

表4 试验各阶段家兔体重变化 /kg

组别	攻毒前 平均体重	攻毒后 平均体重	灌服药物 第1天平均体重	灌服药物 第3天平均体重	灌服药物 第5天后平均体重
1	1.940	1.935	1.930	1.900	1.925
2	2.050	1.790	1.780(死亡2只)	死亡	
3	1.730	1.440	1.475(死亡1只)	1.465	1.480
4	1.855	1.640	1.625	1.610	1.630
5	1.755	1.520	1.500	1.480(死亡2只)	死亡
6	1.905	1.680	1.550(死亡)	死亡	
7	1.875	1.650	1.510(死亡1只)	死亡	

参考文献:

- [1] 刘瑛心,杨喜林,姚育英,等. 沙漠植物志 [M]. 北京:科学出版社,1943:361
- [2] 王选东,李树伟,陶大勇,等. 盐穗木化学成分抑菌作用研究 [J]. 内蒙古中医药,2005,25(4):28-30
- [3] 陶大勇,应璐,任述强,等. 塔里木盆地36种植物对大

- 肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌试验 [J]. 中兽医医药杂志,2005,24(5):23-25
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理学实验方法 [M]. 北京:人民卫生出版社,2002
- [5] 韩文瑜,何昭阳,刘玉斌,等. 病原细菌检验技术 [M]. 长春:吉林科学技术出版社,1999:53-56

金银花、连翘药对配伍对其主要成分含量的影响

陈敏,吴俊伟

(西南大学荣昌校区,重庆荣昌 402460)

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 1000-6354(2009)03-0029-04

金银花,别名银花、双花、二花,为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、红腺忍冬 *Lonicera rehmannii* Miq.、山银花 *Lonicera confusa* DC.的花蕾。连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* 的干燥果实,主产于山西、河南、陕西、山东^[1]。金银花气味芳香,味甘、寒,清热解毒,既可清风温之热,又可解血中之毒,性平稳而功显著,偏于上半身之热;连翘轻清而浮,善清心而去上焦诸热,散结消肿而治疮,便于透达全身之热。二药配伍,并走于上,轻清升浮宣散,清气凉血,清热解毒功效倍增,流通气血以消肿散结止痛^[2]。二药配伍之功效与二者单用有异同,且银翘药对是临床上公认的常用药对,阐明银翘药对的物质基础有助于很多含银翘药对的复方研究。笔者等利用 RP-HPLC 对金银花和连翘的单味提取液、单味合并液及混合液 4 个供试品进行分析。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪:2695 分离与自动进样系统,2487 紫外检测器,在线真空脱气机,柱温箱,Em-power 2 色谱工作站,美国 Waters 公司;电子天平 BP211D 型,德国 Sartorius 公司;98-1-B 型电子调温电热套,天津市泰斯特

仪器有限公司;RE-52AA 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;DL-1005 型低温冷却液循环机(泵),上海比朗仪器有限公司。

1.2 试剂

绿原酸、咖啡酸、连翘苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110753-200613、110885-200702、110821-200610,纯度 ≥ 98%);乙腈、甲醇为色谱纯(Fisher 公司);水为重蒸水,自制;乙酸为分析纯,天津市博迪化工有限公司;金银花、连翘药材均购自重庆荣昌石家药房。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Synergi(250 mm × 4.60 mm, 4 μm);流速:1.0 mL/min,检测波长:绿原酸、咖啡酸 327 nm,连翘苷 280 nm;柱温:30℃;进样体积:20 μL;流动相:A 甲醇-B 乙腈-C 水(0.24%乙酸);系统梯度洗脱:0 min 4%A+6%B,15 min 12%B,30 min 45%B;32 min 4%A+6%B,分析时间:40 min。按上述色谱条件,可使供试品中大部分色谱峰得到充分分离且峰型较好,见图 1-10。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、咖啡酸、连翘苷对照品适量,以甲醇制成浓度为 0.633 mg/mL、0.288 mg/mL、0.358 mg/mL 的对照品溶液。混合对照品溶液制备:取上述绿原酸对照品溶液 3 mL、咖啡酸 1 mL、连翘苷 3 mL 于 25 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度。

收稿日期:2008-12-09

作者简介:陈敏(1982-),男,在读硕士研究生,研究方向:兽医药理与毒理学,E-mail:op010707@163.com。通讯作者:吴俊伟,E-mail:wjw999@163.com

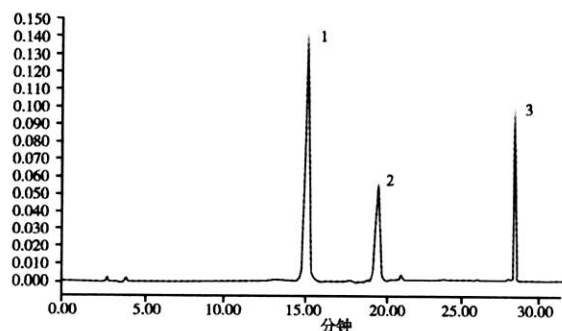


图1 连翘苷、绿原酸、咖啡酸对照品图谱($\lambda = 280 \text{ nm}$)

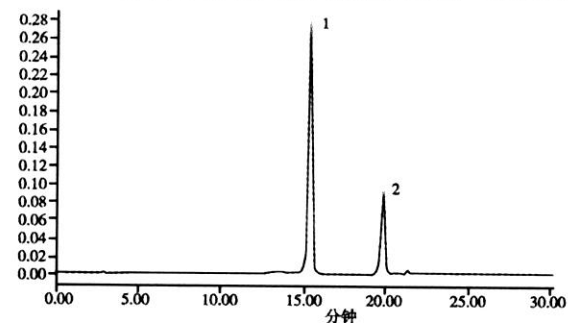


图2 绿原酸、咖啡酸对照品图谱($\lambda = 327 \text{ nm}$)

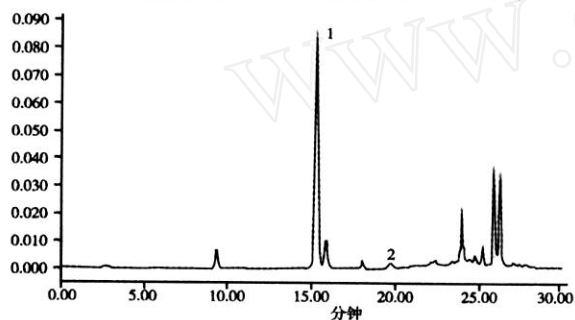


图3 金银花单味提取液图谱($\lambda = 327 \text{ nm}$)

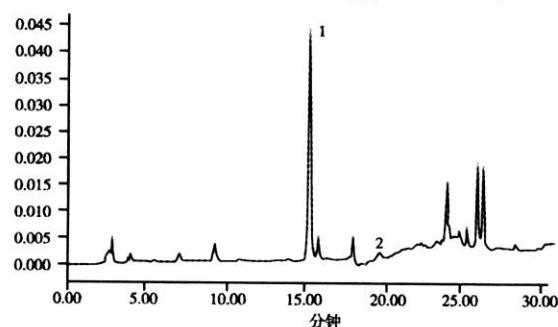


图4 金银花单味提取液图谱($\lambda = 280 \text{ nm}$)

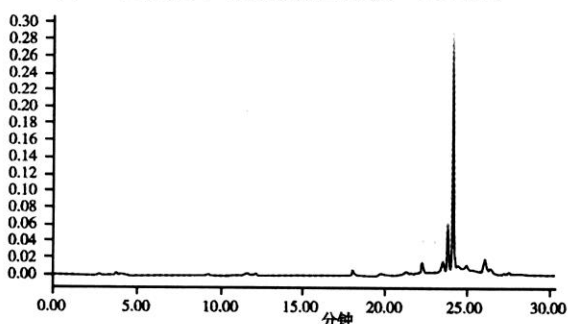


图5 连翘单味提取液图谱($\lambda = 327 \text{ nm}$)

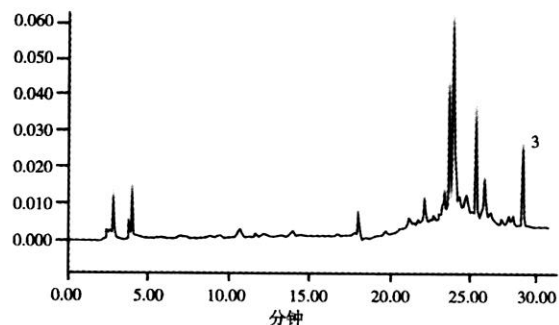


图6 连翘单味提取液图谱($\lambda = 280 \text{ nm}$)

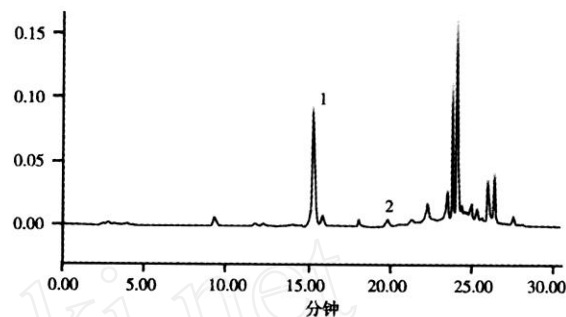


图7 金银花、连翘混合提取液图谱($\lambda = 327 \text{ nm}$)

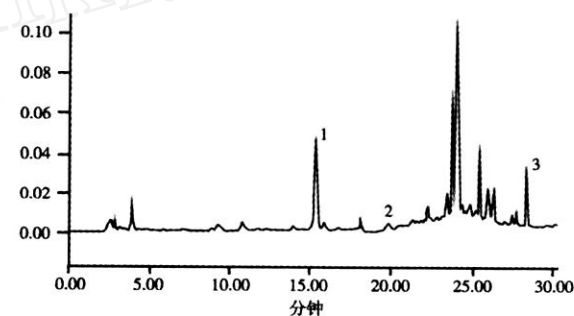


图8 金银花、连翘混合提取液图谱($\lambda = 280 \text{ nm}$)

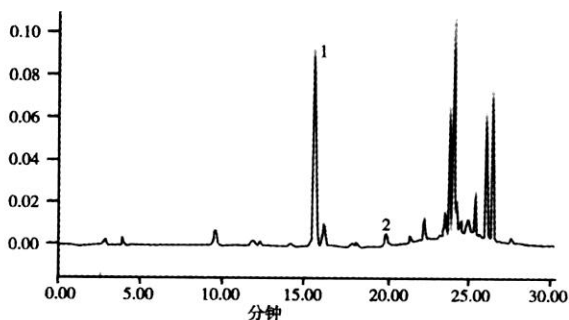


图9 单味合并液图谱($\lambda = 327 \text{ nm}$)

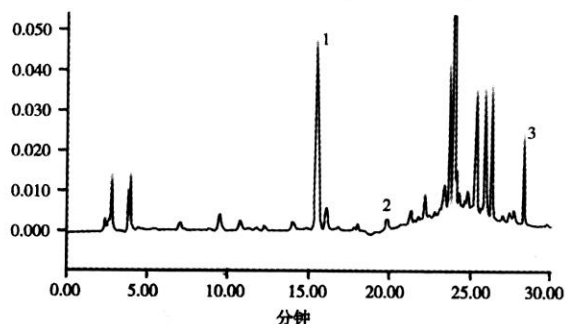


图10 单味合并液图谱($\lambda = 280 \text{ nm}$)

注:1. 绿原酸;2. 咖啡酸;3. 连翘苷(绿原酸、咖啡酸检测波长为 327nm,连翘苷检测波长为 280 nm)。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取金银花药材 280 g,以 75%乙醇回流提取 3 次,合并提取液,回收乙醇至无醇味,过滤。取 1/2 滤液,经浓缩、抽滤后定容至 1 000 mL,作为金银花供试品溶液。称取连翘药材 1 500 g,按上述方法提取,同样取 1/2 连翘滤液,经浓缩、抽滤后定容至 1 000 mL,作为连翘供试品溶液。取上述 1/2 金银花和连翘滤液,混合均匀、浓缩,抽滤定容至 1 000 mL,作为混合供试品溶液。称取金银花药材 140 g,连翘药材 750 g,均匀混合,以 75%乙醇回流提取 3 次,回收乙醇至无醇味,滤过,浓缩、抽滤后定容至 1 000 mL,作为金银花、连翘混合的供试品溶液。

2.3 标准曲线制备

取 2.2.1 项下的混合对照品溶液,分别进样 1、2、4、8、14、20 μL ,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵坐标 (Y),进样量 (μg) 为横坐标,得标准曲线方程 (见表 1)。

表 1 各组分标准曲线方程

成分	保留时间	回归方程	r	线性范围 / μg
绿原酸	15.411	$Y = 60.537x + 62.221$	0.999 8	0.076 - 1.52
咖啡酸	19.850	$Y = 129.340x + 6.994.6$	0.999 9	0.012 - 0.23
连翘苷	28.384	$Y = 13.206x + 2.612.9$	0.999 9	0.04 - 0.86

表 2 绿原酸、咖啡酸、连翘苷加样回收率 ($n=5$)

成分	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
绿原酸	2.430	0.633	3.071	101.26	99.41	1.52
			3.067	100.68		
			3.051	98.06		
			3.057	99.10		
			3.050	97.95		
咖啡酸	0.054	0.057	0.111	99.65	102.91	2.67
			0.116	106.26		
			0.115	105.12		
			0.113	102.35		
			0.113	101.15		
连翘苷	1.550	0.358	1.915	102.17	101.06	2.45
			1.908	99.95		
			1.908	100.04		
			1.902	98.36		
			1.925	104.76		

表 3 金银花、连翘混合液、单味液、单味合并液含量测定结果

成分	绿原酸 /mg · mL ⁻¹ 含量测定 平均值	咖啡酸 /mg · mL ⁻¹ 含量测定 平均值	连翘苷 /mg · mL ⁻¹ 含量测定 平均值
混合液	4.855	0.108	3.077
	4.859	0.109	3.122
	4.872	0.110	3.111
单味合并液	4.246	0.085	2.390
	4.260	0.081	2.400
	4.302	0.084	2.410
金银花单味液	4.294	0.030	
	4.293	0.033	0.031
	4.299	0.031	
连翘单味液			2.309
			2.301
			2.312

2.4 精密度试验

取同一混合样品溶液,连续进样 5 次,测定峰面积,结果绿原酸、咖啡酸、连翘苷峰面积的 RSD 分别为 0.57%、1.50%、0.59%。

2.5 稳定性试验

取同一混合样品溶液,在室温下,10 h 内每隔 2 h 按上述色谱条件进样测定峰面积,结果绿原酸、咖啡酸、连翘苷峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.40%、1.52%、0.588%。

2.6 重复性试验

取同一混合样品溶液 5 份,按上述色谱条件测定,结果绿原酸、咖啡酸、连翘苷 RSD 为 0.33%、1.78%、0.71%。

2.7 回收率试验

取已知含量的混合供试品溶液 5 份,分别精密加入绿原酸、咖啡酸、连翘苷对照品,以 50% 甲醇溶解,按上述色谱条件进样,测定其峰面积,计算含量,结果见表 2。

2.8 样品中主要成分含量测定

取 3 批样品,按供试品溶液制备方法制得,以上述色谱条件分别进样 20 μL ,测定峰面积,计算含量,结果见表 3。

3 讨论

3.1 金银花、连翘所含化学成分复杂,绿原酸、咖啡酸和连翘苷均为文献报道最多的活性成分,且绿原酸、连翘苷为《中国药典》中对金银花、连翘的定量指标成分。因此,本试验选取绿原酸、咖啡酸和连翘苷三个有效成分作为考察目标^[3]。

3.2 《中华人民共和国兽药典·二部》(2005 版) 中收录的金银花中绿原酸的 HPLC 检测方法是采用流动相为乙腈 - 0.4% 磷酸溶液 (13:87),检测波长为 327 nm,连翘苷的 HPLC 检测方法中采用的流动相为乙腈 - 水 (25:75),检测波长为 277 nm。前人报道绿原酸、连翘苷检测的方法,选用波长为 280 nm^[4],虽然在 280 nm 绿原酸、连翘苷均有吸收,但本试验选用双波长 327 nm 和 280 nm 同时检测,结果显示绿原酸、咖啡酸在 280 nm 处的峰面积为 327 nm 处峰面积的 50%,连翘苷在 327 nm 无明显吸收。且在选定的流动相中加入适量的酸,可以抑制色谱峰拖尾现象,改善峰型,并得到较好的基线分离。

3.3 本试验采用 HPLC 方法分析由 75% 乙醇提取的金银花、连翘单味提取液,单味合并液以及混合提取液样品,结果显示,混合液样品中绿原酸、咖啡酸、连翘苷含量均比单味液、单味合并液样品高,绿原酸含量:混合液 > 单味液 > 单味合并液;连翘苷含量:混合液 > 单味合并液 > 单味提取液,咖啡酸含量:混合液 > 单味合并液 > 单味提取液。药对配伍可以促进绿原酸、咖啡酸、连翘苷的溶出,推测是由于药对配伍后混煎时皂苷等成分具有助溶作用,增加了连翘苷、绿原酸、咖啡酸的溶出。

3.4 通过液相色谱图可知,药对混合液以及单味合并液的主要色谱峰都能归属到单煎的色谱图中,但药对混合液色谱图中其他峰峰面积并不随绿原酸、连翘苷峰面积增大而增大,有些峰峰面积反而较单味提取液、单味提取后合并液峰面积小,这可能是混合液与金银花、连翘单味提取液及合并液样品药效不同的原因。

参考文献:

- [1] 宋小妹,唐志书. 中药化学成分提取分离与制备 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2004.
- [2] 苗明三,王智民. 对药的化学、药理与临床 [M]. 北京:军事医学出版社, 2002: 137.

- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [4] 黄淑影,骆园,黎小伟. HPLC法测定银翘解毒片中绿原酸和连翘苷的含量 [J]. 广西中医学院学报, 2004 (2): 58 - 60.

迎春花水提物抗炎活性研究

高天鹏¹,索栋²,王一峰³,叶鹤琳¹,王引权⁴,郑易安⁴

(1. 兰州城市学院化学与环境科学学院,甘肃兰州 730070;

2 浙江大学生命科学学院生物科学系; 3 西北师范大学生命科学院; 4 甘肃中医学院药理学)

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 6354(2009)03 - 0032 - 02

迎春花 (*Jasminum nudiflorum* Lindl.) 为木犀科茉莉花属植物,有黄梅、清明花等之称,分布于我国陕西、山东、河南、江苏、浙江、贵州等地,分野生和栽培两种,其叶、花、茎均可入药。《本草纲目》有迎春花“气味苦涩、平,无毒;主治肿毒恶疮,阴干研末,酒服三钱,出汗便瘥”的记载;《贵州民间药物》有“解热剂,治头痛发热、小便热痛”之述;《陕西中草药》载有“活血散毒,消肿止痛。治跌打损伤,刀伤出血,无名肿毒”。《中草药手册》有“治劳损疮,花调麻油擦”之作用。除以上功效外,《全国中草药汇编》中记载其有“治口腔炎、痈疮肿毒、外阴痒痛”等功效。近年来,国内学者开展了迎春花的化学成分研究,并取得了一定成果,体外抗菌实验研究证明迎春花具有较强的体外抗菌活性,体内抗感染研究亦证实其具有一定的抗菌活性。据古籍记载及临床试验观察,迎春花水提物对仔猪白痢等疾病均有较好疗效。笔者等主要考察其抗炎活性,并取得了比较满意的效果,为临床应用提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 迎春花水提物的制备 迎春花整株于2006年9月采自河南省陕县张湾乡,地上部分阴干后取干燥全藤,剪成小段,常水淹没,浸泡3-4h,煎煮,煮沸后文火煎煮40min,趁热双层纱布过滤,滤渣加常水煎煮,如法3次。合并3次滤液,热水浴浓缩为1:1煎剂。双层纱布过滤中,流通蒸汽灭菌1h,备用。对照药品为醋酸泼尼松。

1.1.2 试剂及器械 AL204精密电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);UV-120-02型紫外-可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司);Cary Eclipse荧光分光光度计(美国瓦里安公司);DNM-9602G型酶标仪(北京普朗新技术有限公司)。伊文思兰(Evans Blue)(美国Fluka公司,进口分装);醋酸泼尼松注射液(天津药业焦作有限公司,批号070223-2);其它试剂如二甲苯等均为国产分析纯。

收稿日期: 2009 - 03 - 09

基金项目: 甘肃省科技支撑计划(0804NKCA075)、甘肃省教育厅科研基地重点项目计划(08zd-14)

作者简介: 高天鹏(1964-),男,博士,副教授,主要从事环境生物学研究。

1.1.3 试验动物 体重18-22g健康雌性昆明小鼠,购于中牧股份兰州生物药厂。

1.2 方法

1.2.1 迎春花水提物对小鼠耳廓肿胀的影响 选取健康、体重(20±2)g昆明雌性小鼠50只,随机分成5组,每组10只。即空白对照组、迎春花10g/kg(低)剂量组、迎春花15g/kg(中)剂量组、迎春花20g/kg(高)剂量组及醋酸泼尼松药物组。迎春花灌胃给药,每天上、下午各1次,连续3d;醋酸泼尼松250mg/kg药物组,每天上、下午各给药一次,连续3d;对照组每次给予等体积的生理盐水。各组最后一次给药1h后,于每只小鼠左耳两面滴加二甲苯0.05mL致炎,右耳作对照,致炎20min后自颈椎脱臼处死小鼠,在两耳相同部位打下耳片,于天平精确称量,按如下公式计算小鼠耳肿胀率:

$$\text{鼠耳肿胀率} = (\text{左耳重量} - \text{右耳重量}) / \text{右耳重量}$$

1.2.2 迎春花水煎剂对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响

试验分组及处理方式同试验1.2.1,最后一次给药1h后,每组小鼠尾静脉注射1%伊文思兰溶液0.2mL/只,随即腹腔注射0.7%冰醋酸溶液0.1mL/10g体重致炎,20min后处死小鼠,用5mL生理盐水冲洗腹腔,将收集的腹腔液1000r/min离心5min,收集上清液,在紫外可见分光光度计590nm波长处测OD值。

1.2.3 结果分析 对所有数据均用SPSS13.0软件进行方差分析。

2 结果

2.1 迎春花水提物对小鼠耳廓肿胀率的影响

结果见表1。

表1 迎春花水提物对小鼠耳廓肿胀率的影响

组别	小鼠只数/只	给药方式	耳廓肿胀率
生理盐水对照组	10	灌胃	0.0143 ± 0.0053
醋酸泼尼松对照组	10	灌胃	0.0117 ± 0.0023
迎春花 10 g/kg剂量组	10	灌胃	0.0141 ± 0.0033
迎春花 15 g/kg剂量组	10	灌胃	0.0094 ± 0.0001
迎春花 20 g/kg剂量组	10	灌胃	0.0139 ± 0.0047