

三黄泻心汤煎煮过程中 13 种指标成分动态变化与分布规律研究

吴学渊^{1,2}, 房春林², 李文^{1*}, 曾佑琴³, 傅舒¹, 李锐¹, 章津铭¹, 傅超美^{1*}, 王凤⁴

1. 成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 成都农业科技职业学院, 四川 成都 611130

3. 成都中医药大学医学技术学院, 四川 成都 611137

4. 四川全泰堂中药饮片有限公司, 四川 遂宁 629000

摘要:目的 建立经典名方三黄泻心汤(Sanhuang Xiexin Decoction, SXD)中 13 种指标成分(表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)的含量同时测定方法,探索 SXD 煎煮过程中成分动态变化和分布规律,揭示 SXD 复合分散体系的制剂特征。方法 按照 SXD 传统煎煮方法制备煎液,建立样品中 13 种指标成分的含量同时测定方法,检测各指标成分在汤剂、离心上清液、离心沉积物中的含量;进一步地,分别制备浸泡结束、刚沸腾以及煎煮不同时间后的样品进行测定,绘制 SXD 煎煮过程中 13 种指标成分动态变化和分布规律图,分析煎煮过程中各成分在汤剂、离心上清液和离心沉积物中的含量变化情况。结果 SXD 煎液中,含量最高的指标成分为黄芩苷(15.496 mg/g),其次为小檗碱(3.048 mg/g),含量最低的指标成分为大黄素甲醚(0.046 mg/g);离心沉积物中黄连碱、小檗碱含量分别为离心上清液的 4.13、3.44 倍,离心上清液中黄芩苷、汉黄芩苷、芦荟大黄素含量分别为离心沉积物的 2.04、2.76、1.33 倍;煎煮过程中,自浸泡结束起,汤剂、离心上清液、离心沉积物中均含有 13 种指标成分,自加热沸腾起,除黄芩苷、汉黄芩苷、芦荟大黄素外,离心沉积物中其余 10 个指标成分含量均明显高于离心上清液。结论 所建方法合理可行,可用于 SXD 样品中 13 种指标成分的含量测定,诠释了《金匮要略》对 SXD 有“以水三升,煮取一升,顿服之”的科学内涵,为揭示 SXD 复合分散体系的制剂特征提供了依据。

关键词:三黄泻心汤; HPLC; 煎煮过程; 沉积物; 上清液; 表小檗碱; 黄连碱; 巴马汀; 小檗碱; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 大黄酸; 芦荟大黄素; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)09-2659-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.008

Study on dynamic variation and distribution rules of thirteen components during decocting process of Sanhuang Xiexin Decoction

WU Xue-yuan^{1,2}, FANG Chun-lin², LI Wen¹, ZENG You-qin³, FU Shu¹, LI Rui¹, ZHANG Jin-ming¹, FU Chao-mei¹, WANG Feng⁴

1. State Key Laboratory of Characteristic Chinese Drug Resources in Southwest China, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China

3. College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

4. Sichuan Quantaitang Chinese Herbal Pieces Co., Ltd., Suining 629000, China

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of thirteen components (epiberberine, coptisine, palmatine, berberine, baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, rhein, aloe-emodin, emodin, chrysophanol, and physcion), and exploring the dynamic variation and distribution rules of components during decocting process in a classical prescription named Sanhuang Xiexin Decoction (SXD, 三黄泻心汤), to reveal the preparation characteristics in the composite and dispersive system of

收稿日期: 2021-11-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81903812)

作者简介: 吴学渊, 博士研究生, 主要从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: 67116042@qq.com

*通信作者: 李文, 博士, 副教授, 主要从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: wander1210@sina.cn

傅超美, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: chaomeifu@126.com

SXD. Methods The decoction was prepared according to the traditional decocting method of SXD, the simultaneous determination method of 13 index components was established to detect the contents of components in the whole decoction, centrifugal supernatant and centrifugal sediment, respectively. Furthermore, the samples after soaking, boiling and decocting for different times were prepared for determination, the figure of the dynamic variation and distribution rules of thirteen components during decocting of SXD were drawn, and the content change of components in decoction, centrifugal supernatant and centrifugal sediment was analyzed, respectively.

Results The content of baicalin (15.496 mg/g) in SXD was the highest, followed by the content of berberine (3.048 mg/g). The content of emodin methyl ether (0.046 mg/g) was the lowest. The contents of coptisine and berberine in centrifugal sediment were 4.13 and 3.44 times higher than those in centrifugal supernatant, and the contents of baicalin, wogonoside, aloe emodin in centrifugal supernatant were 2.04, 2.76 and 1.33 times higher than those in centrifugal sediment. Thirteen index components were all distributed in decoction, centrifugal supernatant and centrifugal sediment since after soaking. However, the contents of ten index components in centrifugal sediment were significantly higher than those in centrifugal supernatant except baicalin, wogonin and aloe emodin since boiling during decocting process. **Conclusion** The established method for simultaneous determination of thirteen components in SXD sample is reasonable and feasible. This study explained the scientific connotation of the application and dosage of SXD in *Synopsis of Prescriptions of the Golden Chamber*, which recorded that “Add three liters of water, decoct to a liter of decoction and take it quickly at one time”. Moreover, this study provided a basis for revealing the preparation characteristics in the composite and dispersive characteristic system of SXD.

Key words: Sanhuang Xiexin Decoction; HPLC; decocting process; sediment; supernatant; epiberberine; coptisine; palmatine; berberine; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin; rhein; aloe-emodin; emodin; chrysophanol; physcion

三黄泻心汤 (Sanhuang Xiexin Decoction, SXD) 全方由大黄、黄连、黄芩 3 味药材组成, 首载于张仲景所著《金匱要略》, 为中医临床治疗火热壅盛、吐衄之经方, 疗效显著^[1]。现代研究表明, 该方具有抗菌^[2]、抗炎^[3]、保护胃黏膜^[4]、降血糖^[5]、免疫调节^[6]等多种药理作用, 主要药效活性成分包括生物碱类、黄酮类、蒽醌类化合物及衍生物, 如小檗碱、表小檗碱、巴马汀、黄芩苷、黄芩素、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷等^[7-9]。

汤剂是我国中医临床应用最广泛的剂型, 其外观似混悬剂, 实系液体复合分散体系, 药物以离子、分子、液滴、不溶性固体微粒等多种形式存在于汤液中^[10], 通过群药合煎, 可达到增效、减毒和扩大临床应用范围等目的。汤剂内部分子之间存在化学键或非化学键相互作用, 如氢键和范德华力, 可使分子间相互结合形成“分子聚集体”, 包括单分子自身聚集、不同单分子之间的聚集、单分子与初级代谢物之间的聚集等, 这些分子聚集体的形成会影响中药成分的吸收和代谢, 进一步影响药物疗效的发挥^[11-13]。课题组前期研究发现, SXD 汤剂外观为均匀的棕黄色混悬液, 而大黄、黄芩、黄连单煎液均为澄明状溶液, 将其两两混合或全部混合后, 混合液同样变浑浊或产生沉淀, 表明 SXD 中成分之间会发生相互作用而形成聚集体, 导致汤剂呈混悬状或产生沉淀析出, 因此, SXD 汤剂可能为溶液、胶体和混悬液共存的复合分散体系。

目前对 SXD 的研究大多集中在汤剂化学成分、药理作用等方面, 对汤剂中分子聚集体或不溶性沉淀的关注还很少, 有文献对 SXD 的煎煮工艺、化学成分检测等进行了研究^[14-18], 但普遍存在工艺参数与古方差异大、指标成分少、色谱条件复杂、色谱技术要求高等不足, 不利于科学、快速、简便地控制 SXD 质量及评价汤剂制剂特征。本实验通过建立 SXD 汤剂、离心上清液和离心沉积物中 13 种指标成分含量的同时测定方法, 并对汤剂煎煮过程中各指标成分动态变化和分布规律进行研究, 为进一步揭示 SXD 复合分散体系的制剂特征与药效机制深入研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪, 包括 LC-20 AT 四元梯度泵、SIL-20AHT 进样器、CTO-20A 柱温箱、SPD-M20A 检测器和 Labsolutions 色谱数据系统, 日本 Shimadzu 公司; CPA225D 型十万分之一电子分析天平、Acculab ALC-210 型万分之一电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; HC-3018R 型高速冷冻离心机, 科大创新股份有限公司中佳分公司; KQ5200DE 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 2000 mL 调温电热套, 北京中兴伟业仪器有限公司。

1.2 药品与试剂

对照品小檗碱(批号 wkq20032408)、黄连碱(批

号 wkq20021306)、表小檗碱(批号 wkq20031807)、巴马汀(批号 wkq20051201)、芦荟大黄素(批号 wkq20032708)、黄芩苷(批号 wkq20010908)、汉黄芩苷(批号 wkq20040108)、汉黄芩素(批号 20030204)、黄芩素(批号 wkq20022608)、大黄酸(批号 wkq20052209)、大黄素(批号 wkq20041308)、大黄酚(批号 wkq20081705)、大黄素甲醚(批号 wkq20040101), 质量分数均 $\geq 98\%$, 购于四川省维克奇生物科技有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯, 购于 Fisher 公司; 甲酸、氨水等其他试剂均为分析纯, 购于成都市科隆化学品有限公司; 水为超纯水。

1.3 药材

黄连饮片(产地四川, 批号 2005052)、黄芩饮片(产地山西, 批号 2006079)、大黄饮片(产地四川, 批号 1912062), 均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司, 经成都中医药大学中药鉴定专业裴瑾教授鉴定, 黄连为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 大黄为蓼科大黄属植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎, 经检验均符合《中国药典》2020 年版一部相关标准规定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Thermo Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相乙腈-(0.5%甲酸-0.2%氨水)水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 18%~25%乙腈; 10~16 min, 25%乙腈; 16~20 min, 25%~27%乙腈; 20~27 min, 27%~31%乙腈; 27~60 min, 31%~80%乙腈; 60~65 min, 80%乙腈; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L; 检测波长为 254 nm。

2.2 混合对照品溶液的配制

分别精密称取对照品表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚适量, 置同一量瓶中, 加甲醇制成质量浓度分别为 96.04、70.56、279.30、248.92、773.22、285.18、88.20、72.52、102.90、79.38、51.94、82.32、49.00 μ g/mL 的混合对照品溶液, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 SXD 传统汤剂的制备 取大黄 30 g, 黄连、

黄芩饮片各 15 g, 置 2000 mL 烧瓶中, 加 10 倍量超纯水, 浸泡 30 min, 大火煮沸(加热功率约 500 W), 保持微沸 40 min(加热功率约 230 W), 煎液用 300 目滤布滤过, 测量体积, 备用。

2.3.2 汤剂上清液和沉积物的离心分离 精密量取“2.3.1”项下制备的煎液 8.0 mL, 置于 10 mL 离心管中, 在 14 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心(离心半径 8.3 cm)处理 10 min, 取上清液和沉积物, 备用。SXD 煎液离心前后的对比照片见图 1。

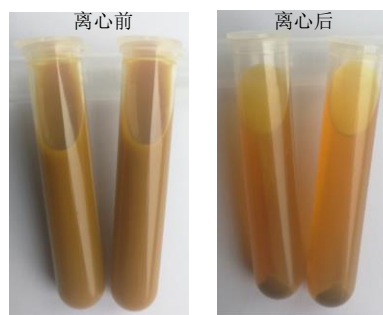


图 1 离心前和离心后的 SXD 煎液

Fig. 1 SXD before and after centrifugation

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取“2.3.1”项下制备的煎液 8.0 mL, 置蒸发皿中, 70 $^{\circ}$ C 水浴蒸干, 残渣加 80%甲醇溶解, 转移至 50 mL 量瓶中, 加 80%甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 取续滤液, 即得汤剂供试品溶液; 取“2.3.2”项下制备的上清液和沉积物, 置蒸发皿中, 其余操作同上, 分别制备离心上清液、离心沉积物供试品溶液。

2.4 阴性汤剂样品溶液的制备

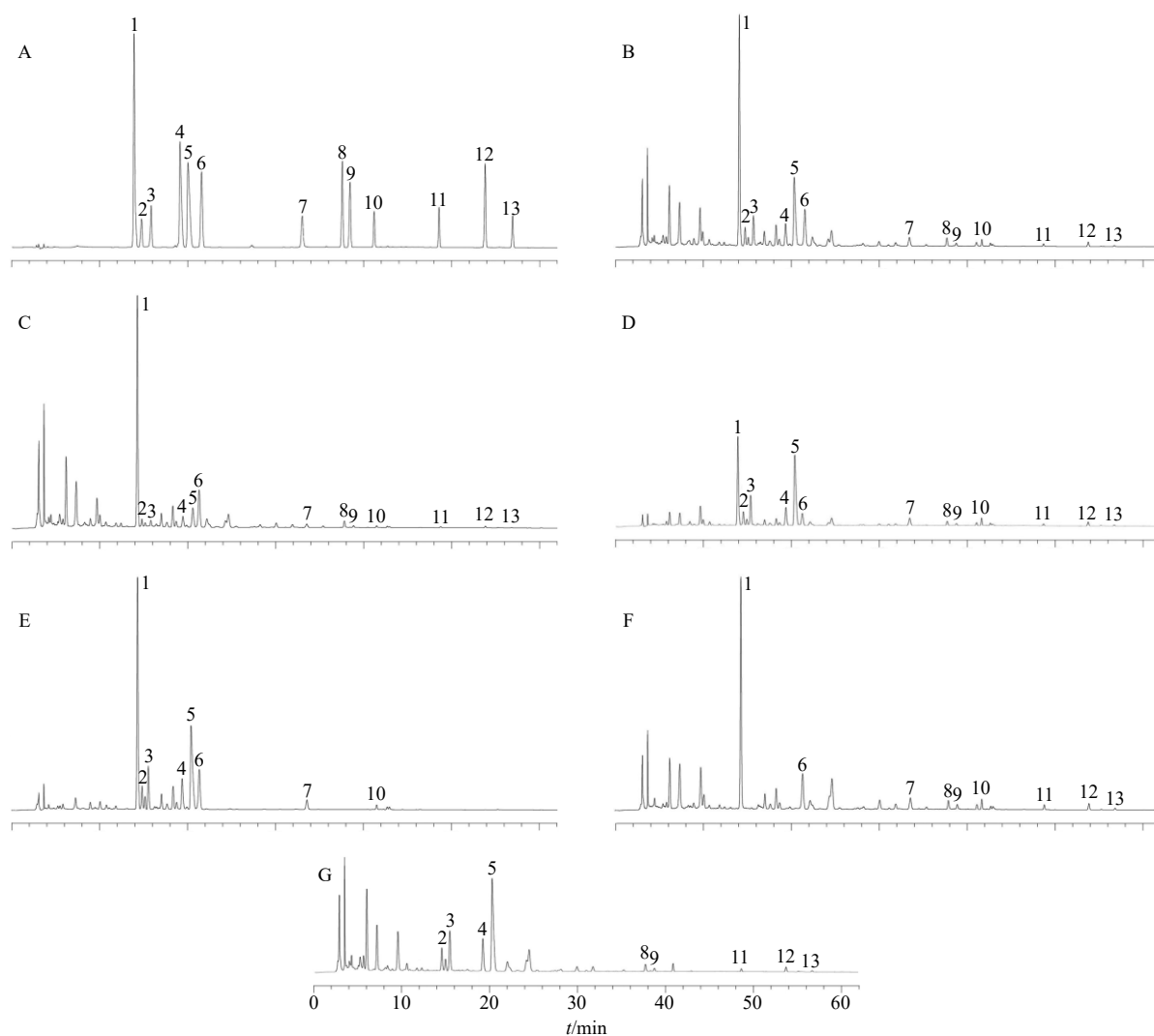
按照“2.3”项下供试品溶液制备方法, 分别制备缺大黄、黄连、黄芩的阴性汤剂样品溶液。

2.5 系统适应性试验

按照“2.1”项下色谱条件测定混合对照品溶液、供试品溶液和阴性汤剂样品溶液, 结果表明, 样品中各成分均能达到基线分离, 13 种指标成分的理论塔板数均大于 5000, 各成分与其他成分之间的分离度均大于 1.5, 且阴性无干扰, 混合对照品溶液、供试品溶液及阴性汤剂样品溶液的色谱图见图 2。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系考察 取“2.2”项下混合对照品溶液, 分别稀释 2、4、8、16、32 倍, 制成系列质量浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。以色谱峰峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归, 得各成分的线性回归方程分别为表小檗碱 $Y=34\ 610.947\ 5\ X+2\ 043.008\ 2$, $R^2=0.999\ 9$,



1-黄芩苷 2-表小檗碱 3-黄连碱 4-巴马汀 5-小檗碱 6-汉黄芩苷 7-黄芩素 8-大黄酸 9-芦荟大黄素 10-汉黄芩素 11-大黄素 12-大黄酚 13-大黄素甲醚
 1-baicalin 2-epiberberine 3-coptisine 4-palmatine 5-berberine 6-wogonoside 7-baicalein 8-rhein 9-aloe-emodin 10-wogonin 11-emodin 12-mchrysophanol 13-mphyscion

图 2 混合对照品 (A)、SXD 汤剂样品 (B)、离心上清液样品 (C)、离心沉积物样品 (D)、缺大黄阴性汤剂样品 (E)、缺黄连阴性汤剂样品 (F)、缺黄芩阴性汤剂样品 (G) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substance (A), SXD sample (B), centrifuged supernatant sample (C), centrifuged sediment sample (D), negative sample without *Rhei Radix et Rhizoma* (E), negative sample without *Coptidis Rhizoma* (F), and negative sample without *Scutellariae Radix* (G)

线性范围 3.00~96.04 $\mu\text{g/mL}$; 黄连碱 $Y=44\ 176.910 X-25\ 640.059$, $R^2=0.999\ 7$, 线性范围 2.21~70.56 $\mu\text{g/mL}$; 巴马汀 $Y=36\ 107.934 X+2\ 047.082$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 8.73~279.30 $\mu\text{g/mL}$; 小檗碱 $Y=44\ 954.718 X+39\ 590.547$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 7.78~248.92 $\mu\text{g/mL}$; 黄芩苷 $Y=21\ 580.550 X+90\ 080.962$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 24.16~773.22 $\mu\text{g/mL}$; 汉黄芩苷 $Y=12\ 909.490 X+5\ 276.650$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 8.91~285.18 $\mu\text{g/mL}$; 黄芩素

$Y=33\ 591.192 X-14\ 683.909$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 2.76~88.20 $\mu\text{g/mL}$; 汉黄芩素 $Y=16\ 334.063 X+1\ 061.407$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 2.27~72.52 $\mu\text{g/mL}$; 大黄酸 $Y=46\ 854.282 X+2\ 690.832$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 3.22~102.90 $\mu\text{g/mL}$; 芦荟大黄素 $Y=49\ 274.461 X+17\ 680.212$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 2.48~79.38 $\mu\text{g/mL}$; 大黄素 $Y=36\ 531.385 X-1\ 996.734$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 1.62~51.94 $\mu\text{g/mL}$; 大黄酚 $Y=55\ 732.931 X+9\ 320.310$, $R^2=$

0.999 9, 线性范围 2.57~82.32 μg/mL; 大黄素甲醚 $Y=34\ 887.855 X+6\ 270.611$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 1.53~49.00 μg/mL; 表明各成分在测定范围内线性关系良好。

2.6.2 精密度试验 取“2.2”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算各成分峰面积的 RSD。结果表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.38%、0.47%、0.37%、0.41%、0.43%、0.57%、0.40%、0.41%、0.34%、0.59%、0.60%、0.35%、0.66%, 表明该仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 按“2.3”项下供试品溶液制备方法, 分别平行制备汤剂、离心上清液、离心沉积物供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算各成分含量。结果汤剂供试品溶液中表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的 RSD 分别为 1.20%、1.06%、1.23%、0.81%、1.50%、0.81%、1.72%、0.72%、1.56%、1.76%、1.03%、0.75%、0.98%, 离心上清液供试品溶液中 13 种成分的 RSD 分别为 1.83%、1.72%、1.31%、1.51%、1.22%、1.83%、1.77%、1.75%、1.29%、1.89%、1.16%、1.59%、1.98%, 离心沉积物供试品溶液中 13 种成分的 RSD 分别为 1.96%、1.45%、1.59%、0.99%、1.59%、1.29%、1.49%、1.28%、1.59%、1.46%、1.58%、1.71%、1.48%, 表明该方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 按“2.3”项下供试品溶液制备方法, 制备汤剂供试品溶液, 室温放置, 按“2.1”

项下色谱条件, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 计算各成分峰面积的 RSD。结果表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.61%、0.66%、0.97%、1.29%、1.06%、0.55%、0.89%、0.87%、0.79%、0.75%、0.63%、0.48%、0.51%, 表明该供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.6.5 加样回收率试验 精密量取已知含量的大黄泻心汤煎液 6 份, 每份 4.0 mL, 置蒸发皿中, 精密加入各对照品溶液适量, 按“2.3”项下供试品溶液制备方法制备汤剂供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算各指标成分的回收率和 RSD。结果表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均加样回收率分别为 99.6%、99.0%、101.9%、101.2%、101.8%、99.7%、101.4%、100.4%、99.7%、100.9%、98.1%、99.4%、99.8%, RSD 分别为 1.42%、1.39%、1.75%、1.35%、1.58%、1.91%、1.21%、1.87%、1.35%、1.65%、1.18%、1.18%、1.97%, 表明该方法准确可靠。

2.7 传统汤剂样品测定

分别取大黄、黄连、黄芩饮片 6 份, 按“2.3”项下供试品溶液制备方法, 分别平行制备 SXD 汤剂、离心上清液、离心沉积物供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 采用外标法计算各成分含量, 结果见表 1。结果表明, SXD 汤剂中含量最高的指标成分为黄芩苷 (15.496 mg/g), 其次为小檗碱 (3.048 mg/g), 含量最低的指标成分为大黄素甲醚

表 1 SXD 样品中 13 种成分含量测定结果 (n = 6)
Table 1 Determination results of 13 components in SXD samples (n = 6)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素
汤剂	0.422±0.010	0.836±0.030	0.854±0.029	3.048±0.110	15.496±0.524	2.652±0.084	0.626±0.024
离心上清液	0.151±0.010	0.169±0.008	0.357±0.013	0.693±0.023	9.523±0.259	2.001±0.087	0.171±0.007
离心沉积物	0.271±0.009	0.698±0.022	0.557±0.015	2.386±0.089	4.668±0.113	0.726±0.018	0.416±0.018
样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	汉黄芩素	大黄酸	芦荟大黄素	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	
汤剂	0.222±0.013	0.051±0.003	0.161±0.008	0.053±0.002	0.062±0.002	0.046±0.004	
离心上清液	0.081±0.007	0.020±0.002	0.093±0.005	0.016±0.001	0.016±0.001	0.012±0.001	
离心沉积物	0.134±0.008	0.031±0.002	0.070±0.003	0.033±0.002	0.043±0.001	0.032±0.002	

(0.046 mg/g), 汤剂离心上清液和离心沉积物中均含有大量指标成分。黄芩苷、汉黄芩苷、芦荟大黄素 3 个成分主要分布在离心上清液中, 分别为离心沉积物含量的 2.04、2.76、1.33 倍, 而其余 10 个指标成分在离心沉积物中的含量均明显高于离心上清液, 其中黄连碱、小檗碱含量分别为离心上清液的 4.13、3.44 倍。

2.8 煎煮过程样品测定

分别取大黄 30 g、黄连、黄芩饮片各 15 g, 共 11 份, 按“2.3.1”项下 SXD 传统汤剂的制备方法, 分别于浸泡结束、刚沸腾以及保持微沸的第 2.5、5、10、15、20、25、30、40、50 min 倒出煎液, 用 300 目滤布滤过, 分别测量体积, 备用。按“2.3.2”及“2.3.3”项下方法, 分别取样制备各时间点 SXD 汤剂、离心上清液及离心沉积物供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 采用外标法计算各成分含量, 绘制 SXD 煎煮过程中 13 种指标成分动态变化和分布规律图, 结果见图 3。

成分动态变化研究结果表明, SXD 煎煮过程中, 各指标成分溶出较快, 自浸泡结束起, SXD 汤剂、离心上清液、离心沉积物中均含有 13 种指标成分; 加热沸腾后, 汤剂中 13 种成分即可达各自最大煎出量的 46.6%~89.6%, 离心沉积物中 13 种指标成分可达各自最大离心沉积物质量分数的 47.9%~79.0%, 离心上清液中 13 种指标成分可达各自最大离心上清液质量分数的 45.3%~92.7%, 之后缓慢增加, 各样品中指标成分达到最大含量的煎煮时间约为 25~30 min, 煎煮时间超过 30 min 后, 汤剂、离心沉积物和离心上清液中黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类成分含量显著下降, 可能与该类成分长时间加热水解破坏有关, 而其他成分含量则趋于稳定或缓慢下降。

成分动态分布研究结果表明, 自加热沸腾起, 离心上清液中黄芩苷、汉黄芩苷、芦荟大黄素含量均高于离心沉积物, 其中黄芩苷、汉黄芩苷煎煮过程中平均含量可达离心沉积物的 2 倍以上, 而离心沉积物中其余 10 个指标成分含量均高于离心上清液, 以小檗碱、小檗碱、黄连碱、黄芩素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚尤为显著, 其中黄连碱、小檗碱煎煮过程中平均含量可达离心上清液的 3 倍以上; 13 种指标成分在离心上清液和离心沉积物中的大量分布, 提示 SXD 有效成分自浸泡开始便可能以离子、分子、不溶性微粒等多种形式分布于汤

剂中; 同时发现, 刚沸腾至保持微沸 2.5 min 时间段样品中部分成分含量存在短暂下降趋势, 可能与刚沸腾时各成分间发生了较为剧烈的相互作用有关。

3 讨论

3.1 样品处理方法

实验前期, 分别考察了 SXD 煎液在不同离心转速 (4000、8000、14 000 r/min) 和离心时间 (10、20、30 min) 条件下离心上清液和离心沉积物中 13 种指标成分的含量差异, 结果表明, 各指标成分含量差异不显著, 但当离心转速为 4000 r/min 时, 得到的沉积物较为松散, 不利于上清液和沉积物的分离处理, 同时还比较了 70 °C 水浴蒸干和冷冻干燥 2 种方法对样品中各指标成分含量的影响, 结果表明, 2 种方法制备的样品中各指标成分含量无显著差异, 因此, 为保证样品的均一性, 提高分析效率, 确定了供试品溶液的制备方法。

3.2 色谱条件筛选和优化

实验前期, 比较了不同厂家 (Agilent、Thermo Fisher、Shimadzu) 色谱柱的分离效果, 对不同流动相 [乙腈-0.3%甲酸水溶液、乙腈-0.5%乙酸铵水溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-(0.5%甲酸-0.2%氨水) 水溶液]、不同梯度洗脱条件、不同柱温 (25、30、35 °C) 等进行了研究, 并采用二极管阵列检测器对供试品溶液进行了全波长扫描, 比较了不同波长 (254、316、345 nm) 条件下色谱图的峰面积与分离度情况, 确定采用 254 nm 作为检测波长, 最终确立了本实验的色谱条件^[14-16,19-20], 可对样品中 13 种指标成分同时进行测定, 有利于降低检测成本和提高检测效率。

3.3 SXD 传统汤剂的最佳煎煮时间和服用方法

中国古代汤剂制法考究, 工艺严谨, 对加水量、煎煮程度均有相关规定和要求^[21], 《金匱要略》对 SXD 要求“大黄二两, 黄连、黄芩各一两, 右三味, 以水三升, 煮取一升”^[1]。本实验遵循古今计量单位换算规则, 并考虑到方便实验研究和数据处理原则, 将处方定为大黄 30 g、黄芩 15 g、黄连 15 g, 加水量定为 600 mL; 同时, 考虑到传统复方汤剂多采用敞口砂锅进行煎煮, 煎煮过程中溶剂挥发较多, 为煎煮和浓缩同步进行的过程, 为尽量保证煎煮条件的一致性, 本实验采用电热套配套敞口烧瓶进行煎煮, 以充分模拟传统汤剂的煎煮过程; 预实验结果表明, 当浸泡时间为 30 min, 煎煮时间为 40 min 时, 滤液体积约为 200 mL, 与古方要求基本一致, 故将

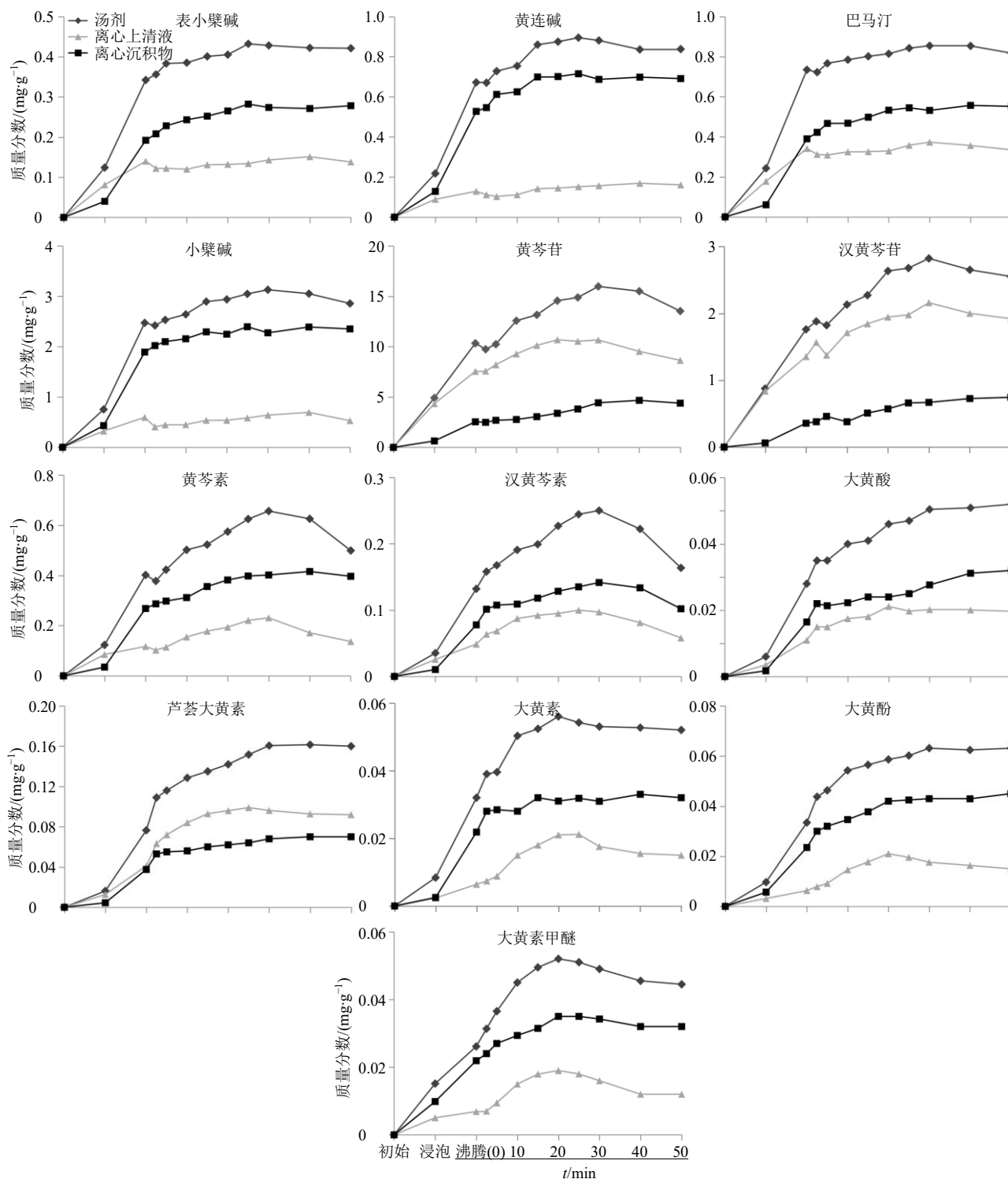


图3 SXD 煎煮过程中 13 种指标成分动态变化和分布规律 (n = 6)

Fig. 3 Dynamic variation and distribution rules of 13 components during decocting process of SXD (n = 6)

该煎煮工艺得到的汤剂作为 SXD 传统汤剂样品开展多成分定量分析方法学研究。

SXD 煎煮过程中 13 种指标成分动态变化研究表明, 各指标成分达到最大煎出量的煎煮时间约为 25~30 min, 继续增加煎煮时间对有效成分的

提取无益, 反而导致汤剂中黄芩苷、黄芩素等黄酮类成分含量下降, 可能与该类成分长时间加热水解破坏, 或因煎液体积大量减少致药渣吸附量增大有关, 该煎煮时间与模拟古方的煎煮时间并不完全一致, 可能与煎药器具、煎煮温度、煎煮环境等因素

有关。因此,为保证处方的临床疗效,综合考虑其它影响因素,建议SXD的煎煮时间为25~30 min。

此外,中药汤剂在临床中多为煎煮后直接服用,《金匱要略》对SXD也要求“顿服之”^[1],《简明中医辞典》谓“顿服”是指“一次性较快地将药物服完”,《伤寒论》泻心汤类方也有“温服”要求^[22]。研究结果表明,从性状上观察,SXD煎液为棕黄色混悬液,静置24 h后会产生少量沉淀,离心处理后会大量沉积物,从多成分定量分析结果来看,整个煎煮过程中,离心沉积物中包含大量有效成分,表明离心沉积物为汤液的重要组成部分,也是汤剂发挥药效的重要物质基础。因此,本研究证实了《金匱要略》中SXD煎煮和服用方法的科学性和合理性,有利于充分发挥处方的临床疗效。

3.4 SXD复合分散体系的形成机制和制剂特征

中药复方中化学成分类别多而复杂,中药汤剂中的分子聚集或沉淀蕴含着中药复方配伍理论的科学内涵;SXD处方由大黄、黄连、黄芩组成,主要含生物碱类、黄酮类、蒽醌类及衍生物、鞣质等化学成分,酸、碱类成分之间可发生络合反应;有研究表明,大黄酸和小檗碱在煎煮条件下可形成难溶性大分子复合物^[23],黄芩苷和小檗碱在80℃、煮沸条件下均会产生不溶性沉淀,且沉淀量与成分比例、加热温度和pH值等因素相关^[24]。本研究结果表明,SXD煎液为离子、分子、固体微粒等共存的复合分散体系,SXD煎煮过程中,自加热沸腾起,汤剂离心后会产生沉积物,且沉积物中大量存在表小檗碱、小檗碱、黄芩苷、汉黄芩苷、大黄酸、大黄酚等化学成分,证明各成分之间可能发生了复杂的酸碱络合反应,进一步形成微粒而离心析出,且离心沉积物与离心上清液中的指标成分分布呈动态平衡,各成分含量随煎煮时间的延长而不断增加,至煎煮25~30 min时基本达到稳定。

同时,实验前期还考察了SXD传统汤剂在不同温度(5、25、45℃)条件下放置不同时间(0、3、6、9、12、18、24、36、48 h)后13种指标成分在离心沉积物和离心上清液中的分布差异,结果表明,汤剂在5℃放置6 h以上,离心沉积物中部分指标成分含量与放置前相比有一定增加,但差异不显著,可能为低温条件下部分成分溶解度降低析出所致,而在其余温度和时间条件下放置后,各成分分布与放置前相比均无显著差异,进一步地表明SXD离心沉积物主要形成于煎煮过程中,而非因放置环

境、放置时间等因素变化而析出,稳定贮存条件下,离心上清液和离心沉积物中各成分分布处于相对平衡和稳定状态。

本实验重点对SXD煎煮过程中主要指标成分动态变化和分布规律进行了研究,有关药效成分在SXD煎液中的存在形式、分布特点以及分子聚集或沉淀的形成机制,值得进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 范永升. 金匱要略 [M]. 第2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 240.
- [2] 孙涛, 张洪峰, 刘璐. 三黄泻心汤不同提取溶媒抑菌活性研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2015, 15(6): 711-713.
- [3] 马秉亮, 马越鸣, 严东明, 等. 泻心汤不同配伍抗炎作用比较研究 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1690-1693.
- [4] 岳丽军, 刘畅, 张华军, 等. 三黄泻心汤治疗上消化道出血疗效及对患者血红蛋白、尿素氮、Rockall评分的影响 [J]. 陕西中医, 2021, 42(5): 594-596.
- [5] 吴家胜, 陆雄, 马越鸣, 等. 泻心汤对糖尿病大鼠早期肾病的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 73-77.
- [6] Li C Y, Hou Y C, Chao P D L, et al. Potential *ex vivo* immunomodulatory effects of San-Huang-Xie-Xin-Tang and its component herbs on mice and humans [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(2): 292-298.
- [7] 刘晶晶, 张贵君, 彭慧, 等. 三黄泻心汤药效组分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 103-108.
- [8] 姚佳琪, 肖永庆, 刘颖, 等. 三黄泻心汤水、醇提取物抗炎作用比较及有效提取物的成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13): 31-35.
- [9] 戴莹, 施凯, 窦志华, 等. 大黄标准汤剂量值传递规律研究 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 2938-2950.
- [10] 杨明. 中药药剂学 [M]. 第3版. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 121.
- [11] Hu J, Wu Z S, Yan J J, et al. A promising approach for understanding the mechanism of traditional Chinese medicine by the aggregation morphology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 123(2): 267-274.
- [12] Su B L, Kan Y J, Xie J W, et al. Relevance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of *Puerariae Lobatae Radix* to aggregation of multi-component molecules in aqueous decoctions [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 845.
- [13] Zhuang Y, Yan J J, Zhu W, et al. Can the aggregation be a new approach for understanding the mechanism of traditional Chinese medicine? [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 378-384.
- [14] 水栋, 王宇卿, 耿榕徽. 高效液相色谱法测定三黄泻心汤中13个有效成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(21): 2235-2239.

- [15] Zhang Q, Wang C H, Ma Y M, *et al.* UPLC-ESI/MS determination of 17 active constituents in two categorized formulas of traditional Chinese medicine, Sanhuang Xiexin Tang and Fuzi Xiexin Tang: Application in comparing the differences in decoctions and macerations [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(8): 1079-1088.
- [16] Li S L, Song J Z, Qiao C F, *et al.* UPLC-PDA-TOFMS based chemical profiling approach to rapidly evaluate chemical consistency between traditional and dispensing granule decoctions of traditional medicine combinatorial formulae [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(4): 468-478.
- [17] 李智勇, 陈雪婷, 王洛临, 等. 三黄泻心汤配方颗粒和标准煎剂中主要有效组分含量对比研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(4): 79-81.
- [18] 傅丹青, 徐莉, 葛尔宁, 等. 三黄泻心汤主要有效成分溶出规律研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10): 16-19.
- [19] 刘磊, 陈婷, 成旭东, 等. HPLC-DAD 法同时测定三黄洗剂中 5 种成分的含量 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(12): 25-28.
- [20] Wu T Y, Chang F R, Liou J R, *et al.* Rapid HPLC quantification approach for detection of active constituents in modern combinatorial formula, San- Huang-Xie-Xin-Tang (SHXXT) [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 374.
- [21] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.
- [22] 汪晓奕, 王骞. 泻心汤类方方证浅析 [J]. 成都中医药大学学报, 2015, 38(3): 102-104.
- [23] 裴妙荣, 宣春生, 段秀俊, 等. 酸碱对药所含碱性成分共煎形成复合物的结构研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3054-3059.
- [24] 雷艳丽, 孙磊, 隋宏, 等. 黄芩苷-小檗碱复合物的形成规律 [J]. 中成药, 2018, 40(3): 577-582.
- [责任编辑 郑礼胜]

• 公益广告 •

<p>戴口罩</p>  <p>非人流密集、不通风场所 普通口罩足矣</p>	<p>勤洗手</p>  <p>使用香皂或洗手液, 流动水洗手</p>	<p>重消毒</p>  <p>使用时忌明火; 84消毒液也可, 注意不得与洁厕灵、洗衣液同用</p>
<p>不乱摸</p>  <p>不洗手不可随意触摸 眼, 口, 鼻</p>	<p>掩飞沫</p>  <p>咳嗽、喷嚏时用手肘或纸巾遮挡</p>	<p>不聚集</p>  <p>莫挨老子 越远越好</p> <p>对自己和家人负责 为国家做贡献, 你我共同的责任</p>
<p>多科普</p>  <p>如今我们尚有能力自保 但我们都有老去的一天</p>	<p>存敬畏</p>  <p>地球是不需要人类保护的 人类只是在自救罢了</p>	<p>善为本</p>  <p>要做完全正确的事很难, 但善良 仍然是照亮黑暗里的一束光</p>