

泻白散及其主药体外抗氧化活性研究

李莉^{1,2}, 文旺^{2,3}, 周垚垚^{1,2}, 张磊^{1,2}, 周大铮⁴, 李德坤^{1,2}, 鞠爱春^{1,2*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂新技术企业重点实验室, 天津 300410

3. 中国药科大学 中药学院, 江苏 南京 211198

4. 天士力医药集团股份有限公司, 天津 300410

摘要: 目的 建立泻白散和方中3味主药甘草、地骨皮、桑白皮的体外抗氧化活性测定方法, 并对31批药材和10批泻白散煎液的抗氧化活性进行测定。方法 采用紫外可见分光光度法检测一定浓度的药材提取液引起DPPH溶液吸光度(A)值降低, 考察波长为517 nm, 分别探索3味药材抗氧化活性成分的提取条件; 并进行不同溶剂的吸收考察、专属性考察、DPPH线性考察、药材提取液线性考察、精密度试验、重复性试验、耐用性考察等方法学验证; 以清除DPPH自由基的半抑制浓度(IC₅₀)作为评价指标, 对泻白散和方中3味药材的体外抗氧化活性进行考察。结果 地骨皮、甘草、桑白皮和泻白散提取液的IC₅₀均值为0.31、1.24、1.49和0.91 g/L, 泻白散提取工艺对方中药物抗氧化活性的保留均值为56%。结论 建立的抗氧化活性测定方法可用于泻白散及方中主药的抗氧化活性测定, 为多维度评价中药和中药材质量提供新思路。

关键词: 泻白散; 甘草; 地骨皮; 桑白皮; 抗氧化活性; 半数抑制浓度(IC₅₀); DPPH自由基; 中药材

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2020)10-2009-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.013

Study on antioxidant activity of famous classical formula Xiebai San and main compositions *in vitro*

LI Li^{1,2}, WEN Wang^{2,3}, ZHOU Yaoyao^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, ZHOU Dazheng⁴, LI Dekun^{1,2}, JU Aichun^{1,2}

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Key Laboratory of Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine Injections of Tianjin Enterprise, Tianjin 300410, China

3. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

4. Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of antioxidant activity of Xiebai San and three main compositions of it *in vitro*, determine the antioxidant activity of 31 batch samples of CMM and 10 batch samples of Xiebai San. **Methods** To explore the extraction conditions of antioxidative components from 3 CMM, the decrease of DPPH solution absorption value caused by a certain concentration CMM solution was taken as the evaluation index (change of absorption value/concentration of CMM); the blank absorption, specificity, DPPH linearity, herbal extract linearity, precision test, repeatability test and durability test were used to verify the methodology. The IC₅₀ of cleared DPPH free radicals was used as the index to evaluate the antioxidant activity in vitro of Xiebai San and three CMM. **Results** The mean IC₅₀ of *Lycii Cortex*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Mori Cortex* and Xiebai San were 0.31, 1.24, 1.49 and 0.91 g/L; The mean value of the antioxidant activity of the extract from Xiebai San was 56%. **Conclusion** The method was applicable to determine the antioxidant activity of Xiebai San and the main compositions of it *in vitro*. And it provides new idea for multi-dimensional evaluation the quality of traditional Chinese medicine and CMM.

Key words: Xiebai San; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; *Lycii Cortex*; *Mori Cortex*; antioxidant activity; half maximal inhibitory concentration(IC₅₀); DPPH radical; Chinese medicinal material (CMM)

收稿日期: 2019-12-18

基金项目: 天津市科技重大专项与工程(18ZXXYSY00020)

第一作者: 李莉(1975—),女,正高级工程师,研究方向为药物制剂工艺研究和质量控制。Tel: (022)84498152 E-mail: lili4@tasly.com

*通信作者: 鞠爱春(1973—),男,正高级工程师,研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

泻白散源于《小儿药证直诀》，由桑白皮、地骨皮、甘草、粳米组成的一种煮散剂，主治小儿肺盛、气急喘嗽^[1]。方中君药桑白皮性寒味甘，归肺经，具有泻肺平喘的功效；臣药地骨皮性寒味甘，归肺、肝、肾经，具有清肺降火之功效，可助君药泻肺中伏火；甘草和粳米养胃和中，为佐药，4味药合用，共同发挥止咳平喘的功效^[2]。

研究表明自由基损伤和氧化应激在小儿肺炎^[3-4]、小儿下呼吸道感染^[5]、急性肺损伤^[6]、慢性阻塞性肺疾病^[7]和肺纤维化^[8]等肺相关疾病的发病机制中的作用不容忽视。活性氧产生过多会破坏肺部氧化还原平衡，可以引起细胞的氧化应激反应，进而引起细胞的损伤甚至凋亡，这些异常与肺相关疾病有着密切的关系^[8]。本研究通过对一定浓度的桑白皮、地骨皮、甘草以及泻白散标准煎液液体1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼[1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, 2, 2-diphenyl-1-(2, 4, 6-trinitrophenyl)hydrazyl, DPPH]自由基清除能力的测定，研究其体外抗氧化活性，以期为泻白散标准煎液在该类疾病的防治提供依据，为整体评价中药质量提供新思路。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Bio Tek Epoch全波长酶标仪(数字本草中药检测有限公司, 资产编号 TJ-01-902); 电子分析天平(型号 XS105、ME 104/02, 美国 Mettler Toledo 公司); 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 型号 KQ3200E); 超纯水仪(Millipore 公司, 型号 Milli-Q Advantage A10); Research plus 手动移液器(艾本德(上海)国际贸易有限公司, 规格 20~100 μL 、100~1 000 μL 、0.5~5.0 mL 和 1~10 mL 等); 96 孔微孔板(Corning 公司, 型号 3599); 容量瓶(德国 BLAU BRAND, 规格 2、5、10、25、50 和 100 mL 等); Vortex-Genie2 漩涡混合器(美国 Scientific Industries 公司, 型号 Vortex-Genie2)。

1.2 试剂、试药和耗材

抗坏血酸 Vc(Sigma 公司, 货号 PHR-1068-2G, 批号 LRAA8956); DPPH(Sigma 公司, 货号 D9132-1G, 批号 STBG8547); 无水乙醇(天津市康科德科技有限公司, 批号 190116); 甘草药材(10 批, 产自内蒙、甘肃、陕西), 经周大铮博士鉴定为甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fich. 的干燥根和根茎; 地骨皮药材(10 批, 产自内蒙、河北、陕西和四川), 经张磊博士鉴定为枸杞 *Lycium chinense* Mill. 的干燥根皮;

桑白皮药材(11 批, 产自安徽、四川、湖南、贵州和江苏), 经周大铮博士鉴定为桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮; 泻白散煎液依据文献方法^[1]制备(10 批, 实验室自制)。

2 方法

2.1 溶剂的选择

一般选择甲醇或乙醇作为 DPPH 的溶剂, 综合考虑泻白散处方组成(地骨皮、桑白皮、甘草)和制备工艺、甲醇的毒性和设备检测原理, 选择以无水乙醇作为其稀释溶剂。

2.2 不同溶剂的吸收考察

以 500 μL 超纯水和 500 μL 无水乙醇的混合溶液作为空白溶剂, 以 66.45 mg/L DPPH 无水乙醇溶液作为控制液。精密吸取空白溶液、控制液、无水乙醇和超纯水各 200 μL 加入 96 孔微孔板底部, 在 400~700 nm 进行扫描。超纯水、无水乙醇和空白溶剂在 400~700 nm 的吸光度(*A*)值接近, 其 517 nm 处的 *A* 值分别为 0.088、0.082、0.085, 该值与 96 孔微孔板的本底 *A* 值接近, 由此可知 3 种溶剂在 517 nm 处吸收干扰相对较小。

2.3 专属性考察

分别称取地骨皮、桑白皮和甘草药材粉末约 1 g, 分别加入超纯水 100 mL, 超声提取 30 min, 离心, 取上清液。分别吸取上述 3 味药材提取液各 500 μL , 分别加入无水乙醇 500 μL , 混合均匀, 作为 3 味药材的本底液。另分别吸取上述 3 味药材提取液各 500 μL , 分别加入质量浓度为 0.132 9 g/L 的 DPPH 溶液 500 μL , 混合均匀, 作为 3 味药材的反应液。以质量浓度为 66.45 mg/L 的 DPPH 溶液作为控制液。精密吸取上述 7 种液体各 200 μL , 加入 96 孔微孔板底部, 在 400~700 nm 对其进行扫描, 以波长-*A* 值绘制曲线。如图 1 所示, DPPH 控制液在 517 nm 附近具有较强吸收, 3 味药材的本底液和反应液在 490~590 nm 处均无较强吸收, 517 nm 处亦无特征吸收, 说明 3 味药材在此浓度下能够较为完全地捕获 DPPH 的自由基, 其提取液具有清除该自由基作用, 该试验过程中 3 味药材中捕获自由基的活性成分为足量或过量。

2.4 DPPH 溶液线性考察

精密称取 DPPH 适量, 加适量无水乙醇配制成质量浓度为 70.9、62.0、53.2、44.3、35.4、17.7、8.9 和 3.5 mg/L 的溶液。精密吸取上述溶液各 200 μL , 加入至 96 孔微孔板底部, 以无水乙醇作为空白溶液, 测定其 517 nm 处 *A* 值。通过将 DPPH 溶液的质量浓

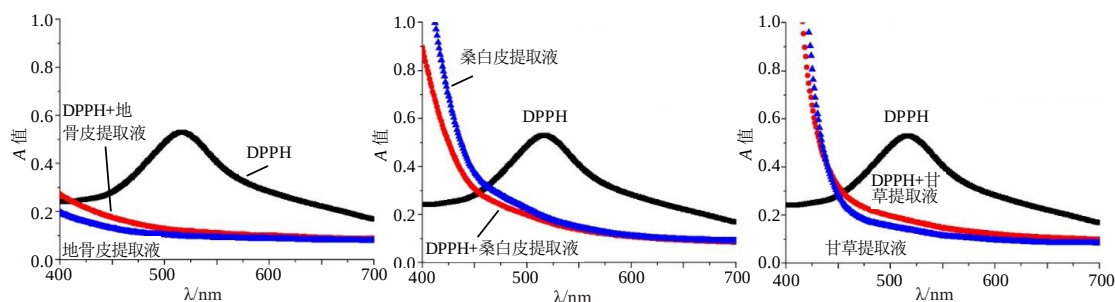


图1 溶剂和专属性考察结果

Fig. 1 Results of solvent and specificity diagram

度与对应的 A 值($A=A_{\text{测}}-A_{\text{空白}}$)进行趋势拟合可知,DPPH溶液质量浓度在 $3.5\sim 70.9\text{ mg/L}$ 线性良好,其趋势拟合方程为 $Y=4.5863X^2+12.286X-0.0047$, $R^2=0.9984$ 。

2.5 提取条件的考察

2.5.1 不同提取溶剂的考察 分别精密称取3味药材粉末约 0.5 g ,分别加入超纯水和体积分数为20%、40%、60%、80%、95%的乙醇水溶液各 25 mL ,超声提取 30 min , 4000 r/min 离心 5 min ,得相应提取液;精密吸取各提取液适量,加超纯水稀释成生药质量浓度(C)分别为 2 g/L (桑白皮)、 2 g/L (甘草)和 0.4 g/L (地骨皮)供试液。精密吸取各供试液 $500\text{ }\mu\text{L}$,分别加入质量浓度为 123.9 mg/L 的DPPH溶液 $500\text{ }\mu\text{L}$,混合均匀(相当于DPPH溶液的质量浓度为 66.45 mg/L),室温下反应 $5\sim 10\text{ min}$ 。精密吸取上述反应液和控制液(DPPH质量浓度为 66.45 mg/L)各 $200\text{ }\mu\text{L}$,加入至96孔微孔板底部,测定其 517 nm 处 A 值,计算其 A 值变化量($\Delta A=A_{\text{控制}}-A_{\text{测}}$)与供试液 C 的比值。

甘草和桑白皮药材的超纯水和不同体积分数乙醇供试液的抗氧化差异不大,其中80%乙醇提取液抗氧化成分提取更为充分;地骨皮药材的超纯水和不同体积分数乙醇供试液的抗氧化差异较大,其中80%乙醇提取液抗氧化成分提取更为充分,95%乙醇提取液抗氧化成分提取较弱。结果见表1。

2.5.2 提取时间的考察 分别精密称取3味药材粉末约 0.5 g ,分别加入80%乙醇水溶液 25 mL ,分别超声提取 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 min , 4000 r/min 离心 5 min ,得相应提取液。精密吸取各提取液适量,加超纯水稀释成 C 分别为 2 g/L (桑白皮)、 2 g/L (甘草)和 0.4 g/L (地骨皮)的供试液。精密吸取各供试液 $500\text{ }\mu\text{L}$,分别加入质量浓度为 123.9 mg/L 的DPPH溶液 $500\text{ }\mu\text{L}$,混合均匀,室温下反应 $5\sim 10\text{ min}$ 。精密吸取上述反应液和控制液(质量浓度为

表1 不同提取溶剂考察结果

Table 1 Investigation results of different extraction solvents

乙醇/%	桑白皮		甘草		地骨皮	
	$C_{\text{药材}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\Delta A/C_{\text{药材}}$	$C_{\text{药材}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\Delta A/C_{\text{药材}}$	$C_{\text{药材}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\Delta A/C_{\text{药材}}$
0	2.054 8	0.190	2.048 4	0.138	0.414 0	0.237
20	2.036 4	0.168	2.024 8	0.113	0.410 3	0.288
40	2.082 4	0.192	2.071 6	0.188	0.407 9	0.402
60	2.104 4	0.202	2.064 0	0.211	0.402 5	0.415
80	2.033 6	0.229	2.053 2	0.213	0.414 5	0.495
95	2.107 6	0.201	2.038 8	0.203	0.412 7	0.133

66.45 mg/L)各 $200\text{ }\mu\text{L}$,加入至96孔微孔板底部,测定其 517 nm 处 A 值,计算其 A 值变化量($\Delta A=A_{\text{控制}}-A_{\text{测}}$)与供试液 C 的比值。3味药材80%乙醇 $20\sim 60\text{ min}$ 提取的抗氧化强度波动不大。结果见表2。

表2 不同提取时长考察结果

Table 2 Investigation results of different extraction time

t/min	桑白皮		甘草		地骨皮	
	$C_{\text{药材}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\Delta A/C_{\text{药材}}$	$C_{\text{药材}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\Delta A/C_{\text{药材}}$	$C_{\text{药材}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\Delta A/C_{\text{药材}}$
10	2.040 0	0.286	2.048 0	0.232	0.408 0	0.635
20	2.068 4	0.292	2.075 2	0.238	0.401 6	0.640
30	2.035 2	0.297	2.002 0	0.234	0.403 0	0.588
40	2.015 2	0.295	2.008 4	0.248	0.409 3	0.596
50	2.013 6	0.300	2.014 4	0.251	0.410 6	0.650
60	2.080 4	0.288	2.010 8	0.259	0.409 1	0.655

2.5.3 提取溶剂倍数的考察 分别精密称取3味药材粉末适量,分别加入 10 、 50 、 100 倍80%乙醇水溶液适量,超声提取 25 min , 4000 r/min 离心 5 min ,得相应提取液。精密吸取各提取液适量,加超纯水稀释成 C 分别为 2 g/L (桑白皮)、 2 g/L (甘草)和

0.4 g/L(地骨皮)供试液。精密吸取各供试液500 μ L,分别加入质量浓度为123.9 mg/L的DPPH溶液500 μ L,混合均匀,室温下反应5~10 min。精密吸取上述反应液和控制液(质量浓度为66.45 mg/L)各200 μ L,加入至96孔微孔板底部,测定其517 nm处的 A 值,计算其 A 值变化量($\Delta A=A_{\text{控制}}-A_{\text{测}}$)与供试液 C 的比值。溶剂倍数对抗氧化强度的影响不大,结果见表3。综合考虑上述因素,最终确定3味药材抗氧化活性成分提取的条件为:以10倍量的80%乙醇作为提取溶剂,超声提取时长为25 min。

表3 不同溶剂倍数考察结果

Table 3 Investigation results of different solvent multiples

溶剂 倍数	桑白皮		甘草		地骨皮	
	$C_{\text{药材}}/$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\Delta A/$ $C_{\text{药材}}$	$C_{\text{药材}}/$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\Delta A/$ $C_{\text{药材}}$	$C_{\text{药材}}/$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\Delta A/$ $C_{\text{药材}}$
10	2.005 8	0.230	2.041 4	0.303	0.408 4	0.713
50	2.035 2	0.218	2.002 0	0.306	0.403 0	0.702
100	2.009 0	0.205	2.068 6	0.285	0.404 8	0.613

2.6 精密度试验

分别精密称取3味药材粉末约0.5 g,依据“2.5”项下确定条件得相应提取液;精密吸取3种提取液适量,加超纯水分别稀释成 C 为1.655 g/L(桑白皮)、2.075 g/L(甘草)和0.411 g/L(地骨皮)的供试液。精密吸取3个供试液各500 μ L,分别加入质量浓度为122.2 mg/L的DPPH溶液500 μ L,混合均匀,室温下反应5~10 min。精密吸取上述反应液和控制液(DPPH质量浓度为61.1 mg/L)各200 μ L,加入至96孔微孔板底部,测定其517 nm处的 A 值,重复测定6次。桑白皮、甘草和地骨皮反应液6次测定结果的RSD分别为0.9%、1.0%、1.0%。

2.7 线性考察

依据“2.5”项下确定条件制备3味药材的提取液,分别精密吸取提取液适量加超纯水制成 C 为0.827~4.137 g/L的桑白皮线性供试液、0.830~4.150 g/L的甘草线性供试液和0.205~0.616 g/L的地骨皮线性供试液。精密吸取上述线性供试液各500 μ L,分别加入质量浓度为122.2 mg/L的DPPH溶液500 μ L,混合均匀,室温下反应5~10 min,测定517 nm下反应液和控制液 A 值,并将反应液浓度和相应的 A 值变化量进行趋势拟合。3味药材供试液的浓度与 A 值变化量间具有多项式线性相关的特性,且其 R^2 均大于0.99,上述浓度范围的浓度- A 值变化量拟合结果分别为:桑白皮 $Y=-0.085\ 27\ X^2+$

$0.421\ 74\ X+0.321\ 33$, $R^2=0.993\ 47$;地骨皮 $Y=2.169\ 64\ X^2+1.096\ 76\ X+0.123\ 6$, $R^2=0.992\ 79$;甘草 $Y=-0.200\ 24\ X^2+0.753\ X+0.098\ 25$, $R^2=0.992\ 9$ 。

2.8 重复性考察

依据“2.5”项下确定条件制备3味药材的提取液,分别精密吸取提取液适量加超纯水分别制备成 C 为4.137 g/L桑白皮供试液、4.150 g/L甘草供试液和61.6 mg/L地骨皮供试液各6份。精密吸取上述供试液各500 μ L,分别加入质量浓度为122.2 mg/L的DPPH溶液500 μ L,混合均匀,室温下反应5~10 min,测定517 nm处反应液和控制液(61.1 mg/L) A 值。6次测定结果显示,桑白皮、甘草和地骨皮反应液 A 值变化量的RSD分别为0.7%、1.5%、1.8%,所建方法重复性较好。

2.9 耐用性考察

依据“2.5”项下确定条件制备3味药材的提取液,分别精密吸取提取液适量加超纯水分别制备成 C 为4.137、3.309、2.068、1.655和1.241 g/L的桑白皮线性供试液,4.150、3.320、2.075、1.660和0.830 g/L的甘草线性供试液,0.616、0.513、0.411、0.308和0.205 g/L的地骨皮线性供试液各6份。精密吸取上述供试液各500 μ L,分别加入质量浓度为122.2 mg/L的DPPH溶液500 μ L,混合均匀,室温下反应5~10 min,测定517 nm处反应液和控制液(61.1 mg/L) A 值。通过计算可知,由高到低5个梯度浓度的桑白皮反应液 A 值变化量的RSD分别为0.7%、0.4%、0.8%、1.0%和1.9%,甘草反应液 A 值变化量的RSD分别为1.5%、0.4%、2.0%、2.2%和1.5%,地骨皮反应液 A 值变化量的RSD分别为1.8%、3.3%、2.3%、2.2%和4.0%,所建方法耐用性较好。

2.10 样品检测

2.10.1 药材抗氧化活性的测定 试验选取了4个产地10批地骨皮、4个产地10批甘草和6个产地11批的桑白皮,依据“2.5”项下确定条件制备相应提取液,并依据“2.7”项下要求配制成相应浓度的线性供试液、测定517 nm处反应液和控制液 A 值,并进行线性溶液浓度和 A 值变化量的趋势拟合,计算各主药的半数抑制浓度(IC_{50})。如表4所示,10批地骨皮的 IC_{50} 均值为0.31 g/L(0.21~0.39 g/L);10批甘草的 IC_{50} 均值为1.24 g/L(0.72~2.90 g/L);11批桑白皮的 IC_{50} 均值为1.49 g/L(0.84~2.53 g/L)。

2.10.2 泻白散煎液抗氧化活性的测定和 IC_{50} 的计

表4 3味药材抗氧化检测结果
Table 4 Antioxidant test results of 3 CMM

样品	产地	IC ₅₀ /(g·L ⁻¹)	样品	产地	IC ₅₀ /(g·L ⁻¹)
地骨皮1	内蒙古	0.21	甘草7	甘肃张掖6	1.00
地骨皮2	河北1	0.29	甘草8	甘肃瓜州	1.14
地骨皮3	河北2	0.34	甘草9	陕西榆中1	1.36
地骨皮4	河北3	0.32	甘草10	陕西榆中2	2.90
地骨皮5	四川阿坝1	0.28	桑白皮1	四川广元	1.31
地骨皮6	四川阿坝2	0.34	桑白皮2	贵州天柱1	2.48
地骨皮7	四川阿坝3	0.36	桑白皮3	湖南怀化1	1.39
地骨皮8	陕西1	0.39	桑白皮4	湖南怀化2	1.76
地骨皮9	陕西2	0.28	桑白皮5	贵州三穗1	1.03
地骨皮10	陕西3	0.32	桑白皮6	湖南怀化3	1.18
甘草1	内蒙古	1.19	桑白皮7	贵州三穗2	1.25
甘草2	甘肃张掖1	1.06	桑白皮8	安徽亳州	2.53
甘草3	甘肃张掖2	0.85	桑白皮9	贵州天柱2	0.84
甘草4	甘肃张掖3	1.43	桑白皮10	贵州天柱3	1.69
甘草5	甘肃张掖4	0.77	桑白皮11	江苏	0.96
甘草6	甘肃张掖5	0.72			

算 依据泻白散处方组成^[1]精密称取3味主药粉末,加12倍超纯水,回流提取30 min,放冷至50℃以下,4 000 r/min离心5 min,取上清液0.5 mL,加超纯水定容至10.0 mL,混合均匀,作为储备液。分别精密吸取储备液200、300、400、500、600 μL,加超纯水适量,使成1 000 μL。精密吸取上述5个浓度的溶液各500 μL,分别加入质量浓度为122.2 mg/L的DPPH溶液500 μL,混合均匀,室温下反应5~10 min,测定517 nm下反应液和控制液(61.1 mg/L)的A值,并将反应液浓度和A值变化量进行趋势拟合,计算各泻白散煎液的IC₅₀。如表5所示,10批泻白散煎液的IC₅₀均值为0.91 g/L(0.56~1.18 g/L)。

表5 泻白散抗氧化检测结果
Table 5 Antioxidant test results of Xiebai San

样品名称	IC ₅₀ /(g·L ⁻¹)	样品名称	IC ₅₀ /(g·L ⁻¹)
泻白散煎液1	0.56	泻白散煎液6	1.07
泻白散煎液2	0.95	泻白散煎液7	0.83
泻白散煎液3	0.74	泻白散煎液8	1.18
泻白散煎液4	0.80	泻白散煎液9	1.00
泻白散煎液5	0.99	泻白散煎液10	0.99

3 讨论

DPPH是一种稳定的、以氮为中心的质子自由基,空间位阻可能会决定反应的倾向,小分子化合

物更易接近自由基而拥有相对较高的抗氧化活性,而大分子化合物由于受空间位阻的影响不易接近自由基而影响测定结果,由于空间位阻决定反应的倾向,小分子化合物由于更易接近自由基而拥有相对较高的抗氧化活性^[9-10]。甘草中主要成分甘草素、甘草苷、甘草酸、芹糖甘草苷、异甘草素、槲皮素和光甘草定^[11-16],桑白皮中主要成分白藜芦醇、氧化白藜芦醇、桑皮苷、绿原酸^[17-21],地骨皮中主要成分地骨皮甲素、地骨皮乙素^[22-26]等成分相对分子量较小,符合该方法对待测物空间构型的要求,相关成分的抗氧化活性也得到证实。

鉴于DPPH自由基清除率随自由基清除剂溶液浓度的增加而增加(DPPH自由基量过量条件下),为满足样本自由基清除能力(抗氧化活性)强弱的评价,采用IC₅₀值作为评价指标。通过对不同提取溶剂、不同提取时长和提取溶剂倍数等的考察确定了3味药材的提取方法,并对其抗氧化活性进行测定,通过对比其IC₅₀可知:地骨皮药材的IC₅₀较低,即相同的DPPH自由基清除条件下,所需地骨皮药材的浓度低于桑白皮和甘草,可认为相同浓度下地骨皮药材体外抗氧化活性强于桑白皮和甘草;3味药材不同产地和批次的IC₅₀差异较大,这可能与不同产地间药材的物质基础相关。小儿“脏腑柔弱,易虚易实、易寒易热”,故在治疗小儿疾病时遣方用药方面,常于祛邪之中伍以扶正之品,使祛邪而不伤正,泻白散方中桑白皮甘寒入肺,泻肺平喘,又因其质润不刚不燥,而不伤娇脏,故为君药;地骨皮甘淡而寒,入肺、肝、肾经,既能直入阴分助君药泻肺中伏火,又能清泻肾中虚热以退蒸;君臣相合,清肺火以复肺气之肃降,泻肾热则虚火不致犯肺。甘草、粳米养胃和中,既可扶胃气,又可防桑白皮和地骨皮寒凉害胃;四药合用,共奏泻肺清热,止咳平喘之功^[2,27]。这与上述3味药材抗氧化活性研究结果具有一致性。另外,本研究仅从DPPH自由基清除角度考察了泻白散及方中药味的体外抗氧化活性,鉴于中药成分的复杂性,基于更多产地、批次和基于其他原理的体外抗氧化活性的研究尚待开展。

通过将10批泻白散煎液IC₅₀测定结果关联方中药味IC₅₀和投药量的分析可知,标准煎液提取工艺对方中药材抗氧化活性的保留值(抗氧化活性的保留值=(IC₅₀桑白皮 ×m_{桑白皮} +IC₅₀地骨皮 ×m_{地骨皮} +IC₅₀甘草 ×m_{甘草})/IC₅₀泻白散煎液)为56%(40%~75%),泻白散煎液提取工艺能够较为有效地保留方中药味的抗氧化活性,为其发挥治疗作用提供保证。

中药材、饮片和中药制剂质量的科学评价具有系统性和复杂性等特点。如何解决药材-饮片-中药制剂之间标准类似且指标成分单一,中药材和(或)饮片质量指标与临床疗效关联性不强的现状,如何在基于中药传统用法和充分考虑中药制剂过程特殊性的前提下,通过中药材和/或饮片质量全面且恰当地预测和建立中药制剂质量标准,确保临床使用的安全有效,对中医药的发展具有重要意义^[28]。本研究采用具有快速、经济、操作简单、适合大样本量检测的生物化学方法对泻白散和其方中3味主药的体外抗氧化活性进行测定,将泻白散和其方中药味的浓度与其抗氧化活性相关联,不仅反映了制剂过程的量变和传递规律,同样也佐证了3味药材中很多已明确结构成分均具有一定的体外抗氧化活性,该方法或可从整体上反映泻白散中药材、煎液和临床疗效间具有一定的相关性,亦或可作为基于中药Q-markers的思路开展中药制剂研究和生产过程控制的借鉴。

参考文献

- [1] 文旺,李莉,李德坤,等.经典名方的“遵古”研发思路探讨——以泻白散为例[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):196-201.
- [2] 赵晖,任耀全.小议泻白散[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(11):707.
- [3] 谭鑫.自由基清除剂在小儿肺炎治疗中的应用[J].临床医学,2017,37(6):107-108.
- [4] 饶延华.自由基清除剂在小儿肺炎治疗中的临床应用[J].中国妇幼保健,2012,27(7):1014-1016.
- [5] 李渠北,符州,张良吉,等.小儿下呼吸道感染与氧自由基关系的研究[J].四川医学,1997(3):35-36.
- [6] 薄丽艳,李聪聪,金发光.抗氧化治疗在急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征中的应用进展[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2016,9(1):80-81.
- [7] 裘雪娇.慢性阻塞性肺病患者唾液中氧化与抗氧化失衡的临床意义[D].济南:山东大学,2018.
- [8] 杨丽,吕晓东,刘勇明,等.中医药防治肺纤维化氧化应激作用机制研究进展[J].世界中西医结合杂志,2017,12(3):297-301.
- [9] 韩飞,周孟良,钱健亚,等.抗氧化剂抗氧化活性测定方法及其评价[J].粮油食品科技,2009,17(6):54-57.
- [10] 张雪,苗婷婷,陆炯,等.天然产物抗氧化活性评价方法研究进展[J].广州化工,2017,45(19):7-10.
- [11] 马鸿雁,邓雨娇,马倩,等.甘草的研究概况[J].中药与临床,2018,9(1):59-62.
- [12] 张光辉,郭惠,张拴,等.甘草苷的合成及抗氧化活性研究[J].化学与生物工程,2019,36(10):16-19.
- [13] 胡晓慧,代向东,李来来,等.生甘草与炙甘草的抗氧化能力比较研究[J].天津中医药大学学报,2016,35(2):114-117.
- [14] 常婧.甘草中黄酮类有效成分的提取、含量测定和抗氧化性研究[D].太原:中北大学,2014.
- [15] 王铎.甘草中黄酮类化合物的分离提取及抗氧化活性评价研究[D].长春:长春师范学院,2011.
- [16] 陈健敏,黄玮玥,叶雅玲,等.甘草提取物的功效及其作用机制研究[J].长江大学学报:自然科学版,2019,16(7):109-115.
- [17] 朴淑娟.桑白皮化学成分及不同来源桑白皮中二苯乙烯苷类化合物含量测定的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2005.
- [18] 姚维,王仕敏,袁珉汪,等.响应面设计优化桑白皮黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J].广东化工,2018,45(13):32-34,11.
- [19] 吴永祥,吴丽萍,王卫东,等.桑白皮多酚的抗氧化和对UV辐射致成纤维细胞光老化的修复作用[J].食品与机械,2018,34(2):15-18.
- [20] 商学兵,李超.桑白皮总黄酮的超声波协同微波提取工艺及其抗氧化活性研究[J].食品工业,2013,34(1):63-66.
- [21] 王元成,伍春,陈虎,等.桑白皮中白藜芦醇、氧化白藜芦醇和桑皮苷的抗氧化活性[J].食品科学,2011,32(15):135-138.
- [22] 马天宇,王磊,金铃和,等.地骨皮化学成分及生物活性研究[J].中国果菜,2018,38(5):9-13.
- [23] 袁媛.中药地骨皮化学成分、含量测定及药理活性研究进展[J].中医药临床杂志,2018,30(11):2131-2134.
- [24] 崔珏,李超,姜中生.桑白皮总黄酮的抗氧化与镇痛活性研究[J].食品科学,2011,32(23):281-284.
- [25] 王洪侠.桑不同提取物体外抗氧化活性的比较研究[J].赤峰学院学报:自然科学版,2008(1):104-107.
- [26] 叶真,倪海祥,黄琦,等.地骨皮提取液对糖尿病肥胖大鼠血清炎症因子及抗氧化功能的影响[J].中华临床医师杂志:电子版,2007(5):52-55.
- [27] 李婷,张彤,王丹丹.泻白散文献分析及研究进展[J].中成药,2019,41(8):1927-1931.
- [28] 陈士林,刘昌孝,张铁军,等.基于中药质量标志物和传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议[J].中草药,2019,50(19):4519-4528.