

黄连解毒汤全方和不同极性部位的活性筛选

李欢, 朱华旭*, 潘林梅, 郭立玮, 钱智磊

(南京中医药大学药学院 中药复方分离工程实验室, 南京 210029)

[摘要] **目的:** 研究比较黄连解毒汤全方水提液体系、水提液体系经有机溶剂梯度萃取后不同极性部位中指标性成分的变化, 通过药效学筛选, 探讨黄连解毒汤改善脑缺血、益智作用的有效部位及其化学组成, 为该方的精制分离提供实验依据。**方法:** 黄连解毒汤全方经水煎煮得水提液(部位 I), 水提液浓缩后以石油醚、乙酸乙酯和水饱和正丁醇梯度萃取, 得到石油醚萃取物(部位 II)、乙酸乙酯萃取物(部位 III)、水饱和正丁醇萃取物(部位 IV)、残留水层上清液(部位 V)、残留水层沉淀(部位 VI), 以栀子苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素和汉黄芩素 6 种成分为对照, 应用 RP-HPLC 确定各萃取物中 6 种指标性成分的含量; 选用鼠源肾上腺髓质嗜铬细胞瘤 PC-12 细胞活性跟踪筛选, MTT 法测定黄连解毒汤及各萃取部位对低糖 DMEM 和氯化钴诱导的 PC-12 细胞缺糖缺氧损伤的影响。**结果:** 部位 V 中各指标性成分含量较高, 且 6 种指标性成分的比例与部位 I 相似; 部位 I, V 对 PC-12 细胞的缺糖缺氧损伤保护作用明显。**结论:** 部位 V 为黄连解毒汤改善脑缺血、益智作用的有效部位。

[关键词] 黄连解毒汤; 梯度萃取; 极性部位; 药效学筛选

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0124-04

Activity of Huanglian Jiedu Decoction and its Different Polarity Parts

LI Huan, ZHU Hua-xu*, PAN Lin-mei, GUO Li-wei, QIAN Zhi-lei

(Chinese Compound Separation Engineering Laboratory, College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** This paper studies Chinese herbal compound of Huanglian Jiedu decoction and its extract systems by gradient extraction with three kinds of organic solvents and the changes in the indicative components in different polarity parts. Through pharmacodynamics screening, utility location and chemical composition which can improve cerebral ischemia and promote noopsyche function were approached, to provide the basis for refining separation. **Method:** Huanglian Jiedu decoction was extracted successively with water (part I), ethyl acetate, water saturated butanol, the petroleum ether extract (part II), ethyl acetate extract (part III), butanol extract water saturated butanol extract (part IV), supernatant (part V) and sediment (part VI) of residual water layer extract. Using RP-HPLC, and geniposide, baicalin, palmatine, berberine, baicalein and wogonin as the indicative components, each component in every extract system was detected. Finally, using PC12 cells, low-sugar of DMEM and cobalt chloride to made oxygen and glucose deprivation model, MTT was applied to detect the cell viability. **Result:** The quality of the indicative components in part V was higher, having the similar ratio with part I; part I and part V had the highest protective effect in the oxygen and glucose deprivation injured cells. **Conclusion:** Part V is the effective fractions that can improve cerebral ischemia and noopsyche function.

[Key words] Huanglian Jiedu decoction; gradient extraction; polarity parts; pharmacodynamic screening

[收稿日期] 20100921(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873450); 江苏省教育厅“青蓝工程”资助

[第一作者] 李欢, 在读硕士, 主要从事中药药剂学研究, Tel: 025-86798699, E-mail: Lihuan_1986@163.com

[通讯作者] * 朱华旭, 副研究员, 主要从事植物化学和中药药剂学研究, Tel: 025-86798399, E-mail: huaxu72@yahoo.com.cn

黄连解毒汤源于唐·王焘《外台秘要》,由黄连、黄柏、黄芩和栀子组成,为清热解毒代表方^[1]。近年来中日两国对黄连解毒汤及其提取物用于脑血管病的基础研究与临床报道较多。药理学实验研究证明,黄连解毒汤具有改善脑缺血、益智作用^[2];临床实践亦表明,黄连解毒汤对老年痴呆症有良好的治疗作用,该方治疗脑部疾病的有效部位为复方中的水溶性成分,包括小檗碱、黄芩苷和栀子苷等^[3]。

黄连解毒汤的传统给药方式为汤剂,由于全方酸性成分与碱性成分共存,汤剂在水煎煮过程中产生大量沉淀^[4],造成后续精制分离工艺取舍较难,而水煎煮所得中间体由于得膏率较高、易吸湿等物理特性,难以做成现代给药的适宜剂型。

基于上述研究结果,本论文对全方水提液体系及其精制分离工艺进行探讨,旨在通过阐明黄连解毒汤改善脑缺血、益智作用的有效部位及其化学组成,建立可体现该方治疗特点的工业化生产工艺,为该方的新药创制提供实验依据。

1 仪器、试剂和试药

AEL-40SM 电子天平(Shimadzu Libror);TD5102 电子天平(天津市天马仪器厂);HB2060 超声振荡仪(江苏淮安汉邦公司);NG6000-2 旋转蒸发器(上海羌强仪器设备有限公司);Agilent 1100 高效液相色谱(Agilent 1100 四元泵,VWD 检测器,Agilent 1100 LC 色谱工作站);Nuair US Autoflow CO₂ Water-jacketed incubator(PRECISION SCIENTIFIC);YJ 超净工作台(苏州市洁净技术研究所);XSZ-DZ 倒置显微镜(重庆光学仪器厂);Spectra max 190 酶标仪(美国 AD 公司)。

黄连 *Coptidis Rhizoma* (产地四川、批号 090617),黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex* (产地东北、批号 090617),黄芩 *Scutellariae Radix* (产地甘肃、批号 090617),栀子 *Gardeniae Fructus* (产地江西、批号 090617)均购自安徽亳州市中药饮片厂,经本校生药学教研室吴启南教授鉴定,符合 2010 版《中国药典》规定;对照品均购自中国药品生物制品检定所,栀子苷(110749-200309)、黄芩苷(110715-200815)、盐酸小檗碱(110713-200208)、盐酸巴马汀(0732-200005)、黄芩素(111595-200604)、汉黄芩素(111514-200403);乙腈为色谱纯(MERCK 公司),水为重蒸水,石油醚、乙酸乙酯、正丁醇试剂均为分析纯(江苏淮安汉邦公司)。

鼠源肾上腺髓质嗜铬细胞瘤 PC-12 细胞细胞株由南京中医药大学陆茵教授惠赠。高糖 DMEM (11995)、低糖 DMEM (11885)、小牛血清(16010)、DPBS(14190)、胰酶替代酶(12605)、双抗(15140)均购自 GIBCO 公司。氯化钴(60818)、DMSO (34869)、MTT(M2128),均购自 Sigma 公司。培养瓶(CORNING),滤器(0.22 μm, MILLIPORE)。

2 药液的制备

黄连:黄芩:黄柏:栀子(3:2:2:3),共 0.6 kg 混合,水煎煮 2 次,第 1 次 10 倍量水、第 2 次 8 倍量水,每次 1.5 h;合并 2 次煎液,浓缩,得部位 I (按生药量计 0.2 g·mL⁻¹的水提液)。将上述水提液依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇各 3 L 分别萃取 3 次,得到各极性部位:部位 II (石油醚萃取物,0.82 g,收率 0.14%)、部位 III (乙酸乙酯萃取物,1.79 g,收率 0.30%)、部位 IV (正丁醇萃取物,18.79 g,收率 3.13%)、部位 V (残留水层上清液,115.60 g,收率 19.27%)、部位 VI (残留水层沉淀,30.82 g,收率 5.14%)。

3 各部位指标性成分的测定

3.1 样品处理 对照品溶液的配制:分别称取对照品栀子苷 6.96 mg,黄芩苷 9.58 mg,盐酸巴马汀 8.24 mg,盐酸小檗碱 8.16 mg,黄芩素 4.90 mg,汉黄芩素 3.22 mg,置于容量瓶,甲醇溶解,定容至 10 mL;分别取各对照品 1 mL 于量瓶中,甲醇定容至 10 mL,即得混合标准品溶液。

样品溶液的配制:部位 I 加水稀释至生药量为 0.012 g·mL⁻¹,过 0.45 μm 有机膜,得样品 I;部位 II 以甲醇 150 mL 稀释,过 0.45 μm 有机膜,得样品 II;部位 III 以甲醇 150 mL 稀释后,再稀释 5 倍,过 0.45 μm 有机膜,得样品 III;部位 IV 以甲醇 500 mL 稀释后,再稀释 5 倍,过 0.45 μm 有机膜,得样品 IV;部位 V 和 VI 分别取 0.9481 g 和 0.1202 g 于量瓶中,甲醇溶解,超声(250 W,50 kHz)处理 30 min,放冷,甲醇定容至 50 mL,过 0.45 μm 有机膜,得样品 V 和样品 VI。

3.2 色谱条件的选择 采用 RP-HPLC,测定样品 I, II, III, IV, V, VI 中栀子苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素的含量。

色谱柱:Agilent, ZORBAX, SB-C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流动相 A 为乙腈, B 为 0.05% 三乙胺水溶液(磷酸调 pH 3.1),洗脱程序见表 1;柱温

30 ℃;流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL;检测波长 238,280,360 nm;理论塔板数以槲子苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素计,不低于 5 000。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	乙腈/%	0.05% 三乙胺水溶液(磷酸调 pH 3.1)
0 ~ 13	12	88
13 ~ 15	12 ~ 26	88 ~ 74
15 ~ 28	26	74
28 ~ 35	26 ~ 45	74 ~ 55
35 ~ 45	45 ~ 100	55 ~ 0
45 ~ 50	100	0
50 ~ 53	100 ~ 12	100 ~ 88
53 ~ 55	12	88

3.3 测定结果 根据外标一点法,计算出黄连解毒汤 0.6 kg 中部位 I ~ VI 中各个指标性成分的含量,结果如下,见表 2;色谱图见图 1 ~ 2。

表 2 各萃取部位中指标性成分的含量 g

部位	槲子苷	黄芩苷	巴马汀	小檗碱	黄芩素	汉黄芩素
I	5.239 3	0.907 7	1.342 4	2.444 5	0.020 5	0.011 2
II	0.000 0	0.000 1	0.000 0	0.000 3	0.000 6	0.000 0
III	0.032 9	0.004 3	0.009 0	0.009 5	0.000 9	0.004 1
IV	1.924 0	0.424 4	0.571 4	1.364 7	0.000 8	0.005 6
V	2.154 3	0.455 4	0.716 8	1.030 6	0.017 1	0.000 2
VI	0.244 9	0.005 2	0.082 0	0.063 5	0.001 0	0.000 0

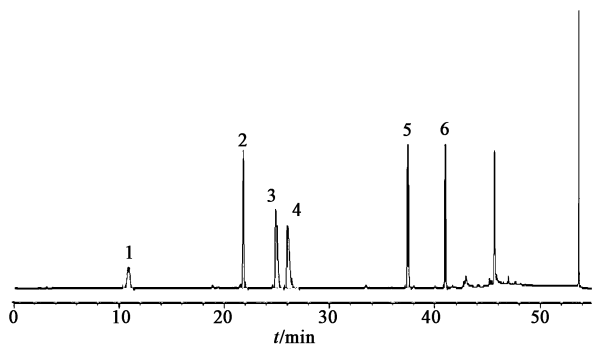


图 1 对照品色谱

1. 槲子苷; 2. 黄芩苷; 3. 盐酸巴马汀;
4. 盐酸小檗碱; 5. 黄芩素; 6. 汉黄芩素

4 药效学筛选

4.1 方法 MTT 的配置:精密称取 MTT 约 250 mg,置于 50 mL 棕色量瓶中配置成 5 g·L⁻¹的溶液,过 0.22 μm 的微孔滤膜。

取各部位样品分别用 1% DMSO-DPBS 溶液配制含生药 100 g·L⁻¹,再依次稀释 10 倍,得含生药

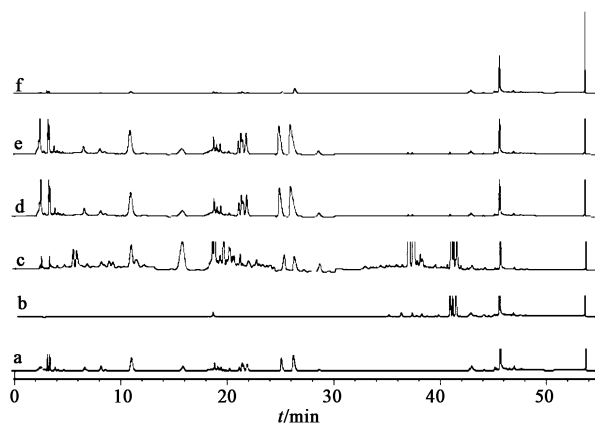


图 2 各样品色谱

a. 样品 I; b. 样品 II; c. 样品 III; d. 样品 IV; e. 样品 V; f. 样品 VI
10,1,0.1,0.01,0.001 g·L⁻¹。

将平均每孔 3 × 10⁴ 个 PC12 细胞种于 96 孔板中,以 180 μL [高糖的 DMEM:小牛血清(9:1)、双抗 100 U·mL⁻¹] 的培养基在 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 h,弃去培养液,用 DPBS 液洗涤 2 次,再以 160 μL (低糖 DMEM、双抗 100 U·mL⁻¹) 为培养基,375 μmol·L⁻¹ 氯化钴 20 μL 诱导细胞缺糖缺氧损伤,依次加入各药物浓度各 20 μL,再在 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,以 570 nm 和 620 nm 为检测波长,以 MTT 法检测细胞活力。

4.2 数据统计 用 570 nm 的吸光度值 A₅₇₀ 与 620 nm 吸光度值 A₆₂₀ 的差值为最终结果(A_n),将每组与模型组进行 t 检验,并计算出各组吸光度值的平均值(A),标准差和各给药组的保护率(B)。

$$A_n = A_{570\text{ nm}} - A_{620\text{ nm}} (n = 1, 2, \dots, 7, 8)$$

$$\bar{A} = (A_1 + A_2 + \dots + A_8) / 8$$

$$B = (\bar{A}_i - \bar{A}_m) / \bar{A}_m \times 100\%$$

$$(i = a, b, c, d, e, f, k, r)$$

\bar{A}_i 为各部位药液给药浓度的平均吸光度值; \bar{A}_m 为模型组的吸光度值的平均值;k 为空白对照组;r 为溶剂对照组;m 为模型组。

t 检验中,以 P < 0.05 有统计学意义。同时,以保护率的大小比较各组对缺氧缺糖损伤细胞保护作用的强弱。

4.3 结果 黄连解毒汤 6 个部位对 PC-12 细胞缺糖缺氧损伤的保护作用见表 3。黄连解毒汤全方水提液(部位 I)对缺糖缺氧损伤的保护率为 51.62%,黄连解毒汤残留水层上清液(部位 V)的保护率为 47.66%。

表3 MTT检测黄连解毒汤6个部位对PC-12细胞缺糖缺氧损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	部位 I		部位 II		部位 III	
	A	保护率/%	A	保护率/%	A	保护率/%
空白对照	0.89 ± 0.09	-	0.90 ± 0.04	-	0.89 ± 0.11	-
溶剂对照	0.88 ± 0.10	-	0.87 ± 0.09	-	0.91 ± 0.10	-
模型	0.64 ± 0.09	-	0.70 ± 0.06	-	0.71 ± 0.08	-
100 g·L ⁻¹	0.25 ± 0.09	-60.89 ²⁾	0.04 ± 0.01	-98.82 ³⁾	0.16 ± 0.06	77.22 ²⁾
10 g·L ⁻¹	0.53 ± 0.13	-16.77	0.55 ± 0.12	-21.83 ¹⁾	0.20 ± 0.06	-71.72 ²⁾
1 g·L ⁻¹	0.89 ± 0.09	39.31 ²⁾	0.35 ± 0.14	-49.94 ²⁾	0.96 ± 0.06	34.96 ²⁾
0.1 g·L ⁻¹	0.97 ± 0.07	51.62 ²⁾	0.77 ± 0.11	10.42	0.95 ± 0.14	30.80 ²⁾
0.01 g·L ⁻¹	0.87 ± 0.07	35.57 ²⁾	0.77 ± 0.09	9.73	0.83 ± 0.14	16.92
0.001 g·L ⁻¹	0.84 ± 0.09	31.81 ²⁾	0.64 ± 0.04	-8.90	0.60 ± 0.04	-15.47 ²⁾

组别	部位 IV		部位 V		部位 VI	
	A	保护率/%	A	保护率/%	A	保护率/%
空白对照	0.80 ± 0.11	-	0.89 ± 0.40	-	0.74 ± 0.09	-
溶剂对照	0.77 ± 0.11	-	0.89 ± 0.10	-	0.76 ± 0.04	-
模型	0.61 ± 0.07	-	0.69 ± 0.07	-	0.57 ± 0.13	-
100 g·L ⁻¹	0.05 ± 0.02	-91.43 ²⁾	0.07 ± 0.02	-89.88 ²⁾	0.20 ± 0.05	-55.32 ²⁾
10 g·L ⁻¹	0.27 ± 0.10	-58.89 ²⁾	0.32 ± 0.02	-52.79 ²⁾	0.13 ± 0.02	-77.19 ²⁾
1 g·L ⁻¹	0.45 ± 0.09	-26.28 ²⁾	0.84 ± 0.08	22.70 ²⁾	0.41 ± 0.10	-27.64 ¹⁾
0.1 g·L ⁻¹	0.55 ± 0.08	8.01	1.01 ± 0.11	47.66 ²⁾	0.53 ± 0.03	-0.07
0.01 g·L ⁻¹	0.89 ± 0.11	57.29 ²⁾	0.95 ± 0.10	36.86 ²⁾	0.52 ± 0.05	-0.09
0.001 g·L ⁻¹	0.56 ± 0.05	3.35 ²⁾	0.82 ± 0.08	19.74 ²⁾	0.52 ± 0.04	-0.09

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

5 讨论

作者首次利用 RP-HPLC 同时检测出黄连解毒汤中栀子苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素和汉黄芩素 6 个指标性成分,且分离效果较好,为黄连解毒汤的质量控制提供条件。

黄连解毒汤水提液经过石油醚、乙酸乙酯和饱和正丁醇萃取后,部位 V 占 68.88%,具有最大比例。原药液中栀子苷:黄芩苷:巴马汀:小檗碱:黄芩素:汉黄芩素 468: 81: 120: 218: 1.8: 1,部位 V 中栀子苷:黄芩苷:巴马汀:小檗碱:黄芩素:汉黄芩素 468: 99: 156: 224: 3.7: 0.04,主要指标性成分的比例相近。其次是部位 IV。

本实验室利用连二亚硫酸钠和氯化钴分别诱导 PC12 细胞缺糖缺氧细胞损伤,确定以氯化钴诱导的损伤最为明显和稳定,再以不同的氯化钴浓度对 PC12 进行诱导损伤,得出损伤曲线,最终确定缺糖缺氧损伤的最优条件,具有很可靠的依据。

经过 MTT 法细胞活性检测,部位 I 对缺糖缺氧细胞损伤的保护率为 51.62%,和部位 I 相比,部位

V 对缺糖缺氧细胞损伤的保护作用最强,达到 47.66%。部位 V 为黄连解毒汤改善脑缺血、益智作用的有效部位。在改善脑缺血和对低氧性脑障碍疾病的治疗方面,可选择性的保留黄连解毒汤水溶性成分,为该方的新药创制提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 徐静华,于庆海,渡边裕司. 黄连解毒汤对脑缺血动物的促智作用及机制探讨[J]. 时珍国医国药,2002,13(12): 705.
- [2] 吴彦,孙建宁,于绍坤. 黄连解毒汤有效部位对培养大鼠皮层神经元缺糖缺氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2004,20(8): 936.
- [3] 张艺平,韩鹏. 黄连解毒汤治疗脑病的药理与临床研究新进展[J]. 中华实用中西医杂志,2003,16(12): 1832.
- [4] 潘林梅,傅佳,朱华旭,等. 黄连解毒汤提取动态过程及沉淀产生机制的初步研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(1): 40.

[责任编辑 聂淑琴]