

## 蒙药那如-3 血清指纹图谱研究

布林白乙拉<sup>1</sup>,何桂松<sup>1</sup>,胡 弟<sup>2</sup>,高秋红<sup>2</sup>,王经韵<sup>3</sup>,何 冰<sup>2\*</sup>

(1. 广州医科大学附属第二医院 番禺院区 骨科, 广东 广州 511447; 2. 广东药科大学 药科学院, 广东 广州 510006; 3. 广东省人民医院 国家临床药物实验机构办公室, 广东 广州 510080)

**摘要:**目的:通过研究蒙药那如-3 血清指纹图谱,进一步了解其药效物质基础。方法:采用高效液相色谱法(HPLC),建立蒙药那如-3 大鼠灌胃后血清指纹图谱,分析其血清中的有效成分。结果:在蒙药那如-3 的含药血清中发现3个入血成分:乌头碱、胡椒碱和没食子酸。结论:乌头碱、胡椒碱和没食子酸为蒙药那如-3 的主要入血成分,是蒙药那如-3 的有效成分。

**关键词:**蒙药那如-3;高效液相色谱;血清指纹图谱

**中图分类号:**R284.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-2197(2018)05-0020-03

**DOI:**10.11954/ytctyy.201805006

蒙药那如-3 方是临床上治疗风湿病的天然药物,处方出自《至高要方》,由制草乌、萆薢、诃子配伍组成。具有祛

浆中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量显著升高;与模型组相比,参苏饮不同剂量组干预后,“肺气虚外感”大鼠肺组织中 IL-1 $\beta$  水平显著下降,参苏饮低、中剂量组“肺气虚外感”大鼠肺组织中 IL-18 水平显著下降,参苏饮高剂量组与模型组大鼠肺组织中 IL-18 水平之间无统计学差异,且中剂量组大鼠肺组织中 IL-18 水平显著高于低剂量组。本实验研究表明,NLRP3 炎症小体下游炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 很可能参与“肺气虚外感”大鼠模型的炎症病理过程;参苏饮对“肺气虚外感”大鼠炎症病理过程中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的分泌可能起到抑制作用。“肺气虚外感”证炎症病理过程的发生与 NLRP3 炎症小体存在一定相关性。

### 参考文献:

- [1] KROEMER G, GALLUZZI L, VANDENABEELE P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 3-11.
- [2] 黄云帆, 彭礼波, 张志坚. 细胞焦亡与炎症反应的研究进展 [J]. 海南医学, 2016, 27(21): 3533-3535.
- [3] OKAMURA H, TSUTSI H, KOMATSU T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells [J]. Nature, 1995, 378 (6552): 88-91.
- [4] BOYLE DL, ROSENGREN S, BUGBEE W, et al. Quantitative biomarker analysis of synovial gene expression by real time PCR Arthritis Res Ther, 2003(5): 8352-8360.

黄水、杀“粘”、消肿、止痛功能,主治风湿病<sup>[1]</sup>;近年来也应用于颈椎病、三叉神经痛、腰椎间盘突出症等疾病的治疗。

- [5] SHI FENG, HUANG GUI XIN, XIANG WEI. The relationship of obese rat serum IL-18 levels and insulin resistance [J]. Journal of General Practice, 2010, 8(7): 811-812.
- [6] REDDY P. Interleukin-18: recent advances [J]. Curr Opin Hematol, 2004, 11(6): 405-410.
- [7] 况菊, 谢敏. NLRP3 炎症复合体与肺纤维化关系研究新进展 [J]. 华西医学, 2017, 32(6): 936-939.
- [8] NOTARNICOLA A, LAPADULA G, NATUZZI D, et al. Correlation between serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-17 in patients with idiopathic inflammatory myopathies [J]. Scandinavian journal of rheumatology, 2015, 44(3): 224-8.
- [9] WREE A, MCGEOUGH MD, PEN A CA, et al. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD [J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(10): 1069-1082.
- [10] SCHRODER K, TSCHOPP J. The inflammasomes [J]. Cell, 2010, 140(6): 821-832.
- [11] DONG Y, FAN C, HU W, et al. Melatonin attenuated early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via regulating NLRP3 inflammasome and apoptosis signaling [J]. J Pineal Res, 2016, 60(3): 253-262.
- [12] ZHOU Y, LU M, DU RH, et al. Micro RNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Mol Neurodegener, 2016, 11(1): 28.

(编辑:宋勇刚)

收稿日期:2017-09-15

基金项目:广东省科学技术厅广东省中医药科学院联合科研专项(粤科社字[2013]102号);广东省大学生创新训练项目(201610573039)

作者简介:布林白乙拉(1959—),男,蒙古族,广州医科大学附属第二医院主任医师,硕士生导师,研究方向为骨外科临床及科研。Email:bulin@163.com

通讯作者:何冰(1959—),女,广东药科大学教授,研究方向为心血管药理、药物筛选及新药研发。Email:wahah5566@163.com

前期研究发现蒙药那如-3 所为天然药物对脊髓损伤 (SCI) 具有抗炎及保护神经细胞功能的作用<sup>[2-4]</sup>。本研究拟采用高效液相色谱法, 分析大鼠口服蒙药那如-3 后血清中的有效成分, 建立血清指纹图谱, 为进一步研究蒙药那如-3 药效物质基础提供实验依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药品与试剂

那如-3 味药 (内蒙古蒙药股份有限公司, 生产批号: 1701050), 对照品 (乌头碱、胡椒碱、没食子酸) 华夏标准物质中心, 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

Agilent-1200 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司)、冷冻微型离心机 (贝克曼库尔特有限公司)、飞鸽牌 TDL 离心机 (上海右一仪器有限公司)。

### 1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠 (南方医科大学实验动物中心), (250 ± 25)g, 雌雄各半。许可证号: SCXK (粤) 2016-0041。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

Dikma C<sub>18</sub> (4.6mm × 250mm, 5μm) 色谱柱; A (甲醇) B (1% 磷酸), 梯度洗脱 (0 ~ 20min, 15% A : 85% B → 80% A : 20% B; 20 ~ 30min, 80% A : 20% B → 15% A : 85% B); 检测波长 285nm; 流速 1.0mL/min; 柱温 30℃; 进样体积: 20μL。

### 2.2 对照品溶液配制

精密称取乌头碱、胡椒碱、没食子酸标准品适量, 分别置于 100mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 分别制成每 1mL 含 0.1mg 乌头碱、0.106mg 胡椒碱及 0.970mg 没食子酸的溶液。保存在 4℃ 的避光冰箱中备用。

### 2.3 含药血清及空白血清的制备

取 SD 大鼠 10 只随机分为给药组和空白组。给药组每日 1.0mL/100g 灌胃那如-3-0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液 (浓度 C=0.3g/mL), 连续给药 7 天, 采血前 24h 禁食, 采血前 2h 再灌胃 1 次, 末次给药 1h 后, 3% 戊巴比妥钠 0.15mL/100g 腹腔注射麻醉, 颈动脉采血 5mL。4℃, 于无菌离心管中静置 30min, 离心 5min (4 000r/min), 取上层血清于 5mL 具塞离心管中, 置于 -20℃ 下冷冻保存。空白组每日 0.5% 羧甲基纤维素钠 1.0mL/100g 灌胃, 连续给药 7 天, 同法制备空白血清。

### 2.4 血浆样品前处理方法

在血浆样本 1.0mL 中加入 2 倍量乙酸乙酯, 涡旋混合 1min, 离心 10min (10 000r/min), 取上清, 氮气常温吹干, 残渣加入 200μL 的甲醇溶液涡旋混合溶解, 低温离心 15min (10 000r/min, 4℃), 取上清, 置于 -20℃ 下冷冻保存, 待测。

## 3 结果

### 3.1 系统专属性实验

图 1 为供试动物的空白血清色谱; 图 2、图 3 和图 4 分别为空白血清中加入没食子酸对照品 (a)、乌头碱对照品 (b) 及胡椒碱对照品 (c) 后得到的色谱; 图 5 为给药后大鼠含药血清色谱。将供试动物的空白血清色谱与空白血清中分别各加入对照品没食子酸、乌头碱和胡椒碱后得到的色谱及给药后大鼠血浆处理后的含药血清色谱进行比较, 结果表明血清中

无内源性物质干扰测定, 且两者峰形良好。

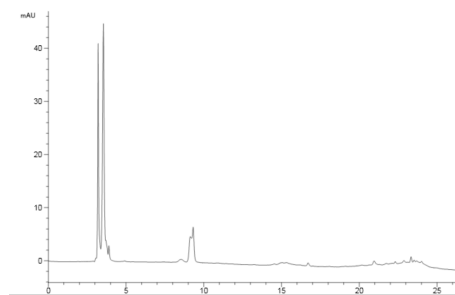


图 1 空白血清 HPLC 色谱

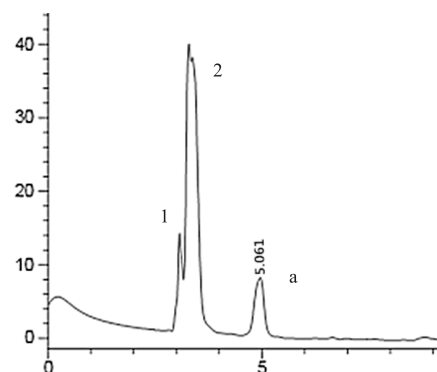


图 2 空白血清中加入没食子酸对照品 HPLC 色谱

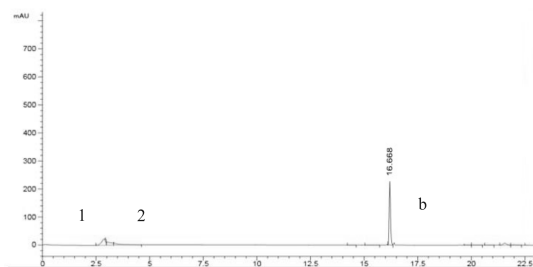


图 3 空白血清中加入乌头碱对照品 HPLC 色谱

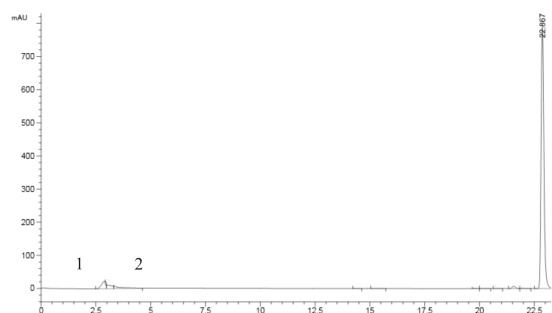


图 4 空白血清中加入胡椒碱对照品 HPLC 色谱

### 3.2 标准工作曲线绘制

取空白全血 1.00mL, 分别加入内标溶液和一系列浓度的乌头碱、胡椒碱和没食子酸标准液。浓度为 0.5, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100μg/mL, 按照“2.4 血浆样品前处理方法”项下方法操作, 按照“2.1 仪器条件”测定, 峰面积为纵坐标 Y, 浓度为横坐标 X, 求得直线回归方程为: 测得乌头碱、胡椒碱和没食子酸在 0.5 ~ 100μg/mL 内线性关系良好。乌头碱标准曲线:  $Y = 102.83X + 12.59$ ,  $r = 0.99921$ ;

胡椒碱标准曲线: $Y=72.94X+8.363$ , $r=0.999\ 81$ ,没食子酸标准曲线: $Y=36.63X+108.36$ , $r=0.999\ 56$ 。

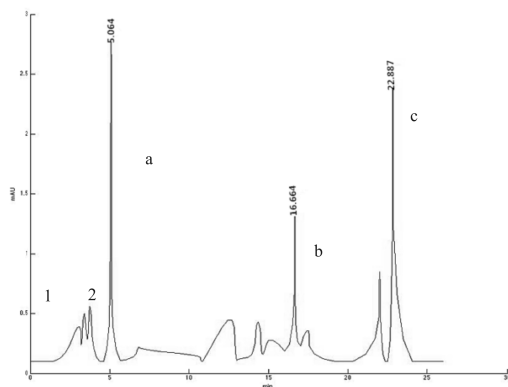


图5 含药血清 HPLC 色谱

### 3.3 精密度与准确度

取空白全血 1.00mL,配置成血药浓度分别为 0.5,5.0,50.0 $\mu\text{g/mL}$  的样品,按照“2.4 血浆样品前处理方法”项下方法操作,每一方法进行 3 次样本分析,并与标准工作曲线同时进行,以当日的标准工作曲线计算质量控制样品浓度,考察方法的精密度和准确度。结果表明,共有的相对峰面积 RSD% 为 1.65%~9.07%。

### 3.4 稳定性实验

取空白全血 1.00mL,配置成血药浓度分别为 1.5,15.0,90.0 $\mu\text{g/mL}$  的样品,按照“2.4 血浆样品前处理方法”项下方法操作,常温放置 24h 进样分析,以当日的标准工作曲线计算质量控制样品浓度,考察方法的稳定性。结果表明,共有的相对峰浓度 RSD% 为 0.6%~1.41%。

### 3.5 血清指纹图谱分析

图 1 为空白血清 HPLC 图谱,在图 2、图 3、图 4 及图 5 中均可见与图 1 相对应的血清内源性干扰色谱峰 1,2 号峰,图 2 中 a 峰为没食子酸对照品的血清 HPLC 色谱峰,图 3 中 b 峰为乌头碱对照品的血清 HPLC 色谱峰,图 4 中 c 峰为胡椒碱对照品的血清 HPLC 色谱峰。图 5 含药血清色谱图中均可见 a、b、c 色谱峰与图 2,3,4 中 a、b、c 色谱峰相对应的共有峰,出峰时间分别为 5.061,16.664 和 22.867min,以上结果提示大鼠口服蒙药那如-3 后血清中的有效成分含有没食子酸、乌头碱和胡椒碱。

## 4 讨论

本研究在分析对照品和血清样品时,均采用了完全相同的色谱条件,因此,建立的没食子酸、乌头碱和胡椒碱对照品血清 HPLC 图谱与含药血清的 HPLC 图谱中的色谱峰能够满足一一对应关系,同时进行了方法学考察,均满足分析检测要求。在处理血清样品时,考察了有机试剂沉淀法、热水浴法,考虑处理方法对色谱峰的干扰影响,最终确定采用乙酸乙酯沉淀法处理血清样本,采用氮气低温浓缩法富集血中的成分,以获取更多的信息。

本研究通过血清指纹图谱研究方法初步研究蒙药那如-3 入血成分,蒙药那如-3 血清 HPLC 指纹图中可检出多个色谱峰,其中血清本身的成分 2 个色谱峰 1,2 号,见图 1、图 5,蒙药那如-3 中已知的主要成分有没食子酸,乌头碱和胡椒碱<sup>[5-7]</sup>,这 3 种主要成分均可从含药血清中检出,见图 2 中的 a 峰、图 3 中的 b 峰及图 4 中的 c 峰。这 3 个人血成分可能为蒙药那如-3 的体内直接作用物质,对其进行深入的研究,将有助于阐明蒙药那如-3 药效物质基础及药效机制。蒙药那如-3 含药血清中的其他有效成分还需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 白清云.中国医学百科全书(蒙医学)[M].上海:上海科学技术出版社,1992:250.
- [2] 布林白乙拉,袁华兵,屠原原.蒙药那如-3 方对脊髓损伤后神经细胞 FOS 表达的影响[J].中国中医药咨讯,2009,1(6):30-31.
- [3] 布林白乙拉,罗利民,陈继铭,等.交通性脊髓损伤致截瘫病人用蒙药那如-3 治疗 66 例观察[J].中国医药导报,2009,1(3):45-46.
- [4] 吴绍春,布林白乙拉.蒙药那如-3 抑制辐射诱导小鼠细胞凋亡的影响的研究[J].中国基层医药,2008,15(4):25-26.
- [5] 陶淑娟,王桂艳,毕开顺.HPLC 法测定蒙药那如-3 丸中胡椒碱的含量[J].沈阳药科大学学报,2004,21(1):35-37.
- [6] 陶淑娟,邵太丽,毕开顺.高效液相色谱法测定蒙药那如-3 丸中没食子酸的含量[J].时珍国医国药,2005,16(1):2-3.
- [7] 孙国园,武娜,董玉.蒙药那如-3 的研究进展[J].内蒙古医科大学学报,2013,35(2):146-150.

(编辑:宋勇刚)

## The Study on Serum Fingerprint of Traditional Mongolian Medicine-Naru-3

Bulinbaiyila<sup>1</sup>, He Guisong<sup>1</sup>, Hu Di<sup>2</sup>, Gao Qiuhong<sup>2</sup>, Wang Jingyun<sup>3</sup>, He Bing<sup>2\*</sup>

(1. Department of Orthopedics; Panyu Hospital; The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 511447, China; 2. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China)

**Abstract: Objective:** To investigate the bioactive constituent of traditional Mongolian medicine-Naru-3, the method of Serum Fingerprints were established. **Methods:** Serum fingerprints of HPLC were adopted to determine the components of traditional Mongolian medicine-Naru-3 absorbed into blood. **Results:** Three components absorbed into blood were detected by HPLC, aconitine, piperine and gallic acid. **Conclusion:** Conclusion: Aconitine, piperine and gallic acid were possible the bioactive components absorbed into blood.

**Keywords:** Mongolian Medicine-Naru-3; HPLC; Serum Fingerprint