

金银花与山银花的体外溶血作用分析

黄娜^{1,2}, 高慧敏², 陈两绵^{2*}, 张毅², 朱晶晶²,

刘晓谦², 王智民^{2*}, 冯伟红², 闫利华²

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450008;

2. 中国中医科学院中药研究所中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700)

[摘要] **目的:**研究金银花和山银花的体外溶血作用,评价其潜在溶血风险。**方法:**以皂苷单体化合物、金银花有效部位及金银花、山银花药材等为实验材料,采用紫外分光光度法测定各类样品在不同浓度时对兔血红细胞的溶血率,绘制溶血率-质量浓度曲线。**结果:**忍冬苦苷A,忍冬苦苷B,灰毡毛忍冬皂苷甲,川续断皂苷乙和川续断皂苷VI在质量浓度 $\leq 1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均未发生溶血。灰毡毛忍冬皂苷乙的溶血率随着质量浓度的升高而增大,当质量浓度 $\leq 0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时未发生溶血;当质量浓度为 $0.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,溶血率上升至11.7%;当质量浓度为 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,溶血率达到50.4%。金银花各有效部位溶血作用的相对强弱为金银花总皂苷部位>总酚部位>总环烯醚萜部位。其中,金银花总环烯醚萜部位在质量浓度为 $0.1 \sim 1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时未发生溶血;金银花总酚部位质量浓度 $< 1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,未发生溶血。金银花总皂苷部位在质量浓度为 $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开始溶血,之后随着质量浓度的升高,其溶血率急剧增大,当质量浓度为 $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,溶血率55.3%。金银花野生品、栽培品与山银花的溶血率-质量浓度曲线较为相似,其溶血率急剧增大的质量浓度为 $2.0 \sim 4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。**结论:**金银花与山银花的溶血作用无显著性差异;各种皂苷单体化合物没有溶血作用或溶血作用较弱;金银花总皂苷部位的质量浓度为 $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (相当于生药质量浓度 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)时具有较弱的溶血作用。尽管如此,中药注射液一般不会达到如此高的药物浓度。因此,含有皂苷类成分的金银花与山银花可应用于中药注射剂,其潜在的溶血风险较小。

[关键词] 金银花; 山银花; 紫外-分光光度法; 溶血作用; 总酚; 总皂苷; 总环烯醚萜

[中图分类号] R283.6; R945; R282.6; R285.5; R25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0006-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017120006

Hemolytic Effects of Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos *in Vitro*

HUANG Na^{1,2}, GAO Hui-min², CHEN Liang-mian^{2*}, ZHANG Yi², ZHU Jing-jing²,

LIU Xiao-qian², WANG Zhi-min^{2*}, FENG Wei-hong², YAN Li-hua²

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the hemolytic effects of Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos *in vitro* and to evaluate their potential hemolysis risks. **Method:** Hemolysis of the rabbit red blood cells were determined by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS) after adding the different concentrations of the compounds of saponins, the active fractions of Lonicerae Japonicae Flos, and the samples of Lonicerae Japonicae Flos and Lonicerae Flos, respectively. Then, the hemolysis rates curves can be obtained by plotting the hemolysis rates against the corresponding concentrations. **Result:** The hemolytic effects of loniceroid A, loniceroid B,

[收稿日期] 20170316(013)

[基金项目] 国家中医药行业科研专项(201507002);中国中医科学院自主选题第8批项目(ZZ0808016)

[第一作者] 黄娜,在读硕士,从事中药药效物质基础及作用机制研究, Tel:18811130260, E-mail:1740554609@qq.com

[通讯作者] *陈两绵,博士,助理研究员,从事中药质量评价研究, Tel:010-64087534, E-mail:lmchen@icmm.ac.cn;

*王智民,博士,研究员,从事中药化学及质量控制研究, Tel:010-84014128, E-mail:zhmw123@263.net

macranthoidin A, dipsacoid B and asperosaponin VI can't be observed as the concentrations were $\leq 1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The hemolysis rate of macranthoidin B was increased with the increasing of the concentration. The hemolysis of macranthoidin B can't be observed as the concentration was less than $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Then, the hemolysis rate was 11.7% as the concentration was $0.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the hemolysis rate was up to 50.4% as the concentration was $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The hemolytic effects of the active fractions of *Lonicerae Japonicae Flos* were in the order of total saponins > total phenolics > total iridoids. The hemolysis of the total iridoids can't be observed as the concentration was between $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. There was no hemolysis for the total phenolics as its concentration was less than $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The hemolysis of the total saponins was observed as the concentration was $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Then, it was increased rapidly with the increase of the concentration and the hemolysis rate was up to 55.3% as the concentration was $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The hemolysis curves of the cultivated and wild samples of *Lonicerae Japonicae Flos* were similar with that of *Lonicerae Flos*. Their obvious hemolysis concentration was between $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. **Conclusion:** There are no significant differences between *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* concerning their hemolysis. All saponins compounds studied have no hemolysis or weak hemolytic effects. The total saponins of *Lonicerae Japonicae Flos* also have weak hemolytic effects with the concentration of $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, which is equal to $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of crude drug. However, it is hard to reach such high concentration in the traditional Chinese medicine injections. Therefore, *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* contained the components of saponins could be applied to traditional Chinese medicine injections and the potential hemolysis risks are small on clinic.

[Key words] *Lonicerae Japonicae Flos*; *Lonicerae Flos*; ultraviolet-visible spectroscopy; hemolysis; total phenolics; total saponins; total iridoids

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾或带初开的花,其味甘性寒,具有清热解毒、疏散风热等功效,临床用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒和温病发热^[1]。金银花的药材来源有野生品也有栽培品,其中山东、河南和河北等地以人工栽培为主,且栽培的农艺品种繁多^[2-3],如大毛花、鸡爪花、四季花、巨花一号、亚特花、九丰一号等。山银花为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *L. macranthoides*,红腺忍冬 *L. hypoglauca*,华南忍冬 *L. confusa* 或黄褐毛忍冬 *L. fulvotomentosa* 的干燥花蕾或带初开的花,其功效与金银花基本相同^[1]。金银花和山银花主要含有酚类、环烯醚萜类及三萜皂苷类等化学成分^[4],其中三萜皂苷类成分具有保肝利胆和抗炎等作用^[5]。金银花中含有的主要三萜皂苷类成分为忍冬苦苷 A 和忍冬苦苷 B 等,山银花中含有的主要三萜皂苷类成分为灰毡毛忍冬皂苷甲、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙和川续断皂苷 VI 等。

目前,金银花是中药注射剂中的常用组分,如清开灵注射液、热毒宁注射液、注射用双黄连冻干粉、复方大青叶注射液、清热解毒注射液及鱼金注射液等。据文献报道^[6-9],皂苷类成分一般具有溶血作用,在制备成注射剂时,需考虑其溶血风险。本实验对皂苷类单体化合物、金银花有效部位及金银花的野生品和栽培品进行体外红细胞溶血研究,并对山

银花及其所含单体皂苷类化合物的溶血作用进行分析,探讨其用于注射剂时的潜在溶血风险,为保证相关药物的临床应用安全提供参考。

1 材料

T6 新世纪型紫外-可见分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司),XSE 105DU 型 1/10 万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],BSA 2224S-CW 型 1/1 万电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),HC-2518 型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),DLSB-BL-20 型低温冷却循环泵(巩义予华仪器有限责任公司)。

灰毡毛忍冬皂苷甲、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙和川续断皂苷 VI 对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为 H-074-151023, H-014-150806, C-005-150728, C-014-160323, 纯度均 > 98%),忍冬苦苷 A 和忍冬苦苷 B 对照品(自制,纯度 > 98%),生理盐水(0.9% 氯化钠注射液,山东齐都药业有限公司,批号 3B16012901),二甲基亚砜(美国 Amresco 公司,批号 12A0219, 纯度 $\geq 99.9\%$),水为蒸馏水,试剂均为分析纯。

金银花样品均由课题组实地采集,实验采集了不同产地和不同农艺品种的金银花栽培品或野生品样品 16 批(编号 1~16),经中国中医科学院中药研究所王智民教授鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera*

japonica 的干燥花蕾或带初开的花,样品信息详见表 1。此外,从安徽亳州药材市场收集了 4 批山银花样品(编号 17~20),经中国中医科学院中药研究所王智民教授鉴定,样品 17 和 18 为忍冬科植物红腺忍冬 *L. hypoglauca* 的干燥花蕾或带初开的花,产地分别为湖北和云南,样品 19 和 20 为忍冬科植物灰毡毛忍冬 *L. macranthoides* 的干燥花蕾或带初开的花,

产地均为湖南。金银花总酚(质量分数 > 92%,以绿原酸计),总环烯醚萜(质量分数 > 87.5%,以断氧化马钱苷计)和总皂苷(质量分数 > 85.5%,以忍冬苦苷 A 计)等有效部位由课题组对金银花(九丰一号)进行渗漉提取后,采用大孔吸附树脂及聚酰胺树脂等对其进行多次分离纯化制备获得,为实验室自制样品。

表 1 金银花样品的信息

Table 1 Information of *Lonicerae Japonicae* Flos samples

No.	品种	采集地点	采集年度	干燥方式
1	大毛花	河南省新密市尖山乡巩密关村	2014	烘干
2	大毛花	江苏省连云港市东海县李埏林场金银花种植基地	2014	晒干
3	大毛花	山东省临沂市沂南县岸堤镇兴旺庄村	2014	烘干
4	鸡爪花	江苏省连云港市东海县李埏林场金银花种植基地	2014	晒干
5	鸡爪花	山东省临沂市平邑县郑城镇史家庄村	2015	晒干
6	鸡爪花	河南省新乡市封丘县陈固乡牛所村	2015	烘干
7	四季花	江苏省连云港市东海县李埏林场金银花种植基地	2014	晒干
8	四季花	山东省临沂市平邑县郑城镇史家庄村	2014	烘干
9	四季花	河南省新乡市长垣县康蒲中药材种植基地	2014	烘干
10	九丰一号	江苏省连云港市东海县李埏林场金银花种植基地	2014	晒干
11	九丰一号	山东省临沂市平邑县保太镇九丰一号种植基地	2014	烘干
12	九丰一号	山东省临沂市平邑县保太镇九丰一号种植基地	2015	烘干
13	野生品	河南省新密市尖山乡巩密关村	2014	晒干
14	野生品	河南省南阳市方城县拐河镇杨家岭村	2015	晒干
15	野生品	山东省泰安市新泰市石莱镇木厂峪村	2015	晒干
16	野生品	河南省新乡市封丘县黄德镇贾庄村	2015	晒干

注:样品 1~12 均为栽培品。

日本大耳白兔 1 只,雄性,体重 2.5 kg,普通级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2015-0001。实验中对动物的处理遵循相关动物使用伦理学原则。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 皂苷单体化合物溶液的制备 精密称取忍冬苦苷 A,忍冬苦苷 B,灰毡毛忍冬皂苷甲,灰毡毛忍冬皂苷乙,川续断皂苷乙和川续断皂苷 VI 适量,加二甲基亚砜 40 μL 超声助溶,加生理盐水分别制备成质量浓度为 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的单体化合物储备液;取储备液适量,加生理盐水分别稀释成质量浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,作为单体化合物的供试品溶液。

2.1.2 金银花有效部位溶液的制备 精密称取金银花总酚、总环烯醚萜和总皂苷有效部位适量,加二

甲基亚砜 40 μL 超声助溶,加生理盐水分别制备成质量浓度为 1.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的有效部位储备液;取储备液适量,加生理盐水分别稀释成质量浓度为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,作为金银花有效部位的供试品溶液。

2.1.3 金银花样品溶液的制备 取金银花药材粉末约 0.2 g(过四号筛),精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 35 kHz)30 min,放冷,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,精密量取上清液 5 mL,减压旋蒸至干,加入二甲基亚砜 40 μL 超声助溶,加生理盐水定容至 10 mL,得金银花样品储备液;取储备液适量,加生理盐水分别稀释成质量浓度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,作为金银花样品的供试品溶液。采用相同方法制备山银花样品的供试品溶液。

2.2 红细胞混悬液的制备^[10] 从家兔耳缘静脉取新鲜血液 20 mL, 置烧杯中, 用缠有少量脱脂棉的玻璃棒轻轻搅拌, 取出血液中的纤维蛋白, 制成脱纤血液, 加入约 10 倍量生理盐水, 摇匀, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃去上清液。按此方法重复 4~5 次, 洗至上清液呈无色透明, 将所得红细胞用生理盐水配制成压积为 1% 的红细胞混悬液, 置于 4 °C 冰箱中保存, 备用。

2.3 溶血率的测定 采用紫外-可见分光光度法测定。以生理盐水 2 mL 中加入兔红细胞混悬液 2 mL 为阴性组; 以水 2 mL 中加入兔红细胞混悬液 2 mL 为阳性组(渗透压的改变造成红细胞完全溶血); 以按照 2.1 项下供试品溶液制备方法制备的不同质量浓度的单体化合物溶液、金银花有效部位溶液及金银花样品溶液各 2 mL 分别加入兔红细胞混悬液 2 mL 作为样品组。将各组溶液轻轻振摇, 混合均匀, 置 (37 ± 0.5) °C 水浴中保温 3 h, 水浴完毕取出, 于 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液至比色皿中。以阴性组为空白, 采用比色法于 542 nm 下分别测定阳性组的吸光度 ($A_{\text{阳}}$) 和样品组的吸光度 ($A_{\text{样}}$), 按溶血率 = $A_{\text{样}}/A_{\text{阳}} \times 100\%$ 计算溶血率, 绘制各样品的溶血率-质量浓度曲线。

2.4 皂苷单体化合物的溶血作用 按 2.1.1 项下方法制备各皂苷单体化合物溶液, 按 2.3 项下方法测定各皂苷单体化合物在不同质量浓度下的溶血率, 绘制溶血率-质量浓度曲线, 见图 1, 2。由图 1 可知, 金银花中的主要皂苷单体忍冬苦苷 A 和忍冬苦苷 B 在 $0.1 \sim 1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 无溶血作用(质量浓度 $\leq 1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶血率 $\leq 2.23\%$)。由图 2 可知, 山银花中的主要皂苷单体灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙和川续断皂苷 VI 在 $0.1 \sim 1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 亦无溶血作用(质量浓度 $\leq 1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶血率 $\leq 2.39\%$)。有无溶血的判定方法参考《中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则》的判定标准, 即体外红细胞的溶血率 $> 5\%$ 表示有溶血作用; 溶血率 $\leq 5\%$ 表示没有溶血作用^[11]。此外, 灰毡毛忍冬皂苷乙的溶血率随着质量浓度的升高而增大, 当质量浓度为 $0.6\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶血率仅 2.2%; 质量浓度为 $0.8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶血率上升至 11.7%; 当质量浓度为 $1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶血率达到 50.4%。

2.5 金银花有效部位的溶血作用 按 2.1.2 项下方法制备金银花各有效部位溶液, 按照 2.3 项下方法测定各有效部位在不同质量浓度下的溶血率, 溶血率-质量浓度曲线见图 3。结果发现金银花各有

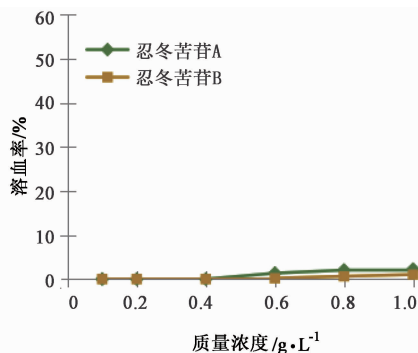


图 1 金银花中 2 种皂苷单体的溶血率-质量浓度曲线
Fig. 1 Hemolysis rates curves of two saponions from *Lonicerae Japonicae Flos*

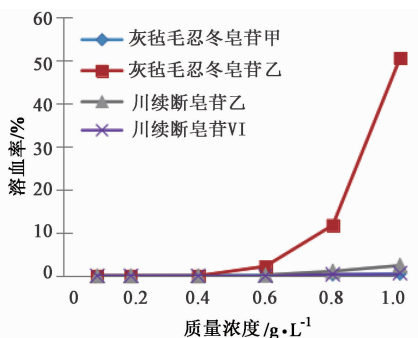


图 2 山银花中 4 种皂苷单体的溶血率-质量浓度曲线
Fig. 2 Hemolysis rates curves of four saponions from *Lonicerae Flos*

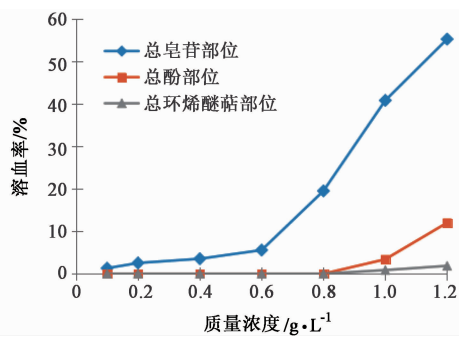


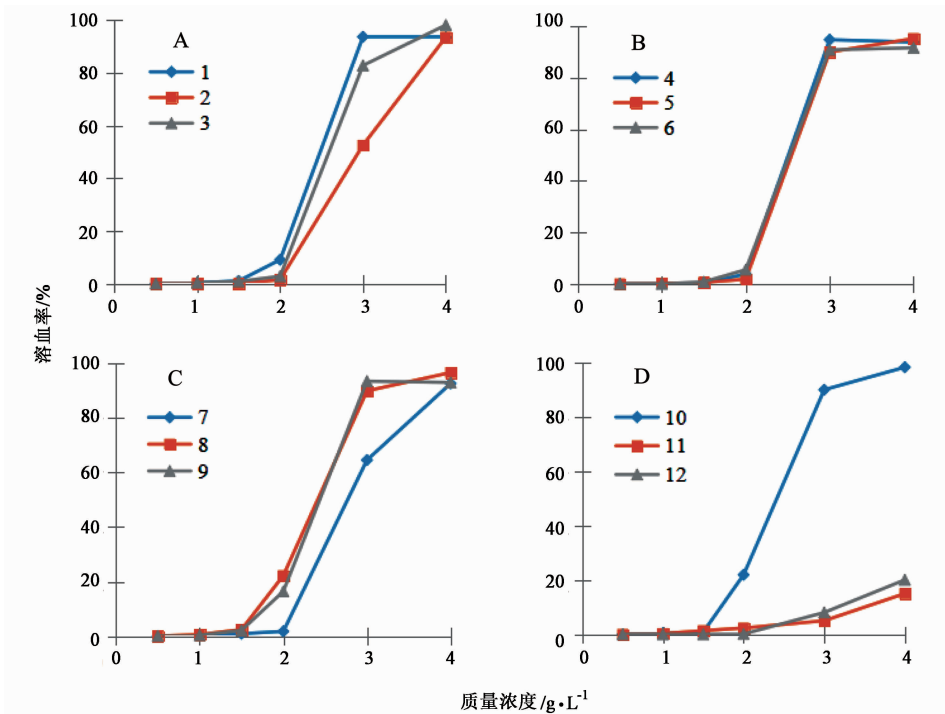
图 3 金银花各有效部位的溶血率-质量浓度曲线
Fig. 3 Hemolysis rates curves of active fractions from *Lonicerae Japonicae Flos*

效部位的体外红细胞溶血作用的大小依次为金银花总皂苷部位 $>$ 总酚部位 $>$ 总环烯醚萜部位。其中, 金银花总环烯醚萜部位没有溶血作用(质量浓度 $\leq 1.2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶血率 $\leq 1.86\%$); 当金银花总酚部位质量浓度 $< 1.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶血率 $\leq 3.4\%$, 表明没有溶血作用, 当质量浓度达到 $1.2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶血率 12.0%, 表现出较为明显的溶血作用; 金银花总皂苷部位对体外红细胞的溶血作用存在明显的剂量依存关系, 当质量浓度为 $0.6\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 溶血率 5.58%;

之后随着质量浓度的升高,其溶血率急剧增大,当质量浓度为 $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,溶血率达 55.3%。

2.6 金银花样品的溶血作用 以 2.1.3 项下方法制备金银花各样品溶液,按照 2.3 项下方法测定金银花样品在不同浓度下的溶血率,绘制溶血率-质量浓度曲线。金银花栽培品不同农艺品种的溶血率-质量浓度曲线见图 4,金银花野生品的溶血率-质量浓度曲线见图 5。结果发现金银花野生品与不同农艺品种的栽培品的溶血作用曲线基本保持一致,存在着明显的剂量依存关系。当样品溶液质量浓度 $\leq 1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不存在体外红细胞溶血现象;当样品溶液的质量浓度为 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,体外红细胞溶血现象开始显现,在质量浓度为 $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时溶血率急剧

增大,在质量浓度为 $4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,溶血作用基本达到平衡。金银花同一农艺品种的不同样品的溶血率-质量浓度曲线的变化规律基本保持一致,仅九丰一号的差别较大。产地为山东省平邑县的九丰一号金银花样品 11 和 12 的体外红细胞溶血作用相对较弱,当质量浓度 $\geq 3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,才产生溶血现象(溶血率 $> 5.0\%$),这可能与样品的产地及采收加工方式等因素有关。此外,还选择了具有代表性的山银花样品进行了体外红细胞溶血试验,结果见图 6。结果显示山银花的溶血率-质量浓度曲线的变化规律与金银花保持一致,质量浓度 $2.0 \sim 4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 是其溶血率急剧增大的突变区间。



A. 大毛花; B. 鸡爪花; C. 四季花; D. 九丰一号

图 4 金银花栽培品不同农艺品种的溶血率-质量浓度曲线

Fig. 4 Hemolysis rates curves of different cultivated samples of Lonicerae Japonicae Flos

3 讨论

3.1 试验条件的选择和优化 紫外-可见分光光度法测定体外红细胞的溶血率时,最大吸收波长的确定是其关键参数之一。本实验以 2.3 项下阴性组的溶血上清液为空白,对阳性组的溶血上清液于 $400 \sim 760 \text{ nm}$ 进行了光谱扫描,结果显示其最大吸收波长在 542 nm 和 575 nm 处。同时,2.1 项下各供试品溶液在该波长处均无干扰吸收。故选择 542 nm 作为溶血率的测定波长。

在制备供试品溶液时,发现皂苷单体化合物、金

银花各有效部位及金银花和山银花样品 70% 甲醇提取物在生理盐水中的溶解性较差。为了获得高质量浓度的供试品溶液进行溶血作用研究,需对其进行增溶,研究发现二甲基亚砜具有良好的增溶作用。为了获得良好的助溶效果并排除二甲基亚砜本身对溶血的影响,预试验考察了不同质量浓度的二甲基亚砜对红细胞的溶血作用。研究结果表明当二甲基亚砜体积分数在 $0.2\% \sim 2.0\%$ 时,其溶血 A 在 $0 \sim 0.007$,干扰吸收很小,可忽略不计。故选择 0.4% 作为各样品储备液中二甲基亚砜的体积分数,即可

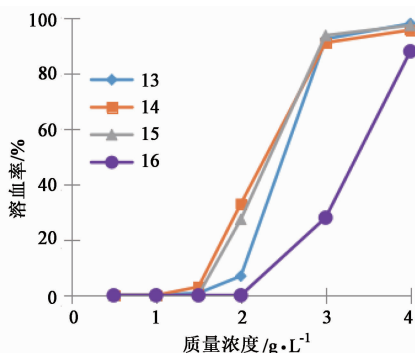


图 5 金银花野生品的溶血率-质量浓度曲线

Fig. 5 Hemolysis rates curves of wild samples of *Lonicerae Japonicae Flos*

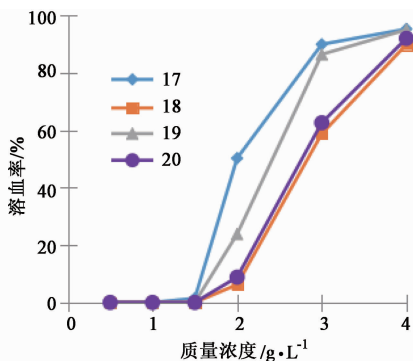


图 6 山银花的溶血率-质量浓度曲线

Fig. 6 Hemolysis rates curves of *Lonicerae Flos* samples

实现其增溶作用。

体外红细胞溶血过程中,水浴保温时间直接关系到是否达到了溶血平衡,是准确测定溶血率的关键参数之一,故本实验考察了水浴保温时间对溶血率的影响。按照 2.3 项下方法,水浴保温时间依次设置为 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 min, 分别测定了高、低质量浓度的金银花总皂苷部位 ($1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的溶血率。研究结果表明高、低质量浓度的金银花总皂苷部位的溶血率在水浴保温时间为 150 ~ 240 min 时,红细胞溶血趋于平衡和稳定,故选择水浴保温时间 180 min。

此外,本实验对高、低质量浓度的金银花总皂苷部位 ($1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 溶血后的上清液在 4 h 内 (0, 1, 2, 3, 4 h) 的稳定性进行了考察。研究结果显示高、低质量浓度的上清液,其 A 的 RSD 分别为 0.2% 和 1.4% ($n = 5$), 表明其稳定性良好,上清液可在 4 h 内进行 A 测定。

3.2 溶血结果分析 本研究采用 UV-VIS 测定了皂苷单体化合物、金银花有效部位及各金银花和山银花样品的溶血率-浓度曲线,并对其体外红细胞溶血作用进行了评价。

各类皂苷单体的溶血实验研究结果表明,金银花中的忍冬苦苷 A, 忍冬苦苷 B 和山银花中的灰毡毛忍冬皂苷甲、川续断皂苷乙、川续断皂苷 VI 均不具有溶血作用,山银花中的灰毡毛忍冬皂苷乙在质量浓度 $\leq 0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时没有溶血作用。汪宏锦等^[12]研究了灰毡毛忍冬花蕾提取物、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙在质量浓度 $\leq 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的体外红细胞溶血性,研究结果表明三者均未导致溶血,其研究结果与本实验保持一致。值得一提的是,本实验中采用二甲基亚砜助溶的方法,各单体皂苷用于体外溶血作用研究的质量浓度高达 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 是汪宏锦等^[12]研究的各皂苷单体质量浓度的 10 倍,可以更加深入全面地了解金银花和山银花所含皂苷单体的溶血性。此外,文献调研发现^[13],甾体皂苷中的偏诺皂苷和薯蓣皂苷在质量浓度分别为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.075 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时发生了溶血,其溶血作用较强。一般认为,皂苷的溶血是由于皂苷与红细胞壁上的胆固醇结合生成不溶性的分子复合物,破坏红细胞的渗透性而发生崩解^[14]。皂苷的溶血性与分子结构有较大关系,甾体皂苷比三萜皂苷更容易与胆固醇结合造成红细胞溶血。比如,以三萜皂苷为主的人参总皂苷没有溶血作用,但经分离后其中以原人参三醇及齐墩果酸为苷元的人参皂苷则具有溶血作用^[15]。这也许是忍冬苦苷 A, 忍冬苦苷 B, 灰毡毛忍冬皂苷甲, 川续断皂苷乙, 川续断皂苷 VI 和灰毡毛忍冬皂苷乙等三萜皂苷没有溶血作用或溶血作用较弱的原因。

金银花各有效部位的体外红细胞溶血作用的大小依次为金银花总皂苷部位 > 总酚部位 > 总环烯醚萜部位。其中,总环烯醚萜部位未导致溶血,总酚部位在质量浓度 $\leq 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时未发生溶血,总皂苷部位在质量浓度为 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时产生了微弱的溶血作用。总皂苷部位质量浓度 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当于生药质量浓度约 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 含金银花的中药注射液中,药物质量浓度不会达到如此之高,潜在的溶血风险较小。此外,本研究还对金银花和山银花的样品的溶血作用进行了比较研究,研究结果表明金银花野生品及栽培品与山银花的溶血率-浓度曲线的变化规律基本相同,二者的体外红细胞溶血作用无显著性差异。

总之,本实验从皂苷单体、有效部位及金银花和山银花样品 3 个层次,研究了金银花与山银花的体外溶血作用,探讨含皂苷类成分的金银花与山银花应用于中药注射剂时的潜在溶血风险。各类样品的溶血结果表明金银花与山银花中所含皂苷类成分

没有溶血作用或溶血作用较弱,临床应用时潜在的溶血风险较小。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 221.
- [2] 周凤琴, 李佳, 冉蓉, 等. 我国金银花主产区种质资源调查[J]. 现代中药研究与实践, 2010, 24(3): 21-25.
- [3] 蒋俊君, 叶红霞. 金银花良种选育研究现状与对策[J]. 浙江农业科学, 2013(12): 1590-1592, 1605.
- [4] 解世全, 王帅, 孟宪生, 等. 不同产地金银花质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 80-83.
- [5] 景恒翠, 翟庆梅, 曹倩. 金银花的药用成分及药理分析[J]. 河南中医, 2014, 34(9): 1839-1840.
- [6] 沈放, 杨黎江, 彭永芳, 等. 重楼皂苷类化合物溶血作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2280-2281.
- [7] 张国松, 封传华, 罗晓健, 等. 柴胡总皂苷提取物体外溶血作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 166-169.
- [8] 刘墨样, 于红艳, 黄樱, 等. 桔梗总皂苷与其总次皂苷溶血效应的比较研究[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 27(4): 26-28.
- [9] 程大任, 付锐, 窦德强, 等. 人参皂苷溶血及抗溶血作用研究[J]. 中国现代中药, 2007, 9(4): 19-23.
- [10] 杨广, 项峥, 康廷国, 等. 人参皂苷溶血测定的实验条件研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(6): 190-191.
- [11] 《中药、天然药物刺激性和溶血性研究的技术指导原则》课题研究组. 中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2004, 【Z】GPT4-1.
- [12] 汪宏锦, 王红玉, 何然, 等. 灰毡毛忍冬花蕾提取物及其两种主要皂苷的溶血性研究[J]. 中国药理通报, 2016, 32(1): 43-48.
- [13] 杨黎江, 沈放, 王德斌, 等. 抗重楼皂苷类化合物溶血作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 629-632, 651.
- [14] Banham A, Horne R W, Glauert A M, et al. Action of saponin on biological cell membranes[J]. Nature, 1962, 196(4858): 952-955.
- [15] 吴立军. 天然药物化学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 293.

【责任编辑 刘德文】