

· 化学与分析 ·

三黄泻心汤水、醇提取物抗炎作用比较及有效提取物的成分分析

姚佳琪, 肖永庆, 刘颖, 于定荣, 麻印莲, 李鹏远, 李丽*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**通过比较三黄泻心汤水、醇提取物的抗炎作用,确定有效提取物并对有效提取物进行成分分析,探讨三黄泻心汤抗炎的药效物质基础。**方法:**以二甲苯所致的小鼠耳肿胀为抗炎活性筛选模型,口服灌胃给药,通过计算各给药组的小鼠耳肿胀抑制率,确定三黄泻心汤的有效提取物,并运用 HPLC 法对有效提取物进行化学成分分析。**结果:**与模型组比较,各给药组肿胀度均有所下降,醇提取物的大、中剂量组能够显著降低小鼠耳肿胀度($P < 0.01$),肿胀抑制率约 46%;2 种提取物相同剂量组间比较,醇提取物的大、中剂量组肿胀度显著低于水提取物($P < 0.05$),醇提取物的抗炎活性优于水提取物。黄酮类-蒽醌类成分在醇提取物中的质量比约 9:2:5。**结论:**三黄泻心汤醇提取物具有显著的抗炎作用,是该方抗炎的有效提取物,其抗炎作用与有效提取物中化学成分的组成及各类成分的量比关系密切相关。

[关键词] 三黄泻心汤; 提取物; 抗炎; 成分分析

[中图分类号] **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0031-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130031

Anti-inflammatory Effect Comparison of Water and Ethanol Extracts of Sanhuang Xiexin Tang and Component Analysis of Its Active Extracts YAO Jia-qi, XIAO Yong-qing, LIU Ying, YU Ding-rong, MA Yin-lian, LI Peng-yuan, LI Li* (Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

[Abstract] **Objective:** To determine the active extracts and uncover the material basis of Sanhuang Xiexin Tang, comparing the anti-inflammatory effect of its water and ethanol extracts. **Method:** Use the xylene-induced auricular swelling of mouse as screening model; oral administration, and calculate the inhibition degree of swelling to determine the active extracts. Meanwhile, conduct the component analysis for active extracts. **Result:** Compared with model group, decrease of swelling in different groups is observed, the swelling of mouse is significantly lower of ethanol extracts than water extracts ($P < 0.01$) and the inhibition degree is about 46%. The swelling of mouse in the medium dose and high dose of ethanol extracts are significantly lower than water extracts ($P < 0.05$), the inflammatory effect of ethanol extract is better than water extracts. The ratio of flavone, anthraquinone and alkaloid in ethanol extracts is 9:2:5. **Conclusion:** The inflammatory effect of ethanol extracts is obvious, which has something to do with the component ratio within the extracts. And ethanol extracts is determined as the active extracts of Sanhuang Xiexin Tang.

[Key words] Sanhuang Xiexin Tang; extracts; anti-inflammatory; component analysis

三黄泻心汤由大黄、黄芩、黄连 3 味中药组成, 血化瘀等功效,主要用于火毒血热所致的身热烦躁、出自东汉张仲景的《金匮要略》,具有清热解毒、活 目赤口疮、牙龈肿痛等。现代药理研究证明抗炎是

[收稿日期] 20150106(004)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81274087)

[第一作者] 姚佳琪,在读硕士,从事中药炮制与质量评价研究,Tel:010-84040221,E-mail:zys_pzzx@163.com

[通讯作者] *李丽,博士,副研究员,从事中药炮制与中药质量评价研究,Tel:010-84040221,E-mail:lili7755@163.com

清热解毒的重要途径之一,因此三黄泻心汤被广泛用于各种炎症的治疗^[1]。目前,有关三黄泻心汤抗炎活性的研究多从水煎液入手^[2-3],探讨其在急性炎症动物模型上的抗炎效应以及不同配伍的抗炎作用,而对其不同提取物的抗炎活性研究尚未见报道。因此,本文拟通过比较三黄泻心汤水提物与醇提物对小鼠耳肿胀的抗炎作用,确定有效提取物并对其进行成分分析,为进一步揭示三黄泻心汤抗炎的药效物质基础提供依据。

1 材料

1.1 仪器 2695 型高效液相色谱仪(Empower 2 工作站,2996 PDA 检测器,美国 Waters),LC-20AT 型高效液相色谱仪(LC solution 工作站,SPD-M20A 检测器,日本岛津),XS105 型电子天平(特勒-托利多仪器有限公司),FA2204B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试药 盐酸小檗碱(110620)(HL1),盐酸巴马汀(MUST-12022707)(HL2),黄芩苷(MUST-12112909)(HQ1),汉黄芩苷(MUST-13052312)(HQ2),黄芩素(MUST-13092303)(HQ3),汉黄芩素(111595-200905)(HQ4),反-3,5,4'-三羟基苯乙炔基-4'-O-β-D-葡萄糖苷(DH1),番泻苷 A(DH2),4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(6"-O-(4"-羟基)-桂皮酰基)-葡萄糖苷(DH3),芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷(DH4),大黄酸-8-O-葡萄糖苷(DH5),芦荟大黄素(110795-201308)(DH6),大黄酸(DH7),大黄素(110756-200110)(DH8),大黄酚(DH9),大黄素甲醚(110758-200912)(DH10)对照品。其中 HL1 购自四川省维克奇生物科技有限公司;HQ1, HQ2, HQ3, HL2 购自成都曼思特生物科技有限公司;DH6, DH8, DH10, HQ4 购自中国食品药品检定研究院;DH1, DH2, DH3, DH4, DH5, DH7, DH9 为实验室分离制备,经 NMR 鉴定及 HPLC 纯度检查,上述对照品纯度均 >98%,可供含量测定用。

大黄饮片购自北京人卫中药饮片厂,黄连、黄芩饮片购自四川新荷花中药饮片公司。甲醇(色谱纯, Fisher Scientific 公司),乙腈(色谱纯, Fisher Scientific 公司),磷酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司),甲酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司),娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),二甲苯(北京化工厂,批号 20130108),所有流动相使用前均以 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.3 动物 昆明种小鼠,雄性,体重 20 ~ 22 g。购自中国食品药品检定研究院,许可证号 SCXK(京)

2009-0017。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备

2.1.1 醇提物的制备 取大黄饮片 300 g,黄芩饮片 150 g,黄连饮片 150 g,捣成粗颗粒,加 75% 乙醇 2 000 mL 浸没 24 h,渗漉提取 25 倍量,渗漉液减压回收溶剂,提取物 60 °C 真空干燥,得醇提物 200.78 g。

2.1.2 水提物的制备 取大黄饮片 300 g,黄芩饮片 150 g,黄连饮片 150 g,捣成粗颗粒,参照 2010 年版《中国药典》“一清颗粒”制备方法,将上述饮片置于 6 000 mL 水中浸泡 0.5 h,煎煮 3 次,煎煮时间分别为 1.5, 1.0, 0.5 h,过滤,合并滤液,60 °C 真空干燥,得水提物 216.73 g。

2.2 水、醇提取物的抗炎作用比较

2.2.1 模型与分组 动物随机分为 7 组,每组 10 只。(1)空白组:灌胃蒸馏水;(2)~(4):水提物的大、中、小剂量组;(5)~(7):醇提物的大、中、小剂量组。参照三黄泻心汤的人临床药量换算为小鼠剂量为 0.44 g·kg⁻¹·d⁻¹,将其设为小剂量^[4],即每个样品分别设大、中、小 3 个剂量(1.8, 0.9, 0.45 g·kg⁻¹)。口服灌胃给药,0.2 mL/10 g 体重,每日 1 次,连续 7 d。

2.2.2 给药与取材 实验各组给药 7 d,每日 1 次,末次给药后 40 min,于右侧耳壳正反两面均匀涂抹二甲苯液 0.02 mL,1 h 后处死动物,沿耳廓基线剪下两耳,于同一部位用打孔器冲下耳片,称重,以两耳片之差为肿胀度,求出给药组的肿胀抑制率。

2.2.3 统计方法 应用 SPSS 19.0 统计软件,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2.2.4 结果 与空白组比较,各给药组肿胀度均有所下降,醇提物的大、中剂量组能够显著降低小鼠耳肿胀度($P < 0.01$),肿胀抑制率约为 46.00%;两种提取物相同剂量组间比较,醇提物的大、中剂量组肿胀度显著低于水提物($P < 0.05$),醇提物的抗炎活性优于水提物。结果见表 1。

2.3 含量测定及方法学考察

2.3.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,进样体积 10 μL。

条件 1:流动相甲醇(A)-乙腈(B)-0.1% 磷酸溶液(C),梯度洗脱(0 ~ 10 min, 18% ~ 19% A,

表 1 三黄泻心汤抗炎作用 (n=12)

Table 1 Anti-inflammatory effects of Sanhuang Xiexin Tang (n=12)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肿胀度($\bar{x} \pm s$) /g	肿胀抑制率 /%
对照		0.013 3 ± 0.007 4	
三黄泻心汤	1.8	0.011 9 ± 0.004 5	10.63
水提物	0.9	0.012 2 ± 0.003 6	8.75
	0.45	0.012 3 ± 0.004 4	7.50
三黄泻心汤	1.8	0.007 1 ± 0.003 7 ^{2,6)}	46.88
醇提物	0.9	0.007 2 ± 0.005 0 ^{2,6)}	46.14
	0.45	0.009 4 ± 0.005 1	29.77

注:与对照组比较¹⁾P<0.001,²⁾P<0.01,³⁾P<0.05;相同剂量组间比较⁴⁾P<0.001,⁵⁾P<0.01,⁶⁾P<0.05。

18%~19% B,64%~62% C;10~15 min,19%~20% A,19%~20% B,62%~60% C;15~25 min,20%~30% A,20%~30% B,60%~40% C;25~45 min,30% A,30% B~,40% C),检测波长 316 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹。此条件用于 HQ1~HQ4 的含量测定。

条件 2:流动相乙腈(A)-0.5%甲酸-0.2%氨水-水溶液(B),梯度洗脱(0~12 min,20%~27% A;12~16 min,27% A;16~20 min,27%~28% A;20~27 min,28%~31% A),检测波长 345 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹。此条件用于 HL1,HL2 的含量测定。

条件 3:流动相乙腈(A)-1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~7 min,10%~16% A;7~10 min,16%~21% A;10~13 min,20% A;13~15 min,20%~40% A;15~20 min,40% A;20~30 min,40%~100% A;30~40 min,100% A),检测波长分别为 280 nm(DH1~3),430 nm(DH4~10),流速 1.0 mL·min⁻¹。此条件用于 DH1~DH10 的含量测定。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别取 HQ1,HQ2,HQ3,HQ4 适量,精密称定,加甲醇配制成质量浓度分别为 120.00,11.60,2.40,1.20 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液 A。

分别取 HL1,HL2 适量,加甲醇配制成质量浓度分别为 34.40,8.30 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液 B。

分别取对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 DH1 6.87 mg·L⁻¹,DH2 8.40 mg·L⁻¹,DH3 6.63 mg·L⁻¹,DH4 2.55 mg·L⁻¹,DH5 15.80 mg·L⁻¹,DH6 0.88 mg·L⁻¹,DH7 5.40 mg·L⁻¹,DH8

0.90 mg·L⁻¹,DH9 1.60 mg·L⁻¹,DH10 0.65 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液 C。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取醇提物 10 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,作为供试品溶液。

2.3.4 专属性试验 按处方比例,分别称取缺少大黄、黄芩、黄连的处方,按照 2.1.1 项下方法制备阴性对照溶液。按照色谱条件 1,2,3 进样分析,结果显示阴性样品无干扰。见图 1。

2.3.5 线性关系考察 标准曲线分别以混合对照品 A,B,C 溶液为母液,用甲醇稀释至母液浓度的 1/2,1/4,1/8,1/16,分别按照色谱条件 1,2,3,各进样 10 μL 分析,以对照品质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,峰面积为纵坐标,计算回归方程。结果见表 2。

表 2 线性关系考察

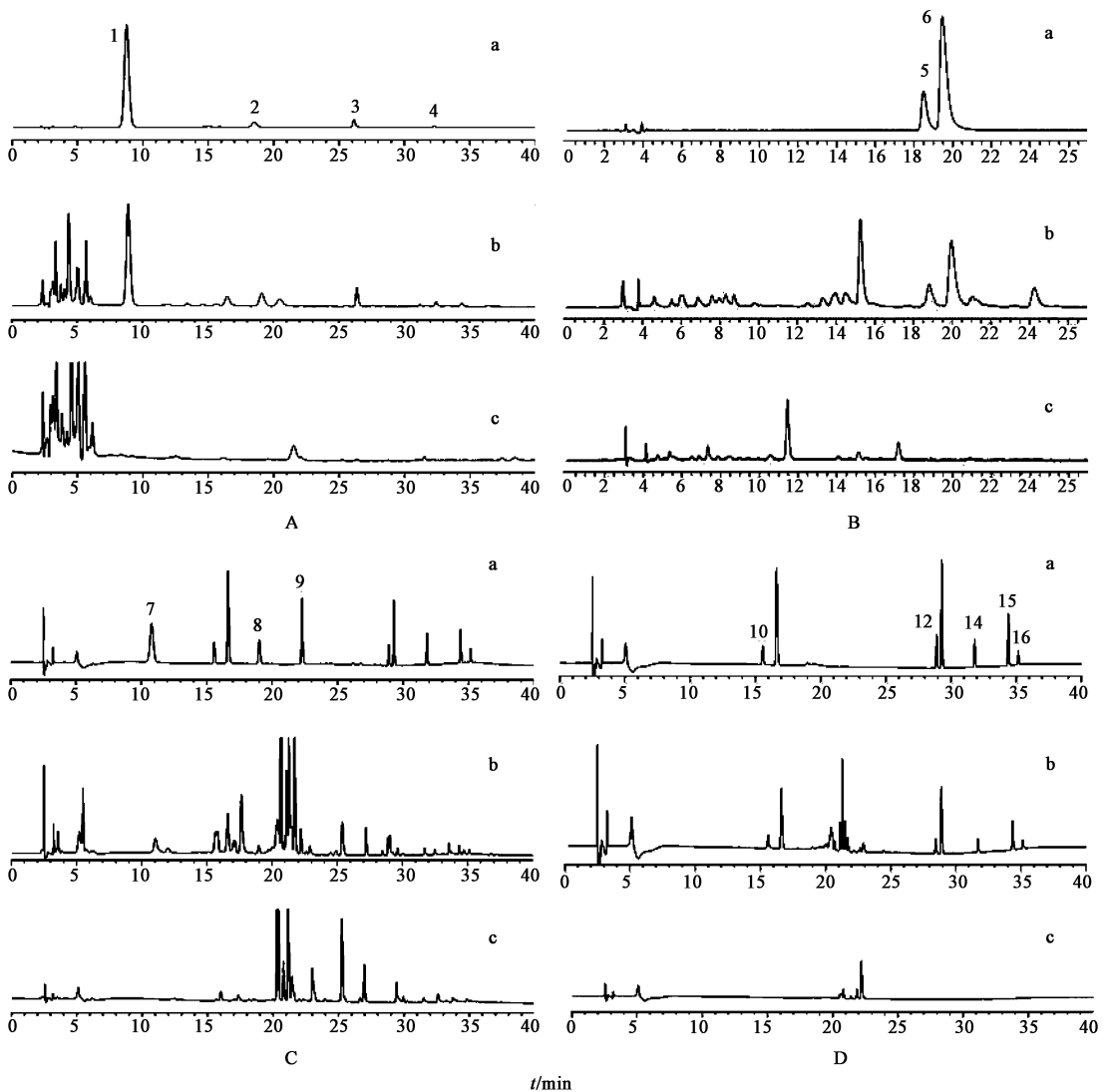
Table 2 Results of linear relation test

成分	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
HQ1	Y=21 082X+20 932	1.000 0	7.50~120.00
HQ2	Y=12 445X-218.38	0.999 9	0.73~11.60
HQ3	Y=48 268X-57.167	0.999 9	0.15~2.40
HQ4	Y=16 580X+1.2917	0.999 9	0.08~1.20
HL1	Y=40 801X-2751.7	0.999 8	2.15~34.40
HL2	Y=45 380X-156.61	0.999 8	0.52~8.30
DH1	Y=23 573X-440.83	0.999 9	0.43~6.87
DH2	Y=6 695.4X+77.417	0.999 9	0.53~8.40
DH3	Y=15 893X-2202.1	0.999 9	0.41~6.63
DH4	Y=8 929.9X+141.58	0.999 9	0.16~2.55
DH5	Y=7 243.9X+532.25	0.999 9	0.99~15.80
DH6	Y=32 746X+609.04	0.999 9	0.06~0.88
DH7	Y=17 015X+363.83	1.000 0	0.34~5.40
DH8	Y=25 042X+303.29	0.999 8	0.06~0.90
DH9	Y=27 841X+485.37	0.999 9	0.10~1.60
DH10	Y=17 606X+285.79	0.999 5	0.04~0.65

2.3.6 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样 6 次,记录峰面积,各成分测定结果的 RSD 在 0.2%~1.9%,表明精密度良好。

2.3.7 重复性试验 精密称取醇提物 6 份,各 10 mg,制备成供试品溶液,各进样 10 μL 分析,记录峰面积,各成分测定结果的 RSD 在 0.5%~4.2%,表明方法重复性良好。

2.3.8 稳定性试验 精密称取醇提物 10 mg,制备成供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,12 h 进样 10 μL



1. 黄芩苷;2. 汉黄芩苷;3. 黄芩素;4. 汉黄芩素;5. 盐酸小檗碱;6. 盐酸巴马汀;7. 反-3,5,4'-三羟基苯乙烯基-4'-O-β-D-葡萄糖苷;8. 番泻苷A;9. 4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(6"-O-(4"-羟基)-桂皮酰基)-葡萄糖苷;10. 芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷;11. 大黄酸-8-O-葡萄糖苷;12. 芦荟大黄素;13. 大黄酸;14. 大黄素;15. 大黄酚;16. 大黄素甲醚;a. 对照品;b. 样品;c. 阴性样品;A. 色谱条件1(黄芩阴性);B. 色谱条件2(黄连阴性);C. 色谱条件3(280 nm,大黄阴性);D. 色谱条件4(430 nm,大黄阴性)

图1 三黄泻心汤 HPLC

Fig.1 HPLC chromatograms of Sanhuang Xiexin Tang

分析,记录峰面积,各成分测定结果 RSD 在 0.2% ~ 3.5%,说明供试品溶液在 0 ~ 12 h 内稳定。

2.3.9 加样回收试验 精密称取醇提取物 9 份,各 5 mg,置于量瓶中,按低、中、高浓度分别精密加入混合对照品溶液,加甲醇定容至 25 mL 量瓶中,每一浓度取 3 份,各进样 10 μL 分析,记录峰面积,结果平均回收率在 96.77% ~ 102.45%, RSD 在 1.3% ~ 3.7%。

2.3.10 含量测定 精密称醇提取物及水提取物各 10 mg,分别置于量瓶中,加甲醇定容至 25 mL,各进样 10 μL 分析。结果见表 3。

3 讨论

三黄泻心汤是清热解毒、活血化瘀的经典小复方,临床上广泛应用于各种炎症的治疗,但目前研究多关注于急性炎症的抗炎活性研究^[2-3],与抗炎活性有关的物质基础研究少有报道。因此本文以三黄泻心汤水提取物与醇提取物为研究对象,进行了抗炎活性的对比研究,结果表明,醇提取物能够显著降低二甲苯所致的小鼠耳肿胀度,是三黄泻心汤抗炎活性的有效提取物。

同时,本文还对三黄泻心汤醇提取物进行了成分分析,明确了其成分组成,并对其主要成分的含量以

表 3 三黄泻心汤醇提物的含量测定 (n=2)

Table 3 Content determination results of ethanol extract of Sanhuang Xiexin Tang (n=2) mg·g⁻¹

成分	醇提物	成分	醇提物
HQ1	164.93	DH3	25.97
HQ2	44.79	DH4	9.31
HQ3	8.47	DH5	49.86
HQ4	5.56	DH6	2.08
HL1	41.94	DH7	18.06
HL2	11.46	DH8	2.22
DH1	25.63	DH9	4.58
DH2	27.92	DH10	2.08

及各成分之间的量比关系进行了分析。三黄泻心汤醇提物中主要含有黄芩苷、小檗碱、蒽醌苷等 16 种活性成分(表 3),其中以黄芩苷含量最高,约占所测成分总量的 37%,此外,大黄酸-8-O-葡萄糖苷、汉黄芩苷、小檗碱等成分也具有较高的含量,均占所测成分总量的 10% 左右。大量实验研究证实^[5-9],上述成分均具有较好的抗炎活性,从而进一步明确了三黄泻心汤醇提物的抗炎活性的物质基础。在对醇提物的成分分析中,作者还与水提物的物质组成及各成分之间的量比关系进行了对比分析,结果显示虽然水提物中也含有众多抗炎活性成分,但两种提取物无论是在化学成分的组成还是各主要成分的量比关系方面都具有显著的差异,醇提物中黄酮-生物碱-蒽醌类成分的量比关系约为 9:2:5,而水提物中上述三类成分的量比关系是 12:2:3,这也提示了抗炎活性不仅与物质基础的组成相关,而且所含化学成分的量比关系改变是导致其活性变化的重要因素^[10-12],这与中药复方的配伍理论有着高度的相似性。

通过本文的研究,不仅明确了三黄泻心汤抗炎作用的有效提取物,并且对其进行了初步的成分

分析,也丰富了三黄泻心汤的研究内容,为进一步开发物质基础清晰、疗效确切的中药创新药物提供了新思路。

[参考文献]

[1] 马维宁. 三黄泻心汤及其制剂的临床研究综述[J]. 河南中医,2005,25(10):85-87.

[2] 马秉亮,马越鸣,严东明,等. 泻心汤不同配伍抗炎作用比较研究[J]. 中草药,2007,38(11):1690-1693.

[3] 马越鸣,闫晶超,王天明,等. 泻心汤在急性炎症动物模型上的抗炎效应[J]. 中国药理学通报,2006,22(11):1393-1398.

[4] 徐叔云. 药理试验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:407.

[5] 祝双来,黄洪林. 黄芩黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展[J]. 江西中医学院学报,2010,22(3):97-100.

[6] 李宇馨,李瑞海. 小檗碱抗炎活性研究[J]. 实用药物与临床,2013,16(1):43-44.

[7] 李晓红,齐云,蔡润兰,等. 芦荟大黄素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成及 iNOS 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(4):488-492.

[8] 余佳,吴晓晴,孙海峰,等. 大黄酸及其衍生物的生物活性研究进展[J]. 药学与临床研究,2008,16(2):125-128.

[9] 沈爱娟,蔡宛如. 大黄素抗炎作用及对急性肺损伤治疗作用研究进展[J]. 浙江中医药大学学报,2013,37(10):1261-1264.

[10] 杨奕,乔卫,刘婧姝,等. 酸枣仁抗抑郁活性组分配伍的研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(1):7-8.

[11] 张建宏,寇俊萍,朱丹妮,等. 生脉散抗小鼠脑缺血缺氧有效组分的配伍研究[J]. 中药新药与临床药理,2007,18(4):253-256.

[12] 盛华刚,李娜,朱立俏,等. 三七总皂苷和淫羊藿苷分配伍对成骨细胞的增殖和钙化作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):183-186.

[责任编辑 顾雪竹]