

金樱子配方颗粒提取工艺优化及质量标准、指纹图谱研究[△]

尚莹莹^{1*}, 胡 辉^{1,2#}, 刘源才^{1,2,3} (1. 劲牌生物医药有限公司, 湖北黄石 435100; 2. 中药保健食品质量与安全湖北省重点实验室, 湖北大冶 435100; 3. 劲牌研究院, 湖北黄石 435100)

中图分类号 R944;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1922-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.12

摘要 目的:优化金樱子配方颗粒的提取工艺,并初步建立该配方颗粒的质量标准及指纹图谱。方法:以金樱子药材出膏率和金樱子多糖提取率为指标,以提取次数、加水量和提取时间为因素,采用正交试验设计优化金樱子配方颗粒的提取工艺并进行验证试验。采用薄层色谱法(TLC)对金樱子配方颗粒进行定性鉴别;采用紫外分光光度法(UV)对金樱子配方颗粒中的金樱子多糖(以D-无水葡萄糖计)进行含量测定。采用高效液相色谱法(HPLC)建立金樱子配方颗粒的指纹图谱;以8号峰为参照,绘制10批金樱子配方颗粒样品的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行相似度评价,确定共有峰。结果:优选提取工艺为8倍量水,回流提取2次,每次2h;金樱子药材平均出膏率为51.07%(RSD=0.58%,n=3)、金樱子多糖平均提取率为22.17%(RSD=0.58%,n=3)。金樱子配方颗粒样品TLC图斑点清晰,分离度好。UV法测定D-无水葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.010 8~0.054 2 mg/mL($r=0.999 1$);金樱子多糖定量限为0.070 3 mg,检测限为0.014 0 mg;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率为97.3%~100.8%(RSD=1.33%,n=9)。10批金樱子配方颗粒样品的HPLC图谱有8个共有峰,相似度均大于0.937;经验证,该10批金樱子配方颗粒样品的HPLC图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。结论:金樱子配方颗粒的优化提取工艺稳定、可行;所建的指纹图谱可为金樱子配方颗粒的质量评价提供依据。

关键词 金樱子;配方颗粒;提取工艺;正交试验;薄层色谱法;紫外分光光度法;高效液相色谱法;含量测定;指纹图谱

Optimization of the Extraction Technology of *Rosa laevigata* Formula Granules and Study on Its Quality Standard and Fingerprint

SHANG Yingying¹, HU Hui^{1,2}, LIU Yuancai^{1,2,3} (1. Jing Brand Bio-medicine Co., Ltd., Hubei Huangshi 435100, China; 2. Hubei Provincial Key Lab for Quality and Safety of TCM Health Food, Hubei Daye 435100, China; 3. Research Institute of Jing Brand, Hubei Huangshi 435100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology and establish the quality standard and fingerprint of *Rosa laevigata* formula granules primarily. METHODS: Using the yield of extract and extract rate of *R. laevigata* polysaccharide as index, the extraction technology of *R. laevigata* formula granules was optimized by orthogonal test with water amount, extraction times and extracting time as factors. Validation test was also conducted. TLC was used to identity *R. laevigata* formula granule qualitatively. The content of *R. laevigata* polysaccharide (by D-glucosum anhydricum) in *R. laevigata* formula granules was determined quantitatively by UV spectrophotometry. HPLC method was adopted to establish the fingerprint of *R. laevigata* formula granules. Using No. 8 peak as reference, HPLC chromatograms of 10 batches of *R. laevigata* formula granules were drawn. The similarity of samples was evaluated by using *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012 edition) to determine common peak. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 8-fold water, extracting for 2 times, 2 h each time. The average yield was 51.07% (RSD=0.58%, n=3) and the average extraction rate of polysaccharide in *R. laevigata* was 22.17% (RSD=0.58%, n=3). TLC spots of *R. laevigata* formula granules were clear and well-separated. In UV test, the linear range of D-glucosum anhydricum were 0.010 8-0.054 2 mg/mL ($r=0.999 1$), respectively; for *R. laevigata* polysaccharide, the limit of quantitation was 0.070 3 mg, and the limit of detection was 0.014 0 mg; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; average recoveries were 97.3%-100.8% (RSD=1.33%, n=9). There were 8 common peaks in HPLC fingerprints of 10 batches of samples, and the similarity was higher than 0.937. After validation, HPLC chromatograms of 10 batches of sample had good consistency with reference fingerprints. CONCLUSIONS: The optimized extraction technology of *R. laevigata* formula granules is stable. Established fingerprint can provide reference for quality evaluation of *R. laevigata* formula granules.

KEYWORDS *Rosa laevigata*; Formula granules; Extraction technology; Orthogonal test; TLC; UV spectrophotometry; HPLC; Content determination; Fingerprint

△ 基金项目:湖北省技术创新专项重大项目(No.2016ACA142)

* 助理工程师,硕士。研究方向:中药资源与制剂。电话:0714-3188791。E-mail:1124039973@qq.com

通信作者:医药工程师。研究方向:中药资源与制剂。电话:0714-3188791。E-mail:95252631@qq.com

金樱子为蔷薇科植物金樱子(*Rosa laevigata* Michx.)的干燥成熟果实。2015年版《中国药典》(一部)将金樱子收载为常用中药,其具有固精缩尿、固崩止带、涩肠止泻等功效^[1],临床常用于治疗上呼吸道感染、烧伤、

直肠脱垂及各种妇科疾病^[2]。金樱子富含多糖、黄酮及鞣质等多种化学成分^[3-6]。中药配方颗粒是对传统中药材应用形式的重大突破,其以生产自动化、生产条件恒定等特点,既符合中医辨证论治原则,又具有免煎易服、质量稳定等优点^[7-9]。本研究优化了金樱子配方颗粒的提取工艺,并采用薄层色谱法(TLC)对金樱子配方颗粒进行定性鉴别,采用紫外分光光度法(UV)对金樱子饮片、提取物、配方颗粒中的金樱子多糖(以D-无水葡萄糖计)进行含量测定,同时,采用高效液相色谱法(HPLC)建立了金樱子配方颗粒的指纹图谱,旨在为该配方颗粒的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

U3000型HPLC仪,包括LPG-3400SDN四元梯度泵、WPS-3000SL自动进样器、TCC-3000RS柱温箱、VWD-3100及DAD-3000检测器(德国Thermo Fisher公司);T9型UV仪(北京普析通用仪器有限责任公司);SK8200LHC型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);XMTD-7000型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);AB135-S型电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];ELGA Option-Q型纯水机[威立雅水处理技术(上海)有限公司]。

1.2 药品与试剂

金樱子配方颗粒(劲牌生物医药有限公司,批号:P20161115、P20161116、P20161117、P20161118、P20161119、P20161121、P20161123、P20161124、P20161126、P20161127,规格:2.6g/袋,每1g金樱子配方颗粒相当于3.8g金樱子中药饮片);金樱子对照药材(中国食品药品检定研究院,批号:121047-201204);D-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110833-201506,纯度:99.9%);麦芽糊精(西王药业有限公司,批号:F160305004);硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂分厂);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

金樱子药材(湖北正光九资河药业有限公司,批号:160601),经中南民族大学药学院梅之南教授鉴定为蔷薇科植物金樱子(*Rosa laevigata* Michx.)的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 金樱子配方颗粒提取工艺优化

2.1.1 正交试验因素与水平 参考《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》^[10]中的规定,以提取次数(A)、加水量(B)和提取时间(C)为因素,以金樱子药材出膏率和金樱子多糖提取率为指标,每个因素取3个不同水平,采用L₉(3⁴)正交试验设计进行考察。因素与水平见表1。

2.1.2 正交试验结果与分析 称取金樱子药材20g,共9份,按“2.4”项下UV法测定金樱子多糖的含量,并计算金樱子药材出膏率和金樱子多糖提取率。金樱子药材

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A,次	B,倍	C,h
1	1	8	1
2	2	10	1.5
3	3	12	2

出膏率(%)=干膏粉质量(g)/提取用生药质量(g)×100%;金樱子多糖提取率(%)=干膏粉质量(g)×金樱子多糖含量(%) / 提取用生药质量(g)×100%,或金樱子多糖提取率(%)=金樱子药材出膏率(%)×金樱子多糖含量(%)。正交试验设计与结果见表2。采用方差分析方法对金樱子多糖提取率进行分析,结果见表3。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

序号	生药质量,g	因素			金樱子药材出膏率,%	金樱子多糖含量,%	金樱子多糖提取率,%
		A	B	C			
1	20.10	1	1	1	11.52	45.76	5.27
2	20.07	1	2	2	36.97	45.68	16.89
3	19.98	1	3	3	46.41	43.78	20.32
4	20.41	2	1	2	41.73	43.21	18.03
5	20.65	2	2	3	49.75	42.35	21.07
6	20.76	2	3	1	18.63	44.98	8.38
7	20.05	3	1	3	51.69	42.37	21.90
8	20.07	3	2	1	28.54	43.31	12.36
9	20.64	3	3	2	41.82	44.83	18.75
K ₁	14.160	15.067	8.670				
K ₂	15.827	16.773	11.890				
K ₃	17.670	15.817	21.097				
R	3.510	1.706	12.427				

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

因素	偏差平方和	自由度	F	F临界值	P	是否有显著性
A	18.496	2	3.437	19.000	0.450 7	否
B	4.390	2	0.816	19.000	0.898 2	否
C	249.713	2	46.398	19.000	0.042 2	是
误差	5.380	2				

2.1.3 优选的提取工艺 由方差分析结果可知,影响金樱子多糖提取率的各因素影响程度依次为C>A>B,其中因素C有显著影响,即提取时间是影响该工艺的最重要因素。从省时降耗及生产实际出发,在保证提取充分的前提下,综合分析各个因素的影响,拟定优选提取工艺为A₂B₁C₃,即8倍量水,回流提取2次,每次2h。

2.1.4 优选提取工艺的验证试验 称取金樱子药材200g,按优选提取工艺重复验证3次,测得金樱子药材平均出膏率为51.07%,RSD为0.58%(n=3);金樱子多糖平均提取率为22.17%,RSD为0.58%(n=3),表明该优选工艺可靠,结果见表4。

2.2 金樱子配方颗粒的制备

以优选的提取工艺,精密称取金樱子药材2kg,共10份,分别加入8倍量水,回流提取2次,每次2h;合并提取液,滤过,滤液蒸干得金樱子浸膏;加8%麦芽糊精,干法(挤压制粒法)制粒,干燥,得金樱子配方颗粒。

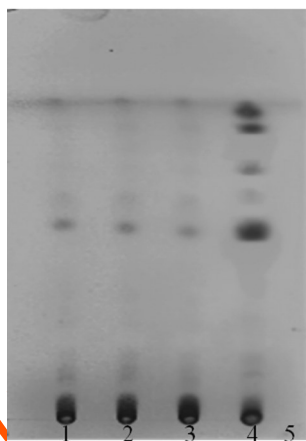
表4 工艺验证试验结果

Tab 4 Results of technology validation test

序号	药材质量, g	金樱子药材 出膏率, %	平均值, %	金樱子多糖 含量, %	平均值, %	金樱子多糖 提取率, %	平均值, %
1	200.02	50.81		43.41		22.06	
2	200.13	51.40	51.07	43.41	43.41	22.31	22.17
3	200.05	51.00		43.41		22.14	

2.3 金樱子配方颗粒的定性鉴别

精密称取金樱子配方颗粒样品(批号:P20161115)粉末2 g,加乙醇30 mL,超声(功率:500 W,频率:53 kHz,下同)处理30 min,滤过;滤液蒸干,残渣加水20 mL使溶解,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次30 mL;合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇2 mL使溶解,作为供试品溶液。另取金樱子对照药材2 g,同法制成对照药材溶液。以甲醇溶液作为阴性对照溶液。按照2015年版《中国药典》(四部)TLC法^[10-11]试验,吸取上述3种溶液各2 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(5:5:1:0.1, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105℃下加热至斑点显色清晰。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图1。



注:1-3.供试品;4.对照药材;5.阴性对照

Note: 1-3. test samples; 4. reference substance; 5. negative control

图1 薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatograms

2.4 UV法测定金樱子配方颗粒中金樱子多糖的含量

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取于105℃下干燥至恒质量的D-无水葡萄糖对照品10.84 mg,置于10 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为1.084 mg/mL的对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取金樱子配方颗粒样品粉末约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加水50 mL,称定质量,静置1 h,加热回流1 h,放冷,再次称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液1 mL,置于100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;精密量取25 mL,置于50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4.3 检测波长的选择 以4%苯酚-硫酸为空白,取

“2.4.1”项下对照品溶液适量,于200~800 nm波长范围内扫描,结果最大吸收波长为490 nm,详见图2。

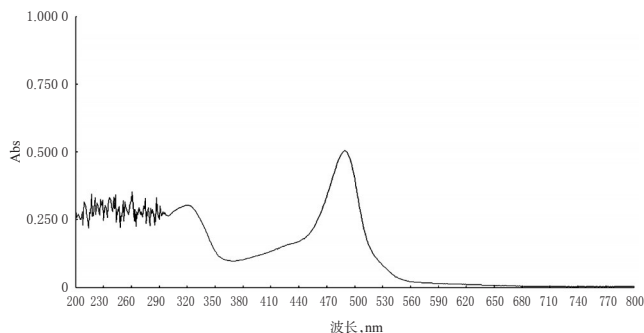


图2 D-无水葡萄糖对照品的紫外吸收光谱图

Fig 2 UV absorption spectrum of D-glucosum anhydricum control

2.4.4 线性关系考察 分别精密量取“2.3.1”项下对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,置于50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得系列对照品贮备液。分别精密量取上述系列对照品贮备液2 mL,置于具塞试管中,加4%苯酚溶液1 mL,混匀,后迅速精密加入硫酸7 mL,摇匀,置于40℃水浴中保温30 min,取出,置于冰水浴中放置5 min,得系列线性工作溶液。分别精密吸取上述系列线性工作溶液适量,于490 nm波长处测定吸光度。以D-无水葡萄糖质量浓度(x, mg/mL)为横坐标,吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得D-无水葡萄糖的回归方程为 $y=10.325x+0.1464$ ($r=0.9991$)。结果表明,D-无水葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.010 8~0.054 2 mg/mL。

2.4.5 定量限与检测限考察 精密吸取“2.4.1”项下对照品溶液适量,于490 nm波长处测定吸光度。分别按信噪比为10:1、3:1计算定量限、检测限。结果,金樱子多糖的定量限为0.070 3 mg,检测限为0.014 0 mg。

2.4.6 精密度试验 取“2.4.1”项下对照品溶液适量,置于具塞试管中,按“2.4.4”项下自“加4%苯酚溶液1 mL”起至“置于冰水浴中放置5 min”依法操作,于490 nm波长处连续测定6次吸光度。结果,金樱子多糖吸光度的RSD为1.21%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.4.7 稳定性试验 精密吸取“2.4.2”项下供试品溶液(批号:P20161115)2 mL,共6份,置于25 mL具塞比色管中,按“2.4.4”项下自“加4%苯酚溶液1 mL”起至“置于冰水浴中放置5 min”依法操作,分别于显色0、2、4、8、12、24 h后于490 nm波长处测定吸光度。结果,金樱子多糖吸光度的RSD为1.03%(n=6),表明供试品溶液经显色后24 h内的稳定性良好。

2.4.8 重复性试验 取金樱子配方颗粒样品(批号:P20161115)粉末共6份,每份0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取2 mL,置于具塞锥形瓶中,再按“2.4.4”项下自“加4%苯酚溶液1 mL”起至“置于冰水浴中放置5 min”依法操作,于490 nm波长处测定吸光度。结果,金樱子多糖吸光度的RSD为1.60%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.4.9 加样回收率试验 取金樱子配方颗粒样品(批号: P20161115)粉末共9份,每份0.25 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,加入一定量的对照品溶液。分别精密量取2 mL,置于具塞试管中,按“2.4.4”项下自“加4%苯酚溶液1 mL”起至“置于冰水浴中放置5 min”依法操作,于490 nm波长处测定吸光度并计算加样回收率,结果见表5。

表5 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 5 Results of recovery tests(n=9)

样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
108.53	86.82	194.92	99.5		
108.80	86.82	196.27	100.7		
108.33	86.82	193.42	98.0		
108.34	108.53	216.65	99.8		
108.71	108.53	214.30	97.3	99.0	1.33
108.50	108.53	214.10	97.3		
108.82	130.23	240.14	100.8		
108.45	130.23	237.49	99.1		
108.74	130.23	237.34	98.7		

2.4.10 样品含量测定 取10批金樱子配方颗粒样品各适量,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液。分别精密量取2 mL,置于具塞试管中,按“2.4.4”项下自“加4%苯酚溶液1 mL”起至“置于冰水浴中放置5 min”依法操作,于490 nm波长处测定吸光度,平行测定3次,计算样品含量,结果见表6。含量限度按测定结果平均值的80%计算,得金樱子多糖含量不得少于34.73%。

表6 样品含量测定结果(n=3)

Tab 6 Results of content determination(n=3)

批号	金樱子多糖, %	平均值, %	RSD, %
P20161115	43.76		
P20161116	44.86		
P20161117	42.88		
P20161118	42.69		
P20161119	43.74		
P20161121	43.34	43.41	2.26
P20161123	41.73		
P20161124	43.29		
P20161126	44.97		
P20161127	42.88		

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 色谱条件 色谱柱: Thermo C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.2%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表7); 检测波长: 270 nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL/min^[11-14]。

表7 梯度洗脱程序

Tab 7 Gradient elution procedure

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	2	98
15	13	87
25	33	67
40	42	58
50	80	20
55	100	0
60	100	0

2.5.2 供试品溶液的制备 取金樱子配方颗粒样品粉

末约0.1 g,精密称定,置于10 mL量瓶中,加20%甲醇超声溶解30 min并定容,混匀,经0.22 μm针头过滤器滤过,即得。

2.5.3 精密度试验 取“2.5.2”项下供试品溶液(批号: P20161116)适量,按“2.5.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以8号峰为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,8个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取“2.5.2”项下供试品溶液(批号: P20161116)共7份,分别于30 ℃下放置1、3、5、7、14、21、28 h时按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,以8号峰为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,8个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=7),表明供试品溶液于30 ℃下放置28 h内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 取金樱子配方颗粒样品(批号: P20161116)粉末适量,共6份,按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,以8号峰为参照,记录各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果,8个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.5.6 HPLC指纹图谱的生成与相似度、共有峰的相关分析 (1)HPLC指纹图谱的生成。取10批金樱子配方颗粒样品各适量,按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.5.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对10批金樱子配方颗粒样品的HPLC图谱进行分析,得HPLC指纹图谱,详见图3、图4。

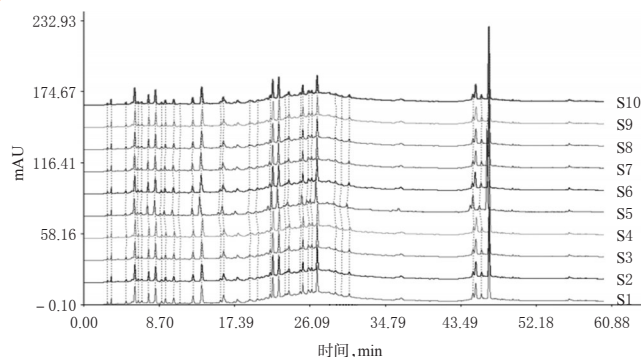


图3 10批样品HPLC叠加指纹图谱

Fig 3 HPLC superimposed fingerprints of 10 batches of samples

(2)相似度分析。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)以样品HPLC对照指纹图谱为参照,进行整体相似度评价。结果显示,10批样品相似度均大于0.937,表明各批金樱子配方颗粒具有良好的稳定性和特征性,拟定金樱子配方颗粒指纹图谱相似度应不得低于0.900,详见表8。

(3)共有峰的相关分析。10批金樱子配方颗粒样品有8个共有峰,其中8号峰含量最高(但笔者尚未对8号

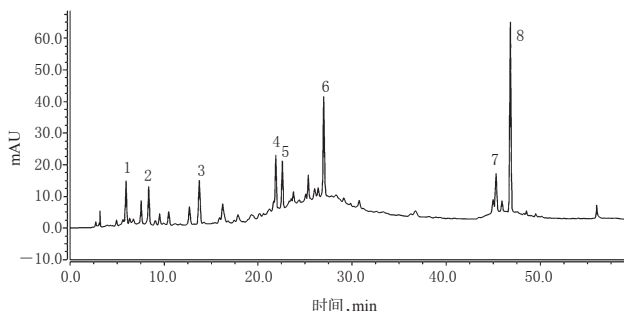


图4 样品HPLC对照指纹图谱

Fig 4 HPLC control fingerprints of samples

表8 10批样品相似度评价结果

Tab 8 Similarity evaluation results of 10 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.999	0.999	0.998	0.939	0.996	0.997	0.996	0.996	0.995	0.997
S2	0.999	1.000	1.000	0.998	0.938	0.997	0.998	0.997	0.996	0.996	0.998
S3	0.999	1.000	1.000	0.998	0.938	0.997	0.998	0.998	0.997	0.997	0.998
S4	0.998	0.998	0.998	1.000	0.939	0.998	0.997	0.997	0.998	0.998	0.999
S5	0.939	0.938	0.938	0.939	1.000	0.940	0.937	0.938	0.938	0.937	0.939
S6	0.996	0.997	0.997	0.998	0.940	1.000	0.998	0.999	0.998	0.998	0.999
S7	0.997	0.998	0.998	0.997	0.937	0.998	1.000	0.998	0.998	0.998	0.998
S8	0.996	0.997	0.998	0.997	0.938	0.999	0.998	1.000	0.999	0.999	0.999
S9	0.996	0.996	0.997	0.998	0.938	0.998	0.998	0.999	1.000	1.000	1.000
S10	0.995	0.996	0.997	0.998	0.937	0.998	0.998	0.999	1.000	1.000	0.999
对照	0.997	0.998	0.998	0.999	0.939	0.999	0.998	0.999	1.000	0.999	1.000

表9 10批样品共有峰的相对保留时间

Tab 9 Relative retention time of common peaks of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.126	0.126	0.126	0.127	0.125	0.126	0.125	0.126	0.127	0.126
2	0.177	0.177	0.177	0.178	0.176	0.177	0.176	0.177	0.178	0.177
3	0.291	0.291	0.291	0.293	0.287	0.290	0.289	0.291	0.292	0.292
4	0.466	0.466	0.466	0.467	0.465	0.467	0.466	0.466	0.466	0.467
5	0.481	0.481	0.481	0.482	0.480	0.482	0.481	0.481	0.482	0.482
6	0.576	0.576	0.576	0.576	0.575	0.576	0.576	0.576	0.576	0.576
7	0.967	0.967	0.967	0.968	0.965	0.967	0.967	0.967	0.967	0.967
8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

表10 10批样品共有峰的相对峰面积

Tab 10 Relative peak area of common peaks of 10 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.219	0.220	0.222	0.219	0.215	0.213	0.217	0.219	0.218	0.220
2	0.215	0.216	0.218	0.216	0.218	0.212	0.215	0.217	0.215	0.217
3	0.321	0.321	0.324	0.319	0.321	0.313	0.321	0.324	0.320	0.323
4	0.244	0.243	0.244	0.229	0.258	0.241	0.247	0.241	0.231	0.234
5	0.270	0.270	0.277	0.271	0.271	0.276	0.281	0.284	0.281	0.287
6	0.340	0.334	0.320	0.296	0.322	0.285	0.283	0.263	0.254	0.250
7	0.219	0.219	0.220	0.217	0.212	0.217	0.222	0.221	0.220	0.223
8(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

本研究参考相关文献^[15-16],采用TLC法对金樱子配方颗粒进行定性鉴别,结果表明,样品TLC图斑点清晰、分离度好。采用UV法对金樱子配方颗粒中的金樱子多糖进行含量测定,结果表明,该方法针对性强、结果准确。另外,本研究建立了金樱子配方颗粒的HPLC指纹图谱,结果10批样品有8个共有峰,相似度均大于

峰的具体成分进行研究),因此选择保留时间为46.732 min的8号峰为参考峰,并计算其他峰相对于8号峰的相对保留时间和相对峰面积,详见表9、表10。

3 讨论

本研究采用正交试验法对金樱子配方颗粒的提取工艺进行了优化,并确定优选提取工艺为8倍量水,回流提取2次,每次2 h。采用该工艺得到金樱子药材平均出膏率为51.07%,金樱子多糖平均提取率为22.17%,表明该工艺高效、稳定、可靠,可为金樱子配方颗粒的工业化生产提供基础。

0.937,表明样品的HPLC图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:221-222.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖,等. 中药现代研究与应用:第三卷[M].北京:学苑出版社,1998:2915.
- [3] 张庭廷,聂刘旺,刘爱民,等. 金樱子多糖的免疫活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(4):55-58.
- [4] 张庭廷,潘继红,聂刘旺,等. 金樱子多糖的抑菌和抗炎作用研究[J].生物学杂志,2005,22(2):41-42.
- [5] 赵云涛,国兴明,李付振,等. 金樱子多糖的抗氧化作用[J].云南中医中药杂志,2003,24(4):35-37.
- [6] 蔡光先,卜献春,陈立峰. 湖南植物志:第四卷[M].长沙:湖南科学技术出版社,2004:2756.
- [7] 仇法新,高福君. 中药配方颗粒的发展现状及应用前景[J].中国药房,2007,18(3):163-164.
- [8] 涂传智,李刚,张增珠,等. 中药配方颗粒及其在中药智能化药房中的应用发展概况[J].世界科学技术:中医药现代化,2017,19(2):207-211.
- [9] 乔彬,张琛,张建春. 中药配方颗粒的应用现状及前景分析[J].甘肃科技,2017,33(21):127-130.
- [10] 国家药典委员会. 中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求:征求意见稿[EB/OL].(2016-08-05)[2017-12-26].<http://www.chp.org.cn/view/ff808081559d1ea301565ac24962560d?a=XWJX>.
- [11] 陈乃富,韩邦兴,张莉,等. 金樱子总黄酮的HPLC指纹图谱的初步研究[J].安徽农学通报,2007,13(3):34-35.

蛇葡萄素 F 对脂多糖致炎模型细胞的抗炎作用及其机制研究^Δ

梁晓玲*, 马利, 赖月花, 侯连兵[#](南方医科大学南方医院药学部, 广州 510515)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1927-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.13

摘要 目的:研究蛇葡萄素 F(AMPF)对脂多糖(LPS)致炎模型细胞的抗炎作用及其机制。方法:以 RAW264.7 细胞为模型细胞,采用 CCK-8 法测定不同质量浓度(100、40、20、10、5 μg/mL)的 AMPF 处理不同时间(24、48、72 h)后的细胞活性。设正常对照组、模型组和 AMPF 高、中、低剂量组(40、20、10 μg/mL),分别未加药物处理或加入相应质量浓度的 AMPF 溶液处理后培养 24 h[除正常对照组外,其余各组均在培养 1 h 时加入 LPS(1 μg/mL)致炎造模]。测定各组细胞中白细胞介素 1β(IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和一氧化氮(NO)的含量,以及环氧合酶 2(COX-2)和一氧化氮合酶(iNOS)的蛋白表达水平。结果:当培养时间为 24 h 时,AMPF 各质量浓度组(100、40、20、10、5 μg/mL)细胞存活率均高于 90%,AMPF 未对细胞产生明显毒性。与模型组比较,AMPF 高、中、低剂量组细胞中 IL-1β 的含量和 iNOS 的蛋白表达水平均显著降低,高剂量组细胞中 IL-6、TNF-α、NO 的含量均显著降低,高、中剂量组细胞中 COX-2 的蛋白表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并呈现一定的剂量依赖性。结论:AMPF 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症具有显著的抑制作用,其机制可能与 AMPF 调控 COX-2 和 iNOS 的表达,进而抑制 NO 的释放,降低 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量有关。

关键词 蛇葡萄素 F; RAW264.7 细胞; 脂多糖; 炎症; 炎症因子

Study on Anti-inflammatory Effect of Ampelopsin F on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Model Cells and Its Mechanism

LIANG Xiaoling, MA Li, LAI Yuehua, HOU Lianbing (Dept. of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-inflammatory effect of ampelopsin F (AMPF) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory model cells and its mechanism. METHODS: Using RAW264.7 cell as model cell, CCK-8 assay was used to determine the activity of cell after treated for different duration (24, 48, 72 h) with different concentration (100, 40, 20, 10, 5 μg/mL) of AMPF. Then the cells were divided into control group, model group and AMPF high-dose, medium-dose and low-dose groups (40, 20, 10 μg/mL). They were cultured without or with relevant AMPF solution for 24 h [Except for normal control group, other groups received LPS (1 μg/mL) to induce inflammatory model after cultured for 1 h]. The contents of IL-1β, IL-6, TNF-α and NO, the protein expression of COX-2 and iNOS were detected in cell culture supernatant. RESULTS: After cultured for 24 h, survival rates of cells in AMPF groups (100, 40, 20, 10, 5 μg/mL) were all higher than 90%, showing no obvious cytotoxicity of AMPF. Compared with model group, the content of IL-1β and the protein expression of iNOS were decreased significantly in AMPF high-dose, medium-dose and low-dose groups; the contents of IL-6, TNF-α and NO were decreased significantly in AMPF high-dose group; the protein expression of COX-2 were decreased significantly in AMPF high-dose and medium-dose groups, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), in dose-dependent manner. CONCLUSIONS: AMPF shows significant anti-inflammatory effect on LPS-induced RAW264.7 cell inflammation, the mechanism of which may be associated with regulating the expression of COX-2 and iNOS, inhibiting the release of NO and decreasing the contents of IL-1β, IL-6, TNF-α and NO.

KEYWORDS Ampelopsin F; RAW264.7 cells; Lipopolysaccharide; Inflammation; Inflammatory factor

[12] 李宇璐, 马国需, 袁经权, 等. 不同产地金樱子根 UPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药师, 2017, 20(3): 409-412.

[13] 冯阳, 陈玉梅, 辛华. 广西金樱子 HPLC 指纹图谱[J]. 中国

Δ 基金项目: 广东省社会发展领域科技计划项目(No. 粤科规财字 [2014]116 号-2013B021800150)

* 硕士研究生。研究方向: 抗炎药物。E-mail: A2166806@qq.com

通信作者: 主任药师, 教授, 博士生导师。研究方向: 天然药物设计与药理学评价。电话: 020-62787163。E-mail: hlianbing@163.com

实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 79-83.

[14] 汪海斌, 石岩, 李芳, 等. 中药黄芪指纹图谱的研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(33): 4749-4752.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 7-8.

[16] 于爱平, 张丹, 郭喜红. 紫外分光光度法测定洋葱提取物中总黄酮的含量[J]. 中国药房, 2005, 16(19): 1498-1499.

(收稿日期: 2018-02-27 修回日期: 2018-05-18)

(编辑: 陈宏)