

4 讨论

炎症反应参与慢性疾病如糖尿病、动脉粥样硬化等的发生、发展。巨噬细胞作为炎症反应中重要的组成部分,可分泌大量促炎因子,诱导和加强炎症反应。促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 作为炎症的重要指标,基因的转录、调控主要是通过 MAPK 信号通路来实现的^[6]。MAPK 属于一种 Ser/Thr 蛋白激酶,可分为四个亚族,其中 JNK/SAPK、p38 与 ERK1/2 三个亚族参与炎症反应的调控。LPS 刺激细胞能够激活 ERK1/2、JNK/SAPK 和 p38 通过作用于各自的底物,影响多种转录因子的活性,从而调节 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等多种细胞因子的基因表达^[7]。因此,有效抑制 MAPK 通路、降低炎症因子的分泌是抗炎药物研究的重点。

半枝莲作为临床常用抗肿瘤中药,黄酮是其主要的药效成分。现代药理学研究表明,半枝莲总黄酮具有抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等药理作用^[8-10]。半枝莲总黄酮的药理作用是否与炎症反应有关,且药物的抗炎作用是否与 MAPK 信号通路有关,均尚不明确。因此,通过体外诱导构建巨噬细胞炎症模型,评价半枝莲总黄酮对 MAPK 信号通路的影响。结果表明,半枝莲总黄酮可有效抑制 MAPK 中 JNK/SAPK 的磷酸化水平,降低 IL-1 β 、IL-6 的分泌来发挥其抗炎作用,这提示半枝莲总黄酮的抗炎作用主要是通过调控 MAPK 信号通路来实现的。

参考文献:

- [1] Bian K, Ghassemi F, Sotolongo A, et al. NOS-2 signaling and cancer therapy [J]. IUBMB Life, 2012, 64(8): 676.
- [2] Plóciennikowska A, Hromada - Judycka A, Borzecka K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(3): 557.
- [3] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update [J]. Physiol Rev, 2012, 92(2): 689.
- [4] 郑晓, 郭善禹, 康文, 等. 半枝莲总黄酮提取物对乳腺癌细胞及甲状旁腺相关蛋白的抑制 [J]. 外科理论与实践, 2015, 20(3): 246.
- [5] 祝娉婷, 卜平, 孙云, 等. 半枝莲总黄酮对 ApoE 基因敲除小鼠血脂及抗氧化功能的影响 [J]. 苏州大学学报(医学版), 2011, 31(2): 225.
- [6] Kima KN, Heob SJ, Yoon WJ, et al. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1-3): 369.
- [7] Yoon WJ, Moon JY, Kang JY, et al. Neolitsea sericea essential oil attenuates LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages by suppressing NF- κ B and MAPK activation [J]. Nat Prod Commun, 2010, 5(8): 1311.
- [8] 马霄, 邵南齐, 陈晓敏, 等. 半枝莲总黄酮对反复脑缺血再灌注小鼠脑能量代谢的影响 [J]. 吉林中医药, 2015, 35(4): 339.
- [9] 徐敏, 卜平, 李瑶瑶. 半枝莲黄酮类化合物对体外肿瘤血管生成的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(20): 2215.
- [10] 祝娉婷, 孙云, 刘兆国, 等. 半枝莲总黄酮对 ApoE 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化及磷脂转运蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(6): 833.

不同提取方法对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素的影响及镇痛作用的比较研究

于定荣, 麻印莲, 顾雪竹, 李丽, 刘颖, 张村, 杜茂波, 陈畅, 王海林
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要:目的 比较不同提取方法对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素及镇痛作用的影响。方法 将白芷药材分别用不同方法提取;以欧前胡素、异欧前胡素的含量以及镇痛作用效果为综合指标,综合比较研究。结果 对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素及镇痛作用产生影响的顺序依次为:乙酸乙酯提取>70%乙醇回流提取>95%乙醇回流提取>80%乙醇渗漉法提取>80%乙醇超声提取。结论 5种提取工艺对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素及镇痛作用产生的影响是不同的,其中以乙酸乙酯提取对欧前胡素、异欧前胡素及镇痛作用的影响最大。

关键词:白芷; 欧前胡素、异欧前胡素、提取工艺; 含量测定; 镇痛作用

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2016.10.033

中图分类号: R284.1; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1008-0805(2016)10-2405-03

白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. 或杭白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss) Shan et Yuan 的干燥根。性温,味辛,具有散风除湿、通窍止痛、消肿排脓功能,主治头痛、眉棱骨痛、齿痛、鼻渊、寒湿腹痛等^[1]。白芷中主要含香豆素类和挥发油,目前研究认为香豆素类是其治疗疼痛的主要活性成

分^[2];《中国药典》(2015年版第一部)将欧前胡素作为白芷药材质量控制的指标成分^[3]。

白芷提取方法有乙醇回流提取^[4-5]、乙酸乙酯加热回流提取^[6]、渗漉提取^[7]和超声提取^[8],但主要以欧前胡素为指标来评判提取工艺的优劣,具有一定局限性。本试验以欧前胡素和异欧前胡素得率以及镇痛作用效果为指标,综合考察、比较不同提取方法对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素及镇痛作用的影响。这种采用多指标综合评判提取工艺比采用单一成分评价提取工艺更具有客观性和科学性,这是目前白芷提取工艺研究中未见报道的。本实验为确定白芷的提取工艺提供了一定的实验依

收稿日期: 2016-02-22; 修订日期: 2016-07-11

作者简介: 于定荣(1975-),男(苗族),湖南绥宁人,中国中医科学院中药研究所助理研究员,博士学位,主要从事中药制剂与炮制研究工作。

据,具有一定的研究意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪(LC-20AT 泵,SPD-M20A 检测器,Empower 2 数据处理软件);分析天平(美国双杰 JJ300);高速万能粉碎机(天津泰斯特 fw100,南京以马内利仪器设备有限公司);数显恒温水浴锅(HH-6,常州国华电器有限公司)。

1.2 白芷药材 采集于安徽省亳州市谯城区谯东镇余集,经中国科学院研究所炮制中心肖永庆研究员鉴定为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. 的干燥根。

1.3 试剂试药 欧前胡素对照品(批号:110826-201214);异欧前胡素对照品(批号:110827-201109)(均购于中国食品药品检定研究院,供含量测定);贝诺酯片(四川金山禅心制药有限公司,每片 0.5g,批号:131001);水为重蒸馏水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.4 动物 ICR 小鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(合格证号:SCXK(京)2012-0001)。

2 方法与结果

2.1 水分测定 按《中国药典》附录 IX H 项下“烘干法”对白芷药材进行水分测定,为 9.8432%。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 5.4mg 欧前胡素和 6.0mg 异欧前胡素对照品于 50ml 量瓶中,加入甲醇定容,分别制备得欧前胡素对照品溶液和异欧前胡素对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

2.3.1 70% 乙醇回流提取供试品溶液制备^[4] 将白芷粉碎成粗粉(过 40 目筛),用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h。合并滤液,蒸干,残渣用醋酸乙酯溶解并定容至 10ml,用 0.45μm 滤膜微滤,取续滤液,得供试品溶液 I。

2.3.2 95% 乙醇回流提取供试品溶液制备^[5] 取白芷 25g,粉碎成 40 目粗粉,加入 8 倍量 95% 的乙醇回流提取 3 次,每次提取 4h。合并滤过液,蒸干,残渣用甲醇溶解,定容至 25ml,取 5 ml,用甲醇稀释至 50ml,0.45μm 滤膜微滤,取续滤液,得供试品溶液 II。

2.3.3 乙酸乙酯加热回流提取供试品溶液制备^[6] 精密称定白芷粉末 5.0g(过 40 目筛),置 250ml 圆底烧瓶中,用 45 倍量的乙酸乙酯加热回流 2 次,每次 0.5 h,放冷至室温,提取液过滤,润洗残渣,滤液挥干,回收溶剂,残渣定量转移至 25ml 量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀。经 0.45μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,得供试品溶液 III。

2.3.4 80% 乙醇渗漉法提取供试品溶液制备^[7] 将白芷粉碎成粗粉(过 40 目筛),称取 100g,先用 100ml 乙醇湿润后,装筒,续加 8 倍量 80% 乙醇,静置 24 h,渗漉。以 3 ml·min⁻¹ 滴速收集滤液,将渗漉液置 55℃ 以下回收乙醇至 20% 体积(药材:药液比为 5:1),滤液称重并密闭保存。取本品 1.50g,置蒸发皿中,60℃ 水浴挥发至无醇味。残渣用甲醇转移至 50 ml 量瓶并定容,用 0.45μm 滤膜微滤,取续滤液,得供试品溶液 IV。

2.3.5 80% 乙醇超声提取供试品溶液制备^[8] 取过 40 目筛白芷药粉 20g,加入 12 倍量 80% 的乙醇,在 45w、59 kHz 的条件下超声 45min 进行提取。过滤后滤液定容至 250 ml 量瓶,得样品溶液。精密吸取样品溶液 5ml,50℃ 水浴挥至无醇味。残渣用甲醇转移至 50 ml 量瓶,定容,用 0.45μm 滤膜微滤,取续滤液,得供试品溶液 V。

2.4 欧前胡素、异欧前胡素的含量测定^[5]

2.4.1 色谱条件 Kromasil 100-5C₁₈(4.6mm×250mm,5μm) 色谱柱;流动相:甲醇-水(65:35);检测波长:251nm;流速:0.8 ml

·min⁻¹;柱温:35℃;进样量 20μl,理论塔板数不低于 3000。

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取 4,6,8,10,14μl 欧前胡素、异欧前胡素对照品溶液进样,测定峰面积积分值。分别以欧前胡素和异欧前胡素的峰面积为纵坐标,以进样量(μg)为横坐标,得欧前胡素回归方程为:Y=2602.8X-32(r=0.9999),线性范围为 0.432~1.512μg;异欧前胡素回归方程为:Y=21042X-1438(r=0.9999),线性范围为 0.480~1.680μg。

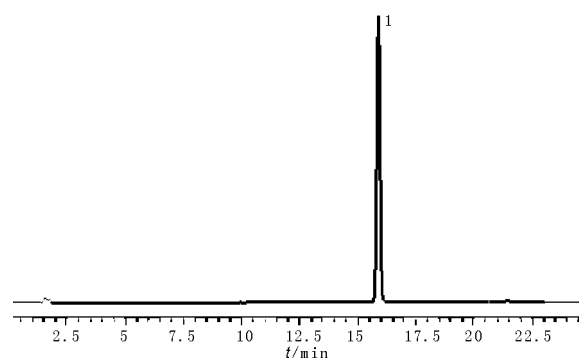
2.4.3 精密度试验 取“2.3.5”项下供试品溶液 V,按 2.4 项下色谱条件连续进样 5 次,测定欧前胡素、异欧前胡素的峰面积积分值,计算得 RSD 分别为 1.91% 和 1.83%,表明精密度良好。

2.4.4 稳定性考察 以“2.3.5”项下供试品溶液 V,按 0.2,4,8,12,24 h 不同时间间隔进样,测定欧前胡素、异欧前胡素的峰面积积分值,结果在 24 h 内稳定,RSD 分别为 0.61% 和 0.73%(n=6)。

2.4.5 重复性试验 以“2.3.5”项下方法另制备供试品溶液,共 6 份,分别进样,测定欧前胡素、异欧前胡素的峰面积积分值,计算 RSD 分别为 1.38% 和 1.18%。

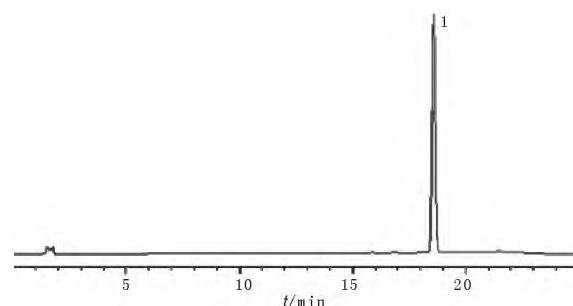
2.4.6 加样回收率试验 精密称取欧前胡素、异欧前胡素对照品适量,加在已知欧前胡素和异欧前胡素含量的样品中,按“2.3.5”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样,分别测定欧前胡素和异欧前胡素含量,计算回收率,结果平均回收率分别为 98.62% 和 98.83%。

2.4.7 欧前胡素和异欧前胡素含量测定 分别精密吸取 2.3 项下供试品溶液 I~V 各 20μl,按“2.4.1”项下色谱条件进样,测定峰面积积分值。以干燥品分别计算欧前胡素和异欧前胡素含量,结果表明,欧前胡素和异欧前胡素与其它组分均能较好地分离,色谱图见图 1~3;结果见表 1。



1. 欧前胡素

图 1 欧前胡素对照品色谱



1. 异欧前胡素

图 2 异欧前胡素色谱

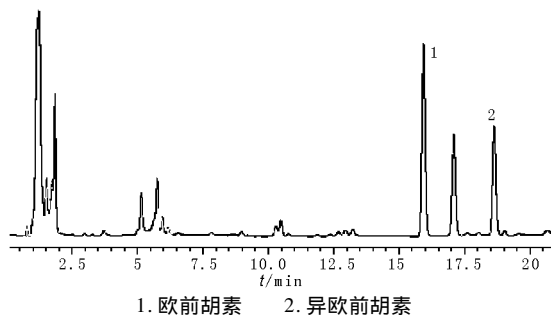


图3 样品中欧前胡素和异欧前胡素色谱图

表1 欧前胡素、异欧前胡素含量测定结果($\bar{x} \pm s$) %

试验号	欧前胡素		异欧前胡素	
	含量	RSD	含量	RSD
70% 乙醇回流提取	0.4454 ± 0.0066	1.48	0.1001 ± 0.0017	1.67
80% 乙醇渗漉法提取	0.3166 ± 0.0029	0.91	0.2060 ± 0.0011	0.53
95% 乙醇回流提取	0.4422 ± 0.0074	1.67	0.1351 ± 0.0015	1.09
80% 乙醇超声提取	0.1517 ± 0.0023	1.54	0.0782 ± 0.0017	2.16
乙酸乙酯提取	0.6032 ± 0.00563	0.93	0.4438 ± 0.0055	1.24

n = 3

2.5 药理供试液制备 取白芷药材样品粉末 100g, 按“2.3.1”~“2.3.5”项下方法分别制备 70% 乙醇回流提取液、80% 乙醇渗漉法提取液、95% 乙醇回流提取液、80% 乙醇超声提取液、乙酸乙酯提取液。将 5 种样品提取液, 减压回收, 制得浓度为 $1\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药理供试液, 备用。

2.6 醋酸扭体法实验^[10] 取 ICR 健康小鼠 70 只, 雌雄各半, 随机均分为蒸馏水组、70% 乙醇回流提取组、80% 乙醇渗漉法提取组、95% 乙醇回流提取组、80% 乙醇超声提取组、乙酸乙酯提取组 ($20\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及扑炎痛组 ($20\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 共 7 组。各组小鼠正常饲养, 于每日早上 8:30 各灌胃给药 1 次, 连续 3d。于末次给药 1h 后, 每只小鼠 ip0.7% 冰醋酸溶液 0.2mL, 立即观察并记录注射冰醋酸 15 min 内各组小鼠出现扭体反应的次数 (腹部收缩内凹、躯干与后腿伸张、臀部高起)。进行组间 t 检验并按下式计算给药组的镇痛抑制率。结果见表 2。

$$\text{镇痛抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组扭体次数} - \text{给药组扭体次数}}{\text{对照组扭体次数}} \times 100\%$$

表2 5种提取液对小鼠醋酸扭体法的试验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	扭体数/次	镇痛抑制率/%
蒸馏水	—	27.8 ± 12.2	—
贝诺酯	20.0	1.9 ± 1.8*	93.2
70% 乙醇回流提取	20.0	15.3 ± 9.6 [△]	45.0
80% 乙醇渗漉法提取	20.0	16.8 ± 8.3 [△]	39.6
95% 乙醇回流提取	20.0	16.1 ± 5.3 [△]	40.8
80% 乙醇超声提取	20.0	21.6 ± 10.2 [△]	22.3
乙酸乙酯提取	20.0	11.8 ± 12.0 [△]	57.6

与蒸馏水组比较, * $P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$; n = 10

2.7 结果分析 由表 1 测定结果可知, 白芷中欧前胡素得率依次为: 乙酸乙酯提取 > 70% 乙醇回流提取 > 95% 乙醇回流提取 > 80% 乙醇渗漉法提取 > 80% 超声提取; 异欧前胡素得率依次为: 乙酸乙酯提取 > 80% 乙醇渗漉法提取 > 95% 乙醇回流提取 >

70% 乙醇回流提取 > 超声提取。

由表 2 镇痛测定结果可知, 镇痛抑制率依次为: 乙酸乙酯提取 > 70% 乙醇回流提取 > 95% 乙醇回流提取 > 80% 乙醇渗漉法提取 > 80% 乙醇超声提取。

综合表 1~2 结果表明, 白芷分别以 5 种方法提取, 以乙酸乙酯提取对白芷中欧前胡素、异欧前胡素含量以及镇痛作用效果影响最大。

3 讨论

白芷中主要含有香豆素类和挥发油两类有效成分, 采用水蒸汽蒸馏法提取白芷, 得率低, 费时, 且浪费能源, 同时易破坏其他有效成分。表 1 测定结果表明, 5 种提取方法对小鼠均有明显的镇痛作用; 其中以 45 倍量的乙酸乙酯加热回流提取 2 次, 每次 0.5h 所得欧前胡素、异欧前胡素含量最高, 镇痛作用效果最明显。由于香豆素类化合物的酯键在高温长时间加热时易断裂分解, 提取时的温度最好不要超过 80°C ^[9]。试验结果亦表明, 以 8 倍量 95% 的乙醇回流提取 3 次, 每次提取 4h, 所得欧前胡素含量、异欧前胡素含量及镇痛效果均低于乙酸乙酯加热回流提取, 也进一步证明了提取时间过长对于白芷中香豆素类化合物的提取效率反而会起到降低的作用。

《中国药典》(2015 年版第一部) 已将欧前胡素作为白芷药材质量的控制指标成分, 但这种以单一成分进行药材质量控制尚存在一定的不足。本试验以白芷中欧前胡素和异欧前胡素含量及镇痛效果作为指标, 比较了不同提取方法对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素及镇痛作用的影响。本试验亦为白芷以及含白芷的制剂生产工艺提供了一定的实验依据, 具有一定的研究意义。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 675.
- [2] 王德才, 李珂, 徐晓燕, 等. 杭白芷香豆素组分解热镇痛抗炎作用的实验研究 [J]. 中国中医药信息杂志 2005 28(11): 36.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典, 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 106.
- [4] 王希, 陈秀芳. 正交试验法优选白芷的提取工艺 [J]. 中药材, 2001 24(8): 591.
- [5] 贾英, 孙振蛟, 包文芳. 正交设计法优选白芷的提取工艺 [J]. 沈阳药科大学学报 2005 22(3): 217.
- [6] 王婷婷, 李丹毅, 李清, 等. 正交试验法优选白芷的提取工艺 [J]. 沈阳药科大学学报 2007 24(5): 310.
- [7] 陈贤春, 王玉蓉, 路世鹏. 白芷提取工艺的研究 [J]. 中成药, 2005 27(2): 145.
- [8] 董芙蓉, 刘强, 陈志良. 正交设计法优化白芷的超声提取工艺 [J]. 齐鲁药事 2011 30(5): 249.
- [9] 梁明金, 杨广德, 贺浪冲. 白芷中欧前胡素的提取方法研究 [J]. 中成药 2000 22(12): 829.
- [10] 马逾英, 高颖, 邹文莉, 等. 熏硫川白芷药材对小鼠镇痛作用的影响 [J]. 华西药学杂志 2006 21(6): 616.