

• 制剂与炮制 •

煎煮方式对肉桂-黄连药对超分子的物质相态和生物活性的影响

徐冉, 王志家, 林晓钰, 魏吉昌, 赵一航, 谭心如, 汪志霞, 张留洋,
王泓力, 黄雪梅*, 王鹏龙*
(北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

[摘要] 基于中药超分子化学探讨肉桂-黄连药效成分的相互作用, 对比该药对体系在不同煎煮方式下(共同煎煮、单煎再机械混合)的相态和活性差异。通过宏观和比浊法观察该药对不同煎煮下汤剂相态差异; 运用等温滴定量热法、紫外与红外光谱分析肉桂-黄连的相互作用; 利用动态光散射法和扫描电镜测定不同煎煮方式下汤剂粒径差异; 结合肉汤稀释法、平板涂布、活死菌染色和扫描电镜进行活性评价; 最后使用 UPLC-MS/MS 进行成分分析。结果显示肉桂-黄连药对汤剂存在明显的超分子体系, 且共同煎煮组的宏观相态更稳定。该药对相互作用是熵和焓共同驱动的自发放热反应; 紫外与红外光谱说明共煎体系药效分子相互作用更加充分, 超分子结构更稳定, 且粒径更小, 分布更集中。共煎样品中小檗碱和黄连碱含量高于机械混合样品, 对金黄色葡萄球菌有更强的抑制活性。结果表明, 共同煎煮下的肉桂-黄连超分子体系相态更均匀、可测黄连碱和小檗碱含量更高、抗菌活性更强。

[关键词] 肉桂; 黄连; 超分子; 煎煮方式; 生物活性

Effect of decoction method on phase state and biological activity of Cinnamomi Cortex-Coptidis Rhizoma supramolecular

XU Ran, WANG Zhi-jia, LIN Xiao-yu, WEI Ji-chang, ZHAO Yi-hang, TAN Xin-ru, WANG Zhi-xia, ZHANG Liu-yang,
WANG Hong-li, HUANG Xue-mei*, WANG Peng-long*
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

[Abstract] Based on supramolecular chemistry of TCM, this study investigated the interaction between Cinnamomi Cortex-Coptidis Rhizoma herb pair and compared phase states and bioactivity differences under different decoction methods (co-decoction vs individual decoction followed by mechanical mixing). Phase state variations were observed macroscopically and through turbidimetry. The herb interaction was analyzed using isothermal titration calorimetry, UV and IR spectroscopy. Particle size differences were determined by dynamic light scattering and scanning electron microscopy (SEM). Antimicrobial activity was evaluated through broth dilution, plate coating, live/dead staining, and SEM. Component analysis was conducted using UPLC-MS/MS. Results revealed distinct supramolecular structures in Cinnamomi Cortex-Coptidis Rhizoma decoctions, with co-decoction showing more stable macroscopic phase states. The interaction was a spontaneous exothermic reaction driven by both entropy and enthalpy. UV and IR spectra revealed co-decoction demonstrated more sufficient molecular interactions, more stable supramolecular structures, and smaller particle sizes with a

[收稿日期] 2025-05-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82474059); 中央高校基金科研业务项目(2023-JYB-JBZD-049, 2022-XJ-KYQD-008); 国家级高层次人才支持计划项目

[通信作者] * 王鹏龙, 教授, 博士生导师, 主要从事中药复方物质基础研究, E-mail: wpl581@126.com; * 黄雪梅, 讲师, 主要从事中药炮制机制研究, E-mail: hxm3928@163.com

[作者简介] 徐冉, 硕士研究生, E-mail: pipigou06@163.com

more centralized distribution. In addition, co-decoction resulted in higher berberine and coptisine content and stronger inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* compared to mechanical mixtures. These findings indicated that co-decoction produced Cinnamomi Cortex-Coptidis Rhizoma supramolecular systems with more homogeneous phase states, enhanced measurable coptisine and berberine content, and superior antibacterial efficacy.

[Key words] Cinnamomi Cortex; Coptidis Rhizoma; supramolecular; decoction method; bioactivity

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250925.301

中药配伍煎煮时,受热力、煎煮方式等因素影响,成分之间相互作用产生超分子,形成复杂多相态体系^[1-3]。这是一个受热力学驱动的复杂变化过程^[4-5]。煎煮时,超分子的产生往往改变有效成分的溶出行为,并影响生物活性,例如大黄-黄连配伍时,超分子的缓释作用平和了黄连的苦寒之性^[6];甘草-附子配伍时,甘草酸参与的组装促进了附子生物碱的转化而减毒^[7];甘草-芫花共煎产生超分子颗粒,促进芫花酯甲溶出而增毒^[8];关木通、广防己与黄连配伍产生的超分子抑制了马兜铃酸溶出,降低肾毒性^[9-10]。

肉桂-黄连配伍首出于《韩氏医通》,主治心肾不交证^[11]。在该药对中,肉桂水提物对金黄色葡萄球菌等病原菌具有明显的抑菌活性^[12-13],黄连作为广泛应用的清热解毒药,抗金黄色葡萄球菌活性被广为人知^[14]。有大量报道发现,肉桂和黄连配伍煎煮时,成分会发生竞争性溶出抑制,其中一味药比例越大,另一味药煎出率则越小^[15-21]。有学者猜测^[11],肉桂酚酸与黄连生物碱相互作用生成沉淀,导致煎出率下降。因此,肉桂和黄连的饮片单煎液合并后,小檗碱和肉桂醛等有效成分含量明显高于饮片共煎汤剂^[22]。HUANG X M 等^[23]通过自组装方式获得肉桂酸-小檗碱纳米粒,发现其可有效抑制金黄色葡萄球菌,表明肉桂和黄连的有效成分会相互作用形成超分子结构并改善原有活性。目前,不同煎煮方式下肉桂-黄连药对水煎液的相态和生物活性差异存在与否及其承接关系,尚缺乏系统的研究。

本研究利用动态光散射法和比浊法比较肉桂-黄连共煎与机械混合的宏/微观差异;使用紫外和红外光谱表征不同煎煮方式样品的光谱学差异;通过等温滴定量热法揭示药对的相互作用能力;考虑到肉桂和黄连的抗菌活性,选用金黄色葡萄球菌为研究模型,对比共煎与机械混合的抗菌活性。利用 UPLC-MS/MS 明确煎煮方式对样品中游离有效成分含量的影响。本研究以中药超分子为切入点,阐

释了肉桂-黄连配伍在不同煎煮方式影响下的物质相态、成分含量及活性差异,为进一步探究中药合理使用提供了依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

黄连[中国北京同仁堂(集团)有限责任公司,批号 200301001];肉桂(北京仟草中药饮片有限公司,批号 24040301);金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538P, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司);营养肉汤(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司,批号 20230318);营养琼脂(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司,批号 20231117);Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 A084241127);色谱甲醇(美国赛默飞世尔科技公司,批号 F2409N213);色谱乙腈(安徽泽生科技股份有限公司,批号 NOD3RREC)。

1.2 仪器

浊度仪(型号 YKM-FZD, 上海佑科仪器有限公司);双光束分光光度计(型号 UH5300, 日本 HITA-CHI 公司);傅里叶变换红外光谱仪(型号 ALPHA II, 美国 Bruker 公司);马尔文粒度仪(型号 Zetasizer Nano ZEN3700, 英国马尔文仪器有限公司);全波长酶标仪(型号 BioTek Epochh, 上海菲特科学器材有限公司);等温滴定量热仪(型号 NANO ITC, 美国 TA 公司);冻干机(型号 SCIENTZ-18N/A, 宁波新芝生物科技股份有限公司);超高效液相色谱串联质谱仪(型号 SCIEX Triple Quad 4500, 美国 SCIEX 公司);激光扫描共聚焦显微镜(型号 FV3000, 日本奥林巴斯株式会社);扫描电镜(型号 GeminiSEM 460, 德国卡尔蔡司公司)。

2 方法

2.1 肉桂和黄连单煎液冻干粉的制备

分别将 10 g 肉桂和黄连药材用煎药袋包好后置于圆底烧瓶中,先后用 10、8 倍质量水加热回流

40 min 过滤煎液后合并冻干,获得肉桂冻干粉和黄连冻干粉。

2.2 肉桂-黄连配伍样品的制备

按精确称取黄连冻干粉和肉桂冻干粉各 30 mg,混匀后加水 10 mL 分散。将其加热回流 40 min 后,获得 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肉桂-黄连共煎样品(DEC)。

分别等量称取黄连冻干粉和肉桂冻干粉 60 mg,加水 10 mL 分散,加热回流 40 min 后,放凉至室温,随后按照 1:1 体积比充分混匀,获得 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肉桂-黄连机械混合样品(MIX)。两样品中各味药浓度一致且均现制现用。

2.3 肉桂-黄连配伍相互作用的宏、微观形貌表征

将制备好的肉桂-黄连配伍样品(DEC 和 MIX)混匀后立刻放入浊度仪中,记录 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 的浊度数据,观察浊度随时间的变化情况;将样品稀释 5 倍后放入马尔文粒度仪中检测粒径(动态光散射法),比较 MIX 与 DEC 的粒径与分布情况;取少量样品滴在洁净硅片上,充分干燥后喷金,用扫描电镜(SEM)观察微观形貌。

2.4 等温滴定量热测定

制备质量浓度 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄连单煎液(RC)和 $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的肉桂单煎液(CC),加热溶解后用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,在脱气站中脱气 30 min,取 300 μL CC 到反应池,用 50 μL RC 进行滴定,以 RC 滴定去离子水作空白对照。每次滴定时间间隔为 180 s,滴定 20 次,转速 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 25°C 。滴定结束后,用 NanoAnalyze 软件处理数据,计算拟合曲线,得到焓变(ΔH)、熵变(ΔS)、吉布斯自由能(ΔG)、结合常数(K_a)、解离常数(K_d)等热力学参数。

2.5 光谱测定

将制备好的 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DEC 和 MIX 样品用去离子水稀释 80 倍后于紫外分光光度仪上进行光谱扫描,扫描范围 200~600 nm,将获取的数据进行归一化处理后绘图分析。

DEC 和 MIX 制备完成后,迅速冻干,得到两样品的冻干粉后,取少量粉末置于红外光谱仪载样台,压片,进行光谱扫描,扫描范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$,数据归一化后绘图分析。

2.6 肉桂-黄连配伍样品对金葡菌的抗菌活性差异

2.6.1 金黄色葡萄球菌悬液制备 用接种环将细菌母液接种到营养琼脂上,于 37°C 培养箱培养 18 h 后挑取单菌落放入营养肉汤培养基中,再于 37°C 恒

温振荡培养箱 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 24 h,涂布计数后用营养肉汤稀释菌液浓度至 $2.0 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,置于 4°C 冰箱备用。

2.6.2 肉汤稀释法评价抗菌活性 取 DEC 与 MIX 分别至 48 孔板中,用营养肉汤稀释至浓度梯度为 250、200、150、100、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,另设对照组和空白组。再加入 10 倍稀释的细菌悬液,培养 12 h 后,在 600 nm 下测吸光度。细菌抑制率 = $[1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

随后,从孔板中取 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的菌液,稀释 10×10^4 倍后取 100 μL 涂布于营养琼脂板上,孵育 18 h 后拍照。

2.6.3 扫描电镜观察细菌形态 在 12 孔板中加入样品,用营养肉汤将浓度稀释至 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,再加入稀释后的菌悬液,培养 8 h 后,在 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,获得细菌。将细菌用 PBS 清洗 3 次后,加入体积分数为 2.5% 的戊二醛固定 4 h,再用 PBS 洗涤 3 次,采用梯度浓度乙醇(30%、50%、70%、80%、85%、90%、95%、100%)分别洗脱,每次脱水 10 min,滴样,待充分干燥后喷金,在 SEM 下观察 DEC 与 MIX 干预后的细菌形态学变化。

2.6.4 活死菌染色 在 12 孔板中加入 100 μL 稀释菌液与 1 mL 营养肉汤,预培养 12 h 后,加入待测样品,为防止细菌过多而提前耗尽营养死亡,额外补充 1 mL 营养肉汤,共培养 12 h。随后弃掉肉汤,保留孔底菌膜。按照说明书配制活死菌染色工作液,每孔滴加 100 μL ,避光反应 30 min 后用荧光显微镜观察并拍照。

2.7 UPLC-MS/MS 对样品的主要成分分析与含量比较

制备等量的 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肉桂-黄连 DEC 和 MIX,取 300 μL ,用 600 μL HPLC 级甲醇进行稀释;将等量煎煮液和机械混合液以 $4500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,分离上清液和沉淀,上清液以相同方法处理;沉淀加入等量甲醇并超声处理 30 min;所有样品过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,移至液相小瓶中待测。

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱($2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$);流动相为乙腈(A),0.1%甲酸-水(B);洗脱梯度(0~30 min 2%~98% A;30~33 min 98% A;33~34 min 98%~2% A;34~40 min 2% A);流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 35°C ;进样量 5 μL 。

质谱条件: 利用 ESI 源在正离子模式下采集信息。毛细管温度和辅助气体加热器的温度均设置为 350 ℃。扫描模式为 Full MS, 分辨率为 10 000, 扫描范围 m/z 100~1 500。

数据处理: 对肉桂醛、小檗碱和黄连碱对应的一级质谱峰进行积分, 对比峰面积大小。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, 测量值以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较使用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 肉桂-黄连煎煮液的宏观相态

肉桂和黄连的单煎液冻干粉复溶后与其单煎液相比呈现为均匀的浑浊相态, 而两者于室温下一旦混合, 便产生明显絮状物, 并很快聚沉分层, 这提示肉桂、黄连之间存在相互作用, 可形成明显的超分子

聚集态。而将肉桂、黄连进行共煎后, 发现汤剂又呈现为相对稳定的均一相态, 见中国知网本文增强出版附加材料, 表明单煎后再室温混合和共煎后的超分子相态差异显著, 即煎煮方式是影响肉桂-黄连之间相互作用的关键因素。

3.2 等温量热滴定法表征肉桂-黄连相互作用情况

黄连滴定肉桂并扣除滴定去离子水的滴定曲线(图 1) 滴定曲线峰朝上, 说明黄连与肉桂之间的反应是放热反应。对滴定峰拟合, 所得热力学参数分别为 $\Delta H = -9.68 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $\Delta S = 50.66 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 、 $K_a = 2.20 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $K_d = 4.46 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 根据热力学第二定律公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 计算, $\Delta G = -24.79 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} < 0$, 表明黄连与肉桂之间的反应是自发进行的。 $-T\Delta S = -15.10 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} < 0$, $\Delta H < 0$ 且 $|\Delta H| < |-T\Delta S|$, 说明两者的反应是熵和焓共同驱动的发反应。

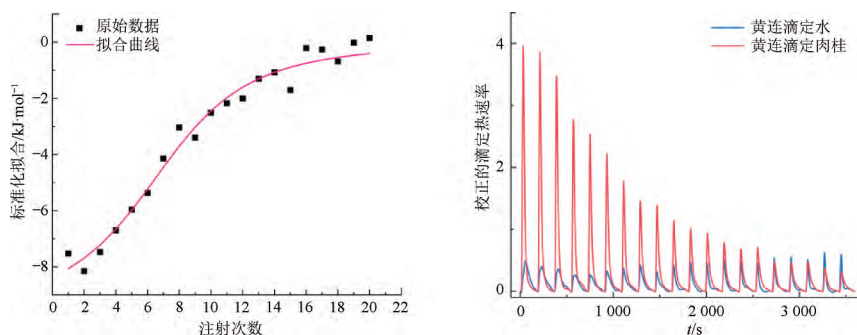


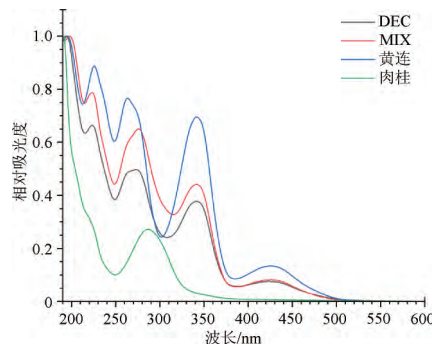
图 1 肉桂-黄连药对相互作用的表征

Fig.1 Characterization of interaction between Cinnamomi Cortex-Coptidis Rhizoma herb pair

3.3 肉桂-黄连配伍相互作用的光谱表征

通过紫外光谱表征 4 组样品, 分析相互作用情况(图 2)。黄连单煎液在 226、264、342 nm 处存在特征峰, 肉桂单煎液在 289 nm 处存在特征峰, 肉桂-黄连配伍后的紫外光谱均表现出黄连的峰形, 并且 264 nm 处的吸收峰红移至 274~276 nm, 302 nm 处的吸收谷红移至 308~316 nm。提示肉桂和黄连之间的相互作用影响了紫外光谱吸收。

对 MIX 和 DEC 进行红外表征(图 3), 发现两者在 $3\ 300 \sim 3\ 200 \text{ cm}^{-1}$ 处的羟基峰和 $3\ 000 \sim 2\ 900 \text{ cm}^{-1}$ 处的 C-H 伸缩振动峰存在差异。相较于 MIX 样品, DEC 样品在此处的峰位是向低波数移动(红移), 羟基峰从 $3\ 260 \text{ cm}^{-1}$ 位移至 $3\ 249 \text{ cm}^{-1}$, 移动 11 cm^{-1} ; C-H 伸缩振动峰从 $2\ 932 \text{ cm}^{-1}$ 位移至 $2\ 913$



DEC.肉桂-黄连共煎样品; MIX.肉桂-黄连机械混合样品(图 3~8、表 2 同)。

图 2 样品紫外光谱

Fig.2 Ultraviolet spectra of samples

cm^{-1} 移动了 19 cm^{-1} 。氢键是药对相互作用形成超分子的重要驱动力^[24]。当分子在易形成氢键的位

置如羟基上发生组装时,羟基偶极矩发生变化,使羟基峰吸收强度增大和红移,氢键越强,这种变化越明显^[25]。红外表征的结果说明煎煮使药对发生了更加充分的相互作用,致使超分子结构与机械混合相比更加稳定。

3.4 肉桂-黄连超分子的微观形貌表征

将 MIX 和 DEC 进行浊度测定(图 4)后发现,DEC 浊度为($1\,810.67 \pm 2.08$) NTU,明显高于 MIX ($1\,137.33 \pm 10.02$) NTU,这是因为机械混合时产生的超分子较为大块疏松,结构之间存在空隙,使大量光线通过;而共煎时产生了均匀的细小颗粒,反而充分阻隔了光路。将样品长时间放置时,浊度会随着自身颗粒沉降而逐渐减小,样品颗粒越细小,沉降速率越慢。静置 3 h 后,DEC 浊度仅下降约 80 NTU,而 MIX 在 30 min 时浊度便下降至 154.93 NTU,60 min

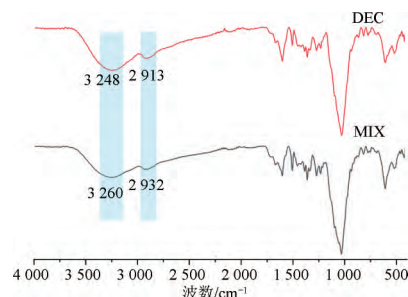


图 3 样品红外光谱

Fig.3 Infrared spectra of samples

时基本完成沉降并且趋于稳定,即 MIX 在短时间内快速沉降,而 DEC 在相同时间内沉降速率显著慢于前者。相较于 MIX,DEC 的浊度下降速度更慢且幅度更小,说明 DEC 中药对的酚酸类成分与生物碱在煎煮时形成了更加细小的超分子颗粒。

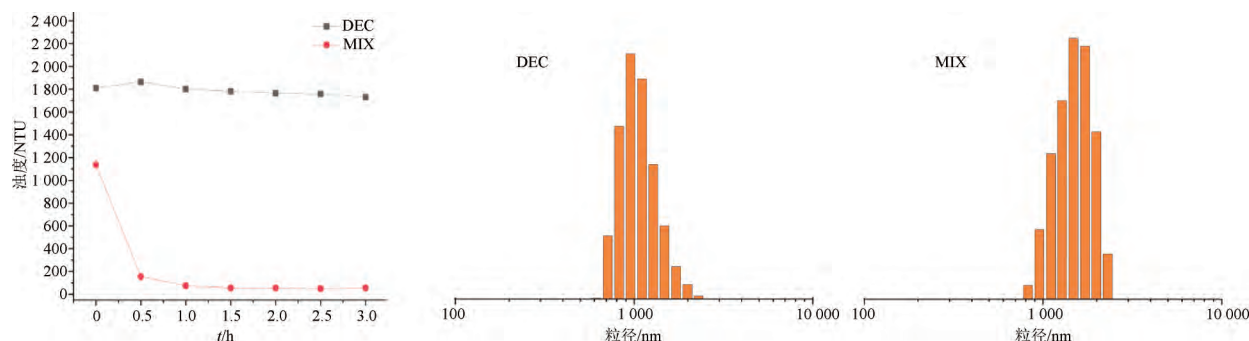


图 4 样品的光散射法表征

Fig.4 Characterization of samples by light scattering method

通过动态光散射法对 DEC 和 MIX 的粒径进行表征(图 4),发现 DEC 超分子的平均粒度($1\,186 \pm 50.95$) nm (PDI = 0.274),MIX 平均粒度($3\,242 \pm 211.2$) nm (PDI = 0.483) 相比之下,DEC 超分子的平均粒度与 PDI 均小于 MIX,说明煎煮下的超分子颗粒更加细小、均匀。同时丁达尔效应显示,DEC 的丁达尔现象更加明显,光路边缘清晰,溶液中发生了散射,见中国知网本文增强出版附加材料;而 MIX 的光路边缘有明显颗粒,并且没有散射发生,总体弱于 DEC,进一步佐证了上述结果。

为进一步明确 DEC 与 MIX 微观形貌,通过电镜图像来表征样品粒径情况。在扫描电镜下(图 5)观察发现,DEC 中存在形貌均匀的球形颗粒,粒径约 200 nm,而在 MIX 中则可以观察到类似纤维的大团交联结构。通过以上数据表明,类似于众

多酸碱药对如黄连-黄芩、黄连-大黄等,肉桂和黄连之间存在明显的相互作用,在常温下机械混合会形成大团交联的絮状超分子结构,而加热共煎的过程促进了药对成分的相互作用,且在分子尺度下表现出聚集的同时,也因热力驱动在宏观尺度下被充分分散,最终形成更加细小的颗粒,宏观表现为均匀的浑浊态。

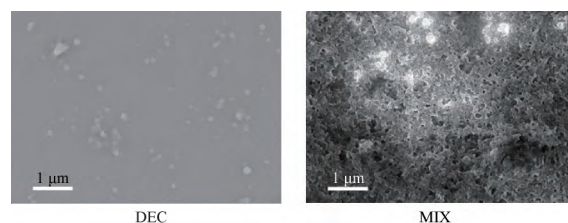


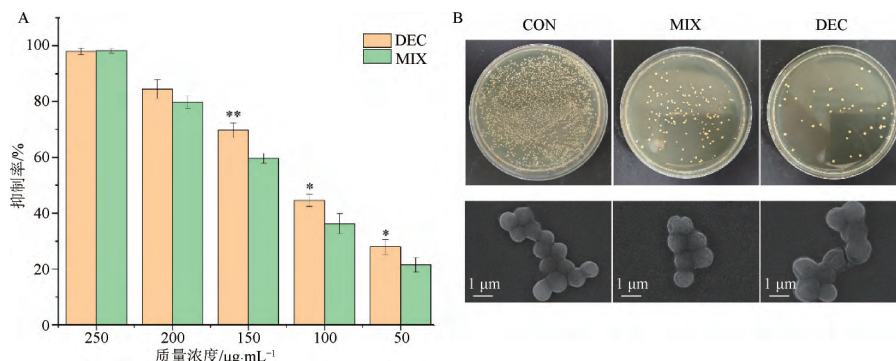
图 5 样品的扫描电镜图像

Fig.5 Scanning electron microscope images of samples

3.5 肉桂-黄连配伍的抑菌活性评价

考察 DEC、MIX 对金黄色葡萄球菌的抑制(图 6) 在 50~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DEC 和 MIX 对金黄色葡萄球菌均表现出相同的抑制趋势,即随着浓度增大,细菌抑制率随之增

强,呈现剂量依赖性。但在 50~150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DEC 抑制率均显著高于 MIX。平板涂布结果(图 6) 也出现相同现象。说明在体外抗菌模型中,肉桂-黄连药对共煎煮后,抑菌活性优于 2 个单味药的机械混合。



CON.对照(图 7 同)。与 MIX 相比* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 6 DEC、MIX 的抗金黄色葡萄球菌活性评价($\bar{x}\pm s$ $n=4$)

Fig.6 Evaluation of activity of DEC and MIX samples against *Staphylococcus aureus* ($\bar{x}\pm s$ $n=4$)

在细菌电镜(图 6)中也可观察到类似现象,对照组细菌总体呈球形,细胞壁表面光滑。DEC 与 MIX 细菌的细胞壁表面均出现数处褶皱,说明两样品均可对细胞壁产生破坏作用,从而抑制细菌生长。而 DEC 组细胞壁的褶皱更加明显,提示煎煮样品对细菌产生了更强的杀伤,对细胞壁破坏作用更强烈,说明煎煮有利于提高肉桂-黄连药对的抗菌活性。

在活死菌荧光染色结果(图 7)中可观察到,肉桂-黄连共煎液中绿色荧光(活菌)较少,而红色荧光(死菌)较多,提示大量细菌发生破损,使红色染料进入菌体。而机械混合样品中绿色荧光较多,红色荧光较少,提示肉桂-黄连机械混合后,抗菌活性欠佳,而共煎则具有相对好的活性。这与比浊法和平板涂布法结果相印证。由此说明,不同煎煮方式不仅会影响饮片煎液的宏观超分子相态,还会进一步导致活性的差异。

3.6 肉桂-黄连配伍煎煮与机械混合的成分组成和含量比较

前述研究已证明肉桂-黄连存在确切的相互作用,煎煮操作直接影响了其相互作用程度,使体系在宏观相态、微观尺度和生物活性上与单纯的机械混合操作存在明显差异。为了进一步探索活性差异的来源,以及宏、微观的物理状态影响生物活性的原因,使用 UPLC-MS/MS 对样品进行了解析(表 1)。

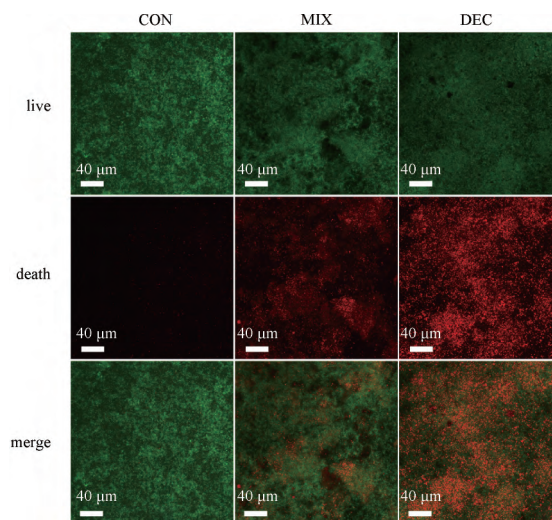


图 7 细菌活死染色

Fig.7 Bacterial live/dead staining results

通过总离子流图(图 8)可以发现,无论煎煮还是机械混合,其全方、上清液和沉淀的化学成分种类基本一致,均为黄连生物碱和肉桂醛等代表性物质,说明热力学作用不会使药对体系中产生新物质。通常情况下,样品中的成分含量与活性直接相关,那么煎煮就可能通过改变超分子尺寸,进而影响游离成分含量来改变活性,为此,有必要对样品进行含量分析。

在总离子流图中,对某一成分的质谱峰进行积

表 1 肉桂-黄连超分子的质谱解析

Table 1 MS analysis of Cinnamomi Cortex-Coptidis Rhizoma supramolecule

No.	t/min	化合物	分子式	模式	理论值	实测值	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子
1	3.35	苯丙氨酸	$C_9H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	166.086 2	166.086 3	0.60	120.080 9 ,103.054 6 ,91.054 7 ,77.039 4
2	3.83	丹参素	$C_9H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	197.045 5	197.045 1	-2.03	179.935 6 ,135.044 1 ,123.044 0
3	3.89	异香草酸	$C_8H_8O_4$	$[M-H]^-$	167.034 9	167.034 3	-3.59	152.010 6 ,151.025 3 ,123.044 0 ,108.020 5
4	4.54	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 8	353.088 2	1.13	163.940 6 ,145.049 7 ,117.927 4
5	4.54	新绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 8	353.088 2	1.13	191.055 5 ,179.034 2 ,161.023 4 ,135.044 0 , 111.043 8
6	5.67	木兰箭毒碱	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	$[M]^+$	314.175 6	314.174 8	-2.55	269.118 5 ,237.090 5 ,209.096 4
7	5.79	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	193.050 6	193.049 7	-4.66	177.032 7 ,161.022 7 ,137.023 3
8	6.02	儿茶素	$C_{15}H_{14}O_6$	$[M-H]^-$	289.070 7	289.070 8	0.35	271.060 2 ,245.092 2 ,203.070 0 ,151.040 6
9	6.67	木兰花碱	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	$[M]^+$	342.170 0	342.170 0	0	297.111 8 ,282.088 1 ,265.085 4 ,237.090 7
10	7.21	木兰花碱葡萄糖苷	$C_{26}H_{34}NO_9^+$	$[M]^+$	504.222 7	504.222 4	-0.59	342.169 9 ,297.112 9
11	7.32	8,9-二去甲基表小檗碱	$C_{18}H_{14}NO_4^+$	$[M]^+$	308.092 3	308.091 6	-2.27	280.096 3 ,278.080 9 ,265.072 8
12	7.71	二氢药根碱	$C_{20}H_{22}NO_4^+$	$[M]^+$	340.154 9	340.154 3	-1.76	325.130 1 ,324.122 4 ,310.106 0 ,308.128 0 , 280.132 4
13	7.90	蝙蝠葛任碱	$C_{21}H_{26}NO_4^+$	$[M]^+$	356.186 1	356.185 4	-1.97	311.126 8 ,251.104 5
14	8.01	肉桂醇-6'-O- α -呋喃-O- β -吡喃葡萄糖苷	$C_{20}H_{28}O_{10}$	$[M-H]^-$	427.161 0	427.161 3	0.70	293.088 4 ,233.154 4 ,191.055 6 ,161.023 8 , 149.023 5 ,125.023 5
15	8.04	去亚甲基小檗碱葡萄糖苷	$C_{25}H_{28}NO_9^+$	$[M]^+$	486.176 4	486.175 8	-1.23	324.122 4 ,308.090 5
16	8.30	去亚甲基小檗碱	$C_{19}H_{18}NO_4^+$	$[M]^+$	324.123 6	324.123 0	-1.85	309.099 1 ,294.075 7 ,266.080 6
17	8.49	小檗红碱	$C_{19}H_{16}NO_4^+$	$[M]^+$	322.107 4	322.107 5	0.31	307.083 6 ,294.075 3 ,279.088 6
18	8.52	11-羟基-格兰地新	$C_{19}H_{16}NO_5^+$	$[M]^+$	338.102 3	338.101 9	-1.18	322.107 5 ,310.106 8 ,306.076 1
19	8.77	氧化小檗碱	$C_{20}H_{17}NO_5$	$[M+H]^+$	352.117 9	352.117 9	0	337.092 9 ,322.070 7 ,308.091 4 ,294.075 4
20	8.86	二氢巴马汀	$C_{21}H_{23}NO_4$	$[M+H]^+$	354.170 0	354.169 8	-0.56	339.143 8 ,338.138 0 ,324.121 3 ,322.140 3 , 310.098 0
21	9.45	非洲防己碱	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	$[M]^+$	338.138 7	338.138 5	-0.59	322.106 4 ,308.091 5 ,294.112 8 ,279.084 7
22	9.56	表小檗碱	$C_{20}H_{18}NO_4^+$	$[M]^+$	336.123 6	336.122 9	-2.08	320.091 2 ,321.096 3 ,306.076 6 ,292.096 2
23	9.60	药根碱	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	$[M]^+$	338.138 7	338.138 2	-1.48	322.106 7 ,308.091 1 ,294.111 8 ,323.113 5
24	9.64	黄连碱	$C_{19}H_{14}NO_4^+$	$[M]^+$	320.091 7	320.091 6	-0.31	305.067 8 ,292.096 3 ,277.072 9 ,262.085 8
25	10.14	香豆素	$C_9H_6O_2$	$[M+H]^+$	147.044 1	147.044 0	-0.68	103.054 6 ,91.054 7 ,77.039 4 ,65.039 4
26	10.17	13-甲基表小檗碱	$C_{21}H_{20}NO_4$	$[M]^+$	350.139 2	350.138 5	-2.00	335.112 2 ,334.106 8 ,306.111 8
27	10.34	氧化红花碱	$C_{20}H_{17}NO_5$	$[M+H]^+$	352.117 9	352.117 8	-0.28	337.093 3 ,322.070 7 ,320.091 9 ,308.091 9 , 307.082 1 ,294.076 3
28	10.39	甲基黄连碱	$C_{20}H_{16}NO_4^+$	$[M]^+$	334.107 9	334.107 3	-1.80	319.083 3 ,306.111 6
29	10.64	巴马汀	$C_{21}H_{22}NO_4^+$	$[M]^+$	352.154 3	352.154 1	-0.57	336.122 4 ,322.106 7 ,308.127 6 ,294.111 4
30	10.79	小檗碱	$C_{20}H_{18}NO_4^+$	$[M]^+$	336.123 6	336.122 8	-2.38	321.097 7 ,320.091 4 ,306.075 7 ,292.096 3 , 278.080 7
31	11.19	脱氢紫堇碱	$C_{22}H_{24}NO_4^+$	$[M]^+$	366.170 0	366.170 0	0	351.144 6 ,336.121 9 ,334.142 5 ,322.143 4
32	11.47	13-甲基小檗碱	$C_{21}H_{20}NO_4^+$	$[M]^+$	350.138 7	350.138 7	0	335.113 6 ,334.107 0 ,320.091 5 ,306.112 0
33	12.36	肉桂醛	C_9H_8O	$[M+H]^+$	133.064 8	133.065 2	3.00	115.054 8 ,105.070 5 ,103.054 9 ,91.055 0 , 79.055 1 ,55.018 9
34	14.41	桂二萜醇	$C_{20}H_{32}O_7$	$[M+H]^+$	385.222 1	385.222 8	1.82	350.138 1 ,331.933 8 ,123.040 5
35	14.91	漆黄素	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M+H]^+$	287.055 0	287.055 3	1.05	269.246 5 ,241.999 3 ,213.112 9 ,167.012 8
36	13.80	4-甲氧基肉桂醛	$C_{10}H_{10}O_2$	$[M+H]^+$	163.075 3	163.075 6	1.83	145.065 0 ,133.064 8 ,110.020 3

分的峰面积可以成为定量依据^[26]。在全方、上清液和沉淀水平上,对样品的的主要活性成分黄连碱、小檗碱所对应的一级质谱峰进行积分后发现,其含量可

能在煎煮过程中产生变化。黄连碱、小檗碱一级质谱峰相对峰面积以 MIX 为 1 进行归一化(表 2),在全方和上清液中各组样品的小檗碱和黄连碱含量大

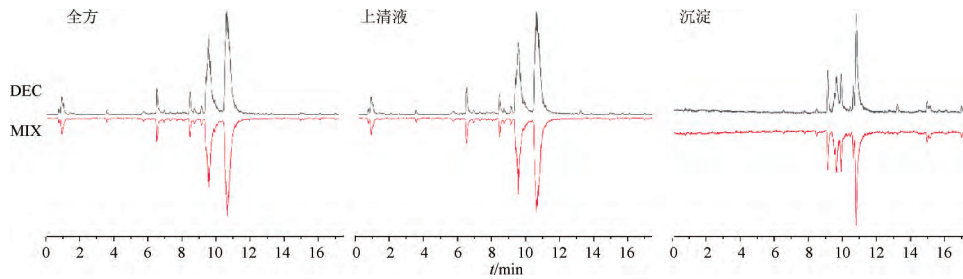


图 8 肉桂-黄连机械混合与共煎后的质谱总离子流图

Fig.8 Total ion chromatograms of Cinnamomi Cortex-Coptidis Rhizoma after mechanical mixing or co-decoction

小均为 DEC 全方>MIX 全方、DEC 上清液>MIX 上清液。而在超分子当中,这种趋势则相反,黄连碱和小檗碱含量在机械混合组中反而高于煎煮组,为 MIX>DEC。

表 2 积分后各样品中小檗碱、黄连碱的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of berberine and coptisine in each sample after integration

组别	黄连碱	小檗碱
MIX 全方	1.000	1.000
DEC 全方	1.116	1.120
MIX 上清液	1.000	1.000
DEC 上清液	1.128	1.127
MIX 沉淀	1.000	1.000
DEC 沉淀	0.567	0.928

无论是上清液还是全方,在同一水平下,共煎样品可测得的黄连生物碱含量明显高于机械混合样品。这可能由于共煎样品受到加热影响,黄连生物碱与肉桂酚酸类成分充分作用,形成尺度相较于机械混合更加微小的超分子聚集体,其中也包含了难以离心分离的纳米尺寸超分子。这种超分子在离心时倾向于分布在上清液中,与机械混合产生的大块絮状物相比,有更大的比表面积。在制备液相样品时,上清液和全方因为纳米尺寸超分子的存在,更容易通过滤膜,所以黄连生物碱含量呈现出“煎煮大于机械混合”,而沉淀由于损失了这部分超分子,故呈现相反的趋势。纳米尺寸超分子更小、更均匀的粒径分布代表着更大的比表面积,促使活性物质更充分地杀伤细菌,引起活性的差异。这种现象对于可形成超分子体系的药对而言,意味着在相同的剂量下,不同方法(煎煮或机械混合)的处理会改变超分子体系形态,影响其对细菌的作用,进而产生不同的生物活性。

4 讨论

中药配伍后的水煎自沉淀现象广泛存在,其本质是药效成分在煎煮过程中相互作用形成超分子体系。煎煮方式差异(共煎和单煎液机械混合)导致活性差异引起学界关注^[27]。但是“煎煮方式-相态差异-生物活性”三者的承接关系,目前鲜有研究。

本研究基于中药超分子,以肉桂-黄连药对为例,对“煎煮方式-相态差异-生物活性”的关系进行了系统探讨,将 DEC 和 MIX 的宏观形貌差异作为切入点,对比了 DEC 和 MIX 的相态差异,发现煎煮后肉桂-黄连药对会呈现均匀浑浊相态,而机械混合则表现为絮状沉淀;通过等温滴定量热法证明了两药相互作用是自发放热过程;光谱结果显示配伍后样品吸收峰较黄连单煎液红移,提示二者成分发生相互作用形成超分子,且 DEC 更稳定;通过浊度测试和电镜观察发现,煎煮使超分子体系粒度更小且均匀,其浊度不会随时间推移发生明显变化,在电镜下呈现出粒径 200 nm 左右的球形颗粒;抗菌结果显示,DEC 的抑菌活性优于 MIX,即共煎后体系具有更强的抗菌能力。为探究活性差异的来源,使用 UPLC-MS/MS 对进行成分分析和含量测定,发现共煎没有产生新物质,而 DEC 样品的全方和上清液中黄连碱和小檗碱含量明显高于 MIX,而在沉淀中该趋势相反,说明煎煮方式影响超分子尺寸,进而影响药理活性。综上,肉桂-黄连超分子体系在不同煎煮方式下存在“相态-尺寸-生物活性”的明显差异。

研究表明,煎煮处理使超分子体系发生显著变化,在粒径、稳定性和可测得活性成分含量均优于机械混合体系。这一发现为阐明中药配伍煎煮的科学性提供了新的视角,即中药配伍煎煮的作用外在表现为相态宏观变化,本质是调控超分子体系形态,改变有效成分对病灶的作用,最终影响活性。未来

可进一步探索不同处理条件(如温度、时间、pH)对超分子体系的影响规律,为优化中药煎煮工艺、提高制剂质量、开发新型制剂提供思路和依据。

[利益冲突] 本文所有作者声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王琪,郭小萌,倪乾坤,等.中药水煎液自组装聚集体研究面临的问题初探[J].药学报,2024,59(1):94.
- [2] 赖长江,陈泽炎,邱子栋,等.中药煎煮的化学反应机制研究现状[J].中国中药杂志,2023,48(4):890.
- [3] 李会竹,宋丹丹,常辰琦,等.麻杏石甘汤胶体相态的拆分、表征及抗病毒研究[J].中国中药杂志,2023,48(16):4394.
- [4] 王凤霞,陈芳雯,沈成英,等.中药汤剂煎法的科学内涵研究进展[J].中国中药杂志,2025,50(4):994.
- [5] 宋金菁,齐天昊,岳伟胜,等.基于中药汤剂中超分子聚集体形成的炮制机制研究新思路[J].中国中药杂志,2024,49(18):5102.
- [6] 林晓钰,魏吉昌,赵一航,等.基于中药超分子化学探究大黄-黄连配伍不同煎煮方式的物质基础差异[J].中国中药杂志,2024,49(18):4948.
- [7] 赵一航,王智威,杨璐平,等.基于“药辅互作-成分转化”动态过程探讨甘草炮制附子的科学内涵[J].中国中药杂志,2024,49(22):6129.
- [8] 杨玉琴,李菲菲,陈珊,等.基于甘草酸增溶原理探讨中药芫花与甘草配伍增毒机制[J].药学报,2021,56(9):2561.
- [9] 许刚,谢鸣,龙胆泻肝汤配伍减毒的化学研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(5):20.
- [10] WANG P L, GUO W B, HUANG G R, et al. Berberine-based heterogeneous linear supramolecules neutralized the acute nephrotoxicity of aristolochic acid by the self-assembly strategy[J]. Acs Appl Mater Inter, 2021, 13(28): 32729.
- [11] 段冬梅,王瑾,荆达,等.黄连-肉桂药对的配伍机制及临床应用研究进展[J].实用中医内科杂志,2024,38(12):1.
- [12] 邱世翠,李连锦,刘云波,等.肉桂体外抑菌作用研究[J].时珍国医国药,2001,12(1):13.
- [13] 李雪,冯艳春,赵婧含,等.肉桂的化学成分及药理作用研究进展[J].药学研究,2024,43(10):1015.
- [14] 沈子扬,韩宇博,刘树民,等.黄连化学成分、药理作用及配伍应用的研究进展[J].中医药信息,2024,41(10):64.
- [15] 陈广,陆付耳,徐丽君,等.不同肉桂与黄连配伍比例对交泰丸中肉桂酸含量的影响[J].中国医院药学杂志,2013,33(4):267.
- [16] 周洪雷,魏璐雪,杨东辉.高效毛细管电泳测定黄连、肉桂配伍前后黄连主要生物碱的含量[J].中国中药杂志,1999,24(5):52.
- [17] 徐艳春,魏璐雪,王亚丽.高效液相法测定黄连配伍肉桂前后肉桂酸的含量[J].中国中药杂志,2001,26(1):48.
- [18] 朱雪梅,陈永财,王晓芬.黄连和肉桂不同配比对交泰丸中总生物碱含量的影响[J].浙江中医杂志,2014,49(12):922.
- [19] 陈广,陆付耳,董慧,等.肉桂与黄连不同配伍比例对交泰丸水煎剂中肉桂醛溶出率的影响[J].中医杂志,2013,54(8):694.
- [20] 陈广,陆付耳,李伶俐,等.肉桂与黄连不同配伍比例对交泰丸中小檗碱含量的影响[J].医药导报,2013,32(3):353.
- [21] 严优芍,钟伟健,孙悦.肉桂与黄连配伍前后挥发油成分的GC-MS分析[J].中国民族民间医药,2014,23(22):11.
- [22] 褚春梅,武紫微.黄连肉桂药对配伍研究[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(1):60.
- [23] HUANG X M, WANG P L, LI T, et al. Self-assemblies based on traditional medicine berberine and cinnamic acid for adhesion-induced inhibition multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Acs Appl Mater Inter, 2020, 12(1): 227.
- [24] 惠璇,张竞研,康安,等.中药物质基础新形式及其药动/药效研究[J].南京中医药大学学报,2024,40(10):1013.
- [25] 白炳莲,韦珏,王海涛,等.用红外光谱技术研究氢键的键合方式[J].化学通报,2013,76(2):167.
- [26] 张杰,赵文法,王春雷,等.液质联用技术在药品质量分析中的应用进展[J].山东化工,2023,52(16):118.
- [27] 崔景朝,赵自明.中药配方颗粒研究进展(II):中药单煎与合煎对比研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):240.

[责任编辑 孔晶晶]