

病理及生理状态下的栀子血清药物化学对比研究

董婉茹¹, 丁雅光¹, 荆雷¹, 卢芳^{1,2}, 刘树民^{1,2*}, 李俊行¹

1. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要:目的 以血清药物化学结合现代色谱技术为研究手段, 阐明清热药栀子苦寒药性的药效物质基础。方法 采用 HPLC 法, 建立药材指纹图谱的色谱洗脱条件, Wistar 大鼠 ig 给予栀子水提物, 肝门静脉采血, 对比大鼠在生理及苯酚诱导的热病症候状态下, 血清中药物成分吸收的变化情况。结果 建立了 6 批栀子水提物共有峰的色谱指纹图谱; 确定最佳给药剂量、采血时间及血清处理方法。与生理状态下的大鼠给药组比较, 热病症候状态下大鼠对栀子苷有显著的增量吸收, 另有 2 个移行成分生成。结论 大鼠在热证状态下对栀子水提物中栀子苷的增量吸收, 以及血清中出现的移行成分等现象, 表明这些成分有可能代表栀子苦寒药性。

关键词: 栀子; 热病症候模型; 血清药物化学; 苦寒性; 增量吸收

中图分类号: R282.710.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)11-2270-05

Comparative study on serum pharmacochemistry of *Gardenia jasminoides* under physiological and pathological status

DONG Wan-ru¹, DING Ya-guang¹, JING Lei¹, LU Fang^{1,2}, LIU Shu-min^{1,2}, LI Jun-hang¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Key Laboratory of Chinese Materia Medica (Heilongjiang University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** By means of serum pharmacochemistry combined with modern chromatographic technology to elucidate the material basis for efficacy of aqueous extract from *Gardenia jasminoides* (AEGJ), which has antipyretic activities with bitter-cold property. **Methods** Waters 2695 HPLC was employed as the detection system, based on the same chromatographic eluted condition, physiological and DNP-induced fever syndrome serum samples, collected from hepatic portal vein of rats after ig administration of AEGJ, were under determining to compare the absorptive variation of the chemical compounds. **Results** The chromatographic fingerprints of common peaks for six batches of AEGJ were established to ascertain the optimized administration dosage, blood collection time, and the method used to process the serum. Compared with the normal administrated group under physiological status of rats, we found that the significant increment absorption of jasminoidin and the generation of two new migration compounds in the DNP fever syndrome model group. **Conclusion** The increment absorption and the migration of chemical compounds in serum of DNP fever syndrome pathological model of rats might reasonably lead us to consider these chemical compounds as symbols of the bitter-cold property of *G. jasminoides*.

Key words: *Gardenia jasminoides* Ellis; fever syndrome model; serum pharmacochemistry; bitter-cold property; increment absorption

栀子系茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 干燥成熟果实, 始载于《神农本草经》, 性寒, 味苦, 归心、肝、肺、胃、三焦经, 具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒、消肿止痛之功效。在中医临

床中, 栀子广泛用于治疗三焦各种热病症候^[1]。现代研究表明, 栀子中的化学成分主要为环烯醚萜类、黄酮类^[2], 有机酸、色素类^[3-4], 多糖及挥发油等^[5], 其中以栀子苷为代表的环烯醚萜类化合物有广泛的

收稿日期: 2011-04-10

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”计划项目(2007CB512608)

作者简介: 董婉茹(1985—), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士研究生, 研究方向为中药药性研究。Tel: 13836181407 Fax: (0451)82196181

E-mail: Jessica_wanru@163.com

*通讯作者 刘树民 Tel: (0451)82196163 Fax: (0451)82196181 E-mail: lsm@hljucm.net

药理活性, 包括抗肿瘤^[6], 抑制胃炎、肝炎、胰腺炎^[7-9], 降血糖^[10], 抗氧化^[11]等; 以西红花苷为代表的色素类成分有抗血栓^[12]等作用, 对防治心脑血管系统疾病有较强的生物活性。

中医药理论强调“疗寒以热药, 疗热以寒药”的治疗原则。本实验运用血清药物化学理论与现代色谱分析技术相结合的方法, 对比在生理与热证病理状态下的大鼠对苦寒药栀子吸收的异同, 以阐明栀子中代表其苦寒药性的成分, 阐释中医药药性理论的科学性。

1 材料

1.1 仪器

美国 Waters 2695 高效液相色谱仪, 包括四元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、2998 二极管阵列检测器、柱温箱; Empower 色谱工作站; 98—1—B 型电子调温电热套, 西安超杰生物科技有限公司; DK—98—1 电热恒温水浴锅, 北京医疗设备厂; DZF—6030B 型真空干燥箱、SHB—III 循环水式多用真空泵、电子天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; MiLLi—PORE 纯水机, 美国密理博公司; KQ—50B 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FD—1A—80 低温冻干机, 上海楚定分析仪器有限公司; Waters OASIS HLB Cartridge 固相萃取柱、MC—612 型电子数字式温度计, 欧姆龙有限公司产品。

1.2 药材与试剂

栀子产地江西樟树, 经黑龙江中医药大学中药研究院王连芝副研究员鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥果实。乙腈为色谱级; 娃哈哈纯净水; 栀子苷, 批号 110749-200613, 西红花苷-1, 批号 111588-200501, 均由中国药品生物制品检定所提供; 绿原酸, 批号 048k1313, 美国 Sigma 公司; 乌拉坦, 上海生科生物科技有限公司; 2, 4-二硝基苯酚, 上海华东师范大学化工厂; 其余试剂为分析纯。

1.3 动物

Wistar 大鼠, 雄性, 清洁级, 体质量 (200±20) g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2007-0001。

2 体外栀子水提取物指纹图谱的建立

2.1 栀子水提取物的制备

栀子药材适当粉碎后, 过筛, 等量分为 6 份, 每份 600 g。第 1 次煎煮加 10 倍量水, 第 2 次加 8

倍量水, 分别加热回流提取各 1.5 h, 合并 2 次煎液, 于低温干燥机中冻干, 研磨成细粉, 过 120 目筛, 供 HPLC 分析。

2.2 色谱条件

美国迪马公司 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)-醋酸水溶液 (醋酸 0.25 μg/mL) (B) 为流动相, 梯度洗脱, 0~15 min, 5.0% 乙腈; 15~23 min, 12.0% 乙腈; 23~28 min, 13% 乙腈; 28~43 min, 15.0% 乙腈; 43~51 min, 22.0% 乙腈; 51~61 min, 24.0% 乙腈; 61~66 min, 25.0% 乙腈。柱温 30 ℃, 体积流量 0.8 mL/min, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。

2.3 体外指纹图谱建立

分别精密称取 6 批栀子水提取物冻干粉各 0.15 g (相当于生药 0.45 g), 置 25 mL 量瓶中, 加入 20 mL 蒸馏水, 超声溶解 20 min, 冷却至室温, 定容于 25 mL 量瓶, 摇匀, 滤过, 存于 Waters 小瓶中待检测。6 批栀子水提取物的共有峰指纹图谱见图 1。精密称取对照品栀子苷 0.05 g、西红花苷-1 2.4 mg、绿原酸 1.2 mg, 各加 5 mL 甲醇溶解, 分别取配制成适当浓度的混合溶液适量。经过精密度、稳定性、重现性考察, 指纹图谱建立方法的 RSD 均小于 1%, 说明该方法准确、稳定、可靠。栀子水提取物与对照品混合液的 HPLC 图谱对照见图 2。

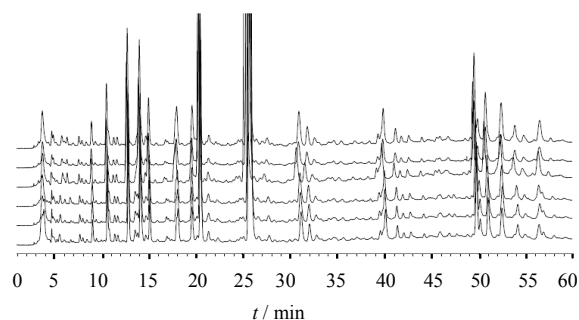


图 1 6 批栀子水提取物共有峰的指纹图谱
Fig. 1 Fingerprint of common peaks for six batches of AEGJ

3 栀子水提取物血清药物化学分析条件筛选

3.1 栀子水提取物制备

栀子水提取物冻干粉经超声溶解于蒸馏水, 分别配制质量浓度为 0.17、0.255、0.34 g/mL 的混悬液。

3.2 最佳给药剂量的确定

取雄性 Wistar 大鼠 9 只, 禁食、不禁水 12 h, 称质量, 随机分组。大鼠分别 ig 给予生药 3.49、5.10、

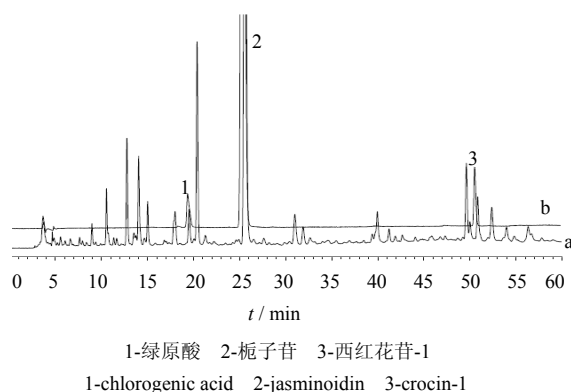


图2 栀子水提取物(a)与混合对照品(b)的HPLC图
Fig. 2 HPLC chromatogram of AEGJ (a) and mixed reference substance (b)

6.80 g/kg 的栀子水提取物混悬液。以能很好地检测出色谱峰并且入血成分最多的栀子最低质量浓度为最佳给药量, 最终确定 5.10 g/kg 为后续实验的给药剂量。

3.3 血清处理方法比较

本实验比较了 HLB 固相萃取小柱法和甲醇沉淀蛋白法处理血清的效果。固相萃取小柱法: 取对照组及给药组血清各 0.5 mL, 用等量的 4% 磷酸酸化后, 上样于激活、平衡后的 Waters OASIS HLB Cartridge 固相萃取柱, 以 12% 甲醇 1 mL 清洗后, 收集洗脱液, 减压回收, 用色谱甲醇 200 μ L 复溶, 待 HPLC 分析。甲醇沉淀蛋白法: 取空白及给药组血清各 0.5 mL, 加甲醇 5 mL, 涡旋混匀, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 于 40 $^{\circ}$ C 恒温水域减压回收至干, 残渣用 100 μ L 甲醇溶解, 待 HPLC 分析, 进样量 20 μ L。结果表明, 与甲醇沉淀法比较, 固相萃取小柱富集血清成分可以较好地去除杂质, 并且灵敏度高, 对不同组分的选择性大, 可以检测出血清中极微量的成分, 适宜体内药物微量成分的检测。因此, 本实验采用固相萃取法作为研究栀子血清化学成分的方法。

3.4 采血时间的筛选

取雄性 Wistar 大鼠 7 只, 禁食、不禁水 12 h, 称体质量。大鼠 ig 生药 5.10 g/kg 的栀子水提取物混悬液。分别于给药前、给药后 10、30、45、60、90、120 min, 大鼠 ip 20% 乌拉坦 0.01 mL/g 麻醉, 用真空采血管经肝门静脉采血 5 mL, 于 4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 10 min, 取上清 0.5 mL, 按“3.3”项固相萃取法制备血清样品, 行 HPLC 分析。结果表明,

给药后 45 min 的血清样品中成分最多, 浓度较高, 最适于分析, 因此选定 45 min 为最佳采血时间。

经过考察, 确定以 5.10 g/kg ig 给药、给药后 45 min 采血、HLB 固相萃取小柱富集血清中的成分为最佳实验方案。空白血清、最佳给药量下血清和栀子水提取物的色谱图见图 3, 给药后 45 min 大鼠含药血清色谱指纹图谱见图 4。

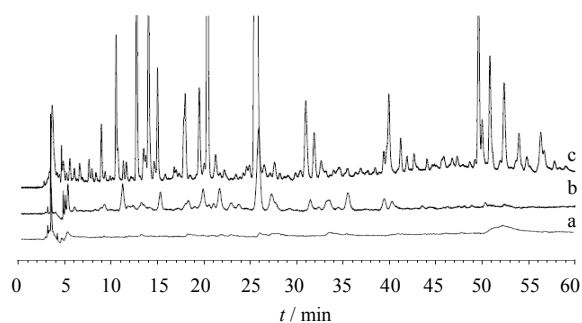


图3 空白血清(a)、最佳给药剂量下血清(b)和栀子水提取物(c) HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatogram of blank serum (a), serum with optimum dosage of AEGJ (b), and AEGJ (c)

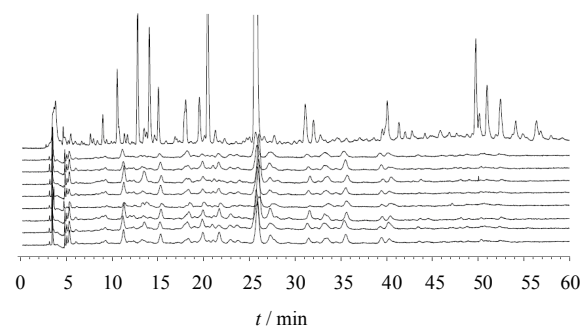


图4 含药血清指纹图谱

Fig. 4 Fingerprint of serum containing AEGJ

4 生理与热病症候状态下大鼠血清药物化学

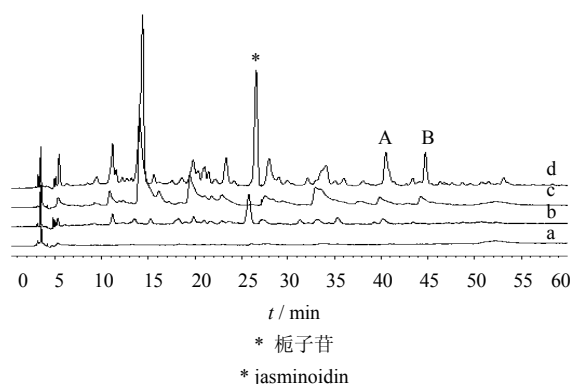
4.1 栀子水提取物及试剂的制备

精密称取栀子水提取物冻干粉 14.17 g 溶于 45 mL 蒸馏水中, 超声至完全溶解, 再加入相应的蒸馏水配制成 50 mL 混悬液。精密称取 2, 4-二硝基苯酚 125 mg, 置于 40 mL 生理盐水中, 滴加 5 mol/L 的 NaOH 溶液, 不断搅拌, 待药液澄清变为亮黄色, 再加入生理盐水至 50 mL。

4.2 分组与给药

取雄性 Wistar 大鼠 24 只, 禁食、不禁水 12 h, 称体质量。将大鼠随机分为对照组、生理状态给药组、热病症候模型组、热病症候状态给药组, 每组

6只。对照组 ig 给予蒸馏水 0.02 mL/g; 生理状态给药组 ig 给予生药 5.1 g/kg 栀子水提物混悬液; 热病症候模型组及其给药组 sc 2, 4-二硝基苯酚 20 mg/kg (1次) 造模^[13]。于造模后 40 min, 热病症候给药组单次 ig 生药 5.1 g/kg 的栀子混悬液; 模型组给予相应量的生理盐水。给药后 45 min, 各组大鼠 ip 20% 乌拉坦 0.01 mL/g 麻醉, 肝门静脉取血, 4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min, 取上清 0.5 mL, 用固相萃取柱处理, 行 HPLC 分析 (图 5)。根据吸收峰的积分峰面积, 对药物吸收量进行 *t* 检验。



a-空白血清 b-栀子给药组血清 c-热证模型组血清
d-热证栀子给药组血清
a-blank serum b-serum of AEGJ group c-serum of fever syndrome model group d-serum of fever syndrome model with AEGJ group

图5 生理、热证病理状态下药物吸收的情况

Fig. 5 Drug absorption at physiological and DNP fever syndrome pathologic status

如图5所示, 在热证病理状态下栀子苷的峰有显著的增量吸收, 并且对病理、生理状态下的栀子苷吸收峰面积进行了 *t* 检验, 结果显示大鼠在病理、生理状态下对栀子苷的吸收有显著差异 ($P < 0.05$); 与生理状态下给药组比较, 图5中峰A、B有特异性吸收, 表明药物在病理状态下的血清中发生了一定的代谢转化, 进而产生了与生理状态下给药组血清不同的移行成分A、B, 具体A、B是何物质有待进一步确证。

5 讨论

栀子苷、绿原酸和西红花苷-1分别为栀子中环烯醚萜类、有机酸类和色素类化合物中生物活性较强的代表成分。本实验运用全波长扫描的紫外检测系统, 通过与对照品比对, 确定药材提取物色谱图中的栀子苷、绿原酸和西红花苷-1等峰的归属。该色谱条件也是目前比较全面的检测栀子水提物各类成分的方法之一。

栀子苷在肠道β-葡萄糖苷酶的作用下代谢成为京尼平^[14], 而本实验在栀子含药血清、药材及对照品的比对中却检测到栀子苷原形, 推测原因可能是由于本实验采用肝门静脉取血方式, 检测的血清样品为未经肝药酶的代谢, 并且在ig给药45 min后采血, 药物很可能还没有在肠道细菌作用下完全代谢转化, 故检测到栀子苷原形药物。在栀子含药血清中未检测到西红花苷类的原形, 是由于其在胃肠道内转化为西红花酸^[15], 并且只能在其特异性吸收波长440 nm下, 在极少的一部分血清样品中可以检测到量极低的吸收峰, 与相关文献的报道一致^[16]。

本实验采用的苯酚诱导的热病症候模型是在本课题组前期实验基础上制备的^[17]。前期实验表明, sc苯酚后, 大鼠发热且热程可持续3 h, 1.5 h时达峰, 随后逐步下降至正常体温, 故本实验选择造模后40 min给药干预, 并在与生理状态下给药组相同的吸收时间(给药后45 min)采血, 此时模型组体温最高, 达到了病理、生理状态下药物吸收情况比较的目的。

苯酚致热的机制虽然并不直接与炎症相关, 但由于外源性物质的异常入侵, 必然导致机体防御系统发生相应的炎症反应。由于栀子苷具有广泛的抗炎作用, 故在本实验中在苯酚致热的病理状态下, 大鼠对栀子苷有显著的增量吸收是合乎常理的。与生理状态下动物对药物吸收情况相比较, 病理状态下血清中产生新的移行成分A、B峰, 推测它们可能是栀子水提物在机体病理状态下产生的药源性代谢产物, 而这些产物也很有可能在热病症候状态下, 影响机体的生理功能, 但其具体机制还有待进一步的研究。综上所述, 通过对比病理、生理状态下药物吸收的变化情况, 推测以栀子苷为代表的化学成分很有可能代表中药栀子的苦寒药性。

参考文献

- [1] 董婉茹, 刘洪毓, 丁雅光. 栀子清泄三焦之释义 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 26 (1): 33-35.
- [2] 于洋, 高昊, 戴毅, 等. 栀子属植物化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41 (1): 148-154.
- [3] 徐燕, 曹进, 王义明, 等. 多波长高效液相色谱法同时测定栀子中的三类成分 [J]. 药学学报, 2003, 38 (7): 543-546.
- [4] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1998.
- [5] 孟延发, 刘景会, 李志孝, 等. 栀子多糖的分离纯化及

- 其基本性质 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 1993, 29(2): 109-112.
- [6] 石若夫, 李大力. 栀子多糖的抗肿瘤活性研究 [J]. 林产化学与工业, 2002, 22(4): 67-70.
- [7] Jung W S, Chae Y S, Kim D Y, *et al.* *Gardenia jasminoides* protects against cerulean-induced acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(40): 6188-6194.
- [8] Lee J H, Lee D U, Jeong C S. *Gardenia jasminoides* Ellis ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastritis and reverse gastric lesions in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(6): 1127-1131.
- [9] Zhang H, Rothwangl K, Mesecar A D, *et al.* Lamiridosins, hepatitis C virus entry inhibitors from *Lamium album* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(12): 2158-2162.
- [10] Wu S Y, Wang G F, Liu Z Q, *et al.* Effect of geniposid, a hypoglycemic glucoside, on hepatic regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(2): 202-208.
- [11] Lee S J, Oh P S, Ko J H, *et al.* Glycoprotein isolated from *Gardenia jasminoides* Ellis has a scavenging activity against oxygen radicals and inhibits the oxygen radical-induced protein kinase Calpha and nuclear factor-kappa B in NIH/3T3 cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2006, 21(1): 8-21.
- [12] Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, *et al.* Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model [J]. *Planta Med*, 2001, 67(9): 807-810.
- [13] 张宏, 余成浩, 彭成. 草乌叶煎煮时间、给药剂量与解热功效的相关性研究 [J]. 陕西中医, 2007, 28(2): 225-226.
- [14] Akao T, Kobashi K, Aburada M. Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial metabolism of geniposide [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(12): 1573-1576.
- [15] 杨全军, 范明松, 孙兆林. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展 [J]. 中国现代中药, 2010, 9(12): 7-12.
- [16] Xi L, Qain Z, Du P, *et al.* Pharmacokinetic properties of crocin (crocin digentiobiose ester) following oral administration in rats [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(9): 633-636.
- [17] 卢芳, 董培良, 陈平平. 三种热病证候模型最佳造模方法的探索与评价 [J]. 山东中医药杂志, 2009, 28(2): 114-116.

天津中草药杂志社4种期刊为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

根据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知, 中草药杂志社编辑出版的《中草药》杂志、*Chinese Herbal Medicines* (CHM)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4本期刊作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821

传真: 23006821

联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com

E-mail: zcy@tiprpress.com