

颈腰康胶囊的抗炎消肿药效物质基础研究[△]

徐杰^{1*}, 姜文月^{1#}, 王雅俪², 王美慧¹, 魏晓雨¹, 边雨¹(1.吉林省现代中药工程研究中心有限公司, 长春130012; 2.修正药业集团股份有限公司, 吉林通化 134001)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0478-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.10

摘要 目的:研究颈腰康胶囊抗炎消肿药效的物质基础,为该制剂的二次开发、质量控制方法建立和技术改造升级提供依据。方法:采用不同溶剂以及大孔吸附树脂法对颈腰康胶囊进行组分提取分离,获得A组分(总体富集部位)、B组分(氯仿萃取部位)、C组分(水层部位)和D组分(60%乙醇洗脱部位)。通过小鼠耳廓肿胀实验和大鼠足跖肿胀实验,以醋酸地塞米松为阳性对照药物,考察颈腰康胶囊及其不同提取部位(A、B、C、D组分)的抗炎消肿作用,筛选功效部位。采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术(UPLC-Q-TOF-MS)解析功效部位,鉴定其中所含化合物并进行组方药材归属。结果:B组分(氯仿萃取部位)+D组分(60%乙醇洗脱部位)对大鼠或小鼠的抗炎消肿疗效与颈腰康胶囊相当,提示二者发挥了协同抗炎消肿作用,是颈腰康胶囊的功效部位。UPLC-Q-TOF-MS检测及鉴定结果显示,B组分中含有土的宁、黄柏碱、杠柳苷元、石松四酮醇、11-羧基- β -乳香酸等13个化合物,分别归属于马钱子、防己、香加皮、伸筋草、乳香等药材;D组分中含有腺嘌呤、羟基红花黄色素A、黄柏碱、Neoeriocitrin、姜状三七皂苷R₁等7个化合物,分别归属于地龙、红花、防己、骨碎补、牛膝等药材。结论:颈腰康胶囊具有显著的抗炎消肿作用,其氯仿萃取部位与60%乙醇洗脱部位可能共同为其抗炎消肿的功效部位,所含主要成分为生物碱类、黄酮类及乳香酸类化合物。**关键词** 颈腰康胶囊;提取;分离;抗炎;消肿;超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术;活性成分;物质基础

Study on Anti-inflammatory and Detumescent Pharmacodynamic Material Basis of Jingyaokang Capsule

XU Jie¹, JIANG Wen Yue¹, WANG Ya Li², WANG Mei Hui¹, WEI Xiao Yu¹, BIAN Yu¹ (1. Jilin Modern Chinese Medicine Engineering and Research Center Co., Ltd., Changchun 130012, China; 2. Xiuzheng Pharmaceutical Group Incorporated Co., Ltd., Jilin Tonghua 134001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-inflammatory and detumescent pharmacodynamic material basis of Jingyaokang capsule, and to provide reference for secondary development, the establishment of quality control method and technological upgrading of the preparations. METHODS: The constituents of Jingyaokang capsule were extracted and separated with different solvents and macroporous adsorption resin to obtain constituent A (overall enrichment part), constituent B (chloroform extraction part), constituent C (water-course part) and constituent D (elution part of 60% ethanol). Using dexamethasone acetate as positive control, the anti-inflammatory and detumescent effects of Jingyaokang capsule and different extraction parts (constituents A, B, C, D) were investigated by mice ear edema and rat paw edema tests to screen the active fraction. UPLC-Q-TOF-MS method was used to analyze active constituent, identify compounds and attribute medicinal material. RESULTS: Anti-inflammatory and detumescent effects of constituent B (chloroform extraction part) + constituent D (elution part of 60% ethanol) were similar to those of Jingyaokang capsule in rats or mice, indicating both had synergistic anti-inflammatory and detumescent effects and were active constituents of Jingyaokang capsule. UPLC-Q-TOF-MS detection and identification showed that constituent B contained 13 compounds as strychnine, phellodendrine, periplogenin, tetraketone alcohol, 11-carbonyl- β -mastic acid, attributing to *Strychnos nux-vomica*, *Stephania tetrandra*, *Periploca sepium*, *Lycopodium japonicum*, *Boswellia carterii*, etc. Constituent D contained 7 compounds as adenine, hydroxysafflower yellow A, phellodendrine, neoeriocitrin, zingibroside R₁, attributing to rainworm, *Carthamus tinctorius*, *Stephania tetrandra*, *Davallia mariesii*, *Achyranthes bidentata*, etc. CONCLUSIONS: Jingyaokang capsule shows the significant anti-inflammation and detumescent effects. The chloroform extraction part is synergistic with 60% ethanol elution part, which are the active constituents of anti-inflammation and detumescence, mainly including alkaloids, flavonoids and boswellic acids.

KEYWORDS Jingyaokang capsule; Extraction; Separation; Anti-inflammation; Detumescence; UPLC-Q-TOF-MS; Active constituent; Material basis

[△] 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.YYZX201508)

* 助理工程师,药师,硕士。研究方向:中药新药及大品种二次开发。电话:0431-89255164。E-mail:xu908613808@163.com

通信作者:工程师,博士。研究方向:中药新药及大品种二次开发。电话:0431-89255164。E-mail:jiangwenyue1987@126.com

颈腰康胶囊是由制马钱子、伸筋草、香加皮、乳香、没药、红花、地龙、烫骨碎补、防己、牛膝等10味药材组方的中成药制剂,具有舒筋通络、活血化瘀、消肿止痛的功效,主要用于骨折后瘀血及肿胀疼痛、骨折恢复期以及肾虚挟瘀所致痹痛(如增生性脊柱炎、腰椎间盘突出症)

等的治疗^[1]。然而截至目前,尚未见有关于颈腰康胶囊抗炎消肿功效的具体活性成分的研究报道。本研究根据制剂中各组方药材中不同成分的理化性质,通过石油醚提取、水提醇沉、95%乙醇提取、氯仿萃取和大孔吸附树脂分离等方法获得各药物组分;同时结合药理学方法,通过小鼠耳廓肿胀与大鼠足跖肿胀等模型,考察不同提取部位的功效作用,筛选该制剂的抗炎消肿功效部位;然后运用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术(UPLC-Q-TOF-MS)解析所筛选的功效部位,根据相对分子量及串联质谱信息对各组分进行结构鉴定,明确功效活性成分,揭示颈腰康胶囊抗炎消肿药效的物质基础,为该制剂的二次开发、质量控制方法建立和技术改造升级提供依据。

1 材料

1.1 仪器

JY2003型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);Acquity UPLC型液相色谱仪、Q-TOF SYNAPT G2 HDMS型质谱仪(包含四级杆飞行时间串联质量分析器、MassLynx V4.1工作站等组件,美国Waters公司);SB-1200D型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);DZF-6051型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

颈腰康胶囊(修正药业集团股份有限公司,批号:160913,规格:0.33 g/粒);醋酸地塞米松片(天津天药药业股份有限公司,批号:160313,规格:0.75 mg);氯化钠注射液(作为生理盐水使用,吉林省都邦药业股份有限公司,批号:1509290509,规格:500 mL:4.5 g);二甲苯(北京化工厂,批号:20161020);角叉菜胶(美国Sigma-Aldrich公司,批号:1408463);D101大孔吸附树脂(天津市大钧科技开发有限公司);乙腈为色谱纯,石油醚(30~60℃)、氯仿等试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为去离子水。

1.3 动物

ICR小鼠108只,雄性,体质量为18~22 g,生产许可证:SCXK(吉)-2011-0004;Wistar大鼠108只,雌雄各半,体质量为180~220 g,生产许可证号:SCXK(吉)2016-0003。实验动物均由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供,在温度20.0~25.9℃、湿度40.0%~70.0%、换气次数≥15次/h、12 h明暗交替的条件下饲养。

2 方法与结果

2.1 颈腰康胶囊组分的分离制备

取该制剂内容物500 g,加石油醚700 mL,超声(功率:300 W,频率:50 kHz)脱脂20 min×3次,滤过,药渣干燥。在石油醚脱脂药渣中再加12倍量水(V/m , mL/g,下同),加热回流3 h,滤过;再加8倍量水,加热回流3 h,滤过。合并2次提取上清液,70℃减压浓缩至1 g(生

药)/mL;加适量95%乙醇使乙醇最终体积分数为80%,4℃静置过夜醇沉;3 000 r/min离心5 min,收集上清液,4℃贮存待用。取水提药渣,加6倍量95%乙醇,80℃加热回流2次,每次1 h;合并2次提取液,并与上述水提醇沉上清液合并,50℃减压浓缩至1 g(生药)/mL;70℃减压干燥,得到A组分。

取A组分样品溶于适量水中,加盐酸调节pH至1~2,混匀待充分溶解后,加5 mol/L NaOH溶液调节pH至11~12;以氯仿400 mL萃取3次,静置分离。取氯仿层挥干溶剂,70℃减压干燥,得B组分(氯仿萃取部位)。另取水层,70℃减压干燥,得C组分(水层部位)。

取C组分样品溶于适量水中,上样至D101大孔吸附树脂,依次用3倍柱体积的水、60%乙醇依次洗脱;收集60%乙醇洗脱液,50℃减压浓缩至2 g(生药)/mL;70℃减压干燥,得D组分(60%乙醇洗脱部位)。

颈腰康胶囊各部位组分提取分离路线见图1;各部位组分制备得率见表1。

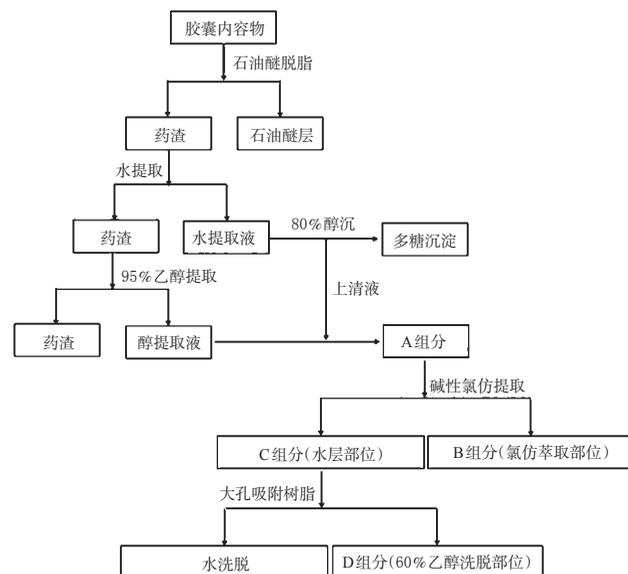


图1 颈腰康胶囊各部位组分提取分离路线图

Fig 1 Component extraction and separation roadmap of Jingyaokang capsule

表1 颈腰康胶囊各部位提取分离组分制备得率

Tab 1 The yield of extraction and separation components of Jingyaokang capsule

样品	取样量/制备量,g	制备得率,%
颈腰康胶囊内容物	500.00	
A组分	86.06	17.21
B组分(氯仿萃取部位)	16.07	3.21
C组分(水层部位)	69.99	14.00
D组分(60%乙醇洗脱部位)	13.79	2.76
药渣	278.76	55.75
损失	10.18	2.04

2.2 颈腰康胶囊的抗炎消肿药效学实验

2.2.1 给药剂量确定 设定小鼠灌胃给药体积为10 mL/kg,醋酸地塞米松片、颈腰康胶囊按临床用药剂量折

算小鼠给药剂量^[2],分别为150、450 mg/kg(以5%羧甲基纤维素钠生理盐水溶液溶解后给药);按表1中颈腰康胶囊各提取分离部位(A、B、C、D)制备得率折合计算其给药剂量,分别为80、15、63、13 mg/kg(溶剂同前)。空白对照组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水。

设定大鼠灌胃给药体积为10 mL/kg,醋酸地塞米松片、颈腰康胶囊按临床用药剂量折算大鼠给药剂量^[2],分别为100、313 mg/kg(溶剂同前);按表1中颈腰康胶囊各提取分离部位(A、B、C、D)制备得率折合计算其给药剂量,分别为54、10、44、9 mg/kg(溶剂同前)。空白对照组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。

2.2.2 小鼠耳廓肿胀实验 参照文献[3-4]方法进行实验。取雌性小鼠108只,随机分为空白对照组、模型组、地塞米松组(阳性对照)、颈腰康胶囊组、A组分组、B组分组、C组分组、D组分组、B+D组分组,每组12只,分别按“2.2.1”项下给药剂量连续给药5 d。于给药第3天时,取二甲苯按20 μL/只涂抹于小鼠右耳内外两侧;于末次给药1 h后,用乙醚麻醉小鼠,再取二甲苯按20 μL/只涂抹于小鼠右耳内外两侧。空白对照组小鼠双耳及其余组小鼠左耳始终不作任何处理。30 min后,处死小鼠,剪下其双耳,用打孔器在相同部位打下圆形耳片并称定质量,计算小鼠耳廓肿胀度、肿胀率及肿胀抑制率。耳廓肿胀度(mg)=右耳片质量-左耳片质量;肿胀率(%)=(右耳片质量-左耳片质量)/左耳片质量×100%;肿胀抑制率(%)=(模型组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/模型组平均肿胀度×100%。各组小鼠耳廓肿胀实验结果见表2。

表2 各组小鼠耳廓肿胀实验结果(n=12)

Tab 2 Results of ear swelling tests in mice of each group(n=12)

组别	给药剂量,mg/kg	肿胀度($\bar{x}\pm s$),mg	平均肿胀率,%	肿胀抑制率,%
空白对照组		0.367±0.219	2.26	
模型组		15.167±2.394 [#]	86.55	
地塞米松组	150	1.950±0.481 ^{###}	11.94	87.14
颈腰康胶囊组	450	4.200±1.481 ^{###}	24.02	72.31
A组分组	80	5.158±1.000 ^{###}	29.27	65.99
B组分组	15	8.917±0.359 ^{###Δ}	50.99	41.21
C组分组	63	7.592±0.617 ^{###Δ}	37.59	49.94
D组分组	13	7.125±0.981 ^{###Δ}	39.75	53.02
B+D组分组	27	5.433±0.633 ^{###}	27.85	64.18

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.01$;与颈腰康胶囊组比较,^Δ $P<0.01$

Note: vs. blank control group, [#] $P<0.01$; vs. model group, ^{*} $P<0.01$; vs. Jingyaokang capsule group, ^Δ $P<0.01$

如表2所示,与空白对照组比较,模型组小鼠耳廓肿胀度显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),表明模型复制成功。与模型组比较,颈腰康胶囊组小鼠耳廓肿胀度显著降低($P<0.01$),表明颈腰康胶囊具有显著的抗炎消肿效果。与颈腰康胶囊组比较,A组分组小鼠耳廓肿胀度差异无统计学意义($P>0.05$),提示A组分为颈腰康胶囊药效成分的总体富集部位;而基于A组分离

制备的B、C、D 3个组分组小鼠的耳廓肿胀度与模型组比较虽显著降低,但与颈腰康胶囊组比较仍显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$),表明B、C、D 3个组分组均未富集到颈腰康胶囊的药效成分,提示其药效组间可能存在协同作用。与颈腰康胶囊组比较,B+D组分组小鼠耳廓肿胀度差异无统计学意义($P>0.05$),表明B组分组与D组分组联合药效与颈腰康胶囊相当,提示二者具有协同抗炎消肿作用,可能共同作为颈腰康胶囊的抗炎消肿药效活性物质。

2.2.3 大鼠足跖肿胀实验 参照文献[5-7]方法进行实验。取大鼠108只,雌雄各半,随机分为空白对照组、模型组、地塞米松组(阳性对照)、颈腰康胶囊组、A组分组、B组分组、C组分组、D组分组、B+D组分组,分别按“2.2.1”项下给药剂量连续给药5 d。于末次给药1 h后,除空白对照组大鼠注射等量生理盐水外,其余大鼠在右后足注射1%角叉菜胶溶液0.1 mL进行致炎。测定致炎前和致炎后1、2、3、4 h时大鼠右后足跖容积,计算足跖肿胀度。肿胀度(mL)=致炎后足跖容积-致炎前足跖容积。各组大鼠足跖肿胀实验结果见表3。

表3 各组大鼠足跖肿胀实验结果(n=12)

Tab 3 Results of paw edema tests in rats of each group(n=12)

组别	给药剂量,mg/kg	肿胀度($\bar{x}\pm s$),mL			
		致炎后1 h	致炎后2 h	致炎后3 h	致炎后4 h
空白对照组		0.033±0.044	0.028±0.052	0.010±0.058	0.036±0.045
模型组		0.348±0.045 [#]	0.617±0.046 [#]	0.704±0.072 [#]	0.553±0.087 [#]
地塞米松组	100	0.191±0.027 ^{###}	0.426±0.078 ^{###}	0.261±0.056 ^{###}	0.188±0.036 ^{###}
颈腰康胶囊组	313	0.250±0.058 ^{###}	0.508±0.079 ^{###}	0.418±0.080 ^{###}	0.314±0.055 ^{###}
A组分组	54	0.263±0.053 ^{###}	0.503±0.097 ^{###}	0.410±0.077 ^{###}	0.308±0.065 ^{###}
B组分组	10	0.313±0.031 ^{###Δ}	0.574±0.050 ^{###Δ}	0.602±0.087 ^{###Δ}	0.410±0.071 ^{###Δ}
C组分组	44	0.290±0.028 ^{###Δ}	0.567±0.053 ^{###Δ}	0.534±0.073 ^{###Δ}	0.368±0.058 ^{###Δ}
D组分组	9	0.296±0.024 ^{###Δ}	0.564±0.049 ^{###Δ}	0.530±0.107 ^{###Δ}	0.385±0.091 ^{###Δ}
B+D组分组	19	0.248±0.049 ^{###}	0.511±0.076 ^{###}	0.409±0.065 ^{###}	0.318±0.055 ^{###}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与颈腰康胶囊组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$

Note: vs. blank control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; vs. model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; vs. Jingyaokang capsule group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$

如表3所示,与空白对照组比较,模型组大鼠足跖肿胀度显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),表明模型复制成功。与模型组比较,颈腰康胶囊组大鼠足跖肿胀度显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$),表明颈腰康胶囊具有显著的抗炎消肿功效。与颈腰康胶囊组比较,各组分大鼠足跖肿胀度差异结果与“2.2.2”项下小鼠耳廓肿胀实验结果一致,进一步证明B组分组与D组分组联合药效与颈腰康胶囊相当,二者具有协同抗炎消肿作用,可能共同作为颈腰康胶囊的抗炎消肿药效活性物质。

2.3 药效组分质谱解析

按“2.2”项下药效学实验结果,对颈腰康胶囊的功效

部位B、D组分进行质谱解析。

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(F₁)-0.1%甲酸溶液(F₂),梯度洗脱(B组分洗脱程序^[8]):0~7 min, 5% F₁→10% F₁; 7~15 min, 10% F₁→20% F₁; 15~20 min, 20% F₁→70% F₁; 20~40 min, 70% F₁→100% F₁。D组分洗脱程序:0~10 min, 5% F₁→20% F₁; 10~11 min, 20% F₁→33% F₁; 11~15 min, 33% F₁→100% F₁; 15~16 min, 100% F₁; 16~17 min, 100% F₁→10% F₁);流速:0.4 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);定量分析质量扫描范围:m/z 50~1 600 Da;电离源温度:110 ℃;去溶剂气温度:300 ℃;锥孔气、去溶剂气均为氮气;流速分别为50、600 L/h;负离子模式:毛细管电压2.0 kV,提取锥孔电压5.0 V,锥孔电压35 V;正离子模式:毛细管电压3.5 kV,提取锥孔电压5.0 V,锥孔电压35 V;全信息串联质谱(MS^E)模式进行二级分析,碰撞气为氩气,低碰撞能10 eV,高碰撞能30~50 eV。采用甲酸钠建立质量标准曲线,以亮氨酸脑啡肽进行实时质量校正。

2.3.3 B组分质谱解析 B组分质谱分析总离子流图见图2。经过一级质谱、二级质谱分析并参考文献[8],对各个峰进行解析与鉴定,共鉴别13个化合物:1号峰为土的宁,2号峰为马钱子碱,3号峰为伪马钱子碱,4号峰为番木鳖次碱,归属于制马钱子药材;5号峰为黄柏碱,6号峰为防己诺林碱,7号峰为粉防己碱,归属于防己药材;8号峰为杠柳苷元,归属于香加皮药材;9号峰为石松四酮醇,归属于伸筋草药材;10号峰为11-羰基-β-乳香酸,11号峰为11-羰基-β-乙酰乳香酸,12号峰为榄香酮酸,13号峰为乙酰基-α-乳香酸,归属于乳香药材。各化学成分分析鉴定结果见表4。

表4 B组分中各化学成分分析鉴定结果

Tab 4 Results of chemical component analysis and identification of constituent B

峰号	保留时间, min	化合物	分子式	相对分子量		误差, ×10 ⁻⁶	碎片离子	药材归属
				测定值	理论值			
1	7.25	土的宁	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	335.177 7	335.176 0	-5.07	335.177 7[M+H] ⁺ , 307.142 5[M-C ₂ H ₄] ⁺ , 264.103 4[M-C ₆ H ₈ N] ⁺ , 234.091 9[M-C ₈ H ₁₀ NO] ⁺	制马钱子
2	9.01	马钱子碱	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₄	395.198 1	395.197 1	-2.53	395.198 1[M+H] ⁺ , 367.165 3[M-C ₂ H ₄] ⁺ , 324.121 3[M-C ₆ H ₈ N] ⁺ , 244.094 5[M-C ₈ H ₁₀ NO] ⁺	制马钱子
3	9.72	伪马钱子碱	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₃	411.191 9	411.192 0	0.24	411.191 9[M+H] ⁺ , 365.186 9[M-C ₂ H ₄ O] ⁺	制马钱子
4	10.25	番木鳖次碱	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₄	381.180 5	381.181 4	2.36	381.180 5[M+H] ⁺ , 324.121 3, 280.097 9, 200.072 8, 160.077 0	制马钱子
5	11.73	黄柏碱	C ₂₀ H ₃₀ NO ₄	342.169 9	342.170 5	1.75	342.169 9[M+H] ⁺ , 192.101 6[M-C ₆ H ₁₀ O ₂] ⁺	防己
6	15.08	防己诺林碱	C ₃₇ H ₄₆ N ₂ O ₆	609.299 5	609.296 4	-5.08	609.299 5[M+H] ⁺ , 578.252 4[M-CH ₃ N] ⁺ , 566.252 0[M-C ₃ H ₅ N] ⁺ , 367.165 3	防己
7	16.32	粉防己碱	C ₃₈ H ₄₆ N ₂ O ₆	623.312 7	623.312 1	-0.96	623.312 7[M+H] ⁺ , 592.267 0[M-CH ₃ N] ⁺ , 580.268 3[M-C ₃ H ₅ N] ⁺ , 381.180 5	防己
8	17.41	杠柳苷元	C ₂₃ H ₃₀ O ₃	391.249 9	391.248 4	-3.83	391.249 9[M+H] ⁺ , 373.242 0[M-H ₂ O] ⁺ , 355.227 2[M-H ₂ O ₂] ⁺ , 337.217 3[M-H ₆ O ₃] ⁺	香加皮
9	17.78	石松四酮醇	C ₂₆ H ₃₆ O ₅	489.354 9	489.358 0	6.33	489.354 9[M+H] ⁺ , 471.352 7[M-H ₂ O] ⁺	伸筋草
10	22.82	11-羰基-β-乳香酸	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	471.352 7	471.347 4	-11.24	471.352 7[M+H] ⁺ , 453.334 8[M-H ₂ O] ⁺ , 407.335 3[M-CH ₃ O] ⁺	乳香
11	26.43	11-羰基-β-乙酰乳香酸	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	513.362 0	513.358 0	-7.79	513.362 0[M+H] ⁺ , 453.334 8[M-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ , 407.335 3[M-C ₃ H ₆ O] ⁺ , 173.132 0, 95.086 6	乳香
12	28.01	榄香酮酸	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	455.352 6	455.352 5	-0.22	455.352 6[M+H] ⁺	乳香
13	30.56	乙酰基-α-乳香酸	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	499.374 1	499.378 7	9.21	499.374 1[M+H] ⁺ , 477.300 1, 439.354 4	乳香
				497.363 4	497.363 1	-0.60	497.363 4[M-H] ⁺ , 455.353 1	

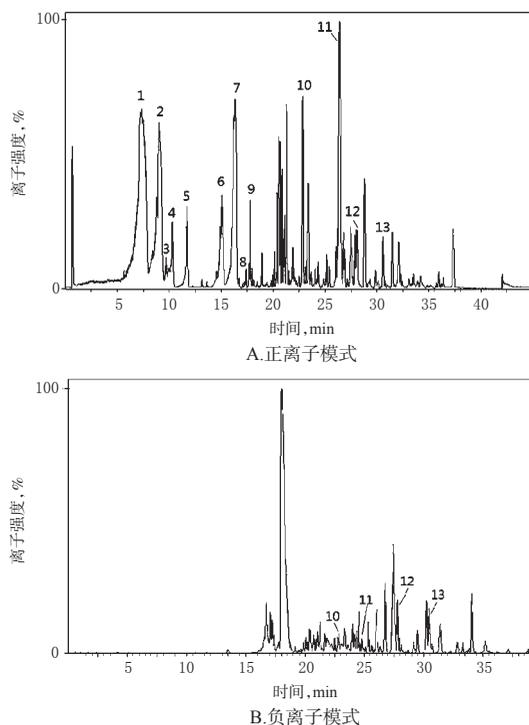


图2 B组分质谱分析总离子流图

Fig 2 Total ion chromatogram of mass spectrum analysis of constituent B

2.3.4 D组分质谱解析 D组分质谱分析总离子流图见图3。经过一级质谱、二级质谱分析并参考文献[8],对各个峰进行解析与鉴定,共鉴别7个化合物:1号峰为腺嘌呤,归属于地龙药材;2号峰为羟基红花黄色素A,3号峰为苯甲酸,归属于红花药材;5号峰为黄柏碱,归属于防己药材;6号峰为Neerocitrin,7号峰为柚皮苷,归属于骨碎补药材;9号峰为姜状三七皂苷R₁,归属于牛膝药材。各化学成分分析鉴定结果见表5。

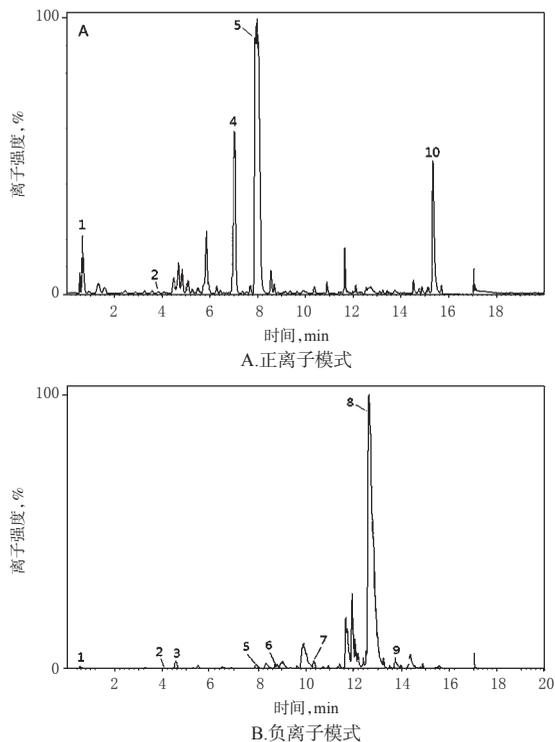


图3 D组分质谱分析总离子流图

Fig 3 Total ion chromatogram of mass spectrum analysis of constituent D

3 讨论

本研究采用水和95%乙醇联合提取,收集颈腰康胶囊中的主要成分;采用石油醚超声前处理及水提液醇沉,去除树脂类、多糖类、蛋白质类成分^[9-11];水提醇沉上清液与95%乙醇提取液合并得A组分;A组分浓缩后以酸水溶解,以碱性氯仿萃取富集得生物碱类B组分,并分离出水层非生物碱类C组分^[12-15];采用D101大孔吸附树脂对水层组分进一步分离,以60%乙醇洗脱富集得黄酮类等D组分^[16-18]。

本研究以药效学指标进行筛选,证实提取分离得到氯仿萃取部位(B组分)与60%乙醇洗脱部位(D组分)可能共同为颈腰康胶囊抗炎消肿的活性组分。同时,将药效学结果与化学成分的质谱鉴定相结合,运用UPLC-Q-TOF-MS技术进行成分鉴定。氯仿萃取部位共鉴别13个化合物,其中4个化合物归属于制马钱子药材,依次为土的宁、马钱子碱、伪马钱子碱、番木鳖次碱;3个化合物归属于防己药材,依次为黄柏碱、防己诺林碱、粉防己碱;1个化合物归属于香加皮药材,为杠柳苷元;1个化合物归属于伸筋草药材,为石松四酮醇;4个化合物归属于乳香药材,依次为11-羧基- β -乳香酸、11-羧基- β -乙酰乳香酸、榄香酮酸、乙酰基- α -乳香酸。60%乙醇洗脱部位共鉴别7个化合物,其中1个化合物归属于

表5 D组分中各化学成分分析鉴定结果

Tab 5 Results of chemical component analysis and identification of constituent D

峰号	保留时间, min	化合物	分子式	相对分子量		误差, $\times 10^{-4}$	碎片离子	药材归属
				测定值	理论值			
1	0.70	腺嘌呤	$C_4H_5N_5$	136.061 3	136.062 3	7.35	136.061 3[M+H] ⁺	地龙
				134.048 1	134.046 7	-0.10	134.048 1[M-H] ⁻	
2	3.96	羟基红花黄色素A	$C_{27}H_{32}O_{16}$	613.175 4	613.176 9	2.45	613.175 4[M+H] ⁺ , 451.332 7[M-glu] ⁺	红花
				611.176 9	611.161 2	-0.26	611.176 9[M-H] ⁻	
3	4.54	苯甲酸	$C_7H_6O_2$	121.029 3	121.029 0	-2.48	121.029 3[M-H] ⁻	红花
4	7.00	未知化合物1	未知	341.177 6		未知	341.177 6[M+H] ⁺ , 301.072 0	未知
5	7.93	黄柏碱	$C_{30}H_{33}NO_4$	342.169 9	342.170 5	1.75	342.169 9[M+H] ⁺ , 192.101 6[M-C ₆ H ₁₀ O ₂] ⁺	防己
				340.152 2	340.154 9	7.94	340.152 2[M-H] ⁻ , 310.111 6	
6	8.82	Neoeriocitrin	$C_{27}H_{32}O_{15}$	595.168 2	595.166 3	-3.19	595.168 2[M-H] ⁻ , 459.114 3	骨碎补
7	10.34	柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	579.176 9	579.171 4	-9.50	579.176 9[M-H] ⁻ , 271.064 1	骨碎补
8	12.66	未知化合物2	未知	259.104 7		未知	259.104 7[M-H] ⁻ , 172.988 1	未知
9	13.23	姜状三七皂苷R ₁	$C_{62}H_{104}O_{14}$	793.440 6	793.437 4	-4.03	793.440 6[M-H] ⁻ , 259.097 7	牛膝
10	15.32	未知化合物3	未知	368.428 5		未知	368.428 5[M+H] ⁺ , 184.073 3	未知

地龙药材,为腺嘌呤;2个化合物归属于红花药材,依次为羟基红花黄色素A、苯甲酸;1个化合物归属于防己药材,为黄柏碱;2个化合物归属于骨碎补药材,依次为Neoeriocitrin、柚皮苷;1个化合物归属于牛膝药材,为姜状三七皂苷R₁。这一结果与本课题组前期研究发现的颈腰康胶囊镇痛药效物质基础研究^[8]结果一致。

颈腰康胶囊为临床有效的经典方剂,但其抗炎消肿药效物质基础尚未完全明确。本研究初步揭示了该复方制剂中抗炎消肿的主要有效成分,并确定了其中的抗炎消肿药效物质基础,可为后续针对其药效物质成分建立特征指纹图谱提供依据,进而有助于提高颈腰康胶囊的产品质量,实现该制剂的技术改造升级。

参考文献

- [1] 药智数据. 颈腰康胶囊[EB/OL].[2018-11-27].<https://db.yaozh.com/instruct/101274.html>.
- [2] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [3] 吕鹏. 跌打消肿止痛灵的药效学研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2012.
- [4] 谷捷, 李鑫, 余黄合, 等. 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(5): 32-35.
- [5] 魏春华, 程虹毓, 高燕萍, 等. 藏药矮紫堇解热镇痛抗炎作用的研究[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(3): 337-342.
- [6] 朱力阳, 涂禾, 马建, 等. 二黄凝胶贴膏镇痛抗炎作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 148-151.

基于Wnt/ β -catenin信号通路的三七/白及胶海绵促进糖尿病足溃疡模型大鼠创面愈合的作用机制研究[△]

雷 霆*, 孙东旭, 周 军#, 魏海梁, 张习禄, 陈志国(陕西中医药大学附属医院普通外科, 陕西 咸阳 712000)

中图分类号 R269;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0483-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.11

摘要 目的:研究三七/白及胶海绵促进糖尿病足溃疡(DFU)模型大鼠创面愈合的作用机制。方法:取健康SD大鼠,采用高脂高糖饲料喂养、一次性腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型,再以钕铁硼磁铁压轧大鼠背部制作溃疡创面造成DFU模型。将60只DFU模型大鼠随机分为A组(空白组,即生理盐水纱布组)、B组(凡士林纱布组)、C组(明胶海绵组)、D组(三七/白及胶海绵组),每组15只。各组大鼠分别给予相应纱布/敷料覆盖创面进行干预治疗,每1~2天换药1次。干预治疗后第3、7天时,分别肉眼观察各组大鼠创面愈合情况并计算创面愈合率;采集创缘组织制作苏木精-伊红(HE)染色切片,在显微镜下进行组织病理学观察;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定创面组织中 β -连环素(β -catenin)、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)、R-脊蛋白3(Rspo3)的mRNA表达水平。结果:干预治疗后第3、7天时,与A、B、C组分别比较,D组大鼠创面愈合率显著升高($P < 0.05$);创面组织的炎细胞浸润、胶原纤维沉积、毛细血管和肉芽组织生长均明显增加; β -catenin、Rspo3的mRNA表达水平均有升高,GSK-3 β 的mRNA表达水平均有降低,且除了干预治疗后第3天时的 β -catenin和第7天时的GSK-3 β 与C组比较差异不显著外,其余指标差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:三七/白及胶海绵可有效促进DFU模型大鼠溃疡创面愈合;其作用机制可能与Wnt/ β -catenin通路中 β -catenin、Rspo3的mRNA表达的上调和GSK-3 β 的mRNA表达的下调相关。

关键词 三七/白及胶海绵;糖尿病足溃疡;创面;促愈合;Wnt/ β -catenin通路;机制;大鼠

Study on the Mechanism of Wound Healing Promotion of *Panax notoginseng*-*Bletilla striata* Gum Sponge on Diabetic Foot Ulcer Model Rats Based on Wnt/ β -catenin Signal Pathway

LEI Ting, SUN Dongxu, ZHOU Jun, WEI Hailiang, ZHANG Xilu, CHEN Zhiguo (Dept. of General Surgery, the Affiliated Hospital of Shaanxi University of TCM, Shaanxi Xianyang 712000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mechanism of wound healing promotion of *Panax notoginseng*-*Bletilla striata* gum sponge on diabetic foot ulcer (DFU) model rats. METHODS: Healthy SD rats were selected and given high-lipid and high-glucose diet, intraperitoneal injection of streptozotocin once to establish diabetes model. Neodymium-iron-boron magnet was used to press the back of rats to make ulcer wound then established DFU model. Totally 60 DFU model rats were randomly divided into group A (blank group, i.e. normal saline gauze group), group B (vaseline gauze group), group C (gelatin sponge group) and group D (*P. notoginseng*-*B. striata* gum sponge group), with 15 rats in each group. The rats were given corresponding gauze/sponge to cover

- [7] 姜溪,陈芙蓉,任雷鸣,等.注射用复方骨肽的药效学及其作用机制研究[J].现代药物与临床,2017,32(6):961-966.
- [8] 徐杰,姜文月,王美慧,等.颈腰康胶囊镇痛药效物质基础研究[J].中药药理与临床,2018,34(5):112-115.
- [9] 沈舒,王琼,李友宾.牛膝的化学成分和药理作用研究进展[J].海峡药学,2011,23(11):1-6.
- [10] 常允平,韩英梅,张俊艳.乳香的化学成分和药理活性研究进展[J].现代药物与临床,2012,27(1):52-59.
- [11] 沈涛,娄红祥.没药的化学成分及其生物活性[J].天然产物研究与开发,2008,20(2):360-366.
- [12] 唐敏,伍冠一,朱婵,等.马钱子碱镇痛研究进展[J].中草

- 药,2014,45(12):1791-1795.
- [13] 祁艳,陈军,蔡宝昌,等.马钱子总生物碱提取纯化工艺及抗肿瘤研究[J].中成药,2010,32(3):405-408.
- [14] 蔡卓亚,周自桂,李萍,等.伸筋草化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(2):297-304.
- [15] 杨欣欣,包永睿,王帅,等.防己生物碱类成分提取纯化工艺研究[J].中成药,2014,36(6):1306-1309.
- [16] 扈晓佳,殷莎,袁婷婷,等.红花的化学成分及其药理活性研究进展[J].药学实践杂志,2013,31(3):161-168,197.
- [17] 彭双,韩立峰,王涛,等.骨碎补中的化学成分及药理作用研究进展[J].天津中医药大学学报,2012,31(2):122-125.
- [18] 王利萍,刘建利.香加皮的化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2009,40(3):493-496.

△ 基金项目:陕西省重点研发计划项目(No.2017SF-320)

* 副主任医师,硕士。研究方向:周围血管病。电话:029-33321623。E-mail:554631847@qq.com

通信作者:主任医师。研究方向:中西医结合诊疗外科疾病。电话:029-33321832。E-mail:13629106789@163.com

(收稿日期:2018-05-29 修回日期:2018-12-24)

(编辑:段思怡)