

不同栀子金花汤煎液中 3 种成分的变化及抑菌作用的比较

陈庄元¹, 董立莎¹, 曹佩雪^{1,2}, 梁光义^{1,2,*}

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550002)

摘要: 目的 考察分煎与合煎制备的栀子金花汤中盐酸小檗碱、黄芩苷和栀子苷的含量变化及其抑菌作用。方法 采用 HPLC 法测定盐酸小檗碱、黄芩苷及栀子苷; HPLC - MS 法比较分煎与合煎中指标成分峰的变化; 采用体外抑菌测试不同栀子金花汤煎液的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度。结果 分煎液中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量显著高于合煎液, 合煎液中栀子苷的含量显著高于分煎液。两者的色谱图和质谱图中, 峰个数与出峰时间无差异。合煎液对大肠杆菌和青霉菌有抑菌作用。结论 分煎与合煎栀子金花汤引起指标成分含量的显著变化, 但无新成分的产生。

关键词: 栀子金花汤; 盐酸小檗碱; 黄芩苷; 栀子苷; 煎液; 高效液相色谱法; 液 - 质联用法; 体外抑菌

中图分类号: R917, R963

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0103 (2008) 02 - 0135 - 03

Content changes of three components in different decoctions of Zhizi Jinhua tang and comparison their bacteriostatic effects

CHEN Zhuang - yuan¹, DONG Li - sha¹, CAO Pei - xue^{1,2}, LIANG Guang - yi^{1,2,*}

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the content change of berberine hydrochloride, baicalin and geniposide between the mixed decoction (mix the traditional Chinese herbs together and then boil in water) and the separated decoction (to boil the single traditional Chinese herbs in water separately and then mix them together) of Zhizi Jinhua Tang and study the bacteriostatic effects. **METHODS** The berberine hydrochloride, baicalin and geniposide were determined by HPLC method, and compared the peaks of index components in the mixed decoction and the separated decoction were compared by HPLC - MS method, individually. The bactericidal concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of different decoctions in Zhizi Jinhua Tang bactericidal was tested by the external bactericidal inhibitory method. **RESULTS** The average contents of berberine hydrochloride and baicalin in the separated decoction were significantly higher than those in the mixed decoction, however, the average content of geniposide in the mixed decoction was significantly higher than that in the separated decoction. The number of peak and retention time had no differences in the chromatograms and mass spectromograms. The mixed decoction had bacteriostatic effect on *Escherichia coli*, but the separated decoction had bacteriostatic effect on *Penicillium*. **CONCLUSION** Mixed decoction and separated decoction of Zhizi Jinhua Tang could significantly change the index components' contents without produce the new components.

Key words: Zhizi Jinhua tang; Berberine hydrochloride; Baicalin; Geniposide; Decoction; HPLC; LC - MS; Anti - bacterial activities *in vitro*

CLC number: R917, R963

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103 (2008) 02 - 0135 - 03

栀子金花汤由黄连、黄柏、黄芩、栀子、大黄组成,具泻火解毒之功效,主治实热火毒、三焦热盛兼大便秘结之证。中药合煎液和分煎液的药效学和临床对比研究已有报道^[1,2],但其化学组成的研究则较少。现采用 HPLC 法和 LC - MS 法比较栀子金花汤合煎液和分煎液中指标成分的含量差异,考察两种煎液对多种菌株的体外抑制作用。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂、菌种和培养基

HP1100 型高效液相色谱仪包括 HP1100 LC -

MS 高效液相色谱 - 电喷雾质谱联用仪、Chem station 色谱工作站 (美国惠普)。栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis、黄连 *Coptis chinensis* Franch、黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi、黄柏 *Phellodendron chinense* Schneid 及大黄 *Rheum palmatum* L. 由贵阳中医学院董立莎教授采购并鉴定,符合《中国药典》2005 年版各项规定;盐酸小檗碱 (批号: 110713 - 200208)、黄芩苷 (批号: 715 - 200010)、栀子苷 (批号: 749 - 200108, 中国药品生物制品检定所);乙腈为色谱纯;其余试剂为分析纯;水为纯净水。金黄色葡萄球菌 (A)、乙型溶血性链球菌 (B)、白色葡萄球菌 (C)、

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (批准号: 30460154)

作者简介:陈庄元 (1981 -),男,吉林四平,正攻读中药学专业的硕士学位。

* 通讯作者 (Correspondent author), E - mail: guangyi_liang@21cn.com

大肠杆菌 (D)、青霉菌 (E)和其他菌种 (F) (包括变形杆菌、伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌、绿脓杆菌、白色念珠菌、黑曲霉菌) (贵阳中医学院微生物检测室)。采用普通肉汤培养基、普通营养琼脂、血琼脂平板、沙氏琼脂培养基和沙氏液体培养基等。

1.2 含量测定

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Extend C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm)。测定盐酸小檗碱的流动相为乙腈 - 0.08%磷酸二氢钾 (含 0.08%三乙胺和 7%四氢呋喃, 磷酸调 pH3.0) (15:85); 检测波长 346 nm; 流速 0.8 ml·min⁻¹; 柱温 28℃; 进样量 5 μl。测定黄芩苷的流动相组成比例改为 20:80; 检测波长 278 nm, 流速 0.9 ml·min⁻¹; 柱温 28℃; 进样量 10 μl。测定栀子苷用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (250 mm ×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 水 (15:85)^[4], VWD 检测波长 238 nm; 流速 0.9 ml·min⁻¹; 柱温 28℃; 进样量 10 μl。

1.2.2 溶液的制备 称取 30 g 黄连、20 g 黄柏、20 g 黄芩、30 g 栀子、30 g 大黄混合, 加 8.5 倍水, 浸泡 1 h, 煎煮保持微沸 1 h, 趁热滤出煎液; 药渣再加 8.5 倍水, 煎煮保持微沸 1 h, 趁热过滤, 合并两次煎液, 将煎液减压浓缩, 干燥制成干膏, 研细, 得合煎粉末。精密称取合煎粉末 0.1 g, 置 100 ml 量瓶中, 加 75% 甲醇 95 ml, 超声处理 30 min, 冷却, 以 75% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得合煎供试品溶液。

称取 90 g 黄连、60 g 黄柏、60 g 黄芩、90 g 栀子、90 g 大黄分置不同的容器中, 按合煎供试品溶液药水比例加水同法浸泡、煎煮并制备得到各单味药的干粉。分别称取 2.35 g 干粉黄连、1.24 g 黄柏、4.29 g 黄芩、3.64 g 栀子、6.49 g 大黄混匀, 相当于生药组方量 65 g, 制成分煎混合粉末。精密称取 0.1 g 分煎混合粉末, 按合煎供试品溶液的制法制备, 得分煎供试品溶液。

对照品经五氧化二磷减压干燥至恒重, 精密称取适量, 以甲醇溶解制成 0.4018 mg·ml⁻¹ 的盐酸小檗碱对照品溶液; 以 75% 甲醇分别溶解制成 0.2690 mg·ml⁻¹ 的黄芩苷对照品溶液和 0.1412 mg·ml⁻¹ 的栀子苷对照品溶液。以上溶液按“1.2.1 项下各色谱条件进样分析 (图 1)。

1.2.3 线性关系的考察 分别精密吸取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml “1.2.2 项下 3 种对照品溶液”, 分别置 10、10、2 ml 量瓶中, 加相应溶剂定容, 摇匀。精密吸取各浓度溶液进样, 测定相应成分的峰面积, 以峰面积积分值为纵坐标、进样量 (μg) 为横坐标, 进行线性回归, 回归方程为: $Y_{\text{小檗碱}} = 4.059 \times 10^3 X - 4.638$ ($r = 0.9999$), 线性范围 0.0197~0.1970 μg; $Y_{\text{黄芩苷}} = 3.513 \times 10^3 X - 12.850$ ($r = 0.9999$), 线性范围

0.0534~0.5340 μg; $Y_{\text{栀子苷}} = 2.250 \times 10^3 X - 1.692$ ($r = 0.9998$), 线性范围 0.0706~0.7060 μg。

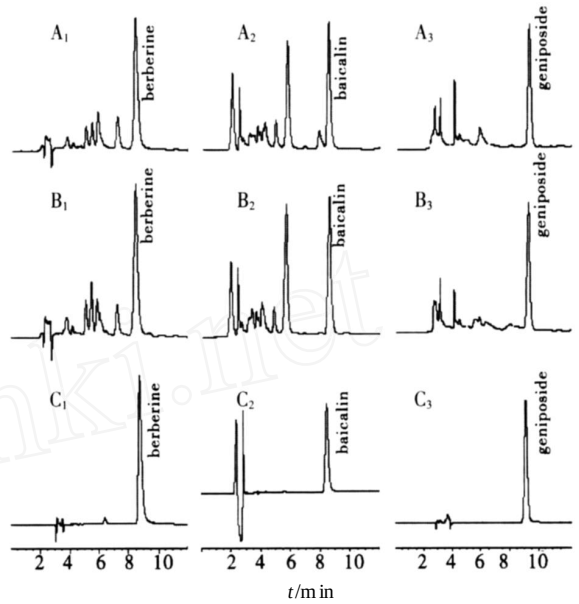


图 1 分煎液 (A)、合煎液 (B) 和对照品 (C) 在小檗碱 (1)、黄芩苷 (2) 和栀子苷 (3) 各自色谱条件下的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of separated decoction (A), mixed decoction (B) and reference substance (C)

1.2.4 精密度试验 分别精密吸取盐酸小檗碱、黄芩苷、栀子苷对照品溶液, 连续进样 6 次, 在各成分相应的色谱条件下测定峰面积, 其 RSD 依次为 0.68%、0.19%、0.43%。

1.2.5 稳定性试验 取同一分煎供试品溶液, 每隔一定时间进样测定, 盐酸小檗碱、黄芩苷、栀子苷各成分峰面积的 RSD 依次为 1.39% ($n = 7$)、0.32% ($n = 10$)、1.18% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 9 h 内稳定性良好。

1.2.6 重复性试验 取同一批分煎样品干粉, 按“1.2.2 项下供试品溶液制备方法平行处理 6 份, 分别测定并计算各成分的含量, 干粉中盐酸小檗碱、黄芩苷、栀子苷的平均含量分别为 3.00% ($RSD = 1.75\%$)、4.15% ($RSD = 1.69\%$)、3.50% ($RSD = 1.51\%$)。表明重复性良好。

1.2.7 回收率试验 精密称取分煎粉末适量, 分别精密加入盐酸小檗碱、黄芩苷和栀子苷对照品溶液, 按供试品溶液制备方法处理, 同法测定, 盐酸小檗碱、黄芩苷、栀子苷的平均回收率分别为 99.54% ($RSD = 3.03\%$, $n = 9$)、99.25% ($RSD = 2.55\%$, $n = 6$)、98.78% ($RSD = 2.10\%$, $n = 6$)。

1.2.8 样品的测定 按“1.2.2 项下供试品溶液制备方法制备药材合煎液与分煎液, 分别平行制备 5 份, 按“1.2.1 项下色谱条件, 采用峰面积外标法测定 3 种成分的含量。合煎液中盐酸小檗碱、黄芩苷、栀子苷的平均含量分别为 0.55%、0.92%、1.03% (分别

以含有该成份的药材计,其中黄连、黄柏都含有盐酸小檗碱,则以二者总的投料量计);分煎液中,3 种成分的平均含量分别为 0.66%、1.00%、0.96%。对结果进行无重复双因素方差分析,分煎液与合煎液中,盐酸小檗碱和黄芩苷的含量具有极显著性差异 ($P < 0.01$),栀子苷的含量具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

1.2.9 色谱和质谱条件 Agilent Extend C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.1%三氟乙酸,梯度洗脱 (表 1);柱温 28℃;流速 0.8 ml·min⁻¹;检测波长 326 nm;进样量 5 μl;离子化方式 ESI(Pos);全扫描采集方式,干燥气为 N₂,温度 350℃;流速 10 L·min⁻¹;毛细管电压 4 kV;碰撞诱导解离电压 70 eV。液相色谱峰和质谱峰分离效果较好。栀子苷、黄芩苷、盐酸小檗碱依次分别在 17.6、34.5、40.8 min 出峰 (图 2)。

表 1 梯度洗脱顺序 (%)

成份	0 min	7 min	14 min	21 min	28 min	35 - 49 min	56 - 66 min
A	5	10	15	20	25	30	35
B	95	90	85	80	75	70	65

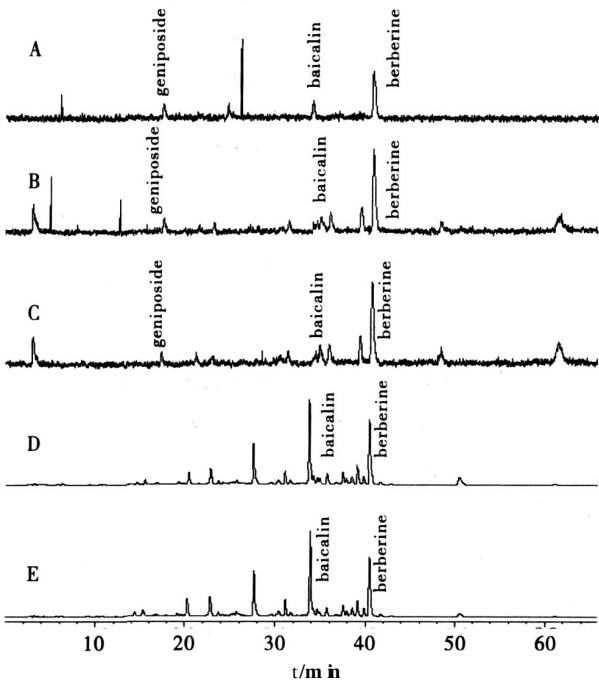


图 2 对照品溶液 (A)、分煎液 (B) 和合煎液 (C) 的质谱图与分煎液 (D) 和合煎液 (E) 的高效液相色谱图

Fig 2 Mass spectrograms of reference substance solution (A), separated decoction solution (B) and mixed decoction solution (C) and HPLC chromatograms of separated decoction solution (D) and mixed decoction solution (E)

1.3 体外抗菌试验

1.3.1 供试品溶液的制备 取适量栀子金花汤合煎及分煎干粉,分别加沸水冲泡,冷却至室温,配成 0.5 g·ml⁻¹ 复方生药的分煎液与合煎液。

1.3.2 抗菌强度试验 采用常规琼脂扩散管碟法定性测定抗菌强度 (接种试验菌液 0.1 ml, 药液 200 μl)。每一菌株取干净试管 10 支,于第 1 管加入药液和相应培养液各 1 ml,将第 1 管中药液混匀后沿 2~8 管做等倍稀释。第 9 管只加稀释菌液 1.05 ml 作阳性对照,第 10 管只加相应培养液 1.05 ml 作阴性对照。分别吸取稀释菌液 0.05 ml,加入第 1~8 管,混匀。常规培养后观察,结果见表 2。

表 2 抗菌强度的定性、定量结果 (cm)

Table 2 Results of antibacterial activities test (cm)							
Decoction	Items	A	B	C	D	E	F
Mixed	D	1.6	1	1.6	1.2	0	0
	MIC	0.125	0.125	0.125	0.125	-	-
	MBC	0.25	-	0.25	-	-	-
Separated	D	1.6	1	1.6	0	0.6	0
	MIC	0.125	0.125	0.125	-	0.25	-
	MBC	0.25	-	0.25	-	-	-

“ - ” means bacteria grew well

2 讨论

LC-MS 检测以乙腈 - 0.1%三氟乙酸为流动相梯度洗脱。326 nm 时,盐酸小檗碱、黄芩苷和栀子苷等成分的液相色谱峰和质谱峰均能较好地分离。合煎与分煎样品的色谱图和质谱图无成分峰的相对变化,只可能在各成分的比例关系上有差异。

实验表明,分煎液中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量显著高于合煎液,可能因小檗碱与黄芩苷合煎产生沉淀、或小檗碱与大黄酸等酸性成分发生中和反应。合煎液中栀子苷的含量显著高于分煎液,初步推断是合煎助溶作用提高了栀子苷的溶出率。

黄连、黄柏的体外抑菌活性成分是小檗碱^[3]。黄芩的水煎液对多种菌株有体外抑制作用,其主要成分是黄芩苷^[4]。表 2 显示,合煎液对大肠杆菌有抑菌作用,而分煎液无此作用,分煎液对青霉菌有抑菌作用而合煎液无此作用。但分煎液中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量要显著高于合煎液,说明复方的抑菌作用是由方中多种成分共同作用的结果,或者抑菌作用与成分组成及含量有关。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典 [S]. 北京:化学工业出版社, 2005. 73.
[2] 梁光义,杨翀,周静宜,等. HPLC 测定三拗汤不同煎液中麻黄碱的含量并比较其体外的抗菌作用 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22 (2): 131 - 133.
[3] 金建玲,栾永娜,华国强,等. 含小檗碱中药的抑菌活性与小檗碱含量的关系 [J]. 中医药学报, 2005, 33 (5): 19 - 21.
[4] 任玲玲,张春枝,陈吉平,等. 黄芩的抗菌活性及 HPLC 分析 [J]. 精细化工, 2005, 22 (8): 589 - 591.

收稿日期: 2007 - 08