

# 小檗皮总生物碱提取物的大孔树脂纯化工艺与质量标准考察

冯慧<sup>1</sup>, 赵娅<sup>1</sup>, 王小艳<sup>1</sup>, 向宇楠<sup>1</sup>, 郝露<sup>1</sup>, 李啟恩<sup>2</sup>, 李先加<sup>2\*</sup>, 赖先荣<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学 民族医药学院, 成都 611137; 2. 青海大学 藏医学院, 西宁 810000)

**[摘要]** 目的: 优选小檗皮总生物碱提取物的大孔树脂纯化工艺, 并建立其质量标准, 为该有效部位的制剂开发提供参考。方法: 采用酸性染料比色法考察小檗皮总生物碱提取物的纯化工艺, 考察的工艺参数包括上样液质量浓度、上样速度、树脂柱径高比、水洗用量、洗脱剂体积分数及用量、洗脱流速等。采用 HPLC 测定小檗皮总生物碱提取物中 4 种生物碱类成分(木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱)的含量, 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 270 nm, 确定最佳纯化工艺。按 2015 年版《中国药典》的要求进行小檗皮总生物碱纯化物的薄层色谱鉴别、含量测定、特征图谱等质量标准研究。结果: 小檗皮总生物碱提取物的最佳纯化条件为采用 HPD100 型大孔树脂 10 g, 树脂柱径高比 1:8, 上样液质量浓度 11 g·L<sup>-1</sup>, 上样液体积 50 mL, 上样流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 加 4 BV 水洗脱(1 BV = 15 mL), 加 30% 乙醇 9 BV 洗脱; 纯化后小檗皮总生物碱的转移率 >80%, 纯度 >65%。建立了小檗皮总生物碱纯化物的质量标准, 特征图谱中共有峰有 19 个, 整体相似度均 >0.99。结论: 优选的纯化工艺稳定可行, 建立的质量标准可靠, 适用于小檗皮总生物碱提取物的纯化及质量控制。

**[关键词]** 小檗皮; 总生物碱; 大孔树脂; 纯化工艺; 质量标准; 特征图谱; 盐酸小檗碱

**[中图分类号]** R22;R28;R9;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)16-0097-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190555

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.2227.054.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-19 14:14

## Optimization of Purification Process of Total Alkaloid Extract of *Berberis dictyophylla* Cortex by Macroporous Resin and Investigation of Its Quality Standard

FENG Hui<sup>1</sup>, ZHAO Ya<sup>1</sup>, WANG Xiao-yan<sup>1</sup>, XIANG Yu-nan<sup>1</sup>, HAO Lu<sup>1</sup>, LI Qi-en<sup>2</sup>,  
LI Xian-jia<sup>2\*</sup>, LAI Xian-rong<sup>1\*</sup>

(1. Ethnic Medicine School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;  
2. Tibetan Medical College, Qinghai University, Xining 810000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize purification process of total alkaloid extract of *Berberis dictyophylla* cortex by macroporous resin, and to establish its quality standard. **Method:** Acid dye colorimetry was used to investigate the purification process of total alkaloid extract of *B. dictyophylla* cortex, the process parameters included concentration of sample solution, speed of sampling, diameter-height ratio of resin column, water washing amount, concentration and dosage of eluent, flow rate of elution, etc. In order to determine the optimum process, HPLC was employed to determine the contents of four alkaloids (magnoflorine, jatrorrhizine hydrochloride, palmatine hydrochloride, and berberine hydrochloride) with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution for gradient elution and detection wavelength at 270 nm. After being purified, quality standard of total alkaloid extract of *B. dictyophylla* cortex was investigated according to the requirements in the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. **Result:** Optimal purification conditions were as following: 10 g of

**[收稿日期]** 20180924(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81774007,81173360,81560806);青海省科技计划项目(2017-ZJ-922Q)

**[第一作者]** 冯慧,在读硕士,从事中药及民族药创新药物研究, Tel:028-61656141, E-mail:1078102337@qq.com

**[通信作者]** \* 赖先荣,教授,从事中药及民族药创新药物研究, Tel:028-61656141, E-mail:vegf@qq.com;

\* 李先加,教授,从事藏族医药防治重大疾病及特色优势病种研究, Tel:0971-5310695, E-mail:lxgyal@sina.com

HPD100 macroporous adsorption resin with a column diameter-height ratio of 1:8, sampling solution concentration of  $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the loading flow rate of  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , sampling solution volume of 50 mL, washed with 4 BV of water (1 BV = 15 mL) and added 9 BV of 30% ethanol, after being purified, the transfer rate of total alkaloids was >80%, and its purity was >65%. The quality standard of total alkaloid extract of *B. dictyophylla* cortex was established, there were 19 common peaks in the characteristic chromatogram, and the overall similarity was >0.99. **Conclusion:** This optimized purification process is stable and feasible, and the established quality standard is controllable.

[**Key words**] *Berberis dictyophylla* cortex; total alkaloids; macroporous resin; purification process; quality standard; characteristic chromatogram; berberine hydrochloride

小檗皮为小檗科植物刺红珠及同属多种植物茎或根的干燥皮,为常用藏族药材(藏药名为吉尔巴<sup>[1]</sup>),在 1995 年版《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》(第一册)等藏族药材标准和藏族医药专著中都有收载<sup>[1-4]</sup>。小檗皮主要含有小檗碱、木兰花碱、药根碱、巴马汀等生物碱类成分<sup>[5]</sup>,其中小檗碱和木兰花碱含量较高。小檗碱具有明显的降血糖、降血脂、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等作用,是小檗皮药材的主要有效成分<sup>[6-8]</sup>。已有文献考察了小檗皮的传统水煎煮提取工艺与乙醇回流提取工艺<sup>[8-12]</sup>,在此基础上,本实验采用酸性染料比色法考察小檗皮总生物碱提取物的大孔树脂纯化工艺,运用 HPLC 测定该提取物中 4 种生物碱类成分(木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱)的含量,通过单因素试验优选纯化工艺,并建立小檗皮总生物碱提取物的质量标准,为该有效部位的后续制剂开发提供前期基础。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),V-1100D 型可见分光光度计(上海美普达仪器有限公司),SHA-C 型摇床(常州澳华仪器有限公司),TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),CPA225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),DHG-9625A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

木兰花碱对照品(批号 M-26-170612),盐酸药根碱对照品(批号 Y-052-160304),盐酸巴马汀对照品(批号 H-015-161226),盐酸小檗碱对照品(批号 Y-035-161114)均购于成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度均 >98%;HPD100 型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司,湿树脂水分 66.19%),水为超纯水,乙腈、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。藏族药(简称藏药)小檗皮由西藏甘露藏药股份有限公司提供,批号 20141201,经成都中医药大学赖

先荣教授、范刚副研究员检验和 DNA 分子鉴定为小檗科植物刺红珠 *Berberis dictyophylla* 的干燥皮,符合 1995 年版《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》(第一册)及 1979 年版《藏药标准》(第一、二分册合编本)<sup>[1-2]</sup>所载小檗皮项下的相关规定。根据郝露等<sup>[11]</sup>优选的小檗皮最佳醇提工艺,取小檗皮粗粉适量,加 15 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次,每次 120 min,过滤,合并 2 次滤液,减压回收乙醇至无醇味,置离心机中以  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液,抽滤,取滤液加水定容至 500 mL,计算总生物碱质量浓度  $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,作为储备液,备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 指标成分的含量测定<sup>[11]</sup>

**2.1.1 色谱条件** Capcell Pak C<sub>18</sub>-MG II 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 14%~18% A; 10~15 min, 18%~23% A; 15~20 min, 23%~26% A; 20~35 min, 26% A),检测波长 270 nm,柱温 30 °C,流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,进样量 10 μL。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 106.60, 13.56, 8.32, 89.84  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品储备液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密量取待测溶液适量,加盐酸-70% 甲醇(3:100)定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

**2.1.4 标准曲线的绘制** 分别精密吸取混合对照品储备液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以 4 种成分的进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的回归方程分别为  $Y = 601.61X + 267.88$  ( $r = 0.999\ 2$ ),  $Y = 4\ 422.1X + 12.367$  ( $r = 0.999\ 0$ ),  $Y = 3\ 494X + 3.193\ 3$  ( $r = 0.999\ 2$ ),  $Y = 1\ 714.1X + 9.742\ 9$  ( $r = 0.999\ 8$ ),

线性范围依次为 0.213 ~ 1.279, 0.027 ~ 0.163, 0.017 ~ 0.100, 0.180 ~ 1.078  $\mu\text{g}$ 。

## 2.2 纯化工艺参数的优选<sup>[13-16]</sup>

**2.2.1 酸性染料比色法检测** 取溴甲酚绿适量,精密称定,加磷酸盐缓冲液制成 0.03% 溴甲酚绿溶液<sup>[17]</sup>,作为酸性染料。精密吸取适量的待测溶液,减压蒸干,用 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液 4 mL 使溶解,移至分液漏斗中,加入酸性染料 5 mL,摇匀,静置 30 min,加入三氯甲烷 5 mL,振摇 2 min,静置 10 min,取三氯甲烷层,如此反复萃取 4 次,合并三氯甲烷萃取液,加三氯甲烷定容,于 417 nm 处测定吸光度  $A$ <sup>[18-19]</sup>。

**2.2.2 上样液的制备<sup>[20-23]</sup>** 精密量取小檗皮醇提储备液适量,减压浓缩,回收乙醇至无醇味,置于离心机中以转速 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,减压滤过,取滤液作为上样液,备用。

**2.2.3 大孔吸附树脂的预处理** 取 95% 乙醇浸泡处理的大孔吸附树脂,加 95% 乙醇湿法装柱,使用适量 95% 乙醇通过树脂柱,至流出液加适量水未出现白色浑浊现象;依次进行以下处理,加适量水清洗树脂柱,至流出液无醇味;加适量 5% 盐酸溶液浸泡一定时间,加适量水洗脱,至流出液 pH 为中性;加适量 5% 氢氧化钠溶液浸泡一定时间,加适量水洗脱,至流出液 pH 为中性,加水浸泡,备用<sup>[20]</sup>。

**2.2.4 HPD100 型大孔树脂吸附饱和和时间考察** 选择 6 种型号 (D101, D140, HPD100, HPD600, AB-8, NKA-9) 的大孔树脂,分析这 6 种型号大孔吸附树脂的吸附量、吸附率以及洗脱率<sup>[12]</sup>,结果确定选用 HPD100 型大孔吸附树脂。精密称取抽滤后的 HPD100 型大孔吸附树脂(湿树脂) 2 g 于具塞锥形瓶,加入上样液 20 mL,密封并振荡(水浴温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,振荡速度 100  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,下同),分别于 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 精密吸取上清液 100  $\mu\text{L}$ ,按 2.2.1 项下方法测定  $A$ ,计算树脂吸附量。结果总生物碱在 7 个不同时间点的吸附量分别为 140.82, 142.94, 158.21, 168.24, 171.08, 172.00, 172.36  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。说明 HPD100 型大孔吸附树脂静态吸附 6 h 即可达到饱和。

**2.2.5 上样液 pH 考察** 精密量取适量上样液,用 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸和 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调节 pH 分别为 1, 4, 7, 10。分别精密加已调 pH 的上样液和未调 pH 的上样液各 20 mL 于锥形瓶中,加入已抽滤的 HPD100 型大孔树脂 2 g,密封,振荡 6 h,过滤,用适量水冲洗树脂,加水定容,按 2.2.1 项下方法测

定,计算大孔树脂吸附量。结果 5 种不同 pH 药液的吸附量分别为 165.48, 166.85, 168.26, 164.08, 171.07  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。说明上样液不同的 pH 对大孔树脂吸附性能基本无影响。

**2.2.6 上样液质量浓度考察** 精密称取 HPD100 型大孔树脂 4 份,每份 10 g,湿法装柱于玻璃色谱柱 (14 mm  $\times$  400 mm),避免气泡产生,静置,树脂上层保留适当高度的水层。分别精密量取总生物碱质量浓度为 13.75, 11, 7.3, 5.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的上样液上样,使总生物碱上样量相同(均为 1.1 g),流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,收集流出液,用适量水洗脱以除去水溶性杂质,按 2.2.1 项下方法测定,计算上样液纯化后总生物碱吸附率,计算公式为吸附率 =  $(m_1 - m_2)/m_1 \times 100\%$ ,式中  $m_1$  为吸附前供试品中总生物碱质量, $m_2$  为吸附饱和后流出液中的总生物碱质量。结果 4 种质量浓度的上样液中总生物碱的吸附率分别为 52.99%, 53.33%, 51.28%, 51.84%。说明上样液中总生物碱质量浓度为 11  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时,HPD100 型大孔吸附树脂的饱和吸附量及吸附率均较其他质量浓度大。

**2.2.7 上样液流速考察** 于已装好的大孔树脂柱中加总生物碱质量浓度为 11  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  上样液 100 mL,调整上样速度分别为 0.5, 1, 2, 3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,收集流出液,测定,计算 4 种流速上样液中总生物碱吸附率分别为 53.17%, 53.26%, 52.16%, 49.27%,综合考虑,故选择上样液的流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.2.8 树脂柱径高比考察** 精密称取同等质量的 HPD100 型大孔树脂装柱,树脂柱径高比分别为 1:4, 1:8, 1:12<sup>[22]</sup>,分别取总生物碱质量浓度为 11  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  储备液 100 mL,上样流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,测定,计算总生物碱吸附率分别为 52.91%, 53.30%, 53.22%,故选择树脂柱径高比 1:8。

**2.2.9 上样液体积考察** 精密称取 HPD100 型大孔树脂 10 g,湿法装柱,树脂柱径高比 1:8,量取总生物碱质量浓度为 11  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  储备液 100 mL 上样,流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,每流出 10 mL 作为 1 份流出液,测定,计算每份流出液中总生物碱的质量浓度,见图 1。结果表明上样液体积为 60 mL 时,出现明显泄露,故选择上样液体积 50 mL。

**2.2.10 水洗脱用量考察** 装好大孔吸附树脂柱,方法同上,加适量水洗脱以除去水溶性杂质,加 10 倍柱体积 (BV, 1 BV = 15 mL) 的水洗脱,收集洗脱液,每 1 BV 为 1 份,测定,计算流出液中总生物碱质量和浸膏质量,见图 2。结果表明加水量为 4 BV

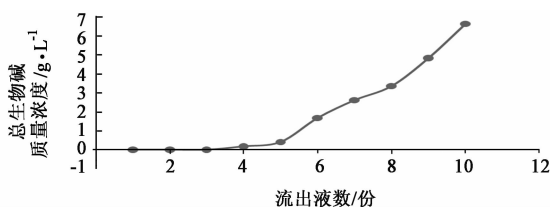
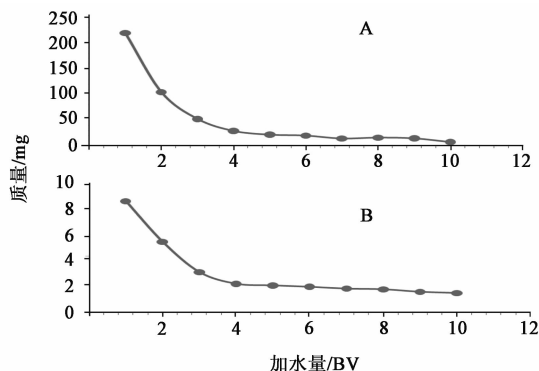


图 1 小檗皮总生物碱提取物纯化工艺的上样液体积考察  
Fig.1 Leakage curve of sample volume in purification process of total alkaloid extract of *Berberis dictyophylla* cortex

时,能将大量水溶性杂质洗脱除去。



A. 浸膏; B. 总生物碱

图 2 小檗皮总生物碱提取物纯化工艺的水洗脱用量考察  
Fig.2 Investigation of water addition in purification process of total alkaloid extract of *Berberis dictyophylla* cortex

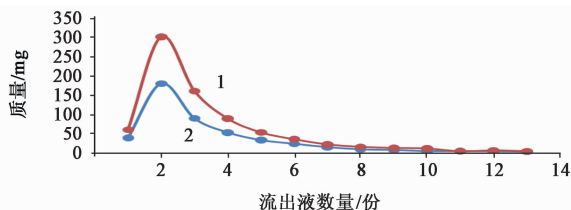
**2.2.11 洗脱剂体积分数考察** 装好大孔吸附树脂柱,方法同上,分别加体积分数为 30%、40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇 150 mL 洗脱,收集流出液并调整其体积至 200 mL,测定,计算流出液中总生物碱质量、浸膏质量、总生物碱的纯度和洗脱率。计算公式为纯度 =  $m_3/m_4 \times 100\%$ , 式中  $m_3$  为洗脱液中总生物碱的质量,  $m_4$  为浸膏量; 洗脱率 =  $m_3/m_5 \times 100\%$ , 式中  $m_5$  为大孔树脂吸附饱和时的总生物碱质量。见表 1。故选择 30% 乙醇作为洗脱剂。

表 1 小檗皮总生物碱提取物纯化工艺的洗脱剂体积分数考察  
Table 1 Investigation of eluent concentration in purification process of total alkaloid extract of *Berberis dictyophylla* cortex

乙醇体积分数/%	浸膏量/mg	总生物碱		
		质量/mg	纯度/%	洗脱率/%
30	772.0	521.2	67.51	94.76
40	786.4	473.8	60.25	86.15
50	847.2	494.6	58.38	89.93
60	860.8	481.4	55.92	87.53
70	742.4	494.9	66.66	89.98
80	766.4	513.7	67.03	93.40

**2.2.12 洗脱剂流速考察** 装好大孔树脂柱,方法同上,调节洗脱剂流速分别为 0.5、1、2、4 mL·min<sup>-1</sup>,分别收集流出液,测定,结果流出液中总生物碱纯度分别为 65.35%、61.42%、55.05%、51.45%;总生物碱转移率分别为 96%、88%、83.27%、72.59%。综合考虑,选择洗脱剂流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.2.13 洗脱剂用量的考察** 装好大孔树脂柱,方法同上,用 30% 乙醇 200 mL 洗脱,收集洗脱液,每 1 BV 为 1 份,测定,计算流出液中总生物碱质量和浸膏质量,见图 3,故选择洗脱剂用量 9 BV。



1. 浸膏; 2. 总生物碱

图 3 小檗皮总生物碱提取物纯化工艺的洗脱剂用量考察  
Fig.3 Investigation of eluent amount in purification process of total alkaloid extract of *Berberis dictyophylla* cortex

**2.3 验证试验** 根据以上研究结果确定最佳纯化工艺为采用 HPD100 型大孔吸附树脂 10 g,上样液质量浓度 11 g·L<sup>-1</sup>,上样流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,树脂柱径高比 1:8,上样液体积 50 mL,水洗脱用量 4 BV,洗脱剂为 9 BV 的 30% 乙醇,洗脱速度保持不变,收集洗脱液,即得。称取 HPD100 型大孔吸附树脂 100 g,共 3 份,按优选的工艺条件进行验证试验,计算纯化后小檗皮总生物碱的纯度及转移率,转移率 =  $m_3/m_1 \times 100\%$ 。结果小檗皮总生物碱的纯度 66.92% (RSD 2.0%),转移率 80.36% (RSD 1.2%),说明优选的工艺条件稳定可行。

**2.4 样品测定** 取适量 30% 乙醇洗脱液,按 2.1.3 项下制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算小檗皮总生物碱中木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的纯度分别为 25.12%、2.57%、1.69%、17.83%,RSD 1.6% ~ 2.4% (n = 3),转移率分别为 50.58%、73.58%、66.67%、73.58%,RSD 0.8 ~ 1.6% (n = 3)。

**2.5 小檗皮总生物碱纯化物的质量标准研究**<sup>[24]</sup>

**2.5.1 性状** 将纯化后的小檗皮总生物碱提取物减压浓缩,真空干燥,得粉末(过 24 目筛),备用。本品为棕黄色至深棕色固体粉末,味苦、气微香。

**2.5.2 薄层鉴别** 吸取 2.1.2 项下木兰花碱、盐酸

药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱混合对照品储备液适量,作为对照品溶液。取 2.5.1 项下粉末 0.5 g,加甲醇 50 mL 使溶解,超声 30 min,过滤,取滤液作为供试品溶液。照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0502 薄层色谱法进行试验<sup>[24]</sup>,吸取对照品溶液和供试品溶液各 2  $\mu$ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板,放入展开缸,展开剂为甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-水-氨水(6:3:3:2:1:0.2),密闭,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

**2.5.3 水分测定** 照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0832 水分测定法第二法<sup>[24]</sup>。取 2.5.1 项下粉末 2 g,平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中,厚度不超过 5 mm,精密称定,开启瓶盖在 105  $^{\circ}$ C 干燥 5 h,将瓶盖盖好,移置干燥器中,放冷 30 min,精密称定,再在上述温度干燥 1 h,放冷,称重,至连续 2 次称重的差异不超过 5 mg 为止。根据减失的质量,计算供试品中含水量。根据测定结果,暂定本品水分不得超过 8.3%。

**2.5.4 灰分测定** 照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 2302 总灰分测定法<sup>[24]</sup>。取 2.5.1 项下粉末 2 g,置炽灼至恒重的坩埚中,称定质量(准确至 0.01 g),缓缓炽热,注意避免燃烧,至完全炭化时,逐渐升高温度至 500~600  $^{\circ}$ C,使完全灰化并至恒重。根据残渣质量,计算供试品中总灰分的含量。根据检测结果,暂定本品灰分不得超过 0.6%。

**2.5.5 重金属检查** 按 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0821 项下重金属检查法第二法<sup>[24]</sup>进行检查。根据检测结果,暂定本品重金属含量不得超过 10 ppm。

**2.5.6 指标成分的含量测定** 色谱条件同 2.1.1 项。对照品溶液的制备同 2.1.2 项。取纯化后的小檗皮总生物碱提取物适量,置具塞锥形瓶中,精密称定,加盐酸-70% 甲醇(3:100)100 mL 使溶解,称定质量,超声处理 30 min,放冷,称定质量,用相应溶剂补足失重,摇匀,滤过,取续滤液为供试品溶液。标准曲线绘制同 2.1.4 项。

取 2.1.2 项下混合对照品溶液适量,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.8%,0.6%,0.6%,0.2%,说明仪器精密度良好。取同批纯化后的小檗皮总生物碱提取物适量,共 6 份,精密称定,按上述方法制备供试品溶液,按

2.1.1 项下色谱条件测定,计算木兰花碱、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 25.52%,2.18%,0.98%,17.96%,RSD 分别为 1.9%,2.4%,2.2%,1.7%,说明该方法重复性良好。精密吸取同一供试品溶液适量,分别于制备后 0,2,4,6,8,10,12,24 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.4%,1.0%,0.9%,1.0%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。取同一批已知指标成分含量的供试品 9 份,每组 3 份,精密称定,分别按已知指标成分含量的 50%,100%,150% 加入木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品溶液,按上述方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的平均加样回收率分别为 97.71%,97.81%,97.67%,98.25%,RSD 分别为 1.4%,0.7%,1.7%,0.9%。

取纯化后的小檗皮总生物碱提取物 0.1 g,共 6 份,精密称定,按上述方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定。根据测定结果,取平均值的  $\pm 20\%$  为上下限,确定纯化物样品中木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱的质量分数范围分别为 20.0%~30.8%,1.5%~2.8%,0.71%~1.19%,14.1%~22.2%。

## 2.6 小檗皮总生物碱提取物特征图谱的建立

**2.6.1 色谱条件** Capcell Pak C<sub>18</sub>-MG II 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu$ m),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,10%~14% A;10~20 min,14%~18% A;20~25 min,18%~23% A;25~30 min,23%~26% A;30~45 min,26% A;45~55 min,26%~55% A),检测波长 270 nm,柱温 30  $^{\circ}$ C,流速 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,进样量 10  $\mu$ L。

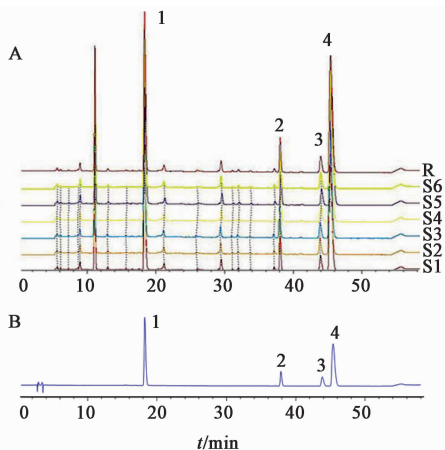
**2.6.2 精密度考察** 取同一批次小檗皮总生物碱提取物的纯化物,精密称定,按 2.5.6 项下方法制备供试品溶液,按 2.6.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,以盐酸小檗碱的保留时间和峰面积为参照,计算各特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%,说明仪器精密度良好。

**2.6.3 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,6,8,10,12,24 h 按 2.6.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。以盐酸小檗碱的保留时间和峰面积为参照,计算各特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%,

说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.6.4 重复性试验** 取同一批次小檗皮总生物碱提取物的纯化物 6 份,精密称定,按 2.5.6 项下方法制备供试品溶液,按 2.6.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。以盐酸小檗碱的保留时间和峰面积为参照,计算各特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.0%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%,说明该方法的重复性良好。

**2.6.5 特征图谱的建立**<sup>[25-27]</sup> 取 6 批小檗皮总生物碱提取物纯化后的样品(S1 ~ S6),按 2.5.6 项下方法制备供试品溶液,按 2.6.1 项下色谱条件测定,记录色谱图,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件进行处理,以 S1 为参照图谱,选择平均数法,时间窗宽度设为 0.1 min,对色谱峰进行谱峰匹配,系统根据小檗皮总生物碱提取物纯化后样品的共有模式,得到其对照特征图谱(R),该特征图谱中有 19 个共有峰。混合对照品溶液按 2.6.1 项下色谱条件测定,以相对保留时间定位,可指出色谱图中木兰花碱(1 号峰),盐酸药根碱(2 号峰),盐酸巴马汀(3 号峰),盐酸小檗碱(4 号峰)共 4 个色谱峰,见图 4。



A. 供试品;B. 混合对照品;1. 木兰花碱;2. 盐酸药根碱;3. 盐酸巴马汀;4. 盐酸小檗碱

图 4 6 批小檗皮总生物碱纯化物的 HPLC 特征谱  
Fig. 4 HPLC characteristic chromatograms of 6 batches of total alkaloid extract of *Berberis dictyophylla* cortex after being purified

**2.6.6 特征图谱的相似度评价** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)软件对实验数据进行处理,计算相似度,见表 2。

### 3 讨论

采用酸性染料比色法考察了小檗皮总生物碱提取物的纯化工艺,考察条件包括上样液质量浓度、上样速度、树脂柱径高比、水洗用量、洗脱剂体积分数

表 2 小檗皮总生物碱纯化物特征图谱的相似度

Table 2 Similarity of characteristic chromatograms of total alkaloid extract of *Berberis dictyophylla* cortex after being purified

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	对照特征图谱
S1	1.000	1.000	0.999	1.000	0.991	0.995	1.000
S2	1.000	1.000	0.999	1.000	0.992	0.994	1.000
S3	0.999	0.999	1.000	0.999	0.993	0.992	0.999
S4	1.000	1.000	0.999	1.000	0.992	0.994	1.000
S5	0.991	0.992	0.993	0.992	1.000	0.993	0.994
S6	0.995	0.994	0.992	0.994	0.993	1.000	0.995
对照特征图谱	1.000	1.000	0.999	1.000	0.994	0.995	1.000

及用量、洗脱流速等,同时建立了 HPLC 测定小檗皮总生物碱中 4 种生物碱含量的方法。确定小檗皮总生物碱提取物的大孔树脂最佳纯化条件为采用 HPD100 型大孔树脂,径高比 1:8,上样液质量浓度 11 g·L<sup>-1</sup>,上样流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,加 4 BV 水进行洗脱,再用 30% 乙醇 9 BV 洗脱。经验证,小檗皮总生物碱提取物纯化后的总生物碱纯度 > 65%,转移率 > 80%,表明优选的工艺稳定可行,适用于该有效部位的研发。

采用 HPLC 测定了 6 批小檗皮总生物碱纯化物样品,按照 2015 年版《中国药典》建立了该有效部位的质量标准。以 4 种生物碱类成分为评价指标,建立了小檗皮总生物碱提取物的特征图谱,其分离度和重复性良好。通过与对照品进行比对,确定了其中 4 个色谱峰的归属,分别为木兰花碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱。6 批自制小檗皮总生物碱纯化物的共有峰有 19 个,整体相似度均 > 0.99,表明小檗皮总生物碱纯化物质量可控性良好。本实验建立的小檗皮总生物碱纯化物的质量标准,填补了对小檗皮中间提取物质量控制研究的空白,可为小檗皮总生物碱提取物及相关制剂的开发提供参考。虽然本研究所得小檗皮总生物碱的纯度较高,但木兰花碱在整个纯化过程中转移率较低,可能与选择的大孔树脂有关,HPD100 型大孔树脂可能不太适合木兰花碱的纯化,后续还需要探索其他更加有效的方法。

### [参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药. 一册[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:340.

- [ 2 ] 西藏、青海、四川、甘肃、云南、新疆卫生局. 藏药标准 (第一、二分册合编本)[M]. 西宁:青海人民出版社, 1979:11.
- [ 3 ] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所. 中国藏药. 第三卷[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1996: 28-30.
- [ 4 ] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京:民族出版社, 1997: 84-85.
- [ 5 ] 吕秀梅,李艳,莫家祺,等. 藏族药小檗皮不同药用部位中 4 种生物碱成分的 HPLC 含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2):37-42.
- [ 6 ] 岳丽珺. 藏药吉尔巴对自发性糖尿病 db/db 小鼠视网膜病变的药效及机制研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2014.
- [ 7 ] 张燕,孟宪丽,岳丽珺,等. 藏药小檗皮对糖尿病模型小鼠血糖水平影响的初步研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(19):3619-3622.
- [ 8 ] Pirillo A, Catapano A L. Berberine, a plant alkaloid with lipid-and glucose-lowering properties: from *in vitro* evidence to clinical studies[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 243(2):449-461.
- [ 9 ] 叶凡,周邦华,王胜,等. 藏药小檗膏提取物中 3 种生物碱含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2):286-289.
- [ 10 ] 吴秦西,王友利,张燕,等. 均匀设计法优化藏药小檗皮的煎煮法提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7):1637-1639.
- [ 11 ] 郝露,周珍,冯慧,等. 藏药小檗皮的醇提工艺优化研究[J]. 中国药房, 2018, 29(7):958-963.
- [ 12 ] 叶凡. 藏药小檗皮提取物的成药性研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2016.
- [ 13 ] 张林,张朝凤,许翔鸿,等. 生物碱提取分离方法研究进展[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(15):49-50.
- [ 14 ] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2005:313-318.
- [ 15 ] 李路扬,龙妮芳,万定荣,等. 5 种小檗属药用植物总生物碱及小檗碱的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17):91-94.
- [ 16 ] 费艳美,张玉萍,方步武,等. 白英中总生物碱的含量测定[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(4):260-262.
- [ 17 ] 刘喜纲,刘翠哲,常金花. 应用酸性染料比色法测定总生物碱的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(11): 875-876.
- [ 18 ] 甄会贤,李平,解育静,等. 酸性染料比色法测定延胡索总生物碱的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(3):66-68.
- [ 19 ] 范圣洁,李文龙,崔文霞,等. 酸性染料比色法测定飞龙掌血提取物中总生物碱的含量[J]. 上海中医药大学学报, 2012, 26(1):85-89.
- [ 20 ] 张旭,王锦玉,全燕,等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):286-290.
- [ 21 ] 王玉霞,刘斌,姜艳艳. 荷叶生物碱提取纯化工艺研究[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(9):622-626.
- [ 22 ] 王毓杰. 管花肉苁蓉中苯乙醇苷的提取和大孔树脂纯化工艺研究[J]. 中草药, 2014, 45(16):2344-2348.
- [ 23 ] 孟甜. 红景天总鞣质的提取纯化工艺及质量标准研究[D]. 成都:西华大学, 2010.
- [ 24 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 57-59, 101-104, 204.
- [ 25 ] 刘芳,张浩,青琳森. 黄连 HPLC 数字化指纹图谱研究及 7 种生物碱含量测定[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21):3713-3719.
- [ 26 ] 谢巍,杨妮,蒋受军. 白背叶 HPLC 特征指纹图谱及模式识别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 52-57.
- [ 27 ] 余佳丽,唐晓章,周菲,等. 三七药材-三七二醇皂苷指纹图谱及其物质群量值传递分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7):18-22.

[责任编辑 刘德文]