

牛贝消核提取物血清药物化学的初步研究

段利瑶^{1,2} 凌彦博¹ 梁艳¹ 史迎昌¹ 王兰¹ 赵冠人³ 刘军⁴ 郑越¹ 吴雪琼¹

【摘要】 目的: 对抗结核中药牛贝消核提取物进行血清药物化学初步研究, 通过分析入血成分, 探讨牛贝消核发挥药效的物质基础。方法: 2018年4月至2019年6月在中国人民解放军总医院第八医学中心全军结核病研究所制备桔梗、白及、鱼腥草和牛蒡子标准品溶液及牛贝消核供试品; 55只小鼠随机分为11组, 每组5只; 1~5组为牛贝消核提取物组, 每只小鼠每天给予1.25 mg/g牛贝消核提取物灌胃; 6~10组为牛蒡苷组, 每只小鼠每天给予0.3 mg/g牛蒡苷灌胃; 11组为空白对照组, 给予蒸馏水灌胃; 连续灌胃7 d。于末次给药后0.5、1、2、4、6 h小鼠眼眶后静脉丛取血, 制备血清供试品溶液。采用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)分析各中药标准品、牛贝消核提取物供试品及各组小鼠给药后血清供试品溶液, 分析色谱图中各物质保留时间; 然后参照对照品初步鉴定牛贝消核提取物的入血成分。结果: 通过牛贝消核提取物和各药材标准品重叠色谱图中可以看出, 牛贝消核提取物保留时间为7.1 min处的色谱峰所对应的物质来源于桔梗, 保留时间为13.5 min、15.5 min、21.2 min处的色谱峰所对应的物质来源于白及, 保留时间为16.3 min的色谱峰所对应的物质来源于牛蒡子, 并进一步鉴定为牛蒡苷化合物。牛贝消核提取物和牛蒡苷给药后血清样本与空白血清比较, 均在17.5~22.5 min发现有吸收峰。结论: HPLC分析可作为牛贝消核中桔梗、白及、鱼腥草和牛蒡子提取的质量控制方法, 检出的牛贝消核提取物血中移行成分可能是牛蒡苷代谢产物, 其余药效成分入血微量未检出。

【关键词】 中药复方; 牛贝消核; 血清药物化学; 色谱法, 高效液相; 抗结核药

【中图分类号】 R917

Preliminary study on serum pharmacology of Niubeixiaohe extract DUAN Li-yao^{1,2}, LING Yan-bo¹, LIANG Yan¹, SHI Ying-chang¹, WANG Lan¹, ZHAO Guan-ren³, LIU Jun⁴, ZHENG Yue¹, WU Xue-qiong¹. ¹Tuberculosis Prevention and Control Key Laboratory, Beijing Key Laboratory of New Techniques of Tuberculosis Diagnosis and Treatment, Tuberculosis Research Institute, Senior Department of Tuberculosis, the 8th Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China; ²Department of Pharmacy, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Hebei Province, Cangzhou 061001, China; ³Department of Pharmacy, the 8th Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100091, China; ⁴Guangdong Qifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510075, China

Corresponding authors: WU Xue-qiong, Email: xueqiongwu@139.com; ZHENG Yue, Email: zhengyue309@126.com

【Abstract】 Objective: Preliminary research on serum pharmacology was carried out on the extract of anti-tuberculosis Chinese medicine Niubeixiaohe, and the material basis of Niubeixiaohe's efficacy was discussed by analyzing the blood components. Methods: From April 2018 to June 2019, the standard solutions of Radix Platycodonis, Rhizoma Bletillae, Herba Houttuyniae, Fructus Arctii and the sample of Niubeixiaohe were prepared at the Tuberculosis Research Institute, the Eighth Medical Center of Chinese PLA General Hospital. 55 mice were randomly divided into 11 groups with 5 mice each group; Group 1 to 5 named Niubeixiaohe extract group were given Niubeixiaohe extract 1.25 mg · g⁻¹ · d⁻¹; Group 6 to 10 named arctiin group were given arctiin 0.3 mg · g⁻¹ · d⁻¹; Group 11 was the blank control group, which was given distilled water. The mice were gavaged continuously for 7 days. Blood was collected from the retroorbital venous plexus of mice at 0.5, 1, 2, 4, and 6 hours after the last administration to prepare the serum solution. The retention time of each substance in the chromatogram of the



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口, 提供丰富的线上扩展功能, 包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.19982/j.issn.1000-6621.20210710

基金项目: 北京市科学技术委员会 G20 工程支撑保障专项 (Z171100001717010); 北京市“十病十药”研发专项(Z141100002214002)

作者单位: ¹中国人民解放军总医院第八医学中心/结核病医学部/全军结核病研究所/全军结核病防治重点实验室/结核病诊疗新技术北京市重点实验室, 北京 100091; ²河北省沧州中西医结合医院西药学部, 沧州 061001; ³中国人民解放军总医院第八医学中心药剂科, 北京 100091; ⁴广东奇方药业有限公司, 广州 510075

通信作者: 吴雪琼, Email: xueqiongwu@139.com; 郑越, Email: zhengyue309@126.com

standard of traditional Chinese medicine. Niubeixiaohe extract and the serum sample solution of mice in each group after administration was analyzed by HPLC. The constituents absorbed into the blood of Niubeixiaohe extract were preliminarily identified with the reference substance. **Results:** The overlapping chromatograms of Niubeixiaohe extract and each medicinal standard showed that the substance corresponding to the chromatographic peak at the retention time of 7.1 min was derived from Radix Platycodonis, and the substance corresponding to the chromatographic peak at the retention time of 13.5 min, 15.5 min and 21.2 min was derived from Rhizoma Bletillae, and the substance corresponding to the chromatographic peak at the retention time of 16.3 min was derived from Fructus Arctii, which was further identified as arctiin compound. Compared with the blank control serum, the serum samples after the administration of Niubeixiaohe extract and arctiin was found the absorption peaks in 17.5–22.5 min. **Conclusion:** HPLC can be used as a quality control method for the extraction of Radix Platycodonis, Rhizoma Bletillae, Herba Houttuyniae, and Fructus Arctii in Niubeixiaohe. The detected constituents absorbed into the blood of Niubeixiaohe extract may be arctiin metabolites, and the trace amount of other pharmacodynamic components into the blood was not detected.

【Key words】 Traditional Chinese medicine compound; Niubeixiaohe; Serum pharmacology; High performance liquid chromatography; Antituberculosis agents

【Fund program】 G20 Engineering Support and Guarantee Special Project of Beijing Municipal Science and Technology Commission (Z171100001717010); Beijing “Ten Diseases and Ten Medicines” Research and Development Special Project (Z141100002214002)

中医经验方牛贝消核在临床上已应用长达 16 年,由川贝母(Bulbus Fritillariae Cirrhosae)、白及(Rhizoma Bletillae)、鱼腥草(Herba Houttuyniae)、桔梗(Radix Platycodonis)、牛蒡子(Fructus Arctii)和糯米(Glutinous rice)6 味中药组成。其中,川贝母和白及为君药,川贝母具有润肺止咳,清热化痰的功效,主治虚劳久咳、肺热燥咳和咯痰带血等症^[1],白及具有抗菌、止血、抗纤维化和抗氧化等多种药理作用^[2];鱼腥草、桔梗和牛蒡子为臣药,鱼腥草多用于肺痛吐脓、痈肿疮毒和痰热喘咳等,桔梗宣肺、利咽、祛痰和排脓,牛蒡子有宣肺透疹、解毒利咽和疏散风热的功效^[3];益肺气、健脾胃的糯米为佐使药。因此,本方 6 味中药配伍合理,具有软坚化结、清热解毒、止咳化痰和滋阴润肺的功效,能够消除咳嗽、胸痛、低热、咯血和消瘦等结核病症状。

中医药文化是中华民族传统文化的精髓,具有广阔的发展前景。然而中药成分复杂,每味中药都含有数十种甚至上百种成分,而其在体内的效应大多是多种成分协同作用的结果。中药传统的口服给药形式决定了只有被吸收进入体内的物质才能产生生活性,且吸收进入体内发挥作用的并非一定是原形成分,也可能是其代谢产物^[4]。中药血清药物化学是以中药口服给药后血清为样品,应用药物化学的研究方法,联合多种现代化技术,从血清中分离、鉴定移行成分,研究血清中移行成分与传统疗效的相关性,阐明体内直接作用物质代谢及体内动态变化的领域^[5]。目前,中药血清药物化学得到广泛应用,为中药的研究提供了一种新的研究思路,有利地推

动了中药的发展。本研究应用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)初步研究牛贝消核提取物的主要有效成分在血液中的移行变化,确定牛贝消核作用的主要入血药效成分,试图阐明其在动物体内移行成分与传统疗效的相关性,为其体内直接作用物质代谢及体内动态规律研究奠定基础。

材料和方法

一、实验材料

1. 实验仪器: 高效液相色谱仪(DGU-20A₃ prominence DEGASSER,配二元梯度泵、自动进样器); Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); KQ-300GVDV 型三频恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); QL-901 型旋涡混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 高速冷冻离心机(Centrifuge 5418, Eppendorf)。

2. 药品与试剂: (1)牛贝消核提取物:牛贝消核提取物干浸膏粉委托西安新通药物研究有限公司生产,批号为 180901;(2)乙腈:色谱纯,美国赛默飞世尔科技有限公司;(3)甲醇:色谱纯,美国赛默飞世尔科技有限公司;(4)牛蒡苷(Arctiin)标准品:中国食品药品检定研究院,批号 110819-201711;(5)白及标准品:批号 BWB51613,中国世纪奥科生物技术有限公司;(6)牛蒡子标准品:批号 120903-201710,中国世纪奥科生物技术有限公司;(7)桔梗标准品:批号 121028-201712,中国世纪奥科生物技术有限

公司;(8)鱼腥草标准品:批号 BWB51804,中国世纪奥科生物技术有限公司。

3. 实验动物:清洁级 BALB/c 雌性小鼠 55 只,6~8 周龄,体质量 19~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号 SCXK(京)2016~0006]。

二、方法

1. 体外供试品溶液的制备:称取牛贝消核提取物 1.00 g,溶于 40 ml 蒸馏水,混匀,99 °C 加热 1 h 助溶,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,作为体外供试品溶液;称取牛蒡子、桔梗、鱼腥草、白及标准品及牛蒡苷标准品 10 mg 分别溶于 600 μl 甲醇,涡旋混匀,置离心半径为 8.9 cm 的离心机,于 13 000 r/min 离心 10 min,取上清。

2. 空白及含药血清样品的制备:55 只小鼠按照数字表法随机分为 11 组,灌胃给药体积为 0.2 ml/10 g。1~5 组为牛贝消核提取物组,每只小鼠每天给予 1.25 mg/g 牛贝消核提取物,连续灌胃给药 7 d;6~10 组为牛蒡苷组,每只小鼠每天给予 0.3 mg/g 牛蒡苷,连续灌胃给药 7 d;11 组为空白对照组,给予蒸馏水灌胃,连续灌胃 7 d。每组小鼠于末次灌胃给药后 0.5、1、2、4、6 h 小鼠眼眶后静脉丛取血,血样置离心半径 16.7 cm 的离心机,于 3000 r/min 离心 10 min,吸取上清液;上清液 200 μl 加入乙腈 400 μl(1:2),涡旋混匀,置离心半径为 8.9 cm 的离心机,于 13 000 r/min 离心 10 min,取上清,作为血清供试品溶液。

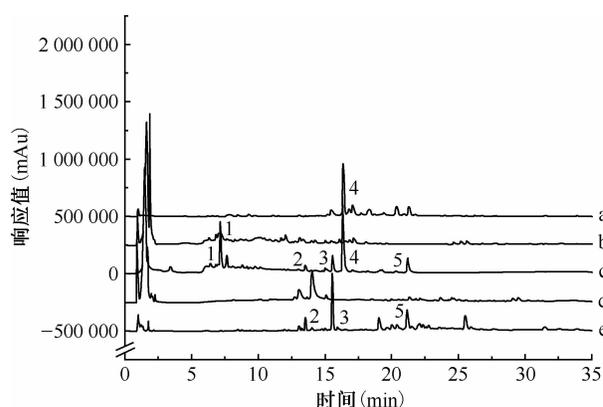
3. 色谱条件:2018 年 4 月至 2019 年 6 月在中国人民解放军总医院第八医学中心全军结核病研究所采用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)分析,采用色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),紫外检测器检测波长 210 nm,流速 1.0 ml/min,最大进样体积为 100 μl,流动相为水(A)~80%乙腈(B),梯度洗脱程序:0~30 min,流动相 A 比例由 100.0%降至 0,流动相 B 比例由 0 增至 100.0%;30~35 min,流动相 A 比例由 0 增至 100.0%,流动相 B 比例由 100.0%降至 0。

4. 牛贝消核提取物及其血清中成分分析:取牛贝消核提取物溶液,以及含药血清样品在相同的色谱条件下进行 HPLC 分析,建立其指纹图谱,并比较分析确定入血成分。然后参照对照品初步鉴定牛贝消核提取物的入血成分。

结 果

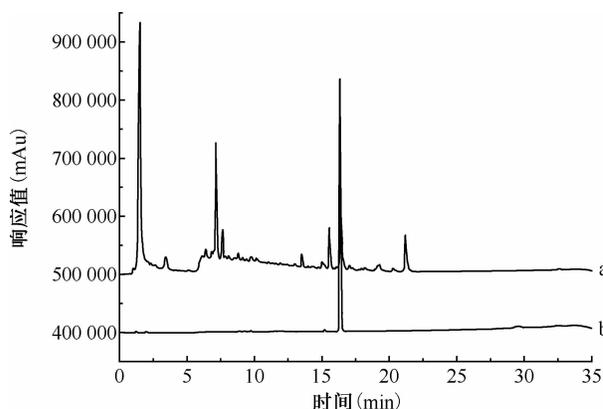
一、牛贝消核提取物的 HPLC 分析结果

牛贝消核提取物的 HPLC 图见图 1,与牛蒡子、桔梗、鱼腥草、白及标准品图谱比较,在同一色谱条件下,发现峰 1 保留时间为 7.1 min,峰 2 保留时间为 13.5 min,峰 3 保留时间为 15.5 min,峰 4 保留时间为 16.3 min,峰 5 保留时间为 21.2 min。同时,牛蒡苷保留时间为 16.3 min(图 2)。



注 a:牛蒡子,b:桔梗,c:牛贝消核提取物,d:鱼腥草,e:白及;牛贝消核提取物(c)中峰 1 对应的物质来源于桔梗(b),峰 2、3、5 对应的物质来源于白及(e),峰 4 对应的物质来源于牛蒡子(a)

图 1 牛贝消核提取物与药材标准品 HPLC 图

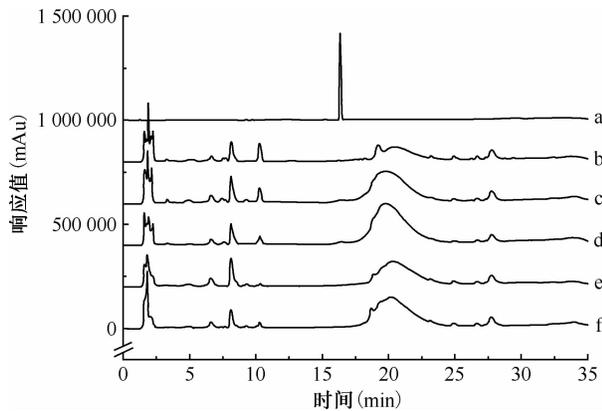


注 a:牛贝消核提取物,b:牛蒡苷

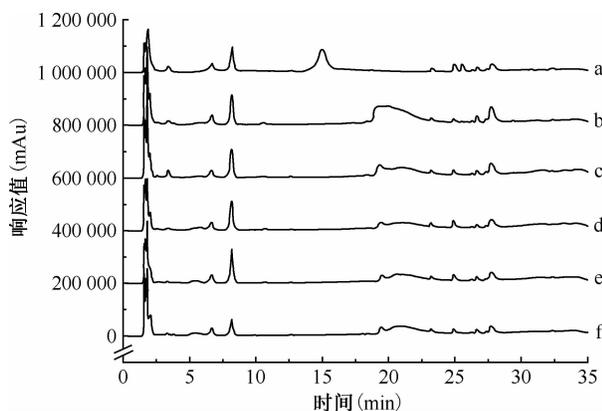
图 2 牛贝消核提取物和牛蒡苷标准品 HPLC 图

二、牛贝消核含药血清样本 HPLC 分析结果

牛蒡苷标准品体外样品色谱图显示牛蒡苷保留时间为 16.3 min,牛蒡苷灌胃给药后并未明显检测出牛蒡苷成分,但灌胃给药后 0.5、1、2、4、6 h 血清与空白血清色谱图比较,图谱中清晰可见 17.5~22.5 min 有吸收峰,且随时间的变化而改变,2 h 达吸收最高峰,4 h 开始下降。同时牛贝消核灌胃后在此时间段也出现相同特征的吸收峰,且 0.5 h 的吸



注 a: 牛蒡苷标准品, b~f: 牛蒡苷灌胃后 0.5、1、2、4、6 h
图 3 牛蒡苷标准品小鼠血清药物化学分析 HPLC 图



注 a: 空白血清, b~f: 牛贝消核提取物灌胃后 0.5、1、2、4、6 h
图 4 牛贝消核提取物小鼠血清药物化学分析 HPLC 图

收峰最高, 1 h 开始下降。详见图 3、4。

讨 论

目前, 绝大部分中药及复方只能采用口服方式给药, 口服中药后的血清中含有真正有效成分, 即原形成分、代谢产物、机体产生的生理活性物质^[6]。因此, 通过分析口服给药后血清中成分, 确定中药及复方在体内的直接作用物质, 将成为准确、快速的确定中药药效物质基础的有效途径。

通过牛贝消核提取物与药材标准品 HPLC 图比较发现, 峰 1 来源于桔梗, 峰 2、3、5 来源于白及, 峰 4 来源于牛蒡子, 并在牛贝消核提取物中鉴定出牛蒡苷化合物, 表明通过 HPLC 分析可作为牛贝消核提取物中桔梗、白及、鱼腥草和牛蒡子提取的质量控制方法。其中桔梗具有宣肺、利咽、祛痰和排脓等多种药理作用, 白及具有抗菌、止血、抗纤维化和抗氧化的作用^[2], 牛蒡子有宣肺透疹、解毒利咽和疏散风热的功效, 并且牛蒡苷是牛蒡子的主要活性成分, 具有较强的抗炎及免疫调节活性、抗病毒活性^[3]。

结合各味中药药理活性及研究数据, 推断牛贝消核所发挥药效的物质分别来源于桔梗、白及和牛蒡子中主要的活性物质, 并选用牛蒡苷为对照进行牛贝消核血清药物化学的初步研究。

样品预处理是为了分离基质和共存的干扰物质, 富集待测成分, 纯化样品, 提高检测灵敏度。血浆、血清等生物样品中的主要干扰物质为氨基酸、蛋白质、磷脂和多肽等。在色谱分离中, 这些干扰物质产生的杂质峰有可能会与待测成分产生的色谱峰重叠, 从而干扰实验的准确性。生物样品处理的方法主要包括: 蛋白沉淀法、固相萃取法、液液萃取法等^[7]。蛋白沉淀法是在样品中加入有机溶剂(甲醇、乙腈、丙酮等)、有机酸、重金属盐等将蛋白沉淀, 纯化样品血样与有机试剂体积比一般为 1:1~1:4 时, 可将 97% 以上的蛋白除去^[8], Chen 等^[9]应用甲醇/乙腈混合溶液沉淀蛋白以纯化血样, 对黄芪颗粒药效学与血清药物化学质量评估进行研究。Zhang 等^[10]则采用甲酸来沉淀蛋白对三子固本颗粒质量评估进行研究。He 等^[11]用乙腈直接沉淀蛋白后对牛蒡子苷的体内吸收药代动力学进行研究。王宇卿等^[12]的研究显示乙腈沉淀法得到的样品色谱图信息量较大, 干扰少。根据以上研究, 笔者采用乙腈沉淀蛋白的方法进行预处理。

参考胥秀英等^[13]的研究, 本研究采用了足够剂量的牛蒡苷灌胃。牛蒡苷 HPLC 体内分析结果提示并未明显检测出牛蒡苷成分, 但发现 2 个高低不同的吸收峰, 而牛贝消核提取物灌胃后也检测出与牛蒡苷相似的 2 个吸收峰, 推测可能检测出牛蒡苷的代谢产物。Wang 等^[14]对口服牛蒡苷的药代动力学研究表明, 牛蒡苷在口服后快速吸收, 随后迅速消失。郑一敏等^[15]报道, 牛蒡苷在动物体内代谢变化快速、受杂质干扰小, 稳定性和重现性较好, 且牛蒡苷在体内吸收很快, 消除也快。牛蒡苷的代谢产物有牛蒡子苷元、(-)-肠内酯、(-)-牛蒡子苷、[(2R, 3R)-2-(3'-羟基苯甲基)-3-(3'', 4''-二甲氧基苯甲基)-丁内酯]^[14, 16]。本研究还需进一步研究确定这些吸收峰是否为牛蒡苷的代谢产物, 是什么代谢产物, 是否可作为牛贝消核体内血药浓度检测的标志物。牛贝消核体内分析只明显检测出与牛蒡苷代谢产物相同特征的吸收峰, 并未明显检测出其他吸收峰, 可能是由于中药化学组分复杂, 有效成分含量较低, 生物利用度低。由于牛贝消核体外 HPLC 结果显示可以明确检测出牛蒡苷成分, 因此本研究暂时只选用牛蒡苷作为对照, 通过后续实验条件及设备的不

断改善,今后实验中会选择更多有效成分作为对照。

本研究首次运用 HPLC 对牛贝消核提取物的血清药物化学进行研究,结果提示牛贝消核提取物入血药效成分微量,血中移行成分推测为牛蒡苷代谢产物。后续研究需进一步优化实验方案及实验设施,为牛贝消核体内直接作用物质代谢及体内动态规律研究奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 赵高琼,任波,董小萍,等. 川贝母研究现状. 中药与临床, 2012, 3(6): 59-64. doi:CNKI:SUN:LCZY.0.2012-06-023.
- [2] He X, Wang X, Fang J, et al. *Bletilla striata*; Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 20-38. doi:10.1016/j.jep.2016.11.026.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:中国医药科技出版社, 2015.
- [4] 孙晖,吴泽明,吕海涛,等. 中药及其复方的体内代谢研究现状与未来发展. 世界科学技术-中医药现代化, 2006, 8(6): 1-6. doi:10.11842/wst.2006.6.
- [5] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究. 世界科学技术·中药现代化, 2002, 4(2): 1-4. doi:10.3969/j.issn.1674-3849.2002.02.001.
- [6] 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. 药物评价研究, 2016, 39(1): 143-147. doi:10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.027.
- [7] 王红波. 菊苣降尿酸有效成分的血清药物化学研究. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [8] 马飞翔,薛培凤,王媛媛,等. 中药血清药物化学研究进展. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1265-1270. doi:10.19540/j.cnki.cjcm.20170224.010.
- [9] Chen HG, Zhou X, Zhao Y, et al. HPLC-DAD-ELSD combined pharmacodynamics and serum medicinal chemistry for quality assessment of Huangqi granule. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123176. doi:10.1371/journal.pone.0123176.
- [10] Zhang C, Lian R, Mahmoodurrahman M, et al. Serum pharmacology for tracking bioactive components by UPLC-Q-TOF-MS/MS combined chromatographic fingerprint for quality assessment of Sanziguben Granule. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1029/1030: 128-136. doi:10.1016/j.jchromb.2016.07.022.
- [11] He F, Dou DQ, Sun Y, et al. Determination of Arctiin in rat plasma by HPLC method and its application to pharmacokinetic studies. *J Med Plants Research*, 2011, 5(4): 549-557. doi:10.1007/BF00989335.
- [12] 王宇卿,李淑娇,庄果. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 法的鬼针草血清药物化学探究. 中成药, 2020, 42(11): 3074-3078. doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.048.
- [13] 胥秀英,郑一敏,傅善权,等. 牛蒡子苷在鼠体内的分布状态及药代动力学研究. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 698-699. doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2006.05.008.
- [14] Wang W, Pan Q, Han XY, et al. Simultaneous determination of arctiin and its metabolites in rat urine and feces by HPLC. *Fitoterapia*, 2013, 86: 6-12. doi:10.1016/j.fitote.2013.01.016.
- [15] 郑一敏,蔡绍哲,胥秀英,等. 牛蒡子苷代谢动力学与分布研究. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(4): 265-267. doi:10.3969/j.issn.1007-7693.2006.04.001.
- [16] 王潞,赵烽,刘珂. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展. 中草药, 2008, 39(3): 467-470. doi:10.3321/j.issn.0253-2670.2008.03.04.

(收稿日期:2021-12-18)

(本文编辑:范永德)