

## • 药剂与工艺 •

## 黄连解毒汤自沉淀化学成分及其抗 PC12 细胞损伤研究

房康, 吴高荣<sup>#</sup>, 王辉, 赵蕊, 张欣钰, 薛南南, 陈萌, 郭文博, 褚福浩, 徐冰, 王鹏龙\*, 雷海民\*

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

**摘要:**目的 探讨黄连解毒汤(HJD)自沉淀制备条件,测定自沉淀主要成分量及自沉淀对PC12细胞损伤模型的保护作用。方法 以提取时间和投水量为影响因素,确定自沉淀的制备工艺;采用HPLC法,测定自沉淀中黄芩苷、小檗碱、栀子苷、巴马汀、黄连碱、汉黄芩苷的量;采用CCK-8法评价HJD上清液、自沉淀对CoCl<sub>2</sub>损伤的PC12细胞模型作用。结果 在10倍量水回流提取30min的煎煮条件下,干燥后HJD自沉淀质量约占上清液质量的10%,自沉淀中81.28%的成分为酸性化合物,其中黄芩苷占42.12%,小檗碱占31.17%,黄连碱占5.89%,汉黄芩苷占1.50%,巴马汀占0.60%,未检测到中性成分栀子苷。上清液、自沉淀对CoCl<sub>2</sub>损伤的PC12细胞的EC<sub>50</sub>值分别28.25、19.58 μg/mL。结论 自沉淀制备工艺操作简单,重复性好,通过成分分析,得出自沉淀的形成机制以酸碱络合为主的假想;与上清液相比,自沉淀表现出较好的神经保护活性,为HJD的二次开发提供参考。

**关键词:** 黄连解毒汤; 自沉淀; 神经保护; 酸碱络合; 析因试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)18-3714-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.008

## Study on chemical constituents of self-settling from Huanglian Jiedu Decoction and effects on PC12 induced by CoCl<sub>2</sub>

FANG Kang, WU Gao-rong, WANG Hui, ZHAO Rui, ZHANG Xin-yu, XUE Nan-nan, CHEN Meng, GUO Wen-bo, CHU Fu-hao, XU Bing, WANG Peng-long, LEI Hai-min

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

**Abstract: Objective** To optimize the preparation conditions of precipitation from Huanglian Jiedu Decoction (HJD). The main components of precipitation content were measured and the protective effect of compound precipitation on injured PC12 cell was evaluated. **Methods** The preparation process of precipitation was determined by time and water supply; Contents of baicalin, berberine, geniposide, palmatine, coptis, and wogonoside were determined by HPLC. The effect of HJD was evaluated and the precipitation on neurotoxic PC12 cells were injured by CoCl<sub>2</sub> with CCK-8 assay. **Results** Under the condition (extracted by refluxing for 30 min using the amount of water which was 10 times of the quality of herbs), the quality of dry precipitation was about 10% of mass of the supernatant, and 81% of the precipitation were organic acids and alkaloids, baicalin was 42.12%, berberine was 31.17%, coptis was 5.89%, wogonoside was 1.50%, palmatine was 0.60%, and geniposide was not detected. EC<sub>50</sub> of supernatant and precipitation on injured PC12 was 28.25 μg/mL and 19.58 μg/mL, respectively. **Conclusion** The preparation process of precipitation is simple and reproducible, and this study reveals that the compound precipitation from HJD is mainly composed of acid-alkali complex. Compared with the supernatant, the compound precipitation shows better neuroprotective activity, and provides basic data for the secondary development of HJD.

**Key words:** Huanglian Jiedu Decoction; precipitation; neuroprotective; acid and alkali complexation; factorial test

收稿日期: 2017-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603256); 北京中医药大学中青年教师面上项目(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)

作者简介: 房康(1993—),男,硕士在读,研究方向为中药先导化合物发现与开发。E-mail: 18364166994@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 吴高荣(1994—),男,硕士在读,研究方向为中药先导化合物发现与开发。E-mail: gaorongwu09@163.com

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decoction, HJD) 首载于葛洪《肘后备急方》, 王焘《外台秘要》开始以“黄连解毒汤”命名。本方由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味药按 3:2:2:3 比例配伍组成, 是清热解毒的代表方<sup>[1]</sup>。而目前对 HJD 的研究大多集中在水煎剂上清液化学成分、药理作用及其作用机制<sup>[2-5]</sup>, 对自沉淀部位的化学成分及药用价值的研究较少。诸多研究表明 HJD 具有较好的抗神经细胞损伤功能<sup>[6]</sup>, 相关研究发现 HJD 能有效改善阿尔茨海默病患者的临床症状, 提高患者生存质量<sup>[7]</sup>。研究表明 HJD 可通过改善能量代谢、膜和线粒体代谢、神经递质和氨基酸代谢、缓解氧化应激活性氧和炎症损伤等途径, 有效维持神经细胞形态和功能, 抑制损伤神经细胞凋亡<sup>[8-12]</sup>。本课题组曾研究了 HJD 水煎自沉淀形成机制<sup>[13]</sup>, 在此基础上, 本研究发现 HJD 水煎自沉淀干燥后质量约占上清液质量的 10% 左右, 且研究表明 HJD 自沉淀具有一定的神经保护活性, 具有深入研究价值, 本实验以 HJD 自沉淀质量为指标, 采用析因试验的设计方法探讨了投水量以及提取时间对 HJD 自沉淀制备的影响, 测定了自沉淀中黄芩苷<sup>[14-15]</sup>、小檗碱<sup>[6]</sup>、栀子苷<sup>[17]</sup>、巴马汀<sup>[18]</sup>、黄连碱<sup>[19]</sup>、汉黄芩苷<sup>[20]</sup>的量, 并测定了 HJD 自沉淀对  $\text{CoCl}_2$  诱导损伤 PC12 细胞模型的保护效果, 为 HJD 自沉淀作为新型药效部位的研究提供了参考, 为进一步研究其形成机制及探讨其药效作用基础提供依据。

## 1 材料

### 1.1 药材与试剂

黄连、黄芩、黄柏、栀子均购于北京同仁堂, 各药材均经北京中医药大学刘春生教授鉴定, 黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎; 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根; 黄柏为芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 除去栓皮的干燥树皮; 栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实; 对照品盐酸小檗碱 (批号 110713-200208)、黄芩苷 (批号 110715-200514)、盐酸巴马汀 (批号 110762-200506)、栀子苷 (批号 749-8801)、汉黄芩苷 (批号 MUST-16116) 均购于中国食品药品检定研究院, 质量分数  $\geq 98\%$ ; 对照品黄连碱, 批号 Z24F4B1, 上海源叶生物科技有限公司, 质量分数  $\geq 98\%$ ; 胎牛血清、马血清, Gibco 公司; 0.25% 胰蛋白酶溶液, 北京索莱宝科技有限

公司; 青链霉素混合液 (100X, 双抗 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素, 北京索莱宝科技有限公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS), 赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司; 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐试剂 (CCK-8), 赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 天津市光复科技发展有限公司; RPMI 1640 培养基 (HyClone 公司); 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL), Biotopped; pet 无纺布隔渣袋, 河北省兴鹏包装有限公司; 神经诱导因子 (NGF), 上海仁捷生物科技有限公司。

### 1.2 细胞

PC12 细胞, 购于北京协和细胞资源中心。

### 1.3 仪器与设备

Waters e2695 Separations Module 高效液相色谱仪, 沃特世科技 (上海) 有限公司; Agilent TC-C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 安捷伦科技 (中国) 有限公司; KQ-100DE 超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; 0SB-2100 旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; LD5-2B 型台式低速离心机, 北京京立离心机有限公司; Thermo3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, 赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司; HFsafe 生物安全柜, 力康生物医疗科技控股有限公司; 全波长酶扫描仪 (芬兰热电 Multiskan GO); Olympus IX71 倒置荧光显微镜, 奥林巴斯 (中国) 有限公司 (OCN); 冷冻高速离心机, 赛默飞世尔科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 析因试验考察 HJD 自沉淀制备工艺

HJD 水煎自沉淀现象已被广泛发现, 但影响自沉淀产生的因素尚未有深入研究, 本实验拟用析因试验设计, 考察煎煮时间和用水量对自沉淀生成量的影响。

**2.1.1 因素水平设计** 以自沉淀质量为指标, 将煎煮时间 (A) 及用水量 (B) 为主要影响因素, 设定煎煮时间为 15、30、60 min, 用水量为 6、8、10 倍量各 3 个水平, 采用  $L_9(3^3)$  析因试验设计, 优选 HJD 自沉淀制备工艺。实验设计见表 1。

**2.1.2 样品制备方法** 分别称取黄连 9 g、黄柏 6 g、黄芩 6 g、栀子 9 g, 用隔渣袋装好, 置于已加入沸石的圆底烧瓶中, 按析因试验表中的用水量加水浸润, 回流加热, 从沸腾开始计时, 以析因试验表中相应时间煎煮, 放冷至室温。将煎煮液倒入 50 mL 离心管中, 离心 30 min, 转速为 3 000 r/min。分别

取上清液和自沉淀，并分别浓缩干燥后称定质量，结果见表 1。经统计学软件 SAS9.4 的方差分析结果（表 2）表明，A、B、A×B 没有显著性差异，经极差分析最佳工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>，综合考虑到实验室制备生产周期以及方差分析结果，选择 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> 为最佳提取工艺，因此确定 HJD 自沉淀实验室制备的最佳提取条件为使用 10 倍量的水，回流提取 30 min。

**2.1.3 工艺验证** 以 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>（分析表 1 数据所得优化工艺）为条件，按“2.1.2”步骤重复实验 3 次，结果见表 3。该重复实验 RSD 为 2.64%，小于 3%，工艺稳定可行，具有实验室制备以及临床用药参考价值。

表 1 析因试验设计与结果

Table 1 Results of orthogonal experiment

序号	A/min	B/倍	C(空白)	自沉淀/mg
1	15(1)	6(1)	(1)	214.4
2	15(1)	8(2)	(2)	319.6
3	15(1)	10(3)	(3)	246.6
4	30(2)	6(1)	(2)	354.8
5	30(2)	8(2)	(3)	278.5
6	30(2)	10(3)	(1)	481.9
7	60(3)	6(1)	(3)	452.1
8	60(3)	8(2)	(1)	443.5
9	60(3)	10(3)	(2)	567.1
K <sub>1</sub>	780.6	1 021.3	1 139.8	
K <sub>2</sub>	1 115.2	1 041.6	1 241.5	
K <sub>3</sub>	1 462.7	1 295.6	977.2	
R	682.1	274.3	264.3	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance table

因素	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	77 552	2	8.59	P=0.104 3>0.05
B	15 574	2	1.72	P=0.367 0>0.05
C	11 848	2	1.31	P=0.432 5>0.05

F<sub>0.05(2, 2)</sub> = 19.00 F<sub>0.01(2, 2)</sub> = 99.00

表 3 工艺验证结果

Table 3 Results of verification test

序号	自沉淀/ mg	上清液 干膏/mg	自沉淀与上清液 干膏质量比/%	RSD/%
1	452.1	4 848.6	9.3	2.64
2	411.2	4 328.4	9.5	
3	463.3	4 727.6	9.8	

## 2.2 HJD 自沉淀成分定量测定

本课题组前期利用 HPLC-MS<sup>n</sup> 技术解析 HJD 水煎自沉淀中成分<sup>[18]</sup>，主要包括黄芩苷、巴马汀、小檗碱、汉黄芩苷、黄连碱等酸碱类化合物，但相关定量测定尚未见深入报道，本实验拟建立适用于 HJD 水煎自沉淀成分定量测定方法，并定量分析相关成分。

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 AgilentTC-C<sub>18</sub> 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min，5%~15%乙腈；10~30 min，15%~30%乙腈；30~42 min，30%~42%乙腈；42~45 min，42%~48%乙腈；45~50 min，48%~60%乙腈；50~60 min，60%~90%乙腈；体积分流量 1 mL/min；柱温 25 °C；检测波长 238 nm。

**2.2.2 储备液的制备** 依次称取适量的栀子苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄连碱对照品和自沉淀（以 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub> 工艺制得）样品，置于 5 mL 量瓶中，甲醇定容，得质量浓度分别为 0.36、0.38、0.90、0.46、0.28、0.24、0.29 mg/mL 的储备液。

**2.2.3 对照品溶液的制备** 将栀子苷、黄芩苷、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄连碱储备液用色谱甲醇稀释到 50.00、4.41、0.90、19.78、5.04、8.40 μg/mL，过 0.22 μm 微孔滤膜备用。

**2.2.4 供试品溶液的制备** 将自沉淀储备液用色谱甲醇稀释到 99.76 μg/mL，过 0.22 μm 微孔滤膜备用。

**2.2.5 线性关系考察** 分别精密吸取 50、75、100、125、150、175 μg/mL 的栀子苷对照品溶液 10 μL，分别精密吸取 4.41、6.61、8.82、11.03、13.23、15.44 μg/mL 的黄芩苷对照品溶液 10 μL，分别精密吸取 0.90、1.35、1.80、2.25、2.70、3.15 μg/mL 的盐酸巴马汀对照品溶液 10 μL，分别精密吸取 19.78、29.67、39.56、49.45、59.34、69.23 μg/mL 的盐酸小檗碱对照品溶液 10 μL，分别精密吸取 5.04、7.56、10.08、12.60、15.12、17.64 μg/mL 的汉黄芩苷对照品溶液 10 μL，分别精密吸取 8.40、12.60、16.80、21.00、25.20、29.40 μg/mL 的黄连碱对照品溶液 10 μL，按“2.2.1”项下色谱条件进样，测定其峰面积值，以峰面积积分值（Y）对进样浓度（X）进行回归处理，结果见表 4。因自沉淀样品中没有检测到栀子苷成分，故未列出栀子苷标准曲线。黄芩苷等 5 种成分线性关系良好，在线性范围内可用于定量测定。

表 4 5 种成分的回归方程和线性范围

Table 4 Regression equations and linear ranges of measured constituents

成分	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )	质量检测范围/μg
黄芩苷	Y=2 905.7 X+9 525.2	0.999 3	4.41~15.44	0.049 4~0.172 9
巴马汀	Y=27 800 X+9 565	0.999 0	0.90~ 3.15	0.009 0~0.031 5
小檗碱	Y=38 347 X+101 689	0.999 3	19.78~69.23	0.197 8~0.692 3
汉黄芩苷	Y=7 596.9 X-1 162.9	0.999 9	5.04~17.64	0.050 4~0.176 4
黄连碱	Y=27 233 X-376.33	0.999 6	8.40~29.40	0.084 0~0.294 0

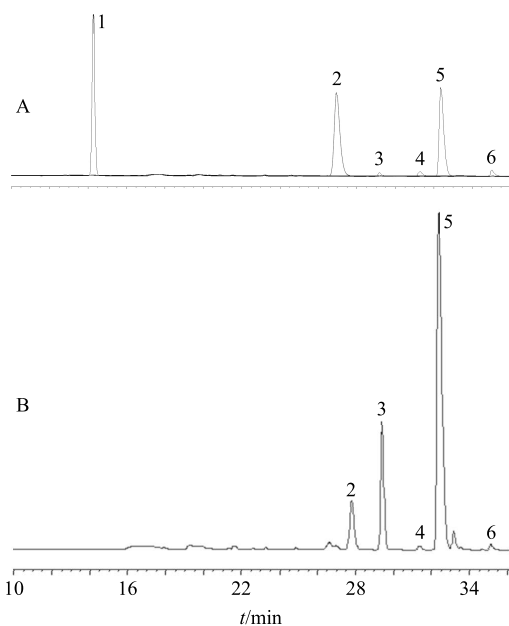
2.2.6 样品的测定 按表 5 精密吸取适量自沉淀供试液，分别按“2.2.1”项下色谱条件进样，测定其峰面积值，相关色谱图见图 1。

表 5 自沉淀的质量浓度及进样体积

Table 5 Concentration and volume of precipitated

被检成分	自沉淀质量浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	进样量/μL
黄芩苷	4.35	35
巴马汀	200.10	20
小檗碱	99.76	20
汉黄芩苷	200.10	20
黄连碱	99.76	20

此进样浓度以及体积是在具体操作中不断调整中确定的  
The concentration and the volume of the sample are determined in the continuous adjustment of the experiment



1-栀子苷 2-黄连碱 3-黄芩苷 4-巴马汀 5-小檗碱 6-汉黄芩苷  
1-geniposide 2-coptisine 3-baicalin 4-palmatine 5-berberine  
6-wogonoside

图 1 6 种对照品 (A) 和 HJD 自沉淀供试品 (B) HPLC 图  
Fig. 1 Separation of six reference materials (A) and HJD sample (B) by HPLC

2.2.7 各成分定量测定结果 经测定，6 种主要活性成分量（质量分数）结果见表 6（其中样品进样检出质量指自沉淀进样质量下，被测目标成分的检出质量；被测成分在自沉淀中的质量分数即样品进样检出质量与自沉淀进样质量的比值）。除栀子苷成分外，黄芩苷、小檗碱、黄连碱、汉黄芩苷、巴马汀 5 种成分均可于 HJD 自沉淀中可检测到，并以黄芩苷和小檗碱成分为主。HJD 自沉淀中被检成分量由高到低排序为黄芩苷>小檗碱>黄连碱>汉黄芩苷>巴马汀，被检成分总量 81.28%，可基本阐明自沉淀的成分构成，成分以酸碱类物质为主，其中黄芩苷和小檗碱之和约占 73.29%，为自沉淀中代表性成分。

2.3 HJD 水煎自沉淀抗 CoCl<sub>2</sub> 损伤的 NGF-PC12 细胞模型研究

本课题前期利用 MTT 法测试发现 HJD 水煎自沉淀具有一定的神经保护活性，但受限于 PC12 细胞为半悬浮细胞，MTT 法测试结果具有一定的波动性，为了提高测试准确度和稳定性，本研究采用 CCK-8 法测试 HJD 水煎自沉淀对 CoCl<sub>2</sub> 损伤的 NGF-PC12 细胞活性的影响。

2.3.1 完全培养基的配制 85% RPMI 1640+10% 马血清+5%胎牛血清+双抗 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素，37 °C 恒温，5% CO<sub>2</sub>，饱和湿

表 6 6 种主要活性成分量

Table 6 Contents of six main active ingredients

成分	样品进样检出质量/μg	自沉淀进样质量/μg	质量分数/%
栀子苷	0.000 0	0.152 3	未检出
黄芩苷	0.064 3	0.152 3	42.12
巴马汀	0.024 1	4.002 0	0.60
小檗碱	0.621 8	1.995 2	31.17
汉黄芩苷	0.060 1	4.002 0	1.50
黄连碱	0.117 6	1.995 2	5.89
合计			81.28

度培养箱中培养。

**2.3.2 应用损伤 PC12 细胞模型评价上清液、自沉淀的活性研究** 用完全培养基培养 PC12 细胞。当细胞浓度达到适量数量时，倒掉原培养基，加空白的 RPMI1640，饥饿细胞 14 h。120 μL 接种于多聚赖氨酸包被过的 96 孔板中，用 90% RPMI1640，10% 胎牛血清，100 U/mL 双抗配的培养基培育，细胞浓度约  $7 \times 10^3$  个/孔。另加 0.05 μg/mL 的 NGF 诱导细胞分化，分化培养 48 h，待细胞生长出类似神经细胞的轴突。参考文献方法<sup>[11]</sup>，以终质量浓度为 3.75、

7.50、15.00、30.00、60.00 μg/mL 加药，每一质量浓度平行 4 孔，对照组加等体积培养液。

自沉淀用 DMSO 溶解，培养基稀释，DMSO 的终质量分数小于 0.1%。药物作用 36 h 后，加入终浓度为 300 μmol/L CoCl<sub>2</sub> 损伤 PC12 细胞。细胞造模损伤 12 h 后加 CCK-8 试剂 10 μL，继续培养 4 h。于微量震荡器上震荡 5 min 使其充分溶解，测定 490 nm 处各孔的吸光度 (A)，导出数据，按下列公式计算细胞增殖率和半数效应浓度 (EC<sub>50</sub>)，结果见表 7，显微镜下观察结果见图 2。

表 7 上清液和自沉淀对 CoCl<sub>2</sub> 损伤的 NGF-PC12 细胞的保护效应比较 (48 h)

Table 7 Comparison of protective effects of supernatant and precipitation on NGF-PC12 cells injured by CoCl<sub>2</sub> for 48 h

组别	细胞增殖率/%					EC <sub>50</sub> /(μg·mL <sup>-1</sup> )
	3.75 μg·mL <sup>-1</sup>	7.50 μg·mL <sup>-1</sup>	15.00 μg·mL <sup>-1</sup>	30.00 μg·mL <sup>-1</sup>	60.00 μg·mL <sup>-1</sup>	
上清液	1.74±7.13	10.22±2.12	46.30± 7.10	51.74±1.67	60.28±1.64	28.25
自沉淀	52.89±2.94	84.77±3.71	36.55±14.84	20.40±4.70	16.58±0.72	19.58

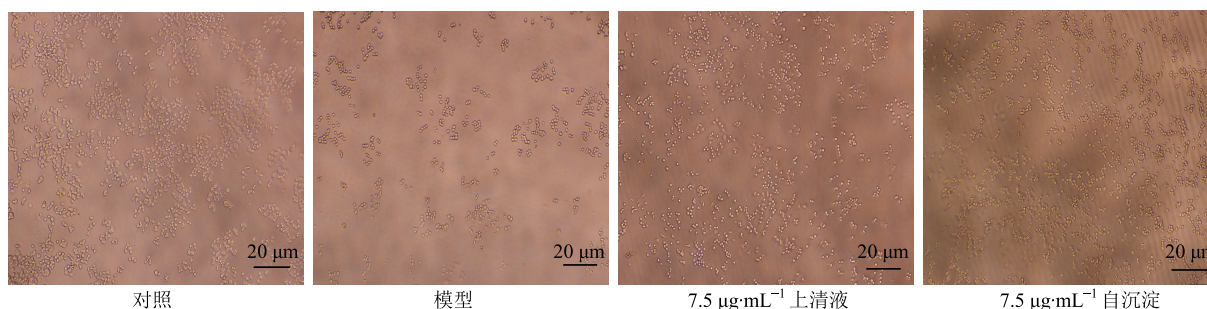


图 2 上清液和自沉淀对损伤 NGF-PC12 细胞形态学的影响

Fig. 2 Morphological changes on NGF-PC12 by supernatant and precipitation

**2.3.3 数据分析**

细胞增殖率 =  $[A_{490}(\text{Compd}) - A_{490}(\text{CoCl}_2)] / [A_{490}(\text{NGF}) - A_{490}(\text{CoCl}_2)]$

$$-pEC_{50} = \lg C_{\max} - \lg [2(\Sigma P - 0.75 + 0.25P_{\max} + 0.25P_{\min})]$$

Compd 为给药药物，C<sub>max</sub> 为最大浓度，ΣP 为总增殖率，P<sub>max</sub> 为最大增殖率，P<sub>min</sub> 为最小增殖率

CCK-8 结果表明 (表 7)，上清液和自沉淀对 CoCl<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞均具有较好的保护作用，而且自沉淀的保护效果 (EC<sub>50</sub> = 19.58 μg/mL) 要优于上清液 (EC<sub>50</sub> = 28.25 μg/mL)。

CCK-8 测试和光学显微镜下观察结果，均可明显看出细胞数量和活力比较排序为对照组 > 自沉淀组 > 上清液组 > CoCl<sub>2</sub> 损伤组，模型组与对照组相比，经 CoCl<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞凋亡数量明显增加；而与模型组比较，经上清液和自沉淀处理的保护组中凋亡细胞明显降低，而且自沉淀组的保护效果要

优于上清液组。CCK-8 测试和光学显微镜下观察实验结果均表明 HJD 水煎自沉淀、上清液均对 CoCl<sub>2</sub> 损伤的 PC12 细胞具有明显的保护作用，且自沉淀的作用效果优于上清液。

**3 讨论**

传统中医认为自沉淀与汤药同服会提高临床疗效<sup>[21]</sup>，但在制药企业提取生产以及医院代煎生产的过程中，水煎剂自沉淀多和药渣一起滤过掉，一定程度上造成疗效不稳定和药材的无意浪费。中药复方水煎自沉淀现象普遍存在，其形成原因较多，以复方中酸碱性成分络合形成大分子复合物，溶解性降低而沉淀的假说为主。本实验以 HJD 水煎自沉淀为载体，结合前期研究<sup>[18]</sup>，初步阐明其化学成分构成以及药理活性，揭示中药复方水煎自沉淀可以作为新型有效部分加以开发利用，另外作为中药生产工艺普遍存在的共性关键问题——如何在临床用药

以及生产过程中减少自沉淀的产生或者充分利用“自沉淀”，以确保治疗效果也应亟待引起学者的重视，从而合理高效地利用中药材。

通过分析用水量和煎煮时间对 HJD 自沉淀的影响，初步发现在煎煮 30 min，10 倍量水条件下，自沉淀质量约占上清液干膏质量的 10%，且其中小檗碱与黄芩苷的总量为 73.28%，两者分别为 HJD 君药黄连和臣药黄芩的主要药效成分。在自沉淀中所检测到的均为酸碱化合物，没有检测到中性的栀子苷成分，而栀子苷广泛存在于上清液<sup>[17]</sup>。综上实验数据表明 HJD 自沉淀中成分主要由复方中酸碱成分络合而来。亦有猜测，自沉淀中可能存在微量金属元素与中药活性成分形成金属配合物以及多糖、蛋白质等物质。本课题组将在此基础上采用 IPC-MS 深入检测 HJD 自沉淀金属元素组成和价态，完善中药复方水煎自沉淀形成理论，解析自沉淀的成分构成；同时本实验研究中药水煎自沉淀化学成分组成以及形成机制有利于探讨中药复方配伍的科学性与必要性，为中药复方的研究提供了一个新方向，也有利于药材的充分利用，避免药材浪费。另外，药理实验证实 HJD 自沉淀对  $\text{CoCl}_2$  损伤的 NGF 诱导的 PC12 细胞的保护作用要优于 HJD 上清液，初步猜测自沉淀中的酸碱络合物的药效高于单体类成分，例如黄芩苷-小檗碱的络合物对  $\text{CoCl}_2$  损伤的 NGF 诱导的 PC12 细胞的保护作用要优于黄芩苷以及小檗碱单体，尚需要进一步实验研究证实。

#### 参考文献

- [1] 朱华旭, 张新龙, 曾明飞, 等. 黄连解毒汤中小檗碱在脑缺血模型大鼠体内药动学与药效学相关性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 546-551.
- [2] 杨 阳, 赵海誉, 宋建芳, 等. 黄连解毒汤化学成分及其神经细胞保护作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1599-1603.
- [3] 陈莉雯, 李毅民, 周 昕. 黄连解毒汤化学成分测定研究概况 [J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(8): 86-89.
- [4] 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.
- [5] 沈 岚, 俞立强, 熊佩华. 六味地黄汤合黄连解毒汤对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用及相关机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(6): 553-557.
- [6] 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
- [7] 徐 雷. 黄连解毒汤治疗老年性痴呆的临床及实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [8] Wang P R, Wang J S, Yang M H, *et al.* Neuroprotective effects of Huang-Lian-Jie-Du-Decoction on ischemic stroke rats revealed by 1 H NMR metabolomics approach [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2014, 88: 106-116.
- [9] Zou H Y, Long J F, Zhang Q X, *et al.* Induced cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia—three active components from Huang-Lian-Jie-Du Decoction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 178: 115-124.
- [10] 赵 晖, 龙建飞, 邹海艳, 等. 黄连解毒汤及其有效部位调控星形胶质细胞网络对 MCAO 大鼠脑损伤的保护 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4405-4410.
- [11] 徐静华. 黄连解毒汤提取物对脑缺血动物的促智作用及机制探讨 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2000.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 钱智磊, 李 欢, 朱华旭, 等. 黄连解毒汤中指标性成分药动学与药效学相关性的初步研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 122-128.
- [15] Zhu H X, Qian Z L, He F, *et al.* Novel pharmacokinetic studies of the Chinese formula Huang-Lian-Jie-Du-Tang in MCAO rats [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(10): 767-774.
- [16] 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学的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2877-2882.
- [17] 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.
- [18] 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, 21(8): 1094-1108.
- [19] 王 凌, 洪筱坤. 黄连解毒汤中生物碱含量的拆方研究 [J]. 中成药, 2003, 25(11): 912-914.
- [20] 黄竹燕, 潘蓓蓓, 黄春燕, 等. 黄连解毒汤抗原皮层神经元缺氧缺糖损伤的活性部位筛选 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(8): 981-987.
- [21] 王慕鉴. 浅谈中草药汤剂科学服用 [J]. 新中医, 1993, 25(11): 19.