

# 9种通络祛风中药提取物对黄嘌呤氧化酶的体外抑制活性研究<sup>△</sup>

李芮<sup>1,2\*</sup>, 马良会<sup>1</sup>, 王栋<sup>1</sup>, 张春雷<sup>1</sup>, 周孟<sup>2</sup>, 廖尚高<sup>1,2#</sup>(1. 贵州医科大学药学院/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

中图分类号 R285.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)06-0677-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.06.08

**摘要** 目的: 研究9种通络祛风中药的提取物对黄嘌呤氧化酶(XO)的体外抑制活性, 以筛选活性突出的中药提取物。方法: 以黄嘌呤为底物、XO为反应酶, 以别嘌醇为阳性对照, 以三角风、石胡椒、山莓、金雀花根、紫藤根、牛蒡根、梓木皮、凌霄花根、爬岩香等药材的水提物和甲醇提取物(以下简称“醇提取物”)以及活性提取物的石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水等萃取部位为对象, 采用紫外分光光度法检测各样品对XO的抑制率, 采用Graphpad prism 6.0软件计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)以筛选活性提取物/部位; 采用双倒数法判断药材的酶抑制作用的类型。结果: 9种中药共18个提取物中, 500 μg/mL各中药提取物(除石胡椒醇提取物外), 250 μg/mL三角风、石胡椒、山莓、爬岩香的水提物和醇提取物, 250 μg/mL梓木皮水提物, 250 μg/mL金雀花根、牛蒡根、凌霄花根醇提取物, 125 μg/mL金雀花根、牛蒡根醇提取物以及62.5 μg/mL金雀花根醇提取物对XO的抑制率均超过了50%; 其中, 金雀花根醇提取物的IC<sub>50</sub>值为43.43 μg/mL, 低于其他药材的提取物, 为活性提取物。金雀花根醇提取物石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水等萃取部位的IC<sub>50</sub>值分别为>200、193.35、7.67、14.80、>200 μg/mL, 其中乙酸乙酯提取部位的IC<sub>50</sub>值与阳性对照(5.11 μg/mL)接近。金雀花根醇提取物对XO的抑制类型为竞争-非竞争性抑制, 不同于阳性对照的竞争性抑制。结论: 金雀花根、牛蒡根、石胡椒、山莓、爬岩香、三角风等醇提取物及三角风、石胡椒、梓木皮等水提物对XO均具有一定的体外抑制活性, 以金雀花根醇提取物最强, 且该提取物的乙酸乙酯萃取部位的抑制活性与别嘌醇相当, 但抑制类型有所差异。

**关键词** 黄嘌呤氧化酶抑制活性; 痛风; 中药; 提取物; 金雀花根; 体外

## Study on *in vitro* Inhibitory Activity of the Extracts from 9 Kinds of TCM for Dredging Collaterals and Dispelling Wind on Xanthine Oxidase

LI Rui<sup>1, 2</sup>, MA Lianghai<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>1</sup>, ZHANG Chunlei<sup>1</sup>, ZHOU Meng<sup>2</sup>, LIAO Shanghao<sup>1, 2</sup> (1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guiyang 550025, China; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education/Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study *in vitro* inhibitory activities of 9 kinds of TCM for dredging collaterals and dispelling wind on xanthine oxidase (XO), and to screen TCM with outstanding activity. METHODS: Using xanthine as substrate and xanthinase as reaction enzyme, allopurinol as positive control, with water extract and methanol extract (hereinafter referred to as “ethanol extract”) from the stem and leaves of *Hedera nepalensis*, the whole plant of *Piper wallichii*, the fruits of *Rubus corchorifolius*, the root of *Caragana sinica*, the root of *Wisteria sinensis*, the root of *Rubus crataegifolius*, the bark of *Catalpa ovata*, the root of *Campsis grandiflora*, the stem of *P. hancei* (hereinafter referred to by plant name) and petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and water fraction of active extract as the objects, inhibition rate of each sample to XO was detected by spectrophotometry; IC<sub>50</sub> values were calculated with Graphpad prism 6.0 software to screen active extract/fraction. Double reciprocal method was used to determine the type of enzyme inhibition. RESULTS: Among 9 kinds of TCM and 18 kinds of the extracts, the inhibitory rates to XO of 500 μg/mL extracts from each TCM (except for ethanol extract of *P. wallichii*), 250 μg/mL water extract and ethanol extract of *H. nepalensis*, *P. wallichii*, *R. corchorifolius* and *P. hancei*, 250 μg/mL water extract of *C. ovata*, 250 μg/mL ethanol extract of *C. sinica*, *R. crataegifolius* and *C. grandiflora*, 125 μg/mL ethanol extract of *C. sinica* and *R. crataegifolius*, 62.5 μg/mL ethanol extract of *C. sinica* were more than 50%. The IC<sub>50</sub> value of the ethanol extract from *C. sinica* was 43.43 μg/mL, which was lower than the extracts of other TCM, and which was the active extract. The IC<sub>50</sub> values of petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and water fraction of ethanol extract from *C. sinica* were >200, 193.35, 7.67, 14.80 and >200 μg/mL, respectively. The IC<sub>50</sub> value of ethyl acetate extract was close to that of positive control (5.11 μg/mL). Inhibitory type of ethanol extract from *C. sinica* to XO was competitive-noncompetitive inhibition, which was different from competitive inhibition of positive control.

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81860690)

\* 硕士研究生。研究方向: 药物体内代谢。E-mail: 787403723@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 天然药物化学、中草药药效物质基础及药物开发。E-mail: lshangg@163.com

CONCLUSIONS: The ethanol extracts of *C. sinica*, *R. crataegifolius*, *P. wallichii*, *R. corchorifolius*, *P. hancei*, *H. nepalensis* and the water extracts of *H. nepalensis*, *P. wallichii*, *C. ovata* show certain inhibitory activity *in vitro* to XO, especially ethanol extract of *C. sinica*. The ethyl acetate fraction of the ethanol extract of *C. sinica* has similar inhibitory activity to allopurinol but their inhibition types are different.

KEYWORDS Xanthine oxidase inhibitory activity; Gout; TCM; Extract; Root of *Caragana sinica*; *in vitro*

痛风是由持续的高尿酸血症致尿酸盐晶体沉积在关节处而引发的炎性关节炎<sup>[1]</sup>,现已成为除糖尿病外的第二大代谢类疾病,严重威胁人类健康<sup>[2-3]</sup>。黄嘌呤氧化酶抑制剂(Xanthine oxidase inhibitor, XODI)可抑制尿酸生成的关键代谢酶黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase, XO),故在痛风的治疗中意义重大。其中,别嘌醇、非布他司等是临床治疗痛风的一线药物,已使绝大多数患者的症状得到了有效控制<sup>[4-6]</sup>。然而,现有XODI所致的不良反应(如肝功能损害等<sup>[7-8]</sup>)也不容忽视,故开发更为安全有效的XODI已成为痛风治疗药物研发的热点之一。诸多中草药在痛风治疗中具有疗效确切<sup>[9]</sup>、副作用小<sup>[9-10]</sup>的特点,是XODI研发的重要资源<sup>[11]</sup>。鉴于此,本研究从《中华本草》中筛选出具有通络祛风且可用于治疗痛风的9种中药(三角风、石胡椒、山莓、金雀花根、紫藤根、牛迭肚根、梓木皮、凌霄花根、爬岩香),在其现有药理活性报道(金雀花根同属中药具有抗类风湿性关节炎、抗炎、镇痛等作用<sup>[12-14]</sup>,三角风等中药具有抗炎、降压、解痉等活性<sup>[15]</sup>)的基础上,从抑制尿酸生成的角度出发,以别嘌醇作为阳性对照,初步评价上述9种中药提取物对XO的体外抑制作用,拟筛选出活性突出的中药品种,为相关中药药效物质基础的进一步研究及其应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Varioskan LUK型全波长扫描式多功能读数仪、902型-80℃冰箱[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; SW-CJ-2D型超净工作台(苏州净化设备有限公司); BS223S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); KQ5200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ZYCGF-II-10T型超纯水机(四川卓越水处理设备有限公司); DZF型真空干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司); TGL16M型台式高速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

### 1.2 药材

三角风、石胡椒、山莓、金雀花根、紫藤根、牛迭肚根、梓木皮、凌霄花根、爬岩香等9种中药饮片均购自安徽益生源中药材饮片科技有限公司,批号分别为180101、180101、180401、181201、181201、171101、171101、180601、180601,并经贵州医科大学药学院龙庆德副教授鉴定,分别为五加科植物常春藤[*Hedera nepalensis* K. Koch var. *sinensis* (Tobl.) Rehd.]的茎叶、胡椒科植物石楠藤[*Piper wallichii* (Miq.) Hand.-Mazz.]的全株、蔷薇科植物山莓(*Rubus corchorifolius* L. f.)的果实、豆科植物锦鸡儿[*Caragana sinica* (Buchoz) Rehd.]的

根、豆科植物紫藤(*Wisteria sinensis* Sweet)的根、蔷薇科植物牛迭肚(*Rubus crataegifolius* Bunge)的根、紫葳科植物梓(*Catalpa ovata* G. Don)的树皮、紫葳科植物凌霄[*Campsis grandiflora* (Thunb.) Loisel ex Schum.]的根、胡椒科植物山蒟(*Piper hancei* Maxim.)的茎,饮片样品保存于贵州医科大学药学院天然药物化学研究组。所有饮片均粉碎,过四号筛,备用。

### 1.3 试剂

黄嘌呤(批号:20210609)、别嘌醇(阳性对照,批号:204337)、XO(批号:379122,规格:40 U/mg)等高纯试剂均购自北京百灵威科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.3)、1 mol/L氢氧化钠(NaOH)溶液、1 mol/L盐酸(HCl)溶液均由本实验室自制;石油醚(60~90℃)、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、二甲基亚砜(DMSO)等试剂均为分析纯,水为高纯水。

## 2 方法

### 2.1 提取物的制备

称取“1.2”项下药材粉末各2份,每份约10 g,分别用适量水和甲醇作为提取溶剂回流提取1 h×2次。合并提取液,滤过,分别获得水提取物和甲醇提取物(以下简称“醇提取物”),共计18个粗品提取物(提取率见表1)。将上述提取物浓缩成浸膏,真空干燥后避光保存,备用。

表1 9种中药的提取率(%)

Tab 1 Extraction rate of 9 kinds of TCM (%)

中药	提取率		中药	提取率	
	水	甲醇		水	甲醇
三角风	10.22	10.91	牛迭肚根	10.38	17.63
石胡椒	7.57	10.48	梓木皮	8.62	6.61
山莓	14.81	11.61	凌霄花根	9.28	8.52
金雀花根	10.42	13.32	爬岩香	6.38	9.13
紫藤根	9.07	10.01			

### 2.2 活性提取物萃取部位的制备

取活性提取物[根据本课题组前期研究结果及“2.1”项下各药材提取物的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)筛选]浸膏适量,加水,超声(功率:200 W,频率:40 kHz,下同)使溶解,依次使用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇适量萃取,得石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水部位(以下简称PE、DCM、EA、NB、W部位,得率分别为4.79%、6.51%、35.61%、23.17%、29.67%),减压回收溶剂后避光保存,备用。

### 2.3 溶液的制备

2.3.1 底物溶液 称取黄嘌呤适量,加入PBS,室温下用NaOH、HCl溶液调节pH至7.5,超声使溶解,制得浓度分别为1 200、1 000、800、600、400 μmol/L的黄嘌呤底

物溶液。

2.3.2 酶溶液 称取 XO 适量,用水 1 mL 溶解,得浓度为 100 U/mL 的 XO 贮备液;将上述贮备液以每管 50  $\mu$ L 分装至 10 mL EPP 管中,于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。取上述贮备液适量,用 PBS 稀释,制得浓度为 0.2 U/mL 的 XO 溶液。溶液配制完毕后,立即置于 0  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

2.3.3 对照溶液 精密称取别嘌呤适量,用 DMSO 溶解,加 PBS 适量稀释,制得质量浓度为 500  $\mu$ g/mL 的别嘌呤母液,待用。采用二倍稀释法,以含 DMSO 的 PBS 为溶剂将上述母液逐级稀释,制得质量浓度分别为 500、250、125、62.5、31.3、15.63、7.82、3.91  $\mu$ g/mL 的对照溶液,DMSO 含量为 1%。

2.3.4 样品溶液 ①9 种中药提取物样品溶液:分别称取“2.1”项下各中药提取物的干燥浸膏适量,研碎,精密称定,用 DMSO 溶解,再用 PBS 稀释,制得质量浓度均为 2 000  $\mu$ g/mL(以干燥浸膏质量计,下同)的提取物样品母液。采用二倍稀释法,以含 DMSO 的 PBS 为溶剂将上述母液逐级稀释,制得质量浓度分别均为 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.3  $\mu$ g/mL 的样品溶液,DMSO 含量为 1%。②活性提取物各萃取部位样品溶液:分别称取“2.2”项下各活性提取物萃取部位浸膏适量,研碎,精密称定,用 DMSO 溶解,再用 PBS 稀释,制得质量浓度为 1 000  $\mu$ g/mL 的萃取部位样品母液。采用二倍稀释法,以含 DMSO 的 PBS 为溶剂将上述母液逐级稀释,制得质量浓度分别均为 1 000、500、250、125、62.5、31.3、15.6  $\mu$ g/mL 的样品溶液,DMSO 含量为 1%。

## 2.4 XO 抑制活性的检测

在适宜条件下,黄嘌呤会被 XO 催化生成尿酸,尿酸在 290 nm 波长处有特征吸收峰<sup>[6]</sup>。基于此,本研究采用 Vikrama Chakravarthi P 等<sup>[6]</sup>报道的紫外分光光度法进行 XO 抑制活性的检测。反应体系总体积为 200  $\mu$ L,将“2.3.4”项下的样品溶液(或“2.3.3”项下的对照溶液,反应终浓度均较原样品稀释 4 倍)50  $\mu$ L 和酶溶液(反应终浓度为 0.05 U/mL)50  $\mu$ L 混合后,于 25  $^{\circ}$ C 预温育 15 min,加入底物溶液(反应终浓度为 150  $\mu$ mol/L)50  $\mu$ L 以启动反应,于 25  $^{\circ}$ C 温育 20 min 后,加入 1 mol/L HCl 溶液 50  $\mu$ L 以终止反应。取上述反应液适量,使用全波长扫描式多功能读数仪于 290 nm 波长处检测各反应液的光密度(OD)值,取该值与温育 0 min 时 OD 值的差值作为检测结果。每样品平行操作 3 次,试验重复 2 次。同法检测空白样品(即不含受试提取物,以含 1% DMSO 的 PBS 替代样品溶液,以测定酶的最大反应活性)的 OD 值,并计算抑制率,抑制率(%)=(1-试验样品平均 OD 值/空白样品平均 OD 值) $\times$ 100%<sup>[17]</sup>。

## 2.5 IC<sub>50</sub> 的计算

采用 Graphpad prism 6.0 软件进行数据分析。以提取物(或别嘌呤)的质量浓度(c)的对数为横坐标,其相对应的 OD 值为纵坐标进行线性拟合,计算半数 XO 被抑制时的药物浓度,即 IC<sub>50</sub>。

## 2.6 抑制类型判断

采用 Graphpad prism 6.0 软件、使用双倒数法绘图以进行酶抑制类型的判断<sup>[18]</sup>。在 5 个剂量黄嘌呤底物(1 200、1 000、800、600、400  $\mu$ mol/L,反应终浓度分别为 300、250、200、150、100  $\mu$ mol/L)以及 2 个剂量别嘌呤(250、125  $\mu$ mol/L,反应终浓度分别为 62.5、31.25  $\mu$ mol/L)、活性提取物(1 000、500  $\mu$ mol/L,反应终浓度分别为 250、125  $\mu$ mol/L)的分别作用下,按“2.4”项下方法检测。以 OD 值 20 min 内变化速率[即(OD<sub>20 min</sub>-OD<sub>0 min</sub>)/20]的倒数(1/v)为因变量、黄嘌呤底物浓度倒数的 10<sup>5</sup> 倍[(1/c) $\times$ 10<sup>5</sup>]为自变量绘制双倒数方程曲线,观察不同抑制剂浓度下两条曲线的交叉情况。若两条曲线相交于纵轴,为竞争性抑制;若相交于横轴,为非竞争性抑制;若相互平行无交叉,为反竞争性抑制;若相交于第 2 象限,为竞争-非竞争性抑制;若相交于第 3 象限,为非竞争-反竞争性抑制<sup>[18]</sup>。

## 3 结果

### 3.1 9 种中药提取物 XO 抑制活性的初筛结果

在相同终浓度条件下,9 种中药共 18 个提取物对 XO 的抑制率及 IC<sub>50</sub> 值见表 2。由表 2 可见,各中药提取物对 XO 的抑制率均有随剂量降低而下降的趋势,其中 500  $\mu$ g/mL 各中药提取物(除石胡椒醇提物超出限度外),250  $\mu$ g/mL 三角风、石胡椒、山莓、爬岩香的水提物和醇提物,250  $\mu$ g/mL 梓木皮水提物,250  $\mu$ g/mL 金雀花根、牛迭肚根、凌霄花根醇提物,125  $\mu$ g/mL 金雀花根、牛迭肚根醇提物以及 62.5  $\mu$ g/mL 金雀花根醇提物对 XO 的抑制率均超过了 50%。当提取物剂量为 62.5  $\mu$ g/mL 时,超半数提取物对 XO 的抑制率低于或接近 10%,且爬岩香水提物的抑制率低至 1.0%;当提取物剂量 $\leq$ 31.25  $\mu$ g/mL 时,除金雀花根醇提物(31.25  $\mu$ g/mL)对 XO 的抑制率为 48.3% 外,其余提取物对 XO 的抑制率均已降至 10% 以下。在 18 个提取物中,金雀花根醇提物的 IC<sub>50</sub>(43.43  $\mu$ g/mL)虽高于阳性对照别嘌呤(5.11  $\mu$ g/mL),但明显低于其余药材的提取物,表明金雀花根醇提物活性相对较强,故以其为活性提取物进行后续试验。

### 3.2 金雀花根醇提物 XO 抑制活性萃取部位的筛选结果

活性提取物金雀花根醇提物不同萃取部位对 XO 的体外抑制活性检测结果见图 1、表 3。由图 1、表 3 可见,EA、NB、DCM 部位对 XO 的抑制率有随剂量增加而降低的趋势。其中,EA 部位的 IC<sub>50</sub> 值为 7.67  $\mu$ g/mL,接近于别嘌呤的 5.11  $\mu$ g/mL,活性最强;NB 部位的 IC<sub>50</sub> 值为 14.80  $\mu$ g/mL,活性次之;DCM 部位的 IC<sub>50</sub> 值为 193.35  $\mu$ g/mL,活性相对较弱;而 W、PE 部位的 IC<sub>50</sub> 值均大于 200  $\mu$ g/mL,无活性。

### 3.3 金雀花根醇提物酶抑制类型分析

在不同抑制剂浓度下,别嘌呤的两条曲线相交于纵轴,属于竞争性抑制;而金雀花根醇提物的两条曲线相交于第 2 象限,属于竞争-非竞争性抑制,详见图 2。

表2 9种中药提取物的XO抑制率及IC<sub>50</sub>

Tab 2 Inhibitory rate and IC<sub>50</sub> of extracts from 9 kinds of TCM to XO

药材	提取物	抑制率, %							IC <sub>50</sub> , μg/mL
		500 μg/mL	250 μg/mL	125 μg/mL	62.5 μg/mL	31.25 μg/mL	15.625 μg/mL	7.825 μg/mL	
三角风	水提取物	95.8	77.0	20.0	6.6	6.0	4.8	1.2	183.78
	醇提取物	99.9	69.6	28.4	10.1	9.3	5.0	2.7	184.67
石胡椒	水提取物	81.6	71.5	14.2	5.4	4.6	2.8	0.6	192.35
	醇提取物	-	82.0	44.3	12.7	9.5	6.1	0.9	138.52
山莓	水提取物	98.4	65.8	15.4	6.2	2.7	1.6	1.1	>200
	醇提取物	99.9	92.5	44.1	15.7	5.3	2.8	1.7	133.51
金雀花根	水提取物	82.0	24.2	14.9	10.2	5.2	4.8	4.6	>200
	醇提取物	100	88.2	76.1	60.9	48.3	19.5	9.8	43.43
紫藤根	水提取物	53.1	15.2	7.7	5.8	5.5	4.6	4.1	>200
	醇提取物	91.7	37.9	19.3	12.0	6.2	4.5	4.3	>200
牛迭肚根	水提取物	95.8	38.8	8.3	6.8	6.0	5.3	3.8	>200
	醇提取物	100	99.7	58.2	16.2	8.6	6.1	3.5	102.68
梓木皮	水提取物	100	91.2	29.2	14.8	2.4	2.2	1.9	149.76
	醇提取物	53.9	38.7	9.0	5.0	2.7	2.3	2.1	>200
凌霄花根	水提取物	92.2	27.1	7.8	7.5	7.2	2.0	1.8	>200
	醇提取物	91.7	63.7	13.8	10.1	9.3	5.9	3.3	>200
爬岩香	水提取物	99.4	50.1	11.9	1.0	0.7	0.5	0.3	>200
	醇提取物	99.7	83.3	25.9	16.5	9.8	4.5	1.6	160.18

注：“-”表示检测结果超出仪器限度

Note: “-” means the results exceeds the instrument limit

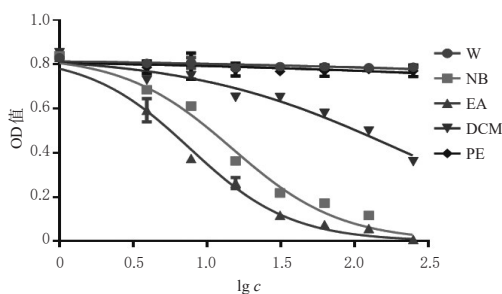


图1 金雀花根醇提取物各萃取部位对XO抑制作用的示意图

Fig 1 Diagrammatic sketch of inhibitory effect of different fractions of ethanol extracts from the root of *C. sinica* on XO

表3 金雀花根醇提取物各萃取部位的XO抑制率及IC<sub>50</sub>

Tab 3 Inhibitory rate and IC<sub>50</sub> of different fractions of ethanol extracts from the root of *C. sinica* on XO

萃取部位	抑制率, %							IC <sub>50</sub> , μg/mL
	250 μg/mL	125 μg/mL	62.5 μg/mL	31.25 μg/mL	15.625 μg/mL	7.825 μg/mL	3.900 μg/mL	
PE	6.3	4.1	5.7	5.0	6.1	4.6	4.8	>200
DCM	57.2	41.4	31.5	22.6	24.9	12.0	11.4	193.35
EA	97.7	93.4	90.6	86.3	66.7	55.3	27.2	7.67
NB	100	85.6	80.0	74.4	56.3	26.6	18.0	14.80
W	6.1	5.7	5.0	6.3	5.4	5.2	4.1	>200

#### 4 讨论

XO是一种多功能的铜羟化酶,广泛分布于肝脏、肾脏、胃肠道、肺、心脏和血管内皮中,是嘌呤代谢途径中

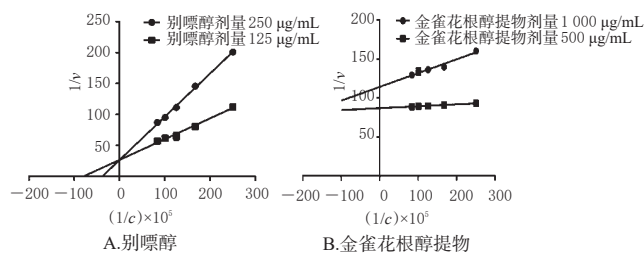


图2 别嘌醇和金雀花根醇提取物的双倒数图

Fig 2 Dixon diagrams of allopurinol and ethanol extracts from the root of *C. sinica*

的关键酶,能催化次黄嘌呤和黄嘌呤反应,产生尿酸和过氧化物自由基,从而导致痛风等疾病的发生<sup>[19-20]</sup>。XODI可通过抑制XO活性,阻止尿酸和过氧化物的生成,现已被广泛应用于高尿酸血症、痛风等症的临床治疗<sup>[21]</sup>。鉴于此,本研究基于文献方法<sup>[16]</sup>进行设计,在体外模拟XO诱导黄嘌呤生成尿酸的反应体系,拟通过考察药物对酶催化尿酸生成的影响,初步评价药物对XO的抑制活性。结果显示,阳性对照别嘌醇的IC<sub>50</sub>值为5.11 μg/mL,与文献<sup>[16]</sup>数据[(6.16 ± 0.10) μg/mL]差异不大,提示方法可行。同时,为了尽量消除中药提取物溶解度及颜色对检测结果所造成的干扰,并综合仪器限度等多方面因素,本研究最终确定活性初筛试验中各受试药材样品溶液的最高反应终浓度为500 μg/mL。但需要说明的是,在实际操作中,500 μg/mL石胡椒醇提取物样品溶液的OD值仍超出了仪器的检测限度,仅为个例,故笔者并未对其进行分析。

本研究共纳入了9种通络祛风中药,均载于《中华本草》中,且明确记载可用于治疗痛风等相关疾病。这9种中药包含冷僻药及民族常用药。其中,瑶药三角风可用于临床治疗风湿、关节肿痛、跌打损伤、疮黄肿毒等症<sup>[15]</sup>。苗药石胡椒和爬岩香,前者舒络通经,多用于治疗风湿性关节炎等症,并可与雷公藤、三七、怀牛膝和莱菔子等组方成石藤胶囊<sup>[22-23]</sup>,该胶囊与爬岩香均可用于治疗风湿骨痛、手足麻痺<sup>[24]</sup>。冷僻药山莓和牛迭肚根均主治痛风<sup>[25]</sup>。金雀花根与紫藤根皆属豆科,前者民间用以治疗风湿骨痛、痛风等症<sup>[26-27]</sup>;后者与柞骨根、菝葜根水煎后,以米酒兑服,可治关节炎<sup>[28]</sup>。凌霄花根与梓木皮皆属紫葳科,凌霄花根具活血、散瘀、解毒和消肿等作用,可治疗风湿性筋骨痛、急性肠胃炎等多种疾病<sup>[29]</sup>。梓木皮被收录于《握灵本草》中,可“治霍乱不吐不泻,煎汤治手足痛风”<sup>[30]</sup>。基于此,本研究以上述9种中药为对象,对其XO抑制活性进行了初步评价。

作为活性物质挖掘的重要环节之一,本研究初步评价了9种中药共18个提取物对XO的体外抑制活性。为保证整个体外反应体系的可行性,综合考虑样品溶解性、最低有效浓度以及仪器限度等多方面因素,并参考已有文献<sup>[11, 16, 31]</sup>,设置了“2.3”“2.4”“2.6”项下各提取物/萃取部位的反应浓度。结果显示,18个中药提取物对XO的抑制活性均有随剂量降低而减弱的趋势。其中,

紫藤根、凌霄花根等中药提取物对 XO 抑制活性较弱或无 XO 抑制活性,提示其对痛风类疾病的治疗作用可能与 XO 抑制无关;金雀花根、三角风、石胡椒等中药提取物的 XO 抑制活性较为突出,提示 XO 抑制可能是这类中药抗痛风的主要机制,但均有待相关基础研究予以确认。9 种中药的提取物中,金雀花根醇提物的 IC<sub>50</sub> 值为 43.36 μg/mL,低于其余中药,提示其可作为 XODI 的重要药材来源。

本研究进一步对金雀花根醇提物的不同萃取部位进行了研究。结果显示,EA、NB、DCM 部位对 XO 的抑制率均有随剂量增加而降低的趋势,其 IC<sub>50</sub> 值分别为 7.67、14.80、193.35 μg/mL,提示中、高极性部位可能是金雀花根发挥 XO 抑制作用的主要有效部位,有进行深入挖掘的价值。此外,抑制类型研究结果显示,别嘌醇对 XO 的抑制类型为竞争性,与已有文献<sup>[32]</sup>结果基本一致;而金雀花根醇提物对 XO 的抑制类型为竞争-非竞争性,提示该提取物中可能含有具竞争-非竞争性抑制作用的单体抑制剂,亦有可能含有不同抑制类型的多个单体抑制剂,但有待通过成分分析和相应基础研究予以证实。本研究结果为进一步研究金雀花根的作用机制以及从金雀花根中寻找 XODI 奠定了基础。

综上所述,金雀花根、牛蒡肚根、石胡椒、山莓、爬岩香、三角风等醇提物及三角风、石胡椒、梓木皮等水提物均表现出了较强的 XO 抑制活性,这些中药的抗痛风作用可能与其 XO 抑制活性有关。此外,金雀花根醇提物中抗 XO 活性较强的 EA 和 NB 萃取部位也有待进一步研究与开发。

## 参考文献

[1] PASCART T, RICHETTE P. Current and future therapies for gout[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18(12): 1201-1211.

[2] 马新路.痛风的药物治疗新进展[J].继续医学教育,2017(9):151-152.

[3] 郭润竹,王雄,邹吉利,等.痛风治疗药物的研究进展[J].医学综述,2017,23(16):3265-3269.

[4] KHANNA D, FITZGERALD JD, KHANNA PP, et al. 2012 American college of rheumatology guidelines for management of gout: part 1: systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia[J]. *Arthritis Care Res: Hoboken*, 2012, 64(10): 1431-1446.

[5] ABHISHEK A, RODDY E, DOHERTY M. Gout: a guide for the general and acute physicians[J]. *Clin Med: Lond*, 2017, 17(1): 54-59.

[6] SOSKIND R, ABAZIA DT, BRIDGEMAN MB. Updates on the treatment of gout, including a review of updated treatment guidelines and use of small molecule therapies for difficult-to-treat gout and gout flares[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18(11): 1115-1125.

[7] KUMAR A, AZMI W. Phytomedicine: a novel alternative for treatment of gout[J]. *Ann Phytomed*, 2014, 3(1): 80-

88.

[8] 李磊,姜红江,孙佳星,等.抗痛风中药及其作用机制研究进展[J/CD].创伤与急诊电子杂志,2016,4(2):110-113.

[9] 陈旅翼,黄亚敏,罗维,等.抗痛风民族药物研究进展[J].中南民族大学学报(自然科学版),2016,35(4):52-56.

[10] MEHMOOD A, ISHAQ M, ZHAO L, et al. Natural compounds with xanthine oxidase inhibitory activity: a review[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2019, 93(4): 387-418.

[11] KONG LD, CAI Y, HUANG WW, et al. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout[J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 73(1/2): 199-207.

[12] 王亮.粉刺锦鸡儿抗类风湿性关节炎及化学成分研究[D].上海:第二军医大学,2015.

[13] 张燕,石妍.蒙药小叶锦鸡儿的化学成分、药理作用研究进展[J].包头医学院学报,2015,31(8):150-152.

[14] 杜庆波,蔡红.锦鸡儿属植物化学成分及药理活性研究新进展[J].宿州学院学报,2012,27(11):26-28.

[15] 唐宇龙,刘湘新,唐小武,等.三角风化学成分分析与抗菌效果研究[J].中国兽医杂志,2007,43(2):51-52.

[16] VIKRAMA CHAKRAVARTHI P, MURUGESAN S, ARIVUCHELVAN A, et al. In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of Piper betle and Phyllanthus niruri[J]. *J Pharmacogn Phytochemistry*, 2018, 7(5): 959-961.

[17] NGUYEN MT, AWALE S, TEZUKA Y, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(9): 1414-1421.

[18] 郭勇,郑穗平.酶学[M].广州:华南理工大学出版社,2000:109-110.

[19] OJHA R, SINGH J, OJHA A, et al. An updated patent review: xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia and gout: 2011-2015[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2017, 27(3): 311-345.

[20] CHEN CY, LYU JM, YAO QZ. Hyperuricemia-related diseases and xanthine oxidoreductase (XOR) inhibitors: an overview[J]. *Med Sci Monit*, 2016. DOI:10.12659/MSM.899852.

[21] KIM SC, SCHNEEWEISS S, CHOUDHRY N, et al. Effects of xanthine oxidase inhibitors on cardiovascular disease in patients with gout: a cohort study[J]. *Am J Med*, 2015, 128(6): 653.e7-653.e16.

[22] 唐先平,胡荫奇.“痰瘀相关”与类风湿性关节炎[J].中华中医药杂志,2005,20(3):173-176.

[23] 王振亮.石藤胶囊治疗类风湿性关节炎 30 例临床观察[J].中华中医药杂志,2011,26(3):528-530.

[24] 简曙光,李玲,张倩媚,等.山蒟(Piper hancei)的生态生物学特征[J].生态环境学报,2009,18(2):608-613.

[25] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:第 4 卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:251-254.

[26] CHEN L, WANG J, KANG W. Chemical constituents of Caragana sinica[J]. *Chem Nat Comd*, 2016, 52(6): 1141-1142.

[27] 吴中民.新华中医纲要:第 2 册[M].上海:上海科学技术

# 奥拉西坦胶囊中主要未知杂质的鉴定及其含量测定<sup>Δ</sup>

张菁\*,孙婷,赵昌梦,姜建国<sup>#</sup>(河北省药品检验研究院,石家庄 050011)

中图分类号 R927.2;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)06-0682-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.06.09

**摘要** 目的:鉴定奥拉西坦胶囊中的主要未知杂质并测定其含量,进而提高该制剂的质量控制标准。方法:采用超高效二维液相色谱-离子阱-飞行时间质谱法对该未知杂质进行定性分析。一维液相色谱分析采用 ST PAK C<sub>18</sub> ES 柱,流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钠溶液,流速为 0.5 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μL,检测波长为 210 nm;二维液相色谱分析采用 Techmate C<sub>18</sub>-ST II 柱,流动相为 0.02 mol/L 醋酸铵溶液,流速为 0.5 mL/min,柱温为 30 ℃,并采用质谱检测(电喷雾离子源,正、负离子模式数据采集)。通过一维液相色谱对目标杂质成分进行定位后,转入二维液相色谱-质谱系统进行定性分析。采用色谱工作站中的分子式预测模块“Accurate Mass Calculator”对该未知杂质结构进行推断;经制备纯化获得杂质精制品,并进行标化和结构确证。采用高效液相色谱法对该杂质含量进行测定(同定性分析的一维色谱条件)。结果:奥拉西坦胶囊中的主要未知杂质为奥拉西坦酸;经制备纯化后获得的杂质精制品含量为 99.5%。9 批奥拉西坦胶囊中奥拉西坦酸的含量为 0.05%~0.14%。结论:所建立的超高效二维液相色谱-离子阱-飞行时间质谱法能准确定位杂质奥拉西坦酸的出峰位置并对其进行结构分析,且相应的含量测定方法能较好地分离杂质与主药及其他成分,灵敏度、精密度、重复性、稳定性、准确度均良好,可较好地控制奥拉西坦胶囊的成品质量。

**关键词** 超高效二维液相色谱-离子阱-飞行时间质谱法;高效液相色谱法;奥拉西坦胶囊;奥拉西坦酸;杂质;鉴定;含量测定

## Identification and Content Determination of Main Unknown Impurity in Oxiracetam Capsule

ZHANG Jing, SUN Ting, ZHAO Changmeng, JIANG Jianguo (Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To identify the main unknown impurity of Oxiracetam capsule and determine its content, so as to improve the standard of quality control. METHODS: Two-dimensional UPLC-IT-TOF-MS was adopted to qualitatively analyze the unknown impurity. One-dimensional liquid chromatogram analysis was performed on ST PAK C<sub>18</sub> ES column with mobile phase consisted of 0.02 mol/L sodium dihydrogen phosphate solution at the flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃, sample size was 20 μL. The detection wavelength was set at 210 nm. Two-dimensional liquid chromatogram analysis was performed on Techmate C<sub>18</sub>-ST II column with mobile phase consisted of 0.02 mol/L ammonium acetate solution at the flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was 30 ℃. Mass spectrometry was adopted (electrospray ionization source, MS<sup>+</sup> and MS<sup>-</sup> mode data acquisition). After the target impurity was located by one-dimensional liquid chromatography, it was transferred to two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry system for qualitative analysis. The unknown impurity structure was inferred by means of molecular formula prediction module “Accurate Mass Calculator” in LCMS Solution, and the refined impurity products by preparation and purification were standardized and confirmed. The impurity content was determined by HPLC (with the same condition of one-dimensional liquid chromatography for qualitative analysis). RESULTS: The main unknown impurity in Oxiracetam capsules is oxiracetam acid. The content of the refined product was 99.5% after preparation and purification. The contents of oxiracetam acid in 9 batches of Oxiracetam capsules were 0.05% -0.14%. CONCLUSIONS: The established two-dimensional UPLC-IT-TOF-MS method can accurately locate the peak position of the impurity oxiracetam acid, and analyze its structure, while the corresponding content determination method can better separate the impurity from the main drug and other

出版社,1991:109.

[28] 于金平,任全进.解毒驱虫话紫藤[J].园林,2000(5):48.

[29] 党璇,杨文慧,姚默,等.凌霄属药理学研究概况[J].安徽农

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(No.2017ZX091-01001)

\* 主任药师。研究方向:药物分析。电话:0311-85212004。E-mail:554392355@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:0311-85212004。E-mail:1343777894@qq.com

业科学,2011,39(33):20389-20390.

[30] 王翊.握灵本草[M].北京:中国中医药出版社,2012:229.

[31] 许洪波,周瑞,谢培,等.27种中草药的黄嘌呤氧化酶抑制活性筛选[J].时珍国医国药,2017,28(3):547-548.

[32] TUNG YT, CHANG ST. Inhibition of xanthine oxidase by *Acacia confusa* extracts and their phytochemicals[J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58(2):781-786.

(收稿日期:2019-07-12 修回日期:2020-01-13)

(编辑:张元媛)