

DOI:CNKI;11-3495/R. 20110301. 1703. 007

## 黄连标准提取物的制备与质量控制

张红梅<sup>1</sup>, 王长虹<sup>1,2\*</sup>, 王峥涛<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学 中药学院 中药研究所 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203;  
2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201210)

**[摘要]** 目的:优化黄连标准提取物的制备工艺,并建立其质量控制方法。方法:采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计优化黄连标准提取物制备工艺;采用高效液相色谱法同时测定标准提取物中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱的含量。结果:最佳制备工艺为药材用 10 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,提取物得率 25.47%;标准提取物中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱的含量分别为 23.02%、5.63%、5.72%。盐酸小檗碱在  $8.5 \sim 271.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好线性,  $r > 0.9999$ , 平均加样回收率 100.14% (RSD 1.92%);盐酸巴马汀在  $4.2 \sim 133.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好线性,  $r > 0.9999$ , 平均加样回收率 98.52% (RSD 1.65%);盐酸黄连碱在  $3.1 \sim 97.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好线性,  $r > 0.9999$ , 平均加样回收率 99.80% (RSD 1.45%)。结论:乙醇回流是制备黄连标准提取物的有效方法。所建立的 HPLC 分析方法可用于黄连标准提取物中有效成分的质量控制。

**[关键词]** 黄连标准提取物;盐酸小檗碱;盐酸巴马汀;盐酸黄连碱;正交试验;高效液相色谱法;制备;质量控制

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0056-04

## Preparation and Quality Control of Standard Extract from Coptidis Rhizoma

ZHANG Hong-mei<sup>1</sup>, WANG Chang-hong<sup>1,2\*</sup>, WANG Zheng-tao<sup>1,2\*</sup>

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai R&D Centre for Standardization of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201210, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize preparation process of standard extract from Coptidis Rhizoma and establish quality control method of it. **Method:**  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment was used to optimize the extraction process of CoptidisRhizoma. The contents of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and coptisine hydrochloride were detected simultaneously by HPLC. **Result:** The optimal condition for extraction were as follows: most coarse powder of Coptidis Rhizoma was reflux extracted with 10 times 60% ethanol for 1 h, for three times. The extraction yield was 25.47%. The contents of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and coptisine hydrochloride were 23.02%, 5.63% and 5.72%, respectively. The calibration curve of berberine hydrochloride was linear in the range from 8.5 to 271.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r > 0.9999$ ) and the average recovery was 100.14% (RSD 1.92%). The calibration curve of palmatine hydrochloride was linear in the range from 4.2 to 133.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r > 0.9999$ ) and the average recovery was 98.52% (RSD 1.65%). The calibration curve of coptisine hydrochloride was linear in the range from 3.1 to 97.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r > 0.9999$ ) and the average recovery was 99.80% (RSD 1.45%). **Conclusion:** Reflux extraction with ethanol was effective method for preparation of standard extract form

**[收稿日期]** 20101109(012)

**[基金项目]** 上海市科学技术委员会科研项目(04DZ19851);上海市重点学科建设项目(Y0301)

**[第一作者]** 张红梅,博士,讲师,从事中药活性成分与质量标准研究, Tel:021-51322203, E-mail:naturecolor@163.com

**[通讯作者]** \*王长虹,博士,教授,从事药物代谢动力学及药物制剂的质量标准研究, Tel:021-51322511, E-mail:wehexm@hotmail.com;

\*王峥涛,博士,教授,从事中药材资源、鉴定、活性成分与质量标准研究, Tel:021-51322507, E-mail:wangzht@hotmail.com

**[网络出版时间]** 2011-03-01 17:03

Coptidis Rhizoma. HPLC methods established can be used for quality control of the standard extract.

[Key words] Standard extract from Coptidis Rhizoma; berberine hydrochloride; palmatine hydrochloride; coptisine hydrochloride; orthogonal experiment; HPLC; preparation; quality control

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎<sup>[1]</sup>, 在香连丸、朱砂安神丸、牛黄上清丸等中成药中广泛应用。黄连药材来源相对复杂, 质量不稳定, 为保证中成药生产原料用药的质量均一性, 迫切需要可以体现原药材特定中医功效、具有相对明确药效物质基础及严格质量标准的黄连标准提取物作为中间体, 替代原生药使用。本文以具有抗菌、抗肿瘤、保护胃黏膜等生理活性的盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱<sup>[2-4]</sup>为指标优选黄连标准提取物最佳制备工艺, 并建立其质量控制方法。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪及色谱工作站(惠普公司); GRT-RK 型电热套(郑州长城科工贸有限公司), BüCHI 001 旋转蒸发仪(BüCHI), 电子分析天平(Sartorius), KQ-250DB 数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

盐酸小檗碱(批号 110713-200609)和盐酸巴马汀(批号 110732-200506)对照品由中国药品生物制品检定所提供, 盐酸黄连碱(批号 6020-18-4)对照品

由上海绿谷生物研究所提供, 纯度均 > 98%。黄连药材购于上海华宇药业有限公司(批号 H2005032307), 由上海中药标准化研究中心吴立宏副研究员鉴定为 *C. Franch.* 的干燥根茎, 凭证标本存放于上海中药标准化研究中心标本室。乙腈为色谱纯(Fisher Company, USA), 水为超纯水, 乙醇(药用级), 醋酸、三乙胺等其余试剂为分析纯。

## 2 正交试验与制备

**2.1 正交试验及结果** 根据黄连有效成分的性质及预试验结果, 选取乙醇浓度(A)、回流时间(B)、回流次数(C)、浸泡时间(D)4 个因素, 每个因素选择 3 个水平, 因素 A 的水平依次为 60%, 80%, 95%, 因素 B 的水平依次为 1, 1.5, 2 h, 因素 C 的水平依次为 1, 2, 3 次, 因素 D 的水平依次为 0, 1, 12 h, 按  $L_9(3^4)$  正交表安排试验(表 1)。称取黄连生药粉末 50 g, 加乙醇进行回流提取, 所得提取液过滤后减压回收溶剂, 得流浸膏, 60 °C 减压干燥至恒重。以盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱的总含量、总提取率及浸膏得率为指标进行综合加权评分(权重系数分别为 0.4, 0.4 和 0.2), 将综合评分进行直观分析和方差分析(表 1, 2), 考察各因素对黄连提取效率的影响, 优选黄连标准提取物制备工艺。

表 1 黄连标准提取物制备工艺正交试验( $n=3$ )

No.	A	B	C	D	浸膏得率/%	总含量/%	总提取率/%	综合评分
1	1	1	1	1	28.2	28.3	84.17	89.17
2	1	2	2	2	28.6	30.1	90.80	94.52
3	1	3	3	3	27.7	31.6	92.37	96.36
4	2	1	2	3	24.6	34.0	87.70	94.92
5	2	2	3	1	29.0	29.7	90.50	94.17
6	2	3	1	2	23.3	31.9	78.03	87.40
7	3	1	3	2	21.1	32.8	72.03	84.38
8	3	2	1	3	17.7	33.8	62.83	79.31
9	3	3	2	1	22.7	30.8	72.93	83.50
$K_1$	93.350	89.490	85.293	88.947				
$K_2$	92.163	89.333	90.980	88.767				
$K_3$	82.397	89.087	91.637	90.197				
R	10.953	0.403	6.344	1.430				

表 2 方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
A	216.771	2	874.077	19.000	<0.05
B	0.248	2	1.000	19.000	
C	73.007	2	294.383	19.000	<0.05
D	3.640	2	14.677	19.000	
误差	0.25	2			

表 1 中极差值表明,4 个因素影响从大到小顺序为  $A > C > D > B$ , 即乙醇浓度影响最大,其次为回流次数,浸泡时间,回流时间。从各因素均值选择最佳制备工艺为  $A_1 B_1 C_3 D_3$ 。表 2 方差分析结果表明,乙醇浓度和回流次数具有显著性差异,而回流时间和浸泡时间无显著意义,故可以根据实际生产选择,从中药常用方法和节省时间角度考虑,黄连标准提取物最佳制备工艺调整为  $A_1 B_1 C_3 D_2$ , 即药材浸泡 1 h,10 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 1 h。

**2.2 黄连提取物的制备** 称取约 500 g 黄连生药,加 5 000 mL 60% 乙醇,浸泡 1 h,提取 3 次,每次 1 h。提取液合并,过滤,回收溶剂至浓流浸膏,在 60 °C 下减压真空干燥至恒重,粉碎,即得。

### 3 质量控制

**3.1 色谱条件** Hypersil ODS<sub>2</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 2% 醋酸 (含 0.1% 三乙胺)-乙腈 (65:35) 等度洗脱; 流速 0.7 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 264 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。高效液相色谱图见图 1。

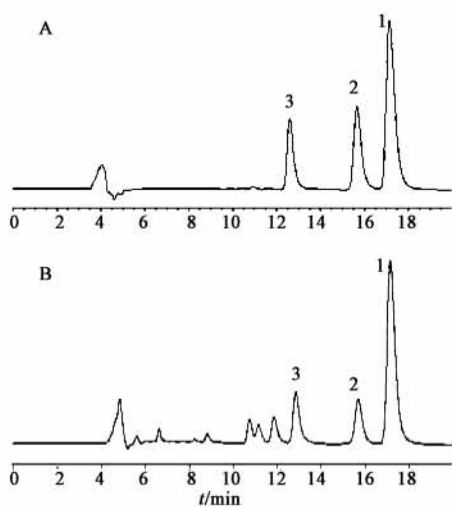


图 1 黄连标准提取物 HPLC

A. 混合对照品; B. 黄连标准提取物样品;  
1. 盐酸小檗碱; 2. 盐酸巴马汀; 3. 盐酸黄连碱

**3.2 对照品溶液制备** 精密称取对照品盐酸小檗碱 6.78 mg, 盐酸巴马汀 3.33 mg, 盐酸黄连碱 2.43 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇约 20 mL, 超声溶解, 放冷, 加甲醇至刻度, 制成含盐酸小檗碱 0.271 g·L<sup>-1</sup>, 盐酸巴马汀 0.133 g·L<sup>-1</sup>, 盐酸黄连碱 0.097 g·L<sup>-1</sup> 的对照品混合溶液。

**3.3 供试品溶液制备** 取均一黄连提取物粉末约 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容。从中精密移取 1 mL 置 50 mL 量瓶中加甲醇定容。

**3.4 标准曲线与线性关系** 精密移取上述对照品混合溶液适量至量瓶中, 甲醇稀释至刻度制成含盐酸小檗碱 0.271, 0.136, 0.068, 0.034, 0.017, 0.008 g·L<sup>-1</sup>, 含盐酸巴马汀 0.133, 0.067, 0.033, 0.017, 0.008, 0.004 g·L<sup>-1</sup>, 含盐酸黄连碱 0.097, 0.049, 0.024, 0.012, 0.006, 0.003 g·L<sup>-1</sup> 6 个质量浓度的系列混合对照品溶液。按 3.1 方法进行测定, 重复操作 3 次, 以横坐标峰面积 (X) 对纵坐标浓度 (Y) 进行线性回归, 得盐酸小檗碱回归方程  $Y = 0.0185X + 0.9280$  ( $r > 0.9999$ ); 盐酸巴马汀回归方程  $Y = 0.0207X + 0.5146$  ( $r > 0.9999$ ); 盐酸黄连碱回归方程  $Y = 0.0214X + 0.2833$  ( $r > 0.9999$ )。结果表明盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱分别在 0.85 ~ 271.2, 0.42 ~ 133.2, 0.31 ~ 97.2 mg·L<sup>-1</sup> 色谱峰面积与浓度呈良好的线性关系。

**3.5 定量限与检测限** 将盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱对照品溶液稀释至一定浓度, 吸取 10 μL 注入 HPLC, 以信噪比  $S/N = 10$  为定量限, 信噪比  $S/N = 3$  为检测限进行测定。盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱的定量限分别为 0.085, 0.084, 0.062 mg·L<sup>-1</sup>; 0.034, 0.034, 0.025 mg·L<sup>-1</sup>。

**3.6 精密度试验** 将一定浓度的盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱对照品溶液, 按 3.1 方法同日内连续进样 6 次, 测定峰面积, 进行日内精密度测定, 峰面积的 RSD 分别为 0.07%, 0.09%, 0.07%; 按 3.1 方法每日内连续进样 3 次, 连续测定 3 日, 测定峰面积, 进行日间精密度测定, 峰面积的 RSD 分别为 0.15%, 0.24% 和 0.49%, 表明仪器精密度良好。

**3.7 重复性试验** 取同一黄连浸膏 6 份, 精密称定, 按 3.3 项下操作制备样品溶液, 按 3.1 方法进样分析, 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱 RSD 分别为 1.99%, 2.23%, 2.40%, 表明方法重复性

良好。

**3.8 稳定性试验** 取一份样品溶液,室温下静置,分别于0,1,2,4,8,12,18,24 h后进入分析,盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱24 h内RSD分别为0.53%,0.95%,2.33%,表明样品在24 h内稳定性良好。

**3.9 加样回收率试验** 精密称取已测定含量的黄连浸膏9份,各0.25 g,分别按80%,100%和120%3个水平精密加入混合对照品溶液,置50 mL量瓶中,加甲醇超声溶解并定容。从中精密移取1 mL置50 mL量瓶中加甲醇定容,按3.1方法进入分析,计算加样回收率,结果见表3。

表3 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸黄连碱的加样回收率( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

化合物	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
盐酸小檗碱	0.250 5 ± 0.000 3	56.46 ± 0.07	45.21	102.30 ± 0.55	101.38 ± 1.39	100.14	1.92
	0.250 6 ± 0.000 5	56.49 ± 0.11	56.51	112.65 ± 1.05	99.37 ± 1.71		
	0.250 7 ± 0.000 4	56.50 ± 0.09	67.81	124.10 ± 1.40	99.67 ± 2.21		
盐酸巴马汀	0.250 5 ± 0.000 3	13.98 ± 0.02	11.25	25.00 ± 0.10	98.44 ± 1.09	98.52	1.65
	0.250 6 ± 0.000 5	13.98 ± 0.03	14.06	27.85 ± 0.20	99.19 ± 1.64		
	0.250 7 ± 0.000 4	13.99 ± 0.02	16.87	30.45 ± 0.35	97.92 ± 2.04		
盐酸黄连碱	0.250 5 ± 0.000 3	16.48 ± 0.02	13.24	29.65 ± 0.15	99.74 ± 1.37	99.80	1.45
	0.250 6 ± 0.000 5	16.49 ± 0.03	16.55	33.05 ± 0.15	100.39 ± 1.07		
	0.250 7 ± 0.000 4	16.49 ± 0.03	19.86	36.15 ± 0.35	99.26 ± 1.83		

**3.10 样品测定** 分别精密称取3批黄连标准提取物,按3.3项下制备,按3.1方法进行含量测定。根据标准曲线回归方程计算盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量。结果见表4。

表4 样品5种成分含量测定( $n=3$ ) %

No.	盐酸 黄连碱	盐酸 黄连碱	盐酸 巴马汀	盐酸 巴马汀	盐酸 小檗碱	盐酸 小檗碱
1	5.74	0.18	5.71	0.64	23.74	0.83
2	5.73	0.25	5.32	0.37	21.81	0.11
3	5.69	0.22	5.87	0.09	23.51	0.04

#### 4 讨论

预试验考察水、0.25%硫酸和乙醇对黄连中有效成分提取效率的影响,结果表明3种溶剂差异显著,其中乙醇对黄连中多种生物碱有效成分的提取效率最高,故选用之。并通过 $L_9(3^4)$ 正交试验对乙醇浓度进行考察,结果表明最佳乙醇浓度为60%。

2010年版《中国药典》<sup>[1]</sup>及文献[5-8]中黄连含量测定所用流动相加入十二烷基磺酸钠,本文采用2%醋酸(含0.1%三乙胺)-乙腈(65:35)为流动相,简化了流动相组成,且符合系统适应性,建立了黄连

标准提取物多成分同时进行含量测定的快速、简便、高效的HPLC分析方法。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:285.
- [2] 王秀杰.黄连的药理研究及现代应用[J].中国药师,2003,6(6):370.
- [3] 代国友,潘晓鸥,罗红霞.黄连的药理研究进展[J].中国药房,2004,15(11):694.
- [4] 黄丕兰,廖晓春,朱红涛,等.高效液相色谱法测定黄藤素片中盐酸巴马汀的含量[J].药物分析杂志,2005,25(10):1261.
- [5] 应懿,何志红,周世文,等.测定黄连中5种生物碱含量的高效液相色谱法研究[J].第三军医大学学报,2007,29(9):843.
- [6] 王传芬.黄连中小檗碱的提取工艺[J].华西药学杂志,2007,22(4):476.
- [7] 宋平顺,卫玉玲,赵建邦,等.黄连不同炮制品中3种生物碱含量的高效液相色谱法测定[J].时珍国医国药,2008,19(10):2396.
- [8] 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[J].上海中医药杂志,2010,44(6):112.

[责任编辑 蔡仲德]