

表明供试品溶液在室温下放置 8 h 内稳定。

2.10 样品测定

取 3 批依折麦布辛伐他汀片(批号: 20120826, 20120828, 20120830), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 按外标法计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of sample determination($n=3$)

批次	依折麦布		辛伐他汀	
	含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%
20120826	99.7	1.45	100.5	0.98
20120828	99.6	1.44	100.1	1.73
20120830	99.6	1.65	100.9	1.15

3 讨论

3.1 流动相系统的选择

参考相关文献^[4-7], 考察了甲醇-水, 乙腈-水, 乙腈-磷酸二氢钠等多个流动相系统, 结果发现, 使用乙腈-水系统时峰拖尾, 而使用 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠(pH 4.5)时分离效果较好, 改善峰拖尾现象, 基线平稳。依折麦布与辛伐他汀因结构相差较大, 所以极性也相差较大, 等度洗脱时辛伐他汀保留时间过长, 采用梯度洗脱程序, 依折麦布与辛伐他汀在 25 min 内能很好的分离, 保留时间适中, 峰形变锐。

3.2 检测波长的选择

2 种有效成分在紫外区域的吸收光谱图显示, 依折麦布在 231 nm 处有最大吸收, 辛伐他汀在 231, 238, 247 nm 有吸收峰, 由于在本制剂中依折麦布成分含量相对较低, 所以选择 231 nm 作为检

测波长, 2 种有效成分响应值高, 重现性好。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

依折麦布和辛伐他汀均几乎不溶于水, 易溶于乙腈, 使用稀释溶液溶解样品, 样品稳定性好, 峰形好。同时考察了提取方法, 结果证明超声提取更加简便, 回收率更高。

本研究建立了 HPLC 同时测定依折麦布辛伐他汀片中 2 种成分含量的方法, 该方法专属性强、准确度高、重复性好, 为进一步完善该制剂的质量标准提供依据。

REFERENCES

- [1] HE P, LI J, JIANG L. Progress in clinical research for ezetimibe [J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2012, 33(2): 168-171.
- [2] WANG F, TANG G. Pharmacology and clinical evaluation of a new cholesterol lowering drug vytorin (ezetimibe/simvastatin) [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2011, 20(15): 1364-1367.
- [3] ZHONG Y, LIU T, LIU A, et al. Dyslipidemia and advances in lipid lowering drugs [J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2011, 30(2): 216-219.
- [4] ASHISH S D, PANKAJ K K, HEMENDRA S J. Validation of a stability-indicating LC method for assay of ezetimibe in tablets and for determination of content uniformity [J]. Chromatographia, 2008, 67: 137-142.
- [5] ZHENG J, ZHENG G, LI H, et al. Determination of content and the related substances of simvastatin tablets by HPLC [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2010, 45(9): 702-705.
- [6] HU C, ZHENG G, ZHENG J. RP-HPLC determination of the related substances of simvastatin capsules [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(9): 856-859.
- [7] LIU M, HE J, WANG X, et al. LC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(8): 1339-1345.

收稿日期: 2012-11-26

抱石莲生物检定的方法学考察

李一卉¹, 段菊屏¹, 康丽群², 何颖³, 陈玉祥^{3*} (1.长沙市中医医院, 长沙 410100; 2.娄底市中心医院, 湖南 娄底 417000; 3.中南大学药学院, 长沙 410013)

摘要: 目的 建立中药抱石莲的生物检定法。方法 采用水提、醇提、水提醇沉等方法提取抱石莲有效成分, 体外抑菌试验检测抱石莲中药提取物的抗菌活性及适用菌株和剂量范围, 探索药物对敏感菌株的量效曲线, 构建适用于一剂量法的效应模式。结果 抱石莲药材的水提物具有较好的抑菌活性, 其对金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)的抑菌圈直径达到 17.39 mm; 当抱石莲的浓度为 $0.25\sim 1.50 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 抱石莲的剂量对数和反应效应呈线性关系。结论 抱石莲生物检定法简单、合理、可行, 可作为抱石莲质量控制的方法之一。

作者简介: 李一卉, 女, 硕士, 药师 Tel: (0731)85259118
教授 Tel: (0731)85259118 E-mail: 978746044@qq.com

E-mail: lyh19850124@yaoo.com.cn *通信作者: 陈玉祥, 男, 博士,

关键词: 抱石莲; 生物检定法; 质量控制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)09-1011-06

Method Validation on the Bioassay of *Lepidogrammitis Drymoglossoides*(Bak.) Ching

LI Yihui¹, DUAN Juping¹, KANG Liqun², HE Ying³, CHEN Yuxiang^{3*} (1.Changsha TCM Hospital, Changsha 410000, China; 2.Central Hospital of Loudi, Loudi 417000, China; 3.School of Pharmaceutical Science, Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a bioassay method for *Lepidogrammitis drymoglossoides*(Bak.) Ching. **METHODS** Three methods including water extraction, ethanol extraction, and water extraction plus ethanol subsiding method were used to extract the bioactive components from *Lepidogrammitis drymoglossoides*(Bak.) Ching, and the anti-bacterial effect of each extraction was detected by the anti-bacterial test *in vitro*. The standard bacterium strain and the dose range of the medicine were selected. We plotted the curve of dose-effect of *Lepidogrammitis drymoglossoides*(Bak.) Ching in response to sensitive bacterium strains and established an effective model applied to one-point method. **RESULTS** The water extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides*(Bak.) Ching showed the diameter of its inhibition zone to CMCC 26003 strain was 17.39 mm. There was a good linear correlation between logarithm dosages and effect of *Lepidogrammitis drymoglossoides*(Bak.) Ching when its concentrations ranged from 0.25 to 1.25 g·mL⁻¹. **CONCLUSION** The bioassay method is one of the quality control methods of *Lepidogrammitis drymoglossoides*(Bak.) Ching, which is simple, reasonable and feasible.

KEY WORDS: *Lepidogrammitis drymoglossoides*(Bak.) Ching; bioassay; quality control

中草药化学成分十分复杂, 其质量较难控制。目前, 中草药的质量控制^[1]较多地采用单一或多种有效成分的含量做为指标, 此外较新的方法还有指纹图谱, 而生物检定法^[2]做为近年来兴起的质量控制的方法, 可与其他方法一起全面地对中草药质量进行控制。本实验研究的抱石莲 [*Lepidogrammitis drymoglossoides*(bak.) ching] 为蕨类水龙骨科骨牌蕨属植物全草, 该草药在民族医药中有重要的应用, 全草具有清热解毒、利湿消痰之功效, 对治疗气管炎、胸膜炎、肺结核、痢疾、风湿关节炎等疾病^[3-5]具有重要功效, 然而国家标准并未载入抱石莲, 各地方标准也未规定抱石莲的质量标准, 因此研究抱石莲的质量控制具有重要意义。

目前, 很多研究者利用生物检定法对中药材质量控制进行了研究, 如益母草(缩宫素生物效价检测法)^[6-7]、连翘(抑菌圈检测法)^[8]、黄连(抑菌圈检测法)^[9]、穿心莲(抑菌圈检测法)^[10]、板蓝根(抑菌圈检测法)^[11-12]、枸杞子(抗氧化活性)^[13]。2010年中国药典中药质量标准研究制定技术要求中指出中药质量标准的制定要体现中药的特点, 其检测方法和检测指标的制定要脱离化学药品单一成分定性定量的模式, 要体现复杂体系整体控制的设计思想, 以建立符合中医药特点的质量标准体系, 逐步由单一指标性成分定性定量的向活性、有效成分及生物测定的综合检测过渡, 向多成分、组分测定及指纹或特征图谱整体质量控制模式转化。

研究者前期工作发现抱石莲含有生物活性成分绿原酸, 并建立了HPLC检测绿原酸的含量, 制定了抱石莲中绿原酸的含量标准。为更好控制抱石莲质量, 本实验对该药材又进行生物检定法的研究, 作为仪器检测某一生物活性成分的补充, 从而完善该药材的质量标准。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

抱石莲药材(广东、广西、福建产), 购于邵阳药材公司, 经中南大学药学院生药教研室李劲平教授鉴定; 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)、大肠杆菌(ATCC 25922)、绿脓杆菌(ATCC 27853)均由湖南省药检所提供; MH 琼脂、营养琼脂、营养肉汤, 均来源于广东环凯生物科技有限公司; 氯化钠与乙醇均为分析纯, 来源于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Mettler Toledo 1/10 万分析天平(Mettler Toledo 仪器有限公司); Model500 超声波细胞粉碎机(Fisher Scientific 公司); Rotavapor R-210 旋转蒸发器(BUCHI 公司); ZK-8213 型真空干燥箱(上海实验仪器总厂); 高压灭菌锅(Daihan Labtech 公司); 净化工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 抱石莲抗菌成分提取方法的确定 取抱石

莲粉末 10.0 g(干燥, 过 24 目筛), 精密称定, 精密加水 200 mL, 超声(200 W)60 min, 过滤, 滤液浓缩至 10 mL, 为抱石莲的水提物, 高压灭菌, 4 °C 保存备用。取抱石莲粉末 10.0 g(干燥, 过 24 目筛), 精密称定, 精密加入加乙醇 200 mL, 超声(200 W)60 min, 过滤, 滤液浓缩至 10 mL, 过 0.45 μm 滤膜, 为抱石莲的醇提物成分, 高压灭菌, 4 °C 保存备用。取 5.0 g 抱石莲, 精密称定, 精密加水 100 mL, 超声提取(200 W)60 min, 过滤, 滤液浓缩至约 5 mL, 精密加入 100 mL 乙醇, 放入 4 °C 冰箱沉淀 24 h, 抽滤, 乙醇反复洗涤, 滤渣干燥后定容至 10 mL 量瓶(提取物 A), 滤液浓缩定容至 10 mL 量瓶(提取物 B)。高压灭菌备用, 4 °C 保存备用。采用管碟法^[2]进行以上 4 种提取成分的抗菌活性研究, 取直径约 90 mm, 高 16~17 mm 的平底双碟, 分别注入加热融化的 MH 琼脂 20 mL, 使在碟底内均匀摊布, 放置水平台上凝固, 作为底层。另取培养基 100 mL 加热融化后, 放冷至 48~50 °C, 加入不同菌浓度的金黄色葡萄球菌悬液 100 μL, 摇匀, 在每一碟中分别加入 5 mL, 使在底层上均匀摊布, 作为菌层, 放置水平台上冷却。药液加入每碟的 4 个牛津杯内, 生理盐水、乙醇作对照, 每组平行 3 碟。用陶瓷瓦盖盖好, 据中国药典 2010 版二部附录 XI 规定的培养基和培养条件培养。用游标卡尺测量平皿内抑菌圈直径, 取平均值。抑菌圈直径 ≤ 10 mm 为耐药; 10~14 mm 为浓度敏感; 14~19 mm 为中度敏感; ≥ 19 mm 为高度敏感。

1.3.2 标准菌株及菌浓度的确定 取金黄色葡萄球菌(ATCC 25923、CMCC 26003), 大肠杆菌(ATCC 25922), 绿脓杆菌(ATCC 27853)四种标准菌株, 配制成 10^5 CFU·mL⁻¹ 的菌液。采用 2 倍稀释法测抱石莲水提取物对 4 种标准菌株的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。取 MIC 的菌株为标准菌株, 并确定菌浓度。再将菌液稀释成 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 CFU·mL⁻¹ 的菌悬液, 以抱石莲水提取物对该菌株的 2 倍 MIC 为药材浓度, 据中国药典 2010 版二部附录 XI 规定的培养基和培养条件培养^[2], 游标卡尺测抑菌圈大小, 取平均值。

1.3.3 中心浓度的选择及各剂量的确定 配制各种浓度的抱石莲溶液, 用管碟法^[2]在规定的培养基和培养条件下培养 20 h, 根据各浓度所致的抑菌圈的大小, 选择 0.60 g·mL⁻¹ 的抱石莲溶液

为中心浓度溶液。剂量一般按等比级数稀释, 剂距选择 1:0.8, 因为中心浓度 $C_0=0.6$ g·mL⁻¹, $C_1=0.27$ g·mL⁻¹; $C_2=0.34$ g·mL⁻¹; $C_3=0.43$ g·mL⁻¹; $C_4=0.54$ g·mL⁻¹; $C_5=0.67$ g·mL⁻¹; $C_6=0.84$ g·mL⁻¹; $C_7=1.05$ g·mL⁻¹; $C_8=1.31$ g·mL⁻¹。令中心浓度为 1 U·mL⁻¹, 则 $C_1=0.46$ U·mL⁻¹; $C_2=0.58$ U·mL⁻¹; $C_3=0.72$ U·mL⁻¹; $C_4=0.90$ U·mL⁻¹; $C_5=1.12$ U·mL⁻¹; $C_6=1.40$ U·mL⁻¹; $C_7=1.75$ U·mL⁻¹; $C_8=2.19$ U·mL⁻¹。

1.3.4 标准曲线的建立 精密移取药材溶液, 用蒸馏水稀释成各浓度 C_{k1-k8} ($0.46\sim 2.19$ U·mL⁻¹), 同时配制成中心浓度药材(0.60 g·mL⁻¹), 取备妥的双碟 24 只, 分为 8 组, 每组 3 只。每组各碟内间隔的 3 只牛津杯内分别滴满药材溶液 C_{k1-k8} ; 另 3 只牛津杯内均滴满对照药材的中心浓度溶液。在规定的培养基和培养条件下培养 20 h 后, 用游标卡尺逐一测量每个抑菌圈直径。

1.3.5 精密度及回收率试验 取备妥的双碟 12 只, 分为 4 组, 每组 3 只。每组各碟内间隔的 3 只牛津杯分别滴满中心浓度溶液 C_0 (0.60 g·mL⁻¹); 另 3 只牛津杯内均滴满供试品溶液(0.50 g·mL⁻¹)。在规定的培养基和培养条件下培养 20 h 后, 用游标卡尺测量每组抑菌圈直径, 连续测量 6 次, 并计算抗菌效价。次日更换实验员按同样方法测定供试品效价, 计算中间精密度。制备 3 种不同浓度的抱石莲供试品溶液, 浓度分别为中心浓度的 80%, 100% 和 120%, 用同样方法测量各药材浓度的抗菌效价, 与估计效价比较, 计算回收率。

1.4 统计学处理

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。所有计量资料均用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。对实验中抑菌圈大小 ($Y-Y_0$) 与抱石莲中药的浓度的常用对数 ($\lg C_k$) 进行直线相关分析, 检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 抱石莲抗菌成分的确定

抱石莲水提物、抱石莲醇提物以及抱石莲水提醇沉物 A 和 B 等 4 种提取物的药敏实验结果显示, 抱石莲水提醇沉物 A 的抑菌效果最好, 为高度敏感, 水提物次之, 为中度敏感, 醇提物耐药, 抱石莲水提醇沉物 B 无抑菌效果。结果见表 1。

2.2 标准菌株及浓度的确定

4 种标准菌株的 MIC 及抱石莲提取物对不同浓度的金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)的抑菌效果表明, 金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)的 MIC 最小,

为 $0.25 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而 $10^3 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的金黄色葡萄球菌可以产生较理想的抑菌圈直径和较高的清晰度。故选择金黄色葡萄球菌(CMCC 26003)作为试验菌株。结果见表2和表3。

表1 不同药物组分的药敏实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Tab 1 Drug sensitivity test for different drugs components ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

药物组分	金黄色葡萄球菌 ATCC 25923/mm	金黄色葡萄球菌 CMCC 26003/mm	抑菌效果
水提物(0.50 g·mL ⁻¹)	15.91±0.56	17.39±0.64	中介
醇提物(0.50 g·mL ⁻¹)	7.23±0.32	8.61±0.45	耐药
组分 A(0.50 g·mL ⁻¹)	20.74±0.87	22.78±0.76	敏感
组分 B(0.50 g·mL ⁻¹)	-	-	无抑菌效果
生理盐水	-	-	
乙醇	-	-	

表2 不同菌种最小抑菌浓度测定结果

Tab 2 MIC of different strains

药物浓度/ g·mL ⁻¹	金黄色葡萄球菌 ATCC 25923	金黄色葡萄球菌 CMCC 26003	大肠杆菌 ATCC 25922	绿脓杆菌 ATCC 27853
1.0	-	-	-	-
0.5	-	-	+	+
0.25	+	-	+	+
0.125	+	+	+	+
0.062 5	+	+	+	+
0.031 25	+	+	+	+
0.015 625	+	+	+	+
生理盐水	-	-	-	-
庆大霉素	+	+	+	+

表3 不同菌浓度的抑菌圈情况

Tab 3 Diameters of bacteria inhibiting ring of different bacteria concentration

菌层浓度/CFU·mL ⁻¹	抑菌圈大小/mm	圈清晰度
10^2	18.93	+
10^3	17.31	++
10^4	15.76	++
10^5	14.62	+++

表5 抱石莲标准曲线记录表

Tab 5 Data calculation of standard curve of *Lepidogrammitis drymoglossoides* (Bak.) Ching

药材稀释浓度/ U·mL ⁻¹	中心浓度抑菌圈直径(y_0)/mm	\bar{y}_0	各剂量(C_{k1-8})抑菌直径(y_k)/mm	\bar{y}_k	$f_k(y_k-y_0)$
0.46	16.49, 17.38, 16.22, 17.31, 16.43, 16.54, 16.04, 17.21, 15.34	16.56	14.77, 14.79, 15.63, 14.82, 15.12, 14.83, 15.26, 14.86, 14.01	14.82	-1.74
0.58	16.74, 17.11, 16.24, 16.78, 17.81, 16.91, 17.73, 16.67, 16.82	17.00	14.78, 14.54, 16.32, 16.59, 16.72, 14.81, 14.86, 14.53, 15.47	15.48	-1.52
0.72	17.77, 17.34, 15.28, 17.49, 17.13, 17.73, 16.76, 15.64, 16.09	16.68	15.27, 15.23, 14.69, 16.52, 17.21, 15.27, 15.89, 16.21, 15.06	15.76	-0.92
0.90	16.76, 16.59, 15.28, 17.12, 18.21, 17.15, 17.29, 18.33, 17.34	17.16	16.74, 14.76, 15.06, 18.44, 18.57, 16.13, 16.78, 16.00, 17.93	16.71	-0.45
1.12	18.21, 17.85, 15.49, 16.74, 16.69, 16.54, 15.92, 16.49, 16.11	16.48	16.62, 17.24, 17.58, 17.54, 16.36, 15.72, 16.87, 16.32, 17.14	16.82	0.34
1.40	16.7, 17.51, 16.21, 16.58, 18.11, 17.47, 17.1, 16.34, 15.22	16.80	15.73, 16.02, 15.78, 19.42, 19.03, 17.21, 17.56, 17.24, 18.86	17.64	0.84
1.75	16.45, 18.21, 18.42, 17.03, 18.58, 16.42, 17.51, 16.12, 16.21	17.31	17.31, 18.07, 19.21, 18.23, 18.29, 18.15, 17.09, 18.24, 19.19	18.30	0.99
2.19	16.27, 16.77, 18.02, 17.23, 16.48, 17.28, 17.22, 18.23, 16.23	17.18	17.91, 18.21, 17.90, 19.13, 18.29, 18.91, 18.67, 19.72, 19.44	18.78	1.60

2.3 抱石莲水提物量效曲线的建立

用游标卡尺测各浓度的抱石莲所致抑菌圈直径大小, 取平均值, 在 $0.25\sim 1.50 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抱石莲药材的浓度范围内, $0.60 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抑菌圈均较明显, 属于中介范围, 故选择 $0.60 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 做为中心浓度。以浓度对数(剂量)为横坐标, 抑菌圈直径大小为纵坐标, 统计、回归处理, 得出回归直线方程式为 $Y=4.484 9X+18.356$, $R^2=0.987 7$, 结果见表4。

表4 不同药物浓度下的抑菌圈大小($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Tab 4 Diameters of bacteria inhibiting ring of different drug concentration

药物浓度/g·mL ⁻¹	抑菌圈大小/mm
1.50	19.10±1.02
1.20	18.81±0.84
0.96	18.04±0.75
0.77	17.90±0.46
0.61	17.49±0.87
0.49	17.00±0.89
0.39	16.72±0.54
0.31	16.01±0.79
0.25	15.52±0.94

2.4 标准曲线的确定

规定的培养基和培养条件下培养 20 h 后, 用游标卡尺逐一测量每个抑菌圈直径, 根据抑菌圈直径计算标准曲线的直线回归数据, 以浓度对数(剂量)为横坐标, 令抑菌圈直径差 $f_k(f_k=y_k-y_0)$ 大小为纵坐标, 经统计回归处理, 得出回归直线方程式为 $f_k=-0.118 24+5.180 36 \text{ Lg}C_{ka}$; $S_b=SS_{X-Y}/\sqrt{Lxx}=0.266 56$, 对回归系数进行 t 检验得到 β 的 95% 可信区间为: $b \pm t_{0.05} \times S_b=5.180 36 \pm 2.447 \times 0.266 56=4.528 0\sim 5.832 6$ 。 β 的可信限率为: $(5.832 6-4.528 0)/(5.180 36 \times 2) \times 100\%=12.6\%$ 。抑菌圈直径见表 5。

2.5 精密度及回收率试验

按标准曲线可计算得到中药材的抗菌效价： $\lg R = (Y_1 - Y_0) / b$ (Y_1 为供试品抑菌圈直径平均值， Y_0 为中心浓度抑菌圈平均值， R 为效价值)，当日连续测量 6 次 $0.50 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抱石莲水提液效价，次日更换实验员测量 $0.50 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抱石莲水提液效价得重复性和中间精密度试验，结果见表 6 和表 7。

表 6 重复性试验 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Tab 6 Repeatability experiment ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

次数	抑菌圈差($Y_1 - Y_0$)/mm	实测效价	RSD/%
1	0.50±0.05	0.843 2	3.10
2	0.62±0.07	0.799 6	
3	0.64±0.05	0.792 8	
4	0.46±0.04	0.858 2	
5	0.56±0.06	0.823 3	
6	0.59±0.05	0.809 8	

表 7 中间精密度试验

Tab 7 Precision of the method

时间	实验员	效价	RSD/%
当日	1 号	0.8212	3.06
次日	2 号	0.8576	

按 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 抱石莲水提溶液浓度的 80%，100%，120% 进行抑菌实验，计算其效价，与估计效价比较，计算回收率，结果见表 8。

表 8 回收率试验

Tab 8 Recovery experiment

次数	药液浓度/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	估计效价/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	实测效价/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
1	0.48	0.80	0.813 2	101.65	99.21	2.45
2	0.48	0.80	0.787 0	98.38		
3	0.48	0.80	0.779 8	97.47		
4	0.60	1.00	1.029 4	102.94		
5	0.60	1.00	0.960 5	96.05		
6	0.60	1.00	0.975 8	97.58		
7	0.72	1.20	1.187 0	98.92		
8	0.72	1.20	1.226 0	102.16		
9	0.72	1.20	1.172 9	97.74		

2.6 样品测定

根据上述实验结果，在建立的标准曲线范围内，对不同产地的抱石莲样品进行检定，重复 3 次。抱石莲生药液的制备同上述抱石莲对照药材液的制备。得广西、福建两地抱石莲效价，及可信区间，两者进行 t 检验，得 $P < 0.01$ ，具有显著性差异，结果见表 9。

表 9 样品测定 ($n=3$)

Tab 9 Sample determination ($n=3$)

产地	效价/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0.6 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品相当于 标准药材浓度/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	95%可信区间/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$
广西	0.739 4	0.443 6	0.740 2±0.013 9
	0.735 1	0.441 1	
	0.746 2	0.447 7	
福建	0.491 2	0.294 7	0.492 8±0.015 8
	0.487 4	0.292 4	
	0.499 8	0.299 9	

3 讨论

本实验研究了 4 种抱石莲提取物的抑菌效果，通过抑菌实验发现水提醇沉物 A 的抑菌效果最好，水提物次之，醇提物及水提醇沉物 B 的抑菌效果均较差。中药材中成分复杂，各成分大多都具有抗菌活性，利用水提的方法可以提取出抱石莲中无机盐、多糖类、鞣质、氨基酸、蛋白质、有机酸盐、生物碱盐及甙类等化合物，再利用乙醇沉淀的方法可将水提物中的多糖类、鞣质、氨基酸、蛋白质、少量的生物碱盐沉淀下来，该类成分构成了抱石莲水提醇沉物 A；抱石莲水提物经乙醇沉淀后过滤剩下的成分无机盐、有机酸盐和大部分的生物碱盐，则构成了水提醇沉物 B 的主要成分。通过各提取物的抑菌实验发现，抱石莲水提物与提取物 A 均具有较高的抑菌活性，明显大于醇提成分和提取物 B，说明抱石莲的主要抗菌活性成分存在于水溶性成分中，推测可能是氨基酸、多糖、蛋白质类等，而提取物 A 中此类成分纯度更高，所以其具有更好的抗菌效果。但该提取过程复杂，若进行质量评价时采用该方法提取抱石莲有效成分，则使得操作不易控制；利用直接水提法从抱石莲中提取的成分已含有提取物 A 的所有成分，且该法与现今大多数中药厂制备中成药和临床用药选择水作为溶媒一致，保持最大限度的相似性，从而可以减小提取溶剂对实验结果的影响。

本实验探索用抱石莲的抗菌效价来标示抱石莲质量，而国家没有关于抱石莲对照药材的规定，考虑抱石莲的主产地为广东，且质量较好，故本实验所用的抱石莲为广东产的生药。通过实验发现抱石莲水提物浓度在 $0.25 \sim 1.50 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时可以用生物检定法对抱石莲进行质量评价，该方法重复测得抱石莲效价的 RSD 为 3.10% ($< 5\%$)，测得的抱石莲回收率介于 95% 和 103% 之间，经统计分析得其可信限率为 12.6%，远小于药典中对于一般生物

检定规定的±30%，说明用该方法用于对抱石莲质量的控制，具有较高的可信度。因此，生物检定法作为抱石莲的质量控制指标之一，方法简单、合理、可行。

REFERENCES

- [1] CUI H H, QIU X. Research and development trends on quality standard modernization Chinese pharmacopoeia commission [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2007, 14(6): 6-7.
- [2] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix XI 93-98, 130.
- [3] NANJING UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE. Dictionary of Chinese Medicine(中药大辞典) [M]. Shanghai: Science and Technology Publisher of Shanghai, 2006: 768.
- [4] YAN Y Q, YU C L. Encyclopedia of Chinese Medicine(中药辞海) [M]. Vol 4. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1998: 981.
- [5] CHEN Z S. Antiinflammation by water extraction of *Lepidogrammitis drymoglossoides*(Bak.) Ching [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2000, 12(3): 37-38.
- [6] YANG M H, YANG S B, JIN Z H, et al. Study on the biological assay of Herbal Leonuri(I)-establishment of standard uterus models and optimizing uterus environment conditions [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2002, 25(6): 333-336.
- [7] YANG M H, YANG S B, JIN Z H, et al. Study on the biological assay of Herba Leonuri(II)-analysis the dosage response curve of Herba Leonuri and oxytocin and establishment of adequate potency patten [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2002, 25(6): 409-411.
- [8] ZHAO Z J, ZHANG E H, LIAN Y, et al. Method validation on the bioassay of coptis and its related preparation [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(24): 2146-2148.
- [9] DAN Y, CHENG J, XIAO H X, et al. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry [J]. J Biochem Biophys Methods, 2009, 32(5): 60-61.
- [10] ZHAO Z J, ZHANG E H, LIAN Y, et al. Study on the bioassay of *Andrographis paniculata*(Burm.f.) Nees [J]. China Healthc Innovat(中国医疗前沿), 2007, 2(18): 30-31.
- [11] WEI L, LI Y, LI H B, et al. Methodological research on the quality evaluation of Radix Isatidis based on antibacterial potency [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med(世界科学技术), 2008, 10(2): 33-36.
- [12] LI Y, GUO H, XIAO X H. Establishment of antibacterial potency detection of Radix Isatis based on biological thermodynamics [J]. World J Integ Tradit West Med(世界中西医结合杂志), 2012, 7(1): 24-27.
- [13] CHU X H, WANG J B, ZHOU C, et al. Comparison of antioxidative activities of Fructus Lycii with different commercial grades by bioassay detection [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 20(7): 599-603.

收稿日期: 2012-11-01

欢迎订阅 2014 年《医药导报》杂志

《医药导报》杂志系中国药理学会、华中科技大学同济医学院附属同济医院联合主办的医药专业期刊，国内外公开发行人。是国家科技部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)，北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》中文核心期刊。被美国《化学文摘》(CA)、《国际药学文摘》(IPA)和波兰《哥白尼索引》(IC)收录。还被万方数据库、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库等国内多家大型数据库收录。设有“特约稿”“药物研究”“药物与临床”“药学进展”“药物制剂与药品质量控制”“用药指南”“新药介绍”“临床药师交流园地”“药物不良反应”“药事管理”“作者·编者·读者”等栏目，每期组编某类药物或某类疾病的药物治疗专栏。读者对象是临床医师、药师、医药院校师生和医药研究所、药品检验所的科技工作者及药品监督管理、医药工商企业经营者。

《医药导报》1982年创刊，始终坚持刊物的科学性、实用性、信息性，以普及、运用、服务为宗旨，着重报道国内外医药研究新成果、新技术、新方法，关注药物临床疗效和不良反应，指导临床合理用药，重视药品质量控制，宣传医药政策法规，在医药科研、生产、经营、使用间发挥纽带和桥梁作用。该刊已于2006年7月开通网站(<http://www.yydbzz.com> 或 www.yydb.cn)，作者、读者可通过网站首页作者投稿系统和作者查稿系统实现在线投稿、查稿，通过过刊浏览栏目免费阅读和下载《医药导报》过刊文章，通过新闻公告栏目了解国内外最新医药动态和编辑部有关信息，通过编读往来栏目与编者互动交流。

《医药导报》杂志月刊，每月1日出版，2014年每期25.00元，全年300.00元(含邮资)，欢迎广大读者积极到当地邮局订阅，如错过邮局订阅时间，可随时向该刊编辑部邮订。地址：武汉市解放大道1095号同济医院《医药导报》编辑部，邮政编码：430030，E-mail: yydbzz@163.com。电话及传真：(027)83643083，83666619,83663559。国内总发行：湖北省邮政公司。邮发代号38-173。全国各地邮局均可订阅。国内统一刊号：CN42-1293/R，国际标准出版物号：ISSN1004-0781。广告许可证：武工商0620号。欢迎广大作者、读者踊跃投稿。