

• 药剂 •

# 黄连解毒汤用半仿生法提取药材组合方式的优选

林慧彬<sup>1</sup>, 张兆旺<sup>2</sup>, 孙秀梅<sup>2</sup>, 路 宁<sup>3</sup>, 林建强<sup>4</sup>, 林建群<sup>4</sup>

(1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250014;  
3. 青岛双鲸药业, 山东 青岛 266000; 4. 山东大学生命科学院, 山东 济南 250100)

**摘要:** 目的: 选择半仿生法提取黄连解毒汤的最佳药材组合方式。方法: 以小檗碱、黄芩苷、栀子苷、总生物碱、总黄酮的含量、干浸膏得率及无水乙醇提取精制液的高效液相梯度洗脱总积分面积等为指标进行综合判定。结果与结论: 黄连解毒汤以黄连、黄柏与栀子合煎, 黄芩单煎的提取方式为佳。

**关键词:** 黄连解毒汤; 半仿生提取法; 组合方式

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)01-0001-05

## The Optimization of Extracting Mode of Huanglian Jiedu Decoction Using Semi-bionic Extraction Method

LIN Hui-bin<sup>1</sup>, ZHANG Zhao-wang<sup>2</sup>, SUN Xiu-mei<sup>2</sup>, LU Ning<sup>3</sup>, LIN Jian-qiang<sup>4</sup>, LIN Jian-qun<sup>4</sup>

(1. Shandong Institute of TCM, Shandong Jinan 250014, China; 2. Shandong University of TCM, Shandong Jinan 250014, China; 3. Qingdao Shuangjing Pharmaceutical Company, Shandong Qingdao 266000, China; 4. College of Life Sciences, Shandong University, Shandong Jinan 250100, China)

**Abstract:** Object: To select the optimum extracting mode of Huanglian Jiedu Decoction. Method: Semi-bionic Extraction method is used, the contents of berberine, baicalin, geniposide, total alkaloid, total flavonoid, extract weight and total integral calculus area of HPLC by gradient washing are evaluated by the results. Result and Conclusion: The optimum extracting mode of Huanglian Jiedu Decoction is that *Rhizoma Coptidis*, *Cortex Phellodendri* and *Fructus Gardeniae* are decocted together, and *Radix Sutellariae* is decocted alone.

**Key words:** Huanglian Jiedu Decoction; Semi-bionic Extraction; extracting mode

黄连解毒汤始见于唐·《外台秘要》, 由黄连(A)、黄芩(B)、黄柏(C)和栀子(D)组成。为选择其药效物质提取时药材较佳组合方式, 我们将方中药材按排列组合方式组成 15 组, 用半仿生提取法(简称 SBE 法)<sup>[1-2]</sup>选出的条件提取(另文报道), 以薄层色谱法测定小檗碱、栀子苷含量; 以分光光度法测定总生物碱、总黄酮含量; 以高效液相色谱法测定黄芩苷含量及无水乙醇提取精制液的梯度洗脱总积分面积以及干浸膏得率等为指标进行了 HPLC 实验研究。

### 1 仪器与药品

pHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); AE240S 型电子分析天平(瑞士 METTLER); 721-100 型分光光度计(上海第三分析仪器厂); CS-930 型薄层扫描仪(日本·岛津); BECKMAN 高效液相色谱仪(美国·贝克曼); LXJ-II 型离心沉淀机(上海医疗器

械三厂)。

药材经张兆旺教授鉴定: 黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria bajcalensis* Georgi. 的干燥根, 黄柏为芸香科植物黄檗 *Phello dendron amurense* Rupr. 除去栓皮的干燥树皮, 栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia Jasminoides* Ellis. 的干燥成熟果实。

盐酸小檗碱、黄芩苷、栀子苷、芦丁对照品(中国药品生物制品检定所); pH7.0 缓冲液按《中国药典》2000 年版二部附录磷酸盐缓冲液(pH7.0)配制; 0.007% 溴麝香草酚蓝溶液用 pH7.0 缓冲液配制; HPLC 用甲醇为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 药材组合方式** 黄连解毒汤有 4 味药材, 其组合方式有 15 种, 分别为 1 号(A+ B+ C+ D); 2 号(A + B+ CD); 3 号(AB+ C+ D); 4 号(AC+ B+ D); 5 号

(AD+ B+ C); 6 号(BC+ A+ D); 7 号(BD+ A+ C); 8 号(A+ BCD); 9 号(B+ ACD); 10 号(C+ ABD); 11 号(D+ ABC); 12 号(AB+ CD); 13 号(AC+ BD); 14 号(AD+ BC); 15 号(ABCD)。

其中, 1 号(A+ B+ C+ D) 即 A、B、C、D 分别单煎。2 号(A+ B+ CD) 即 A、B 分别单煎, C、D 合煎, 其余类推。

**2.2 样品液的制备** 将处方中 4 种药材分别粉碎, 按处方比例取 12~ 20 目之间的粗粉 45g, 精密称定, 按 2.1 项下组合方式, 浸泡 30min, 用 SBE 法加热回流提取 3 次(加水量依次为药材的 10、8、8 倍; 三煎用水的 pH 值分别为 5.90, 7.50, 8.40; 提取时间为 2.9, 1.4, 0.7h), 提取液用 4 层纱布加 120 目筛分别滤过、离心(2500r/min, 20min), 合并上清液, 浓缩至 250ml, 得 1~ 15 号样品液(每 ml 相当于原药材 0.180g)。

**2.3 供试液的制备** 精密吸取 2.2 项下样品液 30.0ml, 置蒸发皿中蒸至近干, 拌硅藻土 4.0g, 搅匀, 蒸干, 研细, 用甲醇 150ml 索氏回流提取至无色, 回收甲醇, 残渣用甲醇定容至 25ml, 得供试液 A(每 ml 相当于原药材 0.216g)。

精密吸取 2.2 项下样品液 3.0ml 置蒸发皿中, 拌入聚酰胺(60~ 90 目) 0.5g, 混匀, 水浴蒸干, 研细。另取聚酰胺 2.0g, 湿法装柱。依次以蒸馏水 300ml, 1% 盐酸 100ml, 20% 乙醇 100ml, 洗脱至碘化铋钾反应为阴性。再用 70% 乙醇 50ml 洗脱, 收集此洗脱液, 水浴蒸干, 用 70% 乙醇定容至 10ml, 得供试液 B(每 ml 相当于原药材 0.054g)。

精密吸取 2.2 项下样品液 25.0ml, 置蒸发皿中蒸至近干, 拌硅藻土 2.0g, 搅匀, 蒸干, 研细, 用无水乙醇 100ml 索氏回流提取至无色, 回收乙醇, 残渣用乙醇定容至 25ml。精密吸取 1.0ml, 用无水乙醇定容至 10ml, 得供试液 C(每 ml 相当于原药材 0.018g)。

**2.4 对照液的制备** 精密称取盐酸小檗碱、栀子苷、黄芩苷、芦丁各一定量, 分别用甲醇、95% 乙醇、70% 乙醇、70% 乙醇配制。4 种对照品液的浓度分别为盐酸小檗碱( $0.550\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、栀子苷( $1.010\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、黄芩苷( $0.200\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、芦丁( $0.210\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )。

## 2.5 小檗碱含量测定

**2.5.1 实验条件** 层析条件: 0.3% CMC-Na 硅胶 G 板; 展开剂: 苯-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水(6:3:3:1.5:0.3) 与等量浓氨水, 展距 10cm。紫外灯定位。扫描

条件:  $\lambda_{\text{e}} = 270\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{r}} = 340\text{nm}$ ; 灵敏度: 中, SX = 3; 狭缝  $1.2\text{mm} \times 1.2\text{mm}$ , 双波长反射式锯齿扫描。

**2.5.2 阴性干扰** 实验按照制备供试液的方法, 制得缺黄连、黄柏的阴性对照液。取供试液、小檗碱对照品液及其阴性对照液点样层析, 晾干后, 于紫外灯(365nm) 下检视, 供试品能很好的分离, 显示 4 个斑点, 小檗碱的黄色荧光斑点清晰( $R_{\text{f}} = 0.63$ ), 而缺黄连、黄柏的阴性对照液在与小檗碱对应位置上无斑点。对其进行扫描的结果显示, 缺黄连、黄柏的阴性对照在与小檗碱对应的位置上无明显吸收, 而供试品在该位置有吸收峰, 表明用本法测定样品中小檗碱含量无明显干扰。

**2.5.3 标准曲线的制备** 精密吸取 2.4 项下盐酸小檗碱对照液 1、2、3、4、5、6 $\mu\text{l}$ , 点于同一块薄层板上, 按选定的色谱条件展开, 测定。以点样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 回归方程为:  $Y = 35821X + 15942$ ,  $r = 0.9993$ 。盐酸小檗碱在  $0.55 \sim 3.30\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的范围内呈良好的线性关系。

**2.5.4 精密度试验** 精密吸取盐酸小檗碱 2 $\mu\text{l}$ , 在同一块薄层板上重复点样 5 次, 展开, 测定峰面积, RSD 为 3.62%。

**2.5.5 稳定性试验** 将上述薄板选 1 点立即测定, 并每隔 15min 测定 1 次。结果盐酸小檗碱在 90min 内稳定, RSD 为 2.09%。

**2.5.6 含量测定** 精密吸取 2.3 项下供试液 A 各 2 $\mu\text{l}$  与盐酸小檗碱对照液 2 $\mu\text{l}$ 、4 $\mu\text{l}$ , 点于同一块薄层板上, 按 2.5.1 项下方法展开后扫描测定。小檗碱含量以盐酸小檗碱计算, 结果见表 1。

**2.5.7 回收率试验** 精密吸取 2.2 项下 1 号样品液 15ml, 共取 5 份, 分别加入盐酸小檗碱对照品一定量, 按 2.3 项下方法制得供试液, 展开后测定。结果盐酸小檗碱的平均回收率为 97.15%, RSD 为 2.26%。

## 2.6 栀子苷的含量测定

**2.6.1 实验条件** 层析条件: 0.3% CMC-Na 硅胶 G 板; 展开剂: 正丁醇-冰醋酸-水(7:1:2), 展距 12cm; 显色剂: 10% 的硫酸乙醇, 105℃ 烘 5min。扫描条件:  $\lambda_{\text{e}} = 495\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{r}} = 635\text{nm}$ ; 灵敏度: 中, SX = 3; 狭缝  $1.2\text{mm} \times 1.2\text{mm}$ , 双波长反射式锯齿扫描。

**2.6.2 阴性干扰实验** 按照制备供试液的方法制得缺栀子的阴性对照液。取供试液、栀子苷对照品液及阴性对照液点样层析, 硫酸乙醇显色后, 供试品可见 7 个分离较好的斑点, 在与栀子苷相应位置上

有一紫红色斑点,扫描显示有明显吸收。而阴性对照在此位置即无斑点,扫描也无明显吸收,表明用本法测定栀子苷含量无明显干扰。

**2.6.3 标准曲线的制备** 精取栀子苷对照液 1.2、3.4、5.6 $\mu\text{L}$ ,点于同一块薄层板上,按 2.6.1 项下方法展开,显色后扫描测定。以点样量为横坐标,峰面积为纵坐标作图,回归方程为:  $Y = 20311X - 8724.27$ ,  $r = 0.9994$ 。栀子苷在 1.01~ 6.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的范围内呈良好的线性关系。

**2.6.4 精密度试验** 精取栀子苷对照液 2 $\mu\text{L}$ ,在同一块薄层板上点 5 个相同量的点,按 2.6.2 项下方法测定,  $RSD$  为 2.43%。

**2.6.5 稳定性试验** 将上述薄层板选择一个点立即测定,并每隔 15min 测定一次,结果在 90min 内稳定,  $RSD$  为 3.15%。

**2.6.6 含量测定** 精取供试液 A 各 2 $\mu\text{L}$  与栀子苷对照液 2 $\mu\text{L}$ 、4 $\mu\text{L}$ ,点于同一块薄层板上,按 2.6.1 项下方法展开、显色、扫描测定,结果见表 1。

**2.6.7 回收率试验** 精密吸取 2.2 项下 1 号样品液 12.5ml,共取 5 份,分别加入栀子苷对照品一定量,按 2.3 项下方法制得供试液,展开后扫描测定,计算回收率。结果栀子苷的平均回收率为 97.88%,  $RSD$  为 2.03%。

**2.7 黄芩苷的含量测定**

**2.7.1 检测条件** 色谱柱: Kromasil  $C_{18}$  (5 $\mu\text{m}$ , 4.6mm  $\times$  30cm); 流动相: 甲醇-水-磷酸(47: 53: 0.2); 检测波长: 280nm; 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.7.2 阴性对照液的制备** 按制备供试液的方法,制得缺黄芩的阴性对照液。

**2.7.3 阴性干扰试验** 按照上述色谱条件,吸取对照品、供试品及阴性对照液各 20 $\mu\text{L}$  测定。在供试品色谱中,与对照品色谱相同的位置上有一相同保留时间的色谱峰,而阴性对照液在此保留时间无干扰。

**2.7.4 标准曲线的制备** 精密吸取黄芩苷对照液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml,分别用 70% 的乙醇定容至 10ml,用 0.45 $\mu\text{m}$  的滤膜滤过。分别吸取 20 $\mu\text{L}$  进样,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,回归方程:  $Y = 170913.45X - 2425.1$ ,  $r = 0.9997$ ,黄芩苷在 20~ 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内呈良好的线性关系。

**2.7.5 精密度试验** 精取黄芩苷对照液 20 $\mu\text{L}$ ,连续进样 5 次,  $RSD$  为 2.56%。

**2.7.6 稳定性试验** 精取黄芩苷对照液 20 $\mu\text{L}$ ,每隔 1h 进样一次,结果在 5h 内稳定性较好,  $RSD$  为 2.31%。

**2.7.7 含量测定** 按 2.7.1 项下方法,将供试液 B 经微孔滤膜滤过后,各进样 20 $\mu\text{L}$ ,测得峰面积,计算含量,结果见表 1。

**2.7.8 回收率试验** 精密吸取 2.2 项下 1 号样品液 1.5ml,共取 5 份,分别加入黄芩苷对照品一定量,按 2.3 项下方法制得供试液,微孔滤膜滤过,进样,测定峰面积,计算回收率。结果黄芩苷的平均回收率为 96.08%,  $RSD$  为 2.21%。

**2.8 总生物碱的含量测定**

**2.8.1 标准曲线的制备** 按文献<sup>[3]</sup>方法,显色,在 420nm 测定吸收度,以浓度为横坐标,吸收度为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程:  $Y = 0.0257X + 0.1054$ ,  $r = 0.9998$ 。

**2.8.2 含量测定** 精密吸取供试液 A 各 0.10ml,置具塞三角瓶中,水浴蒸干,按上述方法测定,总生物碱含量以盐酸小檗碱计算,结果见表 1。

**2.9 总黄酮的含量测定**

**2.9.1 标准曲线的制备** 精取芦丁对照液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml,分别置 25ml 容量瓶中,依次加入水 10.0ml, 5%  $\text{NaNO}_2$  1.0ml, 1%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  1.0ml, 4%  $\text{NaOH}$  10.0ml,时间间隔均为 6min,用水定容至刻度。以相应试剂为空白,在 510nm 处测定吸收度,以浓度为横坐标,吸收度为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为:  $Y = 0.0658X + 0.0075$ ,  $r = 0.9991$ ,线性范围为 8.40~ 50.40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**2.9.2 含量测定** 精取供试液 B 各 3.0ml,置 25ml 容量瓶中,按 2.9.1 项下方法测定。总黄酮含量以芦丁计算,结果见表 1。

**2.10 HPLC 梯度洗脱总积分面积的测定**

**2.10.1 检测条件** 色谱柱: Kromasil  $C_{18}$  (5 $\mu\text{m}$ , 4.6mm  $\times$  30cm); 流动相: 甲醇(30%)-水(70%)  $\rightarrow$  甲醇(100%),时间 45min; 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 检测波长: 254nm。

**2.10.2 总积分面积的测定** 精取供试液 C 各 0.50ml,置 10ml 容量瓶中,用甲醇定容,微孔滤膜滤过,进样量 20 $\mu\text{L}$ ,得总积分面积值,结果见表 1。

**2.11 干浸膏的测定** 精取样品液 10.0ml,分别置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,烘至恒重,计算干浸膏得率,结果见表 1。

表 1 黄连解毒汤 15 种药材组合方式各指标成分的含量比较

实验组	小檗碱(mg·g <sup>-1</sup> )	栀子苷(mg·g <sup>-1</sup> )	黄芩苷(mg·g <sup>-1</sup> )	总生物碱(mg·g <sup>-1</sup> )	总黄酮(mg·g <sup>-1</sup> )	干浸膏(g·g <sup>-1</sup> )	HPLC 总积分面积
1	13.4848	1.7578	0.8917	77.1870	1.8652	0.2990	3577229
2	13.2667	1.5800	1.1760	74.8811	1.9881	0.2907	2455268
3	2.5356	1.7433	0.8664	66.9548	1.7707	0.2402	2900136
4	10.4894	1.9311	1.1084	76.3222	1.9503	0.2824	2340652
5	9.3250	2.2098	1.0119	78.4841	1.9314	0.2852	2225532
6	9.6013	1.1448	1.0732	78.4842	1.5437	0.3002	1660423
7	11.6420	1.1170	1.1744	74.8811	2.0071	0.2784	1243478
8	1.0709	1.6015	1.2372	73.4400	1.8933	0.2754	1540555
9	10.7439	2.8489	1.2588	77.7633	2.0165	0.2793	1027125
10	6.7261	2.5622	1.1375	75.8900	1.6477	0.2716	1388473
11	1.5815	3.1861	0.9129	70.9900	1.7801	0.2230	1086196
12	6.9485	2.7663	1.1831	76.4663	1.8558	0.2784	990864
13	8.7802	2.6613	0.9148	69.6930	1.9787	0.2257	1715843
14	2.2683	2.7961	0.9142	59.1730	1.6194	0.1895	822616
15	1.3141	2.7439	0.9378	64.0726	1.2600	0.2116	835203

表 2 黄连解毒汤 15 种药材组合方式各指标的标准化处理结果

实验组	小檗碱	栀子苷	黄芩苷	总生物碱	总黄酮	干浸膏	HPLC 总面积	Y 值
1	1.3726	- 0.6292	- 1.0686	0.7326	0.2741	1.0571	2.2660	9.9696
2	1.3250	- 0.8962	0.8886	0.3331	0.7911	0.8200	0.8966	18.2212
3	- 1.0655	- 0.6509	- 1.3517	- 1.0493	- 0.1725	- 0.6229	1.4396	- 23.2909
4	0.7063	- 0.3689	0.3994	0.5824	0.6763	0.5829	0.7568	13.6286
5	0.4469	0.0497	- 0.2988	0.9589	0.5870	0.6629	0.6162	10.7426
6	0.5085	- 1.5499	0.1447	0.9589	- 1.2486	1.0914	- 0.0735	- 5.4734
7	0.9631	- 1.5916	0.8770	0.3313	0.9447	0.4686	- 0.5824	6.0335
8	- 1.3917	- 0.8639	1.3314	0.0787	0.4069	0.3829	- 0.2198	- 4.4206
9	0.7630	1.0096	1.4877	0.8334	0.9891	0.4943	- 0.8645	28.5072
10	- 0.1320	0.5790	0.6100	0.5071	- 0.7538	0.2743	- 0.4664	5.5616
11	- 1.2780	1.5161	- 1.0152	- 0.3464	- 0.1281	- 1.1430	- 0.7744	- 11.9469
12	- 0.1256	0.8856	0.9399	0.6075	0.2297	0.4686	0.8907	19.1598
13	0.3256	0.7278	- 1.0014	- 0.5723	0.8105	- 1.0371	- 0.0059	- 0.7751
14	- 1.1250	0.9303	- 1.0058	- 2.4047	- 0.8875	- 2.0714	- 1.0961	- 29.0034
15	1.3370	0.8519	- 0.8350	- 1.5513	- 2.5860	- 1.4400	- 1.0807	- 13.1940

$$Y = (\text{小檗碱} + \text{栀子苷} + \text{黄芩苷}) \times 7 + (\text{总生物碱} + \text{总黄酮}) \times 4 + \text{HPLC 总面积} \times 3 + \text{干浸膏} \times 2$$

### 3 实验结果的处理

按公式  $Y = (x - \bar{x}) / s$ , 对各测定数据进行标准化处理( $\bar{x}$  为含量测定的平均值,  $s$  为其标准差), 根据各指标在工艺选择中的主次, 给予不同的加权系数, 确定综合评价  $Y$  值, 结果见表 2。

### 4 小结与讨论

黄连解毒汤方药排列组合的方式有 15 种, 我们用半仿生的方法进行提取, 以小檗碱、栀子苷、黄芩

苷、总生物碱、总黄酮含量、干浸膏得率及无水乙醇提取精制液的高效液相梯度洗脱总积分面积值为指标, 综合评价的结果是: 黄连、黄柏与栀子合煎, 黄芩单煎的提取方式为佳。

HPLC 梯度洗脱中, 在检测波长 254nm, 流动相 甲醇(30%)-水(70%) → 甲醇(100%) 的色谱条件下, 检出的灵敏度较高。在此分析范围内, 15 种药材组合方式提取液的色谱峰数及峰位基本一致, 但积分

值不同,表明 15 种药材组合方式提取出的成分基本一致,但含量不同。

本实验中对 15 种药材组合方式的 7 个指标进行了标准化处理,以消除各指标单位和纲量不同以及各指标变量范围相差悬殊所造成的影响;同时根据各指标在工艺选择中的主次,给予不同的加权系数,以标准化处理加权求和后的  $Y$  值作为综合评价指标,比各指标成分含量直接相加更加科学合理。

本研究采用多种指标,综合优选该方最佳药材组合方式,符合中医用药发挥多种成分、综合作用的

特点,同时也利于用单体成分控制制剂的质量。

#### 参考文献:

- [1] 张兆旺,孙秀梅.“半仿生提取法”的特点与应用[J].世界科学技术——中药现代化,2000,2(1):35.
- [2] 张瑞亭,张兆旺.思维方式的转换与中药“半仿生提取法”[J].中国中药杂志,1997,22(9):542.
- [3] 孔广英,于立佐,于海鹏,等.酸性染料比色法测定牛黄益金片中总生物碱的含量[J].中成药,1992,14(1):12