

黄芩素的制备及抗糖尿病研究概况

李玉萍, 刘建涛, 熊向源, 吴光杰, 李资玲, 龚妍春 (江西科技师范学院生命科学学院, 江西南昌 330013)

摘要 黄芩是一种中国传统草药, 国内外学者对中药黄芩的化学成分、药理作用和作用机制等方面进行了深入的研究。黄芩素 (baicalein) 是黄芩苷 (baicalin) 的苷元, 是黄芩的主要活性成分之一, 是发挥药理活性的基础。现就近几年来国内外有关黄芩素的提取、纯化、含量测定和生物活性的研究成果进行综述, 为全面开发利用黄芩提供参考。

关键词 黄芩素; 制备; 测定; 生物活性

中图分类号 R977.1⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)32-15648-04

Preparation of Baicalein and Research Situation of Anti-diabetic

LI Yu-ping et al (School of Life Science, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013)

Abstract *Scutellaria baicalensis* Leorgi is a kind of Chinese traditional herbal. Domestic and foreign scholars deeply analyzed chemical components, pharmacology effect and mechanism of *S. baicalensis*. Baicalein is the main bioactive component of *S. baicalensis*. The research progress in extraction, purification, content determination and bioactivity of baicalein at home and abroad in recent years were summarized which will provide a reference for development and utilization of baicalein.

Key words Baicalein; Preparation; Determination; Bioactivity

糖尿病 (DM) 是一组由遗传和环境因素相互作用而引起的体内糖、蛋白质及脂肪代谢紊乱, 以持续高血糖和伴发多种并发症为特征的一种临床综合征。目前全球有 3 亿人患有糖尿病 (包括隐性糖尿病人群), 其中我国糖尿病患者近 6 000 万人。因糖尿病慢性并发症造成的疾病死亡, 已经成为继心血管和肿瘤之后第 3 位“健康杀手”。因此, 新开发的降糖合成药及其制剂不断涌现, 但因其严重的副作用和不良反应, 使许多学者开始重视天然药物的研究开发。黄芩为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Leorgi) 的干燥根。黄芩为多年生草本植物, 主产于黑龙江、吉林、辽宁、河北、山东、四川、云南、山西、甘肃等地, 以山西产量最大, 河北承德产的质量最好^[1]。近年来的研究表明, 黄芩的化学成分主要集中在黄酮、苷、萜、微量元素、酶、甾醇、有机酸等几大类化合物, 其中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷和汉黄芩素等黄酮类化合物是主要的活性成分^[2-3]。黄芩苷和汉黄芩苷为前药, 黄芩素和汉黄芩素为二者的真正发挥药理作用的物质基础。黄芩素 (baicalein, C₁₅H₁₀O₅) 是黄芩苷 (baicalin) 的苷元, 是黄芩的主要活性成分之一, 具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗爱滋病、抗糖尿病及其并发症、抗肿瘤、抗过敏、清除自由基、降血脂、调节免疫力等多种药理作用^[4]。因此, 国内外许多学者在如何制备高纯度的黄芩素单体和生物活性及作用机制方面进行了大量的研究工作。笔者就近年来国内外对黄芩中黄芩素的制备和防治糖尿病研究现状作一综述。

1 黄芩素的理化性质

黄芩素又名黄芩苷元, 黄芩黄素 (Noroxylin), 呈黄色针晶 (乙醇), mp 264~265 °C (分解), 溶于乙醇、甲醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯和热的冰醋酸, 微溶于氯仿和硝基苯, 几乎不溶于水; 溶于稀氢氧化钠呈绿棕色, 遇浓硫酸呈黄色并显绿色荧光^[5]。黄芩素对光和 pH 稳定性差, 抗坏血酸或 Na₂SO₃, 具有提高黄芩素溶液稳定性的作用^[6]。其结构式见图 1。

基金项目 国家人事部留学人员科技活动择优项目 [国人厅发(2006)164 号]。

作者简介 李玉萍 (1964-), 女, 重庆人, 博士, 教授, 从事天然活性成分的机能性研究与开发。

收稿日期 2009-07-14

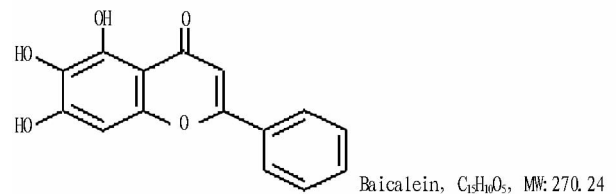


图 1 黄芩素结构式

Fig.1 Structural formula of baicalein

2 黄芩素的提取、分离、纯化

黄芩素为中药黄芩的主要有效成分之一, 具有显著的生物活性, 在黄芩药材中的含量很低, 其质量分数只有 0.04%~0.28%^[7], 直接提取高纯度的黄芩素难度较大。目前主要的提取方法如下:

2.1 直接酸水解法 许闯等^[8-9]采用直接酸水解黄芩苷制备黄芩素, 并以 4 因素 3 水平正交实验法, 以黄芩素含量和制备率两项考察指标综合评析的方法, 对工艺进行了优化。水 (溶媒) 用量为黄芩苷的 100 倍, 浓硫酸量为黄芩苷的 7 倍, 制备时间 6 h, 萃取 3 次为最佳制备工艺, 获得黄芩素的含量达 92.15% 以上, 且得率在 66.03% 以上。

2.2 热裂解法 许闯等^[8]以黄芩素的含量和得率为指标, 采用热裂解方法提取黄芩素, 并与直接酸水解法相比较。当裂解温度超过 200 °C 时, 可以获得含量为 94.47% 以上的黄芩素, 但得率不高于 41.64%。由此可以推论, 直接酸水解法制备黄芩素工艺简单可行, 得率较高, 实用性强。

2.3 改良浸提法 到目前为止, 黄芩素的提取多采用浸提法。梁英等^[10]以黄芩黄酮得率为实验指标, 采用 4 因素二次回归正交旋转组合设计对黄酮回流浸提工艺参数进行优化研究, 建立了黄芩黄酮得率与浸提时间、浸提温度、颗粒粒度和液固比之间关系, 发现浸提时间为 1.6~1.9 h, 温度为 72.5~76.9 °C, 颗粒粒度为 65.2~74.0 目, 液固比 (ml:g) 为 24.9~27.2 时, 黄芩素得率大于 11.00% 的概率为 95%。与实际情况拟合较好, 为黄芩素浸提工艺条件的确定提供了量化基础。

2.4 酶解法

2.4.1 酶水解法。 黄芩中黄芩素含量较低, 直接从黄芩中

提取黄芩素很困难,但是黄芩中富含黄芩苷,因此可以使用酶水解黄芩苷制取黄芩素。刘云华等研究了从黄芩中提取分离黄芩素的酶解条件和提取工艺,结果表明,黄芩药材粉碎至 10~20 目,加水 6 倍,于 60 ℃ 保温 10 h;酶解后的黄芩药材加 8 倍 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,黄芩素的提取率大于 70%,工艺稳定可行^[11]。利用正交实验,以黄芩素的含量为评价指标,确定了从黄芩中提取黄芩素的最佳酶解工艺和提取工艺。研究发现,酶解温度为 40 ℃,pH 值 6.0,时间 12 h 时,黄芩素含量最高;超声提取 30 min、2 次,乙醇加入量为 15 倍时,黄芩素的含量可达 76.5 mg/g。

2.4.2 纤维素酶法。由于黄芩药材的细胞壁大多是由纤维素构成的,其有效成分往往包裹在细胞壁内,纤维素是 β -D-葡萄糖以 1,4- β -糖苷链连接的,用纤维素酶可破坏 β -D-葡萄糖键,进而有利于有效成分的提取。王宏志等^[12]应用纤维素酶对黄芩药材进行酶解,优选最佳工艺条件,以提高黄芩素的提取率。确定了纤维素酶解黄芩药材的最佳工艺条件:浸提倍数 20,加酶量 20 U/g,pH 值 4.8,温度 50 ℃,时间 8 h。与传统水煎提取工艺相比,酶法提取工艺使黄芩中黄芩素提取率提高了 5 倍。

2.5 色谱法(层析法)

2.5.1 柱色谱法。蒋建军等采用酸沉碱溶法从黄芩中提取黄芩苷,通过水解黄芩苷制取黄芩素粗品,再经硅胶和聚酰胺柱层析纯化,得到高纯黄芩素(纯度为 99.35%)。其最佳条件为:黄芩苷在 20% 盐酸水溶液中为 2% (质量分数),反应温度为 37 ℃,反应时间为 1.5 h,黄芩素的产率为 89.86%^[13]。

2.5.2 高速逆流色谱法(HSCCC)。HSCCC 是一种新型的基于液-液分配原理的色谱分离技术,具有样品无损失、无污染、高效、快速和大制备量分离等优点,其中草药成分分离分析方面的应用尚属起步阶段。近年来,随着仪器、方法的改进,国内外文献报道已利用该技术分离分析生物碱、黄酮、萜醌、皂苷、木脂素、蛋白质、胡萝卜素类等成分。李华斌等^[14]以正己烷-乙酸-丁醇-水为展开剂(1:1:8:10),上相为固定相,下相为流动相,有效地分离纯化了黄芩中的黄芩素(纯度 95.7%)、汉黄芩素(纯度 98.5%)等黄酮类化合物。

2.6 超声提取法 超声能产生空化效应,具有粉碎、搅拌等特殊作用,使黄芩植物组织在溶剂中瞬时产生的空化泡崩溃,而使组织中的细胞破裂,有利于溶剂渗透进植物细胞内部,使细胞中的黄芩苷成分进入水溶剂中,加速相互渗透、溶解,提高黄芩苷在水中的溶解度。姚亚红等^[15]综合利用酶解法和超声法对黄芩素进行提取,并用正交实验考察了最佳工艺条件:超声 30 min,提取 2 次,乙醇加入量为药材量 10 倍。超声法具有实验设备简单,操作方便,提取无需加热,时间短,提取率高,污染少等特点,优于传统的醇提酸沉法、漫漉提取法。

2.7 树脂吸附法 大孔树脂吸附技术是利用一类有机高聚物吸附剂吸附溶液中有效成分的方法,20 世纪 70 年代末以来,在中草药有效成分的提取分离及成分测定方面已显示出其独特的作用。冯云霞等^[16]依据目标产物的不同,选择不同的树脂类型、pH 值、流速和洗脱剂综合考察黄芩苷、黄

芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素 4 种成分的提取效果,确定了 SP-825 为最佳树脂,pH 值 6.5 的样品液在 ZBV/h 流速下上样,并以丙酮洗脱为最佳分离工艺。树脂法提取率高,含量也高,成本低,易于工业化生产。但树脂的处理比较困难,而且可能造成产品污染。

2.8 其他 除以上几种分离纯化技术单独使用外,也有研究者将几种分离技术结合实验,并取得了良好的分离效果。李云霞等^[17]采用萃取、柱层析和重结晶等方法结合分离纯化黄芩素。将 100 g 黄芩粗粉(40 目),经甲醇于室温下浸渍 3 次,每次 48 h,合并提取液后,用旋转蒸发仪减压浓缩至原体积的 1/6(约 100 ml);将此浓缩液与 2 倍体积量的层析用聚酰胺均匀拌合,放入真空干燥箱,室温、减压下将其中的甲醇溶剂完全去除,得柱层析用干粉样品;再将此干粉样品与石油醚混合,装入聚酰胺层析柱;经氯仿-乙醇系统梯度洗脱,聚酰胺薄膜检查,得黄芩素纯品。将柱层析得到的纯品经反复重结晶处理后,得到黄芩素黄色晶体 90 mg。

3 结构表征和含量检测方法

3.1 结构表征 对黄芩素的组成和结构进行表征包括:IR 光谱(FTIR)、紫外-可见光谱(UV-Vis)、质谱(MS)、氢谱(¹H-NMR)及碳谱(¹³C-NMR)等分析测试手段^[9-17]。

3.2 含量检测

3.2.1 薄层扫描法(定性检测)。是 2005 版《中华人民共和国药典》黄芩素的含量测定方法^[5]。以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(10:3:1:2)为展开剂,展开槽中预饱和 30 min,取黄芩素对照品、黄芩素制备物供试品各少许,分别用适量甲醇溶解,聚酰胺薄膜点样,展开,展毕后晾干,置紫外灯下(365 nm)观察荧光。结果黄芩素和黄芩苷的分离效果较好,制备物中含有黄芩素,且黄芩素的荧光斑点较黄芩苷的大且明显^[9]。由此证明由酸水解黄芩苷制备黄芩素的工艺可行,且此工艺能使黄芩苷有较高的转化率。

3.2.2 高效液相色谱法(HPLC)。由于黄芩中苷类与其苷元在极性和含量上的差异,很难用单一的方法使几种成分都达到满意的分离和测定效果,采用高效液相色谱法则可以较好地解决这个问题,因此高效液相色谱法成为 2005 年版《中华人民共和国药典》黄芩中黄芩素含量的测定方法。以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,检测波长为 280 nm。Kovacs 等^[18]、宋双红等^[7]、任玲玲等^[19]分别采用 HPLC 分析了不同产地黄芩中黄芩素的含量,色谱柱 Shimadzu C₁₈(4.6 mm × 150.0 mm,5 μ m);测定苷元类用甲醇-乙腈-0.4% 的冰醋酸水溶液(30:20:50),检测波长 275 nm,流速 1.0 ml/min,柱温 40 ℃。应用 HPLC 对中药制剂中黄芩素的含量进行测定,样品不用事先进行分离,简便,准确,重复性好,是目前黄芩素定量分析方法中较为优越的方法,也是质量控制中较常用的方法。

3.2.3 反相高效液相色谱法(RP-HPLC 法)。可应用于大部分的非极性化合物、许多可电离的及离子化合物的分析,是迄今为止 HPLC 中使用最广泛的技术。张箭等^[20]、王彩芳等^[21]对《中华人民共和国药典》中黄芩素的测定方法进行了改进,用 RP-HPLC 方法,C₈ 色谱柱(5 μ m, 200.0 mm × 4.6 mm),流动相为水-乙腈-甲醇(54:28:18,V:V:V,含 0.5% 三

乙铵, pH 值 2.8), 检测波长 276 nm。在 30 min 内完成黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和千层纸素 A 的分离和含量测定, 每种成分在各自的浓度范围内均具有良好的线性相关性; 加样回收率为 99.0% ~ 104.6%, 其相对标准偏差为 1.65% ~ 3.52%。该法操作简便, 快速, 结果准确。赵春颖等建立了 RP-HPLC 测定黄芩素含量的方法, Discovery C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 紫外检测波长 275 nm, 柱温 32 °C, 流速 1.0 ml/min, 进样量 10 μl, 流动相为甲醇-水-冰醋酸(48:52:0.2)^[9]。定量方法操作简单, 结果准确可靠, 重现性好, 可作为黄芩素含量测定的常用方法。

4 抗糖尿病作用及作用机制

近年来的研究表明, 体内产生的活性氧自由基增加、肥胖及伴发的高血脂和高血压等与糖尿病发生及其并发症的发生有密切关系, 而氧化自由基离子的攻击是诱发糖尿病的主要原因^[22]。黄芩素抗糖尿病及其并发症的作用机理主要包括: 清除自由基, 抗脂质过氧化, 纠正蛋白质和脂肪代谢紊乱; 抑制蛋白激酶 C 活性; 抗炎, 增强免疫功能; 改善微循环等。

4.1 清除自由基和抗氧化作用

自由基是体内新陈代谢的产物, 在正常情况下, 它的产生和消除是趋于平衡的。但在工作压力过大、肥胖、运动不足、空气和水污染、食品添加剂、农药、重金属、辐射等影响下会造成体内自由基的产生和大量积累, 加剧自由基对人体生物膜脂质的攻击, 从而产生大量的过氧化脂质及其次级代谢产物。这些具有高活性及高反应性的活性氧和脂质过氧化物, 进而与蛋白质、氨基酸、DNA 等形成复合物, 使蛋白变性、机体内信号传导受阻而引发糖尿病^[22]。中药黄酮类化合物因其 2,3 双键和 4 位羰基以及 3 或 5 位羟基结构, 具有清除超氧阴离子、羟自由基、单线态氧、过氧自由基以及烷氧自由基等活性氧的功能。黄芩素通过酚羟基与自由基反应生成较稳定的半醌式自由基, 在过氧化氢酶的存在下, 能快速地诱导过氧化氢代谢系统, 从而终止自由基链式反应, 清除自由基。高中洪等的研究显示, 黄芩素可通过形成铁螯合物, 预防氢过氧化物酶、超氧化物阴离子等氧自由基引起的成纤维细胞的损伤, 抑制大鼠脑皮质线粒体脂质过氧化, 使细胞免受 H₂O₂ 诱导的损伤, 其抑制效果明显优于黄芩的其他黄酮类化合物^[23]。电子自旋共振 (ESR) 检测结果显示, 黄芩素 (10 mmol/L) 可有效抑制抗坏血酸-Fe²⁺、水溶性偶氮引发剂 2,2-偶氮二(2-脒基丙烷) 盐酸盐 (AAPH) 及还原型辅酶 II (NADPH) 3 种不同损伤体系诱导的鼠大脑皮质线粒体脂质过氧化作用, 其作用机制是通过减少缺氧状态下线粒体能量消耗, 减少琥珀酸氧化的限制和保护线粒体膜的完整性^[24]。苏亚伦等^[25]从甘肃黄芩的丙酮提取物中分离出黄芩素和甘黄芩苷元, 这 2 种成分具有较强抗氧化活性, 明显高于常用的食品抗氧化剂丁基羟基茴香醚 (BHT) 的抗氧化活性。

蛋白非酶糖基化反应在糖尿病慢性并发症的发病中起着重要作用。血糖升高是蛋白质发生过度糖基化反应的一个重要启动因素, 而氧自由基相关的氧化过程可促进糖基化反应。不仅如此, 氧化损伤包括葡萄糖自身氧化产生的自由基代谢应激以及组织损伤产生的自由基及其引发的脂质过

氧化损伤, 在 DN 等微血管病变的发生发展中起重要作用。脂质过氧化物对机体有多方面损害, 尤其在促发糖尿病微血管病变中有重要作用。丙二醛 (MDA) 是氧自由基脂质过氧化的最终产物, 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 是体内清除氧自由基抗氧化酶系统的成员之一。在未出现肾脏组织学改变以前的糖尿病早期, 肾脏脂质过氧化物水平已明显增高, SOD 和 CAT 活性已明显降低。黄芩素具有很强的抗氧化和抑制脂加氧酶 (LO) 作用, 可提高 DN 大鼠肾脏 SOD 和 CAT 活性, 减少肾脏 MDA 形成, 从而显著减轻 DN 大鼠肾脏自由基代谢紊乱^[26]。

4.2 改善血循环

4.2.1 改善肾脏微循环。

糖尿病性肾脏病变是严重的微血管并发症, 是糖尿病人死亡的主要原因之一。该病的发生发展是由于糖尿病的高血糖使基膜中蛋白质发生糖基化, 引起基膜蛋白沉淀, 造成毛细血管基底膜增厚。基膜中纤维联结蛋白质糖化, 使正常的胶原纤维之间的联结减少, 造成肾小球滤过膜的孔径增大。红细胞膜蛋白质糖基化, 造成其携氧能力下降, 变形能力降低, 进一步导致肾脏微血管内缺氧及内皮损伤, 并引发微血管病变。在 I 型糖尿病伴微量蛋白尿及显性肾病的患者中, 血浆内皮细胞黏附分子 I (SLAM-1) 和细胞间黏附分子 I (ICAM-1) 浓度升高。Kimura 等^[27-28]检测了黄芩的 9 种黄酮类化合物对白细胞介素 (IL-1) 和肿瘤坏死因子在体外培养的人脐静脉内皮细胞诱导的黏附分子的表达影响, 发现黄芩素可以抑制 IL-1 和 TNF 诱导的 E-LAM-1 和 ICAM-1 的表达。

4.2.2 抗凝和抗血栓形成作用。

糖尿病患者都存在着不同程度的心血管障碍既是血栓形成过程中的重要现象, 又是导致糖尿病并发症发生以及病情加剧的重要因素之一; 所以防止血栓形成对于预防和控制糖尿病并发症有重要的意义。在动物模型中, 用标准抗血栓药阿司匹林和肝素作对照, 黄芩素 (1.0 mg) 可抑制胶原诱导的大鼠血小板聚集作用, 抑制凝血酶诱导的纤维蛋白原转化为纤维蛋白, 对花生四烯酸诱导的血小板聚集也有抑制作用, 并防止由内毒素诱导的弥散性血管内凝血 (DIC) 及大鼠血小板和纤维蛋白原的减少。其机制可能与黄芩素对 IL-1β 和 TNF-α 在血管内皮细胞诱导 PAI-1 生成的抑制有关。凝血酶和凝血酶受体激活肽可诱导组织型纤维蛋白溶酶原激活剂 (t-PA) 和纤维蛋白溶酶原激活抑制剂-1 (PAI-1) 的产生, 并提高细胞间游离钙的浓度。黄芩素能抑制凝血酶及凝血酶受体紧张肽诱导的血纤维蛋白溶酶原激活剂抑制因子-1 (PAI-1) 的生成, 其机制也许是降低了 Ca²⁺ 的升高, 提示黄芩素可能成为一个治疗动脉硬化和抗血栓形成的药物, 对糖尿病微血管病变和大血管病变有一定的防治作用^[29]。

4.2.3 双重调节血管平滑肌。

最新研究表明, 黄芩素在低浓度 (0.3 ~ 10.0 μmol/L) 时引起血管收缩, 高浓度 (30.0 ~ 300.0 μmol/L) 时引起舒张。其可能的机制是低浓度抑制内皮细胞一氧化氮 (NO) 的合成和释放, 对离体大鼠肠系膜动脉起收缩作用, 并抑制内皮依赖性的舒张; 高浓度抑制蛋白激酶 c (PKC) 介导的收缩机制, 引起舒张作用^[30]。同时, 通过研究黄芩素对培养兔血管平滑肌细胞增殖反应的影响, 发现

黄芩素可特异性抑制血管平滑肌内皮细胞质的磷脂酶 A₂ 代谢,来抑制血管内皮平滑肌细胞的增殖、移行和分化,对血小板源性生长因子刺激的增殖反应抑制作用强于血清刺激的增殖,也许是预防动脉粥样硬化和再狭窄病理改变的较好药物^[31]。

4.3 降低血压 肽类激素血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)是一种强力血管收缩剂,能够导致全身和肾小球局部高血压,从而促进肾脏疾病的发展。研究表明,Ang Ⅱ的增压作用是通过 LO 来实现的。黄芩素是 12-LO 的特异性抑制剂,有拮抗 Ang Ⅱ引起的血压升高作用,减轻肾小球高压、高灌注、高滤过,延缓肾脏病的发展;但不影响血压正常大鼠的血压,只对高血压大鼠的血压有降低作用^[32]。另外,黄芩素对高糖条件下的平滑肌细胞增殖的抑制作用,可阻止因高糖引起的血管腔减小导致的高血压。因此,黄芩素有望成为糖尿病辅助药物治疗因糖尿病引起的血压升高^[33]。

4.4 降低血脂水平 糖尿病患者常有脂代谢紊乱,脂代谢紊乱则是肾脏损害的一个加重因素。在实验性糖尿病模型中,可发现大量脂质在肾小球沉积,并与肾小球损害程度相一致,提示脂代谢紊乱是糖尿病性肾病(DN)损伤的一个独立因素。黄芩素(100 mg/kg)灌胃使实验性高血脂大鼠血清高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-ch)含量由(44.9 ± 2.8) mg 升高至(50.9 ± 2.1) mg,显著降低大鼠肝组织胆固醇、甘油三酯和血清游离脂肪酸、甘油三酯浓度,对大鼠脂肪组织的脂解也有抑制作用,黄芩素显著抑制肾上腺素的脂解作用,可见黄芩素对脂代谢的影响是多方面的。

4.5 抑制蛋白激酶 C (PKC) 的激活 DN 是糖尿病较常见而严重的慢性并发症之一。近年来研究表明,二乙酰甘油(DAG)-PKC 通路的活化在 DN 的发生发展中起着十分重要的作用,即糖尿病或高糖时,由葡萄糖代谢所引起的 3-磷酸甘油醛生成增多,导致 DAG 从头合成增加,DAG 为 PKC 内源性激活剂,促使 PKC 移位到细胞膜而被激活。PKC 激活在高糖导致的肾小球系膜细胞及肾小管上皮细胞过度合成细胞外基质(ECM)及转化生长因子 β(TGF-β)中起着举足轻重的作用。实验结果表明,黄芩素具有剂量依赖性抑制 PKC 活性的作用,当黄芩素浓度为 200 μmol/L 时可降低近端小管细胞膜 PKC 活性达 68%,通过抑制 PKC 的活性使得高糖环境下近端肾小管细胞胶原蛋白、纤连蛋白及 TGF-β1 基因及蛋白表达抑制,能使上述基因水平分别下降 55%、51%、46%,并显著阻止 TGF-β1 蛋白表达的 51%。提示黄芩素可能对延缓 DN 的进展有一定的作用^[34],在干预糖尿病肾病过程中的作用正受到广泛关注。

4.6 调节细胞因子,保护胰岛 β 细胞不受自身免疫的损伤 细胞因子是由活化的免疫细胞及其相关细胞产生的调节细胞生长及功能的高活性、多功能、低分子量多肽,炎症细胞因子可快速激活 12-LOX,催化 12-HETE 的生成参与炎症的形成。与正常鼠相比,链脲霉素诱导的糖尿病鼠 12-LOX 的表达上调了 2 倍,12-HETE 的生成也增加 2 倍,12-LOX 缺乏的鼠给予链脲佐菌素不会形成糖尿病。炎症和细胞因子诱导的胰岛 β 细胞毒性是自身免疫性糖尿病形成的主要原因,黄芩素可部分地逆转细胞因子诱导的胰岛 β 细胞死亡和

胰岛素分泌的抑制,其作用机制是通过抑制 12-LOX 来保护胰岛 β 细胞不受自体免疫的损伤^[35]。另外,12-LOX 作用于肾脏的炎症形成和在肾细胞的死亡而参与糖尿病肾病的病理过程,80 和 160 mg/(kg · d)的黄芩素可阻止正常培养的肾内皮细胞由于暴露于高糖中所引起的细胞死亡,表明黄芩素通过特异地抑制 12-LOX 发挥治疗糖尿病肾病的作用^[36]。

5 结语

糖尿病及其并发症是影响糖尿病患者生活质量和导致患者死亡的主要因素。虽然国内外学者针对相关调控基因也研发了大量新药,但迄今为止糖尿病及其并发症治疗药物均只能暂时调控血糖,并不能防止高血糖累及肾脏、神经、视网膜、心血管等所致的糖尿病慢性并发症包括失明、心脑血管疾病、肾功能衰竭、神经病变等的发生,且都伴有不同程度的毒副作用。近年来开发的 ARIs、PKC 抑制剂等化学药物,均由于不良反应严重而未能在临床上应用。因此,从天然药物中寻找较为安全有效的治疗糖尿病及其并发症的药物是新药研发的一条思路。黄芩素是黄芩的有效成分之一,除具有传统的抗炎、抗变态、抗病毒等活性之外,近年来对其抗氧化、抗凝血、抗高血压、调节免疫以及对脂肪细胞分化的作用等与抗糖尿病相关的研究日趋深入,黄芩素有望在糖尿病的防治过程中扮演重要角色。但值得注意的是:随着新药理作用的不断发现,从黄芩中提取的黄芩素等活性成分大量用于制药工业、化妆品制造等行业,将对黄芩药材的需求不断增加。因此,必须重视对野生黄芩资源保护和合理开发利用,同时应加强黄芩的人工种植技术和方法的研究,确保黄芩药材质量。

参考文献

- [1] 于晶,陈君,肖新月,等. 不同来源黄芩产量及质量性状的比较研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(7):494.
- [2] 杨娟,傅军鹏. 黄芩活性成分及药效研究近况[J]. 实用医药杂志,2004,21(3):271-273.
- [3] 温华珍,尚盛元,王义明,等. 黄芩化学成分及炮制学研究[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(6):575-580.
- [4] 许文杰,丁启龙. 黄芩素的药理学研究进展[J]. 江苏药学与临床研究,2006,14(2):103-106.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005,31.
- [6] 姚亚红,张立伟. 黄芩素稳定性研究[J]. 光谱实验室,2006,23(2):346-348.
- [7] 宋双红,张媛,王括之. HPLC 测定不同产地黄芩中黄酮化合物的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(7):598-600.
- [8] 许润,肖功胜,杨云. 黄芩素制备工艺研究[J]. 中国实用医药,2008,3(12):3-4.
- [9] 赵春颖,王汝兴. 黄芩素制备工艺及含量测定方法的研究[J]. 承德医学院学报,2007,24(3):239-241.
- [10] 梁英,韩鲁佳,任成才,等. 黄芩黄酮浸提工艺优化研究[J]. 中成药,2008,30(7):1068-1070.
- [11] 刘云华,黄志芳,陈燕,等. 酶解法提取黄芩中黄芩素的工艺研究[J]. 天然产物研究与开发,2007,19(4):688-691.
- [12] 王宏志,喻春皓,高钧,等. 酶法提取黄芩中黄芩素、汉黄芩素[J]. 中药材,2007,30(7):851-854.
- [13] 蒋建军,董慧茹. 高纯度黄芩素的制备及表征[J]. 北京化工大学学报:自然科学版,2008,35(3):31-34.
- [14] LI H B, CHEN F. Isolation and purification of baicalin, wogonin and oroxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Chromatography A,2005,1074:107-110.
- [15] 姚亚红,张立伟. 黄芩素提取工艺研究[J]. 西北药学杂志,2008,23(5):280-282.

不好,对峰面积进行积分,发现3个色谱峰面积之和与图2A中峰I的面积大致相等,可见,3种姜黄素在C₃₀柱上的分离效果明显优于C₁₈柱。降低流动相中甲醇的比例,发现当甲醇-水(85:15, v/v)为流动相时,色谱峰在C₁₈柱上的保留时间略有延长,但3种姜黄素仍然合并为1个峰(图2C),而C₃₀柱上3种姜黄素的保留时间明显延长,且分离效果得到了显著改善(图2D)。由此可见,C₃₀固定相较长的烷基链使得固定相的疏水性较强,导致姜黄素的保留时间增加,从而使分离效率提高。

该试验还考察了其他流动相的分离效果,结果发现,乙腈-水与甲醇-水的分离效果相当。为了改善峰型,尝试用0.1%磷酸溶液代替水,发现0.1%磷酸溶液可使峰型更尖锐,同时峰的保留时间无变化。但考虑到磷酸会缩短色谱柱的使用寿命,在常规分析中应使用甲醇-水为流动相。

2.3 定性分析结果 3种姜黄素的分子骨架相同,具有相同的发色团,这些特点决定了它们具有相似的吸收光谱,但不同结构式姜黄素苯环上甲氧基的个数不同,由于甲氧基为供电子基,可导致吸收光谱红移,且甲氧基个数越多,红移幅度越大,因此,根据最大吸收波长的不同可对不同组分进行定性分析。图2D中3个色谱峰的最大吸收波长分别为419、423、428 nm(分别对应图3B~D),因此,可判断3种组分分别为去二甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素和姜黄素。

3 结论

该研究考察了姜黄素类化合物在C₁₈柱和C₃₀柱上的分离情况,发现在相同洗脱条件下,3种姜黄素在C₃₀柱上的分

离效果远优于C₁₈柱;研究中使用组成简单的甲醇-水为流动相,不必通过复杂的梯度洗脱程序就可获得基线分离,且分离时间较短。该方法简单易行,适用于姜黄素成分的常规分析。

参考文献

- [1] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定[M]. 北京:人民卫生出版社, 1997:512.
 - [2] 韩婷, 宓鹤鸣. 姜黄的化学成分及药理活性研究进展[J]. 解放军药学学报, 2001, 17(2): 95-97.
 - [3] RASMUSSEN C, KVISTL K. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiproteolytic constituent of *Curcuma longa* [J]. *Planta Med*, 2000, 66: 396-397.
 - [4] 吴伟志, 袁翠美. 姜黄素的高效液相色谱分析[J]. 中国野生植物资源, 1999, 18(3): 56-57.
 - [5] 彭炳先, 周欣, 王道平, 等. HPLC法测定姜黄、莪术、郁金中三种姜黄素的含量[J]. 中药材, 2004, 27(11): 813-815.
 - [6] 王琰, 胡文言, 王慕邨. HPLC法测定中药莪术中3种姜黄素的含量[J]. 药学学报, 1999, 34(6): 467-470.
 - [7] 丘振文, 罗丹冬, 任结梅. HPLC法测定通络胶囊中姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素的含量[J]. 药品评价, 2006, 3(2): 111-113.
 - [8] 惠伯棣, 李京, 裴凌鹏, 等. C₃₀-HPLC-PDA分离与鉴定β, β-胡萝卜素几何异构体[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 252-255.
 - [9] 惠伯棣, 李京, 孙拿拿, 等. 番茄和胡萝卜中类胡萝卜素的C₃₀与C₁₈ HPLC分离[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(4): 289-292.
 - [10] 张艳, 惠伯棣, 裴凌鹏, 等. C₃₀柱分离万寿菊花中的叶黄素类化合物初探[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 424-428.
 - [11] 惠伯棣, 李京, 裴凌鹏. 应用C₃₀-HPLC-PDA分离与鉴定番茄红素几何异构体[J]. 食品工业科技, 2006, 27(7): 49-52.
 - [12] 裴凌鹏, 惠伯棣, 刘蕊, 等. C₃₀-HPLC-PDA分离与鉴定虾青素类化合物初探[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 323-326.
 - [13] 王政, 惠伯棣, 张静, 等. 姜黄中姜黄素的C₃₀-HPLC-PDA分离[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 241-243.
 - [14] 邢丙聪, 邵青松, 胡润淮. 温郁金姜黄素类化合物的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16): 7516-7518.
- (上接第15651页)
- [16] 冯云霞, 杨云, 王俊敏, 等. 黄芩总黄酮的分离纯化工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(2): 193-196.
 - [17] 李云霞, 索全伶, 贺文智, 等. 黄芩素的分离纯化与结构表征[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(8): 1895-1899.
 - [18] KOVACS G, KUZOVKINA I N, SZOKE E, et al. HPLC determination of flavonoids in hairy-root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Chrom Suppl*, 2004, 60: 84-88.
 - [19] 任玲玲, 张春枝, 陈吉平, 等. 黄芩的抗菌活性及HPLC分析[J]. 精细化工, 2005, 22(8): 589-590.
 - [20] 张箭, 肖丽和, 李发关. RP-HPLC法测定黄芩属四种药材中五个活性成分的含量[J]. 中药材, 2005, 28(5): 389-391.
 - [21] 王彩芳, 张红岭, 代桂丽, 等. 正交实验优选黄芩中黄芩素提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2509-2510.
 - [22] MROWICKA M. Free-radical reactions in diabetes mellitus [J]. *Pol Merkurizus Lek*, 2005, 19(112): 571-576.
 - [23] 高中洪, 黄开勋, 卞曙光, 等. 黄芩黄酮对自由基引起的大鼠脑线粒体损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1): 81-83.
 - [24] 高中洪, 黄开勋, 徐辉碧. 黄芩黄酮对自由基清除作用的ESR研究[J]. 华中理工大学学报, 1999, 27(1): 97-99.
 - [25] 苏亚伦, 黄聿, 陈振宇. 甘肃黄芩抗氧化有效成分的分离鉴定[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 863-864.
 - [26] 陈丽, 刘晓城. 黄芩对糖尿病大鼠肾脏病变的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2003, 11(6): 433-437.
 - [27] KIMURA Y, OKUDA H, OGITA Z. Effects of flavonoids isolated from *scutellariae radix* on fibrolytic system induced by trypsin in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60(6): 598-601.
 - [28] CLAUSEN P, JACOBSEN P, BOSSING K, et al. Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with Type I diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy [J]. *Diabetic Med*, 2000, 17(9): 644-649.
 - [29] NAKAMURA N, HAYASAKA S, ZHANG X Y, et al. Effects of baicalin, baicalein, and wogonin on interleukin-6 and interleukin-8 expression, and nuclear factor-kappa B binding activities induced by interleukin-1 beta in human retinal pigment epithelial cell line [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 77(2): 195-202.
 - [30] CHEN Z Y, SU Y L, LAU C W, et al. Endothelium-dependent contraction and direct relaxation induced by baicalein in rat mesenteric artery [J]. *Eur J Pharmacology*, 1999, 374(1): 41-47.
 - [31] TAKIZAWA H, DELLIPIZZI A W, NASHLETTI A. Prostaglandin I₂ contributes to the vasodepressor effect of baicalein in hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 1998, 31(3): 866-871.
 - [32] 益文杰, 张丽敏, 佟继铭. 黄芩茎叶总黄酮对正常及肾动脉狭窄模型大鼠血压的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(31): 179-182.
 - [33] CHEN M, YANG Z D, SMITH K M, et al. Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(3): 486-495.
 - [34] 沈雯, 陆福明, 顾勇, 等. 黄芩素对高糖诱导近端肾小管上皮细胞外基质及转化生长因子β1表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2003, 19(3): 173-176.
 - [35] CHEN M, YANG Z D, SMITH K M, et al. Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(3): 486-495.
 - [36] 吴泽成, 刘慎微, 董骏武, 等. 12-脂氧合酶抑制剂黄芩素对II型糖尿病大鼠肾脏细胞外基质的影响及机制[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(2): 116-120.
 - [37] 张东向, 李富雄. 黄芩愈伤组织培养与快速繁殖条件的优化研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 36(29): 12600-12601, 12621.
 - [38] 齐香君, 郭永康, 陈秀清. 黄芩毛状根的生长与产物代谢动态研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 36(30): 13226-13227.
 - [39] 华智锐, 李小玲. 黄芩组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(13): 5293-5294.
 - [40] 石春红, 郑有飞. 超声波法提取黄芩中总黄酮的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17): 7287-7289.