

猪胆汁炮制对黄连中生物碱类成分溶出的影响

王静, 吕佳, 袁子民*, 陈悦
(辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:比较黄连、胆黄连及其水煎液中生物碱类成分的含量,研究猪胆汁炮制对黄连中生物碱类成分溶出效果的影响,探讨胆黄连寒性增强的炮制机制。方法:采用紫外分光光度法(UV)测定黄连、胆黄连及其水煎液中总生物碱含量,检测波长 345 nm。采用高效液相色谱法(HPLC)测定黄连、胆黄连及其水煎液中盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的含量,流动相乙腈(A)-磷酸三乙胺水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min,25%~30% A;15~20 min,30%~55% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 345 nm。结果:黄连水煎液、胆黄连水煎液中总生物碱的转移率分别为 71.17% 和 78.50%;黄连水煎液中盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的转移率分别为 73.93%,51.59%,56.16%;胆黄连水煎液中三者的转移率分别为 80.42%,64.21%,64.79%。结论:黄连经猪胆汁炮制后能够增加黄连中生物碱类成分在水煎液中的溶出,可达到寒性增强的炮制目的。

[关键词] 黄连;胆黄连;生物碱;转移率;盐酸药根碱;盐酸巴马汀;盐酸小檗碱

[中图分类号] R283.1;R283.2;R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160120.1454.016.html>

[网络出版时间] 2016-01-20 14:54

Effect of Being Processed on Dissolution of Alkaloids in Coptidis Rhizoma with Pig's Bile

WANG Jing, LYU Jia, YUAN Zi-min*, CHEN Yue
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To compare contents of alkaloids between Coptidis Rhizoma, bile processed products of Coptidis Rhizoma and their water decoctions, dissolution of alkaloids in Coptidis Rhizoma was determined after being processed with pig's bile. Aim of this study was to explore processing mechanism of cold property enhancement of bile processed products. **Method:** Total alkaloids in Coptidis Rhizoma, bile processed products and their water decoctions were determined by UV. Contents of berberine, jatrorrhizine and palmatine in Coptidis Rhizoma, bile processed products and their water decoctions were determined by HPLC, mobile phase was acetonitrile-phosphate triethylamine solution by gradient elution at room temperature, detection wavelength was set at 345 nm. **Result:** Transfer rates of total alkaloids from water decoctions of Coptidis Rhizoma and its bile processed products were 71.17% and 78.50%; transfer rates of jatrorrhizine, palmatine and berberine in water decoction of Coptidis Rhizoma were 73.93%, 51.59% and 56.16%; transfer rates of jatrorrhizine, palmatine and berberine in water decoction of bile processed products of Coptidis Rhizoma were 80.42%, 64.21% and 64.79%, respectively. **Conclusion:** Being processed with pig's bile can raise transfer rate of total alkaloids in water decoction of Coptidis Rhizoma, and then to achieve purpose of cold property enhancement of bile processed

[收稿日期] 20150703(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303225)

[第一作者] 王静,博士,副教授,从事中药质量分析及评价研究,Tel:0411-85890149,E-mail:wjyuanmeng@163.com

[通讯作者] *袁子民,博士,副教授,从事中药炮制机制研究,Tel:0411-85890145,E-mail:yuanzmin@163.com

products of *Coptidis Rhizoma*.

[**Key words**] *Coptidis Rhizoma*; bile processed products of *Coptidis Rhizoma*; alkaloids; transfer rate; jatrorrhizine; palmatine; berberine

黄连味苦,性寒,具有清热燥湿、泻火解毒之功效。历代本草对黄连加工炮制方法的记载颇多,其中经猪胆汁炮制后的胆黄连,药性改变,符合“寒者益寒”的传统中药炮制理论^[1-2]。鉴于汤剂临床应用普遍,目前有关黄连炮制成胆黄连后对其生物碱类成分溶出影响的研究较少,主要局限于相对峰面积的增加^[3]及单纯的样品含量的比较^[4],缺少水煎液中生物碱类成分溶出影响的研究。本实验拟从炮制后增加生物碱类成分溶出的角度探讨胆黄连药效增强的机制,通过对黄连、胆黄连水煎液中生物碱类成分的含量测定,比较黄连饮片、胆黄连水煎液中总生物碱、药根碱、巴马汀、盐酸小檗碱的转移率,研究黄连经猪胆汁炮制前后对生物碱类成分溶出的影响,为胆黄连的炮制机制及作用机制研究提供参考。

1 材料

UV-3010 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110713-201212,110733-201108,110732-201108),猪胆汁(大连猪肉市场),水为娃哈哈纯净水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。黄连购自大连权健中药饮片有限公司,经辽宁中医药大学鉴定教研室李峰教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎;胆黄连炮制品[参考 2008 年版《上海市中药炮制规范》^[5],经工艺优化后自制^[6],取黄连饮片,加猪胆汁水溶液(每猪胆汁 6 g 加水 40 mL)拌匀,闷润 1 h(每黄连饮片 100 g 加胆汁水溶液 40 mL),95 °C 翻炒 19 min,即得]。

2 方法与结果

2.1 黄连、胆黄连供试品溶液的制备 分别取黄连和胆黄连粉末(过二号筛)约 0.1 g,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,精密量取甲醇-盐酸(100:1)50 mL,称定质量,超声处理 20 min,放冷,称定质量,用甲醇-盐酸(100:1)补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,备用。分别精密量取续滤液各 1 mL,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)稀释至刻度,摇匀,作为总生物碱含量测定用供试品溶液;另分别精密量取上述总生物碱含量测定用的供试品溶液 4 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)稀

释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液作为盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀含量测定用供试品溶液。

2.2 黄连、胆黄连水煎液供试品溶液的制备^[7]

精密称取黄连、胆黄连各 10 g,分别置于圆底烧瓶中,加水 100 mL 浸泡 30 min 后,加热回流提取 1 h,趁热滤过,药渣加水 80 mL,加热回流提取 1 h,趁热滤过,合并滤液,转移至 250 mL 量瓶中,加水稀释至 250 mL,摇匀,得水煎液,备用。分别精密量取该水煎液 1 mL 至 5 mL 量瓶中,用甲醇-盐酸(100:1)稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液 1 mL 至 100 mL 量瓶中,用甲醇-盐酸(100:1)稀释至刻度,摇匀,作为总生物碱含量测定用供试品溶液;另分别精密量取上述总生物碱含量测定用供试品溶液 5 mL 至 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液作为盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀含量测定用供试品溶液。

2.3 总生物碱的含量测定^[8]

2.3.1 对照品溶液的制备 称取盐酸小檗碱适量,用甲醇-盐酸(100:1)制成 23.56 mg·L⁻¹对照品溶液。

2.3.2 标准曲线绘制 精密量取上述对照品溶液 1.25,2.00,2.50,4.00,5.00 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇-盐酸(100:1)稀释至刻度,备用。以甲醇-盐酸(100:1)为空白,在 345 nm 处测定吸光度 *A*,以盐酸小檗碱质量浓度(*C*)为横坐标,*A* 为纵坐标,得回归方程 $A = 70.938C - 0.005$ ($r = 0.9996$),线性范围 2.945 ~ 11.78 mg·L⁻¹。

2.3.3 精密度试验 取同一胆黄连供试品溶液,按 2.3.2 项下方法平行测定 6 次 *A*,结果 RSD 1.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一胆黄连供试品溶液,分别在制备后 0,2,4,6,8,10 h 按 2.3.2 项下方法测定 *A*,结果 RSD 1.1%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一胆黄连,按 2.1 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.3.2 项下方法测定 *A*,计算总生物碱平均质量分数 110.719 mg·g⁻¹,RSD 1.3%,表明该方法重复性良好。

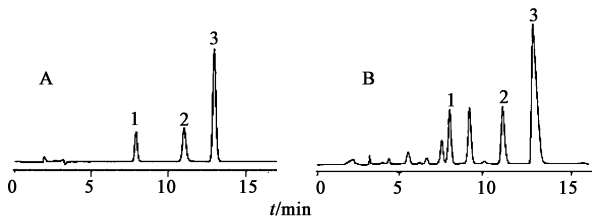
2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的胆

黄连(总生物碱质量分数 $114.973 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)约 0.05 g ,共6份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入盐酸小檗碱对照品适量,按2.1项下方法制备供试品溶液,按2.3.2项下方法测定A,计算平均加样回收率 100.1% ,RSD 1.5% 。

2.3.7 样品测定 分别取2.1和2.2项下黄连、胆黄连饮片及其水煎液的供试品溶液,按2.3.2项下方法测定A,计算总生物碱含量。

2.4 盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的含量测定^[9]

2.4.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相乙腈(A)-磷酸三乙胺水溶液(B,精密量取磷酸 3 mL ,三乙胺 2 mL ,置于 1 L 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得)梯度洗脱($0 \sim 15 \text{ min}, 25\% \sim 30\% \text{ A}; 15 \sim 20 \text{ min}, 30\% \sim 55\% \text{ A}$),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 345 nm ,柱温为室温,进样量 $10 \mu\text{L}$ 。见图1。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 盐酸药根碱; 2. 盐酸巴马汀; 3. 盐酸小檗碱

图1 胆黄连 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of bile processed products of *Coptidis Rhizoma*

2.4.2 对照品溶液的制备 分别精密称取盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇-盐酸($100:1$)溶液溶解,制成质量浓度分别为 $0.042, 0.046, 0.131 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.4.3 线性关系考察 精密吸取2.4.2项下混合对照品溶液 $2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 \mu\text{L}$,按2.4.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的回归方程分别为 $Y = 2523.6X + 1.826$ ($r = 0.9999$), $Y = 3354.8X + 3.391$ ($r = 0.9999$), $Y = 3771.9X - 98.899$ ($r = 0.9998$),线性范围分别为 $0.084 \sim 0.504, 0.092 \sim 0.552, 0.262 \sim 1.572 \mu\text{g}$ 。

2.4.4 精密度试验 取同一胆黄连供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件连续进样6次,计算盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为 $1.9\%, 1.7\%, 1.2\%$,表明仪器精密度良好。

2.4.5 重复性试验 取同一胆黄连,按2.2项下方法制备6份供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件测定,计算盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的平均质量分数分别为 $15.31, 16.76, 56.44 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD分别为 $1.3\%, 1.0\%, 0.6\%$,表明该方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验 精密吸取同一份胆黄连供试品溶液适量,分别在制备后 $0, 2, 4, 6, 8 \text{ h}$ 按2.4.1项下色谱条件测定,结果盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的RSD分别为 $1.7\%, 1.3\%, 1.1\%$,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.4.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的胆黄连(盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱质量分数分别为 $15.19, 16.79, 56.37 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)约 0.1 g ,平行6份,各加入盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品适量,按2.1项下方法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表1。

2.4.8 样品测定 分别精密吸取黄连、胆黄连及其水煎液的供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$,按2.4.1项下色谱条件测定,计算各指标成分的含量,结果见表2。

3 讨论

本文通过UV和HPLC测定了黄连、胆黄连及其水煎液中生物碱类成分的含量,结果表明黄连经猪胆汁炮制后能够增加生物碱类成分在水煎液中的溶出,与相关文献基本一致^[3],但该文献主要采用高效毛细管电泳法(HPCE),通过比较相对峰面积得出的结论,缺少总生物碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱水煎液中转移率的研究。

有研究表明胆黄连与黄连相比,总生物碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱含量增加,但该研究中供试品溶液的制备主要采用有机溶剂提取黄连、胆黄连的粉末样品,再进行含量测定得出的结论,未对水煎液中成分的转移率进行研究^[4]。而本文研究表明胆黄连总生物碱含量降低,盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱含量变化不大,与该文的研究结果并不一致。

本文研究结果表明胆黄连水煎液中总生物碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱的转移率均高于黄连,原因可能与猪胆汁中所含的胆酸类钠盐具有较强的界面活性有关,即类似于表面活性剂的增溶作用;另外还可能与猪胆汁中胆酸类成分与黄连中生物碱类成分成盐,增加了在水中的溶解度有关。

本文通过比较黄连经猪胆汁炮制后在水煎液中

表 1 胆黄连中盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的加样回收率试验

Table 1 Recovery tests of berberine, jatrorrhizine and palmatine in bile processed products of *Coptidis Rhizoma*

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
盐酸药根碱	0.100 1	1.520 5	1.501 8	3.007 0	98.98	100.1	1.6
	0.099 6	1.512 9	1.507 9	3.011 1	99.36		
	0.101 0	1.534 2	1.500 4	3.009 4	98.32		
	0.101 1	1.535 7	1.479 6	3.021 0	100.39		
	0.101 7	1.544 8	1.507 5	3.095 2	102.85		
	0.098 9	1.502 3	1.497 7	3.008 3	100.55		
盐酸巴马汀	0.100 1	1.680 7	1.677 2	3.361 9	100.24	100.1	1.3
	0.099 6	1.672 3	1.653 3	3.301 3	98.53		
	0.101 0	1.695 8	1.717 8	3.430 2	100.97		
	0.101 1	1.697 5	1.702 6	3.402 5	100.14		
	0.101 7	1.707 5	1.712 1	3.396 1	98.63		
	0.098 9	1.660 5	1.598 6	3.290 9	101.99		
盐酸小檗碱	0.100 1	5.642 6	5.609 2	11.240 6	99.80	99.6	0.7
	0.099 6	5.614 5	5.538 4	11.125 2	99.50		
	0.101 0	5.693 4	5.499 7	11.151 1	99.24		
	0.101 1	5.799 0	5.736 9	11.579 3	102.50		
	0.101 7	5.732 8	5.931 6	11.599 4	98.90		
	0.098 9	5.575 0	5.391 4	10.923 5	99.20		

表 2 黄连、胆黄连及其水煎液中总生物碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的含量及转移率 (n=3)

Table 2 Transfer rates and contents of total alkaloids, berberine, jatrorrhizine and palmatine in *Coptidis Rhizoma*, bile processed products and their water decoctions (n=3)

样品	总生物碱	转移率	盐酸药根碱	转移率	盐酸巴马汀	转移率	盐酸小檗碱	转移率
	/mg·g ⁻¹	/%	/mg·g ⁻¹	/%	/mg·g ⁻¹	/%	/mg·g ⁻¹	/%
黄连	122.30		15.19		16.67		56.20	
胆黄连	112.90		15.22		16.71		56.34	
黄连水煎液	87.05	71.17	11.23	73.93	8.60	51.59	31.56	56.16
胆黄连水煎液	88.63	78.50	12.24	80.42	10.73	64.21	36.50	64.79

注:转移率=(水煎液中待测成分质量/饮片中实际质量)×100%。

总生物碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱转移率的测定,从炮制后药效成分的溶出增加方面,初步阐明了胆黄连寒性增强的炮制机制,但炮制后能否提高生物碱类成分的体内生物利用度还需从体内方面进一步深入研究。

[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,2010:285.
 [2] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:160.
 [3] 高希梅,李飞,乔延江. 黄连炮制品全粉和水煎膏中生物碱类成分变化比较[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(1):132-134.
 [4] 钟凌云,杨金梅,龚千锋,等. 不同辅料炮制对黄连生物碱类成分的影响[J]. 中药材,2010,33(2):

195-198.

[5] 上海市食品药品监督管理局. 上海市中药炮制规范[S]. 上海:上海科学技术出版社,2008:169.
 [6] 王静,陈悦,袁子民,等. 响应面法优化胆黄连的炮制工艺[J]. 中华中医药学刊,2015,33(6):1298-1300.
 [7] 李雪改,杨立国,陈丽霞,等. 黄连水提液化学成分分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(3):193-198.
 [8] 朱强,王有为,齐海涛,等. 不同品系黄连产量和质量的研究[J]. 中草药,2006,37(12):1866-1869.
 [9] 王静,张朔,杨艳云,等. 高效液相色谱法同时测定左金丸提取物中五种成分的含量[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(5):804-805.
 [10] 陈阿丽,杨霞,王淑美,等. 黄连与人参配伍后生物碱的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):13-15.

[责任编辑 刘德文]