

黄芩、黄连配伍前后的主要化学成分含量变化

张振巍¹, 张娜娜², 李月梅^{1*}

(1. 中国人民解放军第一五五中心医院, 河南 开封 475003; 2. 开封市中医院, 河南 开封 475000)

[摘要] 目的: 考察相须药对的配伍对主要活性成分煎出量的影响。方法: 选择黄芩-黄连药对为研究对象, 以黄芩苷和盐酸小檗碱含量为指标, 采用 HPLC 测定含量, 选取加水量、提取次数、提取时间及黄芩-黄连比为考察因素, 通过混合均匀设计试验优选煎煮工艺。考察不同比例配伍的黄芩-黄连共煎液与单煎混合液化学成分的异同, 并采用三维效应面及三角能级图的形式将两指标成分进行直观对比, 重点关注因两味中药在共煎而产生的化学成分动态变化现象。结果: 黄连主要活性成分的煎出量与两者的配伍比例显著性相关; 而黄芩活性成分的煎出量与煎煮时影响因素有关。黄连用量为黄芩用量 2, 3, 5 倍时溶液中两者含量相对较高, 其他比例时均较低。结论: 可通过研究药对的不同配比与其各自化学成分动态变化关系, 揭示其临床使用疗效。

[关键词] 黄芩; 黄连; 配伍; 化学成分; 混合均匀设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0058-05

Content Change of Main Chemical Composition Before and After Compatibility of *Scutellaria baicalensis* and *Coptis chinensis*

ZHANG Zhen-wei¹, ZHANG Na-na², LI Yue-mei^{1*}

(1. The 155th Central Hospital of Chinese People's Liberation Army, Kaifeng 475003, China;
2. Kaifeng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kaifeng 475000, China)

[收稿日期] 20120810(010)

[第一作者] 张振巍, 药师, 硕士, 从事中药新药及质量控制研究, Tel: 13938488262, E-mail: zhenwei_981@163.com

[通讯作者] * 李月梅, 学士, 副主任药师, 从事药事管理和中药制剂研究, Tel: 0378-3932729, E-mail: ccdriyuemei@163.com

由表 2 可知, 4 个因素对炮制工艺的影响顺序为 $A > D > C > B$, 由表 3 可见, 以极值最小的 B 因素为误差项进行方差分析, 结果 A 因素对试验结果有显著性影响, C, D 因素无显著性影响。最佳炮制工艺确定为 $A_3B_2C_1D_2$, 即加蜂蜜 40%, 闷润 4 h, 100 ~ 110 °C 温度下炒炙 6 min, 取出, 放凉。

2.7 验证试验 取款冬花 3 份, 每份 100 g, 按优选的炮制工艺进行 3 次验证试验, 结果综合评分分别为 9.923, 9.919, 9.996。

3 讨论

现代药理研究证明款冬花具有明显的镇咳祛痰、抗炎、止泻等多种生物活性^[5], 款冬酮作为款冬花的有效成分之一, 表明对呼吸和心血管系统具有较强的刺激作用, 对血小板活化因子具有较强的抑制作用^[6]。2010 年版《中国药典》首次将款冬酮作

为款冬花质量控制指标, 故本文将将其作为优选蜜炙款冬花炮制工艺的主要指标之一。

[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: 312.
- [2] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 219.
- [3] 张金莲, 何敏, 谢一辉, 等. 正交法优选蜜麸炒樟帮枳壳炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 8.
- [4] 刘玉峰, 杨秀伟. 反相高效液相色谱法测定款冬花中的款冬酮含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 31.
- [5] 回连强, 高双荣, 刘婷, 等. 款冬花及其总生物碱的肝脏毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 238.
- [6] 王金凤, 杨苏蓓. 款冬花研究进展[J]. 中国实用医药, 2009, 4(32): 221.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] Objective: To study effect of compatibility of traditional Chinese medicine pair on decocting rate of main active ingredient. **Method:** With pair of *Scutellaria baicalensis* and *Coptis chinensis* as study object, the content of baicalin and berberine hydrochloride as indexes, which were determined by HPLC, the amount of water, extraction times, extraction time and ratio of *S. baicalensis* and *C. chinensis* were chosen as factors, boiling technology was optimized by mixing uniformity design test. Difference of chemical composition between total decoction (with different proportion of *S. baicalensis* and *C. chinensis*) and mixed liquid of single decoction of them was investigated, and two target ingredients were visual contrasted by three dimensional response surface and triangle energy level diagram, dynamic change phenomenon of chemical composition was focused on, which due to mixed decoction of *S. baicalensis* and *C. chinensis*. **Result:** The decocting content of main active ingredient from *C. chinensis* showed significantly correlation with compatibility proportion of *S. baicalensis* and *C. chinensis*; But the decocting content of active ingredient from *S. baicalensis* was concerned with decoction influencing factors. The contents of two index component were lower with other proportions of *S. baicalensis* and *C. chinensis*, except the amount of *C. chinensis* was 2, 3, 5 times for *S. baicalensis*. **Conclusion:** Clinical efficacy of pair-Chinese materia medica could be revealed by study on dynamical change relationship of different compatibility proportions and their chemical composition.

[Key words] *Scutellaria baicalensis*; *Coptis chinensis*; compatibility; chemical composition; mixing uniform design

中药复方在多药共煎煮后的化学成分并非方中各单味药物化学成分的简单相加,其必然与复方疗效优于单味药物的事实存在本质联系。黄芩-黄连属于清热燥湿配伍的经典药对,二者皆属苦寒之品,均能清热燥湿、泻火解毒,常相须合用起协同增效作用。文献报道临床疗效与二者剂量比例有非常密切的关系^[1],故本试验以黄芩-黄连为研究对象,从其化学成分的动态变化入手,探讨2味药物共煎煮前后化学成分的变化情况,为中药配伍理论提供试验依据^[2]。

1 材料

2695型高效液相色谱仪(美国 Waters),黄芩苷、盐酸小檗碱对照品(批号分别为110715-200815,110713-200208,中国药品生物制品检定所),甲醇为色谱纯,黄芩、黄连药材均购自张仲景大药房,经155医院药械科主任药师石磊教授鉴定,均符合《中国药典》2010年版一部相关项下要求。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3] Kromasil C₁₈100A 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1%磷酸溶液(50:50),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长278,345 nm,柱温25℃,进样量5 μL。

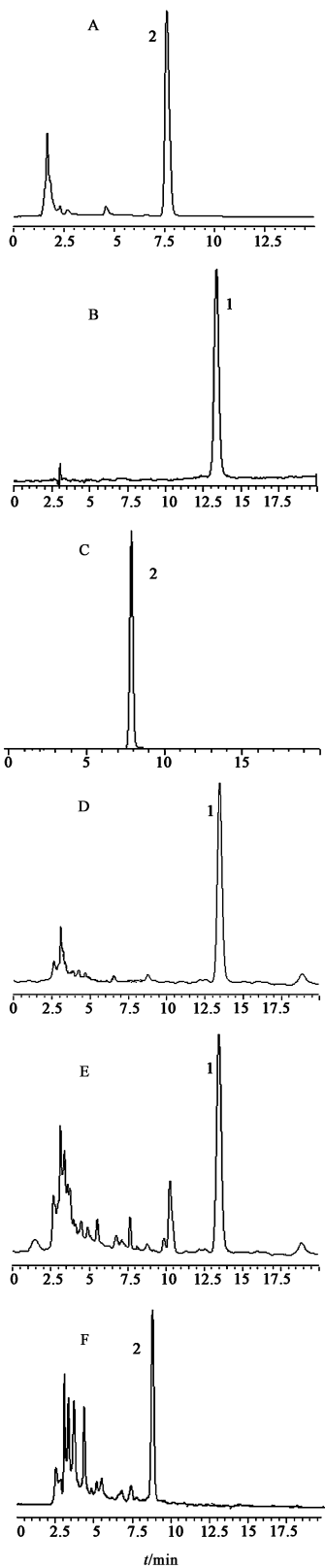
2.2 线性关系考察 精密称取黄芩苷对照品2.6 mg,盐酸小檗碱对照品3.41 mg,分别用甲醇溶解并定容至25 mL量瓶中,摇匀,分别精密吸取0.25,0.5,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL,置于5 mL量瓶中,

用甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜过滤,取10 μL进样测定,分别以黄芩苷(*X*)和盐酸小檗碱进样量(*X'*)为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 4.42 \times 10^4 X - 9.32 \times 10^3$ ($r = 0.9997$),线性范围5.2~104 mg·L⁻¹; $Y' = 2.018 \times 10^4 X' + 6.185 \times 10^3$ ($r = 0.9999$),线性范围6.82~136.4 mg·L⁻¹。

2.3 混合均匀试验设计 取黄芩、黄连粗粉适量,按试验设计进行提取,精密吸取提取液2.00~50 mL量瓶中,甲醇定容,过滤,取续滤液,即得供试品溶液。按2.1项下色谱条件进行定量分析,HPLC色谱见图1。采用均匀设计表U₁₂(12×4×4×3)表头设计(表1),其中心化偏差(CD)为0.3886,经DPS7.05数据处理软件对实验设计点矩阵进行优化后其CD为0.1748,采用优化后设计安排试验^[4],试验安排及结果见表2。

2.3.1 数据统计分析 根据试验数据的特征,选择二项式回归模型进行拟合,并对试验因素的交互作用进行综合分析,剔除对拟合方程贡献程度较小的因素,对数据进行预测,将实测值与预测值进行对比,以考察模型拟合程度。数据统计采用DPS7.05及STATISTICA 8.0进行分析,结果见表3。

分别将黄芩苷和盐酸小檗碱的含量作为因变量进行二项式模型拟合,并对拟合模型进行统计学意义分析,结果如下:



A, B. 对照品; C. 黄芩水煎液; D. 黄连水煎液;
E. 药对 1:3 配伍溶液; F. 药对 6:1 配伍溶液;
1. 黄芩苷; 2. 盐酸小檗碱

图 1 黄芩-黄连 HPLC

表 1 黄芩-黄连煎煮工艺混合均匀试验设计因素水平

水平	X_1 黄芩-黄连	X_2 加水量/倍	X_3 提取时间 /min	X_4 提取数 /次
1	1:0	5	30	1
2	1:1	7	60	2
3	1:2	9	90	3
4	1:3	11	120	
5	2:3			
6	1:5			
7	1:6			
8	2:1			
9	3:1			
10	3:2			
11	5:1			
12	6:1			

$$Y = 68.53 - 6.38X_1 - 38.03X_3 + 48.35X_4 + 1.01X_1^2 + 10.62X_3^2 - 12.66X_4^2 - 1.55X_1X_3 - 1.10X_1X_4 [r = 0.999, Ra = 0.997, F = 288.077 (Df = 8, 3), P = 0.0004 < 0.01]$$

$$Y' = -32.73 + 14.20X_1' - 3.74X_3' + 73.87X_4' - 0.14X_1'^2 + 0.95X_1'X_2' - 2.21X_1'X_3' - 6.18X_1'X_4' + 7.55X_2'X_3' - 15.94X_2'X_4' [r = 0.9999, Ra = 0.9997, F = 2155.707 (Df = 9, 2), P = 0.0005 < 0.01]$$

由表 3 可知,黄芩苷和盐酸小檗碱的含量变化主要与 X_1, X_3, X_4 相关性程度较高,且均具有统计学意义,虽然药对比例对黄芩苷的统计学意义不显著,但该因素对方程的贡献程度较高,故在实际分析处理时将其纳入方程系数统计中;在交互作用考察中,注意到 X_1 的变化对盐酸小檗碱的含量变化起到至关重要的作用,均具有极显著性影响,说明盐酸小檗碱的含量变化除了与两者比例有一定关系以外,与其他因素的交互作用也有较大关系,在实际用药煎煮时应综合考虑^[5]。

2.3.2 模型寻优及相互作用分析 结合 RSM 法(效应面设计)对试验模型进行三维投影,从立体角度对各个因素的影响趋势进行分析,为方便对试验参数进行分析,将两指标性成分进行标准化量度,以消除数值差异性,根据各因素的三维效应面将两指标性成分绘制在同一三角能级图中,根据其能级变化选取最佳参数范围(图 2)。

由图 2 可知,从两指标性成分提取率角度考虑,各因素所表现的影响程度有一定差别(图 2A, B, C, D);从三角能级图中显示黄芩苷和盐酸小檗碱其各自最大化区域重叠较小,对于黄芩苷来说,其最大化

表2 黄芩-黄连煎煮工艺混合均匀试验设计安排

%

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	黄芩苷			盐酸小檗碱		
					Y'实测值	Ye'预测值	e_i 残差	Y'实测值	Ye'预测值	e_i 残差
1	1	2	3	2	84.95	83.904	1.047	82.01	82.336	-0.326
2	8	3	3	3	32.48	31.396	1.084	28.01	28.147	-0.137
3	11	1	3	1	75.44	74.747	0.693	44.92	45.067	-0.147
4	2	4	2	3	43.89	44.583	-0.693	40.20	40.053	0.147
5	6	1	4	3	58.08	58.715	-0.635	78.03	77.877	0.153
6	3	3	4	1	89.91	90.153	-0.243	74.02	73.857	0.163
7	7	4	1	1	63.87	63.235	0.635	64.02	64.173	-0.153
8	4	1	1	2	62.97	62.907	0.063	87.11	86.998	0.1118
9	10	2	1	3	61.57	61.327	0.243	43.65	43.813	-0.163
10	5	2	2	1	41.99	43.074	-1.084	56.10	55.963	0.137
11	12	3	2	2	85.65	86.697	-1.047	40.20	39.874	0.326
12	9	4	4	2	81.37	81.433	-0.063	52.99	53.102	-0.112

注:提取率=(提取液中成分含量/药材中相应成分含量) $\times 100\%$; e_i =实测值-预测值。

表3 黄芩-黄连煎煮工艺各因素相关性统计

%

r	Y			Y'		
	偏相关	t 检验值	P	偏相关	t 检验值	P
Y/Y', X_1	-0.745	1.933	0.125	0.997 3	19.151	0.000 3
Y/Y', X_3	-0.971	7.064	0.002	-0.983 3	7.650	0.004 6
Y/Y', X_4	0.945	4.986	0.008	0.999 6	51.180	0.000 1
Y/Y', X_1^2	0.979	8.369	0.001	-0.983 7	7.746	0.004 5
Y', $X_1 X_2$	-	-	-	0.998 6	26.293	0.000 1
Y/Y', $X_1 X_3$	-0.911	3.817	0.019	-0.998 2	23.371	0.000 2
Y/Y', $X_1 X_4$	-0.826	2.536	0.064	-0.999 4	39.889	0.000 1
Y', $X_2 X_3$	-	-	-	0.999 4	39.580	0.000 1
Y', $X_2 X_4$	-	-	-	-0.999 8	79.221	0.000 1
Y, X_3^2	0.994	15.725	0.000	-	-	-
Y, X_4^2	-0.970	6.846	0.002	-	-	-

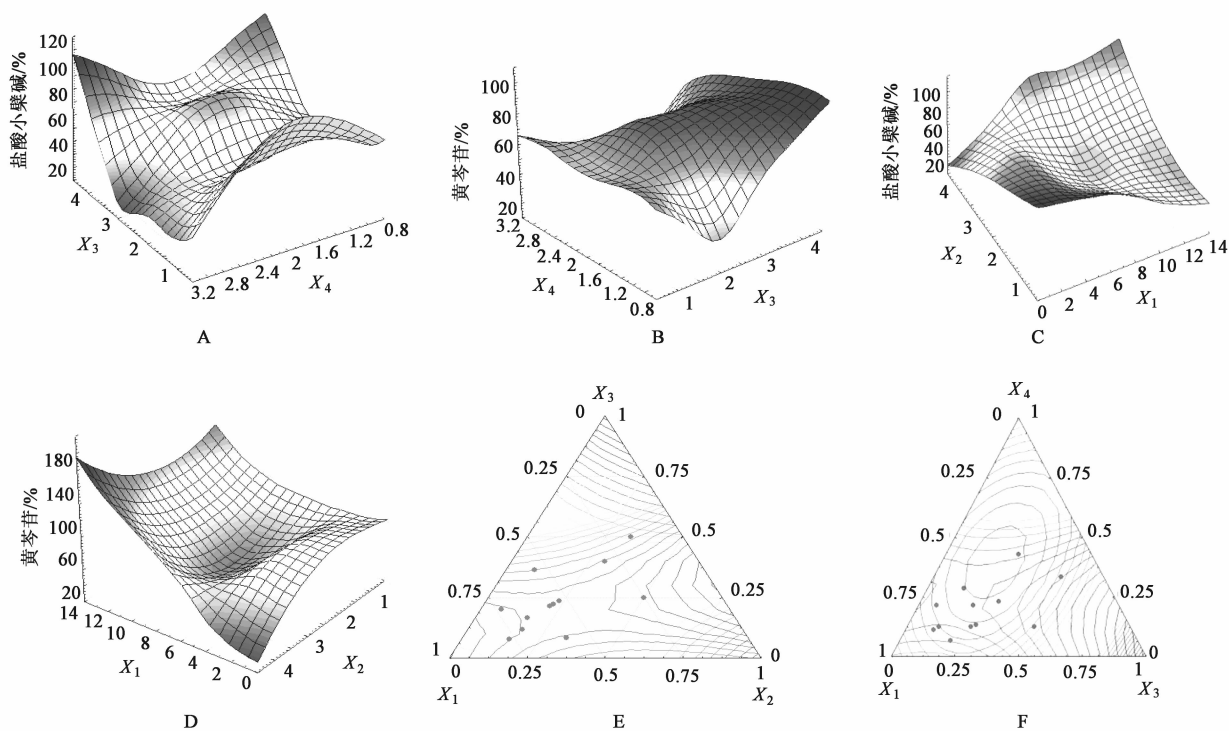


图2 黄芩-黄连煎煮工艺各因素对两指标性成分的三维图像分析

提取时各因素区域为两者比例 1:3,10 倍水量提取 2 次,每次 120 min;而盐酸小檗碱则为 6:1,11 倍水提取 1 次,共 120 min;由此可看出两指标性成分在提取时间和加水量两因素上几乎一致,而 X_1, X_4 对两者含量有较显著影响,因此,将不同比例药量的两指标性成分煎出量做一动态分析(图 3)。

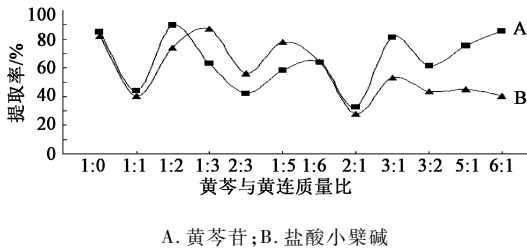


图 3 不同比例药量对黄芩苷和盐酸小檗碱煎出含量变化趋势

3 讨论

多因素水平的实验设计较多,如 CCD 设计(中心复合设计)、响应面设计、旋转组合设计等,此类设计对试验水平的预测能力更高,但当试验因素数目增多时,试验次数将大幅度增加。如 CCD 设计,当有 4 个因素时,试验次数最少要求 22 次,且试验次数不能加入设计;D-Optimal 设计虽能加入非连续性变量,但试验次数最少要求 32 次,增加试验设计数据分析的复杂程度。因此,本试验采用混合均匀设计,既能降低试验次数,又能采用高阶统计方法对数据进行综合评价分析,同时结合效应面法考察不同因素对药对配比的交互影响,对药对的药效学分析提供制剂工艺参考。

黄芩和黄连作为经典的药对配伍,在实际煎煮过程中有沉淀出现,文献报道该沉淀物为黄芩和黄连的主要化学成分,如黄连碱、小檗碱等黄酮类及生物碱类成分^[6]。通过对煎煮比例的分析,发现在黄芩-黄连 1:2 时黄芩苷煎出量较单味药材含量高,对黄芩而言,此时表现出协同增效作用;但盐酸小檗碱的含量稍低于单煎时含量,对黄连而言,此时的配比对黄连有效成分的溶出有拮抗作用;在两者比例为 1:1,2:3,2:1,3:2 时两指标成分的含量均出现拐点(图 3),可为临床用药提供参考^[7]。

黄芩-黄连中化学成分的相互作用较为复杂,黄芩中主要成分黄芩苷和汉黄芩苷都是在 C₇ 位上羟基与葡萄糖醛酸结合的苷,分子中带有羧基,酸性较强;黄连中主要成分小檗碱分子能表现季铵型、醇胺型、醛型三种互变异构体,当小檗碱遇到少量酸时,可促进部分醇胺型、醛型结构转变成碱性较强的季铵型,产生氢氧离子以中和酸中的氢离子,生成由酸根离子直接与季铵离子结合的盐;当溶液中酸性成分增多时,小檗碱完全以季铵型形似参与反应,两性生物碱也会参与中和反应,这种微妙的化学反应与两者配伍比例(即用量)有很大关系。尤其是在两者比例为 1:1,2:1,2:3 时,两者溶液的煎出量明显偏低,药味所含成分发生了化学反应而导致检出量偏低,同时溶液沉淀析出增多。本研究对相须药对黄芩-黄连的化学作用分析仍然不够全面,液质联用将放大两者化学作用的细节,对化合物的相互作用分析将显得尤为重要,有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 王付. 仲景方黄连药对研究与应用[J]. 中医药通报, 2007,6(5):28.
- [2] 刘冬敏,刘树民,祖金祥,等. 黄连解毒汤及其不同配伍组方成分溶出变化研究[J]. 中成药,2012,34(1):74.
- [3] 雷鹏,刘韶,李新中,等. 高效液相色谱法同时测定黄连解毒胶囊中 5 组分的含量[J]. 中国药房,2005,16(12):940.
- [4] 唐敏,刘耀,王渝,等. 均匀试验优化金银花总黄酮提取工艺[J]. 中国药房,2008,19(18):1375.
- [5] 李伟,宋凤瑞,刘志强,等. 毛细管电泳及液相色谱法研究黄连黄芩配伍过程化学成分的变化[J]. 药学学报,2008,43(2):191.
- [6] 乔梁,彭嘉柔,魏璐雪,等. 黄连-黄芩药对煎煮液沉淀物的分析[J]. 中国中药杂志,1999,24(6):352.
- [7] 王立,赵瑛. 煎煮方式对葛根芩连汤中黄芩苷和小檗碱家犬体内药动学影响[J]. 中成药,2011,33(8):1326.

[责任编辑 全燕]