

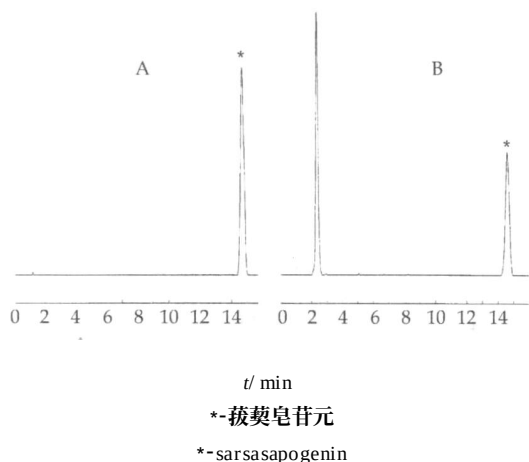


图2 菝葜皂苷元对照品(A)和知母(B) HPLC图谱
Fig. 2 HPLC Chromatograms of sarsapogenin reference substance (A) and Rhizoma Anemarrhenae (B)

知母为临床常用药,文献报道其有效成分大多为皂苷类成分。为寻找与临床功效相对应的活性成分已进行了许多基础研究。本实验选择知母中的代表性成分菝葜皂苷元、芒果苷为指标,比较可知炮制后知母中芒果苷和菝葜皂苷元的量均有不同程度的升高,但至于其炮制机制目前还不是很清楚,其炮制后量的改变机制及其与功效的关系需要进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 郑民实,陆仲毅.芒果苷与异芒果苷的抗单纯疱疹病毒作用[J].中国药理学报,1989,10(1):85.
- [3] 李好文,邓家刚,邓静.芒果苷国外研究进展[J].广西中医学院学报,2003,6(4):62.
- [4] 叶定江.中药炮制学[M].北京:人民卫生出版社1999.

多指标正交试验优选复方五仁醇胶囊含药血清的制备方法

罗琳¹, 窦志华², 丁安伟³, 黄金华¹, 陈洁¹, 徐济良^{1*}

(1. 南通大学, 江苏 南通 226001; 2. 南通大学附属南通第三医院, 江苏 南通 226006;

3. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 药效与化学指标相结合优选复方五仁醇胶囊含药血清制备方法。方法 建立 CCl₄ 诱导的大鼠肝细胞损伤模型, 采用 L₈(2⁷) 正交设计给药和取血方案, 制备大鼠含药血清或血浆, 考察含药血清或血浆对损伤肝细胞增值(MTT)和培养上清液中丙氨酸氨基转移酶(ALT)的影响, 高效液相法测定含药血清或血浆中五味子乙素含量, 并对结果综合加权评分和方差分析。结果 给药方式及采血时间对结果有显著影响, 且两者之间有交互作用, 血浆优于血清, 但综合加权评分无统计学意义, 动物是否造模无明显影响。结论 复方五仁醇胶囊含药血清较优的制备方法为正常大鼠连续 ig 给药 3 d, 上、下午各 1 次, 末次给药后 2 h 采血分离血浆。

关键词: 复方五仁醇胶囊; 含药血清; 五味子乙素; 正交试验

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0238-04

中药血清药理学是指在动物灌胃给药一段时间内采血分离血清, 用此含药物成分的血清(含药血清)进行体外药理试验的实验方法。该方法能反映中药经胃肠道消化吸收, 再经生物转化, 最后产生药理效应的过程, 不仅反映药物中可吸收部分的直接作用, 且能反映药物成分在机体作用下形成的代谢产物和药物诱生的机体内同源物质的间接效果, 体现了体外和体内实验较好的结合^[1]。近年来中药血清药理学研究取得的成果表明, 该方法值得推广应用, 但也存在一些问题与局限性, 其中含药血清制备技术的规范化亟待解决, 包括供体动物的选择、给药

方案、采血时间、含药血清的处理、体系中含药血清的加入量等^[2], 若忽视这些问题或处理不当, 都会影响研究的真实性和可信性, 从而使研究的重复性降低^[3]。复方五仁醇胶囊是以五味子为主的中药复方制剂, 治疗急慢性肝炎疗效确切^[4]。笔者拟以该制剂为对象, 探讨采用血清药理学与血清药化学方法相结合研究中药复方药效物质基础的可行性。本实验将药效与化学指标相结合, 采用正交设计综合考察动物是否造模、给药方案、采血时间和取血成分 4 个因素, 优选含药血清的制备方法, 为该制剂血清药理学和血清药化学研究提供参考。

* 收稿日期: 2008-03-16

基金项目: 江苏省中医药局科研项目(H05173); 江苏省高校研究生科技创新计划项目(140)

作者简介: 罗琳(1976-), 女, 江苏南京人, 讲师, 硕士, 从事药理学研究。Tel: (0513) 85051726 E-mail: luolin@ntu.edu.cn

* 通讯作者 徐济良 Tel: (0513) 85051727 E-mail: jlxu@ntu.edu.cn

1 仪器、试药及动物

HERA cell CO₂ 培养箱(德国 GmbH 公司); BT-200B 数显恒流泵(上海沪西分析仪器厂); BIO-TEK340 酶标仪(美国 Sigma 公司); 日立 7170 全自动生化分析仪(日本日立公司); 1100 Series 高效液相色谱仪、HP 化学工作站(美国 Agilent 公司)。

羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, 香港 Farco 公司, 批号 L0024LJ0101M21), 乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA, 美国 Amresco 公司, 批号 0732), 胶原酶 IV(美国 Sigma 公司, 批号 0406), 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司, 批号 030702), DMEM 培养基(美国 Gibco 公司, 批号 1255136), 新西兰新生小牛血清(美国 HyClone 公司, 批号 DPEO166), 溴化 3-(4,5-二甲基噻唑)-2,5-二苯基四氮唑蓝(MTT, Amresco 公司, 批号 1324B37), 四氯化碳(宜兴市第二化学试剂厂, 批号 20010608), 复方五仁醇胶囊(南通大学附属南通第三医院, 批号 050505), 五味子乙素对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 批号 1173-040110)。

SD 大鼠, SPF 级, 体质量(230 ± 19.8) g, 雌雄各半, 南通大学实验动物中心提供, 许可证号 SYKX(苏)2002-0022。

2 方法与结果

2.1 正交试验制备含药血清、血浆: 以动物是否造模(A)、给药间隔时间(B)、采血时间(C)、取血成分(D)为考察因素, 每个因素设 2 个水平, 选用 L₈(2⁷) 正交表安排试验, 见表 1、2。取 SD 大鼠 36 只, 随机

分成 9 组, 其中正交试验 8 组, 空白对照 1 组, 每组 4 只, 雌雄各半, 其中肝损伤模型大鼠给药前 24 h ip CCl₄ 1.0 mL/kg。按文献方法^[5]制备复方五仁醇胶囊甲醇提取物的 0.5%CMC-Na 混悬液, 各试验组每天分两次按照 4.5 mL/kg(相当于成人临床等效剂量的 10 倍)剂量 ig 给药, 末次给药后用 3%戊巴比妥钠 1.5 mL/kg ip 麻醉, 颈总动脉取血, 含药血浆组血液立即以 3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆, 含药血清组血液置冰箱 4 °C 冷藏过夜, 分离的血清即为含药血清。空白对照组每天 0.5% CMC-Na 4.5 mL/kg 灌胃, 同法制备空白血清。同组血清、血浆分别合并混匀, -70 °C 冷冻保存。

2.2 肝细胞的分离、纯化与培养: 按文献报道^[6]方法分离、纯化大鼠肝细胞, 悬浮于含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基中, 并用台盼蓝染色法检测细胞活力达 90%, 以 1 × 10⁵/cm² 接种于 96 孔和 48 孔培养板中, 置 CO₂ 培养箱, 5% CO₂, 37 °C 培养 24 h。

2.3 药效学试验: 取培养 24 h 的肝细胞, 吸弃上清液, 随机分成 10 组(正常对照组, 模型对照组, 正交 1~8 组), 每组设 6 个复孔。除正常对照组加入空

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels				
水平	因素			
	A	B	C	D
1	正常大鼠	每天上、下午各 1 次	末次给药后 2 h	血清
2	肝损伤模型大鼠	前两天同水平 1, 第 3 天 2 次间隔 1 h	末次给药后 1 h	血浆

表 2 L₈(2⁷) 正交设计及试验结果

Table 2 Design and results of L ₈ (2 ⁷) orthogonal test											
试验号	A	B	A × B	C	A × C	B × C	D	MTT	AL T/ (U · L ⁻¹)	C/ (μg · mL ⁻¹)	Y
1	1	1	1	1	1	1	1	0.736	5.00	10.405 8	86.47
2	1	1	1	2	2	2	2	0.595	6.78	7.923 8	66.62
3	1	2	2	1	1	2	2	0.581	7.00	7.789 7	64.98
4	1	2	2	2	2	1	1	0.451	7.00	7.822 9	59.44
5	2	1	2	1	2	1	2	0.812	4.33	12.789 9	100.00
6	2	1	2	2	1	2	1	0.517	12.00	7.214 5	51.84
7	2	2	1	1	2	2	1	0.514	6.86	6.781 3	60.15
8	2	2	1	2	1	1	2	0.496	8.17	7.216 9	56.88
I	277.51	304.93	270.12	311.60	260.17	302.79	257.90				
II	268.87	241.45	276.26	234.78	286.21	243.59	288.48				
R	8.64	63.48	6.14	76.82	26.04	59.20	30.58				

白 DMEM 培养基外,其余各组加入含 CCl_4 10 mmol/L DMEM 培养基;同时各正交组加入含药血清或血浆,正常对照组和模型对照组加入空白血清,终浓度均为 10%。作用 24 h 后,收集 48 孔板中上清液自动生化分析仪检测 ALT;96 孔板中每孔加入 5 mg/mL MTT 液 20 μL ,继续孵育 4 h,再加入二甲基亚砜 200 μL ,振荡,使结晶物充分溶解,用酶标仪于检测波长 570 nm、参比波长 655 nm 测定各孔吸光度(A)。

2.3 含药血清、血浆中五味子乙素的测定:按文献方法^[7]制备对照品、供试品溶液,注入液相色谱仪,测定五味子乙素峰面积,外标法计算。

2.4 统计学分析:使用 Wstata7.0 统计软件包进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析处理数据,以 $P < 0.05$ 为显著性判断界值。

2.5 结果与分析:药效学试验表明,正常对照组、模型对照组 MTT 分别为 (1.358 ± 0.014) 、 (0.378 ± 0.073) ,ALT 分别为 (3.83 ± 0.41) 、 (22.00 ± 1.67) U/L。模型对照组 MTT 较正常对照组明显下降 ($P < 0.01$)、ALT 显著升高 ($P < 0.01$),说明造模成功;正交试验 1、2、3、5 组 MTT 值较模型对照组明显升高 ($P < 0.01$),所有正交组 ALT 均明显下降 ($P < 0.01$),说明一定条件下制备的含药血清或血浆对肝细胞损伤具有保护作用。

正交试验结果见表 2,将各试验组 3 个指标的测定结果分别转换成分数,综合加权评分后进行统计分析。具体权重为:MTT 占 35%,ALT 占 35%,五味子乙素的质量浓度(C)占 30%。MTT、五味子乙素以最大值为 100 分,ALT 先作倒数处理,也以最大值为 100 分。综合因素得分计算公式为: $Y_i = \text{MTT}_i / \text{MTT}_{\max} \times 35\% + (1 / \text{ALT})_i / (1 / \text{ALT})_{\max} \times 35\% + C_i / C_{\max} \times 30\%$ (i 为试验号)。

从表 2 中极差直观分析,设计的 4 个因素对结果影响的大小次序依次为:采血时间、给药间隔时间、取血成分、动物是否造模。从方差分析结果(表 3)看,采血时间对结果有极显著影响 ($P < 0.01$),给药间隔时间有显著影响 ($P < 0.05$),且两者之间存在交互作用(B $\times$ C 的 $P < 0.05$),血浆的影响优于血清,但无统计学意义 ($P > 0.05$),而动物是否造模几乎没有影响。因此,较优的含药血清制备方法组合为 $A_1B_1C_1D_2$,即给正常大鼠连续 ig 给药 3 d,上午、

下午各 1 次,末次给药后 2 h 采血分离血浆。

对 B、C 因素的交互作用作进一步分析,见表 4,其最佳组合为 B_1C_1 ,与以上确定的方法一致。

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
B	503.71	1	503.71	71.74	$P < 0.05$
C	737.66	1	737.66	105.05	$P < 0.01$
D	116.89	1	116.89	16.65	
A $\times$ C	84.76	1	84.76	12.07	
B $\times$ C	438.08	1	438.08	62.39	$P < 0.05$
误差(A + A $\times$ B)	14.04	2	7.02		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

表 4 B、C 因素交互作用分析结果

Table 4 Reciprocal action analysis of factors B and C

项目	C1	C2
B1	93.24	59.23
B2	62.57	58.16

2.6 验证试验:对于最佳组合的实验验证,测定了按该组合条件制备的血浆中五味子乙素的量,平均值为 $12.590 \pm 8 \mu\text{g/mL}$,与正交试验最大值的 $12.789 \pm 9 \mu\text{g/mL}$ 接近。

3 讨论

目前含药血清制备方法研究一般采用药效指标考察,较少考虑不同制备条件对药物成分变化的影响,且逐一进行单因素考察,不能反映各因素的相互影响。本实验采用药理和化学指标相结合加权评分的正交设计进行试验,并发现存在交互作用,在思路和方法方面具有一定的创新性。

五味子乙素为五味子主要有效成分之一,具有降转氨酶效果^[8],故将其作为化学考察指标。

近年来有人提出血浆药理学比血清药理学更为合理^[9],因此本实验中将“取血成分”纳入考察因素,结果虽然显示血浆与血清对结果的影响没有统计学差异,但从极差直观分析,血浆确优于血清。

理论上讲,宜采用病理状态下的动物制备含药血清^[10],但本研究结果显示,动物是否造模几乎对结果没有影响,与文献报道^[11]结果一致。

关于给药方案,最好视药物的 $t_{1/2}$ 等药动学指标而定,每隔 1 个半衰期给药 1 次,连续给 4~6 次,即可达到最大血药浓度,连续 5~7 个半衰期可达到稳态血药浓度^[2]。但由于中药成分复杂,半衰期很难

测定,李仪奎^[12]在对412种药物的药动学指标分析的基础上提出了“通法”方案:每日给药2次,连续给药3d。本实验给药方案水平1采用了“通法”,水平2在此基础上调整为最后一天间隔1h给药,旨在稳定平均稳态血药浓度,结果表明“通法”比较科学。

理想的采血时间应落在血药浓度的高峰期,这样能够避免由于有效物质尚未吸收或代谢殆尽而造成的假阴性结果。由于中药复方给药后,不同药物达峰时间不同,故对于采血时间很难有一个统一标准。蒙一纯等^[13]认为,根据实验动物消化生理特点和中药吸收转化特点确定取血时间范围是合理的,如大鼠一般1~2h可达血药浓度峰值,此时血清即为含药血清;时间延长将有部分药物组分发生转化,成为药物代谢血清。所以采血时间分别设定为大鼠末次给药后1、2h。

预试验中分别比较了相当于成人临床等效剂量5、10、20倍的给药剂量和体系中添加5%、10%、20%、40%的含药血清对MTT、ALT的影响,结果表明临床等效剂量10的给药剂量和体系中添加10%的含药血清为最佳方案,故在本实验中直接采用。

参考文献:

- [1] 潘卫松,刘美凤,石钱,等.血清药理学、血清化学和中药药代动力学[J].世界科学技术:中药现代化,2002,4(3):51-55.
- [2] 米永杰,李健.中药血清药理学研究概述[J].四川解剖学杂志,2006,14(4):34-35.
- [3] 张军平,张伯礼,山本清高.中药药物血清的制作方法探讨[J].天津中医药,2004,21(4):274-276.
- [4] 窦志华,施忠,李伟红,等.复方五仁醇胶囊的研制[J].时珍国医国药,2005,16(10):953,957.
- [5] 窦志华,丁安伟,王陆军,等.复方五仁醇胶囊血清药化学研究[J].中草药,2006,37(8):1137-1140.
- [6] 徐淑云.药理实验方法学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2002:581-583.
- [7] 罗琳,窦志华,丁安伟,等.大鼠灌胃复方五仁醇胶囊后血清和血浆中五味子醇甲和五味子乙素的比较[J].中草药,2006,37(10):1486-1489.
- [8] 王胜春,胡咏武,王俊琴,等.五灵胶囊药效作用的有效成分[J].第四军医大学学报,2004,25(17):1587-1591.
- [9] 贺石林,葛金文,贺蓉,等.质疑血清药理学,加强多层次半体内实验研究[J].中国药理学通报,2005,21(3):277-279.
- [10] 张声鹏,施旭光,桂蜀华.关于中药血清药理学中血清供体动物是否造模的思考[J].中国中西医结合杂志,2001,21(5):388-389.
- [11] 阴赓宏,李兰芳,金亚宏,等.当归补血汤肝损伤小鼠含药血清抑制肝组织LPO生成的作用[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(5):32-34.
- [12] 李仪奎.中药血清药理学实验方法的若干问题[J].中药新药与临床药理,1999,10(2):95-98.
- [13] 蒙一纯,丁霞,黄长恩,等.中药血清药理学应用研究展望[J].北京中医药大学学报,1999,22(4):42-43.

鸡肝散中总黄酮的提取工艺研究

徐娟华^{1*},卢启洪²,曾苏¹,高峻³,缪千状⁴

(1.浙江大学药学院,浙江 杭州 310031; 2.绍兴县卫生进修学校,浙江 绍兴 312000; 3.浙江天堂硅谷创业集团有限公司,浙江 杭州 310012; 4.奉化县第一人民医院,浙江 奉化 315500)

鸡肝散为唇形科香薷属四方蒿 *Elsholtzia blanda* (Benth.) Benth. 的干燥成熟花序,主产于云南、贵州、广西等地,多年生灌木状草本植物,性凉,味苦、微辛,入肝、肺二经,具清肝明目、清热解表、消炎止痛等功效。其叶、花或全草民间均可药用,成熟花序最常用,治疗感冒、痢疾、肝炎、夜盲等症^[1~3]。鸡肝散主含挥发油、黄酮类成分等^[2~4]。鸡肝散总黄酮对大鼠急性心肌缺血、实验性心律失常和冠脉结扎诱发胸痹证等都具有作用^[5~7]。初步试验发现不同的提取方法和条件对药材中总黄酮提取率影响较大,因此,本实验采用多因素正交设

计,以总黄酮提取率为考察指标,对鸡肝散水提醇沉工艺进行优化,为生产厂家合理开发利用和提高生产效益提供参考依据。

1 仪器和药品、试剂

UV-160A 紫外-可见分光光度仪(日本岛津),RE52CS 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),FA1004 电子天平(上海天平仪器厂),LXI-II 离心沉淀机(上海医用分析仪器厂)。

四方蒿 *E. blanda* (Benth.) Benth. 经中国科学院昆明植物研究所李恒教授鉴定,腊叶标本由云南昆明金殿制药有限公司提供,药材经打粉、过24目

* 收稿日期:2008-06-20
基金项目:浙江大学与云南省企业合作基金资助项目(01-420001-1)