

黄连解毒汤中 9 种主要成分在大鼠脑组织中分布特征研究

衡霞^{1,2}, 戚懿予^{1,2}, 曲书阅^{1,2}, 葛平源^{1,2}, 杨念云^{1,2}, 郭瑞^{1,3}, 张启春^{1,2,3*}, 朱华旭^{1,2*}

1. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学 江苏省植物药深加工工程研究中心, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学 江苏省中药药效与安全评价重点实验室, 江苏 南京 210023

摘要:目的 建立灵敏、准确、可靠的小檗碱、小檗红碱、药根碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A、京尼平苷和栀子黄素 B 在大鼠海马、皮层、纹状体和脑脊液组织中高效液相色谱-串联质谱联用 (HPLC-MS-MS) 分析方法, 用于黄连解毒汤中 9 种主要成分在大鼠脑组织中分布研究。方法 优化黄连解毒汤中 9 种主要成分及内标克拉霉素和氯霉素的质谱检测条件, 确定分析条件并对方法学进行考察。正常大鼠 ig 给予黄连解毒汤, 末次给药 1 h 后采集脑脊液、海马、皮层和纹状体样品, 经处理后将该方法用于 9 种成分的测定。结果 小檗碱、药根碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A、栀子黄素 B 在 1~250 ng/mL 呈现良好的线性关系 ($r^2 > 0.99$), 小檗红碱在 1~500 ng/mL 具有良好的线性关系 ($r^2 = 0.9912$), 京尼平苷在 5~500 ng/mL 具有良好的线性关系 ($r^2 = 0.9995$); 各成分的日内、日间精密性 RSD 均小于 12.94%, 准确度均在 -12.71%~6.91%; 提取回收率均在 88.02%~106.70%, 基质效应均在 88.92%~105.10%; 短期、冻融循环和长期稳定性 RSD 均小于 12.51%。各成分在海马、皮层和纹状体中的含量为小檗碱 > 黄芩苷 > 京尼平苷 > 小檗红碱 > 巴马汀 > 汉黄芩素 > 药根碱 > 千层纸素 A > 栀子黄素 B; 各成分在脑脊液中的含量为京尼平苷 > 小檗碱 > 小檗红碱 > 巴马汀 > 黄芩苷 > 栀子黄素 B > 药根碱 > 汉黄芩素 > 千层纸素 A。结论 该方法可用于大鼠脑组织中小檗碱、药根碱等 9 种成分含量的同时检测, 并可用于这 9 种成分在大鼠脑组织分布研究, 为探究黄连解毒汤治疗脑部疾病的物质基础提供依据。

关键词: 黄连解毒汤; 小檗碱; 小檗红碱; 巴马汀; 药根碱; 黄芩苷; 汉黄芩素; 千层纸素 A; 栀子黄素 B; 京尼平苷; 高效液相色谱-串联质谱; 多反应离子监测; 脑组织分布; 克拉霉素; 氯霉素; 基质效应; 稳定性

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)15-3922-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.15.011

Distribution characteristics of nine main components of Huanglian Jiedu Decoction in rat brain

HENG Xia^{1,2}, QI Yi-yu^{1,2}, QU Shu-yue^{1,2}, GE Ping-yuan^{1,2}, YANG Nian-yun^{1,2}, GUO Rui^{1,3}, ZHANG Qi-chun^{1,2,3}, ZHU Hua-xu^{1,2}

1. Jiangsu Collaboration Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Research Center of Botanical Medicine Refinement Engineering, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Key Laboratory of Efficacy and Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish a sensitive, accurate and reliable LC-MS-MS analysis method for the nine major components (berberine, berberrubine, jatrorrhizine, palmatine, baicalin, wogonin, oroxylin A, geniposide and gardenin B) in Huanglian Jiedu Decoction (HJD) in rat hippocampus, cortex, striatum, and cerebrospinal fluid, and to study the distribution characteristics of the components in brain tissues of rats. **Methods** The mass spectrometry detection conditions and chromatographic analysis conditions of

收稿日期: 2020-02-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573635); 国家自然科学基金资助项目 (81873027); 江苏高校“青蓝工程”资助

作者简介: 衡霞 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: hengxia1019@163.com

*通信作者 张启春, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药药理学。E-mail: zhangqichun@njucm.edu.cn
朱华旭, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药药剂学。E-mail: huaxu72@126.com

nine main components and internal standards (clarithromycin and chloramphenicol) was optimized, and then the methodological investigations were performed. After HJD was administrated for 1 h, the samples of cerebrospinal fluid, hippocampus, cortex and striatum tissues were collected, and the contents of nine components in these samples were measured. **Results** Berberine, jatrorrhizine, palmatine, baicalin, wogonin, oroxylin A and gardenin B showed a good linear relationship in the range of 1—250 ng/mL ($r^2 > 0.99$). Berberrubine had a good linear relationship in the range of 1—500 ng/mL ($r^2 = 0.991\ 2$), and geniposide had a good linear relationship in the range of 5—500 ng/mL, respectively ($r^2 = 0.999\ 5$). The intra-day and inter-day precision of each component was less than 12.94%, the accuracy was from -12.71% to 6.91%; The extraction recovery rate was from 88.02% to 106.7%; The matrix effect was from 88.92% to 105.10%; And the short-term, freeze-thaw cycle and long-term stability were less than 12.51%. The content of each component in the hippocampus, cortex and striatum was berberine > baicalin > geniposide > berberrubine > palmatine > wogonin > jatrorrhizine > oroxylin A > gardenin B; And the content of each component in cerebrospinal fluid was geniposide > berberine > berberrubine > palmatine > baicalin > gardenin B > jatrorrhizine > wogonin > oroxylin A. **Conclusion** The method can be used for the simultaneous detection of the concentration of nine active components in brain tissues of rats, and successfully applied to the study of brain tissue distribution, which provides a reference for HJD to treat brain diseases.

Key words: Huanglian Jiedu Decoction; berberine; berberrubine; palmatine; jatrorrhizine; baicalin; wogonin; oroxylin A; gardenin B; geniposide; LC-MS-MS; MRM; brain tissue distribution; clarithromycin; chloramphenicol; matrix effect; stability

黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decoction, HJD) 作为清热解毒方中的经典方剂,出自《肘后备急方》。该方由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味中药组成,主治三焦热盛,一切实热火毒^[1]。HJD 主要由生物碱、黄酮、环烯醚萜类成分构成^[2-3]。现代研究表明, HJD 具有抗炎、抗氧化、抗脑缺血、保护神经元、改善学习记忆、抗脓毒症的作用,可用于脑血管疾病、痴呆、炎症、胃肠道疾病等^[4-8]。随着研究的深入, HJD 在脑源性疾病中的巨大潜力逐渐受到关注。然而,目前关于 HJD 的研究比较集中在小檗碱、黄芩苷和栀子苷等少数成分的血浆药动学特征上,而 HJD 中生物碱、黄酮、环烯醚萜类物质在脑中的分布情况报道较少。小檗碱、药根碱、巴马汀和小檗红碱属于生物碱类化合物,主要存在于黄连和黄柏中;黄芩苷、汉黄芩素和千层纸素 A 均属于黄酮类化合物,主要存在于黄芩中;栀子黄素 B 属于黄酮类化合物,京尼平苷属于环烯醚萜类化合物,主要存在于栀子中。越来越多的研究表明, HJD 中的生物碱、黄酮、环烯醚萜类化合物具有多种药理作用,被广泛应用于多种疾病的治疗。因此,本实验旨在建立一种灵敏、准确、可靠并且适用于 HJD 中多个成分检测的高效液相色谱-串联质谱联用 (HPLC-MS-MS) 分析方法,从而对 HJD 中 9 种主要成分在大鼠脑组织中的分布情况进行探讨,为 HJD 治疗脑类疾病的作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

黄连 (四川,批号 160101)、黄芩 (内蒙古,批号 160101)、黄柏 (四川,批号 160101) 和栀子

(江西,批号 151101) 药材均购自安徽汇中州中药饮片有限公司,经南京中医药大学药学院吴啟南教授鉴定,黄连药材为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎,黄芩药材为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,黄柏药材为芸香科黄檗属植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮,栀子药材为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的干燥果实。

对照品小檗碱 (批号 PRF7091801,质量分数 99.37%)、小檗红碱 (批号 PRF9052221,质量分数 99.96%)、盐酸巴马汀 (批号 PRF9031601,质量分数 99.44%)、药根碱 (批号 PRF8080421,质量分数 99.51%)、黄芩苷 (批号 PRF8090701,质量分数 99.69%)、汉黄芩素 (批号 PRF7090242,质量分数 98.79%)、千层纸素 A (批号 PRF8041444,质量分数 99.51%)、京尼平苷 (批号 PRF8030342,质量分数 99.07%)、栀子黄素 B (批号 PRF8063043,质量分数 98.80%) 均购自成都普瑞法科技开发有限公司。对照品内标克拉霉素 (批号 130558-201904,质量分数 98.60%) 和氯霉素 (批号 130555-201704,质量分数 99.8%) 均购于中国食品药品检定研究院。甲醇,色谱级,批号 10999607 909,德国 Merck 公司;乙腈,色谱级,批号 JA061830,美国 Merck 公司;甲酸,色谱级,批号 G1826012,上海阿拉丁生物科技股份有限公司;超纯水为实验室自制。

1.2 仪器

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪,日本 Shimadzu 公司; AB SCIEX Triple Quad™ 5500 三重

四级杆线性离子阱质谱仪, 美国 Applied Biosystems 公司; Lyoquest-55 PLUS 型冷冻干燥机, 西班牙 Telstar 公司; Tissuelyser-48 全自动样品快速研磨仪, 上海净信科技有限公司; Labconco CentriVap® 抗酸防腐型冷冻离心浓缩仪, 美国 Labconco 公司; Allegra 64R Centrifuge 高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; Shimadzu AUW120D 十万分之一电子分析天平, 日本 Shimadzu 公司。

1.3 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 体质量 260~280 g, 购自上海杰思捷实验动物有限公司, 动物许可证号为 SCXK(沪) 2018-0004。大鼠饲养在光线(12h/12h 日夜循环)和温度(室温 25℃)控制的环境中, 给予充足的饲料和饮水, 自由饮食。

2 方法

2.1 HJD 提取物的制备

按照 HJD 4 味药的组成比例分别称取黄连 270 g、黄芩 180 g、黄柏 180 g、栀子 270 g, 根据本实验室已有的优选提取工艺^[9]进行提取, 具体如下: 第 1 次提取加 10 倍量的水, 加热煮沸 1.5 h, 趁热滤过, 得滤液 1; 第 2 次提取加入 8 倍量水, 加热煮沸 1 h, 趁热滤过, 得滤液 2; 合并 2 次滤液, 转入旋转蒸发仪中, 浓缩至约 1 000 mL, 放入-80℃冰箱预冻过夜后, 置于冷冻干燥机中进行冻干。共得到 210.07 g 冻干粉, 即 1 g 冻干粉相当于 4.28 g 生药量(冻干粉中含小檗碱 8.33%、黄芩苷 11.90%、京尼平苷 2.81%)。

2.2 HPLC-MS/MS 条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~1 min, 5%~20%乙腈; 1~12 min, 20%~95%乙腈; 12~14 min, 95%~5%乙腈; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 5 μL; 柱温 35℃。

2.2.2 质谱条件 采用多反应离子监测(MRM)模式电喷雾离子源(ESI)正负离子模式扫描, 主要质谱参数: 离子源温度 550℃, 喷雾电压 5 500 V, 气帘气 241.32 kPa, 雾化气为 379.22 kPa, 干燥气为 379.22 kPa。分别采用全扫描、选择性离子扫描和子离子扫描模式, 确定各化合物的母离子和子离子。克拉霉素为正离子检测模式的内标物, 氯霉素为负离子检测模式的内标物。9 种被测物质的 MRM 信息见表 1。

表 1 大鼠脑组织中 9 种主要成分及内标质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of nine components in rat brain tissue and internal standard

化合物	母离子	子离子	去簇电压/V	碰撞电压/V	ESI
小檗碱	336.1	321.1	40	35	ESI ⁺
小檗红碱	323.3	308.1	1	37	ESI ⁺
药根碱	338.2	322.3	130	29	ESI ⁺
巴马汀	352.2	336.1	130	47	ESI ⁺
黄芩苷	447.1	271.1	79	25	ESI ⁺
汉黄芩素	285.3	270.1	70	25	ESI ⁺
千层纸素 A	285.3	270.1	70	25	ESI ⁺
栀子黄素 B	359.2	329.2	141	37	ESI ⁺
京尼平苷	387.1	225.0	180	12	ESI ⁻
克拉霉素	748.4	158.2	130	30	ESI ⁺
氯霉素	321.0	257.0	120	30	ESI ⁻

2.3 对照品储备液的配制

分别精密称定小檗碱、小檗红碱、盐酸巴马汀、药根碱、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A、京尼平苷和栀子黄素 B 对照品各 2.500 mg, 置于 2.5 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度, 配制成为质量浓度均为 1.0 mg/mL 的各对照品储备液。

2.4 混合对照品溶液的制备

精密量取各对照品溶液适量, 用甲醇稀释, 使各对照品质量浓度均为 5 μg/mL, 并稀释得到系列质量浓度为 1、5、10、25、50、100、250、500 ng/mL 的混合对照品溶液。

2.5 内标溶液的制备

精密称取克拉霉素和氯霉素适量, 用甲醇稀释, 使克拉霉素和氯霉素的质量浓度均为 5 μg/mL 的混合内标溶液。

上述各溶液均置于 4℃冰箱中保存备用。

2.6 海马、皮层、纹状体、脑脊液样品的采集

雄性 SD 大鼠, 适应性饲养 1 周后, 随机分为 2 组: 对照组(ig 0.50% CMC-Na 溶液)、HJD 组(ig HJD 提取物)。根据大鼠与人用药剂量的换算关系, 以及 HJD 的临床给药量, 确定给药量为 1.58 g/(kg·d)。连续给药 7 d, 末次给药 1 h 后, 异氟烷(1.5%~2.0%)麻醉大鼠, 用注射器于枕骨大孔处取出脑脊液, 脱颈椎处死后迅速取出大鼠脑组织, 小心剥离海马、皮层和纹状体组织, 剥离血丝并于生理盐水中洗净, 置于-80℃冰箱冷冻保存。

2.7 海马、皮层、纹状体、脑脊液样品的前处理

海马、皮层、纹状体和脑脊液样品于 4℃解冻,

将海马、皮层和纹状体组织匀浆(1 g 脑组织用 1 mL 超纯水匀浆),取各组组织匀浆液 200 μ L 和脑脊液 100 μ L,加入 20 μ L 内标溶液,加入 4 倍量甲醇-乙腈(1:3)溶液沉淀蛋白,涡旋振摇 1 min 后,于 4 $^{\circ}$ C、16 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,并用离心浓缩仪挥干溶剂。组织残留物用 200 μ L 0.1%甲酸水溶液-乙腈(5:5)溶解涡旋混匀,脑脊液残留物用 100 μ L 0.1%甲酸水溶液-乙腈(5:5)溶解涡旋混匀,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,并转移至液相小瓶中待测。

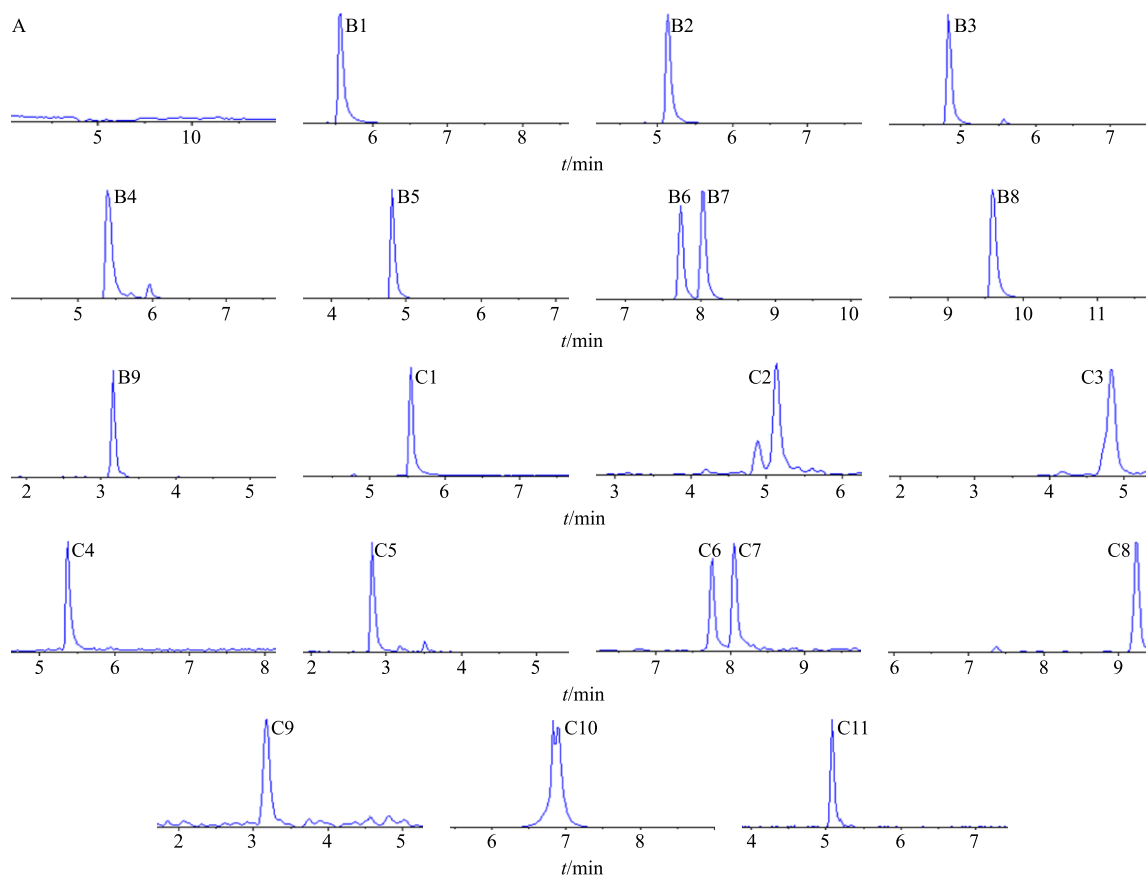
2.8 方法学考察

2.8.1 专属性考察 分别精密吸取 200 μ L 空白大鼠脑组织匀浆液,除不加混合对照品和内标溶液外,其他按照“2.7”项下方法处理,得大鼠空白脑组织样品的色谱图;将一定质量浓度的混合对照品和内标溶液加入大鼠空白脑组织匀浆液中,依同法进行

处理,得相应标准样品色谱图;取 ig 给药 1 h 后的大鼠脑组织匀浆液,依同法处理,得实测样品色谱图,见图 1。结果表明,在该方法处理下各化合物之间无相互干扰,峰形良好,且大鼠脑组织中内源性物质对待测物和内标的测定没有干扰。

2.8.2 标准曲线和定量限(LOQ) 依次加入系列质量浓度混合对照品溶液 100 μ L,内标溶液 20 μ L,于离心浓缩仪中低温旋转至干,精密吸取空白脑组织匀浆液 200 μ L,涡旋 1 min,按“2.7”项下方法处理样品,并按“2.2”项下方法进样测定。分别以各化合物的质量浓度为 X 轴,以各化合物与内标物峰面积的比值为 Y 轴,进行线性回归,以信噪比(S/N)=10 确定 LOQ,分别得脑组织中小檗碱、小檗红碱等 9 种化合物的回归方程和定量限。

结果表明,各化合物在相应质量浓度范围内线性关系良好($r>0.99$),符合生物样品分析方法的



A-空白脑组织 B-空白脑组织+混合对照品溶液 C-脑组织样品 1-小檗碱 2-小檗红碱 3-药根碱 4-巴马汀 5-黄芩苷 6-汉黄芩素 7-千层纸素 A 8-梔子黄素 B 9-京尼平苷 10-克拉霉素(内标 1) 11-氯霉素(内标 2)

A-blank brain tissue B-blank brain tissue + each reference substance C-brain tissue samples 1-berberine 2-berberrubine 3-jatrorrhizine 4-palmatine 5-baicalin 6-wogonin 7-oroxylin A 8-gardenin B 9-geniposide 10-clarithromycin (internal standard 1) 11-chloramphenicol (internal standard 2)

图 1 大鼠脑组织中 9 种主要成分及内标的 MRM 图

Fig. 1 MRM diagram of nine main components and internal standard in rat brain tissue

表 2 大鼠脑组织中 9 种主要成分的回归方程、相关系数、线性范围和定量限 ($n = 6$)Table 2 Standard curve, correlation coefficient, linear range and minimum quantitation limit of nine main components in rat brain tissue ($n = 6$)

化合物	回归方程	r^2	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
小檗碱	$Y = 2.9672X + 0.0139$	0.9977	1~250	0.0014
小檗红碱	$Y = 1.14X - 0.0037$	0.9912	1~500	0.0155
药根碱	$Y = 1.363X + 0.0003$	0.9968	1~250	0.0035
巴马汀	$Y = 4.5964X - 0.0003$	0.9951	1~250	0.0041
黄芩苷	$Y = 0.6606X - 0.0001$	0.9996	1~250	0.0136
汉黄芩素	$Y = 1.7863X - 0.0003$	0.9994	1~250	0.0054
千层纸素 A	$Y = 2.3226X - 0.0006$	0.9996	1~250	0.0168
栀子黄素 B	$Y = 5.2343X + 0.0009$	0.9960	1~250	0.0091
京尼平苷	$Y = 5.0161X + 0.0277$	0.9995	5~500	1.4135

要求。各化合物在脑组织中的回归方程、线性范围和 LOQ 见表 2。

2.8.3 精密度考察 取 25、250 ng/mL 2 个质量浓度的混合对照品溶液各 100 μ L，内标溶液 20 μ L，于离心浓缩仪中低温旋转至干，精密吸取空白脑组织匀浆液 200 μ L，涡旋 1 min，按“2.7”项下方法操作，于 0、2、4、6、12、24 h 分别测定以考察日内精密度，于 0、12、24、36、48、72 h 分别测定以考察日间精密度，同一质量浓度重复 6 份样本进行分析。以当日校正的标准曲线计算日内和日间准确度（相对误差，RE）和精密度（相对标准偏差，RSD），结果见表 3。结果表明该方法精密度和准确度良好，符合分析要求。

2.8.4 提取回收率与基质效应 取 25、250 ng/mL 2 个质量浓度的混合对照品溶液 100 μ L，内标溶液 20 μ L，于离心浓缩仪中低温旋转至干，精密吸取空白脑组织匀浆液 200 μ L，涡旋 1 min，按“2.7”项下方法操作，进样分析后将指标成分峰面积记作 A。另精密吸取空白脑组织匀浆液和超纯水 200 μ L，按“2.7”项下方法处理，离心分取上清后补加混合对照品溶液，于离心浓缩仪中蒸发至干，复溶进样分析，将测得的指标成分峰面积分别记作 B、C。以 A/B 计算提取回收率，以 B/C 计算基质效应，结果见表 4。

2.8.5 稳定性考察 取 25、250 ng/mL 2 个质量浓度的混合对照品溶液 100 μ L，内标溶液 20 μ L，于离心浓缩仪中低温旋转至干，精密吸取空白脑组织匀浆液 200 μ L，涡旋 1 min，按“2.7”项下方法操作，分别从短期（12 h）、长期（7 d，-20 $^{\circ}$ C）、反复冻融 3 次处理后样品放置 24 h 的稳定性综合评价

表 3 大鼠脑组织中 9 种主要成分测定方法准确度及精密度分析 ($n = 6$)Table 3 Accuracy and precision analysis of nine main components in rat brain tissue ($n = 6$)

化合物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	精密度 RSD/%		准确度 RE/%	
		日内	日间	日内	日间
小檗碱	25	11.94	10.35	-9.04	-0.40
	250	4.44	8.34	5.11	-1.03
小檗红碱	25	10.20	11.82	-2.75	-6.27
	250	5.44	5.81	6.03	6.91
药根碱	25	3.53	12.78	-12.07	2.93
	250	5.91	12.03	-9.13	5.06
巴马汀	25	11.03	10.34	-11.04	-4.85
	250	5.84	8.04	-1.97	-3.98
黄芩苷	25	5.23	11.31	-8.31	3.89
	250	8.74	8.53	-3.59	-5.09
汉黄芩素	25	5.47	5.25	-11.73	-3.36
	250	4.00	8.36	2.69	-3.20
千层纸素 A	25	6.88	9.29	-9.41	-11.33
	250	3.32	7.54	-0.67	0.30
栀子黄素 B	25	7.32	6.76	-12.71	-8.28
	250	6.63	9.07	-9.76	-5.17
京尼平苷	25	11.62	1.22	-6.49	-9.90
	250	10.90	12.94	-0.54	-7.54

该方法的稳定性，结果见表 5。结果表明各化合物脑组织样品在上述处理条件下均稳定性良好。

2.8.6 含量测定 取 ig 给药后的大鼠海马、皮层、纹状体组织匀浆液 200 μ L，脑脊液 100 μ L，按“2.7”项下方法处理样品，按“2.2”项下方法进行测定，以检测各成分在海马、皮层、纹状体以及脑脊液中

表 4 大鼠脑组织中 9 种主要成分提取回收率及基质效应分析 ($n = 6$)Table 4 Extraction recovery rate and matrix effect analysis of nine main components in rat brain tissue ($n = 6$)

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	提取回收率/%	基质效应/%	化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	提取回收率/%	基质效应/%
小檗碱	25	100.60±3.70	91.17±5.56	黄芩苷	250	93.30±5.00	99.04±5.64
	250	96.74±4.43	92.68±2.97	汉黄芩素	25	88.78±2.47	92.59±3.98
小檗红碱	25	102.50±4.32	94.71±7.27		250	88.25±3.12	102.80±5.72
	250	89.20±3.15	100.40±8.16	千层纸素 A	25	90.75±3.82	95.96±7.29
药根碱	25	106.70±2.13	100.90±2.89		250	88.27±2.38	105.10±3.30
	250	96.69±7.44	91.49±2.69	栀子黄素 B	25	93.40±6.56	90.86±4.47
巴马汀	25	100.10±5.28	94.96±6.64		250	93.94±4.45	104.00±5.35
	250	88.02±5.67	90.32±2.60	京尼平苷	25	89.55±4.35	98.46±8.48
黄芩苷	25	100.00±4.78	89.51±8.40		250	91.94±6.38	88.92±7.40

表 5 大鼠脑组织中 9 种主要成分的稳定性试验 ($n = 6$)Table 5 Stability test of nine main components in rat brain tissue ($n = 6$)

化合物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	短期 (12 h)		冻融循环		长期 (-20 °C, 7 d)	
		准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%
小檗碱	25	3.12	7.84	2.58	9.42	-2.29	12.51
	250	-6.01	7.74	-9.35	4.98	-9.82	12.00
小檗红碱	25	1.68	9.10	-8.82	7.95	0.88	9.45
	250	3.46	6.10	7.27	7.89	2.85	6.83
药根碱	25	-0.82	9.61	7.44	7.28	4.04	9.14
	250	-1.42	8.30	11.64	6.04	5.40	10.55
巴马汀	25	5.71	8.72	11.89	4.30	8.98	8.03
	250	-13.62	7.91	-0.88	9.62	-3.29	7.22
黄芩苷	25	2.87	9.06	6.13	9.09	10.20	5.79
	250	-4.07	11.56	-1.67	9.26	2.34	9.11
汉黄芩素	25	6.69	7.91	13.09	5.02	10.40	3.53
	250	-4.20	10.90	-2.76	10.25	-1.91	9.19
千层纸素 A	25	2.15	9.18	7.86	2.89	5.06	8.61
	250	-1.25	7.80	-5.69	9.55	1.94	10.90
栀子黄素 B	25	1.28	5.65	10.12	6.10	8.89	8.53
	250	-1.85	8.71	-7.54	8.51	12.70	7.40
京尼平苷	25	0.92	6.92	-4.90	9.29	1.90	6.34
	250	-1.32	8.77	-7.93	8.13	-2.94	10.40

的含量。结果按每克组织（每毫升脑脊液）中含待测成分的量表示，结果见表 6。结果表明 HJD ig 给药 1 周后，小檗碱、小檗红碱、药根碱、巴马汀、黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A、京尼平苷和栀子黄素 B 均能透过血脑屏障进入脑组织并在其中分布。其中海马、皮层和纹状体组织中以小檗碱、黄芩苷、京尼平苷含量最高，小檗红碱、巴马汀、汉黄芩素含量次之，药根碱、千层纸素 A、栀子黄素 B 含量较低。脑脊液中以京尼平苷、小檗碱、小檗

红碱含量最高，巴马汀、黄芩苷、栀子黄素 B 含量次之，药根碱、汉黄芩素和千层纸素 A 含量较低。

3 讨论

HJD 作为清热解毒的传统名方，由黄连、黄芩、黄柏和栀子 4 味中药组成，主要含有生物碱、黄酮、环烯醚萜 3 类成分。对这 3 类成分体内定量分析方法学的建立大多应用高效液相色谱法，分析时间较长，且内源性物质干扰较多，影响测定的灵敏度和精确度。

表 6 HJD 中 9 种成分在脑组织不同部位中的含量
Table 6 Contents of nine ingredients of HJD in different brain tissues

化合物	质量分数/(ng·g ⁻¹)			质量浓度/(ng·mL ⁻¹)
	海马	皮层	纹状体	脑脊液
小檗碱	164.70±11.20	108.90±7.32	157.50±11.29	41.07±3.61
小檗红碱	36.28±0.14	39.17±0.32	36.57±0.05	37.44±0.28
药根碱	6.40±0.39	13.14±0.88	13.36±0.93	4.48±0.30
巴马汀	20.69±1.36	15.87±0.85	26.69±1.66	7.90±0.33
黄芩苷	52.49±2.13	111.10±9.26	35.31±2.31	6.76±0.64
汉黄芩素	23.25±1.33	10.90±0.41	21.01±1.25	3.75±0.12
千层纸素 A	14.49±0.72	12.30±0.59	10.61±0.45	4.37±0.16
栀子黄素 B	2.49±0.12	3.03±0.12	6.31±0.29	6.16±0.21
京尼平苷	29.68±1.94	58.25±8.47	26.95±3.98	58.16±4.38

近年来,中药多成分复杂体系生物样品的分析多采用 LC-MS/MS,相比 HPLC-UV 具有灵敏度更高,专属性更强,分析速度更快等特点,大大提高了分析效率^[10-11]。本实验从 HJD 中 3 类主要成分入手,通过对 4 个生物碱类、4 个黄酮类和 1 个环烯醚萜类化合物 HPLC-MS-MS 联用分析方法学的建立,对这 9 种成分在大鼠脑组织中的分布特征进行研究。

本实验初期对脑组织样品的处理方法进行考察,发现采用甲醇-乙腈(1:3)沉淀蛋白法处理脑组织样品,具有稳定可靠、简便快捷、重现性好的优势。在流动相的选择上,对甲醇和乙腈进行考察,发现以乙腈为流动相时待测物可以得到较好的峰形,加入 0.1%甲酸,可以提高待测物的离子化效率。因此选用乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行分析。

质谱分析部分采用 ESI 源正负离子模式,以 MRM 扫描方式进行定量分析。分别采用全扫描、选择性离子扫描和子离子扫描模式,对各化合物的母离子和子离子进行选择,并对去簇电压(DP)和碰撞电压(CE)进行优化,确定最优的质谱参数。克拉霉素和氯霉素性质稳定,易溶于甲醇,分别在正负电离模式下有良好的响应,且干扰其他成分的测定^[12],因此采用克拉霉素和氯霉素分别作为正、负离子模式的内标物质。

近年来,基于“毒损脑络”的中医理论指导,HJD 被广泛应用于脑缺血、痴呆症等脑部疾病的治疗^[13-16]。现代药理研究表明,小檗碱、巴马汀、黄芩苷、栀子苷等成分对脑缺血和阿兹海默症具有显著疗效^[17-21],黄竹燕等^[22]研究发现栀子苷、黄芩

苷、巴马汀、汉黄芩素均可提高神经元存活率,张辉^[23]研究发现药根碱对 H₂O₂ 诱导的神经损伤具有保护作用,Jeon 等^[24]和 Lee 等^[25]研究证明千层纸素 A 具有神经保护及促进神经发生的作用,因此,参考此类文献报道本研究选择 HJD 中上述 9 种活性成分建立稳定可靠的 LC-MS-MS 检测方法,为 HJD 治疗脑部疾病提供依据。

有研究显示 HJD 冻干粉中以京尼平苷、小檗碱、巴马汀含量最多,黄芩苷、药根碱次之,汉黄芩素和千层纸素 A 最低,对于小檗红碱和栀子黄素 B 未进行检测^[26]。在本研究中分别对海马、皮层、纹状体和脑脊液中这 9 种成分的含量进行测定,发现 9 种成分在海马、皮层和纹状体中分布相似,以小檗碱、黄芩苷、京尼平苷含量最高,小檗红碱、巴马汀、汉黄芩素含量次之,药根碱、千层纸素 A、栀子黄素 B 含量较低;脑脊液中略有差异,以京尼平苷、小檗碱、小檗红碱含量最高,巴马汀、黄芩苷、栀子黄素 B 含量次之,药根碱、汉黄芩素和千层纸素 A 含量较低。9 种成分在各脑组织中分布的总体趋势与冻干粉中大体一致,而 9 种成分在不同脑组织中的分布趋势也基本相同,但各成分在脑脊液中的含量大多低于其他 3 个部位。越来越多的研究表明,HJD 在脑缺血、痴呆等脑部疾病方面具有显著疗效,本研究也为 HJD 治疗脑部疾病的物质基础研究提供参考。

参考文献

- [1] 邓中甲. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [2] 刘磊, 姜鹏, 窦圣姍, 等. 黄连解毒汤的化学及药理学研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 935-938.

- [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] 刘雨浓, 张晓敏, 崔晓英, 等. 黄连解毒汤有效组分通过激活 Caspase-11 靶点抗脓毒症的研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(1): 7-11.
- [5] Lu J, Wang J S, Kong L Y. Anti-inflammatory effects of Huang-Lian-Jie-Du decoction, its two fractions and four typical compounds [J]. *J. Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 911-918.
- [6] Yu C J, Zheng M F, Kuang C X, *et al.* Oren-Gedoku-To and its constituents with therapeutic potential in Alzheimer's disease inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase activity *in vitro* [J]. *JAD*, 2010, 22(1): 257-266.
- [7] Xu J, Murakami Y, Matsumoto K, *et al.* Protective effect of Oren-Gedoku-To (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 73(3): 405-413.
- [8] 张晓囡, 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.
- [9] Zeng M F, Pan L M, Zhu H X, *et al.* Comparative pharmacokinetics of baicalin in plasma after oral administration of Huang-Lian-Jie-Du-Tang or pure baicalin in MCAO and sham-operated rats [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(6): 490-496.
- [10] 郭懿萍, 覃彩缤, 陈 黎, 等. UPLC-MS/MS 法测定连翘苷溶液中 7 种成分的含量 [J]. 中药材, 2018, 41(9): 2143-2146.
- [11] 杨梦玲, 尤朋涛, 何丽珊, 等. 基于 UPLC-MS/MS 分析胃溃疡模型大鼠口服加味小柴胡颗粒后血浆中 8 种有效成分的药代动力学 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(18): 3748-3755.
- [12] 丁 雯, 钱大玮, 刘 培, 等. 不同提取溶剂对当归赤芍药对主要活性成分溶出率的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 916-919.
- [13] 韩旭超, 唐 鹏, 李 锐. 黄连解毒汤保护脑缺血再灌注损伤的机制探讨 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(25): 136.
- [14] 周 丽, 张允岭, 侯小兵, 等. 基于“毒损脑络”理论的老年期痴呆辨经探讨 [J]. 中国针灸, 2012, 32(11): 1031-1040.
- [15] 顾欣如, 方思月, 任 维, 等. 黄连解毒汤在阿尔茨海默病模型大鼠体内药代动力学及对脑内炎症微环境改善的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 3006-3011.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 王 博, 孙亚男, 王继燕, 等. 小檗碱通过激活 SIRT1 通路减轻脑缺血再灌注大鼠炎症及凋亡 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(10): 847-852.
- [19] 桑星晨. 黄芩的化学成分及治疗阿尔兹海默病的研究进展 [J]. 医学信息, 2019, 32(13): 52-55.
- [20] 常 鑫, 梁宇彬, 车思璇, 等. 小檗碱对三转基因阿尔兹海默病小鼠的学习记忆和海马 PSD95 突触相关蛋白表达水平的影响 [J]. 卒中与神经疾病, 2018, 25(1): 3-7.
- [21] 向绍通, 徐书雯, 肖 豪, 等. 槲子苷通过 ERK1/2-Nrf2 通路发挥对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的阿尔兹海默病大鼠模型的神经保护作用 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2018, 47(1): 27-32.
- [22] 凌 芳, 华 梅. 汉黄芩素对慢性低灌注大鼠的神经保护作用 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2142-2144.
- [23] 张 辉. 小檗碱和药根碱对 HO 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其机制 [D]. 广州: 中山大学, 2010.
- [24] Jeon S J, Rhee S Y, Seo J E, *et al.* Oroxylin A increases BDNF production by activation of MAPK-CREB pathway in rat primary cortical neuronal culture [J]. *J Neurosci Res*, 2011, 69(3): 214-222.
- [25] Lee S, Kim D H, Lee D H, *et al.* Oroxylin A, a flavonoid, stimulates adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus region of mice [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 35(11): 1725-1732.
- [26] 杨丽宏, 袁子文, 纪 鹏, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3794-3801.