

· 中药工业 ·

黄连五种主要生物碱的提取纯化及含量测定[△]张纯刚^{1*}, 唐静雅², 于琛琛¹, 程兰¹, 康廷国¹

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116620; 2. 大连医科大学附属第一医院药学部, 辽宁 大连 116620)

[摘要] **目的:** 探索出黄连五种主要生物碱的最优提取纯化方法及含量测定方法, 为制剂研究奠定基础。**方法:** 采用 HPLC 进行生物碱的含量测定, 以黄连五种主要生物碱加和得率为指标, 优选黄连五种主要生物碱提取及纯化工艺。盐酸药根碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的浓度, 分别在 0.48 ~ 4.80、3.52 ~ 35.2、2.04 ~ 20.4、1.72 ~ 17.2、10.2 ~ 102 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (r 均大于 0.999) 范围内, 与峰面积呈良好的线性关系。**结果:** 黄连提取最优的条件为黄连饮片, 加 8 倍量 1.5% 的硫酸溶液, 煎煮 3 次, 每次 40 min。纯化最佳工艺为黄连提取液用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH 5 ~ 6, 滤液加 HCl 调节 pH 1 ~ 2, 加 5% NaCl, 冰箱冷藏静置过夜, 沉淀物干燥。**结论:** 所建立的黄连五种主要生物碱提取纯化工艺及含量测定方法简单可靠。

[关键词] 黄连; 生物碱; 提取纯化工艺; 含量测定

Extraction, Purification and Determination of Five Alkaloids in Rhizome CoptidisZHANG Chun-gang^{1*}, TANG Jing-ya², YU Chen-chen¹, CHENG Lan¹, KANG Ting-guo¹

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116620, China;

2. Department of Pharmacy, The first hospital affiliated to dalian medical university, Dalian 116011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the optimal conditions of extraction and purification process for five alkaloids and determination for five alkaloids from Rhizome Coptidis, and provide the basis for preparation research of Rhizome Coptidis. **Methods:** The alkaloids were determined by HPLC. The yield ratio of five alkaloids was used for indication. The extraction technology and the purification technology of five alkaloids were optimised. Rhizine hydrochloride, epiberberine hydrochloride, coptisine hydrochloride, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride showed good linear relationship with the peak area at the range of 0.48-4.80, 3.52-35.2, 2.04-20.4, 1.72-17.2, 10.2-102 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r > 0.999$). **Results:** The optimal extraction technique was as follows: refluxing extraction 3 times by 1.5% sulfur acid with liquid-material ratio at 8:1, 40 min every time. The optimal purification process was as follows: adjusting extraction liquid to pH value being 5-6 by $\text{Ca}(\text{OH})_2$, adjusting the filtrate to pH value being 1.5-2 with HCl, adjusting the salinity of solution up to 5% by NaCl, keeping the solution in the refrigerator for one night, and then filtrating, drying the residue at 50 °C. **Conclusion:** The optimal extraction and purification process of five alkaloids from Rhizoma Coptidis and the method for the content determination of five kinds of alkaloids are simple and feasible.

[Keywords] Rhizoma Coptidis; alkaloid; extraction and purity process; determination

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180329005

黄连味苦, 性寒, 归心、胃、肝、胆、大肠经, 具有泻火解毒、清热燥湿的功效。黄连中含有小檗碱、巴马汀碱、黄连碱, 表小檗碱等生物碱都具有较强的药理活性。现代药理研究表明, 黄连主要有效成分生物碱类不仅具有抗菌、抗病毒的功效, 还具有抗心律失常、改善充血性心力衰竭、扩张冠状动脉、降血糖、降血脂、抗血小板凝集、利胆、抗肿瘤等药理

作用, 被广泛应用于各种病证的治疗^[1]。因此, 对黄连五种主要生物碱提取与纯化工艺进行研究对于临床研究有着重要的意义。黄连提取纯化方法很多种, 有水提、醇提以及柱层析纯化等^[2-7]。《中华人民共和国药典》2015年版一部黄连含量测定项下一测多评法及相关文献报道同时测定四种生物碱的含量^[8-15]。本实验采用硫酸水提结合酸溶盐析沉淀的方法提取纯化生

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(81503257); 辽宁省博士启动基金(201501098)

* [通信作者] 张纯刚, 副教授, 研究方向: 药物制剂研究; Tel: (0411)85890145, E-mail: gaogaoii123@163.com

物碱,通过优化方法同时检测五种含量较大的生物碱,并计算五种生物碱的含量。基于以上结果,为后续进行的降血糖方面制剂研究提供依据。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪 Agilent 1100 series(美国安捷伦科技有限公司);硫酸、氯化钠为分析纯(国药集团化学试剂有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯(天津市科密欧化学试剂有限公司)。黄连(批号: C150677)由大连权健中药饮片有限公司提供,经辽宁中医药大学康廷国教授鉴定为正品黄连 *Coptidis Rhizoma*。盐酸小檗碱对照品、盐酸药根碱对照品、盐酸黄连碱对照品、盐酸表小檗碱对照品、盐酸巴马汀对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 Y18N8S48598、Z27A6S2808、ZS0924BE14、H25F3X1、Z23O6L4910,纯度 $\geq 98\%$)。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

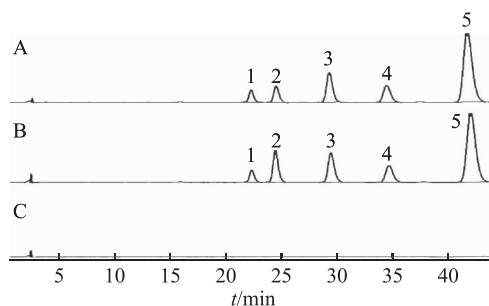
2.1.1 对照品溶液的制备 精密称定盐酸小檗碱对照品、盐酸黄连碱对照品、盐酸表小檗碱对照品、盐酸巴马汀为对照品及盐酸药根碱对照品适量,置棕色量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含 51 μg 盐酸小檗碱、10.2 μg 盐酸黄连碱、17.6 μg 盐酸表小檗碱、8.6 μg 的盐酸巴马汀及 2.4 μg 盐酸药根碱的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取经提取后的黄连提取物粉末约 0.2 g,置 50 mL 容量瓶中,精密加入甲醇-盐酸(100:1)溶解,超声处理 30 min,放冷至室温后续加甲醇-盐酸(100:1)定容。精密吸取上述溶液 2 mL 至 10 mL 容量瓶中,加入甲醇-盐酸(100:1)进行定容,再经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤,作为供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 固定相: Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-0.05 mol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(45:55)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g,再以磷酸调节 pH 4.0);流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;柱温: 室温;检测波长: 345 nm;进样量: 10 μL 。

2.2 黄连中总生物碱含量测定的方法学建立

2.2.1 专属性试验 分别吸取空白及对照品溶液和供试品溶液,按 2.1.3 项下色谱条件,分别进样,记录色谱图(图 1)。结果表明,在上述色谱条件下五种成分的分离情况及峰形良好,专属性良好。



注: A. 供试品; B. 对照品; C. 空白; 1. 盐酸药根碱; 2. 盐酸表小檗碱; 3. 盐酸黄连碱; 4. 盐酸巴马汀; 5. 盐酸小檗碱。

图 1 黄连五种生物碱 HPLC 图谱

2.2.2 线性关系 将对照品溶液依次进样 2、4、8、10、16、20 μL 。得盐酸药根碱、盐酸表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的回归直线方程及线性范围,结果见表 1。

表 1 五种生物碱的回归方程及线性范围

成分	标准曲线	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
盐酸药根碱	$Y = 63.818X - 1.9833$	0.48 ~ 4.80	0.9995
盐酸表小檗碱	$Y = 24.576X - 6.898$	3.52 ~ 35.2	0.9997
盐酸黄连碱	$Y = 47.992X - 13.441$	2.04 ~ 20.4	0.9997
盐酸巴马汀	$Y = 40.498X - 20.223$	1.72 ~ 17.2	0.9998
盐酸小檗碱	$Y = 33.138X - 71.405$	10.2 ~ 102	0.9996

2.2.3 精密度试验 取五种生物碱混合对照品溶液,各重复进样 6 次,测得盐酸药根碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱平均峰面积的 RSD 依次为 1.13%、1.47%、1.76%、1.27%、1.10%, RSD < 2%,精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 按既定方法制备供试品溶液,分别于 2、4、6、8 h 进样 10 μL 检测。结果盐酸药根碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的 RSD 依次为 0.87%、0.31%、0.97%、0.30%、1.89%, RSD < 2%,说明样品在 8 h 内稳定性良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批次的样品 6 份,照上述制定的方法制备供试品溶液和进行 HPLC 测定,测得盐酸药根碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱平均峰面积的 RSD 依次为 1.44%、1.64%、1.92%、1.63%、1.70%, RSD < 2%,本方法重复性良好。

2.2.6 回收率试验 采用加样回收率方法考察回收率,结果盐酸药根碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐

酸巴马汀和盐酸小檗碱的平均回收率依次为 99.85%、100.08%、99.09%、99.69%、101.65%，RSD 依次为 1.66%、1.50%、1.18%、0.79%、1.34%。表明方法准确可靠。

2.2.7 样品含量测定 按上述色谱条件，以混合对照液进行计算，对盐酸药根碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱五种生物碱进行含量测定，计算五种生物碱含量之和。

2.3 提取工艺研究

2.3.1 酸浓度考察 取黄连饮片粉末约 10 g，共 3 份，分别加 0.5%、1.5%、2.5% 的硫酸溶液 80 mL，加热回流提取 3 次，每次 40 min，滤过，合并滤液，用水定容至 200 mL，取上述提取液适量，用甲醇稀释到适当浓度，经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤，按照 2.2.7 样品含量测定项下进行测定，测得 5 种生物碱含量并加和，计算 5 种主要生物碱的提取率，结果见表 2。

表 2 酸浓度对五种主要生物碱提取率的影响

酸浓度(%)	五种主要生物碱加和的提取率(%)
0.5	52.61
1.5	88.05
2.5	55.74

从表 2 结果可知，随着酸浓度的升高，黄连五种主要生物碱提取率先升高后下降。酸浓度在 1.5% 时五种主要生物碱提取率达到最高值。

2.3.2 提取时间考察 取黄连饮片粉末约 10 g，共 3 份，加 1.5% 硫酸溶液 80 mL，分别加热回流提取 20、40、60 min，提取 3 次，滤过，合并滤液，用水定容至 200 mL，即得，结果见表 3。

表 3 提取时间考察试验结果

提取时间/min	总生物碱提取率(%)
20	49.67
40	88.05
60	89.41

从表 3 结果可知，随着提取时间的延长，黄连五种主要生物碱提取率逐渐提高，40 min 时和 60 min 时五种主要生物碱提取率相差较小，因此推测再继续延长五种主要生物碱提取率并不会增加，因此选择 40 min 时黄连五种主要生物碱提取效率最佳。

2.3.3 加液量考察 取黄连饮片粉末约 10 g，共 3

份，分别加 1.5% 硫酸溶液 40、80、120 mL，加热回流提取 3 次，每次 40 min，滤过，合并滤液，分别用水定容至合适体积，即得，结果见表 4。

表 4 加液量考察试验结果

加液量/mL	总生物碱提取率(%)
40	28.48
80	88.05
120	89.77

从表 4 结果可知，随加液量的增加，黄连五种主要生物碱提取率逐渐提高，继续增加加液量五种主要生物碱提取率并没有继续提高，加液量为 80 mL 时黄连五种主要生物碱提取效率最佳。

2.3.4 提取次数考察 取黄连饮片粉末约 10 g，共 4 份，分别加 1.5% 硫酸溶液 80 mL，加热回流分别提取 1 次、2 次、3 次、4 次，40 min/次，滤过，合并滤液，分别用水定容至 200 mL，即得，结果见表 5。

表 5 提取次数考察试验结果

提取次数/次	五种主要生物碱加和提取率(%)
1	36.55
2	48.37
3	88.05
4	90.31

从表 5 结果可知，随着提取次数的增加，黄连五种主要生物碱提取率逐渐提高，当提取次数为 4 次时最高，但是提取 3 次与提取 4 次差别很小，考虑提取效率因素，提取 3 次的黄连五种主要生物碱提取率最优。

2.4 黄连总生物碱纯化工艺研究

2.4.1 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中和条件的考察 取黄连提取液 4 份，每份 50 mL，分别用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH 5~6、pH 7、pH 8~9、pH 10，滤过后的滤液分别置于 50 mL 容量瓶中，加水至刻度。取上述滤液 1 mL，加甲醇定容至 25 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜，照上述含量测定中要求测定黄连总生物碱含量。取上述各滤液 40 mL，分别加盐酸调节 pH 1.5~2，加氯化钠 4 g，使用漩涡仪搅匀使溶解，在冰箱中静置过夜，抽滤，干燥，收集纯化物，所制得的纯化物主要是由五种主要生物碱组成的，结果如表 6。

试验结果表明，pH 5~6 时，黄连中五种主要生物碱加和的得率最大且纯化物纯度较高。采用 Ca

(OH)₂中和硫酸,并滤除沉淀,在沉淀过程中会有部分生物碱沉淀析出,造成过滤后生物碱的部分损失,但是经过Ca(OH)₂中和硫酸滤除沉淀后,得到的纯化后的生物碱固体纯度更高了,对后续制备高载药量的黄连生物碱降糖制剂奠定了基础。

表6 Ca(OH)₂中和条件下不同pH值考察试验结果

pH 值	中和后药液中五种主要生物碱得率(%)	纯化物中五种主要生物碱得率(%)	纯化物纯度(%)
5~6	64.31	38.99	85.15
7	60.68	32.07	66.60
8~9	39.17	31.51	64.81
10	36.57	27.30	59.01

2.4.2 酸沉条件考察 取黄连提取液400 mL,加Ca(OH)₂调节pH 5~6,抽滤。分别量取滤液3份,每份100 mL,用盐酸分别调节pH 1.5~2、pH 2~3、pH 3~4,每份样品均加氯化钠10 g,使用漩涡仪搅匀使溶解,在冰箱中静置过夜,抽滤,滤渣在干燥箱中真空干燥(50℃),收集纯化物。结果如表7。

表7 盐酸酸化下不同pH考察结果

pH 值	五种主要生物碱得率(%)	纯化物纯度(%)
1.5~2	38.89	83.18
2~3	27.02	58.36
3~4	20.20	43.63

试验结果表明,当黄连提取液进行酸沉实验时,随着pH升高,黄连中五种主要生物碱的得率变小,纯化物纯度降低,pH为1.5~2时为最优。

2.5 黄连五种主要生物碱含量测定

取黄连提取液1000 mL,共3份,分别加Ca(OH)₂调节pH 5~6,抽滤,滤液加盐酸调节pH 1.5~2,加氯化钠100 g,充分搅拌,后在冰箱冷藏静置过夜,抽滤,滤渣干燥(50℃),收集纯化物。含量测定结果见图2。

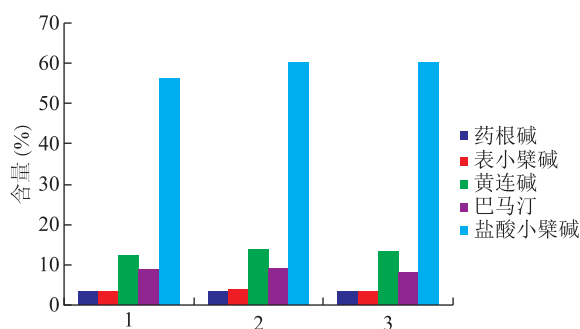


图2 黄连五种主要生物碱含量测定结果

3 结论与讨论

黄连提取率最优条件是:研磨黄连呈粉末状,加8倍量1.5%的硫酸溶液,煎煮三次,每次40 min。硫酸浓度不宜过高,以免提取时由于水分蒸发,局部浓度过高产生碳化的现象。

五种主要生物碱纯化物纯度最优条件是:黄连提取液采用Ca(OH)₂调节pH 5~6,滤液加HCl调节pH 1~2,加5%氯化钠溶液使之溶解,冰箱冷藏过夜,滤饼50℃烘干。在黄连生物碱纯化过程中,向提取液中加入Ca(OH)₂中和硫酸时,由于Ca(OH)₂微溶于水,与硫酸反应时间较长,因此加入Ca(OH)₂后需不断搅拌,以促进Ca(OH)₂与硫酸充分反应。如果搅拌不充分,则pH测定不准确,对沉淀提纯的结果有较大的影响。虽然在沉淀提纯过程中,有少部分生物碱的损失,不能完全提取纯化出来,但是由于得到的五种主要生物碱纯化物的纯度较高,为制备高载药量的黄连生物碱降糖制剂奠定了较好的基础,得到了纯度较高的原料药。

黄连五种主要生物碱的采用高效液相色谱法进行含量测定方法,五种生物碱分离度符合要求,方法精密性、准确稳定可靠,检测结果准确。

参考文献

- [1] 余国媛,王伯初,彭亮,等. 黄连的药理研究进展[J]. 重庆大学学报,2006,29(2):107-111.
- [2] 席国萍,宋国斌. 黄连中小檗碱提取方法研究进展[J]. 贵州农业科学,2009,37(1):8-10.
- [3] 许沛虎,高媛,张雪琼,等. 黄连总生物碱纯化工艺研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):3079-3080.
- [4] 赖先荣,周邦华,杜明胜,等. 6种黄连饮片中6种生物碱的RP-HPLC含量测定及与“治消渴”药效学的谱-效关系分析[J]. 中国中药杂志,2016,41(24):4579-4586.
- [5] 张乐佳,夏新华. 黄连提取工艺的研究[J]. 中成药,2001,23(6):398-400.
- [6] 武佳,谭桂莲,杨红. 黄连中盐酸小檗碱提取工艺探究[J]. 时珍国医国药,2007,18(2):437-438.
- [7] 胡冬华,袁绪富. 黄连素的提取及分子活性部位研究[J]. 长春中医药大学学报,2006,22(1):67-67.
- [8] 王永占,沈勇,谢世清,等. HPLC法同时测定云黄连中四种生物碱的含量. 中国药师,2013,16(7):947-949.
- [9] 袁久荣,魏英勤,袁浩,等. RP-HPLC法同时测定黄连中四种原小檗碱型生物碱的含量. 世界科学技术—中医药现代化,2006,8(6):36-39.

(下转第1156页)

- protopanaxatriol and protopanaxadiol, in rats [J]. *Fitoterapia*, 2013, 86(1): 48-53.
- [2] 孙德亚. 达玛烷型人参皂苷元结构修饰及其抗肿瘤活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [3] 李娟, 王如锋, 杨莉, 等. 三七皂苷类成分及对心血管作用的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(17): 3480-3487.
- [4] 刘海宇, 张庆贺, 刘金平, 等. 达玛烷型三萜皂苷结构修饰研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(22): 269-273.
- [5] Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. "Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System" [S]. FDA, 2000.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: X.
- [7] 曾宝, 王春玲, 吴安国, 等. Caco-2 细胞模型的建立及其在中药吸收研究中的应用探讨[J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(6): 570-573.
- [8] 杨秀伟. 人参化学成分的药物代谢动力学研究[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(1): 16-35.
- [9] 杨秀伟, 杨晓达, 王莹, 等. 中药化学成分肠吸收研究中 Caco-2 细胞模型和标准操作规程的建立[J]. *中西医结合学报*, 2007, 5(6): 634-641.
- [10] Yee S Y. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-Factor or myth[J]. *Pharm Res*, 1997, 14(6): 763-766.
- [11] 杨秋娅, 康雷, 顾圣莹, 等. 人参皂苷 Rb₁ 在大鼠体内的药动学研究[J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(3): 221-226.
- [12] 韦凤华, 宋林, 何毅, 等. 人参皂苷 Rg₁ 在大鼠体内的代谢与排泄研究[J]. *华西药学杂志*, 2010, 25(3): 302-305.
- [13] 李丽明, 刘若轩, 郭洁文, 等. 三七皂苷 R₁ 在急性心肌梗死大鼠体内的药动学研究[J]. *中药材*, 2015, 38(9): 1908-1911.
- [14] Volpe D A, Faustino P J, Ciavarella A B, et al. Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay[J]. *Clin Res Regul Aff*, 2007, 24(1): 39-47.
- [15] Wils P, Warnery A, Phung-Ba V, et al. High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 269(2): 654-658.
- [16] Patel J, Buddha B, Dey S, et al. *In vitro* interaction of the HIV protease inhibitor ritonavir with herbal constituents: changes in P-gp and CYP3 A4 activity[J]. *Am J Ther*, 2004, 11(4): 262-277.

(收稿日期 2018-03-22)

(上接第 1149 页)

- [10] 武小赞, 李铁钢, 阳勇, 等. HPLC 法测定黄连中主要生物碱的方法学研究. *上海中医药杂志*, 2010, 44(6): 112-115.
- [11] 康莲, 万国盛, 贾伟利, 等. HPLC 同时测定黄柏中 6 种化学成分含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(2): 94-97.
- [12] 肖平, 李三新. 反相高效液相色谱法测定五味黄连丸中盐酸小檗碱的含量[J]. *中南药学*, 2009, 7(11): 879-880.
- [13] 熊玲, 覃瑶, 罗维早, 等. 正交试验设计筛选黄连总生物碱的提取纯化工艺研究[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(5): 706-710.
- [14] 肖培根, 肖伟, 许利嘉, 等. 黄连及含小檗碱类生物碱的中草药[J]. *中国现代中药*, 2016, 18(11): 1381-1385.
- [15] 赵文龙, 周昌妮, 王佳乐, 等. 星点设计-效应面法优选黄连的提取工艺[J]. *中国现代中药*, 2014, 16(4): 312-315.

(收稿日期 2018-03-29)