

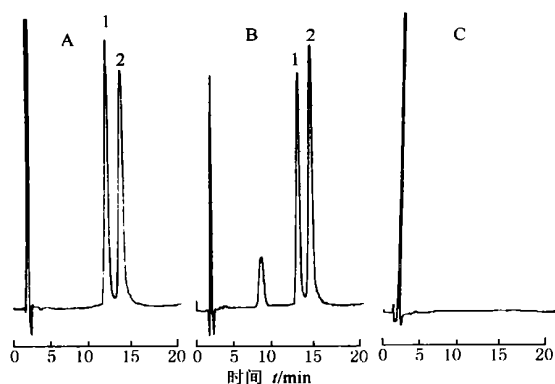


图 1 麻黄碱对照品(A)、风湿关节炎片(B)和阴性液(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of ephedrine (A), Fengshi Guanjiayan Tablet (B), and negative sample (C)

献报道的 RP-HPLC 方法较多^[2~4]。实验曾选用甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾(以磷酸调至 pH 2.5)、十二烷基硫酸钠溶液-乙腈-磷酸作为流动相,前者 pH 值较小,使用一段时间后造成柱效明显降低,而

离子对色谱平衡时间长,在所选波长处噪音大,难清洗。本实验选择的色谱条件下麻黄碱和伪麻黄碱分离度较好,适合企业常规质控。

3.2 未对制剂中的伪麻黄碱定量分析,但实验中精密称取伪麻黄碱对照品 2.3 mg,用甲醇溶解定容至 5 mL,稀释 10 倍后在上述色谱条件下进样,以确定此色谱条件下图谱中伪麻黄碱的位置。

3.3 采用碱性氯仿较酸水-有机溶剂提取更为简便,提取效率较高。

References

- [1] Zha L H, Su Z G, Zhang G Z, et al. Application and research on *Ephedra* resource [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2002, 19(4): 396-405.
- [2] Liang H X, Yu R G, Yang Q H, et al. Use of the Powell method to optimize the composition of HPLC mobile phase — the separation of ephedrine and pseudoephedrine [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 1991, 26(1): 49-52.
- [3] Liang H, Li W Y, Chen Y. Determination of ephedrine in Qingxuan Preparations by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1999, 19(4): 276-277.
- [4] Kazuhiko S, Keiichi S, Yuji I, et al. Determination of alkaloids in *Ephedra* herb by high-performance liquid chromatography [J]. *Iyakuin Kenkyu* (医药品研究), 1996, 27(5): 255-261.

均匀设计与正交设计联用筛选复方银杏的最佳配比

唐春红^{1,2}, 蔡绍哲¹, 王伯初^{1*}

(1. 重庆大学生物工程学院 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044;

2. 重庆工商大学环境与生物工程学院, 重庆 400033)

正交设计是在中药复方筛选试验中使用最多的一种设计方法, 均匀设计由于其试验次数少, 优化效率高的优点也开始用于中药复方的筛选^[1]。本实验采用均匀设计联用正交设计的方法, 以内皮细胞为作用对象, 以细胞释放的一氧化氮和细胞生长状态作为观察指标, 对以葛根素、银杏提取物和精氨酸为主效药的复方银杏进行最佳配比的筛选, 为以后的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料: 银杏提取物 GBE-828w 由贵州大学生化中试基地惠赠。葛根素由陕西正平制药公司惠赠。人脐静脉血管内皮细胞株 ECV-304 (中国科学院上海细胞生物研究所), 干粉型 DM EM /F₁₂ 培养基 (美国 Hyclone 公司), 水合联胺 (重庆东方试剂厂)。

1.2 仪器: CO₂ 培养箱 (美国 SHELL LAB 公司), WD800A SL—4 (格兰仕) 不锈钢型微波炉, 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), 3599 型 96 孔培养板 (美国 Corning Incorporated 公司), BD—RAD 酶标仪。

1.3 NO 的测定: Griess Reagent Kit (Beyotime Biotechnology) 在 1~100 μmol/L 有很好的线性关系。在 96 孔培养板内分别依次加入 50 μL 培养液、Griess Reagent I 和 II, 用酶标仪在 540 nm 下测定吸光度, 与标准曲线比较, 计算 NO 浓度。

1.4 各药物最佳质量浓度范围的确定: 将人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 传代于 50 mL 培养瓶中, 待细胞均匀铺满瓶底, 消化细胞 DM EM -F₁₂ 培养液吹打制成细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 0.1 mL, 含 1 × 10⁵ 个细胞, 培养 24 h 后, 弃上清液。

* 收稿日期: 2004-03-16

作者简介: 唐春红 (1965—), 女, 四川三台县人, 副教授, 现在重庆大学攻读博士学位, 研究方向为保健食品加工与天然产物制药。

(或改用无血清培养液培养 24 h, 弃上清液), 同时加入水合联胺和不同质量浓度的各种药物作用于细胞, 24 h 后检测 NO 浓度。优选得 GBE-828w、葛根素和精氨酸的最佳质量浓度范围分别为 100~ 500、0. 1~ 50、0. 1~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1. 5 方法设计: 按 $U_6(6^4)$ 和 $L_9(3^4)$ 安排试验, 优选银杏叶提取物、葛根素、精氨酸的最佳质量浓度。

2 结果与分析

2. 1 均匀试验设计结果: 见表 1。水合联胺损伤细胞加药物保护后, 可以用 NO 的增加为药物作用好坏的判断指标, 另一个指标是细胞生长状态的好坏, 通过表 1 直观看出, 序号 4 的结果较好。

表 1 $U_6(6^4)$ 均匀设计试验及结果

Table 1 $U_6(6^4)$ uniform design and results						
序号	因 素				指 标	
	GBE-828w ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	葛根素 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	精氨酸 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	空 列	NO/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	生长 状态
1	200	80	30	0	3. 314	形态较差
2	160	30	5	0	3. 991	形态较好
3	100	10	40	0	1. 197	形态一般
4	60	100	15	0	7. 922	形态很好
5	40	50	50	0	1. 332	形态差
6	20	20	25	0	6. 838	形态很好

2. 2 正交试验设计结果与分析: 见表 2。以均匀设计表中序号 4 中的各因素的水平数为基准上下浮动, 也可考虑单因素水平作用效果, 对各因素的水平数进行合理取值。通过各因素不同水平的极差分析和最优水平的排序分析, 可以得出, 该复方最佳配比为银杏提取物 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 葛根素 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 精氨酸 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这与正交试验表中和第 3 号组合恰巧是一致的, 其水平的取值经综合分析是可信的, 再通过验证试验和一系列的药理实验, 证明此最佳复方配比是正确的。

3 结论与讨论

3. 1 本实验通过均匀设计与正交设计联用, 筛选得到复方银杏中药复方最佳配比为: 银杏提取物、葛根素、精氨酸的质量浓度比为 40 120 20。

3. 2 内皮细胞被认为是心脑血管疾病基因治疗中最佳靶细胞^[2]。因此本研究选用内皮细胞作为药物筛选的靶细胞, 用水合联胺对内皮细胞进行损伤, 用不同浓度和配比的几种植物提取物对细胞进行处理, 以内皮细胞释放的 NO 和细胞的生长状态为药物作用的判断指标对复方进行筛选。本实验得到的复方配比能够将受损的内皮细胞恢复到正常状态, 证明它对心血管的保护机制之一是通过保护内皮细

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计结果

Table 2 $L_9(3^4)$ orthogonal design and the results				
试验号	GBE-828w/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	葛根素/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	氨基酸/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NO/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	40	80	10	4. 601
2	40	100	15	6. 024
3	40	120	20	8. 261
4	60	80	15	5. 211
5	60	100	20	6. 499
6	60	120	10	7. 176
7	80	80	20	5. 143
8	80	100	10	5. 415
9	80	120	15	6. 905
K_1	18. 886	14. 955	17. 192	
K_2	18. 886	17. 938	18. 140	
K_3	17. 463	22. 342	19. 903	
k_1	6. 295	4. 985	5. 731	
k_2	6. 295	5. 979	6. 046	
k_3	5. 821	7. 447	6. 634	
R	0. 474	2. 462	0. 903	
最优组合	A_1	B_3	C_3	
因素主次顺序	3	1	2	

胞而起作用的。

3. 3 均匀设计与正交设计联用的优点: 将两种设计方法有机结合, 可以扬长避短, 无论在药理学研究还是在制剂生产工艺参数的优化研究中, 都可以在省时、省力、省钱的基础上在整个实验范围内尽快找到最佳的复方配比、最佳药效和最优工艺条件, 使均匀设计的实验次数大为减少, 使正交设计能够进行直观分析的优点在药学研究中更好地发挥出来。

3. 4 均匀设计与正交设计联用的理论基础: 由于正交实验设计实验次数的跳跃性和均匀设计分析时和分析人员的数理统计知识的严格要求等, 使这两种设计方法在药学研究中的应用受到一定程度的限制。将均匀设计与正交设计联用是有其理论基础的, 对均匀试验设计而言, 如果没有计算机处理数据, 也可以从试验中找到一个最优的指标, 相应的试验为要选的工艺条件, 这种方法是建立在均匀性的基础之上, 由于试验点分散均匀, 试验中最优的工艺条件离试验范围内的最优工艺条件不是很远, 所以还是有效的。这就是可以先用均匀实验设计进行复方的粗筛, 再在此基础上用正交实验设计进行复方细筛的理论依据, 李卫民等^[1]通过实验证明了这一点。实验处理结果提示, 均匀设计联用正交设计的复方筛选方法可作为一种中药复方筛选的研究手段。

Reference:

[1] Li W M, Gao Y, Li D H. Application of uniform-design method used to select proportion of ingredients in Houpuwan [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志) 2001 (2): 18-20.