

基于分子热力学特征探讨黄连解毒汤水煎自沉淀形成机制

李 桐, 王 辉[#], 张 昊, 田学浩, 陈麒合, 房 康, 吴高荣, 徐 冰, 褚福浩, 王鹏龙*, 雷海民*
北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘 要: **目的** 全面解析黄连解毒汤(HJD)水煎自沉淀来源, 并从分子热力学角度探讨 HJD 组方配伍中药间相互作用热力学参数及结合能力强弱, 以期揭示中药复方水煎自沉淀形成机制。**方法** 通过拆方研究, 锁定产生水煎自沉淀的主要组方配伍; 通过等温滴定量热技术(isothermal titration calorimetry, ITC)分别测定不同配伍中药相互作用过程中的能量和热力学参数变化, 包括结合常数(K_a)、解离常数(K_d)、结合计量比(n)、焓变(ΔH)、熵变(ΔS)、吉布斯自由能变(ΔG), 进而阐明不同组方配伍中药间结合能力的差异。**结果** 拆方研究表明, 能够产生明显自沉淀现象的配伍有黄芩-黄连、黄芩-黄柏, 其中黄芩-黄连生成沉淀最明显, 黄芩-黄柏次之; 而黄芩-栀子、黄连-黄柏、黄柏-栀子、黄连-栀子配伍则未发现明显自沉淀生成。应用 ITC 分别考察黄芩-黄连、黄芩-黄柏、黄芩-栀子 3 种配伍关系, 结果显示黄芩-栀子相互作用过程中能量变化显著低于黄芩-黄连和黄芩-黄柏相互作用的能量变化, 3 组的 $\Delta H < 0$, $-T\Delta S > 0$, $\Delta G < 0$, $|\Delta H| > |-T\Delta S|$, 均为焓驱动的自发反应过程; 黄芩水煎液滴定黄连、黄柏、栀子水煎液的 K_a 依次为 1.283×10^4 、 4.680×10^3 、 1.973×10^3 , 数值逐渐减小, 反之 K_d 依次增大(7.794×10^{-5} 、 2.137×10^{-4} 、 5.068×10^{-4})。**结论** HJD 水煎自沉淀形成过程中, 存在焓驱动非共价键结合的化学反应, 而非简单的物理凝聚吸附沉淀; 并且黄芩-黄连成分间结合力大于黄芩-黄柏成分间结合力, 而黄芩-栀子间的相互作用极弱。

关键词: 黄连解毒汤; 自沉淀; 等温滴定量热; 分子热力学; 黄芩; 黄连; 黄柏; 栀子

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)17-3505-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.009

Formation mechanism of precipitation in Huanglian Jiedu Decoction based on molecular thermodynamic characteristics

LI Tong, WANG Hui, ZHANG Hao, TIAN Xue-hao, CHEN Qi-he, FANG Kang, WU Gao-rong, XU Bing,
CHU Fu-hao, WANG Peng-long, LEI Hai-min

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To explore all sources of precipitation, parameters of interaction and binding abilities of different Chinese materia medica (CMM) combinations during the formation process of the precipitation in Huanglian Jiedu Decoction (HJD) using the thermodynamic method. The study was aim to reveal the mechanism of the formation of precipitation in CMM decoction. **Methods** First, the possible CMM combinations which had obvious precipitation phenomenon when combined were determined by the research on decomposed recipes. Then isothermal titration calorimetry (ITC) was used to determine the binding heat and thermodynamic parameters of binding reactions, thermodynamic parameters contents binding constant (K_a), dissociation constant (K_d), estimate of stoichiometric ratio (n), enthalpy change (ΔH), entropy change (ΔS), Gibbs free energy change (ΔG), these data were used to explain the differences in binding abilities between different CMM combinations. **Results** The original decomposed recipes experiment indicated the CMM combinations that could produce obvious precipitate when they were mixed were *Scutellariae Radix-Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix-Phellodendri Chinensis Cortex*. Precipitation amount of *Scutellariae Radix-Coptidis Rhizoma*

收稿日期: 2017-04-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603256); 北京中医药大学青年教师面上项目(2015-JYB-JSMS023); 北京中医药大学创新团队资助项目(2011-CXTD-15); 北京市中药新药与物质基础研究重点实验室(北京, 100102); 国家级大学生创新创业训练计划(201710026044)

作者简介: 李 桐(1996—), 男, 本科在读, 研究方向为中药先导化合物发现与开发。E-mail: lt1755258545@163.com

***通信作者** 雷海民, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药先导化合物发现与开发。Tel: (010)84738641 E-mail: hm_lei@126.com

王鹏龙, 男, 讲师, 研究方向为中药功效成分修饰及活性筛选。Tel: (010)84738641 E-mail: wpl581@126.com

#并列第一作者 王 辉(1996—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药先导化合物发现与开发。E-mail: 15652387323@163.com

was the most. There was no precipitate in *Scutellariae Radix*-*Gardeniae Fructus*, *Coptidis Rhizoma*-*Phellodendri Chinensis Cortex*, *Coptidis Rhizoma*-*Gardeniae Fructus* or *Phellodendri Chinensis Cortex*-*Gardeniae Fructus*. In ITC, the thermodynamic parameters of the three experience groups were the same, $\Delta H < 0$, $-T\Delta S > 0$, $\Delta G < 0$, $|\Delta H| > |-T\Delta S|$, indicating the three reactions were all enthalpy-driving reactions. The K_a of *Scutellariae Radix* decoction titrated *Coptidis Rhizoma* decoction was 1.283×10^4 , *Scutellariae Radix* decoction titrated *Phellodendri Chinensis Cortex* decoction was 4.680×10^3 , *Scutellariae Radix* decoction titrated *Gardeniae Fructus* decoction was 1.973×10^3 . The value decreased gradually. The binding heat of *Scutellariae Radix* and *Gardeniae Fructus* was much smaller than the binding heats of *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma*, *Scutellariae Radix* and *Phellodendri Chinensis Cortex*. **Conclusion** During the formation process of the precipitation in HJD, the main source of acid-base complex-precipitation were *Scutellariae Radix*-*Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix*-*Phellodendri Chinensis Cortex*; Analysis of molecular thermodynamic indicates the binding energy of *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma* was larger than that of *Scutellariae Radix* and *Phellodendri Chinensis Cortex*, compared with them, the binding energy of *Scutellariae Radix* and *Gardeniae Fructus* is tiny.

Key words: Huanglian Jiedu Decoction; precipitation; isothermal titration calorimetry; molecular thermodynamics; *Scutellariae Radix*; *Coptidis Rhizoma*; *Phellodendri Chinensis Cortex*; *Gardeniae Fructus*

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decoction, HJD) 为历代中医名方, 首载于东晋葛洪《肘后备急方》, 由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味药按 3:2:2:3 的比例配伍组成, 中医临床常用于脑卒中的恢复治疗^[1-2]。现代药理研究发现 HJD 上清液具有促进损伤神经细胞恢复的功能^[3-4]; 通过降低 ADP 核糖多聚酶 (PARP) 的过度表达, 继而抑制凋亡蛋白 Caspase-3 活性, 直接抑制神经细胞的凋亡过程, 从而发挥神经保护功效^[5]。近来有研究报道, HJD 水煎自沉淀现象明显, 自沉淀收率最高可达 7.13% (沉淀量/药材量)^[6], 本课题组前期利用 HPLC-MSⁿ 技术分析发现该自沉淀主要是以黄芩苷、汉黄芩苷、小檗碱、黄连碱、栀子苷等为代表的酸碱性化学成分, 并利用 CoCl_2 损伤的神经生长因子 (NGF)-PC12 细胞模型对 HJD 水煎自沉淀活性评价, 已证实自沉淀具有确切的神经保护作用, 能够显著抑制神经细胞凋亡^[7]。但是通过利用 HPLC-MSⁿ 自沉淀成分的解析, 并不能解释自沉淀产生的内在分子机制, 本实验采用拆方研究, 希望能够进一步解析自沉淀来源, 并借助等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry, ITC) 解析自沉淀形成过程中内在的分子热力学参数。

ITC 通过微量量热仪连续、准确地检测和记录一个变化过程的量热曲线, 计算出结合过程的热力学参数, 包括该过程的结合常数 (K_a)、解离常数 (K_d)、结合计量比 (n)、焓变 (ΔH)、熵变 (ΔS) 以及吉布斯自由能变 (ΔG), 提供反应的热力学和动力学信息。目前, 主要应用于分子之间的相互作用特征鉴定、酶动力学以及中药注射液用药相容性的研究^[8-9], 本实验旨在利用 ITC 技术阐明自沉淀的形成机制。

1 仪器与材料

YP3002 电子天平, 上海佑科仪器仪表有限公司; NANO ITC 等温滴定量热仪和脱气站 Degassing Station, 美国 TA 公司; 京立牌 LD5-2B 型台式低速离心机, 北京京立公司; KQ-100DE 超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; 日立 UH5300 紫外可见分光光度计, 日立高新技术公司; ME55 十万分之一电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; DP1DK-70A 恒温鼓风干燥箱, 北京亚欧德鹏科技有限公司。黄芩 *Scutellariae Radix*、黄连 *Coptidis Rhizoma*、黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex*、栀子 *Gardeniae Fructus* 购自同仁堂, 并由北京中医药大学中药资源系刘春生教授分别鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮、茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥果实。对照品黄芩苷 (批号 110715-200514, 质量分数 98%)、栀子苷 (批号 749-8801, 质量分数 98%), 均购自中国食品药品检定研究院; 对照品小檗碱, 批号 Z24F4B1, 质量分数 98%, 上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 紫外分光光度 (UV) 法测定

2.1.1 药材水煎液的制备及定量测定 称取黄连 3 g, 加 10 倍量水冷凝回流, 煎煮 30 min 后水煎液趁热离心, 分取上清液即得黄连水煎液。再分别称量黄芩 2 g、黄柏 2 g、栀子 3 g, 用同样的方法处理, 分别得到黄芩、黄柏和栀子的澄清水煎液。采用 UV 法测定样品浓度, 测定时, 将药材水煎液样品分别稀释 10 倍。其中, 黄芩水煎液浓度以黄芩苷计总黄

酮量^[10], 为 (6.57 ± 0.77) mmol/L ($n=3$); 黄连、黄柏水煎液浓度以小檗碱计总生物碱量^[11-12], 分别为 (7.79 ± 0.85) 、 (2.76 ± 0.39) mmol/L ($n=3$); 栀子水煎液浓度以栀子苷计总环烯醚萜苷量^[13], 为 (1.19 ± 0.21) mmol/L ($n=3$)。

为了满足 ITC 在计算热力学参数时以 mmol/L 作为样品单位, 因此本方法对照品配制采用物质的量浓度, 进而初测得到药材中相应有效部位的浓度。

2.1.2 线性关系考察 分别精密称取 3 种对照品并分别配制成 250.0、125.0、31.25、15.625、7.812 5 μ mol/L 的黄芩苷、小檗碱、栀子苷对照品溶液, 采用 UV 法^[14]分别在 278、344、240 nm 处测定对照品溶液吸光度 (A) 值作出标准曲线, 回归方程分别为黄芩苷 $A=14.703 C+0.017 7$, $r=0.999 3$; 小檗碱 $A=5.677 4 C+0.020 5$, $r=0.999 1$; 栀子苷 $A=8.937 7 C+0.022 5$, $r=0.999 3$; 线性范围均为 7.812 5~250.0 μ mol/L。

2.1.3 精密度试验 取同一黄芩苷对照品溶液, 在 276 nm 处测定 A 值, 重复测定 5 次, A 值依次为 0.377、0.376、0.376、0.377、0.377, 计算其 RSD 为 0.17%; 同理, 计算小檗碱、栀子苷 RSD 分别为 0.17%、0.17%; 为说明本方法精密度良好。

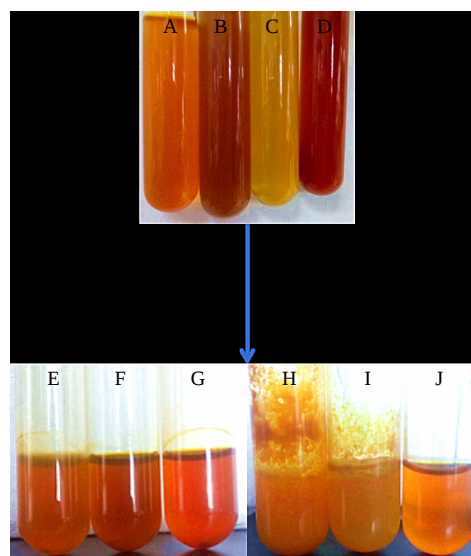
2.1.4 稳定性试验 精密吸取黄芩苷对照品溶液按上述方法操作, 在室温下放置 2、4、8、12、24 h 分别测定 A 值, A 值依次为 0.377、0.375、0.377、0.373、0.376, 其 RSD 为 0.44%; 同理, 计算小檗碱、栀子苷 RSD 分别为 0.28%、0.23%; 说明溶液 24 h 内基本稳定, 不影响定量测定。

2.2 拆方研究沉淀反应

取等体积黄芩水煎液、黄连水煎液、黄柏水煎液、栀子水煎液, 两两互相混合。实验结果见图 1, 产生沉淀或浑浊即相互结合的中药配伍为黄芩-黄连、黄芩-黄柏, 其余实验组均无明显变化, 由此表明 HJD 水煎自沉淀形成过程中相互作用的配伍中药主要是黄芩-黄连、黄芩-黄柏。因此, 本研究以 HJD 中黄芩为主体, 应用 ITC 技术分别探讨其与黄连、黄柏、栀子的相互作用。

2.3 ITC 检测配伍中药成分间的相互作用

2.3.1 供试品样品的制备 为了使拟合得到的热力学参数准确可靠, 应用 ITC 进行分子热力学参数测定过程中, 需要反应池样品充分消耗, 最终得到 S 形等温线^[15]。因此, 根据前期预实验的摸索, 将黄芩水煎液稀释 4 倍, 黄连水煎液稀释 8 倍, 黄柏水



A—栀子单煎液 B—黄柏单煎液 C—黄芩单煎液 D—黄连单煎液
E—栀子-黄柏单煎混合液 F—黄柏-黄连单煎混合液 G—黄连-栀子单煎混合液 H—黄芩-黄连单煎混合液 I—黄芩-黄柏单煎混合液 J—黄芩-栀子单煎混合液

A—D—single decoctions of *Gardeniae Fructus*, *Phellodendri Chinensis Cortex*, *Scutellariae Radix*, *Coptidis Rhizoma* (from left to right) E—J—mixtures of *Phellodendri Chinensis Cortex* and *Gardeniae Fructus*, *Coptidis Rhizoma* and *Phellodendri Chinensis Cortex*, *Coptidis Rhizoma* and *Gardeniae Fructus*, *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma*, *Scutellariae Radix* and *Phellodendri Chinensis Cortex*, *Scutellariae Radix* and *Gardeniae Fructus* (from left to right)

图 1 拆方研究配伍中药水煎自沉淀现象

Fig. 1 Pictures of precipitation of single decoctions and mixtures

煎液稀释 4 倍, 栀子水煎液未稀释。稀释后的黄芩、黄连、黄柏、栀子 4 种水煎液供试品溶液以黄芩苷、小檗碱、栀子苷计参与反应的单体成分浓度分别为 1.95、0.82、0.69、1.19 mmol/L。滴定前, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 得到的水煎液样品滤液在脱气站 (Degassing Station) 脱气 20 min。

2.3.2 检测条件和操作过程 利用 ITC 进行滴定, 在样品池中加入被滴定溶液 300 μ L, 恒温至 30 $^{\circ}$ C, 控制搅拌速率为 250 r/min, 待仪器自动平衡后开始滴定黄芩水煎供试品溶液, 连续滴定 20 滴, 每滴 2.5 μ L, 时间间隔为 180 s。

2.3.3 数据处理及分析 应用 Nano Analysis 软件进行数据采集, 滴定结束后, 将实验用样品浓度输入, 采用 Nano Analyze 软件建模对反应活性谱进行计算、拟合, 可得到不同滴定过程的热力学参数, 包括 K_a 、 K_d 、 n 、 ΔH 、 ΔS 、 ΔG 。参数的计算推导

过程已有文献报道^[16]。

热量变化曲线峰值朝上代表放热,朝下代表吸热。 K_a 值越大,说明2种物质结合力越强。 $\Delta G < 0$,反应自发进行,且绝对值越大,反应越容易进行。 $\Delta H < 0$, $-T\Delta S < 0$,反应为熵和焓共同驱动的自发反应; $\Delta H < 0$, $-T\Delta S > 0$,若 $|\Delta H| > |-T\Delta S|$,则反应自发进行,且差值越大反应越容易进行。相反,当 $|\Delta H| < |-T\Delta S|$ 时,反应不会自发进行; $\Delta H > 0$, $-T\Delta S > 0$,反应不自发进行; $\Delta H > 0$, $-T\Delta S < 0$,则只有在 $|\Delta H| < |-T\Delta S|$ 时,反应才会自发进行,且差值越大越容易进行^[17]。

2.3.4 滴定实验及结果 黄芩水煎液分别滴定去离子水、黄连水煎液、黄柏水煎液和栀子水煎液的能量变化值见图2~5。以黄芩水煎液滴定去离子水的能量变化(P , μW)为基准,用Nano Analyze软件分别拟合出黄芩水煎液滴定黄连水煎液、黄柏水煎液、栀子水煎液的能量变化曲线及热力学参数,结

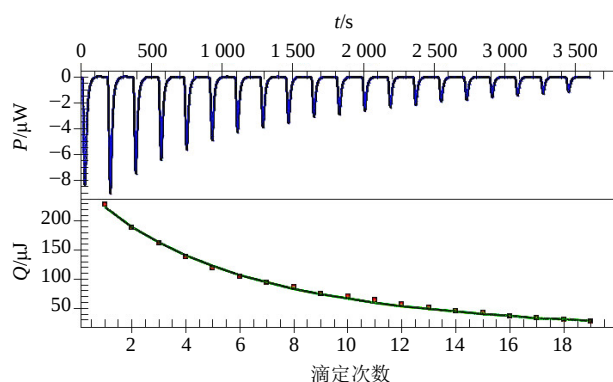


图2 黄芩水煎液滴定去离子水能量变化图像及拟合曲线
Fig. 2 Calorimetric titrations of decoctions and energy curves of *Scutellariae Radix* decoction to deionized water

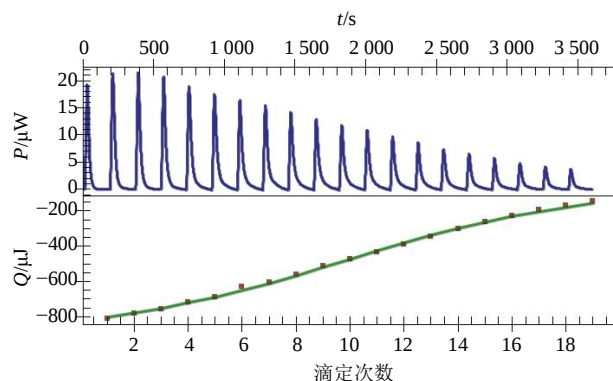


图3 黄芩水煎液滴定黄连水煎液能量变化图像及拟合曲线
Fig. 3 Calorimetric titrations of decoctions and energy curves of *Scutellariae Radix* decoction to *Coptidis Rhizoma* decoction

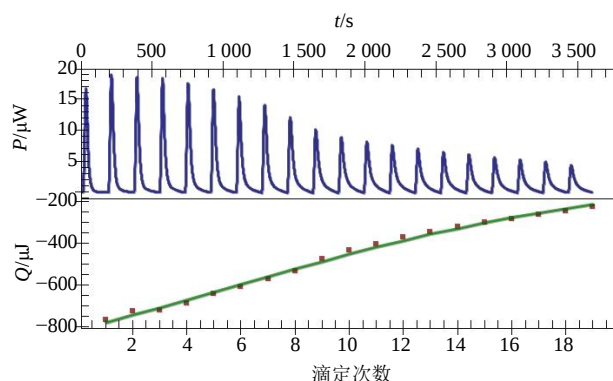


图4 黄芩水煎液滴定黄柏水煎液能量变化图像及拟合曲线
Fig. 4 Calorimetric titrations of decoctions and energy curves of *Scutellariae Radix* decoction to *Phellodendri Cortex* decoction

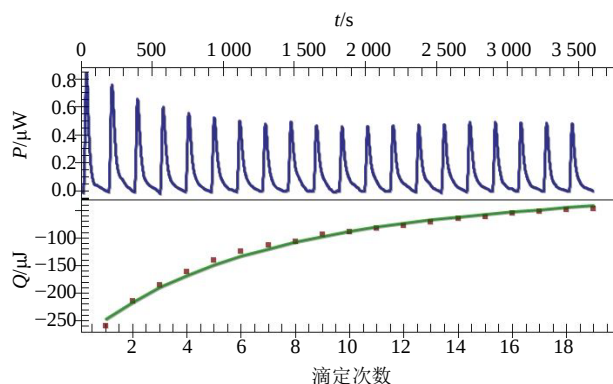


图5 黄芩水煎液滴定栀子水煎液能量变化图像及拟合曲线
Fig. 5 Calorimetric titrations of decoctions and energy curves of *Scutellariae Radix* decoction to *Gardeniae Fructus* decoction

果见表1。观察滴定图2~5发现,黄芩滴定去离子水的热量峰朝下,说明黄芩提取液的稀释过程为吸热。而黄芩水煎液滴定黄连、黄柏、栀子水煎液的能量(Q , μJ)峰均朝上,说明这3个药对提取液相互作用的反应过程放热^[18-19]。

分析表1中的热力学参数 ΔH 、 ΔS 、 ΔG 发现黄芩水煎液滴定去离子水的 $\Delta G < 0$, $\Delta H > 0$, $-T\Delta S < 0$, $|\Delta H| < |-T\Delta S|$,说明该过程为熵驱动的自发过程,驱动力为物理变化过程的疏水作用,即仅为黄芩水煎液在水中的稀释过程^[20]。黄芩滴定黄连水煎液的 $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$, $-T\Delta S > 0$, $|\Delta H| > |-T\Delta S|$,说明该过程为焓驱动的自发过程,黄芩和黄连中的酸性成分间可能发生了非共价键的结合^[20-21],如氢键、配位键等。 $n=0.480$,说明黄芩中成分与黄连中成分的平均结合比例可能为1:2;黄芩滴定黄柏水煎液的 $\Delta G < 0$, $\Delta H < 0$, $-T\Delta S > 0$, $|\Delta H| >$

表 1 反应过程的热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters of titrations

类别	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$-T\Delta S/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	n	$K_d/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$K_a/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$
黄芩水煎液滴定去离子水	1 127.00	-1 146.86	-19.86	1.721	3.709×10^{-4}	2.696×10^3
黄芩水煎液滴定黄连水煎液	-199.30	175.38	-23.92	0.480	7.794×10^{-5}	1.283×10^4
黄芩水煎液滴定黄柏水煎液	-246.90	225.49	-21.41	0.602	2.137×10^{-4}	4.680×10^3
黄芩水煎液滴定栀子水煎液	-16 455.00	16 428.05	-26.90	0.001	5.068×10^{-4}	1.973×10^3

$|-T\Delta S|$ ，说明该过程同黄芩滴定黄连一致，也为焓驱动的自发反应。 $n=0.602$ ，提示两者结合的比例可能为 5:3；黄芩滴定栀子过程的 $\Delta G<0$ ， $n=0.001$ ，推测黄芩栀子反应虽自发，但成分间的结合作用极弱。

从表 1 中的 K_a 和 K_d 来看，黄芩水煎液滴定黄连、黄柏、栀子的 K_a 分别为 1.283×10^4 、 4.680×10^3 、 $1.973\times 10^3 \text{ L/mol}$ ，依次递减， K_d 分别为 7.794×10^{-5} 、 2.137×10^{-4} 、 $5.068\times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ，逐渐递增，说明黄芩同黄连的结合作用最强，约为黄芩-黄柏结合能力的 3 倍，黄芩和栀子的结合能力最弱。

通过图 6 可以观察到黄芩滴定栀子过程的能量变化非常小，折线紧贴 x 轴，提示放出的热量均用以填补黄芩在水中稀释吸收的热量。因此黄芩与栀子的结合作用远小于同黄连和黄柏的结合作用。验证了上述从热力学参数角度进行的推断，与之前的沉淀试验也相吻合，也说明了黄芩与黄连、黄柏的反应是 HJD 中最重要的部分。

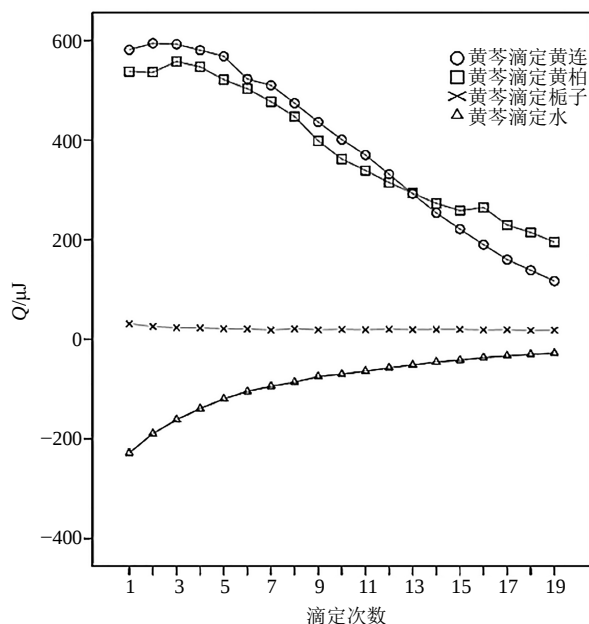


图 6 能量变化折线图

Fig. 6 Line chart of energy change

3 讨论

本实验在前期的工作基础上^[7]，通过拆方研究确定了自沉淀是由酸碱性药材配伍产生，即 HJD 中酸性药材黄芩分别与碱性药材黄连和黄柏成分相互作用产生；通过对 ITC 数据的分析则发现黄芩水煎液滴定黄连、黄柏、栀子水煎液的过程均满足 $\Delta H<0$ ， $-T\Delta S>0$ ， $\Delta G<0$ ， $|\Delta H|>|-T\Delta S|$ ，说明这 3 组反应均为焓驱动的化学反应；通过对 K_a 和 K_d 的比较，揭示了 HJD 中结合作用最强的 2 味药是黄芩和黄连，其次是黄芩和黄柏；通过对 n 的比较，揭示了相互配伍中药黄芩-黄连、黄芩-黄柏的结合比例。

用 K_a 、 K_d 来判断不同配伍中药间结合能力的差异是因为 K_a 、 K_d 均是与浓度无关的参数，大小仅取决于参与反应的物质的种类以及温度。因此在相同滴定条件下，黄芩-黄连结合的 K_a 大于黄芩-黄柏结合的 K_a ，并不是由于简单的黄连、黄柏中总生物碱浓度不同造成的，而是和生物碱的种类及组成有关。实验中发现黄芩滴定栀子也发生了微弱的化学变化，可能是由于黄芩中的黄芩苷与栀子中极少量黄酮或者胆碱类物质成分^[22]发生了酸碱反应。

本实验首次将 ITC 技术引入到中药复方的研究之中，证明了将等温滴定量热技术应用于中药复方水煎自沉淀形成机制以及药对间相互作用研究的可行性。对于现阶段的中药研究而言，成分复杂是阻碍研究进展的主要障碍，而 ITC 的优点就在于简单快捷、灵敏度高，无需明确中药的物质基础和成分组成，能有效地弥补化学方法的不足。同时，ITC 也能用于中药中单体活性成分的滴定，测定单体有效成分相互作用的热力学原理，从而从化学层面更高层次地揭示中药间相互作用的机制。关于本实验中 HJD 的单体成分间（如黄芩中的黄芩苷与黄连中的小檗碱、黄连碱，黄柏中的小檗碱、黄柏碱等）相互作用研究也正在进行当中。相信 ITC 技术与化学方法的结合会更好揭示中药复方中药对相互作用的机制。

同时,本实验结果表明传统中医认为临床服用汤药时自沉淀应与上清液同服的科学性,自沉淀形成于复方有效成分间的相互作用,如在临床服用汤药或企业提取生产过程中将自沉淀弃掉,在一定程度上是对药用资源的无意浪费,也势必会影响临床疗效。因此,基于本实验研究,相信中药复方水煎自沉淀作为一种新型有效成分聚集体,具有潜在的药用价值,值得深入研究。

参考文献

- [1] 彭世陆,刘丽芳,朱华旭,等.组合药物及黄连解毒汤对小檗碱在大鼠脑组织中药动力学的影响[J].中草药,2016,47(16):2877-2882.
- [2] 李华安.黄连解毒汤的研究及应用[J].山东中医药大学学报,1995(5):312.
- [3] Wang P R, Wang J S, Zhang C, et al. Huang-Lian-Jie-Du-Decotion induced protective autophagy against the injury of cerebral ischemia/reperfusion via MAPK-mTOR signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(1): 270-280.
- [4] 张 建,龙建飞,邹海艳,等.黄连解毒汤有效部位对脑缺血半暗带区星形胶质细胞活化及 Cx43 表达的影响[J].中草药,2014,45(13):1876-1882.
- [5] 龙建飞,张 弛,张秋霞,等.黄连解毒汤有效部位对脑缺血大鼠半暗带神经元 NeuN、Caspase-3、PARP 表达的影响[J].北京中医药大学学报,2014,37(2):90-98.
- [6] 潘林梅,傅 佳,朱华旭,等.黄连解毒汤提取动态过程及沉淀产生机制的初步研究[J].中国中药杂志,2010,35(1):40-43.
- [7] Zhang C Z, Zhao R, Yan W Q, et al. Compositions, formation mechanism, and neuroprotective effect of compound precipitation from the traditional Chinese prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang [J]. *Molecules*, 2016, doi:10.3390/molecules21081094.
- [8] 宋熙熙.蛋白质-表面活性剂相互作用及酶催化反应的量热学研究[D].杭州:浙江大学,2008.
- [9] 鄢 丹,陈龙虎,冯 雪,等.基于等温滴定量热技术的清开灵注射液临床联合用药相互作用表征研究[J].中草药,2012,43(11):2217-2221.
- [10] 王 东,王 玲.近红外光谱法测定黄芩药材中黄芩苷的含量[J].中医研究,2007,20(2):20-22.
- [11] 代春美,肖小河,王 迪,等.微量热法对不同生长年份黄连品质的评价[J].中草药,2006,37(2):205-209.
- [12] 蓝 松,尹 艳.酸性染料比色法测定关黄柏中总生物碱的含量[J].广东化工,2016,43(24):134-135.
- [13] 吴红娟,王清波,谭朝阳,等.不同来源栀子中栀子苷含量测定[J].湖南中医药大学学报,2010,30(5):35-37.
- [14] 刘 昊,芦 乾,宋 伟,等.栀子药材中总绿原酸含量的紫外测定方法学研究[J].时珍国医国药,2012,23(12):2997-2998.
- [15] Pierce M M, Raman C S, Nall B T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions [J]. *Methods*, 1999, 19(2): 213-221.
- [16] 冯 雪,鄢 丹,闫 琰,等.基于等温滴定量热技术表征的中药注射剂临床联合用药相容性评价[J].药学报,2011,46(3):322-328.
- [17] 赵 霞.谈焓变和熵变对自发过程的影响及其对 ΔG 的相对贡献[J].大理学院学报,2000(2):83-85.
- [18] 焦 铭.过氧化氢酶去折叠及其与超氧化物歧化酶相互作用的研究[D].武汉:武汉大学,2003.
- [19] 刘 敏.蛋白质及其模型分子的溶液热力学研究[D].杭州:浙江大学,2007.
- [20] Leavitt S, Freire E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(5): 560-566.
- [21] Ohtaka H, Velázquezcampoy A, Xie D, et al. Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: The binding thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease [J]. *Protein Sci*, 2002, 11(8): 1908-1916.
- [22] 孟祥乐,李红伟,李 颜,等.栀子化学成分及其药理作用研究进展[J].中国新药杂志,2011,20(11):959-967.