

- 国慢性病预防与控制,2005,13(3):139-141.
- [10] 张晋,王晓良.内皮源性血管活性因子的研究进展[J].中国药理学通报,2000,16(1):11-15.
- [11] 唐晓红,张艳玲,王莹莹.肾性高血压的诊治[J].现代临床医学,2011,37(5):382-385.
- [12] CHENG C,ZHENG Z,SHI C, et al. Advanced glycation end-products reduce podocyte adhesion by activating the renin-angiotensin system and increasing integrin-linked kinase[J].Exp Ther Med,2013,6(6):1494-1498.
- [13] HIGAKI J,AOKI M,MORISHITA R,et al.*In vivo* evidence of the importance of cardiac angiotensin-converting enzyme in the pathogenesis of cardiac hypertrophy[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000,20(2):428-434.
- [14] 刘欣,殷惠军. β -arrestin 介导的血管紧张素 II 受体信号通路与心血管疾病[J].中华老年心脑血管病杂志,2016,18(2):205-207.
- [15] 柏丹娜,高延,王海昌,等.Inpp5f 抑制血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大反应[J].心脏杂志,2016,28(2):145-148.
- [16] BARBATR A,RUSSO P,SIANI A, et al. Aldosterone synthase gene (cyp11b2) C-344T polymorphism, plasma aldosterone renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population [J].J Hypertens,2004,22(10):1895-1901.

红花龙胆血清药物化学初步研究*

赵琳璐^{1,2},罗君³,卿娟⁴,武春兰³,张丽艳¹,叶世芸¹

(1.贵阳中医学院,贵阳 550002;2.贵阳新天社区卫生服务中心,贵阳 550008;3.贵阳中医学院第一附属医院药剂科,贵阳 550001;4.贵州省修文县疾病预防控制中心,贵阳 550200)

摘要 目的 研究红花龙胆血清药物化学,探讨红花龙胆药效作用的物质基础。方法 采用血清药物化学研究方法,在建立红花龙胆高效液相色谱(HPLC)指纹图谱的基础上,比较红花龙胆提取物、红花龙胆含药血清、空白血清 HPLC 指纹图谱差异,确认红花龙胆提取液灌胃后大鼠含药血清的移行成分。结果 在红花龙胆含药血清中发现 20 个入血成分,4 个为原型成分,其余 16 个可能为原型成分代谢产物。结论 20 个入血成分可能是红花龙胆的体内直接作用物质,对其进行深入研究可能有助于阐明红花龙胆的药效物质基础及药效机制。

关键词 红花龙胆;血清药物化学;指纹图谱;色谱法,高效液相

中图分类号 R286;R969

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)07-0750-03

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.07.007

Preliminary Study on Serum Pharmacochemistry of *Gentiana rhodantha*

ZHAO Linjun^{1,2}, LUO Jun³, QING Juan⁴, WU Chunlan³, ZHANG Liyan¹, YE Shiyun¹ (1. Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. The Community Health Service of Xintian in Guiyang, Guiyang 550008, China; 3. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550001, China; 4. Center for Disease Control and Prevention of Xiuwen City, Guizhou Province, Guiyang 550200, China)

ABSTRACT Objective To explore the bioactive constituents of *Gentiana rhodantha* for its serum pharmacochemistry research. **Methods** The blood migrating constituents of *Gentiana rhodantha* were determined by comparing the HPLC fingerprints of the aqueous extracts, drug contained serum and blank serum. **Results** Twenty compounds were detected in drug contained serum, four among which were original constituents of *Gentiana rhodantha*, the rest might be metabolites of the original ingredients. **Conclusion** These twenty constituents absorbed in blood could be the bioactive components of *Gentiana rhodantha*. Further studies will be useful to clarify the bioactive constituents and action mechanisms of *Gentiana rhodantha*.

KEY WORDS Extract of *Gentiana rhodantha*; Serum pharmacochemistry; Fingerprint; Chromatography, high performance liquid

中药血清药物化学是以药物化学的研究手段和方法为基础,分析鉴定中药口服后血清中移行成分,研究其药效相关性,确定中药药效物质基础并研究其体内过程的应用学科^[1]。红花龙胆为龙胆科植物红花龙胆(*Gentiana rhodantha* Franch.)的干燥根,收载于《贵

州省中药材、民族药材质量标准》2003 年版^[2],为贵州苗族习用药材(苗药名“锐定谋”)。具有清热燥湿、解毒泻火、止咳的功效,用于湿热黄疸、肺热咳嗽、小便不利等症^[3]。其为肺力咳胶囊、康妇灵胶囊等制剂的主要原药材。目前,笔者尚未见红花龙胆有效成分和药

效物质基础的相关研究,虽有选择以芒果苷建立红花龙胆质量标准的报道^[4],但尚无确凿数据为其佐证。因此,运用血清药物化学对红花龙胆的入血移行成分进行研究,为质量控制提供依据成了亟待解决的共性问题。基于此,笔者建立了红花龙胆药材及其提取液灌胃后大鼠血清高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,通过色谱峰相关性研究,初步确定了其入血移行成分,以期确定红花龙胆在体内的有效组分群,为进一步完善其质量标准及其药效物质基础研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(DAD 检测器);AY120 型电子天平(梅特勒-托利多公司,感量:0.000 1 g);12620-840 涡旋混合器(美国 VWR 公司);MCD-250RD 低温高速离心机(日本 ASONE 公司);MTN-2800D 氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器有限公司);eppendorf 移液器(德国)。

1.2 试药 芒果苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111607-200402,含量:98.4%),供含量测定用。乙腈为色谱醇,甲醇、磷酸均为分析纯,乙醇为食用级,水为娃哈哈纯净水。红花龙胆药材采自贵州省贵阳市花溪,经贵阳中医学院魏升华副教授鉴定为红花龙胆(*Gentiana rhodantha* Franch.)的干燥根,洗净后 60 ℃ 烘干。

1.3 实验动物 SD 大鼠,雌雄各半,体质量(200±20)g,购于第三军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(军)2012-0003。

1.4 溶液的制备

1.4.1 对照品溶液的制备 取干燥至恒重的芒果苷对照品适量,加甲醇制成 0.113 5 mg·mL⁻¹对照品溶

液。

1.4.2 红花龙胆药材供试液的制备 取红花龙胆药材,加 10 倍量 50%乙醇回流 2 h,滤过;滤渣用 8 倍量 50%乙醇回流 1 h。合并 2 次滤液,浓缩并转移至量瓶,加水定容至刻度,使含生药 0.175 g·mL⁻¹,密封,于 4 ℃ 冰箱冷藏保存。

另取供试液 100 μL,加甲醇定容至 10 mL,过孔径 0.45 μm 微孔滤膜,供分析测试备用。

1.5 血清样品的制备

1.5.1 给药方案 取 SD 大鼠 36 只,按照体质量由轻到重顺序编号并划分为 6 个群体,按照随机数字表法随机分为 6 组,即空白对照组和 5 个给药组,每组 6 只。给药组按 1.75 g·kg⁻¹剂量灌胃给予红花龙胆提取物溶液,每天 2 次,连续 3 d;空白对照组给予等量纯化水灌胃。末次给药前 12 h 禁食,自由饮水。

1.5.2 采血时间的确定 5 个给药组末次给药后,分别于 0.25、0.5、1、2、3 h 用 10%水合氯醛麻醉,经股动脉取血 5 mL,全血静置凝结后,4 000 r·min⁻¹离心 15 min($r=8$ cm),取上清液 0.5 mL,合并同组血清,以消除个体差异,供分析用。

1.5.3 血清样本的预处理 分别取空白血清和含药血清各 1 mL,加入甲醇 3 mL,涡旋混合 2 min,12 000 r·min⁻¹离心 20 min($r=8$ cm),取上清液 2 mL,40 ℃ 氮气吹干,加入甲醇 200 μL 复溶,超声处理 2 min,涡旋混合后,12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,备用。

1.6 血清指纹图谱的测定 色谱条件:Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B),梯度洗脱,0~5 min,92%→90.5%B;>5~20 min,90.5%→89.5%B,>20~45 min,89.5%→80%B;>45~80 min,80%→70%B;>80~90 min,70%→68%B;>90~100 min,68%→64%B;>100~105 min,64%B;流速 0.8 mL·min⁻¹;检测波长 245 nm;柱温 25 ℃;进样量 10 μL^[5]。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度实验 取同批红花龙胆药材提取液 1 份,按“1.6”项色谱条件,连续进样 6 次,测得共有峰相对保留时间 RSD 均<1%,相对峰面积 RSD 均<3%,表明仪器精密度良好。

2.1.2 稳定性实验 精密吸取红花龙胆供试品溶液,按“1.6”项方法分别在 0、3、6、9、12、24、48 h 进样检测。其各共有峰相对保留时间 RSD 均<1%,相对峰面积 RSD 均<3%,表明样品在 48 h 内稳定。

收稿日期 2016-05-17 修回日期 2016-06-20

基金项目 *贵州省科技厅贵阳中医学院联合基金(黔科合中药字[2012]LKZ7059);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY2012-04,QZYY2016-099);贵州省科技厅贵阳中医学院第一附属医院联合基金资助项目(黔科合 LH 字[2015]7801);贵阳中医学院院内项目(贵中医科院内[2016]55 号);苗族医学研究协同创新中心项目(黔教合协同创新字[2015]05)

作者简介 赵林珺(1982-),女,贵州贵阳人,主管中药师,在读硕士,主要从事中药民族药质量控制与新药研究。电话:0851-86840425,E-mail:93343673@qq.com。

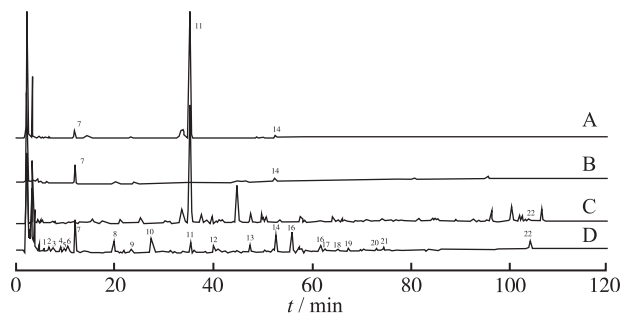
通信作者 罗君(1980-),男,贵州遵义人,副主任药师,硕士,主要从事中药质量控制与新药研究。电话:0851-85639479,E-mail:luojun031009@163.com。

叶世芸(1966-),女,贵州贵阳人,教授,硕士生导师,学士,主要从事药物分析研究。E-mail:lihaolora@sina.com。

2.1.3 重复性实验 取同批红花龙胆药材 6 份,制备供试品溶液,按“1.6”项色谱条件进样分析,记录色谱图,测得其各共有峰的相对保留时间 RSD 均 $<1\%$,相对峰面积 RSD 均 $<3\%$,表明该方法重复性良好。

2.2 各供试品指纹图谱的建立

2.2.1 成分分析 分别吸取红花龙胆提取物供试液、对照品溶液、含药血清、空白血清供试品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图,并比较分析,确定红花龙胆口服吸收后的入血成分,见图 1。



A. 对照品溶液; B. 空白血清; C. 红花龙胆提取物供试液; D. 含药血清

图 1 4 种溶液高效液相色谱图

A. reference solution; B. blank serum; C. *entiana rhodantha* extract; D. the serum containing *Gentiana rhodantha* extract

Fig.1 HPLC chromatogram of four kinds of solution

2.3 含红花龙胆血清移行成分分析及确认 通过比较红花龙胆灌胃液、含红花龙胆提取液血清、空白血清及芒果苷 HPLC 发现,除去血清中的固有成分(7 号、14 号),含红花龙胆血清中出现 20 个移行成分,其中 4 个成分为红花龙胆药材原型成分,即 11, 12, 13 和 22 号峰,通过对照品对照及特征峰紫外光谱图,确认 11 号峰为芒果苷。其余各成分可能为小鼠口服红花龙胆提取液后在体内转化的代谢产物,各代谢物的鉴定和来源有待进一步研究。

3 讨论

实验中笔者对比了水煎、50%乙醇回流等提取方

法,以 50%乙醇溶液做提取溶剂时,色谱峰较多,能更好地反映红花龙胆药材的化学成分信息。对大鼠灌胃红花龙胆药材提取液后不同采血时间进行了对比研究,末次灌胃后 30 min 含药血清指纹图谱色谱峰较多,且峰形较好,峰面积较大。对甲醇和乙酸乙酯不同血清处理方法进行了对比研究,结果表明,甲醇处理含药血清后,能有效去除血清中的蛋白质等杂质,且操作简便,色谱图基线平稳、峰形较好。

芒果苷具有消炎、止咳作用,与红花龙胆药材的功效一致^[5]。实验结果表明,其含药血清指纹图谱中,芒果苷以原型化合物入血,且红花龙胆药材指纹图谱中亦显示芒果苷含量较高。因此选择芒果苷作为红花龙胆药材质量控制指标可行,这为筛选确定红花龙胆的药效成分和质量标准的制订奠定了基础。红花龙胆中尚含马钱苷酸、獐牙菜苦苷、槲皮素、熊果酸、没食子酸乙酯等成分,仅马钱苷酸在部分批次药材中出现,其余均未检测到。然在血清指纹图谱中上述成分均未检测到,可能是上述几种成分在红花龙胆药材中含量较少或检测条件限制,有待进一步研究。

本实验仅对红花龙胆提取液血清药物化学进行了初步研究,分析了 245 nm 波长处有吸收的情况,其余有无紫外吸收的成分尚待进一步研究;采用标准品对照,实验中仅确认了芒果苷一个原型成分,其余化合物尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘晓东,闫明,张兰兰,等.驱虫斑鸠菊血清药物化学的初步研究[J].医药导报,2009,28(6):713-715.
- [2] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药质量标准[M].贵阳:贵州科技出版社,2003:184.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草.第三十五卷-苗药卷[M].贵阳:贵州科技出版社,2005:328.
- [4] 吴立宏,官海峰,俞丽,等.红花龙胆质量标准研究[J].中国中药杂志,2010,35(18):2099-2102.
- [5] 罗君,卿娟,赵琳娟,等.红花龙胆高效液相指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(14):69-72.