

3 种方法制备的黄连解毒汤提取液指纹图谱比较

陈丽静, 孙秀梅*, 张兆旺, 黄延亮, 周莹

山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 比较以半仿生提取法(SBE法)、醇提取法(AE法)、水提取法(WE法)制得黄连解毒汤方药提取液的指纹图谱, 进一步验证该方药较佳的提取方法。**方法** 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法, 比较3种方法制备的黄连解毒汤相对分子质量 $\leq 1\,000$ 的提取液的指纹图谱。**结果** SBE提取液有23个特征指纹峰; 与SBE提取液相比较, AE提取液缺少5个特征指纹峰(5、9、10、11、22), WE提取液缺少3个特征指纹峰(11、22、23); 用夹角余弦法计算特征指纹峰的相似度, 结果SBE提取液的数值均大于AE提取液和WE提取液, 这与共有特征峰重叠率的计算结果也较相符。栀子苷、黄芩素、盐酸小檗碱3种指标成分及共有特征指纹峰总面积比较, 皆是SBE提取液>AE提取液>WE提取液。**结论** 黄连解毒汤方药以SBE法提取得到的相对分子质量 $\leq 1\,000$ 的提取液中成分最多。

关键词: 黄连解毒汤; SBE法; AE法; WE法; HPLC指纹图谱; 特征峰

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0487-05

Comparison on fingerprints of extract solutions from Huanglian Jiedu Decoction by three kinds of methods

CHEN Li-jing, SUN Xiu-mei, ZHANG Zhao-wang, HUANG Yan-liang, ZHOU Ying

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To compare HPLC fingerprints of extract solutions from Huanglian Jiedu Decoction (HJD) made by semi-bionic extraction (SBE), alcohol extraction (AE), and water extraction (WE), and verify the best extraction method furtherly. **Methods** Fingerprint of extract solutions with relative molecular mass (RMM) $\leq 1\,000$ from HJD made by the three different methods was investigated and compared by RP-HPLC. **Results** There were 23 characteristic peaks in SBE solution, while there were five characteristic peaks (5, 9, 10, 11, 22) in AE solution and three (11, 22, 23) in WE solution less than those in SBE solution. Data were analyzed by fingerprint similarity evaluation software and the similarity of characteristic peaks in SBE solution was larger than those in AE and WE solutions, which was in accordance with the overlap rate of common peak. The comparison between geniposide, baicalein, and berberine and the total area of characteristic peak is SBE>AE>WE, respectively. **Conclusion** The optimal method for making the extract solution with RMM $\leq 1\,000$ of HJD is SBE.

Key words: Huanglian Jiedu Decoction (HJD); SBE method; AE method; WE method; HPLC fingerprint; characteristic peak

黄连解毒汤源自唐·《外台秘要》, 由黄连、黄芩、黄柏和栀子组成, 具有清热、泻火、解毒之功效。现代研究表明, 黄连解毒汤主要含有小檗碱、巴马亭、药根碱等生物碱类, 黄芩苷、汉黄芩素、木犀草素等黄酮类, 栀子苷等环烯醚萜苷类成分, 药理活性主要集中在抑菌、抗炎、抗氧化、抗脑缺血缺氧、提高机体免疫功能等方面^[1-4]。前期根据SBE法理论与研究方法^[5-8], 对该方研究已取得一定

进展, 特别是对其半仿生提取液(SBE液)、醇提取液(AE液)、水提取液(WE液)作多指标(盐酸小檗碱、黄芩素、栀子苷、总生物碱、总黄酮、HPLC峰总面积、相对分子质量 $\leq 1\,000$ 提取物)综合评判比较, 结果综合评判(Y)值为: $Y_{SBE} > Y_{AE} > Y_{WE}$ ^[9]。在此基础上, 本研究对该方药3种提取方法制得的相对分子质量 $\leq 1\,000$ 提取液作HPLC指纹图谱比较, 进一步验证该方药较佳的提取方法。

收稿日期: 2011-09-27

基金项目: 国家科技重大新药创制专项——“中药‘半仿生’提取关键技术研究”(2010ZX09401)

作者简介: 陈丽静(1987—), 女, 山东聊城人, 硕士研究生, 研究方向为中药新药与中药炮制原理研究。

Tel: 13791070052 E-mail: chenlijing0921@163.com

*通讯作者 孙秀梅 Tel: (0531)82628081 E-mail: sunxiumei8@163.com

1 仪器与材料

pHS—3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); MA110 型电子分析天平(上海第二分析仪器厂); 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); UV3010 型紫外分析仪(日立公司); KQ—250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DH—系列中空纤维超滤膜(上海德宏生物医学科技发展有限公司)。

方药经山东中医药大学张兆旺教授鉴定: 黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎加工成的饮片; 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根加工成的饮片; 黄柏(关黄柏)系芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮加工成的饮片; 梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实加工成的饮片。

盐酸小檗碱(批号 111595-200604)、黄芩素(批号 110715-200815)、梔子苷(批号 110749-200613)均购自中国药品生物制品鉴定所; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品液的制备

2.1.1 半仿生提取液(SBE 液)的制备 按处方比例称取方药粗粉(10~20 目)100 g, 按照优选的 SBE 法提取工艺条件和药材组合方式(黄连与梔子合煎, 黄芩与黄柏合煎, 合并煎液)^[10], 分别浸泡 30 min, 分别用 SBE 法提取 3 次, 加水量依次为药量的 10、8、8 倍, 3 煎 pH 值依次为 2.0、7.0、9.0, 提取时间依次为 2、1.5、1.5 h, 分别将 3 煎提取液依次粗滤, 离心, 相对分子质量为 1 000 的中空纤维超滤膜滤过, 浓缩, 合并, 定容至 500 mL, 即得相对分子质量≤1 000 提取物的样品液(含生药 200 g/L)。

2.1.2 醇提液(AE 液)的制备 按“2.1.1”项下方法, 改用 60%乙醇作溶剂^[11], 依法制得相对分子质量≤1 000 提取物的样品液(含生药 200 g/L)。

2.1.3 水提液(WE 液)的制备 按“2.1.1”项下方法, 改用中性水作溶剂, 依法制得相对分子质量≤1 000 提取物的样品液(含生药 200 g/L)。

2.2 供试品溶液的制备

精密量取“2.1”项下 3 种样品液, 各 10.0 mL, 分别置蒸发皿中, 水浴浓缩蒸至近干, 加硅藻土 0.8 g, 拌匀, 蒸干, 研匀, 转移至 100 mL 干燥磨口三

角瓶中, 精密加入甲醇 25 mL 溶解, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 布氏漏斗滤除残存硅藻土。精密吸取上述滤液各 2.5 mL, 分别用甲醇定容至 10 mL, 即得 3 种供试品溶液(含生药 20 g/L)。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取梔子苷对照品 5.10 mg, 黄芩素对照品 1.96 mg, 小檗碱对照品 2.32 mg, 用甲醇定容至 10 mL, 即得混合对照品溶液。

2.4 色谱条件^[12-14]

色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为(0.1%磷酸+0.02 mol/L KH₂PO₄)(A)-乙腈(B), 线性梯度洗脱程序: 0~30 min, 5%~30% B; 30~40 min, 30% B; 40~60 min, 30%~40% B; 检测波长 225 nm; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 20 μL; 柱温 30 ℃。

2.5 内参照峰的选择

以上述流动相进行梯度洗脱, 从图 1 可以看出, 7 号峰保留时间适中, 峰面积较大且稳定, 峰形较好, 故选择 7 号峰为内参照峰进行各供试品溶液相对保留时间和相对峰面积的计算。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取“2.2”项下供试品溶液(SBE 液), 连续进样 5 次, 检测指纹图谱, 计算得各色谱峰相对保留时间的 RSD<1.0%, 相对峰面积的 RSD<5.0%。

2.6.2 稳定性试验 取“2.2”项下供试品溶液(SBE 液), 分别在 0、2、6、12、24 h 检测指纹图谱, 计算得各色谱峰相对保留时间的 RSD<1.0%, 相对峰面积的 RSD<5.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.3 重现性试验 按“2.1”和“2.2”项下方法, 制备供试品溶液(SBE 液)5 份, 检测指纹图谱, 计算得各色谱峰的相对保留时间的 RSD<1.0%, 相对峰面积的 RSD<5.0%。

2.7 方药 3 种方法提取相对分子质量≤1 000 供试品溶液指纹图谱的建立与比较

2.7.1 指纹图谱的建立 按“2.1”项下方法, 分别制备 SBE 液、AE 液和 WE 液, 按“2.2”项下方法, 分别制备 SBE 供试品溶液、AE 供试品溶液和 WE 供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件, 分别进样 20 μL, 记录 HPLC 图, 结果见图 1。

2.7.2 指纹图谱的比较 取 3 种供试品溶液, 分别进样, 记录 HPLC 图, 色谱图经《中国药典》2010

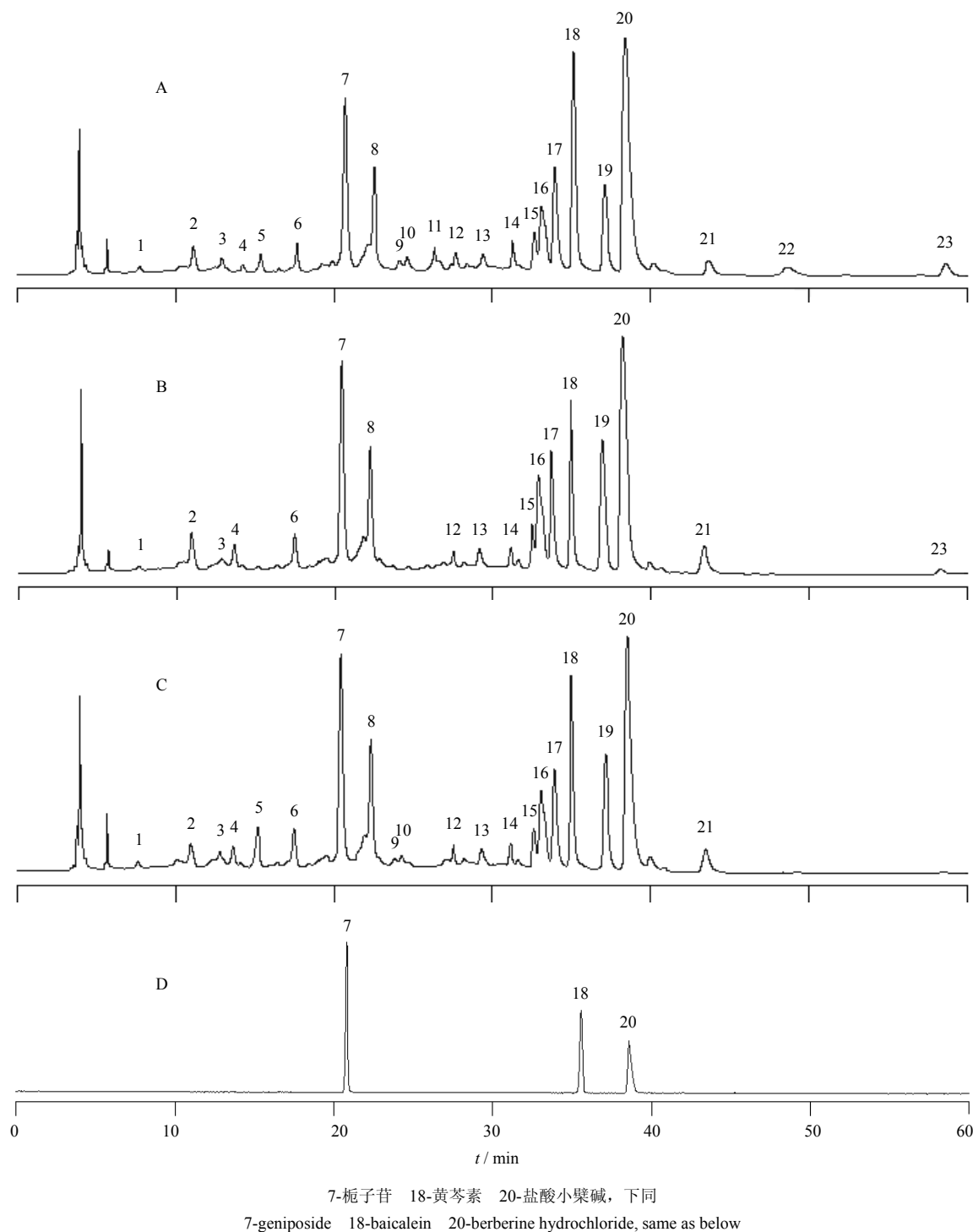


图 1 SBE 法 (A)、AE 法 (B) 和 WE 法 (C) 提取相对分子质量 $\leq 1\,000$ 供试液 HPLC 指纹图谱以及混合对照品的 HPLC 色谱图 (D)

Fig. 1 HPLC fingerprints of extract solutions with RMM $\leq 1\,000$ made by SBE (A), AE (B), and WE (C) methods, and HPLC chromatogram of mixed reference substances (D)

年版规定的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》处理,得相对保留时间、相对峰面积,见表 1、2。
2.7.3 特征峰重叠率 由表 1 可知,以 SBE 液的指纹图谱峰数为对照样品峰,其共有 23 个指纹峰;

AE 液指纹图谱与 SBE 液指纹图谱比较,有 18 个相对应的共有峰,峰 5、9、10、11、22 未检出;WE 液指纹图谱与 SBE 液指纹图谱比较,有 20 个相对应的共有峰,峰 11、22、23 未检出。

表 1 3 种方法提取相对分子质量 $\leq 1\ 000$ 供试品溶液特征指纹峰的保留时间及相对保留时间Table 1 Retention and relative retention times of extract solutions with RMM $\leq 1\ 000$ made by three different methods

峰号	保留时间 / min			相对保留时间		
	SBE 法	AE 法	WE 法	SBE 法	AE 法	WE 法
1	7.66	7.55	7.56	0.370 6	0.369 5	0.370 4
2	11.06	10.89	10.90	0.535 0	0.533 5	0.533 9
3	12.90	12.76	12.75	0.624 3	0.624 7	0.624 7
4	14.21	13.58	14.02	0.687 4	0.664 9	0.686 6
5	15.33	—	15.12	0.741 6	—	0.740 4
6	17.61	17.40	17.41	0.852 2	0.852 0	0.852 7
7	20.67	20.42	20.41	1.000 0	1.000 0	1.000 0
8	22.48	22.18	22.27	1.087 4	1.085 9	1.090 8
9	24.12	—	23.79	1.166 8	—	1.165 3
10	24.57	—	24.24	1.188 8	—	1.187 6
11	26.30	—	—	1.272 4	—	—
12	27.66	27.44	27.49	1.338 4	1.343 8	1.346 8
13	29.37	29.11	29.28	1.421 0	1.425 7	1.434 3
14	31.22	31.05	31.08	1.510 7	1.520 6	1.522 5
15	32.64	32.45	32.60	1.579 2	1.588 9	1.596 9
16	33.06	32.84	33.03	1.599 4	1.608 4	1.617 8
17	33.92	33.66	33.90	1.641 2	1.648 6	1.660 8
18	35.11	34.89	34.96	1.698 7	1.708 6	1.712 4
19	37.03	36.86	37.09	1.791 9	1.804 9	1.816 9
20	38.33	38.14	38.46	1.854 4	1.867 6	1.883 9
21	43.64	43.30	43.43	2.111 5	2.120 5	2.127 4
22	48.61	—	—	2.352 0	—	—
23	58.62	58.25	—	2.836 1	2.852 4	—

“—” 未检出, 下同

“—” undetected, same as below

用共有峰的重叠率公式分别计算 SBE 液与 AE 液、WE 液指纹图谱共有峰的重叠率, 结果 SBE 液的重叠率为 1, AE 液的重叠率为 0.870 8, WE 液的重叠率为 0.930 2。

$$\text{重叠率} = \text{共有峰数} \times 2 / (X + \text{SBE 液峰数})$$

X 为待测样品的峰数

2.7.4 特征指纹峰相似度 色谱图经《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》处理, SBE 法、AE 法、WE 法提取相对分子质量 $\leq 1\ 000$ 供品溶液特征指纹峰相似度(夹角余弦法)评价结果分别为 1.000 0、0.977 3、0.984 6。

该方药 3 种方法提取相对分子质量 $\leq 1\ 000$ 提取

表 2 3 种方法提取相对分子质量 ≤ 1000 供试品溶液特征指纹峰的面积及相对峰面积Table 2 Peak areas and relative peak areas of extract solutions with RMM $\leq 1\ 000$ made by three different methods

峰号	峰面积			相对峰面积		
	SBE 法	AE 法	WE 法	SBE 法	AE 法	WE 法
1	251.1	78.7	121.7	0.044 2	0.015 1	0.024 8
2	877.0	875.4	533.0	0.154 2	0.167 4	0.108 7
3	717.2	624.0	543.2	0.126 1	0.119 4	0.110 8
4	288.3	540.0	111.3	0.050 7	0.103 3	0.022 7
5	700.8	—	928.9	0.123 2	—	0.189 5
6	1 128.2	987.4	917.2	0.198 4	0.188 9	0.187 1
7	5 686.8	5 228.3	4 901.9	1.000 0	1.000 0	1.000 0
8	3 525.3	2 765.3	2 678.4	0.619 9	0.528 9	0.546 4
9	578.2	—	339.7	0.101 7	—	0.069 3
10	854.6	—	325.4	0.150 3	—	0.066 4
11	1 062.1	—	—	0.186 8	—	—
12	714.1	544.8	482.2	0.125 6	1.041 4	0.098 4
13	1 450.3	915.5	585.1	0.255 0	0.175 1	0.119 4
14	1 659.5	584.5	548.9	0.291 8	0.111 8	0.112 0
15	1 292.1	1 118.9	778.4	0.227 2	0.214 0	0.158 8
16	3 020.7	3 242.8	2 359.6	0.531 2	0.620 2	0.481 4
17	3 798.0	3 218.4	2 311.7	0.667 9	0.615 6	0.471 6
18	6 887.4	4 108.5	4 056.0	1.211 1	0.785 8	0.827 4
19	3 583.9	4 004.8	3 033.3	0.630 2	0.766 0	0.618 8
20	14 065.4	9 669.8	8 670.0	2.473 3	1.849 5	1.768 7
21	764.1	1 191.2	947.3	0.134 4	0.227 8	0.193 3
22	772.1	—	—	0.135 8	—	—
23	631.3	225.2	—	0.111 0	0.043 1	—

总面积 54 308.5 39 923.5 35 173.2

液的特征指纹峰比较结果: SBE 液有 23 个特征指纹峰, 与 SBE 液相比较, AE 液缺少 5 个特征指纹峰(5、9、10、11、22), WE 液缺少 3 个特征指纹峰(11、22、23), 由此可以说明, SBE 液中含有的化学成分数量多于 AE 液和 WE 液; 用夹角余弦法计算特征指纹峰的相似度, 结果 SBE 液的数值均大于 AE 液和 WE 液, 与共有特征峰重叠率的计算结果也较相符。栀子苷、黄芩素、盐酸小檗碱 3 个指标成分及共有特征指纹峰总面积比较, SBE 液 $>$ AE 液 $>$ WE 液^[9]。综上所述, 该方药制剂时以用 SBE 法制备相对分子质量 $\leq 1\ 000$ 提取物成分较多。正在进行的该方药 3 种方法提取液的药效学比较也证明

SBE法优于AE法和WE法(文献待发表)。

3 讨论

经对380余种常用中药中已知活性成分的统计,绝大多数相对分子质量小于1 000,这与“中药活性成分分子量表”对245种成分的统计结果相符合^[15],故本实验以相对分子质量 $\leq 1\ 000$ 提取物为最终产物进行指纹图谱测定,能体现中药整体、综合、客观、模糊的特点,为选用现代药物新剂型提供了技术支撑,也对药效物质未知的中药提取研究拓展了思路。

半仿生提取法(semi-bionic extraction method, SBE法)是根据中药和方剂中部分成分已知,大部分成分未知的现实,将整体药物研究法与分子药物研究法相结合,从生物药剂学角度,模拟口服给药及药物经胃肠道转运的过程,为经消化道给药的中药制剂设计的一种新的提取技术。本方法在提取工艺中坚持“有成分论,不唯成分论,重在机体药理学反应”的观点^[5-7],以一种或几种有效成分、总浸出物及不同极性部分等做指标和(或)主要药理作用做指标,综合评判,优选提取工艺,不拘泥于某化学成分或适合纯化学成分的药理模型,而是考虑到综合成分的作用。SBE法自创立以来,已被应用于多种中药和复方的研究。结果皆表明,SBE法在增加有效成分的提取率、提高某些药学指标方面明显优于WE法和AE法,本研究进一步表明SBE法具有广泛的推广应用前景。

参考文献

- [1] 曾明飞,潘林梅,朱华旭,等.黄连解毒汤中栀子苷在正常及脑缺血大鼠体内药动学研究[J].中草药,2010,41(4):617-620.
- [2] 邓远雄,刘晓东,刘李,等.黄连解毒汤对糖尿病大鼠肠道二糖酶活性的影响[J].中草药,2010,41(7):1127-1130.
- [3] 邓远雄,何丽华,万思婷,等.黄连解毒汤对体内外晚期糖基化终产物形成的影响[J].中草药,2011,42(1):130-133.
- [4] 宋珏,路通,谢林,等.黄连解毒汤的药动学-药效学相关性研究[J].中草药,2011,42(10):2042-2046.
- [5] 张兆旺.中药药剂学专论[M].北京:人民卫生出版社,2009.
- [6] 张兆旺,孙秀梅.建立中药复方用半仿生提取研究的技术平台[J].世界科学技术——中医药现代化,2005,7(1):56-59.
- [7] 张兆旺,孙秀梅.试论“半仿生提取法”制备中药口服制剂[J].中国中药杂志,1995,20(11):670-673.
- [8] 宋宏新,刘静,张彦娟.半仿生酶法提取三七皂苷工艺研究[J].中草药,2009,40(6):905-907.
- [9] 窦锦明,孙秀梅,张兆旺,等.黄连解毒汤方药3种方法提取液成分比较[J].时珍国医国药,2010,21(6):1369-1371.
- [10] 黄延亮.以黄连解毒汤方药探讨中药复方用“半仿生-酶法”研究的初步模式[D].济南:山东中医药大学,2011.
- [11] 窦锦明.以 $\leq 1\ 000\text{ Da}$ 提取物探讨中药复方成分提取用SBE法研究的基本模式[D].济南:山东中医药大学,2010.
- [12] 曹现峰,沈嘉.黄连解毒汤的HPLC指纹图谱测定条件初探[J].中成药,2003,25(7):519-522.
- [13] 任玲玲,薛兴亚,徐青,等.黄连解毒汤高效液相色谱分析方法的建立[J].世界科学技术——中医药现代化,2005,7(5):41-44.
- [14] 沈嘉,曹现峰,刘九飞.几种黄连解毒汤的HPLC指纹图谱研究[J].中成药,2003,25(6):433-437.
- [15] 季宇彬.中药有效成分药理与应用[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2004.