

## 柴芩水提液退热有效部位的研究

杨江萍, 高增平, 谢鸣\*

(北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的: 比较分离的柴胡-黄芩水提液各有效部位对脂多糖诱导的发热小鼠模型的退热影响。方法: 柴胡-黄芩水提液经 AB-8 型大孔树脂柱净化, 依次用水, 20%, 40%, 60% 和 90% 乙醇梯度洗脱, 通过化学反应检识, 合并组成相近的流份得到 4 个部位; 观察各部位对脂多糖诱导的小鼠发热模型的退热作用。结果: 柴胡-黄芩水提液经分离得到的 4 个部位分别为糖类(A)、皂苷类(B)、皂苷及黄酮苷类(C)、黄酮苷元及皂苷元(D); 4 个部位均具有不同程度的退热作用( $P < 0.05$ ), 其中以 D 部位的退热作用最好( $P < 0.01$ )。结论: 柴胡-黄芩水提液退热作用涉及多个部位。

**[关键词]** 柴胡-黄芩; 水提液; 退热; 有效部位

**[中图分类号]** R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0131-04

## Study on Antifebrile Parts for Chaiqin Decoction

YANG Jiang-ping, GAO Zeng-ping, XIE Ming\*

(Beijing university of Chinese medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study was designed to evaluate the effect of the antipyretic effective fraction from the decoction of *Bupleurum chinese* and *Scutellaria baicalensis* in fever model mice induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** Four fractions were obtained by using AB-8 macroporous resin column to purify the decoction of *B. chinese* and *S. baicalensis*. Through chemical reactions to identify the major types of components, the flow of a merger similar gain four parts. Then the anus temperature of mice was tested to observe

**[收稿日期]** 20120309(005)

**[第一作者]** 杨江萍, 讲师, 在读博士, 从事方剂效应及物质基础的研究

**[通讯作者]** \* 谢鸣, 教授, 博士生导师, 从事方剂学基础与运用研究, Tel: 010-64286992, E-mail: xieming603@263.net

min), 且纯度相对较高(98%), 从 HPLC 鉴定结果看, 流动相选择甲醇-水(58:42)亦可以达到分离要求, 高速逆流色谱技术的应用为白鲜皮中单体成分的高效分离制备提供了一条新的技术路线。

二甲苯致小鼠耳廓肿胀及小鼠腹腔毛细血管渗透是常用的急性炎症模型, 主要表现为局部的充血、水肿及毛细血管通透性等病理反应, 是研究药物抗炎的常见模型。对于待试物的抗炎活性的动物模型效果显示, 白鲜皮粗提物、白鲜碱能够显著降低二甲苯致小鼠耳廓肿胀程度, 说明其具有明显的抗炎作用, 但是在抑制醋酸致小鼠腹腔毛细血管渗透性增高方面, 高剂量有抑制的趋势, 低剂量效果不明显, 需要进一步重复及验证, 以确定抗炎效果。

### [参考文献]

- [1] 李翔, 汤华钊, 苟小军, 等. 白鲜皮的化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 32(12): 1816.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 265.
- [3] 王蓉, 徐强, 徐丽华. 白鲜皮的免疫药理研究[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(4): 234.
- [4] 李静晖, 睢大策, 马文丽, 等. 白鲜皮粗多糖对大鼠 LPO 和 SOD 的影响[J]. 长春医学院学报, 1995, 11(5): 72.
- [5] 张玲, 李云涛, 王丽娜, 等. HPLC 法测定白鲜皮中白鲜碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 8.
- [6] Ito Y, Conway W D. High speed countercurrent chromatography[M]. New York: John Wiley, 1996.

[责任编辑 邹晓翠]

the antifebrile action of every fraction and compare to the fever model mice induced by LPS. **Result:** The four fractions, A (polysaccharides), B (saponins), C (saponins and flavonoids), D (flavonoids and aglycones of saponins), purified by AB-8 macroporous resin, all can reduce the temperature of fever mice ( $P < 0.05$ ), and different fraction have different levels. Fraction D showed the best effective on antifebrile action ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** the decoction of *B. chinese* and *S. baicalensis* involved more than one effect of the fever effective fractions.

[**Key words**] *B. chinese-S. baicalensis*; decoction; antipyretic effect; effective fraction

柴胡-黄芩是经典名方小柴胡汤和解少阳的核心药对,以透邪清热为其效用特点,是中医临床发热病证治疗组方的常用配伍。之前,有实验研究表明,柴胡-黄芩配伍的水煎液具有退热、抗炎、免疫调节、保肝、利胆、镇静等多种药理作用<sup>[1-2]</sup>。本文基于该药对水提液的退热效用,采用大孔树脂法对其水提液进行初步分离,并通过观察了各部位的退热效用,以探讨水提液解热作用的有效部位及作用特点。

## 1 材料

**1.1 动物** NIH 小鼠,25 ~ 30 g,购自北京生物制品检定所,动物合格证号 0200152。

**1.2 药品与试剂** 柴胡(为伞形科植物柴胡 *Bupleurum Chinense* DC. 的干燥根)、黄芩(为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根),购自北京同仁堂药店。脂多糖 (*Escherichia coli* endotoxin O<sub>55</sub>B<sub>5</sub>, L2880, LPS), Sigma 公司;盐酸、氢氧化钠、浓硫酸、镁粉、醋酸酐均为分析纯。

**1.3 仪器** 电子控温水浴锅(北京永光医疗仪器厂);MC-3B 型电脑数字温度计,欧姆龙(大连有限公司生产);AB-8 大孔树脂(天津南开大学化工厂生产)使用前按说明书进行洗脱净化处理。

## 2 方法

### 2.1 柴胡-黄芩水煎液及各部位分离

**2.1.1 柴胡-黄芩水提液的制备** 柴胡-黄芩饮片按照第五版《方剂学》教材原方中的比例(4:3)配伍,加药材 5 倍体积冷水浸泡 30 min,加热微沸煎煮 30 min,倾出药液;残渣加 3 倍体积水微沸 30 min,合并先后 2 次的煎煮液,脱脂棉过滤 2 次,浓缩成含生药 1 g·mL<sup>-1</sup>,备用。

**2.1.2 水提液的大孔吸附树脂柱分离** 1 g·mL<sup>-1</sup> 的柴芩水提浓缩液上 AB-8 大孔树脂柱  $\Phi$ :h 即径高比为 1:10 以上,依次用水和 20%,40%,60%,90% 乙醇梯度洗脱,共收集 14 个流份,经化学反应检视,合并相同流份,得到 A,B,C,D 共 4 个部位。

**2.2 大孔树脂柱各洗脱流份的检视** Molish 反应:取样品液 1 mL,加 5%  $\alpha$ -萘酚乙醇 1 ~ 3 滴,摇匀后

沿试管壁缓缓加入浓硫酸,观察两液间颜色。盐酸-镁粉反应:取样品液 1 mL 中,加适量镁粉振摇,然后加几滴浓盐酸,1 ~ 2 min 内(必要时微热)观察其泡沫颜色。醋酐-浓硫酸(Liebermann-Burchard)反应:在白瓷板上将样品溶液吹干,加数滴醋酐溶解,滴入浓硫酸,观察颜色变化。泡沫试验:取检品的水溶液 2 mL 于带塞试管中,用力振摇 3 min,即产生持久性蜂窝状泡沫(维持 15 min 以上),且泡沫量不少于液体体积的 1/3,则为阳性。

**2.3 动物模型复制与分组处理** 小鼠于 23 °C 左右室温下适应性饲养 3 ~ 5 d,第 4,5 天每日早、晚各测体温(肛温)1 次。取肛温的平均值作为基础体温,选用体温波动范围不超过 38.0 °C,且 2 次测体温波动均不超过 0.4 °C 的小鼠。

试验 1:将符合要求的小鼠随机分为正常组、模型组、柴芩水煎液组、柴芩水煎液分离各部位合并组(简称柴芩分离合并组)共 4 组,每组 11 只。后 3 组小鼠按 200 mg·g<sup>-1</sup> 剂量腹腔注射质量浓度为 60 mg·L<sup>-1</sup> 的 LPS 生理盐水溶液诱导发热模型,正常组注射同体积生理盐水。造模同时,给药组小鼠分别给予柴芩水煎液和柴芩分离各部位合并液(剂量均为相当于原药材 10 g·kg<sup>-1</sup> 体重)灌胃,正常组和模型组给予同体积的生理盐水。分别测定腹腔注射后 0,30,60,120,180,240,330 min 时各组小鼠肛温和各时间点的体温差值  $\Delta T$ (实测肛温 - 初始肛温)。

试验 2,将梯度洗脱的各流份合并为 4 个部位即 A,B,C,D,分别配制成每 mL 含生药 1 g 的浓度。小鼠随机分为正常对照、发热模型、柴-芩 A、柴-芩 B、柴-芩 C、柴-芩 D、柴-芩 ABCD 共 7 组,每组 10 只。造模及给药处理同试验 1,分别测定腹腔注射后 60,180 min 时各组小鼠肛温。

**2.4 统计学方法** 应用 SPSS 17.0 for windows 统计软件分析数据,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行 LSD-*t* 检验,多组间比较用 *q* 检验;非正态分布资料采用非参数统计分析。所得数据结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示。

### 3 结果

**3.1 柴芩水煎液与洗脱合并液的退热作用** 结果见表1。由表1可看出,与正常组比较,自30 min后模型组小鼠各时间点肛温均显著性升高( $P < 0.05$ );与模型组相比,柴芩水煎液组与柴芩洗脱合

并液组30 min后的各时间点小鼠肛温均显著性降低( $P < 0.05$ )。与柴芩水煎液组相比,柴芩洗脱合并液组30 min时的小鼠肛温显著性降低( $P < 0.05$ ),其余各时间点的肛温变化无明显差异。

表1 柴芩水煎液与洗脱合并液对LPS诱导的发热小鼠 $\Delta T$ 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	330 min
正常	-	0.43 ± 0.19	0.13 ± 0.16 <sup>2)</sup>	-0.07 ± 0.19 <sup>2)</sup>	0.11 ± 0.18 <sup>2)</sup>	-0.15 ± 0.20 <sup>2)</sup>	0.06 ± 0.23 <sup>2)</sup>
模型	-	0.40 ± 0.24	0.93 ± 0.38 <sup>1)</sup>	0.64 ± 0.27 <sup>1)</sup>	1.1 ± 0.42 <sup>1)</sup>	0.6 ± 0.24 <sup>1)</sup>	0.96 ± 0.34 <sup>1)</sup>
柴芩水煎液	10	0.33 ± 0.18	-0.28 ± 0.14 <sup>2)</sup>	-0.51 ± 0.17 <sup>2)</sup>	-0.19 ± 0.24 <sup>2)</sup>	-0.45 ± 0.15 <sup>2)</sup>	-0.22 ± 0.19 <sup>2)</sup>
柴芩洗脱合并液	10	0.25 ± 0.13 <sup>2,3)</sup>	-0.35 ± 0.17 <sup>2)</sup>	-0.63 ± 0.28 <sup>2)</sup>	-0.27 ± 0.35 <sup>2)</sup>	-0.38 ± 0.21 <sup>2)</sup>	-0.17 ± 0.15 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与柴芩水煎液组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2 各洗脱流份的化学反应检识** 各流份的检识结果,分别合并1,2,3号收集液为A部位,4,5号收集液为B部位;6,7,8,9号收集液为C部位;10,11,

12号收集液为D部位。其中A主要为糖类,B为皂苷类,C为皂苷+黄酮苷类,D为黄酮苷元+皂苷元类。见表2。

表2 各洗脱流份的化学反应检识

试剂	显色结果	去离子水洗脱部分			20%乙醇洗脱部分		40%乙醇洗脱部分			60%乙醇洗脱部分			90%乙醇洗脱部分		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Molish反应	紫环	卅	卅	+	卅	卅	卅	+	+	+	-	-	-	-	-
HCL-镁粉反应	紫红或红	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
醋酐-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 反应	紫红或紫	-	-	-	卅	卅	-	卅	+	卅	+	-	+	-	-
泡沫试验	泡沫	+	-	-	卅	卅	卅	卅	+	+	-	-	-	-	-

注:卅为深紫红色,卅为紫红色,+为浅紫红色

**3.3 柴-芩水提液分离所得各部位的退热作用** 结果见表3。由表3可以看出,与正常组比较,模型组小鼠2个观测点的肛温均显著性升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,各给药组小鼠2个观测点的肛温均显著性降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

表3 柴芩水提液不同部位对LPS诱导的发热小鼠 $\Delta T$ 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	60 min	180 min
正常对照	-0.18 ± 0.13 <sup>2)</sup>	-0.30 ± 0.08 <sup>2)</sup>
发热模型	1.35 ± 0.39 <sup>1)</sup>	1.52 ± 0.52 <sup>1)</sup>
柴-芩A	0.59 ± 0.15 <sup>2,4)</sup>	0.59 ± 0.24 <sup>2,4)</sup>
柴-芩B	-0.59 ± 0.10 <sup>2,3)</sup>	-0.68 ± 0.24 <sup>2,3)</sup>
柴-芩C	-0.80 ± 0.27 <sup>2,3)</sup>	-0.74 ± 0.29 <sup>2,3)</sup>
柴-芩D	-0.84 ± 0.21 <sup>2,3,4)</sup>	-1.10 ± 0.27 <sup>2,3,4,5)</sup>
柴-芩ABCD	-0.53 ± 0.18 <sup>2,3,5,7)</sup>	-0.89 ± 0.31 <sup>2,3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与柴-芩A组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与柴-芩B组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ;与柴-芩C组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ ;与柴-芩D组比较<sup>7)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 4 讨论

方剂有效部位通常是指复方某一特定药效条件下与药效密切关联的化学部位。由于中医方剂临床上主要以汤药的形式运用,因此在确认汤药有效的基础上,探查其中与药效密切关联的部位或组分对于理解方剂效用物质可能更有意义。之前的研究表明,柴胡-黄芩配伍的水提液具有显著的退热作用,本文则是对柴胡-黄芩水提液中有效退热部分的考察。

鉴于柴胡和黄芩药材中含有多类成分,实验中选用了AB-8型大孔吸附树脂对水提液进行分离。由于分离洗脱过程中可能存在有效物质的丢失,故实验中首先比较了原水提液与经过大孔树脂柱纯化的洗脱合并液的退热效应,结果表明水提液与其洗脱合并液退热作用相当,故认为分离过程中没有有效物质丢失,药效意义上所得洗脱合并液与水提液基本一致。

本研究通过对水煎液大孔树脂柱净化、梯度洗脱所得各流份的检识以了解分离的效果及各流份所含的大体化学类别。在合并相关流份得到 4 个部位中, A 部位(1, 2, 3 号)主要是来自含柴胡和黄芩的糖类; B 部位(4, 5 号)主要是来自柴胡的三萜皂苷类; C 部位(6, 7, 8, 9 号)主要是黄酮类化合物及少量柴胡皂苷类成分; D 部位(10, 11, 12 号)主要含皂苷元、黄酮苷元等。13, 14 号收集液各化学反应为阴性, 舍弃不用。

实验结果显示, A, B, C, D 各部位对发热小鼠模型均显示不同程度的退热作用, 但其中的柴-芩 C 和柴-芩 D 组较柴-芩 ABCD 合并组的退热效果好, 提示各部位在配伍上可能存在拮抗作用。已知柴-芩水提液中的 B, C, D 部位主要涉及柴胡总皂苷、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷元、柴胡黄酮、黄芩苷、黄芩素、黄芩苷元等多种化学成分, 其各自的退热作用曾被一些研究<sup>[3-10]</sup>所证实, 但多糖类 A 部位的解热作用之前并未见报道。

采用石油醚、醇沉、聚酰胺柱的水、醇洗脱及水饱和正丁醇萃取的方法从柴芩水提液中分离得到挥发油、多糖、黄酮、皂苷及剩余混合物多个部分, 正交试验结果显示挥发油、黄酮为退热的有效部分, 并与皂苷部分配伍显示拮抗作用, 其中单一多糖部分无退热作用<sup>[11]</sup>。但本次发现柴芩水提液中的多糖部分有一定的退热作用, 提示两种不同分离方法获得的部位可能存在成分上的差异。曾有研究发现柴胡皂苷元具有良好的解热作用<sup>[12]</sup>, 在本实验的各给药组中, 柴-芩 D 部位不仅退热作用较好, 起效也较快, 可能与其所含柴胡皂苷元有关。

小结: 柴芩水提液经树脂洗脱分离获得 A, B, C, D 部位均具有一定的退热作用, 其中 D 部位退热作用最优, 且显著优于 A, B, C, D 合并。结果表明, 该水提液中的退热有效物质涉及多个部位, 其各部

位之间可能存在包括拮抗在内的复杂配伍关系, 有待进一步研究。本结果还提示, 在不清楚复方化学部位或成分与复方效应关系的情况下, 以其中所谓的有效部位为切入来研究复方的效应物质基础的思路可能与实际不符。

### [参考文献]

- [1] 王春华, 张爱丽. 小柴胡汤的药理研究现状[J]. 中成药, 1997, 19(2): 47.
- [2] 谢鸣. 中医方剂现代研究[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 182.
- [3] 孟庆刚, 王微, 李强. 黄芩解热作用的谱效关系研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(6): 379.
- [4] 白宗利, 王岩, 贾天柱. 柴胡的药理作用研究进展[C]. 中华中医药学会四大怀药与地道药材研究论坛暨中药炮制分会第二届第五次学术会议与第三届会员代表大会论文集, 2007: 287.
- [5] 薛燕, 白金叶. 柴胡解热成分的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(1): 11.
- [6] 刘云海, 陈永顺, 谢委, 等. 柴胡总皂苷抗内毒素活性研究[J]. 中药材, 2003, 26(6): 423.
- [7] 张廷模. 临床中药学[M]. 上海: 上海科技出版社, 2006: 101.
- [8] 徐珊, 孟庆刚. 黄芩提取物解热作用及机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(6): 1179.
- [9] 李仪奎. 中药药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1992: 44.
- [10] 尹华熙, 白筱璐, 邓文龙. 黄芩的解热作用研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(6): 51.
- [11] 高琳, 白晶, 刘迪谦. 柴胡-黄芩水煎液中不同化学成分群配伍与其解热作用相关性研究[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(11): 760.
- [12] 薛燕. 柴胡的解热作用药效学研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21(11): 1897.

[责任编辑 邹晓翠]