

蒙药复方述达格-4特征图谱初步分析^Δ

杜银飞*, 嵇增云, 信莎莎, 董玉*(内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3110-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.19

摘要 目的:分析蒙药复方述达格-4的特征图谱。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Agilent Extend C₁₈, 流动相为 0.4% 乙酸溶液-甲醇(梯度洗脱), 流速为 0.6 mL/min, 检测波长为 286 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL。分别对复方述达格-4 全方及各单味药体内特征图谱进行分析和对比。结果:复方述达格-4 全方体外特征图谱有 47 个峰;其体内特征图谱有 24 个峰, 其中峰 1、4、7~9、12、14、18~20、22、25、38~41、44、46 对应的 18 个成分为体外直接入血成分;各单味药体内特征图谱中峰 1、4、7、8、12、14、18~22、25、40、46 来源于高良姜药材;峰 14、18、19、22、44 来源于木香药材;峰 1、4、7~9、12、14、18、19、22 来源于石菖蒲药材。结论:直接入血成分及代谢产物可能为复方述达格-4 在体内发挥作用的有效成分;该方法可用于其特征图谱的分析。

关键词 蒙药;复方述达格-4;特征图谱;化学成分;体内;体外

Preliminary Analysis of Characteristic Chromatograms of Mongolian Medicine Compound Shudage-4

DU Yinfei, JI Zengyun, XIN Shasha, DONG Yu (College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyse characteristic chromatograms of Mongolian Compound Shudage-4. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Extend C₁₈ with mobile phase consisted of 0.4% acetic acid solution-methanol (gradient elution) at the flow rate of 0.6 mL/min. The detection wavelength was set at 286 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. The *in vivo* and *in vitro* characteristic chromatograms of allsquare of Compound Shudage-4 and single ingredients were analysed and compared respectively. RESULTS: Totally 47 peaks were identified from *in vitro* characteristic chromatograms of allsquare of Compound Shudage-4. There were 24 common peaks from *in vivo* characteristic chromatograms, among which 18 ingredients corresponding to common peaks 1, 4, 7-9, 12, 14, 18-20, 22, 25, 38-41, 44, 46 were direct blood components *in vitro*; peaks 1, 4, 7, 8, 12, 14, 18-22, 25, 40 and 46 of serum test sample were from *Alpinia officinarum*; peaks 14, 18, 19, 22, 44 were from *Aucklandia lappa*; peaks 1, 4, 7-9, 12, 14, 18, 19, 22 were from *Acorus tatarinowii*. CONCLUSIONS: Blood components and some metabolites may be square of Compound Shudage-4. The method can be used for the analysis of characteristic chromatograms of it.

KEYWORDS Mongolian medicine; Compound Shudage-4; Characteristic chromatogram; Chemical component; *in vivo*; *in vitro*

- ease: an expanded review[J]. *World J Hepatol*, 2017, 9 (16):715-732.
- [4] 易学东, 罗亚文. 胆石六号浓缩液在黄疸型肝炎 44 例临床分析[J]. 遵义医学院学报, 2005, 28(1):45.
- [5] 刘燕. 胆石六号颗粒剂的制备工艺、质量控制及初步药效学研究[D]. 遵义:遵义医学院, 2017.
- [6] 胡文兵, 赵静, 陈婷婷, 等. 青钱柳多糖对高脂血症小鼠的降血脂作用及机制初探[J]. 现代食品科技, 2015, 31(11):39-44.
- [7] VAN HERCK MA, VONGHIA L. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: a starter's guide[J]. *Nutrients*, 2017, 9(10):1072-1085.
- [8] 范建高, 曾民德. 脂肪性肝病[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:115-116.
- [9] BEDOSSA P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Liver Int*, 2017, 37(S1):85-90.
- [10] 葛晓春, 王英南, 刘晓燕, 等. 血脂康胶囊治疗绝经后女性 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝的临床观察[J]. 中国药房, 2016, 27(33):4641-4643.
- [11] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病防治指南:2018 年更新版[J]. 实用肝脏病杂志, 2018, 21(2):177-186.
- [12] 陈婷, 叶晓光. 常用非酒精性脂肪性肝病药物治疗方案的药物经济学评价[J]. 肝脏, 2017, 22(9):794-799.
- [13] 熊颖, 王俊文, 邓君. 金钱草和广金钱草的药理作用比较[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11):2106-2111.
- [14] 张荣臻, 毛德文, 王璐, 等. 不同剂量大黄、赤芍对肝衰竭大鼠肝功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(7):1518-1519.
- [15] 肖日传, 罗光明, 张风波, 等. 栀子根醇提物对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(3):114-117.

(收稿日期:2018-01-08 修回日期:2018-03-16)

(编辑:张静)

复方是蒙医临床用药的主要形式,具有组方复杂多样的特点。阐明药效物质基础,找到适用于复杂体系的分析方法,一直是蒙药及其复方研究的关键问题^[1]。除肠道用药和外用药等少数药物外,多数药物的药效物质均以血液为递质运送至作用靶点,产生相应的药理作用^[2]。因此,通过分析含药血清,对血中移行成分进行检测,以确定蒙药复方中的直接作用物质,是其药效物质基础研究的有效途径之一^[3]。

复方述达格-4又名菖蒲四味,由高良姜、紫硃砂、木香、石菖蒲4味药材按质量比4:2:1:1组合而成,临床多用于膈肌痉挛、胸闷气短、胸肋刺痛、消化不良等症的治疗,是蒙医常用的消喘止痛传统配方。《国家卫生部药品标准·蒙药分册》^[4]仅涉及复方述达格-4各味药材的鉴别与含量测定,并未记载此复方。本课题组前期对复方述达格-4的化学成分、质量控制、药理作用方面进行了大量研究^[5-9],但对其特征图谱涉及较少。因此,本试验采用高效液相色谱法(HPLC)对复方述达格-4特征图谱初步分析,为其后续药动学研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括DEACB06007梯度泵、DEAAC21236自动进样器、DEAAX04861检测器、JPAAJ82372柱温箱、DEACN22944化学工作站(美国Agilent公司);BT25S型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-S型电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);Vortex-GENIE型微型漩涡混合仪(美国Scientific Industries公司);3-18K型低温高速离心机(美国Sigma公司);移液器(德国Eppendorf公司,规格:0.5~10、10~100、20~200 μL);BCD-272型冰箱(博西华家用电器有限公司)。

1.2 试剂

山柰酚对照品(批号:20160328,纯度:99.8%)、山柰素对照品(批号:20160812,纯度:99.8%)、高良姜素-3-甲醚对照品(批号:20170919,纯度:99.8%)均购自北京坛墨质检科技有限公司;芦丁对照品(批号:100080-201209,纯度:99.4%)、茴香酸对照品(批号:100097-199402,纯度:99.8%)、槲皮素对照品(批号:100081-200406,纯度:99.8%)、丁香酚对照品(批号:110725-201414,纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;1-苯基-7-(3-甲氧基-4-羟基)苯基-5-醇-3-庚酮对照品、高良姜素对照品(内蒙古医科大学药学院生药学实验室自制,经质谱、碳谱鉴定结构,经HPLC法检测以峰面积归一化法计算纯度均大于95%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

高良姜(批号:150201)、紫硃砂(批号:170701)、木香(批号:170601)、石菖蒲(批号:171001144)药材均购自内蒙古天立药业有限公司,经内蒙古医科大学药学院

李骁副教授鉴定为真品。

1.4 动物

清洁级健康Wistar大鼠36只,雄性,约2月龄,体质量250~300 g,由内蒙古医科大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(蒙)2015-0001;动物使用许可证号:SYXK(蒙)2015-0001]。标准条件饲养,自由进食、饮水,适宜温度、湿度,人工黑暗和光照交替。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Extend C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.4%乙酸溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.6 mL/min;检测波长:286 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

时间,min	A, %	B, %
0	35	65
15	37	63
25	43	57
35	48	52
40	52	48
45	55	45
65	62	38
70	70	30
90	100	0

2.2 溶液和血清的制备

2.2.1 对照品溶液 分别称取高良姜素、山柰酚、山柰素、高良姜素-3-甲醚、芦丁、茴香酸、槲皮素、丁香酚、1-苯基-7-(3-甲氧基-4-羟基)苯基-5-醇-3-庚酮对照品各适量,分别加甲醇溶解,制成单一对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取复方述达格-4方中高良姜、紫硃砂、木香、石菖蒲药材(4:2:1:1, m/m/m/m)共约20 kg,乙醇回流提取2次,合并提取液(回收溶剂),超声(功率:250 W,频率:40 kHz)处理5 min,经大孔树脂柱洗脱,洗脱液浓缩干燥得粉末(全方);各单味药按全方比例分别同法制成粉末,分别加甲醇溶解,4 ℃贮藏,备用。

2.2.3 空白血清和含药血清 36只大鼠随机分成空白对照组(等体积水)、复方述达格-4(全方)组(6.3 g/kg)、高良姜组(6.3 g/kg)、紫硃砂组(6.3 g/kg)、木香组(6.3 g/kg)、石菖蒲组(6.3 g/kg)^[8],每组6只。各给药组大鼠灌胃相应药物,空白对照组大鼠灌胃等体积水1次。大鼠给药120 min后,乙醚吸入麻醉,腹主动脉采血适量,以3 000 r/min离心10 min,取上清液,即得空白血清和各含药血清,置于-20 ℃冰箱中贮藏,备用。

2.2.4 供试血清 分别取“2.2.3”项下空白血清和各含药血清0.5 mL,分别置于10 mL离心管中,加入2 mL乙腈,涡旋1 min,以3 000 r/min离心10 min,取上清液,氮气吹干,精密加入0.15 mL水使沉淀充分溶解,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下单一对照品溶液各适量,按“2.1”项下

色谱条件进样测定。结果,理论板数以高良姜素、山柰酚、山柰素、高良姜素-3-甲醚、芦丁、茴香酸、槲皮素、丁香酚、1-苯基-7-(3-甲氧基-4-羟基)苯基-5-醇-3-庚酮峰计均不低于3 000;基线分离良好,分离度均大于1.5。

2.4 复方述达格-4全方及各单味药体外特征图谱分析

取“2.2.2”项下供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,复方述达格-4全方体外特征图谱显示有47个峰,其中,峰1~8、12、15~18、20、23~30、35、38~43、46来源于高良

姜药材;峰2~4、6~11、13、15、16、18、19、22、24来源于木香药材;峰1~3、5、11~16、18、19、23、24、28、29、32、33、36、39、41~44来源于石菖蒲药材。经与对照品色谱图比对,确定峰10对应成分为芦丁,峰11对应成分为茴香酸,峰20对应成分为槲皮素,峰22对应成分为丁香酚,峰24对应成分为山柰酚,峰29对应成分为1-苯基-7-(3-甲氧基-4-羟基)苯基-5-醇-3-庚酮,峰38对应成分为高良姜素,峰39对应成分为山柰素,峰40对应成分为高良姜素-3-甲醚。



图1 复方述达格-4全方及各单味药体内特征图谱

Fig 1 *in vitro* characteristic chromatograms of allsquare of Compound Shudage-4 and single ingredients

2.5 复方述达格-4全方体内特征图谱分析

取“2.2.4”项下复方述达格-4全方供试血清和空白供试血清各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2。由图2可知,复方述达格-4全方体内特征图谱与图1A比对,峰1、4、7~9、12、14、18~20、22、25、38~41、44、46对应的18个成分为共同存在的成分(即体外直接入血成分),其他成分在图1A中未找到对应峰,推测为代谢产物;峰14、19、20、22、44对应的成分在血中相对含量增高(峰面积增大),而峰38~41对应的成分入血后其相对含量降低(峰面积减小)。

2.6 复方述达格-4各单味药体内特征图谱分析

取“2.2.4”项下各单味药供试血清和空白供试血清

各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图3。经图3与图2A对比可知,峰1、4、7、8、12、14、18~22、25、40、46来源于高良姜药材;峰14、18、19、22、44来源于木香药材;峰1、4、7~9、12、14、18、19、22来源于石菖蒲药材。经与对照品色谱图比对,确定峰20对应成分为槲皮素,峰22对应成分为丁香酚,峰24对应成分为山柰酚,峰38对应成分为高良姜素,峰39对应成分为山柰素,峰40对应成分为高良姜素-3-甲醚。

3 讨论

一般认为,生物样品中内源性杂质较多,所含成分复杂,且相关成分含量较低,为了凸显待测成分、保护色谱柱,需对生物样品进行前处理。常用的处理方法包括

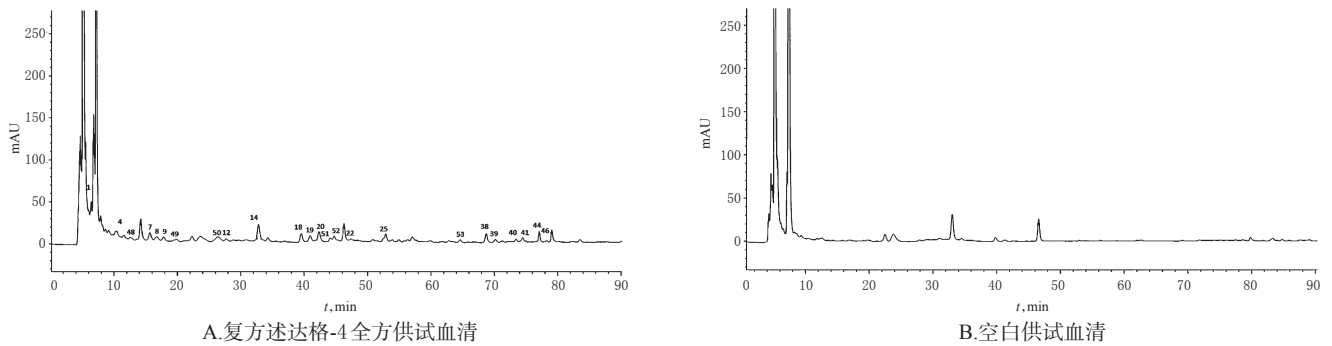


图2 复方述达格-4全方体内特征图谱

Fig 2 *in vivo* characteristic chromatogram of allsquare of Compound Shudage-4



图3 各单味药体内特征图谱

Fig 3 *in vivo* characteristic chromatogram of single ingredients

有机溶剂沉淀蛋白法、强酸沉淀蛋白法、重金属盐沉淀蛋白法、液液萃取法等^[10]。预试验中,笔者分别考察了以乙腈或甲醇或L-抗坏血酸+乙酸乙酯处理血清的效果。结果发现,采用乙腈处理血清样品后可得较全的色谱峰,因此确定以乙腈与血清按体积比4:1进行处理,去除蛋白质。

预试验中,笔者采用腹主动脉采血,分别考察了大鼠灌胃给药30、60、90、120、150、180 min后血清样品的HPLC图。经比较发现,大鼠灌胃给药120 min后血清样

品的HPLC图色谱峰数目较多,因此确定120 min为最终采血时间点。

经复方述达格-4全方体内特征图谱对比,发现有24个血中移行成分,其中有18个成分为体外直接入血成分,另外6个成分推测为代谢产物。其中,高良姜素、山柰素与高良姜素-3-甲醚在体外特征图谱中相对峰面积较大,但三者体内特征图谱中相对峰面积明显减小。经分析,可能是由于高良姜素、山柰素与高良姜素-3-甲醚在体内未被充分游离或者是代谢为其他产

藏药麻花秦艽不同部位醇提物的抗炎作用研究^Δ

包婷雯^{1,2*}, 左明丽^{1,2,3}, 王敏^{1,3}, 王怡^{1,2}, 姚政^{1,3}, 林鹏程^{1,2,3#}(1.青海民族大学药学院, 西宁 810007; 2.青海省青藏高原植物资源化学研究重点实验室, 西宁 810007; 3.青海省药物分析重点实验室, 西宁 810007)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3114-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.20

摘要 目的:观察藏药麻花秦艽不同部位醇提物的抗炎作用。方法:72只雄性SPF级昆明种小鼠随机分为模型组[等体积0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液]、醋酸泼尼松组(10 mg/kg)及麻花秦艽地上部位醇提物低、高剂量组(10、30 g/kg)与麻花秦艽地下部位醇提物低、高剂量组(10、30 g/kg),每组12只;灌胃给药,每天2次,连续6次;末次给药40 min后于小鼠右耳廓正反两面均匀涂抹二甲苯(0.05 mL)以建立耳肿胀模型,考察各组小鼠的耳肿胀度,并计算耳肿胀抑制率。分组同上;灌胃给药,每天2次,连续5次;末次给药40 min后于小鼠右足皮下注射1%角叉菜胶0.9%氯化钠溶液(0.05 mL)以建立足肿胀模型,考察各组小鼠的足肿胀度,并计算足肿胀抑制率。无菌条件下将灭菌棉球植于小鼠鼠蹊部皮下以建立肉芽肿模型;分组同上,建模24 h后灌胃给药,每天1次,连续10次;末次给药24 h后剥离棉球,考察各组小鼠的肉芽肿度,并计算肉芽肿抑制率。84只雄性SD大鼠随机分为正常对照组(等体积0.5% CMC-Na溶液)、模型组(等体积0.5% CMC-Na溶液)、醋酸泼尼松组(7 mg/kg)及麻花秦艽地上部位醇提物低、高剂量组(7、21 g/kg)与麻花秦艽地下部位醇提物低、高剂量组(7、21 g/kg),每组12只;灌胃给药,每天1次,连续30次;灌胃给药4次后于大鼠右后足皮下注射完全弗氏佐剂(0.1 mL)以建立关节炎模型;建模18 h后,考察各组大鼠的足肿胀度,并计算足肿胀抑制率,建模20 d后进行大鼠全身关节病变评分,末次给药24 h后称定大鼠胸腺、脾、肾上腺质量和体质量并计算相应脏器指数。结果:与模型组比较,醋酸泼尼松组、麻花秦艽地上部位醇提物高剂量组和麻花秦艽地下部位醇提物低、高剂量组小鼠耳肿胀度均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),耳肿胀抑制率分别为67.12%、27.39%、19.86%、54.79%;麻花秦艽地下部位醇提物低、高剂量组小鼠足肿胀度均显著降低($P<0.01$),足肿胀抑制率分别为34.63%、46.07%;醋酸泼尼松组、麻花秦艽地上、地下部位醇提物低、高剂量组小鼠肉芽肿度均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肉芽肿抑制率分别为42.52%、14.02%、23.36%、21.50%、35.58%;醋酸泼尼松组和麻花秦艽地上、地下部位醇提物高剂量组大鼠关节肿胀度均显著降低,全身关节病变评分均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与正常对照组比较,模型组大鼠胸腺、脾脏、肾上腺指数均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,麻花秦艽地上、地下部位醇提物低、高剂量组各脏器指数差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:麻花秦艽地上、地下部位醇提物均具有一定的抗炎作用。

关键词 麻花秦艽;地上部位;地下部位;醇提物;抗炎作用

物。本试验未检测到紫菀药材体内外特征图谱,是否由于色谱条件不适宜所致仍有待进一步分析。基于此,本课题组后续将对复方述达格-4全方及各单味药体内外特征图谱中相对面积较小的峰进行指认,并对有关成分体内代谢产物进行追踪,从而对复方述达格-4进行较为全面的分析。

参考文献

- [1] 陈卓,潘明佳,邢雪飞,等. 血清药物化学在中药及其复方药效物质基础研究中的进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(1):143-147.
- [2] 张灵娜,林兵,宋洪涛. 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望[J]. 中草药, 2015, 46(17):2662-2665.
- [3] 马飞祥,薛培凤,王媛媛,等. 中药血清药物化学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7):1265-1270.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81760783);青海省重点研发与转化计划项目(No.2016-SF-125);青海省科技计划项目(No.2017-ZJ-Y19)

* 硕士研究生。研究方向:微生物药理学。E-mail:1132511030@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:藏药生药学、天然药物化学、药物分析。E-mail:qhlpc@126.com

- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:蒙药分册[S]. 呼和浩特:内蒙古科学技术出版社, 1998:158.
- [5] 杨洋,贾鑫,董玉,等. 蒙药述达格-4的化学成分研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2013, 44(4):392-396.
- [6] 信莎莎,杜银飞,贾鑫,等. 蒙药复方述达格-4化学成分的分离与结构鉴定[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(11):945-948.
- [7] 信莎莎,杨洋,白埔,等. 蒙药述达格-4抗小鼠胃溃疡的作用研究[J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8):524-528.
- [8] 贾鑫,信莎莎,杨洋,等. 蒙药复方述达格-4抗实验性胃溃疡的作用研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(5):381-384.
- [9] 信莎莎,杨洋,孙国园,等. HPLC法测定蒙药复方述达格-4中1-苯基-7-(3-甲氧基-4-羟基)苯基-5-醇-3-庚酮的含量[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2015, 46(2):191-195.
- [10] 雷露静. 蒙药三子散质量控制及血清药物化学初步研究[D]. 呼和浩特:内蒙古医科大学, 2016.

(收稿日期:2018-02-25 修回日期:2018-04-06)

(编辑:张静)