

不同胆汁制胆南星中胆酸类成分及其解热作用比较

陈江宁^{1,2}, 单国顺^{1,2}, 赵启苗^{1,2}, 贾天柱^{1,2}, 高 慧^{1,2*}

1. 辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

2. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600

摘要: **目的** 比较猪、牛、羊胆汁制胆南星中胆酸类成分及其对发热小鼠体温的影响, 为规范胆南星发酵工艺提供依据。**方法** 分别采用猪、牛、羊胆汁与天南星生品发酵制备胆南星。采用 HPLC-CAD 法检测 3 种胆南星中胆酸类成分胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸。以干酵母制备小鼠发热模型, 观察猪、牛、羊胆汁制胆南星对发热小鼠体温的影响。**结果** 不同胆汁制胆南星中胆酸类成分存在差异, 牛胆汁制胆南星中胆酸类成分质量分数最高, 胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸的质量分数分别为 0.035 9%、0.843 4%、2.260 2%、0.037 2%。猪胆汁制胆南星中鹅去氧胆酸和去氧胆酸升高, 胆酸和猪去氧胆酸降低; 羊胆汁制胆南星中胆酸类成分除去氧胆酸外均降低。不同胆汁制胆南星对发热小鼠均有一定的清热作用, 猪胆汁制胆南星组小鼠体温先升高后降低, 且与模型组比较差异有显著性, 牛胆汁制胆南星亦表现出清热作用, 但与模型组比较无显著性差异。羊胆汁制胆南星清热作用较弱。**结论** 综合比较猪、牛、羊胆汁制胆南星中胆酸类成分质量分数和清热作用, 作为制备胆南星的辅料, 牛胆汁、猪胆汁优于羊胆汁。

关键词: 胆南星; 胆酸; 去氧胆酸; 猪去氧胆酸; 鹅去氧胆酸; 解热作用

中图分类号: R285.5; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)04-0567-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.04.004

Comparison on bile acids and clearing heat effects among *Arisaema cum Bile* processed with different biles

CHEN Jiang-ning^{1,2}, SHAN Guo-shun^{1,2}, ZHAO Qi-miao^{1,2}, JIA Tian-zhu^{1,2}, GAO Hui^{1,2}

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To compare bile acids contents in different *Arisaema cum Bile* processed with pig's bile, bilis bovina, and sheep bile and discuss the differences of temperature changes in fever mice, and provide the basis for *Arisaema cum Bile* fermentation process. **Methods** *Arisaema cum Bile* were prepared by fermentation on *Arisaematis Rhizoma* with pig's bile, bilis bovina, and sheep bile. HPLC-CAD method was used to determine the bile acid composition (cholic acid, deoxidationcholic acid, hyodeoxycholic acid, and chenodeoxycholic acid) in three kinds of *Arisaema cum Bile*. The fever model of mice was established with dry yeast, and the effects of clearing the heat on the models were observed and compared. **Results** There were significant differences of bile acids among three kinds of *Arisaema cum Bile*, and bile acids composition contents were the highest in *Arisaema cum Bile* processed with bilis bovina, and cholic acid, hyodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, and deoxidationcholic acid were 0.035 9%, 0.843 4%, 2.260 2%, and 0.843 4%, respectively. Contents of chenodeoxycholic acid and deoxidationcholic acid were decreased in *Arisaema cum Bile* processed with pig's bile, but those of cholic acid and hyodeoxycholic acid were significantly decreased. Contents of bile acids except deoxidationcholic acid in *Arisaema cum Bile* processed with sheep bile were significantly decreased. The three kinds of *Arisaema cum Bile* samples all showed clearing heat function. Mice temperature in *Arisaema cum Bile* processed with pig's bile group increased first and then decreased. Compared with model group, *Arisaema cum Bile* processed with bilis bovina also showed clearing heat effects, but there was no significant difference. *Arisaema cum Bile* processed with sheep bile had weak clearing heat function. **Conclusion** Both the contents of bile acids and the effects of clearing heat are different among *Arisaema cum Bile* processed with

收稿日期: 2016-11-21

基金项目: 公益性行业科研专项经费项目 (201507004-03)

作者简介: 陈江宁 (1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药炮制原理研究。Tel: (0411)85890153 E-mail: chenjiangning1991@163.com

*通信作者 高 慧, 教授, 博士, 研究方向: 中药炮制原理。Tel: (0411)85890155 E-mail: gaohuitcm@163.com

pig's bile, bilis bovina, and sheep bile, and pig's bile and bilis bovina are better than sheep bile as *Arisaema cum Bile* processing adjuvants.

Key words: *Arisaema cum Bile*; cholic acid; deoxidationcholic acid; hyodeoxycholic acid; chenodeoxycholic acid; clear heat effects

胆南星为生天南星细粉与牛、羊或猪胆汁经发酵加工而成,具有清热化痰、息风定惊的功效^[1]。胆南星始记于宋代《圣记总录》^[2],记载为牛胆中煮一复时暴干。最早记载的炮制辅料为牛胆汁,在《中药炮炙经验集成》中加入猪胆汁制胆南星的记载^[3]。《中国药典》1977 年版首次收载胆南星,并把牛胆汁、猪胆汁、羊胆汁同时收载为辅料,一直沿用至今。天南星性辛温,具有燥湿化痰、祛风止痉、散结消肿的功效,经与胆汁混合发酵后功效由温化寒痰转为清化热痰,药性的改变与胆汁的加入一定有着密不可分的联系。与最早用牛胆汁发酵胆南星的记载相比,现今药典增加了猪胆汁和羊胆汁,其依据是什么,不同胆汁制备的胆南星之间是否存在差异均未见报道。为了规范胆南星的炮制工艺,本课题组先从发酵辅料着手,对不同胆汁的胆酸类成分和清热作用进行比较研究^[4],再对不同胆汁发酵的胆南星进行成分、药效方面的比较。胆汁中的胆酸类成分具有一定的解热作用^[5-7],因此本实验采用 HPLC-CAD 法对胆酸类成分中胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸等具有清热作用的成分进行测定。针对胆南星清热的功效,本实验选择干酵母致发热小鼠模型,比较不同胆汁发酵的胆南星的清热作用。本研究综合化学成分、药效评价不同胆汁作为制胆南星辅料的差异,为胆南星辅料的选择提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AB 高效液相色谱仪(日本岛津公司);Mettler AE240 型十万分之一分析天平(瑞士 Mettler 公司);Corona 电雾式检测器(美国 ESA 公司);FA1004B 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);电子体温计[欧姆龙(大连)有限公司];HWS-080 恒温恒湿箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试药

天南星购于河北安国,经辽宁中医药大学尹海波教授鉴定为东北天南星 *Arisaema amurense* Maxim. 的干燥块茎。去氧胆酸、胆酸、猪去氧胆酸

对照品批号分别为 110724-200207、100078-201415、100087-201411,均购自中国食品药品检定研究院;鹅去氧胆酸对照品,批号为 ZO1011LA14,质量分数 $\geq 98\%$,购自上海源叶生物科技有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯;干酵母(安琪酵母股份有限公司);水为纯水;猪、牛、羊胆汁购于大连经济技术开发区农贸市场,为趁鲜破胆取得,置棕色瓶,于 -20°C 保存。

1.3 动物

SPF 级 KM 小鼠 45 只,体质量 $18\sim 22\text{ g}$,购于辽宁长生生物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(辽)2015-00011。小鼠适应性喂养 1 周,自由饮食饮水,室温 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。

2 方法与结果

2.1 样品制备

取生天南星 15 g ,粉碎,过 80 目筛,以 $1:4$ 的比例分别加入 20 mL 猪、牛、羊胆汁,拌匀,放入恒温恒湿箱中,温度为 32°C ,湿度为 70% ,发酵 7 d ,再隔水蒸 2 h 。趁热制成小块,低温烘干,分别得到各胆南星样品。

2.2 胆酸类成分的测定^[8]

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品适量,加甲醇溶解并定容,制得 4.26 、 4.53 、 51.00 、 $51.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取猪、牛、羊胆汁制胆南星 2 g ,粉碎,过 80 目筛,置 50 mL 量瓶中,加入适量甲醇并超声提取 1 h ,放冷至室温,补足甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 色谱条件 Waters C_{18} 色谱柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相为 0.5% 甲酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱: $0\sim 5\text{ min}$, $40\%\sim 50\%\text{ A}$; $5\sim 25\text{ min}$, $50\%\sim 57\%\text{ A}$;体积流量: 1 mL/min ;进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$,Corona 参数:氮气压力为 241.3 kPa ,Filter: high,Range 200 pA 。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取各胆酸类对照品溶液适量,注入液相色谱仪,测定,并记录峰面积。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程。胆酸: $Y=3\ 149\ 097.591\ 0\ X+$

49 800.590 2 ($r=0.998\ 5$), 结果表明胆酸在 4.26~42.6 ng 与峰面积呈良好的线性关系。去氧胆酸: $Y=1\ 319\ 880.859\ 2\ X+2\ 677.169\ 0$ ($r=0.999\ 5$), 结果表明去氧胆酸在 0.013 59~0.113 25 μg 与峰面积呈良好的线性关系。鹅去氧胆酸: $Y=275\ 884.168\ 5\ X+341.337\ 0$ ($r=0.999\ 9$), 结果表明鹅去氧胆酸在 0.051~0.510 μg 与峰面积呈良好的线性关系。猪去氧胆酸: $Y=1\ 022\ 475.093\ 4\ X-26\ 477.385\ 4$ ($r=0.999\ 2$), 结果表明猪去氧胆酸在 0.051~5.100 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取各对照品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 计算得胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸峰面积的 RSD 值分别为 1.2%、1.7%、1.9%、1.3%。

2.2.6 稳定性试验 取牛胆汁制胆南星供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、10、24 h 进样, 计算得胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸峰面积的 RSD 值分别为 2.0%、1.1%、1.6%、1.4%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取同一批牛胆汁制胆南星 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得胆酸、去氧胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸质量分数的 RSD 值分别为 1.1%、2.1%、1.1%、1.8%。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的牛胆汁制胆南星样品 1 g, 平行 6 份, 精密称定, 分别精密加入 0.085 2 mg/mL 胆酸对照品溶液、1.53 mg/mL 鹅去氧胆酸对照品溶液、1.275 mg/mL 猪去氧胆酸对照品溶液、0.072 48 mg/mL 去氧胆酸对照品溶液各 5 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果平均回收率分别为 98.4%、100.1%、99.8%、

98.1%, RSD 值分别为 0.9%、1.2%、1.9%、1.7%。

2.2.9 样品测定 分别精密吸取牛胆汁制胆南星、羊胆汁制胆南星、猪胆汁制胆南星供试品溶液 20 μL , 进行测定, 外标法计算各胆汁中胆酸类成分的质量分数, 色谱图见图 1, 结果见表 1。

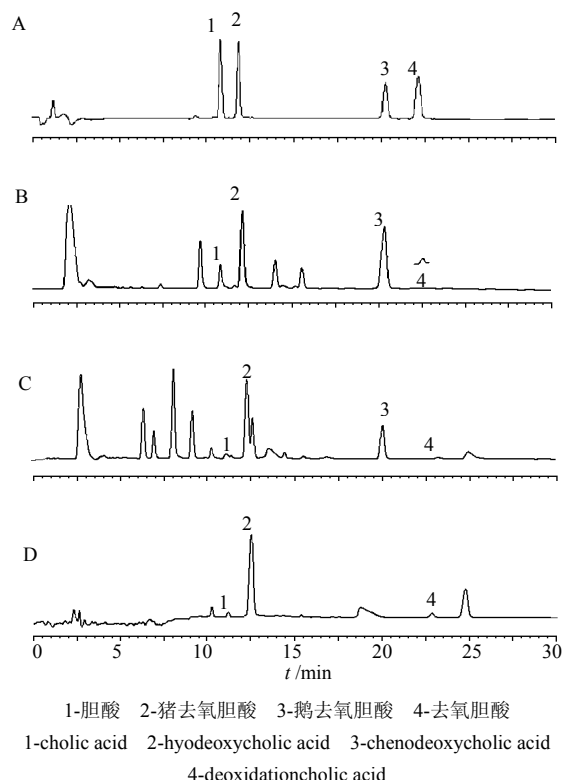


图 1 混合对照品 (A)、牛胆汁制胆南星 (B)、猪胆汁制胆南星 (C) 和羊胆汁制胆南星 (D) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), *Arisaema cum Bile* processed with bilis bovina (B), pig's bile (C), and sheep bile (D)

表 1 不同胆南星中胆酸类成分的测定结果 ($n=6$)
Table 1 Determination of bile acids in different *Arisaema Cum Bile* ($n=6$)

样品	质量分数/%			
	胆酸	猪去氧胆酸	鹅去氧胆酸	去氧胆酸
胆南星 (牛胆汁制)	0.035 9	0.843 4	2.260 2	0.037 2
胆南星 (羊胆汁制)	0.009 7	0.025 5	—	0.000 6
胆南星 (猪胆汁制)	0.005 7	0.315 9	0.786 9	0.008 0

—未检测出该成分
—not detected

可见牛胆汁制胆南星含有 4 种胆酸类成分, 鹅去氧胆酸、猪去氧胆酸、去氧胆酸、胆酸质量分数依次为 2.260 2%、0.843 4%、0.037 2%、0.035 9%,

混和发酵后较牛胆汁中 4 种成分均有增加。羊胆汁制胆南星中不含有鹅去氧胆酸, 猪去氧胆酸质量分数最高为 0.025 5%, 混合发酵后较羊胆汁胆酸、猪

去氧胆酸质量分数均降低。猪胆汁制胆南星中含有4种胆酸类成分,鹅去氧胆酸的质量分数最高为0.786 9%,混合发酵后较猪胆汁中胆酸和猪去氧胆酸质量分数降低,鹅去氧胆酸和去氧胆酸质量分数升高,但去氧胆酸依然质量分数较低。

2.3 小鼠清热实验

2.3.1 溶液的制备 称取干酵母10 g于乳钵中,加入蒸馏水研磨为均匀的悬浆,并定容于50 mL量瓶中,即得20%酵母混悬液,现用现配。

分别取胆南星各样品适量,加入10倍量的水浸泡1 h,煎煮2次,每次1 h,合并滤液并浓缩制成0.246 6 g/mL胆南星药液。摇匀,置4℃保存备用。

2.3.2 动物及造模给药 动物随机分为5组,每组8只。分别为对照组、模型组、猪胆汁制胆南星组、牛胆汁制胆南星组、羊胆汁制胆南星组。实验前,分别于8:00、15:00时测量小鼠肛温,连续测量3 d,剔除肛温异常的小鼠。保证体温计探头每次深入动物体内的长度一致,取其平均值作为小鼠的正常体温。各组小鼠以10 mL/kg sc干酵母造模^[8],小鼠体温升高时,造模成功。对照组注射同体积生理

盐水。造模同时ig相应药物10 mL/kg^[9],对照组、模型组给予相应生理盐水。于给药后2、3、6、7、8、9、10、12 h分别测定肛温,与基础体温比较,计算温差。

2.3.3 统计学处理 实验数据用SPSS 17.0软件进行分析,所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用单因素方差分析,判断各组差异的统计学意义。

2.3.4 胆南星对发热小鼠体温变化的影响 随着时间的变化观察小鼠12小时的体温变化,模型组体温随着时间的变化慢慢升高,在10 h时升至最高,后下降,说明小鼠热证模型造模成功。猪胆汁制胆南星组小鼠随着时间的变化,体温不断升高,到8 h时体温升至最高,后体温逐渐下降,至12 h时体温基本恢复正常,且与模型组比较差异有显著性。羊胆汁制胆南星随着时间的变化体温上升,7 h时升至最高,后体温没有明显的下降,至12 h时体温依然高于正常体温。牛胆汁制胆南星在8 h时体温升至最高,后下降,但是在6、8、12 h都没有表现出显著的差异。可以看出猪胆汁制胆南星表现出较好的清热作用。见表2。

表2 3种胆南星对发热小鼠体温变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of Arisaema Cum Bile on temperature changes in mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体温变化/℃			
		2 h	4 h	6 h	7 h
对照	—	-0.26±0.07	-0.43±0.31	0.35±0.16	0.73±0.19
模型	—	-0.73±0.21	1.79±0.14 [▲]	2.35±0.32 [▲]	2.69±0.37 [▲]
胆南星(猪胆汁)	2.466	-0.15±0.39 ^{**}	1.15±0.35 ^{**}	0.95±1.86 [*]	1.55±0.38 ^{**}
胆南星(羊胆汁)	2.466	-1.47±0.74	1.73±0.51	1.82±0.84 [*]	2.55±1.30 [*]
胆南星(牛胆汁)	2.466	-1.63±0.67 [*]	0.11±0.56 ^{**}	1.09±1.04	1.62±0.95 [*]

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体温变化/℃			
		8 h	9 h	10 h	12 h
对照	—	0.16±0.08 ^{**}	0.72±0.13	0.57±0.12	0.90±0.24
模型	—	2.77±0.80	2.44±0.48 [▲]	2.81±0.80 ^{▲▲}	2.07±0.26 [▲]
胆南星(猪胆汁)	2.466	1.91±0.14 ^{**}	1.31±0.40 ^{**}	0.93±0.83 ^{**}	0.56±0.48 ^{**}
胆南星(羊胆汁)	2.466	2.45±1.38	2.47±1.86	2.77±0.51	2.08±1.95
胆南星(牛胆汁)	2.466	1.94±0.90	1.72±0.39 [*]	1.46±1.06 [*]	0.97±1.70

与对照组比较: [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

[▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

3 讨论

研究表明,牛胆汁制胆南星中胆酸类成分质量分数最高,且相对于本课题组之前的对不同胆汁化学成分的研究结果,牛胆汁制得的胆南星中的胆酸

类成分均高于牛胆汁中的各成分。清热实验结果表明,猪胆汁为辅料发酵的胆南星清热作用较好,从结果可见用猪胆汁、牛胆汁作为辅料优于羊胆汁。胆汁中主要成分为胆汁酸,胆汁酸分为游离型胆酸

以及与甘氨酸或牛磺酸结合的结合型胆酸。结合型胆酸水解后变成游离型胆酸,本实验采用超声提取的方法检测游离型胆酸类成分,分析其原因可能是由于胆南星发酵使部分结合型胆酸水解成游离型胆酸。这一反应与人体中胆汁酸在肠道菌群的作用下由结合型胆酸水解成游离型胆酸从而发挥其作用的过程一致。因此可以推测发酵过程中产生的微生物使其发生水解反应。发酵为微生物分解有机物的过程,在发酵的过程中一定有物质被消耗,因此比较分析发酵前后物质的量、种类的变化是寻找发酵转化途径的一种方式。只有找到了发生质变或量变的物质才可以控制发酵过程的时间,从而使发酵药物发挥其最大功效。胆酸类成分的质量分数与解热作用的药效实验结果未呈现一致性,分析原因应该是胆南星中还存在其他清热作用的成分,因为关于胆南星化学成分的研究十分有限,笔者将对其活性成分进一步研究寻找,药效物质的揭示将有助于胆南星的炮制工艺规范化,并建立科学有效的质量评价标准。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 261.
- [2] 赵 洁. 圣济总录 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1962: 1891.
- [3] 中医研究院中药研究所. 中药炮制经验集成 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1974: 317.
- [4] 王凯平, 石朝周. 动物胆汁药用研究的概况与展望中国药用研究的概况与展望 [J]. 中国中医药科技, 2000, 7(5): 350-352.
- [5] 李培锋, 关 红, 哈斯苏荣, 等. 鸡胆汁有效成分 CDCA 和 TCDCA 的抗炎作用研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2002, 21(1): 7-10.
- [6] 张 壮, 闫彦芳, 孙塑伦, 等. 比较猪去氧胆酸与牛磺熊去氧胆抗神经细胞缺氧缺糖再给氧损伤的作用 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(17): 134-136.
- [7] 邓文龙. 开窍方药的临床及实验研究进展 [J]. 中成药研究, 1985(3): 33-38.
- [8] 陈慧慧, 张 敏, 虞慧娟, 等. 柴胡和黄芩配伍解热抗炎作用研究 [J]. 中成药, 2011, 33(9): 1596-1598.
- [9] 陈 雷, 王海波, 孙晓丽, 等. 龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 903-906.