

土家药獐牙菜苦寒性味量化评价

李钰,黄先菊*,全志文,刘丽玲,杨沐然,李怡豪

(中南民族大学 药学院,武汉 430074)

摘要 为量化评价土家药獐牙菜各活性部位的苦味寒性,并探究其发挥苦味寒性的物质基础及作用机制,以实验对采集于湖北恩施的土家药獐牙菜进行了初步鉴定,经不同溶剂萃取得不同活性部位,采用高效液相色谱法对各活性部位的獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷进行分析,用电子舌技术对各活性部位的滋味度进行量化.通过监测实验小鼠肛温变化,检测能量代谢相关酶活力,并结合活性成分与TRP通道的分子对接评分值,探究土家药獐牙菜的寒热药性.结果显示土家药獐牙菜各活性部位獐牙菜苦苷的含量最高,其中乙酸乙酯部位对苦味的响应值最大,獐牙菜各活性部位均能降低小鼠肛温,抑制能量代谢相关的酶,表现出寒凉药性,且分子对接结果显示獐牙菜苷与TRPM4的评分值最高.这表明土家药獐牙菜各活性部位獐牙菜苦苷的含量最高,乙酸乙酯部位对其苦味药性的贡献最大,与热性药物相比,土家药獐牙菜表现出寒凉药性,其寒性发挥机制可能与活性成分和TRPM4的作用有关.

关键词 土家药;獐牙菜;苦味;寒性

中图分类号 R282.71 文献标志码 A 文章编号 1672-4321(2025)02-0188-05

doi:10.20056/j.cnki.ZNMDZK.20250207

Quantitative evaluation of bitter-cold property of *Swertia bimaculata*

LI Yu, HUANG Xianju*, QUAN Zhiwen, LIU Liling, YANG Muran, LI Yihao

(School of Pharmaceutical Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China)

Abstract In order to quantitatively evaluate the bitterness and coldness of the active parts of Tujia medicine *Swertia bimaculata* (*S. bimaculata*), and explore the material basis and mechanism of its bitterness and coldness, this experiment preliminarily identified *S. bimaculata* collected in Enshi, Hubei Province, and extracted different active parts with different solvents. The contents of swertiamarin, gentiopicroside and sweroside in each active part were analyzed by high performance liquid chromatography. The taste of each active site was quantified by electronic tongue technology. By monitoring the changes of anal temperature of mice, the activity of enzyme related to energy metabolism was detected, and combined with the molecular docking score of active components and TRP channels, the chilling-heat properties of *S. bimaculata* were explored. The results showed that the content of swertiamarin in the active fractions of *S. bimaculata* was the highest, and the ethyl acetate fraction had the greatest response value to bitterness. The active parts of *S. bimaculata* can reduce the rectal temperature of mice and inhibit the enzymes related to energy metabolism, showing cold and cool medicinal properties. The molecular docking results showed that the score of sweroside and TRPM4 was the highest. These results indicated that the content of swertiamarin in the active fractions of *S. bimaculata* is the highest, and the ethyl acetate fraction contributes the most to its bitterness. Compared with hot drugs, *S. bimaculata* showed cold medicinal properties, and its cold mechanism may be related to the role of active ingredients and TRPM4.

Keywords Tujia medicine; *Swertia bimaculata*; bitter taste; coldness

龙胆科獐牙菜属植物始载于《救荒本草》^[1],目前在我国约有80种,主要分布在云南、四川、青海等地^[2],另外在西藏东南部地区也有生长,当地将本属药物称作“蒂达”^[3].经过调查和整理发现,湖北省獐

收稿日期 2023-07-05

*通信作者 黄先菊(1972-),女,教授,博士,研究方向:中药民族药活性评价,E-mail:xianju@mail.scuec.edu.cn

基金项目 湖北省国际科技合作项目(2024EHA054);中南民族大学中药现代化传承与创新团队资助项目(XTZ24025)

牙菜属有12种,主要分布于鄂西南恩施、宜昌等地^[4],因恩施一带以土家族居多,所以该地带所产獐牙菜也被称作土家药獐牙菜。

土家药獐牙菜又名水灵芝、水黄连、河风草等,龙胆科多年生草本,具有苦寒药性,历史悠久,安全性高,功效多样,民间应用广泛,常用其治疗急性肠炎、肺热、菌痢等。研究表明,獐牙菜还有抗肿瘤活性^[5]。獐牙菜中提取分离的化合物可分为吡啶类、黄酮类、环烯醚萜类、三萜类等多种类型的化学成分^[2],现代药理研究发现,这些化学成分具有保肝利胆、抗菌消炎、解痉镇痛、降低血糖等作用^[6-7]。

目前獐牙菜属植物已有多种中成药,比如八味獐牙菜丸、二十五味珊瑚丸等。但当前大多数研究对象为川西、川东獐牙菜,对湖北土家药獐牙菜的研究较少,限制了土家药獐牙菜的开发利用。其次,针对獐牙菜的苦味和寒性特征,需要设计可视化、可量化、可重复的实验方案,优化对其苦味和寒性的量化和评价机制,从而充分挖掘药性药味在獐牙菜植物资源的鉴定和评价上的作用。

本研究拟对湖北恩施新塘乡采集的土家药獐牙菜各活性部位的成分进行对比分析,在此基础上,分析獐牙菜对小鼠物质能量代谢状况的影响,对土家药獐牙菜各活性部位的苦寒药性进行量化评价,旨在探讨獐牙菜性味特征的物质基础和作用机制,为湖北产獐牙菜属植物的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

药材于2021年9月采自湖北恩施新塘乡,经中南民族大学刘虹博士鉴定为獐牙菜 *Swertia bimaculata*,凭证标本保存于中南民族大学标本馆(编号:HSN5396)。将药材粉碎过65目筛,8倍量的80%乙醇浸泡,加热回流提取两次,每次1.5 h,合并滤液蒸发浓缩,干燥后得獐牙菜总提物301.24 g。采用系统溶剂分离法对总提物进行处理,依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇将总提物进一步分离干燥,最终得石油醚部位31.54 g、二氯甲烷部位20.80 g、乙酸乙酯部位5.97 g、正丁醇部位117.30 g,分离出水层,得水提物112.17 g。

昆明小鼠,SPF级,4周龄,体质量(20±2) g,雌雄各半,共70只,购自湖北省实验动物研究中心,饲养于中南民族大学实验动物中心SPF级动物房内,

饲养环境温度恒定(22~25℃)、湿度恒定(40%~60%),每隔12 h进行1次光、暗循环,予以正常饲料适应性喂养1周,进食饮水自由。

1.2 试剂和仪器

獐牙菜苷标准品、獐牙菜苦苷标准品、龙胆苦苷标准品(上海源叶);乙腈、甲醇、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇(中国医药);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(索莱宝);Na⁺-K⁺-ATP酶试剂盒(南京建成);氯化钠注射液(武汉滨湖双鹤药业)。

HH系列数显恒温水浴锅(金坛科析仪器);超声波清洗器(昆山超声仪器公司);高效液相色谱仪(美国安捷伦);电子舌(日本Insent公司);旋转蒸发仪(上海亚荣);电子天平(奥豪斯仪器);全波长酶标仪(美国赛默飞);倒置生物显微镜(重庆奥特)。

1.3 实验方法

1.3.1 獐牙菜全草粉末显微鉴定

取土家药獐牙菜全草生药粉末少许,置于载玻片上,滴加适量水合氯醛,于酒精灯外焰上加热至冒出小泡,放冷后滴加2滴甘油醋酸试液,封片,于倒置显微镜下观察。

1.3.2 獐牙菜活性部位成分及含量分析

以獐牙菜苷(0.202 mg/kg)、獐牙菜苦苷(0.202 mg/kg)、龙胆苦苷(0.202 mg/kg)的甲醇溶液为对照品,对獐牙菜各活性部位进行检测。色谱条件:填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶;色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为甲酸水(D)-0.1%,乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min, 12%B; 10~15 min, 12%~20%B; 15~35 min, 20%~26%B; 35~45 min, 26%~32%B; 45~55 min, 32%~50%B; 55~75 min, 50%~100%B)。流速1 mL/min;柱温30℃;检测波长为254 nm。

将含有獐牙菜苦苷(0.523 mg/kg)、龙胆苦苷(0.549 mg/kg)、獐牙菜苷(0.438 mg/kg)的甲醇混合溶液(对照品A)稀释得到6种不同浓度的混标溶液(对照品溶液A分别取5、2、1 mL用甲醇稀释至10 mL得对照品B、C、D,再取5 mL对照品D稀释至10 mL得对照品E,最后从对照品E中取2 mL稀释至10 mL得到对照品F)。检测并绘制獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷标准曲线,配制供试品溶液(石油醚部位1.148 mg/kg、二氯甲烷部位3.94 mg/kg、乙酸乙酯部位0.896 mg/kg、正丁醇部位3.056 mg/kg、水提物4.648 mg/kg),测定各活性部位獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷的含量。色谱条件:流动相77%水、23%甲醇,等度洗脱,时间30 min,其余条件同上。

1.3.3 獐牙菜各活性部位苦味度的测定

按各活性部位在獐牙菜中的占比,称取石油醚部位 0.4013 g、乙酸乙酯部位 0.4003 g、二氯甲烷部位 0.4010 g、正丁醇部位 0.4016 g 以及总提物 0.4009 g,分别置于 50 mL EP 管中,先后加入 20 mL 乙醇和 20 mL 生理盐水,密封摇匀,超声仪器中加速溶解,用生理盐水稀释成浓度为 1% 的溶液.再经 20% 乙醇稀释一倍,12000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 10 min,取 70 mL 上清,电子舌测定,重复测定 3 次.参比溶液为 0.3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒石酸和 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶液^[8].

1.3.4 獐牙菜对小鼠机体物质能量代谢状况的影响

昆明小鼠 70 只 (20 ± 2 g),经过 1 周的适应性喂养后随机分成 7 组,包括空白对照组、干姜组、总提物组和各活性部位组.总提物组的给药量为 500 mg/kg,干姜组为 1000 mg/kg^[9],对照组给予等体积生理盐水,各活性部位组按提取占比给药,连续 9 d 每天上午九时给药,隔天下午三时测定肛温,第 10 天取血,分离血清,测定乳酸脱氢酶(LDH)活力,摘取肝脏,测定 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力.

1.3.5 獐牙菜核心成分与寒热靶点分子对接

选取 6PQQ-TRPA1、6BQV-TRPM4、6O72-TRPM8^[10-12]

作为分子对接的受体,使用 SYBYL-X 2.0 软件对受体蛋白的复合三维晶体结构进行优化,并使用 Ligand 模式产生相应的活性口袋.选取獐牙菜苷(PubChem CID:161036)、獐牙菜苦苷(PubChem CID:442435)作为小分子配体^[15],使用 Chem3D 使小分子结构能量最小化,在 SYBYL-X2.0 中运行分子对接.

1.4 统计方法

用平均值 \pm 标准差(SD)来表示数据结果.多组数据之间的统计学相比采用 ANOVA 分析. $P < 0.05$ 时被认为具有统计学意义.

2 实验结果

2.1 獐牙菜全草粉末鉴定结果

显微鉴别实验发现獐牙菜全草粉末呈深褐色.色素块随处可见,呈现黄色或棕色.木纤维较少,少数为单纹孔.导管多见,以螺纹导管居多,梯纹较少.薄壁组织少见,细胞多边形,胞壁厚,平直、弯曲.花粉粒少见,卵球形,具颗粒状雕纹.草酸钙方晶少见(图 1).

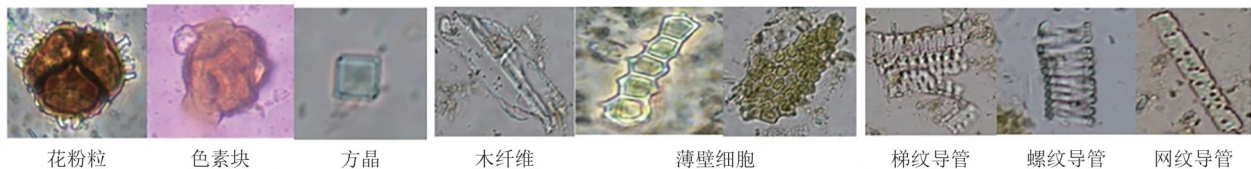


图 1 獐牙菜显微鉴定图

Fig. 1 Microscopic identification of *Swertia bimaculata*

2.2 獐牙菜各活性部位成分及含量

石油醚部位和二氯甲烷部位只检测出了獐牙菜苦苷(图 2),而其余部位三种成分都能检测出来.三种成分在正丁醇部位的含量最高,而且在各个活性部位中,獐牙菜苦苷的含量都最高(表 1).

2.3 獐牙菜各活性部位苦味度

电子舌对各活性部位的滋味响应平均值如表 2 所示,无论是苦味还是苦味回味,乙酸乙酯部位对电子舌的响应值都是最大的.

2.4 獐牙菜对小鼠机体物质能量代谢状况的影响

2.4.1 獐牙菜各活性部位对小鼠肛温的影响

各组小鼠的肛温变化如图 3 所示,持续给药发现,与空白对照组相比,干姜组小鼠肛温总体偏高,总提物组及各活性部位组小鼠肛温降低趋势较为明显;末次给药后,与空白对照组相比,干姜组小鼠肛温最高,乙酸乙酯部位组小鼠肛温最低,而獐牙菜总

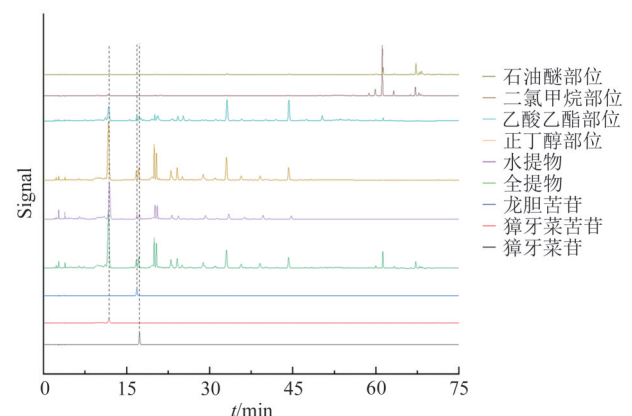


图 2 獐牙菜 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC of chromatogram of *Swertia bimaculata*

提物组及各活性部位组小鼠肛温均低于空白对照组.

2.4.2 獐牙菜各活性部位对小鼠能量代谢相关酶活力的影响

如图 4(a)所示,与空白对照组相比,干姜可以

表1 各活性部位成分含量

Tab. 1 Content of components in each active part

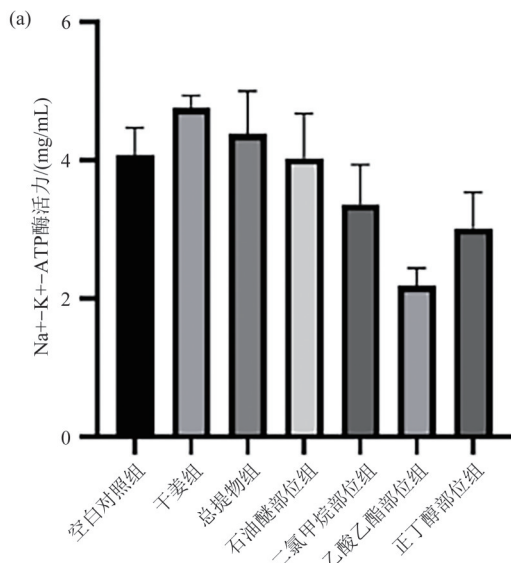
部位	獐牙菜苦苷含量/%	龙胆苦苷含量/%	獐牙菜苷含量/%
水层	10.78	0.65	0.58
正丁醇	27.81	2.41	2.29
乙酸乙酯	8.97	2.10	1.37
二氯甲烷	1.09	0	0
石油醚	1.92	0	0

表2 獐牙菜各活性部位不同滋味度均值

Tab. 2 The average value of different taste in different active parts of *Swertia bimaculata*

化学成分	酸味	苦味	涩味	苦味回味	涩味回味	鲜味	丰富性	咸味
总提物	9.52	-3.25	-6.92	0.66	0.99	1.83	-0.3	23.62
正丁醇	12.32	-4.22	-8.07	0.11	0.98	1.04	-0.34	24.6
乙酸乙酯	14.3	-4.97	-8.34	0.68	1.84	0.34	0.63	24.74
二氯甲烷	11.65	-4.02	-7.79	0.39	0.92	1.36	-0.15	23.66
石油醚	8.03	-3.26	-7.2	0.66	0.98	2.31	-0.12	23.85

提高 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力,而獐牙菜各活性部位则可



与空白对照组比较: **P<0.01, ***P<0.001.

图4 各组小鼠肝组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶和血清中 LDH 酶活力

Fig. 4 Activity of Na⁺-K⁺-ATPase in liver tissue and LDH enzyme in serum in each group of mice

3 讨论

药性和功效的发挥依托于药材化学成分.獐牙菜中的化学成分单体数量庞大,因此本研究采用系统溶剂分离法,根据不同溶剂的极性不同,对其成分进行分离,形成不同活性部位的物质组群.龙胆科药用植物的代表性成分是裂/环烯醚萜苷类化合物中的獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷^[13],研究重点比较了不同活性部位中这三种成分的含量差异.

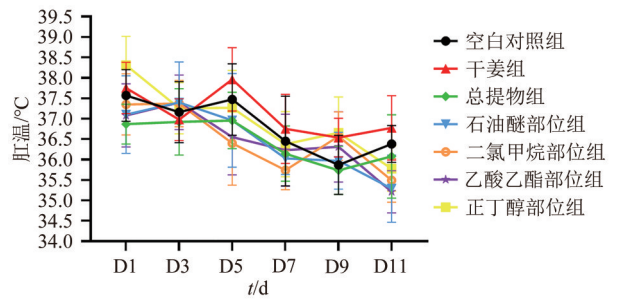


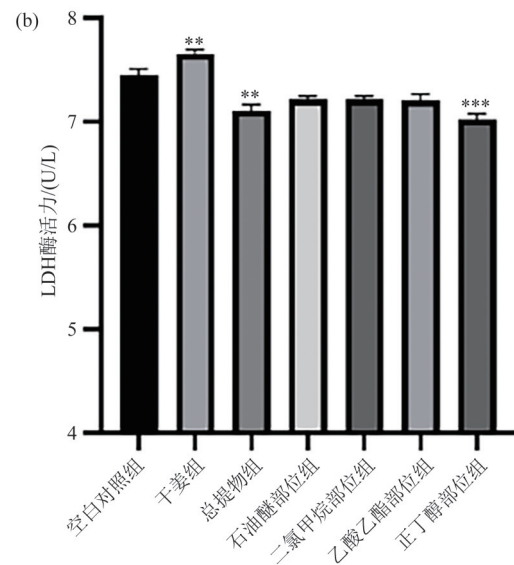
图3 各组小鼠肛温变化

Fig. 3 Changes of anal temperature in each group

以降低该酶的活力.如图4(b)所示,与空白对照组相比,干姜可以提高 LDH 酶活力,而獐牙菜可以降低乳酸脱氢酶(LDH)活力,其中总提物和正丁醇部位的作用效果显著(P<0.01, P<0.001).

2.5 獐牙菜核心成分与寒热靶点分子对接结果

三种寒性靶点与獐牙菜苷的结合作用稍强,与獐牙菜苦苷的结合作用稍弱,而两种化合物与 6BQV-TRPM4 结合位点的最高总评分值最大(表3).



结果表明,獐牙菜石油醚部位和二氯甲烷部位只能检测出獐牙菜苦苷,其余活性部位及总提物中三种成分都能检测出来.獐牙菜苦苷在各活性部位中的含量是最高的,并且大部分集中于总提物和正丁醇部位,龙胆苦苷主要集中于正丁醇和乙酸乙酯部位,而獐牙菜苷在正丁醇部位的含量最高.

苦味是中药药性“五味”之一,它对药效有重要作用.电子舌是由模拟味觉系统构成的电子分析检测器,由多个以敏感膜为材料的传感器组成,其中

参 考 文 献

表 3 分子对接总评分表

Tab. 3 Molecular docking general rating table

化合物	受体分子		
	6PQQ-TRPA1	6BQV-TRPM4	6O72-TRPM8
獐牙菜苷	6.0686	6.9402	6.8536
	5.8933	6.2556	5.7156
	5.0825	6.1243	5.6431
獐牙菜苦苷	4.0729	5.8509	5.2810
	4.0563	5.7563	5.2563
	4.0043	5.6973	5.1502

一氧化钴(CoO)苦味传感器可检测到苦味及苦味回味^[14]。结果表明,无论是苦味还是苦味回味,獐牙菜乙酸乙酯部位对电子舌的响应值都是最大的,说明獐牙菜乙酸乙酯部位对獐牙菜苦味药性的贡献度最大。

温热性药物通常能够促进机体的能量代谢,相反,寒凉药物则表现出抑制作用^[15]。LDH酶和Na⁺-K⁺-ATP酶都能参与能量代谢过程,这两种酶的活性越高,机体能量代谢越快。与干姜组小鼠相比,总提物组及各活性部位组小鼠肛温降低趋势较为明显,并且乙酸乙酯部位对小鼠肛温的影响最为显著。各组小鼠肝脏中的Na⁺-K⁺-ATP酶和血清中的LDH酶活力表明,獐牙菜各活性部位都能抑制LDH和Na⁺-K⁺-ATP酶的活力,表明獐牙菜可能通过降低能量代谢相关酶的活力,导致ATP生成减少,机体供能减少,从而发挥寒性作用,在小鼠表征上表现为肛温下降。

分子对接评分值表明,獐牙菜苷与三种靶点的作用稍强,从受体的角度来看,TRPM4与两种活性成分的作用最强。TRPA1和TRPM8都是非常典型的能够感知冷刺激的温度敏感型通道^[10],当獐牙菜活性成分对其产生结合时,就能使中枢产生冷的感觉,使獐牙菜表现出寒性。虽然TRPM4介于温敏和凉敏之间,但是它能被钙离子激活后选择性地通过钾离子和钠离子^[12],所以推测其对于寒性药性的发挥可能与钠钾泵有关,也就是与能量代谢过程有关。

综上所述,土家药獐牙菜各活性部位中獐牙菜苦苷的含量最高,乙酸乙酯部位对其苦味药性的贡献度最大。土家药獐牙菜能够降低小鼠肛温、抑制能量代谢相关酶,表现出寒性,其寒性药性的发挥可能与活性成分与TRPM4的作用有关。

- [1] 陈家春,黄先石.湖北獐牙菜属植物的化学成分分析[J].中药材,1990,13(2):29-30.
- [2] 何旭,陈美华,金莉莉,等.中国獐牙菜属植物化学成分与药理作用研究进展[J].人参研究,2022,34(4):45-53.
- [3] 董志强,杜少波,陈晓文,等.典型藏茵陈原植物(川西獐芽菜、椭圆叶花锚、湿生扁蕾)分子水平的研究进展[J].安徽农学通报,2022,28(11):13-15,28.
- [4] 陈家春,黄先石,詹亚华.湖北獐牙菜属药用植物资源调查[J].中药材,1990,13(4):18-19.
- [5] 万玛拉旦,兰科加,完玛仁青.藏药七味红花殊胜丸治疗黄疸型肝炎的疗效观察[J].中国民族医药杂志,2022,28(12):1-3.
- [6] 任丽华,谢华通.龙胆科植物獐牙菜属药用植物的研究及应用概况[J].中医儿科杂志,2007,3(1):50-52.
- [7] HUANG X J, HE C J, LIANG S, et al. *Veratilla baillonii* franch could alleviate lipid accumulation in LO2 cells by regulating oxidative, inflammatory, and lipid metabolic signaling pathways[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 575772.
- [8] 荆文光,赵小亮,张权,等.基于电子舌和多成分定量技术的厚朴“苦味”药性物质基础研究[J].中国现代中药,2022,24(2):258-264.
- [9] 米汪洋,杨翠兰,克迎迎,等.基于正常大鼠物质能量代谢状况探讨怀菊花的寒热药性[J].中草药,2021,52(3):799-807.
- [10] 李睿萍,孙万森,铁晓玲,等.探讨中药药性与温度相关性瞬时受体电位的潜在联系[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(8):2992-2997.
- [11] 贾振华,黄渊,唐景峰,等. TRP通道超家族的基本特征及其与疾病的关系[J].生命科学,2020,32(9):903-914.
- [12] 杨璇. TRPM4通道离子选择性通透机制的研究[D].天津:河北工业大学,2020.
- [13] 黄先菊,伊雪佳.龙胆科植物保肝作用的物质基础[C]//第二届临床中医学大会论文集.北京:第二届临床中医学大会,2018:46-55.
- [14] 刘欣畅,欧水平,赵云,等.药物苦味评价技术研究进展[J].中国医药工业杂志,2022,53(12):1699-1705.
- [15] 苏发智,白晨曦,张文森,等.基于正常及寒热证模型大鼠物质能量代谢的天南星与胆南星的药性研究[J].中国中药杂志,2022,47(17):4682-4690.

(责编&校对 姚春娜)