

黄连解毒汤中 13 种活性成分的 HPLC 检测及其有效部位的筛选

杨丽宏, 袁子文, 纪 鹏, 张晓松, 华永丽, 魏彦明*

甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

摘 要: 目的 建立黄连解毒汤(HJD)中 13 个活性成分黄柏碱、绿原酸、木兰花碱、京尼平苷、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 的 HPLC 检测方法, 利用活性成分含量和比例筛选 HJD 有效部位。方法 借助索氏提取器采用系统溶剂提取法将 HJD 水煎液冻干粉依次经石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、纯净水提取并干燥后获得 HJD 不同极性部位, 将残渣干燥后作为沉淀部位。采用 Agilent 1260 型高效液相色谱仪建立 HJD 中 13 种活性成分的 HPLC 检测方法, 并对 HJD 及其不同极性部位中活性成分含量进行检测, 筛选 HJD 有效部位。结果 成功建立了稳定可靠的 HPLC 检测方法; HJD 中各活性成分含量从高到低依次为京尼平苷、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、黄连碱、药根碱、表小檗碱、木兰花碱、黄柏碱、汉黄芩素、绿原酸、千层纸素 A。与石油醚、醋酸乙酯、水和沉淀部位相比, HJD 正丁醇部位中各活性成分总量最高且其比例与 HJD 全方相近, 为 HJD 有效部位。结论 成功建立了 HJD 中 13 个活性成分的 HPLC 检测方法, 经筛选 HJD 正丁醇部位为 HJD 有效部位。

关键词: 黄连解毒汤; 有效部位; 黄柏碱; 绿原酸; 木兰花碱; 京尼平苷; 黄连碱; 表小檗碱; 药根碱; 小檗碱; 巴马汀; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 汉黄芩素; 千层纸素 A; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)16-3794-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.009

Determination of 13 active components in Huanglian Jiedu Decoction by HPLC and screening of its effective fraction

YANG Li-hong, YUAN Zi-wen, JI Peng, ZHANG Xiao-song, HUA Yong-li, WEI Yan-ming

College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of 13 active components (phellodendrine, chlorogenic acid, magnoflorine, geniposide, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine, berberine, palmatine, baicalin, wogonoside, wogonin, and oroxylin A) in Huanglian Jiedu Decoction (HJD) by HPLC, and screen the effective fractions of HJD by the content and ratio of active components. **Methods** The freeze-dried powder of HJD water decoction was extracted by petroleum ether, ethyl acetate, *n*-butanol and pure water by soxhlet extractor combined system solvent extraction method. The different polar fractions of HJD were obtained after drying, and the residue was used as the precipitation fraction. Subsequently, 13 active ingredients in HJD were detected by Agilent 1260 high performance liquid chromatography. Furthermore, the content of active components in HJD and its different polar fractions were detected, and the effective fraction of HJD were screened. **Results** A stable and reliable HPLC method was successfully established, and the content of active components in HJD from high to low were: geniposide, berberine, palmatine, baicalin, wogonoside, coptisine, jatrorrhizine, epiberberine, magnoflorine, phellodendrine, wogonin, chlorogenic acid, and oroxylin A. Compared with the fractions of petroleum ether, ethyl acetate, purified water, and precipitation, the total content of active components in the fraction of *n*-butanol of HJD was the highest and its proportion is the closest to that of HJD, which was the effective fraction of HJD. **Conclusion** In this study, a method for the determination of 13 active ingredients in HJD by HPLC was successfully established, and the *n*-butanol fraction of HJD was selected as the effective fraction of HJD based on the content of active components.

Key words: Huanglian Jiedu Decoction; effective fraction; phellodendrine; chlorogenic acid; magnoflorine; geniposide; coptisine; epiberberine; jatrorrhizine; berberine; palmatine; baicalin; wogonoside; wogonin; oroxylin A; HPLC

收稿日期: 2019-05-05

基金项目: 国家肉牛/牦牛产业技术体系(CARS-37); 甘肃农业大学优秀博士学位论文培育项目(YB2017004)

作者简介: 杨丽宏(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 18894310019@163.com

*通信作者 魏彦明, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理学。E-mail: weiyim@gsau.edu.cn

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decoction, HJD) 是由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味中药组成的清热解毒的经典方剂, 该方最早记载于东晋葛洪所著的《肘后备急方》, 其名初见于唐代王焘所著的《外台秘要》^[1]。现代药理研究表明, 该方具有抗炎、解热、抗病毒、抗菌、抗氧化、抗血栓等多重药理作用^[2-5]。目前, 该方在国内外临床上具有较广泛的应用, 可用于治疗脓毒血症、降血糖、降血压、调血脂以及治疗神经退行性疾病^[6-15]。

选用不同极性溶剂对中药或复方中成分进行萃取, 是分离鉴定中药药效成分群最简单常见的手段, 如白关亚等^[16]采用该方法制备了青翘不同极性部位, 并初步证明青翘的抗炎药效物质主要集中于醋酸乙酯部位。众所周知, 中药复方成分复杂, 但并非所有成分均具有药理活性, 其治疗效果往往是小部分高含量且具有药理活性的成分综合作用的结果。因此, 对中药复方中此类药效成分群的分离鉴定对中药作用机制的研究意义深远。近年来, 随着现代检测技术的进步, 广大研究人员对 HJD 中化学成分进行了积极的探索, 并对其部分活性成分建立了定性、定量检测方法^[17-19], 如 Dou 等^[20]采用 LC-ESI-MS/MS 检测到 HJD 中 13 个成分, 并对其中 7 个成分建立了 LC-DAD 定量检测方法; Yang 等^[21]则采用 UHPLC-Quadrupole-Orbitrap MS 检测到 HJD 中 69 个化学成分, 并采用 UHPLC-QqQ MS 对其中 17 个成分进行了定量检测。不难看出, 这些研究要么针对少数几个活性成分进行了定性、定量检测, 要么则需要依赖于高精尖的检测设备。众所周知, 在生产环节中对药物指标性活性成分的实时监测对管控药物质量至关重要。因此, 在生产中对具有多重药理活性的 HJD 进行多种活性成分的检测显得尤为必要。另外, 立足于实际生产过程, 采用更具有普遍适用性的检测仪器无疑能够极大地降低企业生产成本。

本研究采用常见的 Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 建立 HJD 中研究较多的 13 个活性成分黄柏碱、绿原酸、木兰花碱、京尼平苷、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 的定性、定量检测方法, 在此基础上, 定量检测 HJD 经系统溶剂提取后不同极性部位中 13 个活性成分的含量分布, 并依各部位中活性成分含量筛选出 HJD 有效部位, 以期为实际生产提供切实有效的质量检测方法, 同时也为 HJD

复方精制及药效物质基础的研究奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; AL104 型十万分之一电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; RE-6000 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; KDM 型调温电热套, 山东省鄄城永兴仪器厂; 真空冷冻干燥仪, 上海恒科学仪器有限公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HH-S 型恒温水浴锅, 金坛市恒丰仪器厂; 砂芯过滤装置、0.22 μm 有机相针式滤器 (批号 10441995), 上海安谱实验科技股份有限公司。

1.2 药品与试剂

原药材黄连、黄柏、黄芩、栀子均购于兰州市黄河药材市场, 经甘肃农业大学中兽医教研室魏彦明教授鉴定, 黄连为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 黄柏为芸香科黄檗属植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 除去粗皮的干燥树皮, 黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根, 栀子为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的干燥成熟果实。对照品黄柏碱 (CAS 号 6873-13-8, 批号 yz170427, 质量分数 $\geq 98\%$)、绿原酸 (CAS 号 327-97-9, 批号 yz092419, 质量分数 $\geq 98\%$)、千层纸素 A (CAS 号 480-11-5, 批号 yz170928, 质量分数 $\geq 98\%$)、汉黄芩素 (CAS 号 632-85-9, 批号 yz161221, 质量分数 $\geq 98\%$)、木兰花碱 (CAS 号 2141-09-5, 批号 yz180524, 质量分数 $\geq 98\%$)、黄芩苷 (CAS 号 21967-41-9, 批号 yz180309, 质量分数 $\geq 98\%$)、巴马汀 (CAS 号 3486-67-7, 批号 yz180629, 质量分数 $\geq 98\%$)、汉黄芩苷 (CAS 号 51059-44-0, 批号 yz171009, 质量分数 $\geq 98\%$)、盐酸黄连碱 (CAS 号 6020-18-4, 批号 yz180315, 质量分数 $\geq 98\%$)、京尼平苷 (CAS 号 24512-63-8, 批号 yz171103, 质量分数 $\geq 98\%$)、表小檗碱 (CAS 号 6873-9-2, 批号 yz171108, 质量分数 $\geq 98\%$)、药根碱 (CAS 号 3621-38-3, 批号 yz170413, 质量分数 $\geq 98\%$)、小檗碱 (CAS 号 2086-83-1, 批号 yz170421, 质量分数 $\geq 98\%$) 均购自南京源植生物科技有限公司; 色谱纯甲醇购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 色谱纯异丙醇购自天津市光复科技有限公司; 色谱纯甲酸购自天津市大茂化学试剂厂; 分析纯石油醚购自天津市津东天正精细化学试剂厂; 分析纯

醋酸乙酯购自烟台市双双化工有限公司；分析纯正丁醇购自天津市大茂化学试剂厂；纯净水购自娃哈哈股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 HJD 全方水煎液的制备

称取黄连 60 g、黄芩 40 g、黄柏 40 g、栀子 60 g 加 10 倍纯净水浸泡 1 h，武火煮沸后用文火煎煮 1.5 h，滤过，滤渣加 8 倍纯净水再煎煮 1.5 h，合并 2 次滤液，用旋转蒸发仪减压浓缩为浸膏。 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空冷冻干燥得 HJD 全方干粉，保存于干燥箱中，备用。

2.2 HJD 不同极性部位的制备

称取 HJD 干粉 10 g，加 500 mL 石油醚于圆底烧瓶中用索氏提取装置提取至索氏提取器中溶剂无色透明，获得石油醚提取物。挥干索氏提取器及残渣中溶剂后按此方法依次采用醋酸乙酯、正丁醇、纯净水进行提取，将各溶剂提取物浓缩干燥后依次得到 HJD 石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位。将最后剩余残渣干燥后为 HJD 沉淀部位。将各部位干粉置于干燥箱中保存备用。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取各对照品于同一 25 mL 量瓶中，30% 甲醇溶液定容，配制成混合对照品母液，使用时稀释至所需质量浓度。混合对照品母液中各对照品溶液质量浓度分别为黄柏碱 11.4 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 36.0 $\mu\text{g/mL}$ 、木兰花碱 13.0 $\mu\text{g/mL}$ 、京尼平苷 330.0 $\mu\text{g/mL}$ 、黄连碱 42.0 $\mu\text{g/mL}$ 、表小檗碱 11.5 $\mu\text{g/mL}$ 、药根碱 15.4 $\mu\text{g/mL}$ 、小檗碱 900.0 $\mu\text{g/mL}$ 、巴马汀 46.7 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 73.8 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩苷 42.0 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩素 21.0 $\mu\text{g/mL}$ 、千层纸素 A 27.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 供试品溶液的制备

分别精密称取适量 HJD 干粉、石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位、沉淀部位于 10 mL 棕色量瓶中，加入 30% 甲醇于冰水浴超声溶解 10 min，定容，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得 HJD 全方及各部位供试品溶液。

2.5 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)，流动相为甲醇-1% 甲酸水溶液，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ，检测波长 265 nm，体积流量 1.0 mL/min，进样量 20 μL ，梯度洗脱条件^[21]：0~10 min，10% 甲醇；10~12 min，10%~15% 甲醇；

12~14 min，15%~20% 甲醇；14~16 min，20%~30% 甲醇；16~17 min，30%~31% 甲醇；17~21 min，31%~31.4% 甲醇；21~30 min，31.4%~35% 甲醇；30~35 min，35%~47% 甲醇；35~40 min，47%~50% 甲醇；40~50 min，50%~65% 甲醇；50~60 min，65%~95% 甲醇；60~70 min，5% 甲醇。

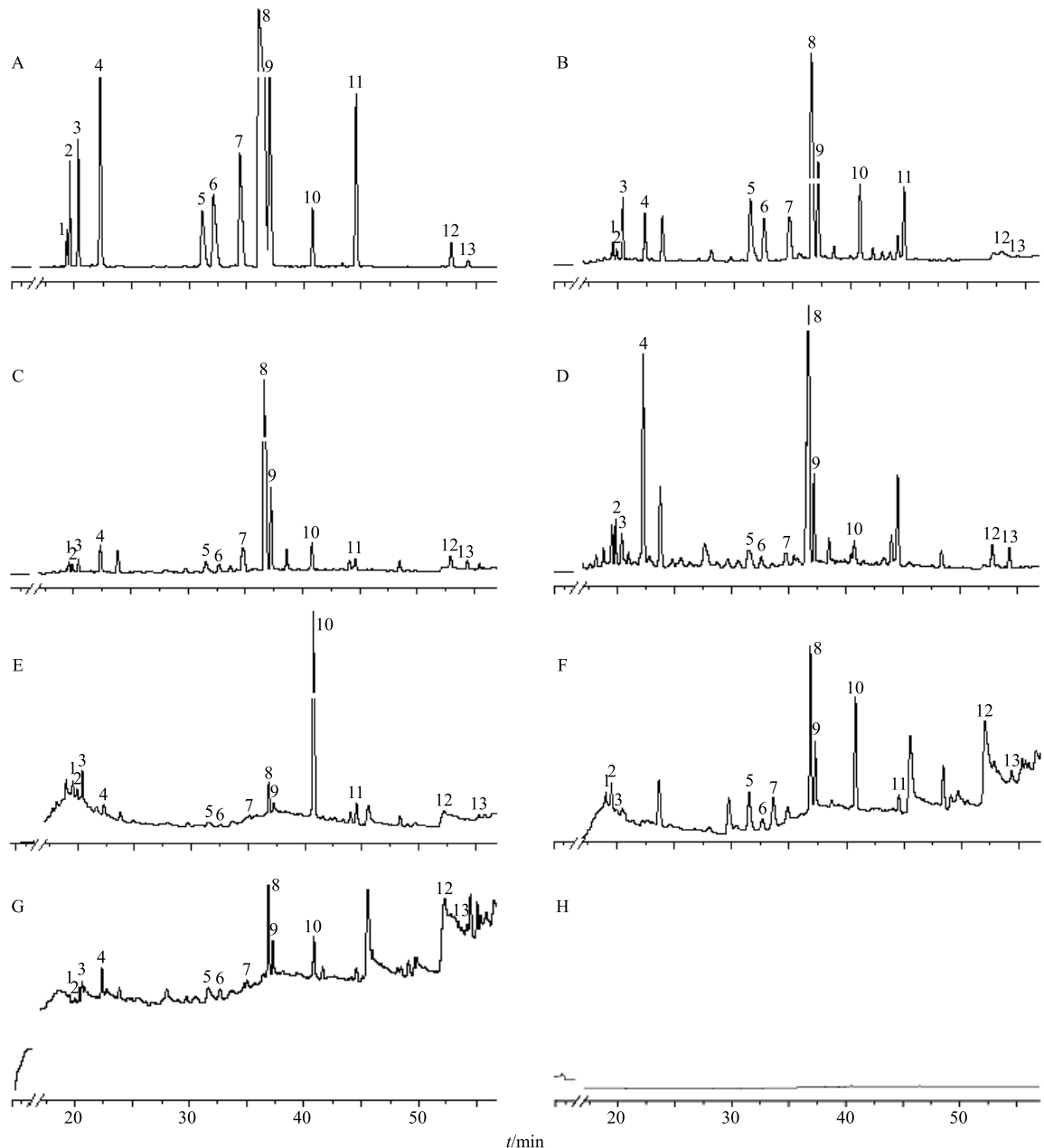
2.6 HJD 水煎液干粉及其不同极性部位的得率

称量“2.1”项方法下制备的 HJD 全方干粉，并根据原药材计算得率为 22.31%。称量“2.2”项下方法制备的各极性部位根据 HJD 干粉计算得率分别为石油醚部位 0.718%、醋酸乙酯部位 5.15%、正丁醇部位 64.45%、水部位 25.76%、沉淀部位 3.70%。

2.7 HPLC 方法学考察

2.7.1 系统适应性实验 按照“2.5”项下色谱条件，分别吸取混合对照品溶液和 HJD 及各极性部位样品溶液进样，测定各化合物峰面积，结果（图 1）显示，混合对照品溶液中各成分对应色谱峰分离良好，基线平稳且各对照品峰与样品峰时间对应良好。

2.7.2 线性关系考察 精密吸取混合对照品母液，将其用 30% 甲醇稀释为 7 个梯度，分别计算出每个质量浓度梯度下各对照品的质量浓度，按“2.5”项色谱条件测定 7 个质量浓度梯度下各对照品的峰面积，以质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 绘制各对照品标准曲线，进行线性回归，得各活性成分的线性回归方程和线性范围分别为黄柏碱 $Y=4.282\ 9\ X+0.176\ 6$ ， $r=0.999\ 6$ ，线性范围 0.035 8~11.440 $\mu\text{g/mL}$ ；绿原酸 $Y=18.962\ X-6.074\ 4$ ， $r=0.999\ 7$ ，线性范围 1.125 0~36.000 $\mu\text{g/mL}$ ；木兰花碱 $Y=44.068\ X-1.086\ 7$ ， $r=0.999\ 9$ ，线性范围 0.040 5~12.960 $\mu\text{g/mL}$ ；京尼平苷 $Y=5.130\ 8\ X+0.494\ 7$ ， $r=0.999\ 9$ ，线性范围 0.469 0~300.00 $\mu\text{g/mL}$ ；黄连碱 $Y=59.547\ X-30.839$ ， $r=0.999\ 0$ ，线性范围 0.131 3~42.000 $\mu\text{g/mL}$ ；表小檗碱 $Y=56.062\ X-7.121\ 2$ ， $r=0.999\ 2$ ，线性范围 0.035 9~11.480 $\mu\text{g/mL}$ ；药根碱 $Y=58.775\ X-2.618\ 6$ ， $r=0.999\ 8$ ，线性范围 0.048 0~15.360 $\mu\text{g/mL}$ ；小檗碱 $Y=90.337\ X-204.46$ ， $r=0.999\ 5$ ，线性范围 1.500 0~960.000 $\mu\text{g/mL}$ ；巴马汀 $Y=59.303\ X-257.76$ ， $r=0.999\ 6$ ，线性范围 0.729 7~467.000 $\mu\text{g/mL}$ ；黄芩苷 $Y=33.606\ X-15.172$ ， $r=0.994\ 9$ ，线性范围 0.115 0~73.800 $\mu\text{g/mL}$ ；汉黄芩苷 $Y=45.876\ X+4.407\ 9$ ， $r=0.999\ 7$ ，线性范围 0.065 7~



1-黄柏碱 2-绿原酸 3-木兰花碱 4-京尼平苷 5-黄连碱 6-表小檗碱 7-药根碱 8-小檗碱 9-巴马汀 10-黄芩苷
11-汉黄芩苷 12-汉黄芩素 13-千层纸素 A
1-phellodendrine 2-chlorogenic acid 3-magnoflorine 4-geniposide 5-coptisine 6-epiberberine 7-jatrorrhizine
8-berberine 9-palmatine 10-baicalin 11-wogonoside 12-wogonin 13-oroxylin A

图 1 混合对照品 (A)、HJD 全方水煎液 (B)、正丁醇部位 (C)、醋酸乙酯部位 (D)、水部位 (E)、沉淀部位 (F)、石油醚部位 (G) 和溶剂 (H) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), HJD water decoction (B), *n*-butyl alcohol fraction (C), ethyl acetate fraction (D), water fraction (E), precipitation fraction (F), petroleum ether fraction (G), and solvent (H)

42.000 $\mu\text{g/mL}$; 汉黄芩素 $Y=38.580 X-2.627 3$, $r=0.999 4$, 线性范围 0.032 8~21.000 $\mu\text{g/mL}$; 千层纸素 A $Y=27.353 X-2.708 9$, $r=0.999 3$, 线性范围 0.042 2~27.000 $\mu\text{g/mL}$ 。可以看出各活性成分在相应检测质量浓度范围内线性关系良好。

2.7.3 精密度试验 取“2.4”项下方法配制的 HJD 全方样品 1 份, 按“2.5”项色谱条件连续进样 5 次, 分别计算 13 种活性成分黄柏碱、绿原酸、木兰花碱、京尼平苷、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素

A 对应峰面积 RSD 值和保留时间 RSD 值, 结果峰面积 RSD 分别为 0.819 4%、0.906 3%、0.670 3%、0.969 5%、1.214 4%、1.096 7%、1.188 4%、1.228 9%、1.030 6%、1.516 9%、0.949 5%、1.281 0%、1.937 8%, 保留时间 RSD 分别为 0.021 2%、0.011 8%、0.022 7%、0.019 5%、0.071 0%、0.073 0%、0.045 6%、0.034 7%、0.031 0%、0.016 1%、0.022 3%、0.022 0%、0.021 9%, 结果表明各活性成分峰面积的 RSD 值均小于 2%, 保留时间的 RSD 值均小于 0.1%, 说明该检测方法精密度良好。

2.7.4 稳定性试验 取同一 HJD 供试品溶液分别在配制后 0、2、4、10、24 h 进样检测, 并计算 13 种活性成分黄柏碱、绿原酸、木兰花碱、京尼平苷、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 对应峰面积和保留时间的 RSD 值, 结果峰面积 RSD 分别为 1.486 7%、0.983 1%、0.898 4%、0.771 4%、1.986 8%、0.674 2%、1.063 7%、3.605 5%、0.977 4%、4.280 8%、0.921 1%、1.334 7%、2.978 1%, 保留时间 RSD 分别为 0.028 3%、0.029 3%、0.030 1%、0.048 0%、0.086 3%、0.088 8%、0.051 2%、0.036 4%、0.029 8%、0.019 7%、0.026 3%、0.027 8%、0.021 1%, 结果显示各活性成分对应峰面积的 RSD 值均小于 5%, 保留时间的 RSD 值均小于 0.1%, 该结果表明, HJD 供试品溶液在配置后 24 h 内稳定。

2.7.5 重复性试验 同时配制 5 份 HJD 样品, 按“2.5”项色谱条件进行检测, 分别计算 13 种活性成分黄柏碱、绿原酸、木兰花碱、京尼平苷、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 峰面积和保留时间的 RSD 值, 结果峰面积 RSD 分别为 4.178 1%、0.713 3%、0.615 2%、1.756 3%、2.705 7%、1.523 0%、0.957 7%、1.137 5%、0.863 6%、2.786 2%、0.591 6%、1.679 8%、3.468 7%, 保留时间 RSD 分别为 0.020 5%、0.051 2%、0.025 3%、0.070 1%、0.063 0%、0.077 6%、0.052 4%、0.036 2%、0.030 8%、0.045 6%、0.049 0%、0.085 9%、0.035 9%, 结果显示各化合物峰面积的 RSD 值均小于 5%, 保留时间的 RSD 值均小于 0.1%, 说明该检测方法稳定可靠。

2.7.6 加样回收率试验 精密称取 5 份已知 13 种活性成分含量的 HJD 样品, 精密加入黄柏碱、绿原酸、木兰花碱、京尼平苷、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、

千层纸素 A 的混合对照品储备液, 进样测定不同样品中 13 种活性成分的峰面积。计算其回收率和 RSD 值, 结果为黄柏碱、绿原酸、木兰花碱、京尼平苷、黄连碱、表小檗碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 平均回收率分别为 96.591 8%、94.285 1%、97.693 9%、99.026 4%、98.151 6%、99.385 5%、97.342 4%、99.376 0%、94.474 6%、92.706 9%、95.315 0%、91.166 7%、90.892 1%, RSD 分别为 4.182 1%、1.262 7%、2.610 9%、2.226 4%、2.931 3%、4.732 1%、0.969 1%、0.759 9%、4.314 2%、2.200 3%、4.783 4%、3.789 2%、2.464 2%, 结果显示 13 种成分的回收率在 90%~100%, RSD 值均小于 5%, 说明该检测方法下各化合物的回收率良好。

2.7.7 含量测定 分别平行制备 5 份 HJD、石油醚部位、醋酸乙酯部位、正丁醇部位、水部位以及沉淀部位样品。采用建立的 HPLC 方法分别对其进行检测并使用外标法计算 HJD 及各极性部位中 13 种活性成分的含量。结果(表 1)表明 13 种活性成分在 HJD 中含量最高的 6 个依次为京尼平苷、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、黄连碱。

从各活性成分在 HJD 不同极性部位的含量分布来看, 石油醚部位中可检出 12 种, 但各活性成分含量甚微且其比例与全方差异较大; 醋酸乙酯部位中可检出 12 种, 其中千层纸素 A、绿原酸和京尼平苷含量远高于 HJD 全方, 说明醋酸乙酯对此 3 种活性成分具有显著的富集作用, 但其余成分含量则远低于 HJD 全方。有趣的是, 正丁醇部位中 13 种活性成分均可检出且对 8 种成分黄柏碱、药根碱、汉黄芩素、千层纸素 A、巴马汀、绿原酸、小檗碱、京尼平苷具有富集作用。此外, 从图 2 中还可看出相较于其他极性部位, 正丁醇部位中各活性成分含量比例与 HJD 全方中基本相似。水部位和沉淀部位中分别可检出 13 和 11 种活性成分, 但此二部位中各成分含量均较少且各成分比例与 HJD 全方差异较大。

进一步对 13 种活性成分进行分类比较发现, HJD 全方中生物碱类成分(小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱、表小檗碱、木兰花碱、黄柏碱)含量最高, 其次为环烯醚萜类成分(京尼平苷)和黄酮类成分(汉黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A), 有机酸(绿原酸)含量最低(图 3)。石油醚部位中 4 类成分含量均很低, 醋酸乙酯部位中环烯醚

表 1 HJD 及各极性部位中 13 种活性成分含量测定结果
Table 1 Content of 13 components in HJD and different fractions

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	黄柏碱	木兰花碱	表小檗碱	药根碱	汉黄芩苷	汉黄芩素	千层纸素
HJD	3.827 6±0.115 8	6.748 9±0.045 0	8.905 6±0.086 4	9.402 8±0.096 6	17.536 0±0.237 0	2.168 9±0.348 8	0.261 8±0.021 2
石油醚部位	0.008 3±0.318 5	0.003 9±0.008 1	0.007 3±0.002 5	0.004 0±0.005 1	0.000 0±0.000 0	0.031 1±0.005 5	0.015 2±0.009 5
醋酸乙酯部位	0.000 0±0.000 0	2.654 9±0.038 2	1.153 0±0.014 3	1.286 4±0.041 5	7.341 9±0.205 6	0.507 9±0.263 7	2.777 4±0.045 1
正丁醇部位	3.897 9±0.093 5	3.277 8±0.041 9	3.099 0±0.042 3	10.199 0±0.155 8	15.900 0±0.692 2	3.255 4±0.575 0	4.469 3±0.108 8
水部位	0.350 3±0.138 9	0.303 4±0.005 5	0.165 0±0.003 8	0.105 2±0.018 6	0.172 4±0.033 5	0.139 4±0.288 1	0.128 1±0.021 9
沉淀部位	0.857 6±0.357 9	0.046 0±0.017 5	0.172 7±0.007 4	0.096 9±0.009 6	0.000 0±0.000 0	1.732 5±0.675 8	0.296 7±0.124 6

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	巴马汀	黄连碱	黄芩苷	绿原酸	小檗碱	京尼平苷
HJD	19.682 0±0.145 2	14.058 0±0.163 1	18.577 0±0.092 7	1.080 0±0.026 1	53.082 0±0.544 3	72.383 0±1.094 8
石油醚部位	0.196 5±0.043 9	0.026 7±0.007 1	0.020 5±0.001 4	0.015 3±0.015 2	0.099 2±0.044 9	0.028 9±0.026 9
醋酸乙酯部位	8.188 9±0.057 2	2.930 3±0.086 7	0.823 5±0.121 0	6.333 5±0.051 1	5.609 4±0.152 8	150.950 0±0.331 1
正丁醇部位	21.060 0±0.234 9	5.303 4±0.107 4	12.264 0±0.077 9	1.194 4±0.021 1	69.223 0±1.103 3	84.946 0±1.132 1
水部位	4.373 4±0.023 0	0.604 3±0.005 0	0.464 5±0.006 3	0.661 3±0.169 8	2.361 4±0.009 3	1.337 7±0.047 1
沉淀部位	4.306 6±0.126 1	0.640 9±0.032 0	0.656 8±0.363 1	0.455 6±0.112 6	2.391 3±0.031 3	0.000 0±0.000 0

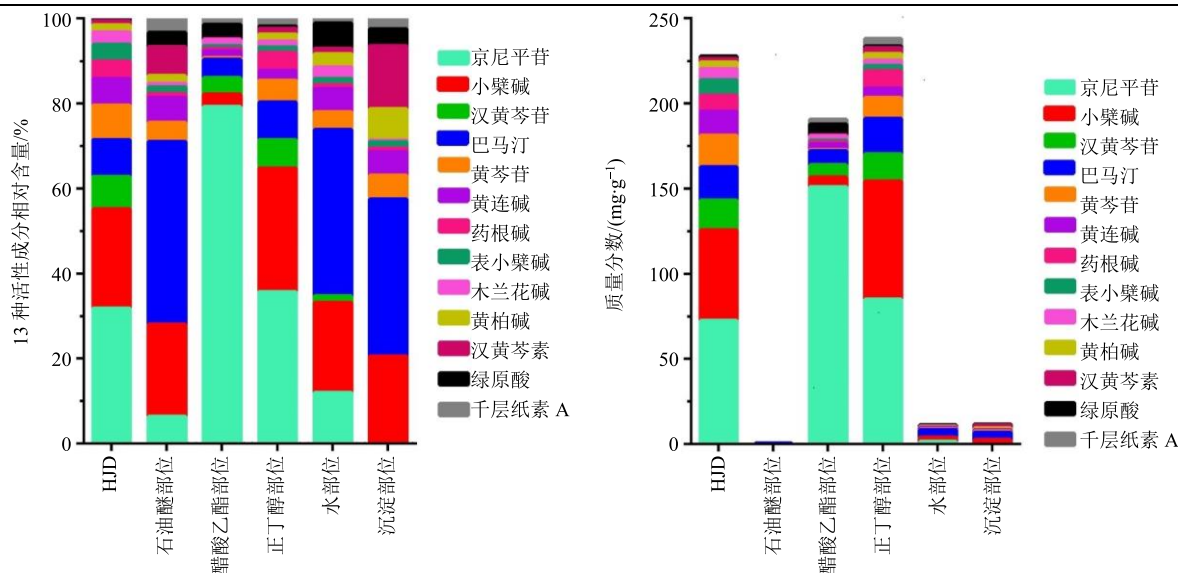


图 2 HJD 及各部位中 13 种活性成分含量

Fig. 2 Content of 13 active components in HJD and different fraction

萜类化合物和有机酸含量达到 HJD 全方的 2 倍，但该部位中生物碱、黄酮类含量均较低。正丁醇部位中 4 类化合物含量比例与 HJD 全方相似。生物碱类和黄酮类活性成分在水部位与沉淀部位中含量接近但远低于 HJD 全方。此外，沉淀部位中无环烯醚萜类化合物。因此，综合上述分析结果表明 HJD 正丁醇部位为 HJD 有效部位。

3 讨论

近年来，随着 HJD 在中医临床上的广泛应用以

及检测技术的快速发展，众多学者对 HJD 中诸多活性成分的药理作用做了深入研究，李欢等^[22]研究表明小檗碱、栀子苷、黄芩苷、巴马汀等成分对脑缺血有显著疗效；胡淑平等^[23]研究发现黄连素、汉黄芩素有体外抗炎作用。此外，也有研究表明 HJD 中治疗糖尿病的主要活性成分为小檗碱和黄芩素^[24-25]。因此，参考此类文献报道本研究最初选择了 HJD 药理作用研究较多的 15 种活性成分拟建立其 HPLC 检测方法，但由于其中槲皮素和黄芩黄素含量较低

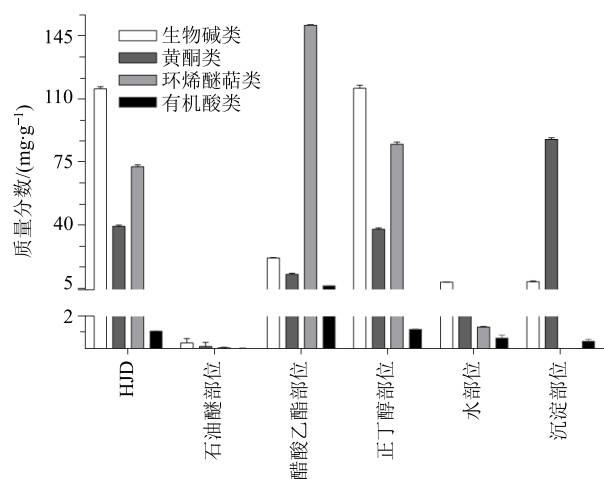


图 3 各类活性物质总含量

Fig. 3 Total content of various active components

且不稳定,故最终成功建立了 13 种活性成分稳定可靠的 HPLC 检测方法。

HPLC 检测结果表明 HJD 全方中京尼平苷、小檗碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩苷、黄连碱、药根碱占 13 种活性成分总含量的 89.6%, 为 HJD 主要活性成分。各活性成分在 HJD 不同极性部位中含量分布检测结果显示, 13 种活性成分在正丁醇部位中均可检出, 且各活性成分含量和比例均与 HJD 全方最为相近, 说明正丁醇部位为 HJD 有效部位, 这与 Yang 等^[21]研究结果基本一致。Yang 等^[21]采用 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 对 HJD 水煎液中 17 种化学成分进行了检测, 其中除黄芩黄素、汉黄芩素、千层纸素 A 外, 其余成分均可在正丁醇提取物中检出, 此外作者还借助体外细胞模型证实正丁醇部位为 HJD 神经保护作用的有效部位。然而, 与此研究略有不同的是, 本研究中从 HJD 正丁醇部位中可检测出千层纸素 A, 分析原因主要系提取方法的不同所致。采用索氏提取法与其他方法(如固液/液液超声萃取法)不同, 该方法为国际公认的完全提取法, 经正丁醇长达 80 h 的提取基本可做到完全提取, 这一点也可从后续水部位和沉淀部位中各活性成分含量较少得以证实。另外, 与 Dou 等^[20]和霍文杰等^[26]报道略有不同的是, 本研究检测结果表明, HJD 中京尼平苷含量略高于小檗碱, 其原因一方面为药材来源批次与先前研究所用不同, 另一个方面可能是由于小檗碱降解所致。研究表明, HJD 煎煮后, 随着放置时间的延长, 小檗碱含量明显降低, 而京尼平苷含量则基本不变^[27]。

对本研究中检测的 13 种活性成分来说, 其总含

量不到 HJD 及其不同极性部位干粉质量的 25%, 说明在 HJD 中仍有大量未知成分需要进一步深入研究。此外, 本研究仅从活性成分含量角度筛选出正丁醇部位为 HJD 有效部位, 但截至目前, 仅有体外研究表明 HJD 正丁醇部位具有神经保护作用, 然而, 该部位含有大量活性成分, 是否还具有其他药理学活性尚不可知, 因此, 后续仍需大量的在体实验进行深入研究。

综上所述, 本研究成功建立了 HJD 中 13 种活性成分的 HPLC 检测方法, 该方法稳定、可靠且设备依赖度相对较低, 可为生产实际中降低企业生产成本的同时提供高质量的质检方法提供重要依据。另外, 本研究通过采用索氏完全提取法制备了 HJD 不同极性部位并借助活性成分分析筛选出正丁醇部位为 HJD 有效部位, 为进一步深入研究 HJD 药效物质基础及复方精制奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] 司南, 杨阳, 王巍, 等. 黄连解毒汤来源及用药剂量换算的考证 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(2): 31-33.
- [2] 张国华, 马建兵. 黄连解毒汤药理研究进展 [J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(6): 39-41.
- [3] 房康, 吴高荣, 王辉, 等. 黄连解毒汤自沉淀化学成分及其抗 PC12 细胞损伤研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3714-3719.
- [4] 景玉森. 黄连解毒汤的临床应用探究 [J]. 光明中医, 2016, 31(14): 2128-2129.
- [5] 付晓春, 王敏伟. 黄连解毒汤的抗血栓作用研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(6): 425-427.
- [6] 张晓因, 张军平, 徐士欣, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗高血压潜在机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5865-5875.
- [7] 唐晓玲, 唐敏. 黄连解毒汤临床研究进展 [J]. 实用中西医结合临床, 2010, 10(5): 90-92.
- [8] 艾琴英, 吉燕华, 傅灵艳, 等. 黄连解毒汤干预高脂血症小鼠肠道菌群研究进展 [J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(2): 112-116.
- [9] 陈一君, 吴庆光, 刘颖, 等. 黄连解毒汤单独用药及联合用药对 2 型糖尿病治疗效果的 Meta 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 212-220.
- [10] 顾欣如, 王宏洁, 杨健, 等. 黄连解毒汤治疗阿尔茨海默病作用机制研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(10): 829-835.
- [11] 郭强. 中药黄连解毒汤对 2 型糖尿病影响的临床研究 [J]. 心理月刊, 2018(9): 228.
- [12] 王文杰, 陈赛贞, 徐红燕, 等. 黄连解毒汤抗脑缺血研

- 究进展及展望 [J]. 江西中医药, 2018, 49(11): 70-74.
- [13] Zhang N, Gao Y W, Lv C, *et al.* Effect of Huanglian Jiedu Decoction on vascular endothelium factor and expression of RhoA protein factor in young spontaneously hypertensive rats [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2019, 28(2): 114-120.
- [14] 周 燕, 林师伟, 黄玉龙. 黄连解毒汤化裁治疗热毒痰瘀型高血压的药理分析及医案 [J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(1): 182-187.
- [15] 樊 英, 康淑红. 黄连解毒丸联合利巴韦林治疗小儿疱疹性口炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(12): 1971-1975.
- [16] 白关亚, 何 盼, 李媛媛, 等. 青翘不同极性部位抗炎作用的谱效关系分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 1-6.
- [17] 李 桐, 王 辉, 张 昊, 等. 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 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3505-3510.
- [18] Peng C C, Wang S P, Jin H Z, *et al.* Bioanalysis and pharmacokinetics of eight active components from Huanglian Jiedu Decoction in rat plasma by LC-ESI-MS/MS method [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(3): 198-210.
- [19] 杨岩涛, 吴春英, 吴德智, 等. 指纹图谱段带总量统计矩法对黄连解毒汤提取过程中成分变化的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2157-2164.
- [20] Dou S S, Liu L, Jiang P, *et al.* LC-DAD and LC-ESI-MS chromatographic fingerprinting and quantitative analysis for evaluation of the quality of Huang-Lian-Jie-Du-Tang [J]. *Chromatographia*, 2009, 69(7/8): 659-664.
- [21] Yang Y, Zhao H Y, Wang H J, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of four different polarity fractions from Huang-Lian-Jie-Du-Decoction by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and their related neuroprotective effects [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2013, 22(4): 334-341.
- [22] 李 欢, 朱华旭, 潘林梅, 等. 黄连解毒汤全方和不同极性部位的活性筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 124-127.
- [23] 胡淑平, 王 怡, 于平野, 等. 黄连解毒汤主要成分的体外抗炎作用研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(10): 1171-1174.
- [24] 金 丹. 黄连解毒汤及黄连素对 2 型糖尿病大鼠靶组织中磷脂酰肌醇-3 激酶 mRNA 和蛋白表达的影响 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.
- [25] 陆付耳, 冷三华, 屠庆年, 等. 黄连解毒汤与黄连素对 2 型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢影响的比较研究 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2002, 31(6): 662-665.
- [26] 霍文杰, 杜兰哲, 李 慧, 等. 黄连解毒汤配方颗粒中 4 种成分含量的测定及与传统汤剂的比较 [J]. 北方药学, 2016, 13(2): 10-12.
- [27] 郑金凤, 夏 坤, 李国辉. 黄连及黄连解毒汤水煎剂的稳定性实验研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(13): 1161-1164.