛叶中黄酮类化合物研究较少,本研究分离获得了金钗石斛叶中的黄酮成分,并发现其在抗AD方面具有良好的活性,值得进行深入研究,而本研究结果可以为更好地开发利用金钗石斛叶这一资源提供基础研究数据。

参考文献

- [1] 郑晓珂,曹新伟,匡海学.金钗石斛的研究进展[J].中国新药杂志,2005,14(7):826-829.
- [2] AGISTORRES A,SÖLHUBER M,FERNANDEZ M, et al. Multi-target-directed ligands and other therapeutic strategies in the search of a real solution for Alzheimer's disease[J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2014, 12(1):2-36.
- [3] CALZÀ L,BALDASSARRO VA,GIULIANI A, et al. From the multifactorial nature of Alzheimer's disease to

multitarget therapy: the contribution of the translational approach[J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(15):1843-1852.

- [4] VAUZOUR D. Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology[J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(6):1042-1056.
- [5] 唐丽,李菁,龙华,等.不同生长龄铁皮石斛茎与叶中总多糖,总生物碱及总黄酮含量的差异[J].广东农业科学, 2015, 42(8):17-21.
- [6] 刘银芳,吴文倩,刘春宇,等.沙苑子黄酮提取工艺研究[J].时珍国医国药, 2010, 21(6):1401-1402.
- [7] 刘琼,李乔丽,放茂良,等.傣族药竹叶兰不同极性部位提取物的抗氧化性研究[J].中国农学通报, 2011, 27(14):77-81.
- [8] 刘阳,杨冰,王新锐,等.洋葱不同极性部位总黄酮的定性和定量分析[J].广州化工, 2015, 43(1):97-98.
- [9] 黄琴,沈杨霞,张成静,等.铁皮石斛多酚和黄酮含量及与抗氧化活性的相关性[J].应用与环境生物学报, 2014, 20(3):438-442.
- [10] 孙玉婉,汪春牛,韩星,等.琼榄不同部位化学成分预试验及总黄酮含量测定[J].中国药房, 2013, 24(7):618-621.
- [11] 韦献雅,殷丽琴,钟成,等. DPPH法评价抗氧化活性研究进展[J].食品科学, 2014, 35(9):317-322.
- [12] SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA K, et al. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cycloextrin emulsion[J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(6):945-948.
- [13] LI YP, NING FX, YANG MB, et al. Syntheses and characterization of novel oxoisoaporphine derivatives as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation[J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(5):1572-1581.
- [14] CHEN SY, CHEN Y, LI YP, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of curcumin analogues as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(18):5596-5604.
- [15] 丁彩梅,曾荣华,丘泰球,等.香椿叶黄酮类化合物超声强化提取研究[J].中成药, 2005, 27(12):1390-1392.
- [16] ALIEV G, OBRENOVICH ME, REDDY VP, et al. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2008, 8(13):1395-1406.
- [17] YAMIN G, ONO K, INAYATHULLAH M, et al. Amyloid beta-protein assembly as a therapeutic target of Alzheimer's disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(30):3231-3246.

(收稿日期:2017-08-14 修回日期:2017-11-13)

(编辑:林 静)

基于三黄泻心汤的黄芩-大黄-黄连不同剂量配伍对黄芩苷和汉黄芩苷溶出的影响^Δ

邓丽红*, 谢 臻[#], 陈 勇, 李耀华, 庞 婷(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

中图分类号 R284;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0334-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.11

摘要 目的:基于三黄泻心汤(简称“泻心汤”)考察黄芩-大黄-黄连不同剂量配伍对黄芩苷和汉黄芩苷溶出的影响,为研究中药复方药味剂量组成配伍的化学机制提供参考。方法:以高效液相色谱法测定黄芩苷、汉黄芩苷含量。固定黄芩剂量(3 g)不变,以大黄和黄连的不同剂量为因素,黄芩苷和汉黄芩苷的溶出率为响应值,设计二因素五水平星点试验,采用响应面法优化黄芩-大黄-黄连最佳剂量配伍,并与经典剂量泻心汤(黄芩3 g、大黄6 g、黄连3 g)比较其中黄芩苷和汉黄芩苷溶出率的变化。结果:黄芩、大黄、黄连的剂量分别为3、1.76、0.17 g时提取液中黄芩苷和汉黄芩苷的总溶出率最高,验证试验中黄芩苷和汉黄芩苷的总溶出率平均为21.89%(RSD=0.46%,*n*=3),与预测值22.54%的相对误差为2.88%;与经典剂量泻心汤比较,最优配伍剂量黄芩-大黄-黄连提取液中黄芩苷和汉黄芩苷总溶出率提高了47.21%。结论:基于泻心汤的黄芩-大黄-黄连不同剂量配伍对黄芩苷和汉黄芩苷溶出有一定影响,当黄芩、大黄、黄连的剂量分别为3、1.76、0.17 g时其溶出率高于经典剂量。
关键词 三黄泻心汤;黄芩苷;汉黄芩苷;剂量配伍;星点设计;响应面法;溶出率

Effects of Different Dose Compatibility of *Scutellaria baicalensis*-*Rheum palmatum*-*Coptis chinensis* Based on Sanhuang Xiexin Decoction on Dissolution Rate of Baicalin and Baicalein
DENG Lihong, XIE Zhen, CHEN Yong, LI Yaohua, PANG Ting (College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of different dose compatibility of *Scutellaria baicalensis*-*Rheum palmatum*-*Coptis chinensis* based on Sanhuang Xiexin decoction (shorted for Xiexin decoction) on dissolution rate of baicalin and baicalein, and to provide reference for studying chemical mechanism of TCM compound dose composition compatibility. METHODS: HPLC method was used to determine the contents of baicalin and baicalein. By fixing the dose of *S. baicalensis* (3 g), using the dose of *R. palmatum* and *C. chinensis* as factors, dissolution rate of baicalin and baicalein as response value, two-factor and five-level central composite test was designed. The optimal dose compatibility of *S. baicalensis*-*R. Palmatum*-*C. chinensis* was optimized by response surface method, and compared with the dissolution rate of baicalin and baicalein in classic dose Xiexin decoction (*S. baicalensis* 3 g, *R. Palmatum* 6 g, *C. chinensis* 3 g). RESULTS: When the doses of *S. baicalensis*, *R. palmatum*, *C. chinensis* were 3, 1.76, 0.17 g, total dissolution rate of baicalin and baicalein was the highest in extract. The average total dissolution rate of baicalin and baicalein in validation test was 21.89% (RSD=0.46%, *n*=3), and the relative error was 2.88% with the predicted value of 22.54%. Compared with the classical dose of Xiexin decoction, the total dissolution rate of baicalin and baicalein in the optimum dose of *S. baicalensis*-*R. Palmatum*-*C. chinensis* in extract was increased by 47.21%. CONCLUSIONS: The different dose compatibility of *S. baicalensis*-*R. Palmatum*-*C. chinensis* based on Xiexin decoction influence the dissolution of baicalin and baicalein to certain extent. When the doses of *S. baicalensis*, *R. palmatum*, *C. chinensis* are 3, 1.76, 0.17 g, dissolution rate of baicalin and baicalein are higher than that of classic dose.
KEYWORDS Sanhuang Xiexin decoction; Baicalin; Baicalein; Dose compatibility; Central composite design; Response surface methodology; Dissolution rate

三黄泻心汤(后文简称“泻心汤”)出自《金匱要略》,其药物组成为大黄二两(6 g)、黄连一两(3 g)、黄芩一两(3 g),水煎后服用,具有清心泻火、凉血止血的功效,主

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81360524);教育部科学技术研究重点项目(No.211140);广西自然科学基金资助项目(No.2014GXNSFAA118208);广西研究生教育创新计划项目(No.JGY2013041)

* 硕士研究生。研究方向:体内药物分析、药动学。E-mail:linideng.lihong@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药质量控制、中药复方配伍。E-mail:xie_zhen@126.com

治心火内盛、迫血妄行及症见吐血衄血、便秘溲赤者^[1]。现代临床应用显示,泻心汤适应证较广泛,且临床疗效较好^[2-4]。蒽醌类、黄酮类和生物碱类成分是泻心汤中的主要活性成分^[5],同时也是多种中草药的有效成分。文献报道,黄酮类化合物具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抑菌、调节心血管等药理作用^[6-10],而黄芩中含有黄芩苷、汉黄芩苷等黄酮成分^[11]。泻心汤的经典剂量比例为大黄-黄芩-黄连(2:1:1)。目前,对本方的药理作用研究较多,但是对泻心汤中黄芩-大黄-黄连不同剂量配伍是否会引起其中黄芩苷和汉黄芩苷的溶出变化还未可知。许多

学者利用数学方法进行化学成分变化规律的研究,如均匀设计法、正交设计法、偏最小二乘法等^[12],与均匀设计法、正交设计法比较,星点设计法具有试验次数较少、精度较高等优点^[13]。故本研究以黄芩苷和汉黄芩苷溶出率为响应值,采用星点设计-响应面法优化黄芩-大黄-黄连的最佳剂量配伍,为研究中药复方药味剂量组成配伍的化学机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型高效液相色谱仪,包括2998PDA检测器、四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、Empower3工作站(美国沃特世科技有限公司);BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司);FW17型中草药打粉机(天津泰斯特仪器设备有限公司);HWS24型电热恒温数显水浴锅(上海一恒科技有限公司);TGL-16G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药材、药品与试剂

中药饮片大黄、黄连、黄芩(广州康美药业股份有限公司,批号:161008891、161106631、161105141);黄芩苷对照品、汉黄芩苷对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号:160624、160711,纯度:均 $\geq 98\%$);甲醇、磷酸均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 泻心汤中黄芩苷和汉黄芩苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Thermo Synchronis C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:甲醇(流动相A)、0.2%磷酸水溶液(流动相B),梯度洗脱(0~10 min,45% A;10~55 min,45% A~70% A;55~56 min,70% A~45% A);流速:1.0 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:280 nm;进样量:5 μ L。

2.1.2 溶液的制备 (1)混合对照品溶液的制备。精密称取黄芩苷、汉黄芩苷对照品适量,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解至刻度,作为贮备液。分别精密移取一定量的上述贮备液至10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,分别制成每1 mL溶液中含黄芩苷0.050 22 mg、汉黄芩苷0.008 08 mg的混合对照品溶液,然后以离心半径为16 cm、13 000 r/min离心10 min,取上清液,备用。

(2)不同剂量配伍黄芩-大黄-黄连提取液的制备。精密称定黄芩药材粉末3 g,按表2星点设计试验,精密称定相应量大黄、黄连粉末,置于圆底烧瓶中,加入30倍量水,称质量;浸泡30 min,加热回流提取20 min,放冷;补足减失的质量,滤过,得泻心汤提取液。

(3)供试品溶液的制备。精密移取“2.1.2(2)”项下提取液(按方案9制备)1 mL,转移至10 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,以离心半径为16 cm、13 000 r/min离心10 min,取上清液,得供试品溶液。

(4)缺黄芩阴性样品溶液的制备。按“2.1.2(2)”项下剂量精密称定大黄、黄连粉末并进行相应处理后,得到缺黄芩的提取液,精密移取缺黄芩的提取液1 mL,按“2.1.2(3)”项下方法操作得缺黄芩阴性样品溶液。

2.1.3 方法学考察 (1)专属性试验。分别取混合对照

品溶液、供试品溶液和缺黄芩阴性样品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果,其他组分不干扰黄芩苷和汉黄芩苷的测定,分离度均大于1.5,方法专属性和选择性好,色谱图见图1。

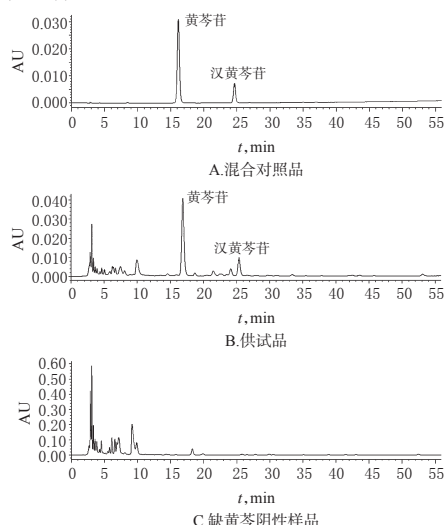


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

(2)线性关系考察。分别取“2.1.2(1)”项下混合对照品溶液2、4、6、8、10、12、14 μ L,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以混合对照品进样量(x , μ g)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得黄芩苷回归方程为 $y=3\times 10^6x-123\ 389$ ($r=0.999\ 9$),检测进样量线性范围为0.100 44~0.703 08 μ g;汉黄芩苷回归方程为 $y=4\times 10^6x-325\ 13$ ($r=0.999\ 9$),检测进样量线性范围为0.016 16~0.113 12 μ g。

(3)精密度试验。取“2.1.2(3)”项下同一供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,重复进样6次。结果,黄芩苷、汉黄芩苷峰面积的RSD值均小于2.0%($n=6$)。

(4)稳定性试验。取“2.1.2(3)”项下同一供试品溶液,分别放置0、2、4、8、12、24 h后按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果,24 h内,黄芩苷、汉黄芩苷峰面积的RSD值均小于2.0%($n=6$)。

(5)重复性试验。精密移取“2.1.2(2)”项下同一泻心汤提取液1 mL,共6份,按“2.1.2(3)”项下方法制备成供试品溶液,然后按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果,黄芩苷、汉黄芩苷峰面积的RSD值均小于2.0%($n=6$)。

(6)准确度试验。精密移取“2.1.2(2)”项下同一泻心汤提取液0.5 mL,共6份,分别精密加入一定量的混合对照品溶液,按“2.1.2(3)”项下方法制备溶液,然后按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果,黄芩苷、汉黄芩苷平均加样回收率分别为99.66%、99.57%,RSD值均小于2.0%($n=6$)。

2.2 星点设计-响应面法优化黄芩-大黄-黄连剂量配伍

2.2.1 星点设计 因泻心汤中黄芩苷和汉黄芩苷来自黄芩,故固定黄芩的剂量不变(均为3 g),以大黄(X_1)、黄

连(X_2)的量为考察因素,以黄芩苷、汉黄芩苷溶出率之和(Y)为指标(响应值),采用星点试验法设计黄芩-大黄-黄连的配伍剂量^[14]。因素与水平见表1,星点设计试验结果见表2。

表1 因素与水平
Tab 1 Factors and levels

水平	因素	
	大黄(X_1 ,g)	黄连(X_2 ,g)
-1.414	1.76	0.17
-1	3	1
0	6	3
1	9	5
1.414	10.24	5.83

表2 星点设计试验结果
Tab 2 Results of central composite design

试验号	因素		指标		
	X_1 ,g	X_2 ,g	黄芩苷溶出率,%	汉黄芩苷溶出率,%	Y ,%
1	3	1	17.70	2.55	20.25
2	3	5	3.86	1.42	5.28
3	9	1	18.43	2.61	21.04
4	9	5	9.76	1.78	11.54
5	1.76	3	10.07	2.14	12.21
6	10.24	3	14.52	2.17	16.69
7	6	0.17	18.99	2.67	21.66
8	6	5.83	4.79	1.47	6.25
9	6	3	13.30	2.08	15.38
10	6	3	12.84	1.99	14.84
11	6	3	12.80	1.98	14.79
12	6	3	12.95	2.02	14.99
13	6	3	13.03	2.01	15.05

2.2.2 模型拟合 以大黄(X_1)、黄连(X_2)的量为自变量,以 Y 值为因变量,对试验结果进行多元线性回归和二项式拟合,以方程的 $P<0.05$ 作为显著标准,选择有较大 r 值的模型,得多元线性方程为 $Y=19.945\ 19+0.5575\ 2X_1-2.893\ 49X_2(r=0.982\ 7,P<0.05)$;拟合的二项式方程为 $Y=23.137\ 20-3.672\ 07X_2-0.013\ 09X_1^2-0.106\ 55X_2^2+0.236\ 43X_1X_2(r=0.997\ 0,P<0.05)$,复相关系数 $r=0.997\ 0$,相对多元线性拟合有提高,表明该方程有较大的可信度,预测性较好。简化的二项式拟合结果见表3。

表3 简化后二项式拟合结果

Tab 3 Results of simplified binomial fitting

项目	标准误差	t	P
常数	0.495 426	46.701 6	<0.000 1
X_2	0.306 031	-11.999 0	<0.000 1
X_1^2	0.008 519	-1.536 2	0.163 0
X_2^2	0.039 758	-2.679 9	0.028 0
X_1X_2	0.031 646	7.470 9	<0.000 1

由表3可知,一次项 X_2 、二次项 X_2^2 、交互项 X_1X_2 对黄芩苷和汉黄芩苷溶出率均有显著影响($P<0.05$),特别是 X_2 项影响最为显著,提示黄连的量的微小变化即对黄芩苷和汉黄芩苷的溶出有较大影响。

2.2.3 响应面法优化黄芩-大黄-黄连剂量配伍 大黄与黄连的量对黄芪类成分溶出有交互作用。固定黄芩和大黄的量不变时,增大黄连的量, Y 值降低;固定黄芩和黄连的量不变,增大大黄的量, Y 值有较小幅度的增大,

见图2。

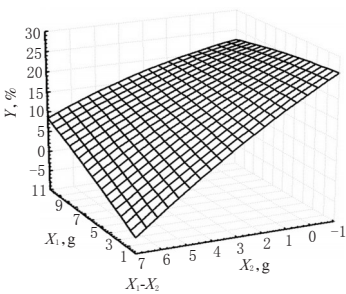


图2 响应面图

Fig 2 Picture of response surface plot

应用LINGO 9.0软件求导后可得:当黄芩的量为3 g、大黄的量为1.76 g、黄连的量为0.17 g时,有最大 Y 值22.54%。故本试验最终选取黄芩-大黄-黄连的最优剂量配伍为黄芩3 g、大黄1.76 g、黄连0.17 g。

2.2.4 验证试验 根据最优剂量比例提取黄芩-大黄-黄连溶液3份,按照前述方法测定其中黄芩苷和汉黄芩苷的溶出率。结果所制3份黄芩-大黄-黄连提取液中黄芩苷和汉黄芩苷平均总溶出率为21.89%,与预测值22.54%的相对误差为2.88%($n=3$),可见预测性较好。

2.3 最优配伍剂量黄芩-大黄-黄连提取液与经典剂量泻心汤中黄芩苷和汉黄芩苷溶出率比较

分别按黄芩-大黄-黄连最佳剂量配伍(黄芩3 g、大黄1.76 g、黄连0.17 g)和经典剂量比例(大黄6 g、黄连3 g、黄芩3 g)泻心汤制备提取液,按前述方法处理并测定其中黄芩苷与汉黄芩苷的总溶出率(两种剂量的总溶出率分别用 Y_1 、 Y_2 表示),并计算最优配伍剂量黄芩-大黄-黄连提取液中黄芩苷和汉黄芩苷溶出率的增加率(%) $[(Y_2-Y_1)/Y_2\times 100\%]$,结果见表4。

表4 最优配伍剂量黄芩-大黄-黄连与经典剂量泻心汤中黄芩苷和汉黄芩苷溶出率比较结果(%)

Tab 4 Comparison of dissolution rate of baicalin and baicalein in optimal dose of *S. baicalensis*-*R. palmatum*-*C. chinensis* and classic dose of Xiexin decoction(%)

试验号	Y_1	Y_2	增加率
1	21.98	14.84	48.11
2	21.91	14.79	48.14
3	21.78	14.97	45.80
平均值	21.89	14.87	47.21

3 讨论

固定黄芩的剂量不变,只改变其他2味中药的剂量,是考虑到泻心汤中的黄芩苷和汉黄芩苷来自黄芩,固定黄芩在整方中的量不变,更便于比较大黄、黄连量的变化对泻心汤中黄芩苷和汉黄芩苷溶出的影响。本研究应用星点设计-响应面法优化不同剂量配伍黄芩-大黄-黄连提取液中黄芩苷和汉黄芩苷溶出变化,本次建立的二项式拟合模型是科学、合理、有效的,建立的方程能够较好地预测黄芩苷、汉黄芩苷的总溶出率,具有现实指导意义。本研究结果显示,大黄剂量的变化对黄芩苷和

2015年版《中国药典》(一部)中含毒性饮片成方制剂的归纳与分析^Δ

李春晓^{1*},王盼盼²,李学林^{1,2#},张 辉¹,唐进法¹(1.河南中医药大学第一附属医院药学部,郑州 450000;2.河南中医药大学药学院,郑州 450046)

中图分类号 R288 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0337-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.12

摘要 目的:为加强含毒性饮片成方制剂(简称“含毒中成药”)的临床安全用药与监管提供参考。方法:整理2015年版《中国药典》(一部)中收录的含毒中成药,进行归纳分析并提出提高其临床安全用药水平的建议。结果与结论:2015年版《中国药典》(一部)共收录含毒中成药474种,占成方制剂的31.75%。含毒性饮片的口服制剂、外用制剂、肌内注射品种分别为435(其中12个为既可口服又可外用的品种)、38、1个,分别占含毒中成药的91.77%、8.02%、0.21%。含有1、2、3味及3味以上毒性饮片的成方制剂分别有318、93、32、31个,分别占含毒中成药的67.09%、19.62%、6.75%、6.54%。目前,有关含毒中成药的基础研究比较薄弱,说明书信息并不完善,缺乏临床用药指导依据,建议加强含毒中成药的基础研究,开展特殊人群用药研究,提高临床合理使用中成药水平,加强上市后安全性再评价,以保障含毒中成药的临床用药安全。
关键词 2015年版《中国药典》(一部);毒性饮片;中成药;安全用药

汉黄芩苷溶出的影响相对于黄连小,可能是酸性成分之间(即大黄中酸性成分与黄芩中黄酮酸性成分)相互作用弱于酸性、碱性成分之间(即黄芩中黄酮酸性成分和黄连中碱性成分)的相互作用的缘故^[15]。

在星点设计试验中,由于大黄与黄连剂量在变化,大黄、黄连有效成分的溶出也将会受到影响。若要同时考察大黄、黄连有效成分的溶出变化,则需要考虑的影响因素太多,限于篇幅有限,故本研究未展开研究。泻心汤中黄芩泻肺燥湿解毒,黄连泻心清胃、燥湿解毒,大黄泻火通肺泻毒、引火下行。可见,黄芩、黄连与大黄都对泻心汤的泻火解毒这一功效有重要影响。因此,本研究将在后续研究中分别考察三者不同剂量配伍对大黄、黄连有效成分溶出变化的影响。

黄芩-大黄-黄连提取液中黄芩苷和汉黄芩苷的溶出率与配比比例呈现非线性变化。当黄芩-大黄-黄连提取液中黄芩、大黄、黄连的剂量分别为3、1.76、0.17 g时,黄芩苷、汉黄芩苷总溶出率较经典比例泻心汤增加了47.21%,这可能会提高黄芩-大黄-黄连提取液的临床疗效。但是黄芩-大黄-黄连提取液的药效不仅与其中黄芩苷和汉黄芩苷溶出率有关,还需要对其他的有效成分进行测定及药理试验验证,才能更深入地探究不同剂量配伍对黄芩-大黄-黄连提取液中有效成分的影响,这有待后续试验进一步完善。

参考文献

[1] 范永升.金匱要略[M].北京:中国中医药出版社,2003:291-292.

Δ 基金项目:国家科技重大专项项目(No.2015ZX09051004)
* 副主任药师,硕士。研究方向:中药上市后再评价。电话:0371-66245274。E-mail:lichunxiao@126.com

通信作者:主任药师,博士生导师。研究方向:中药合理应用。电话:0371-66245142。E-mail:lixuelin450000@163.com

[2] 苗婷婷.三黄泻心汤研究进展[J].湖南中医杂志,2016,32(3):190-192.
[3] 李颜,郭澄.三黄泻心汤的现代药理研究进展[J].中国药房,2010,21(11):1048-1051.
[4] 梁晋川,袁丽,谭正怀.泻心汤临床研究进展[J].中国药房,2011,22(31):2965-2968.
[5] 耿慧春,辛颖,艾凤伟,等.三黄泻心汤HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2008,39(4):524-529.
[6] 羊波,应茵,陈苓丽,等.黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展[J].中国药师,2016,19(7):1369-1373.
[7] 曾祥伟,杨丽燕,陈金龙,等.黄酮类成分抗自由基氧化活性进展[J].中华中医药杂志,2013,28(9):2694-2697.
[8] 杨楠,贾晓斌,张振海,等.黄酮类化合物抗肿瘤活性及机制研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(3):373-381.
[9] 游庭活,刘凡,温露,等.黄酮类化合物抑菌作用研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(21):3645-3650.
[10] 黄河胜,马传庚,陈志武.黄酮类化合物药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2000,25(10):13-16.
[11] 杨立新,刘岱,冯学锋,等.高效液相色谱法测定不同产地黄芩中黄酮化合物的含量[J].中国中药杂志,2002,27(3):9-13.
[12] 麦蓝尹,李怡萱,陈勇,等.基于数理统计方法学的中药复方配伍研究进展[J].中国中药杂志,2014,39(10):1749-1756.
[13] 刘艳杰,项荣武.星点设计-效应面法在药学试验设计中的应用[J].中国现代应用药学杂志,2007,24(6):455-457.
[14] 谢臻.大承气汤方药物质基础及其配伍规律研究[D].广州:广州中医药大学,2009.
[15] 冯有龙,胡浩彬,余伯阳.泻心汤不同配伍情况下黄酮类、蒽醌类和生物碱类成分的含量比较[J].中国天然药物,2007,5(4):281-284.

(收稿日期:2017-08-21 修回日期:2017-10-08)
(编辑:林 静)