

# 基于改善胰岛素抵抗活性和有效成分含量的 酒蒸黄连炮制工艺优选

范刚, 郑海杰, 赖先荣, 孟宪丽, 张艺\*  
(成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

**[摘要]** 目的: 优化酒蒸黄连的炮制工艺。方法: 以 3T3-L1 前脂肪细胞胰岛素抵抗模型的葡萄糖利用变化率及 3 种生物碱(盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱和盐酸小檗碱)总量为指标, 采用均匀设计考察黄酒用量、闷润时间、蒸制时间对酒蒸黄连炮制工艺的影响。结果: 酒蒸黄连能显著或部分降低培养液中葡萄糖水平。最佳炮制工艺为黄酒用量 20%, 闷润时间 2 h, 蒸制时间 8 h; 葡萄糖平均利用变化率 33.076%, 与回归模型预测值的相对误差 2.63%; 3 种生物碱总量平均值 8.167%, 与回归模型预测值的相对误差 1.15%。结论: 酒蒸黄连具有改善胰岛素抵抗的活性, 优化的酒蒸黄连炮制工艺稳定可行。

**[关键词]** 酒蒸黄连; 炮制工艺; 胰岛素抵抗; 有效成分; 生物碱

**[中图分类号]** R283.3; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0005-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014040005

## Optimization of Processing Technology for Coptidis Rhizoma Steamed with Rice Wine Based on Improvement of Insulin Resistance Activity and Contents of Effective Ingredients

FAN Gang, ZHENG Hai-jie, LAI Xian-rong, MENG Xian-li, ZHANG Yi\*

(College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize processing technology of Coptidis Rhizoma steamed with rice wine. **Method:** Taking glucose utilization variation rate of insulin resistance (IR) model of 3T3-L1 adipocyte and total contents of active ingredients (columbamine hydrochloride, epiberberine hydrochloride and berberine hydrochloride) as indexes, uniform design test was adopted to optimize processing technology with rice wine consumption, moistening time and steaming time as factors. **Result:** Coptidis Rhizoma steamed with rice wine could significantly reduce level of glucose in the culture medium. The best processing technology was as follows: rice wine consumption 20%, moistened 2 h and steamed 8 h; Average glucose utilization variation rate was 33.076%, whose relative error was 2.63% with the predicted value of regression model; Average total contents of three kinds of alkaloids was 8.167% with relative error was 1.15% by comparing with the predicted value. **Conclusion:** Coptidis Rhizoma steamed with rice wine had a role in improvement of IR; This optimized processing technology was stable and feasible.

**[Key words]** Coptidis Rhizoma steamed with rice wine; processing technology; insulin resistance; active ingredients; alkaloids

黄连具有清热燥湿、泻火解毒的功效, 根据中医 临床辨证施治的需要, 其炮制方法主要有酒炙、姜汁

**[收稿日期]** 20130908(012)

**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAI40B05, 2007BAI40B03)

**[第一作者]** 范刚, 博士, 讲师, 从事中药质量控制研究, Tel: 028-61800160, E-mail: fangang1111@163.com

**[通讯作者]** \* 张艺, 博士, 博士生导师, 研究员, 从事中药质量控制及药效物质基础研究, Tel: 028-61800274, E-mail: 9006zmy@163.com

炙、吴茱萸汁炙等<sup>[1]</sup>,此外尚有盐黄连、醋黄连、酒蒸黄连等炮制品。酒蒸黄连常用于治疗消渴病,如《本草纲目》<sup>[2]</sup>记载“治消渴,用酒蒸黄连”,《东医宝鉴》<sup>[3]</sup>谓“黄连,治消渴要药,酒浸蒸”。目前姜黄连、萸黄连、酒炙黄连的炮制工艺研究已有文献报道<sup>[4-6]</sup>,但尚无酒蒸黄连的炮制工艺研究。本实验采用均匀设计方法,以 3T3-L1 脂肪细胞 IR 模型葡萄糖利用率及有效成分含量为指标,考察黄酒用量、闷润时间和蒸制时间对酒蒸黄连炮制工艺的影响,为酒蒸黄连的开发利用及质量标准研究提供参考。

### 1 材料

LC-10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津,SPD-10Avp 型紫外检测器,N2000 色谱数据工作站),BP121s 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),CK40-F200 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),SN-3001 型酶标仪(美国 Thermo Formo 公司),SHH-W21-600 型三用电热恒温水箱(天津市泰斯特仪器有限公司),MLS-3020 型高压蒸汽灭菌仪(日本 SANYO 公司),MCO-150A 型二氧化碳培养箱(日本三洋电气公司)。

盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110713-200609),盐酸表小檗碱和盐酸非洲防己碱对照品(均由重庆市中药研究院提供,HPLC 检测纯度均 >98%),黄连饮片(购自四川省什邡市,经成都中医药大学民族医药学院张艺研究员鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎饮片),DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司),优级新生牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司),血糖测定试剂盒(GOD-PAP 法,四川省迈克科技有限公司),磷酸盐缓冲液(PBS,北京中杉金桥生物技术有限公司),马来酸罗格列酮(ROS,英国葛兰素史克),地塞米松(Dex)、胰岛素和 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)均购自 Sigma 公司,3T3-L1 前脂肪细胞株(四川大学华西医院卫生部移植工程与移植免疫重点实验室),乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 酒蒸黄连样品的制备** 按《中国药典》2010 年版(一部)的“酒蒸”炮制方法和要求,根据均匀设计炮制方案对黄连饮片进行炮制,制备 6 批酒蒸黄连样品。

#### 2.2 体外改善胰岛素抵抗活性的测定

**2.2.1 受试样品溶液的配制** 精密称取不同酒蒸

黄连炮制品 25 g,加 6 倍量水煎煮提取 3 次,每次 2 h,滤过,合并药液,减压浓缩,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,得浸膏。将浸膏溶于适量 PBS 中,配制成生药质量浓度  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的受试样品溶液。

#### 2.2.2 3T3-L1 前脂肪细胞的接种培养和诱导分化

将 3T3-L1 前脂肪细胞悬液按  $5 \times 10^5$  个/mL 的密度接种至 48 孔培养板,置于含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养基中,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度条件下培养。待细胞融合达接触抑制后,用含 Dex ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),IBMx ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及胰岛素 ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 DMEM 完全培养液诱导分化,48 h 后撤去 Dex 和 IBMx,用  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的胰岛素继续作用 48 h,直到细胞完全分化,显微镜下观察细胞数目、形态变化和细胞内脂肪含量的变化,直到有成熟脂肪细胞的特征,约 8 ~ 12 d。

**2.2.3 葡萄糖利用率考察** 对分化好的细胞进行分组,设置空白对照组、阳性对照组、模型组和受试药物组,除空白组加入正常培养基外,其余各组均加入摩尔浓度为  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的地塞米松和胰岛素进行脂肪细胞的胰岛素抵抗,作用 3 d。待脂肪细胞胰岛素抵抗成立后,换用无酚红 DMEM 高糖培养基,加入受试药物作用 3 d,取细胞培养上清液于 505 nm 处比色测定葡萄糖含量,计算葡萄糖利用变化率,结果见表 1,评价各药物对体外 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖利用率的影响。

$$\text{葡萄糖利用变化率} = (\bar{M} - \bar{S}) / \bar{M}$$

$\bar{M}$  为 IR 模型组平均葡萄糖含量, $\bar{S}$  为试验组平均葡萄糖含量。

表 1 不同酒蒸黄连对脂肪细胞 IR 模型葡萄糖利用率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	培养液葡萄糖 摩尔浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	葡萄糖利用 变化率/%
空白对照	$12.447 \pm 2.722^{1)}$	21.731
IR 模型对照	$15.903 \pm 1.290$	-
ROS 阳性( $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$7.213 \pm 1.290^{2)}$	54.655
酒蒸 1	$10.899 \pm 0.806^{2)}$	31.465
酒蒸 2	$10.499 \pm 1.824^{2)}$	33.977
酒蒸 3	$11.061 \pm 0.808^{2)}$	30.443
酒蒸 4	$10.108 \pm 1.340^{2)}$	36.435
酒蒸 5	$13.033 \pm 3.402^{1)}$	18.047
酒蒸 6	$13.796 \pm 0.510$	13.251

注:与 IR 模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

由表 1 可知,与空白组比较,3T3-L1 前脂肪细胞在地塞米松和胰岛素作用下,模型组对胰岛素的

敏感性明显降低,培养液中葡萄糖的摄取明显减少,表明胰岛素抵抗模型造模成功。与 IR 模型组比较,不同炮制工艺酒蒸黄连均能显著或部分降低培养液中葡萄糖含量,提高脂肪细胞葡萄糖的利用率,改善胰岛素抵抗,作用与阳性药 ROS 相似。

### 2.3 酒蒸黄连改善胰岛素抵抗有效成分的含量测定

**2.3.1 色谱条件** Xtimate™ C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 30 mmol·L<sup>-1</sup> 碳酸氢铵溶液(含 0.1% 三乙胺和 0.7% 氨水, A)-乙腈(B) 梯度洗脱(0 ~ 15 min, 10% ~ 25% B; 15 ~ 25 min, 25% ~ 30% B; 25 ~ 40 min, 30% ~ 45% B; 40 ~ 45 min, 45% ~ 70% B), 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 270 nm。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱和盐酸小檗碱对照品适量, 加盐酸-甲醇(1:100) 制成质量浓度依次为 24.96, 40.96, 264.96 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 精密称取各酒蒸黄连炮制品粉末约 0.1 g, 置锥形瓶中, 加入盐酸-甲醇(1:100) 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 称重, 用盐酸甲醇(1:100) 补足失重, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.3.4 方法学考察

**2.3.4.1 线性范围考察** 分别精密量取混合对照品溶液 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 各加盐酸-甲醇(1:100) 混合液稀释至刻度, 得系列对照品溶液。精密吸取各溶液 10 μL, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱和盐酸小檗碱的回归方程分别为  $Y = 51\,488X - 512.68$  ( $r = 0.999\,9$ ),  $Y = 36\,771X - 5\,737.6$  ( $r = 0.999\,9$ ),  $Y = 37\,765X + 80\,246$  ( $r = 0.999\,6$ ), 线性范围依次为 1.25 ~ 24.96, 2.05 ~ 40.96, 13.25 ~ 264.96 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.4.2 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.96%, 0.53%, 0.61%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.4.3 重复性试验** 取同一批样品 6 份, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸小檗碱含量的 RSD 依次为 1.06%, 1.30%, 1.16%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.4.4 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12 h 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 1.72%, 1.57%, 1.62%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

**2.3.4.5 加样回收率试验** 精密称取已知含量的酒蒸黄连样品 0.05 g, 共 6 份, 各精密加入盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱、盐酸小檗碱对照品 200.0, 512.0, 3 372.8 μg, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算平均加样回收率依次为 101.8%, 100.3%, 97.9%, RSD 分别为 1.30%, 1.76%, 1.97%。

**2.3.5 样品测定** 取 6 批酒蒸黄连样品粉末, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱和盐酸小檗碱含量。

**2.4 炮制工艺优选** 采用均匀设计法, 选择黄酒用量、闷润时间、蒸制时间为考察因素, 采用 U<sub>6</sub>(6<sup>3</sup>) 均匀设计表安排试验, 因素水平见表 2, 以葡萄糖利用变化率和生物碱总量为评价指标, 试验安排及结果见表 3。

表 2 酒蒸黄连炮制工艺均匀设计因素水平

水平	X <sub>1</sub> 黄酒用量/%	X <sub>2</sub> 闷润时间/h	X <sub>3</sub> 蒸制时间/h
1	20	1	3
2	40	2	4
3	60	3	5
4	80	4	6
5	100	5	7
6	120	6	8

采用 DPS 统计软件对数据进行回归建模处理<sup>[7-8]</sup>, 分别以葡萄糖利用变化率和 3 种生物碱总量为因变量进行二次多项式回归分析, 结果回归方程依次为  $Y = 26.449 + 0.281X_1 - 0.004X_1^2 + 0.030X_1X_3 - 0.190X_2X_3$  ( $r = 0.988, P < 0.05$ ),  $Y = 6.790 + 0.271X_3 + 0.003X_1X_2 - 0.003X_1X_3 - 0.021X_2X_3$  ( $r = 0.988, P < 0.05$ ), 表明 2 个回归模型均具有较高的预测精度且在  $\alpha = 0.05$  的水平上均具有显著意义。

对回归方程求极值显示, 当黄酒用量 60%, 闷润时间 2 h, 蒸制时间 8 h 时葡萄糖利用变化率达最大值点(40.269%); 当黄酒用量达 40% 后, 饮片闷润后残留黄酒量较多, 在闷润过程中部分生物碱有效成分已溶解于黄酒中, 如果把残留黄酒弃去, 必然

表 3 酒蒸黄连炮制工艺均匀试验安排及含量

%

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	葡萄糖利用变化率	盐酸非洲防己碱	盐酸表小檗碱	盐酸小檗碱	3 种生物碱总量
1	20	2	5	31.465	0.403	0.926	6.407	7.736
2	40	4	8	33.977	0.400	0.914	6.441	7.755
3	60	6	4	30.443	0.460	0.842	6.317	7.619
4	80	1	7	36.435	0.415	0.701	5.919	7.035
5	100	3	3	18.047	0.454	0.808	6.062	7.324
6	120	5	6	13.251	0.424	0.788	6.019	7.231

造成有效成分的损失。当黄酒用量 20%，闷润时间 1 h，蒸制时间 8 h 时 3 种生物碱总量达最大值点 (8.370%)；但闷润 1 h 难以达到《中国药典》2010 年版规定的“闷透”程度，根据经验选择闷润时间 2 h。综合考虑，最终确定最佳炮制工艺为黄酒用量 20%，闷润时间 2 h，蒸制时间 8 h，此时 3 种总生物碱含量和葡萄糖利用变化率的预测值分别 8.262%，32.229%。

**2.5 验证试验** 取 3 批黄连饮片，按优选的工艺条件进行炮制，结果 3 批酒蒸黄连的葡萄糖利用变化率分别为 33.534%，32.659%，33.034%，平均值 33.076%，与回归模型预测值的相对误差 2.63%；而 3 种生物碱总量分别为 8.102%，8.269%，8.130%，平均值 8.167%，与回归模型预测值的相对误差仅 1.15%，表明优选的工艺条件稳定可靠。

### 3 讨论

3T3-L1 前脂肪细胞是体外研究胰岛素抵抗发病机制和药物作用机制的重要细胞模型，通过培养 3T3-L1 前脂肪细胞，由地塞米松诱导建立胰岛素抵抗模型，可从细胞层次探讨不同酒蒸黄连样品改善胰岛素抵抗活性的药效差异<sup>[9-10]</sup>。试验结果显示不同炮制工艺酒蒸黄连均能显著或部分降低培养液中的葡萄糖水平，说明酒蒸黄连具有增强脂肪细胞对葡萄糖摄取和利用的能力，从细胞水平上阐明了酒蒸黄连具有改善胰岛素抵抗的作用。

课题组前期研究发现盐酸非洲防己碱、盐酸表小檗碱和盐酸小檗碱均为体内入血成分，与体外改善胰岛素抵抗活性相关，可能是酒蒸黄连改善胰岛素抵抗活性的药效物质基础<sup>[11-12]</sup>，故选择该 3 种生物碱总量为评价指标。均匀设计结果显示各因素对炮制工艺的影响顺序为蒸制时间 > 黄酒用量 > 闷

润时间，其中蒸制时间对 2 个考察指标均具有显著性影响。优选的炮制工艺参数较客观，克服了传统单凭经验炮制的主观性，使酒蒸黄连的炮制更合理。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 286.

[2] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 华夏出版社, 1998: 538.

[3] 许浚. 东医宝鉴[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1995: 602.

[4] 张洪利, 康大力, 黄艳萍. 正交设计法优选姜黄连炮制工艺研究[J]. 中医药导报, 2008, 14(7): 99.

[5] 张洪利, 康大力, 黄艳萍. 吴茱萸制黄连的炮制工艺研究[J]. 吉林中医药, 2008, 28(4): 294.

[6] 傅华荣, 杨金梅, 龚千锋, 等. 正交试验优选酒黄连最佳炮制工艺[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1887.

[7] 胡志方, 胡律江, 郭慧玲, 等. 基于均匀设计法的建昌帮四制香附炮制工艺评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 39.

[8] 肖正国, 包强, 李天庆, 等. 均匀设计优选玉红膏中紫草油炸提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19): 60.

[9] 白红艳, 邹文俊, 高小平. 葛根对地塞米松诱导的胰岛素抵抗的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 356.

[10] 李佳川, 孟宪丽, 赖先荣, 等. 基于 3T3-L1 细胞的不同黄连炮制品“止消渴”药效比较研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(2): 52.

[11] 赖先荣, 张艺, 郑海杰, 等. 三黄方及其单味药药效物质基础的血清药物化学研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2010, 12(4): 666.

[12] 李佳川. 基于本草知识的酒蒸黄连“止消渴”系统研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.

[责任编辑 全燕]