

僵蚕两种入药形式下的化学成分溶出性能与抗惊厥作用比较^Δ

程雪娇^{1*}, 胡美变¹, 刘玉杰¹, 肖 禾², 吴纯洁^{1#}(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.成都岷江源药业股份有限公司, 成都 611000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1242-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.21

摘要 目的:对僵蚕煎液和粉末冲服两种入药形式下化学成分溶出性能与抗惊厥作用的差异性进行研究,为僵蚕入药方式的选择提供参考。方法:测定僵蚕煎液和粉末仿生胃液的干浸膏得率,采用高效液相色谱法测定僵蚕煎液和粉末仿生胃液中草酸铵的含量,采用二喹啉甲酸法测定僵蚕煎液和粉末仿生胃液中蛋白质含量。取小鼠按随机数字表法分为正常组(1%羧甲基纤维素钠溶液)、模型组(1%羧甲基纤维素钠溶液)、阳性组(苯妥英钠, 2 mg/kg)以及僵蚕煎液和粉末混悬液的高、中、低剂量组(以生药计分别为0.75、1.5、3 g/kg),每组20只;灌胃给药60 min后给予小鼠电刺激,记录小鼠惊厥率。结果:僵蚕煎液与粉末胃液溶液的干浸膏得率分别为22.08%、26.40% ($P<0.05$),草酸铵含量分别为11.22%、16.83% ($P<0.05$),蛋白质含量分别为3.39%、4.92% ($P<0.01$)。与正常组比较,模型组小鼠惊厥率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠的惊厥率均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且僵蚕粉末混悬液组小鼠惊厥率均低于同剂量煎液组。结论:僵蚕粉末仿生胃液中化学成分的溶出性能优于煎液,且僵蚕粉末抗惊厥效果较煎液好。

关键词 僵蚕;粉末;煎液;干浸膏得率;草酸铵;蛋白质

Comparison of the Dissolution Performance of Chemical Component and Anticonvulsant Effect between Two Application Forms of *Bombyx mori*

CHENG Xuejiao¹, HU Meibian¹, LIU Yujie¹, XIAO He², WU Chunjie¹ (1.College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.Chengdu Minjiang Source Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 611000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the difference of dissolution performance of chemical component and anticonvulsant effect of *Bombyx mori* decoction and powder taken with water, and to provide reference for the selection of application forms of *B. mori*. METHODS: The yield of dry extract was determined for decoction and powder biomimetic gastric juice of *B. mori*. HPLC method was used to detect the content of ammonium oxalate in decoction and powder biomimetic gastric juice of *B. mori*. The content of protein in decoction and powder biomimetic gastric juice of *B. mori* was determined with bicinchoninic acid (BCA) method. Mice was divided into normal group (1% Sodium carboxymethylcellulose solution), model group (1% Sodium carboxymethylcellulose solution), positive group (phenytoin, 2 mg/kg) and *B. mori* decoction and powder suspensions high-dose, medium-dose and low-dose groups (0.75, 1.5, 3 g/kg by crude drug) according to random number table, with 20 mice in each group. After 60 min of intragastric administration, electric stimulation was conducted, and the rate of convulsion in mice was recorded. RESULTS: The yields of dry extract were 22.08% and 26.40% in decoction and powder gastric juice of *B. mori* ($P<0.05$); the contents of ammonium oxalate were 11.22% and 16.83% ($P<0.05$), and the contents of protein was 3.39% and 4.92% ($P<0.01$). Compared with normal group, convulsion rate of mice was increased significantly in model group ($P<0.01$); compared with model group, convulsion rates of mice were decreased significantly in administration groups ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the convulsion rate of mice in *B. mori* powder suspensions group was lower than decoction group. CONCLUSIONS: The dissolution performance of the chemical component from gastric juice of *B. mori* powder is better than that of decoction, and the anticonvulsant effect of *B. mori* powder is better than decoction.

KEYWORDS *Bombyx mori*; Powder; Decoction; Yield of dry extract; Ammonium oxalate; Protein

僵蚕又名白僵蚕,为蚕蛾科昆虫家蚕(*Bombyx mori*

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81773906);国家中药标准化项目(No.ZYBIH-Y-SC-41)

* 硕士研究生。研究方向:中药炮制与制剂。电话:028-61801001。E-mail: Chengxuejiao6698@163.com

通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:中药炮制与制剂。电话:028-61801001。E-mail: wcj-one@263.net

Linnaeus) 4~5 龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant] 后致死的干燥体^[1],具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结的功效,在临床中主要用于治疗肝风夹痰、惊痫抽搐、小儿急惊、破伤风、中风口喎、风热头痛等症。在用法上,僵蚕历代多以“粉”“末”入药^[2-3],最具有代表性的有《雷公炮炙论》:“单捣,

筛如粉用也”^[2],且在《本草纲目》《中药大辞典》《中华本草》中收录了以僵蚕为主药的单方或验方达65首,均为直接服用细粉或入丸、入散剂^[4-5]。而近代僵蚕多入煎剂^[6-7],入丸、入散剂的较少。僵蚕入煎剂味劣难服,易反胃败胃,疗效不稳定,限制了其在临床上的应用。古代僵蚕研末冲服能否克服入煎剂的上述缺点,其在临床上的应用是否科学、合理都亟待进一步考察。因此,本研究拟通过对比分析僵蚕煎液与僵蚕粉末2种入药形式下的化学成分溶出性能(干浸膏得率、草酸铵和蛋白质含量)及其抗惊厥作用,为僵蚕入药方式的选择提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC2010A 高效液相色谱仪、BP211D 电子天平(德国赛多利斯公司);ZRS-8G 智能溶出仪(天津大学无线电厂);TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);酶标仪(成都百乐科技有限公司);JTC-1 惊厥及痛觉实验交流刺激器(成都仪器厂)。

1.2 药材、药品与试剂

僵蚕(批号:161007)由成都岷江源药业股份有限公司提供,经成都中医药大学李敏教授鉴定为真品,经检验达到2015年版《中国药典》(一部)标准;苯妥英钠片(山西云鹏制药有限公司,批号:A150902,规格:1 mg/片);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(扬州联科生物技术有限公司,批号:7219101);人工胃液(北京雷根生物技术有限公司,批号:0020A17);草酸铵对照品(成都市科龙化工试剂厂,批号:2015030501,纯度:>99.5%);磷酸氢二铵(天津市瑞金特化学品有限公司,批号:2016070201);乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

SPF级KM小鼠220只,鼠龄60 d,♀♂各半,体质量(20±2) g,购自成都达硕实验动物有限公司,生产合格证号:SCXK(川)2013-24。实验小鼠均饲养在成都中医药大学基础医学院动物房内,光照周期为12 h,室温保持在25℃左右,实验期间自由饮食,对小鼠的饲养遵守实验动物管理与保护的相关规定。实验前先将小鼠适应性喂养5 d。

2 方法与结果

2.1 僵蚕两种给药方式下化学成分的溶出性能比较

2.1.1 干浸膏得率 (1)样品制备。僵蚕粉末:取僵蚕1 kg,60℃烘干2 h,粉碎后过100目筛,制得僵蚕粉末,置于干燥器中,备用。僵蚕煎液:称取上述同批次僵蚕粉末适量,加入10倍量蒸馏水,煎煮2次,每次1 h,合并煎液,滤过,用旋转蒸发仪浓缩至生药量为0.1 g/mL,即得,置于冰箱中保存,备用。僵蚕粉末仿生胃液:参考文

献^[8],精密称取上述同批次僵蚕粉末适量,加30倍量人工胃液,置于小杯中,设定智能溶出仪温度为37℃、转速为100 r/min,处理1 h,滤过,浓缩至生药量为0.1 g/mL,即得。空白溶液:取人工胃液150 mL,在不加入僵蚕的情况下按“僵蚕粉末仿生胃液制备”方法处理,即得。(2)干浸膏得率计算。分别取僵蚕煎液、僵蚕粉末仿生胃液和空白溶液各3份,每份50 mL,浓缩蒸干,称定并记录干浸膏质量,计算干浸膏得率:干浸膏得率(%)=(干浸膏质量-空白溶液的干浸膏质量)/僵蚕粉末质量×100%。经计算,僵蚕煎液、僵蚕粉末仿生胃液的平均干浸膏得率分别为22.08%、26.40%(n=3)。

2.1.2 草酸铵含量 (1)溶液制备。草酸铵对照品溶液:精密称取干燥至恒质量的草酸铵对照品0.172 g,用磷酸氢二铵水溶液(5 g/L,pH 2.5)溶解,定容至100 mL量瓶中,摇匀,用0.45 μm的微孔滤膜抽滤,即得0.150 mg/mL的草酸铵溶液。样品溶液:精密吸取“2.1.1”项下僵蚕煎液0.5 mL,置于10 mL试管中,75℃水浴加热5 min,滴加0.25 mol/mL的CaCl₂溶液至沉淀完全,冷却至室温,以离心半径为8 cm、3 000 r/min离心5 min,弃上清,沉淀用磷酸氢二铵水溶液(5 g/L,pH 2.5)超声处理(功率:20 W,频率:20 kHz)30 min,转移至250 mL量瓶中,定容,用0.45 μm的微孔滤膜抽滤,即得供试品溶液;同法取僵蚕粉末胃液和空白溶液制备相应样品溶液。

(2)色谱条件。色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈;流动相:磷酸氢二铵水溶液(5 g/L,pH 2.5);流速:0.5 mL/min;柱温:25℃;检测波长:214 nm;进样量:10 μL。(3)线性关系考察。精密吸取“2.1.2(1)”项下草酸铵对照品溶液,用超纯水稀释制成不同质量浓度(15、30、60、90、120、150 μg/mL)的草酸铵对照品溶液,按照“2.1.2(2)”项下的色谱条件进样,记录峰面积。以草酸铵对照品溶液质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程为 $y=3\ 507.93x+15\ 916$ ($R^2=0.999\ 0$)。结果表明,草酸铵质量浓度在15~150 μg/mL范围内线性关系良好。(4)方法学考察。按照相关方法操作进行方法学考察。结果,精密度、稳定性、重复性试验中草酸铵峰面积的RSD分别为0.78%、1.73%、2.47%(n=6),准确度试验中草酸铵的平均加样回收率为98.65%(RSD=1.2%,n=6)。(5)样品含量测定。分别精密吸取各样品溶液,按照“2.1.2(2)”项下色谱条件进样,记录峰面积,将各峰面积代入回归方程,计算各样品溶液中草酸铵含量。采用SPSS 19.0统计软件进行成组t检验。结果,僵蚕煎液、僵蚕粉末仿生胃液中草酸铵含量分别为11.22%、16.83%(n=3),两组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.1.3 蛋白质含量 (1)溶液的制备。样品溶液:精密吸取“2.1.1(1)”项下僵蚕煎液2 mL,以离心半径为4

cm、12 000 r/min 离心 5 min,分取上清液,将上清液加水定容至 100 mL^[9],即得僵蚕煎液的样品溶液;同法制得僵蚕粉仿生胃液的样品溶液。空白对照溶液:精密吸取人工胃液 30 mL,浓缩至 10 mL,精密吸取浓缩液 2 mL,在不加入僵蚕的情况下前述方法同法制备空白对照溶液。标准蛋白溶液:取适量牛血清白蛋白(BSA)标准品,用超纯水稀释制成不同质量浓度(0、25、50、100、200、300、400、500 μg/mL)的标准品溶液。(2)线性关系考察。精密吸取上述不同质量浓度的标准品溶液,按 BCA 试剂盒方法操作,采用酶标仪测定 562 nm 波长处的吸光度值,以标准品溶液质量浓度为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程为 $y=585.76x-80.188(R^2=0.9912)$ 。结果表明,蛋白质质量浓度在 0~500 μg/mL 范围内线性关系良好。(3)BCA 回收试验。精密称取 6 份已知含量的样品溶液,分别加入一定量 200 μg/mL 标准品溶液,按照上述操作方法,进行回收试验测定。结果,标准蛋白的平均回收率为 99.05% (RSD=1.70%, $n=6$)。(4)样品中蛋白质含量测定。分别精密吸取“2.1.3(1)”项下样品溶液和空白对照溶液各 3 份,每份 20 μL,按 BCA 试剂盒方法测定吸光度,并计算样品溶液的实际吸光度(即样品溶液平均吸光度-空白溶液平均吸光度),代入“2.1.3(2)”项下回归方程,计算样品溶液的蛋白质浓度,并采用 SPSS 19.0 统计学软件进行成组 t 检验。结果,僵蚕煎液、僵蚕粉末仿生胃液中蛋白质含量分别为 3.39%、4.92% ($n=3$),差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 僵蚕两种入药形式下对小鼠的抗惊厥作用比较

采用最大电休克实验。用两个耳电极夹住小鼠双耳尖部,在 JTC-1 惊厥及痛觉实验交流刺激器上设定参数为 50 V、0.3 s,单次刺激,以出现后肢强直性伸直为合格小鼠,共筛选出 180 只。将 180 只合格小鼠按随机数字表法分为 9 组,每组 20 只(♀ ♂ 各半),分别为正常组(1%羧甲基纤维素钠溶液,5 mL/kg),模型组(1%羧甲基纤维素钠溶液,5 mL/kg),阳性组(苯妥英钠,2 mg/kg),僵蚕煎液高、中、低剂量组(以生药量计分别为 3、1.5、0.75 g/kg)和僵蚕粉末混悬液高、中、低剂量组(以生药量计分别为 3、1.5、0.75 g/kg)^[10]。灌胃给药后 60 min,按上述电刺激参数给予电刺激,以小鼠后肢强直性抽搐作为强直性惊厥指标,记录惊厥鼠数,计算各组小鼠的惊厥率。采用 SPSS 19.0 统计软件对惊厥率结果进行 χ^2 检验,结果见表 1。

由表 1 可知,与正常组比较,模型组小鼠惊厥率显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠的惊厥率均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且僵蚕粉末混悬液组小鼠惊厥率均低于同剂量僵蚕煎液组。

3 讨论

表 1 僵蚕煎液与粉末的抗惊厥作用测定结果

Tab 1 Anticonvulsive effect of *B. mori* decoction and powder

组别	<i>n</i>	惊厥鼠数,只	惊厥率,%
正常组	20	0	0
模型组	20	16	80**
阳性组	20	0	0 [#]
僵蚕粉末混悬液高剂量组	20	7	35 ^{##}
僵蚕粉末混悬液中剂量组	20	8	40 ^{##}
僵蚕粉末混悬液低剂量组	20	12	60 [#]
僵蚕煎液高剂量组	20	9	45 [#]
僵蚕煎液中剂量组	20	12	60 [#]
僵蚕煎液低剂量组	20	13	65 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

本研究基于古方中僵蚕粉末的应用理论,对僵蚕煎液与粉末冲服两种入药方式下的化学成分溶出性能(干浸膏得率、草酸铵和蛋白质含量)和抗惊厥作用进行了比较,将僵蚕药用物质基础与药效相结合,综合分析了僵蚕煎液和粉末冲服两种入药方式的效能差异。针对僵蚕部分药效物质未知的特点和物质基础整体特征,采用半仿生酶法(在半仿生提取法的基础上,加入合适的酶,模拟胃环境)模拟僵蚕粉末在胃环境中的溶出过程,测定干浸膏得率,该指标能较准确地反映药物整体物质基础^[11-12]。已有研究表明,僵蚕含有蛋白质、草酸铵、多糖、酶以及少量核苷酸等成分,其中蛋白质为主要化学成分,草酸铵具有抗惊厥作用^[13]。因此,本研究将干浸膏得率以及草酸铵、蛋白质含量作为两种入药方式的化学成分差异化评价指标科学、合理。现代研究表明,僵蚕具有抗惊厥作用^[14],并且最大电休克发作模型为常用经典急性惊厥模型。因此,本研究采用最大电休克实验考察两种入药方式的抗惊厥作用差异。

本研究结果表明,僵蚕粉末仿生胃液的干浸膏得率、草酸铵含量以及蛋白质含量均显著高于僵蚕煎液。可见,同煎液相比,僵蚕以粉末冲服入药能较好地保证其化学成分的溶出,尤其是部分有效成分的溶出,为发挥相应药效作用奠定了物质基础;相反,僵蚕以煎液入药,高温可能会导致部分有效成分被破坏或干浸膏得率下降,不利于其药效的发挥。本研究还发现,与煎液相比,僵蚕粉末抗惊厥作用更好,这可能与僵蚕粉末冲服的化学成分溶出性能较煎液强有关。由此可见,僵蚕以粉末冲服入药治疗惊厥,在剂型的选择上具有一定的科学性。但僵蚕入药形式的差异可能会导致其药效发生改变,考虑到僵蚕的活性成分也可能有一定的毒性,因此,在临床应用实践中,在不同入药方式下均需要对其活性成分(如蛋白质、草酸铵)含量进行限度控制,僵蚕粉末的临床剂量将在以后的研究中进一步探讨。另

蛇床子搽剂的质量标准研究^Δ

韩雪^{1*}, 柴金苗^{2#}, 李钦青¹, 王永辉³(1.山西中医药大学中药学院,太原 030619;2.山西中医药大学中西医结合临床学院,太原 030619;3.山西中医药大学实验管理中心,太原 030619)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1245-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.22

摘要 目的:初步拟定蛇床子搽剂(简称为“搽剂”)的质量标准。方法:观察搽剂的性状,采用薄层色谱法对搽剂中蛇床子素进行定性鉴别并对搽剂的相对密度、含醇量和pH值等进行测定,采用高效液相色谱法对搽剂中蛇床子素和欧前胡素进行定量分析。结果:3批样品均为红棕色液体,气香。在供试品薄层色谱中,在与对照品色谱相应位置上显现出相同颜色的荧光斑点。蛇床子素和欧前胡素检测质量浓度的线性范围分别为0.101 2~0.910 8、0.006 2~0.124 4 mg/L(r 均为0.999 6),精密密度试验的RSD分别为1.38%、0.79%($n=6$),稳定性试验的RSD分别为0.33%、0.41%($n=6$),重复性试验的RSD分别为0.83%、1.98%($n=6$),平均加样回收率分别为98.73%、99.25%(RSD分别为1.29%、1.22%, $n=6$);含量测定结果显示,3批样品中蛇床子素含量为2.20~2.35 mg/mL,欧前胡素为0.310~0.340 mg/mL。结论:建立的方法操作简单、快速、准确,可用于蛇床子搽剂的质量控制。

关键词 蛇床子搽剂;薄层色谱法;蛇床子素;欧前胡素;高效液相色谱法;质量标准

Study on Quality Standard of *Cnidium monnieri* Liniment

HAN Xue¹, CHAI Jinmiao², LI Qinqing¹, WANG Yonghui³(1.College of TCM, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030619, China; 2.Clinical College of Combination of TCM and Western Medicine, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030619, China; 3.Experimental Management Center, Shanxi University of TCM, Taiyuan 030619, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To formulate the quality standard of *Cnidium monnieri* liniment (called “liniment” for short) preliminarily. METHODS: The property of liniment was observed. TLC was used for qualitative identification of osthole in liniment; relative density, alcohol content and pH value were also determined. The osthole and imperatorin in liniment were

外,由于僵蚕粉末入药疗效受多种因素的共同影响,故未来仍需对僵蚕的药动学特征等进行系统研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:375.
- [2] 南北朝·雷斅.雷公炮炙论通解[M].西安:三秦出版社,2001:74.
- [3] 王翊.握灵本草[M].叶新苗,校注.北京:中国中医药出版社,2012:183.
- [4] 南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2008:1021-1022.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1998:179-182.
- [6] 赵琦,周建国.虫类中药辨治小儿哮喘临床体会[J].医药

Δ基金项目:山西省科技创新团队建设计划项目(No.2013131022);山西省科技创新项目(No.2008101017)

* 讲师,硕士。研究方向:中药物质基础及新药开发。电话:0351-3179903。E-mail:sever_2001@126.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中医目系理论及相关药物的研究。电话:0351-3179842。E-mail:jinmiao@163.com

前沿,2016,6(34):330-331.

- [7] 韦燕博,张奇,程为平,等.僵蚕临床应用举隅[J].山东中医杂志,2015,34(12):961-962.
- [8] 孙小菊,徐丽君,魏世超,等.黄连粉末与煎剂在胃液中溶出性能比较[J].时珍国医国药,2013,24(8):1910-1912.
- [9] 徐莹.僵蚕炮制前后蛋白质的差异研究[D].镇江:江苏大学,2016:19.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知:中药饮片卷[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:973.
- [11] 王秋红,赵珊,王鹏程,等.半仿生提取法在中药提取中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(18):187-191.
- [12] 薛璇玑,罗俊,张新新,等.半仿生酶法提取柿叶中总黄酮的工艺筛选及优化[J].中国药房,2017,28(13):1813-1816.
- [13] 李晶峰,孙佳明,张辉,等.僵蚕的化学成分及药理活性研究[J].吉林中医药,2015,35(2):175-177.
- [14] 徐冲,商思阳,刘梅,等.僵蚕化学成分和药理活性的研究进展[J].中国药房,2014,25(39):3732-3734.

(收稿日期:2017-09-05 修回日期:2017-11-28)

(编辑:林静)