

结合化学与药效学指标优选参芪麝蓉丸的纯化工艺

周永全¹, 刘书芬^{2,3}, 张宁^{1*}, 王拥军^{2,3*}, 杜思邈¹

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032;
3. 上海中医药大学脊柱病研究所, 上海 200032)

[摘要] 目的: 优选参芪麝蓉方的纯化工艺条件。方法: 以黄芪甲苷含量为化学指标, 足趾肿胀率、脊髓损伤大鼠的 BBB 评分及病理切片为药效学指标, 通过大鼠足趾肿胀试验及脊髓损伤大鼠相关试验确定参芪麝蓉方水提液的纯化工艺。结果: 优化的纯化工艺为水提液浓缩后加乙醇至含醇量为 60%。结论: 化学指标与药效学指标筛选参芪麝蓉方水提液的纯化条件具有一致性, 为保证参芪麝蓉方的质量提供实验依据。

[关键词] 参芪麝蓉方; 纯化; 黄芪甲苷; 药效学指标; 脊髓型颈椎病动物模型

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0036-04

Optimization of Purification Technology for Shenqi Sherong Pills by Chemical and Pharmacodynamic Indicators

ZHOU Yong-quan¹, LIU Shu-fen^{2,3}, ZHANG Ning^{1*}, WANG Yong-jun^{2,3*}, DU Si-miao¹

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;
2. Longhua Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China;
3. Institute of Spinal, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology conditions of Shenqi Sherong prescription. **Method:** With the content of astragaloside IV as chemical index, while BBB score and pathological section of rats after spinal cord injured and toe swelling rate as pharmacodynamic indexes, purification technology of water extract from Shenqi Sherong prescription was optimized according to the above mentioned indexes. **Result:** Optimized purification conditions was as following: after concentrated, water extract was added alcohol until the alcohol content of 60%. **Conclusion:** Purification technologies for water extract of Shenqi Sherong prescription had consistency by screening chemical index and pharmacodynamics indexes, it could provide experimental basis for guaranteeing quality of Shenqi Sherong prescription.

[Key words] Shenqi Sherong prescription; purification; astragaloside IV; pharmacodynamic index; animal model of cervical spondylotic myelopathy

参芪麝蓉方系上海中医药大学附属龙华医院施杞教授治疗脊髓型颈椎病(CSM)的临床验方, 主要针对 CSM 的脾肾亏虚、筋脉失养、气虚血瘀等病因采用益气活血化瘀法进行治疗^[1], 长期临床应用表明该方可明显减轻病症、改善患者生活质量。参芪麝蓉方由 4 味中药组成, 黄芪为君药, 丹参、肉苁蓉为臣药。课题组前期研究已确定该方的提取方案为丹参醇提后的药渣并入黄芪、肉苁蓉中进行水提。本实验主要对水提取物进行纯化, 通过化学指标和药效学指标筛选纯化方法和条件, 以达到除杂和易

[收稿日期] 20121031(022)

[基金项目] 上海市科学技术委员会项目(09dZ1977200)

[第一作者] 周永全, 硕士, 从事中药新剂型与质量控制研究, Tel: 021-51322388, E-mail: zhouyongquan0111@126.com

[通讯作者] *张宁, 博士, 研究员, 从事中药新剂型与质量控制研究, Tel: 021-51322384, E-mail: ningzh18@126.com; *王拥军, 博士, 教授, 从事中医药防治椎间盘退变性疾病和骨代谢疾病的研究, Tel: 021-64286239, E-mail: yjwang8888@126.com

于成型的目的。

1 材料

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司), Thermo ODS-2 C₁₈ 色谱柱(上海安谱科学仪器有限公司), DK-S22 型水浴锅(上海精宏实验设备有限公司), FA-2004 及 JY-2002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), Centrifuge 5417R 型离心机(德国 Eppendorf), CM1900 型冰冻切片机(德国 Leica 公司), CFX96 C1000 Thermal cycler 实时荧光 PCR(美国 BIO-RAD 公司)。黄芪、丹参、肉苁蓉药材均购自上海康桥中药饮片公司,经上海中医药大学药学教研室可燕研究员鉴定,分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎,列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 的干燥带鳞叶的肉质茎。黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110781-200613),大鼠 PGE₂ 及 PLA₂ ELISA 试剂盒(Gbdeia 公司,批号分别为 P066-9, P205-9), TRIzol Reagent (Invitrogen™ 公司,批号 51941204)。

SD 大鼠, SPF 级, 体重(180~200)g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限责任公司, 许可证号 SCXK(沪)2008-0016。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷含量测定

2.1.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(34:66), 流速 1 mL·min⁻¹, ELSD 蒸发温度 45 °C, 柱温为室温。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取黄芪甲苷对照品适量, 加甲醇配制质量浓度 225 mg·L⁻¹ 的对照品溶液, 以该溶液为母液, 制备质量浓度分别为 112.5, 56.25, 28.13, 14.06, 7.031, 3.516 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液, 进样 40 μL, 按上述色谱条件测定, 得回归方程 $\ln Y = 1.5046 \ln X + 5.0263$ ($r = 0.999$), 线性范围 0.14~9.00 μg。

2.1.3 精密度试验 精密量取同一质量浓度的黄芪甲苷对照品溶液, 连续进样 6 次, 进样量 20 μL, 结果 RSD 1.37%, 表明仪器精密度良好。

2.2 化学指标筛选纯化工艺^[2] 以黄芪甲苷含量为指标, 分别采用不同体积分数乙醇沉淀法、离心法和澄清剂法进行去杂纯化处理。称取处方量药材, 按课题组前期确定的提取工艺制备水提液, 等分为 6 份[未纯化组、50% 醇沉组、60% 醇沉组、70% 醇沉

组、离心组(5 000 r·min⁻¹, 15 min)与 ZTC1 + 1 天然澄清剂(Ⅱ型)组], 分别按相应方法进行处理。取各组样液适量, 浓缩, 各取一定量加水饱和正丁醇萃取 5 次, 每次 40 mL, 收集、合并正丁醇层; 用氨试液洗涤 2 次, 每次 40 mL, 取正丁醇层, 回收溶剂至干, 残渣加 10 mL 甲醇溶解, 滤过, 取续滤液, 进行 HPLC 测定黄芪甲苷含量。结果黄芪甲苷得率分别为 0.711, 0.644, 0.669, 0.693, 0.451, 0.445 mg·g⁻¹; 表明天然澄清剂组的黄芪甲苷得率最低, 各乙醇沉淀组黄芪甲苷得率较高, 而随乙醇沉淀浓度的增加, 黄芪甲苷含量逐渐提高。

2.3 药效学指标筛选纯化工艺 按体重折算, 剂量相当于临床 70 kg 体重病人用量, 给药剂量按人与动物体表换算关系计算临床等效剂量。按课题组前期制定的提取工艺制得提取液, 适度回收溶剂后, 分为未纯化组、50% 醇沉组、60% 醇沉组、70% 醇沉组及中速离心组, 按相应纯化方法处理, 浓缩至 1 g·mL⁻¹。

2.3.1 大鼠足趾肿胀试验 颈椎病患者的脊髓、脊神经根等受压迫后会出现不同程度的炎症反应, 故采用足趾肿胀试验对药效进行初步考察。将 70 只大鼠(雌雄各半)随机分配至生理盐水组、阳性对照阿司匹林组、未纯化组、离心组、50% 醇沉组、60% 醇沉组、70% 醇沉组, 每组 10 只, 雌雄各半。各组灌胃给以相应药液, 每天 1 次, 连续 7 d。最后一次灌胃后 30 min 注射角叉菜胶致炎, 分别于 0(灌胃后、注射角叉菜胶前), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 h 测定足趾体积, 计算肿胀率, 结果见表 1。

由表 1 可知, 造模致炎 1 h 后, 各给药组肿胀率均比生理盐水组低, 且除离心组外, 各给药组与生理盐水组均有显著性差异, 其中以未纯化组效果最佳, 其次分别为阳性对照组及 60% 醇沉组。

2.3.2 脊髓损伤大鼠相关试验 CSM 的发病机制尚未完全明确, 发病过程为慢性进行性退变^[3-4], 且病程较长, 故至今尚无公认的 CSM 动物模型^[5-6]。本实验根据课题组相关专利与成果^[7], 设计了慢性脊髓压迫大鼠模型的制作过程。将 94 只 SD 雄性大鼠腹腔注射氯胺酮麻醉后, 暴露椎板, 以大鼠 C7 棘突为基准, 定位 C4 椎体, 开口后植入螺钉, 逐层缝合, 伤口涂抹红霉素、腹腔注射青霉素抗炎(最终成功造模 72 只)。将造模成功的大鼠喂养 1 个月随机分为 6 组(模型组、未纯化组、离心组、50% 醇沉组、60% 醇沉组、70% 醇沉组), 每组 10 只, 其余备用; 另设有麻醉后只作切割、缝合操作的假手术组,

表 1 参芪麝蓉方水提液的大鼠足趾肿胀试验($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	足趾肿胀率/%						
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	24 h
生理盐水	46.7 ± 20.3	59.1 ± 22.4	64.8 ± 25.8	77.6 ± 31.4	86.2 ± 28.8	73.2 ± 23.0	56.8 ± 16.3
阳性对照	20.5 ± 12.9 ²⁾	25.3 ± 13.1 ²⁾	33.5 ± 11.0 ²⁾	48.8 ± 18.4 ²⁾	40.5 ± 9.8 ²⁾	49.1 ± 15.8 ²⁾	28.1 ± 12.3 ²⁾
未纯化	11.7 ± 8.1 ²⁾	24.4 ± 13.5 ²⁾	23.8 ± 7.4 ²⁾	35.6 ± 12.3 ²⁾	33.9 ± 12.9 ²⁾	34.4 ± 16.4 ²⁾	23.5 ± 8.0 ²⁾
离心	44.7 ± 14.5	57.2 ± 21.8	61.6 ± 20.1	73.6 ± 30.4	60.8 ± 21.3 ²⁾	66.5 ± 19.1	30.8 ± 21.0 ²⁾
50% 醇沉	49.6 ± 13.6	44.6 ± 14.4 ¹⁾	45.6 ± 18.9 ¹⁾	58.8 ± 21.9 ¹⁾	61.6 ± 25.7 ²⁾	51.8 ± 20.2 ¹⁾	19.1 ± 15.8 ²⁾
60% 醇沉	36.6 ± 6.8	39.4 ± 12.0 ²⁾	37.6 ± 12.7 ²⁾	53.5 ± 9.6 ¹⁾	45.4 ± 10.1 ²⁾	46.0 ± 14.1 ²⁾	23.1 ± 17.2 ²⁾
70% 醇沉	46.3 ± 12.0	44.2 ± 16.5 ¹⁾	45.6 ± 15.5 ¹⁾	55.9 ± 16.8 ¹⁾	61.4 ± 22.2 ²⁾	50.7 ± 23.7 ¹⁾	19.0 ± 9.2 ²⁾

注:与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

各灌胃给以相应药液(假手术组、模型组均给生理盐水),每天 1 次,连续 30 d。

2.3.2.1 BBB 评分 大鼠脊髓损伤后会出现肢体蜷缩、不能负重与尾巴下垂等形态、动作异常,可据此作 BBB(Basso, Beattie, Bresnahan)评分对其疾病程度进行描述^[8]。脊髓损伤大鼠给药期间,每隔一周作一次 BBB 评分,结果见表 2。

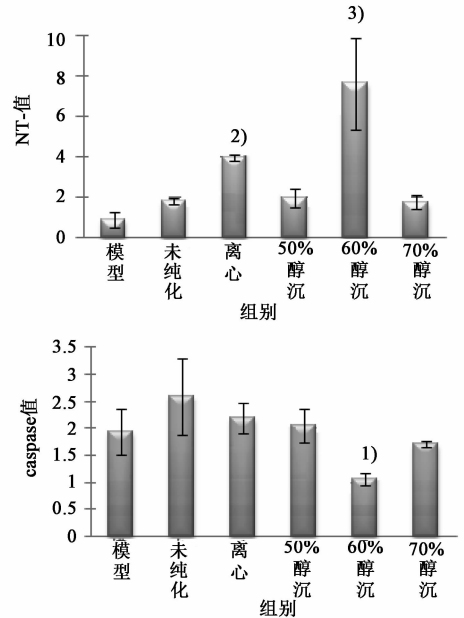
表 2 参芪麝蓉方水提液对大鼠脊髓损伤后 BBB 评分($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	足趾肿胀率/%			
	1 w	2 w	3 w	4 w
模型	15.43 ± 3.05	14.71 ± 2.87	14.57 ± 2.99	14.14 ± 2.67
未纯化	17.10 ± 1.20	17.30 ± 1.42 ²⁾	17.10 ± 1.45 ²⁾	17.20 ± 1.75 ²⁾
离心	16.70 ± 0.82	17.20 ± 0.63 ²⁾	17.00 ± 0.82 ²⁾	17.00 ± 0.67 ²⁾
50% 醇沉	17.44 ± 0.88 ¹⁾	17.56 ± 0.73 ²⁾	17.11 ± 0.33 ²⁾	17.22 ± 0.67 ²⁾
60% 醇沉	16.10 ± 0.99	17.00 ± 0.47 ²⁾	16.90 ± 0.57 ²⁾	17.10 ± 0.57 ²⁾
70% 醇沉	16.70 ± 1.25	16.80 ± 1.14 ²⁾	16.70 ± 0.95 ²⁾	16.70 ± 0.95 ²⁾
假手术	21.00 ± 0.00 ²⁾	21.00 ± 0.00 ²⁾	21.00 ± 0.00 ²⁾	21.00 ± 0.00 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

由表 2 可知,模型组给药期间的 BBB 评分呈下降趋势,各给药组则基本稳定;给药第一周,除假手术组外,其他各组间 BBB 评分差异基本无统计学意义,而两周后,各给药组的 BBB 评分均明显高于模型组,但一直低于假手术组,且各给药组间差异较小。

2.3.2.2 大鼠脊髓组织中 NT-3 和 caspase-3 神经 营营养素-3(NT-3)是近年发现的相对分子量 13.6 kD 的碱性蛋白质,可促进神经细胞分裂、再生,但 NT-3 在组织含量微小,NT-3 的 mRNA 则广泛分布于鼠脑中^[9];天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)被激活后可水解相应的靶蛋白、诱导程序性细胞凋亡^[10]。上述各组大鼠于最后 1 次灌胃给药后 1 h 麻醉,处死,取颈段脊髓组织,提取总 RNA 后进行逆转录反应,再加入 TAq 酶、上下游引物、模板 cDNA 等进行荧光定量 PCR 反应,测定,以各组测得数值与假手术组数值的差值为该组测定结果进行比较,结果见图 1。

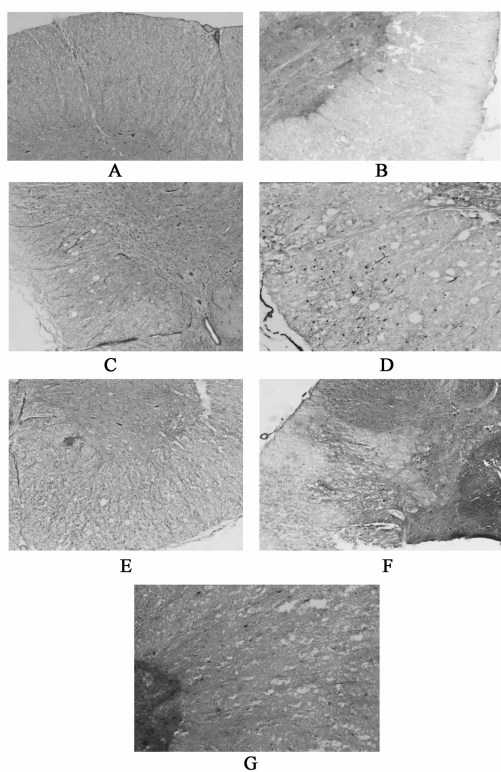


与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$
图 1 参芪麝蓉方水提液对脊髓损伤大鼠的 NT-3 及 caspase-3 表达情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

由图 1 可知,各给药组 NT-3 的表达均高于模型组,且离心组和 60% 醇沉组与模型组的差别具有统计学意义;60% 醇沉组和 70% 醇沉组的 caspase 表达低于模型组,且仅有前者与模型组的差别具有统计学意义,其他各组与模型组均无显著性差异。

2.3.2.3 大鼠脊髓组织病理切片观察 取上述各假手术组、造模组大鼠脊髓组织,制备 HE 染色冰冻切片,于电镜下检视,结果见图 2。

由图 2 可知,假手术组灰质前角中神经元细胞核大而少、白质中神经束均匀有序,未纯化组与假手术组相近;模型组灰质前角中神经元细胞核明显变小、增多,部分核周围已有空洞,白质中神经束紊乱、轴突变粗,且有炎症细胞浸润,离心组与模型组相近;各醇沉组前角中神经元细胞核有所减小、增多,神经束也有所增粗或紊乱,但优于模型组、离心组,而比假手术组、未纯化组差。



A. 假手术组($\times 100$); B. 未纯化组($\times 100$);
C. 模型组($\times 100$); D. 离心组($\times 200$);
E. 50%醇沉组($\times 200$); F. 60%醇沉组($\times 200$);
G. 70%醇沉组($\times 200$)

图2 参芪麝蓉方水提液各组的大鼠脊髓组织病理切片

综合上述化学和药效学指标考察结果,确定纯化工艺为采用醇沉法,加乙醇至醇体积分数60%。

3 讨论

新型分离纯化技术有高速逆流色谱、分子蒸馏、絮凝沉淀、膜分离、大孔树脂吸附等,这些新型纯化技术越来越广泛地应用于中药及其复方制剂的纯化,但在工业生产中应用较为广泛的仍是乙醇沉淀法、离心法、大孔树脂吸附法等少数几种,且尤以前两者应用最多。

中药的化学成分组成较为复杂,且成分的有机组合不同于单独各成分的简单相加,这使得其作用机制难以确定,单一的有效成分很难代表复方制剂的功效^[11]。若纯化方法和条件确定时,根据该方的功能主治选择一些相关的药效学指标进行综合评价,对保证制剂的有效性更为直观,如郑琴等^[12]以阿魏酸含量测定与小鼠镇痛、镇静试验相结合的方法,验证提取纯化工艺。在实际研究中,化学与药效学指标的研究结果可能相互矛盾,故应选择能综合代表处方功能的药效学试验结果。本实验中选取黄

芪甲苷作为化学评价指标进行工艺筛选;选取脊髓损伤大鼠的 BBB 评分、神经营养因子 NT-3 与可诱导细胞凋亡的 caspase-3 等蛋白的 RNA 表达、脊髓组织病理切片为药效学指标,分别从模型动物的整体形态动作、分子生物学、局部形态学 3 个角度进行考察,同时与足趾肿胀炎症试验相结合进行综合评价;结果本实验中化学指标与药效学指标结果保持一致,这为制剂纯化工艺条件的选定提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 胡劲松. 施杞教授治疗颈椎病经验[J]. 中医正骨, 2004,16(5):59.
- [2] 万德光,裴瑾. 试论中药提取物的产业化趋势[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2002,4(6):47.
- [3] Morishita Y, Naito M, Hymanson H, et al. The relationship between the cervical spinal canal diameter and the pathological changes in the cervical spine[J]. Eur Spine J,2009,18(6):877.
- [4] 王勤俭,杨豪,杜旭召. 针灸、推拿结合神经生长因子治疗脊髓型颈椎病[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(7):26.
- [5] 陈智,魏显招,沈洪兴. 脊髓型颈椎病动物模型的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志,2010,18(21):1784.
- [6] 周涛. 慢性颈脊髓压迫大鼠脊髓病理变化的研究[D]. 天津:天津医科大学,2011.
- [7] 胡志俊,卞琴,王拥军,等. 大鼠脊髓慢性压迫性损伤动物模型的建立[C]. 中国针灸学会经筋诊治专业委员会学术年会暨第二届中华经筋医学论坛论文集. 北京,2010:107.
- [8] 刘丽霞. 针刺对大鼠脊髓损伤的疗效观察及机理研究[D]. 南京:南京中医药大学,2011.
- [9] 陈昌杰,何蕴韶. NT-3 基因克隆与表达[J]. 中国临床解剖杂志,2002,20(1):58.
- [10] 何静春,刑沈阳,李峰,等. 颈椎稳定性异常对老龄小鼠脑海马 caspase-3 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(11):2155.
- [11] 郑林,黄勇,兰燕宇. 化学指标结合药效学指标优选紫金透骨喷雾剂提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):26.
- [12] 郑琴,伍振峰,邱玲玲,等. 大川芎方中川芎提取纯化工艺及其镇静镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):26.

[责任编辑 全燕]