



黄连解毒汤提取动态过程及沉淀产生机制的初步研究

潘林梅, 傅佳, 朱华旭, 郭立玮*

(南京中医药大学 中药复方分离重点实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:运用统计学方法,初步探讨黄连解毒汤提取动态过程中“沉淀物”的产生及机制。方法:采用 UV 测定其中总生物碱、总黄酮的量, HPLC 同时测定小檗碱、药根碱、巴马汀、黄芩苷、栀子苷的量并计算固含率,沉淀率。采用 SPSS 统计软件评价各指标性成分、沉淀率、固含率之间的相关性。结果:总生物碱中的小檗碱等的量均与总生物碱呈较好的相关性。总黄酮中黄芩苷与总黄酮的相关系数并不高,而总黄酮与栀子苷的相关系数略高;沉淀率与各指标性成分不显示有极高的相关性。固含率与各指标性成分的相关系数相对较大。结论:随提取时间的变化,提取液中以小檗碱为代表的总生物碱及黄芩苷等达到一定浓度后可视为一平衡点或称为沉淀生成的临界点,即可发生反应,生成“沉淀物”;由于“沉淀物”的生成,降低了上述成分浓度,破坏了“平衡状态”。药材中相关成分溶出速度增加,同时沉淀物可能部分溶解,达到新的平衡状态。

[关键词] 黄连解毒汤;提取;动态过程;沉淀机制

黄连解毒汤是一经典名方,载于《外台秘要》。该方是清热解毒的代表方,由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 种中药组成,具有多种药理作用。方中主要成分包括生物碱类、黄酮类、环烯醚萜苷类等,共煎时会产生沉淀^[1-3]。本实验对黄连解毒汤提取过程中产生沉淀的现象进行深入探讨,研究随提取时间的变化,各指标性成分的溶出与其沉淀产生的相关性,从而可以根据提取目标的要求,建立各相关指标性成分溶出的拟合方程,针对性地对复方提取过程中的时间加以控制,为复方提取动态过程进行在线监控。

1 材料

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Agilent 1100 型,安捷伦公司)。紫外-可见分光光度计(Spectrum 754 型,上海分析仪器厂)。

乙腈、甲醇为色谱纯(江苏汉邦公司);水为亚沸蒸馏水;其余试剂均为分析纯。盐酸小檗碱(批

号 110713-200208),巴马汀(批号 0732-200005),药根碱(批号 0733-200005),黄芩苷(批号 110715-200212),栀子苷(批号 110749-200511),芦丁(批号 100080-200306),以上对照品购自中国药品生物制品检定所。

1.2 药材

黄连、黄柏、黄芩、栀子,购于南京市药材公司,经南京中医药大学吴启南教授鉴定符合 2005 年版《中国药典》规定。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 指标性成分的测定方法 采用 UV 测定总生物碱、总黄酮的量,采用 HPLC 同时测定小檗碱、药根碱、巴马汀、黄芩苷、栀子苷的量。

色谱条件的选择:综合考虑各指标性成分的性质,采用乙腈-0.05% 三乙胺水溶液(磷酸调 pH 3.1),梯度洗脱的方法对以上 5 种成分同时进行测定。Li-chrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,进样量 10 μL,检测波长 238, 256, 280 nm。

2.1.2 固含率,沉淀率的测定 以药典法测定复方各提取液的固含率。沉淀率的测定参照 2005 年版《中国药典》固含率的测定方法,将各提取样品液冷却至 25 °C,过滤,得沉淀,水浴蒸干,转移至 60 °C, -0.1 MPa 真空干燥箱,干燥至恒重,计算,即得沉淀率。

[收稿日期] 2009-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873450);江苏省教育厅自然科学基金项目(07KJB360087)

[通信作者] *郭立玮,研究员,博导,主要从事中药制备高新技术及原理研究, Tel: (025) 86798188, E-mail: guoliwei815@yahoo.com.cn

[作者简介] 潘林梅,副研究员,主要从事中药制备高新技术与生物药剂学的研究, Tel: (025) 86798188, E-mail: linmeip@yahoo.com.cn



2.2 复方提取过程指标性成分溶出动态变化的研究

2.2.1 样品制备 称取黄连 9 g、黄芩 6 g、黄柏 6 g、栀子 9 g, 以上药材 12 份分别加水 300 mL, 煎煮 10, 20, 30, 40, 50……120 min, 滤过, 得提取液, 其中 200 mL 减压干燥得动态变化样品 1~12 号。

表 1 黄连解毒汤提取动态过程中各指标性成分质量分数及沉淀率、固含率($n=5$)

No.	总生物碱 /mg · g ⁻¹	总黄酮 /mg · g ⁻¹	小檗碱 /mg · g ⁻¹	药根碱 /mg · g ⁻¹	巴马汀 /mg · g ⁻¹	黄芩苷 /mg · g ⁻¹	栀子苷 /mg · g ⁻¹	沉淀率 /%	固含率 /%
1	127.37	11.24	6.33	0.40	1.00	8.60	7.4	3.12	14.22
2	172.56	13.79	8.08	0.55	1.50	9.78	7.36	4.66	16.27
3	184.47	14.66	8.76	0.57	1.49	11.6	7.99	4.76	17.82
4	194.07	14.93	10.06	0.67	1.85	13.4	8.9	5.94	19.24
5	214.75	15.42	11.04	0.69	1.94	14.92	9.85	5.2	20.21
6	241.04	16.04	11.16	0.70	2.10	14.70	9.86	8.90	21.10
7	190.13	18.1	8.98	0.69	1.58	11.39	11.89	4.33	19.67
8	181.80	17.98	9.77	0.65	1.54	11.87	11.26	7.05	19.01
9	196.44	19.54	9.95	0.73	1.54	13.35	9.78	5.27	20.90
10	202.46	15.37	10.18	0.64	1.68	12.92	11.63	3.12	20.94
11	155.66	10.49	8.39	0.57	1.54	10.16	7.43	4.86	16.02
12	225.93	15.13	12.06	0.78	2.16	15.78	12.49	7.13	21.67

2.3 统计处理及相关性分析

针对上述各成分产生的变化, 运用 SPSS 统计软件, 采用曲线拟合法和等级相关来作进一步的统计分析。

2.3.1 各指标性成分随时间变化的折线图 根据上述测定结果对指标性成分量随时间的变化进行直观分析, 总黄酮、小檗碱、黄芩苷与栀子苷均有较显著的经时变化, 药根碱和巴马汀的量相对较小, 变化趋势不明显, 需做进一步分析, 见图 1。

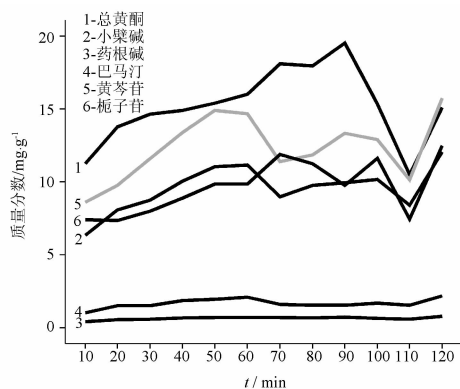


图 1 各指标性成分(不含总生物碱)随时间的变化

依法重复试验 5 次, 对各实验组样品分别进行各指标的测定, 分别取其平均值进行数据拟合研究。

2.2.2 试验结果 根据 2.1 所述测定方法, 对 7 个指标性分别进行测定, 并分别计算各指标性成分的质量分数($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 生药), 同时依法计算固含率及沉淀率, 结果见表 1。

2.3.2 各指标性成分随时间变化的拟合方程 采用 SPSS 软件, 对所测各指标性成分随时间溶出的变化作曲线拟合, 方程中 Y 为指标性成分的质量分数($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 生药), X 为时间(min), 见表 2。

在使用 SPSS 软件作曲线拟合时, 从相关系数来看并不是越大越好, 通常要充分误差的存在, 不能过度拟合, 否则就会使所拟合方程的可靠性不高, 导致预报不好。从表 2 的拟合结果可知, 拟合曲线方程中可以初步估算出各成分随时间溶出的变化, 起到一定的预报作用。

3 讨论

3.1 各指标性成分、沉淀率、固含率之间的相关性分析

3.1.1 各指标性成分的量之间的相关性 等级相关的结果显示, 作为总生物碱组成部分小檗碱、药根碱、巴马汀, 其本身的量均与总生物碱呈较好的相关性, 相关系数分别为 0.958 0, 0.831 6, 0.873 3。而作为总黄酮重要组成成分的黄芩苷与总黄酮的相关系数并不高, 只有 0.475 5, 说明复方中黄酮类的特征性成分还需进一步分析, 而总黄酮与栀子苷成分的溶出量有一定的相关性, 系数为 0.678 3, 提示共



表 2 黄连解毒汤中不同成分动态溶出的拟合方程

指标性成分	拟合方程	R^2	F	P
总生物碱	$Y = 62.179 + 7.270X - 0.11X^2$	0.647	4.887	0.032
总黄酮	$Y = 10.023 + 0.158X - 7.13 \times 10^{-6}X^3$	0.548	3.230	0.082
小檗碱	$Y = 2.883 + 0.365X - 0.006X^2 + 2.60 \times 10^{-5}X^3$	0.736	7.444	0.011
药根碱	$Y = 0.209 + 0.021X + 1.34 \times 10^{-6}X^3$	0.794	10.276	0.004
巴马亭	$Y = 0.206 + 0.088X - 0.001X^2 + 6.88 \times 10^{-6}X^3$	0.788	9.938	0.004
黄芩苷	$Y = 3.312 + 0.516X - 0.008X^2 + 3.77 \times 10^{-5}X^3$	0.496	4.603	0.037
栀子苷	$Y = 5.481 + 0.138X - 0.001X^2 + 3.66 \times 10^{-6}X^3$	0.49	2.565	0.128

煎会有一定程度上的互相促进溶出作用。

总生物碱与黄芩苷的相关系数为 0.916 1, 其中小檗碱与黄芩苷的相关系数最高, 为 0.965, 提示二者在提取液中几乎同步增长, 相互促进溶出或发生反应, 药根碱、巴马汀在提取液中的含量相对较少, 但它们与黄芩苷的相关系数也较大, 分别为 0.838 6, 0.873 3, 而总生物碱与栀子苷的相关系数仅为 0.678 3, 其中小檗碱与栀子苷的相关性远低于小檗碱与黄芩苷的相关性, 仅为 0.734 3, 药根碱、巴马亭与栀子苷的相关系数也只有 0.726 3, 0.704 2。

3.1.2 沉淀率、固含率与指标性分量之间的相关性 沉淀率与总生物碱、总黄酮、小檗碱、药根碱、巴马汀、黄芩苷、栀子苷的相关系数分别为 0.539 4, 0.339 8, 0.637 4, 0.678 4, 0.596 1, 0.714 5, 0.322 2, 并不显示有极高的相关性, 说明复方黄连解毒汤提取过程中, 体系中成分溶出-沉淀-再溶出的复杂性, 且还不能仅以其中的某几个成分来较全面地表达。而固含率因反映的是体系中全部的固体量, 它与各指标性成分、总生物碱、总黄酮、小檗碱、药根碱、巴马汀、黄芩苷、栀子苷的相关系数就相对较大, 分别为 0.958 0, 0.643 4, 0.930 1, 0.866 7, 0.838 0, 0.853 1, 0.797 2, 说明各指标性成分的含量越高, 包含沉淀在内的固体成分就越多。

3.2 黄连解毒汤提取动态过程“沉淀物”产生的初步机制

各成分在提取过程的前 60 min 几乎都呈上升趋势, 即在水提取的第 1 个小时内, 各指标性成分的溶出均不断地上升, 随后 60 min 内, 各指标性成分的量呈现不同的波动情况, 但各成分在 110 min 时

均有一定幅度的明显下降, 可能是处在该时间点时, 体系中不同的成分之间发生了一定的反应, 到 120 min 时又明显上升。由于方中药材所含成分的差异性, 药材中不同成分之间会产生化学反应, 导致体系中会产生沉淀, 随着提取时间的变化, 沉淀产生的量也不尽相同, 沉淀率在 3.12% ~ 8.9%, 60 min 时复方提取液的沉淀率最高, 10, 100 min 时沉淀率最低, 从而揭示体系中沉淀的生成变化是一个动态的过程, 可能存在不同成分的复溶现象。

综上, 黄连解毒汤提取动态过程“沉淀物”产生的机制可初步表述为: ①提取液中以小檗碱为代表的总生物碱及黄芩苷达到一定浓度后可视为一平衡点或称为沉淀生成的临界点, 即可发生反应、生成“沉淀物”。②由于“沉淀物”的生成, 降低了上述成分浓度, 破坏了“平衡状态”。药材中相关成分溶出速度增加, 同时沉淀物可能部分溶解, 达到新的平衡状态。本实验研究及数据拟合尚在逐步完善中, 进行这一探索可针对性地对复方提取过程加以控制, 更好地与下一步的药效研究相结合, 分析制定合理的提取过程, 并实现复方提取动态过程的在线监控。

[参考文献]

[1] 马兆堂, 杨秀伟. 黄连解毒汤醋酸乙酯溶性化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2080.
[1] 袁拯忠, 朱陵群, 庞鹤, 等. 黄连解毒汤有效成分对缺氧/复氧时脑微血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 249.
[2] 孙健, 温庆辉, 李夏, 等. 黄连解毒汤及其含药血清的化学成分及抗肿瘤作用对比研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(18): 152.



Preliminary study to investigate dynamic extract process of Huanglian Jiedu Tang and the mechanism of subsidence produce

PAN Linmei, FU Jia, ZHU Huaxu, GUO Liwei*

(*Separation Engineering of Chinese Traditional Medicine Compound, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To study the phenomenon of subsidence emergence in the process of Huanglian Jiedu Tang decoction extraction, and the mechanism of subsidence emergence. **Method:** UV was applied to determine the concentration of total alkaloids and total flavones; Simultaneous determination of berberine, jatrorrhizine, palmatine, baicalin and geniposide were carried out by HPLC; The solid holdup and precipitation rate were calculated by the formula. The relativity among these parameters was analyzed by the SPSS software program. **Result:** The contains of berberine, jatrorrhizine, palmatine in total alkaloids showed a good correlation with total alkaloids. The correlation between baicalin and total flavones was lower than that between geniposide and total flavones. Compared to precipitation rate, solid hold up shows a larger relevance with index component. **Conclusion:** With the change of time, the total alkaloids represented by berberine alkaloids and baicalin at a certain concentration can be regarded as the equilibrium point, or one generated by the critical point of precipitation, the reaction can generate “sediments”; because “precipitation objects” generated, reducing the concentration of the above-mentioned components, destroy the “balance”. The relevant components of herbal medicine increased dissolution rate, at the same time might partly dissolved sediment, reaching a new equilibrium state.

[**Key words**] Huanglian Jiedu Tang; dynamic process; precipitation; mechanism of subsidence produce

doi: 10.4268/cjcm20100108

[责任编辑 周驰]

本刊重要启事

本刊已开通在线支付功能,作者请登录本刊网站 www.cjcm.com.cn “作者中心”,点击在线充值,可以选择网上银行(没开通网银功能的帐户可以选择信用卡充值)和手机充值卡 2 种充值方式,充值成功后系统会显示您的账号余额。然后您可以根据稿件状态和编辑部邮件通知来缴纳相应的费用,如审稿费,发表费等。如有疑问请咨询鲍雷编辑:13683362408,178562955@qq.com。