

# 正交试验法优选胆黄连炮制工艺的研究

钟凌云, 杨金梅, 龚千锋, 孙莹\*

(江西中医学院药学院, 江西 南昌 330004)

**摘要:**目的 通过优选出胆黄连的最佳炮制工艺, 为控制黄连炮制品种质量、探讨炮制机制以及考察辅料对药物寒热药性可能产生的影响奠定基础。方法 采用正交试验法, 以胆黄连饮片外观性状、醇浸出物和3种生物碱总量为考察指标, 选择胆汁量、炒制时间及炒制温度3个因素(每因素3水平), 对胆汁制黄连工艺进行优选。结果 胆汁用量、炒制温度对试验结果有显著性影响, 影响程度为胆汁量>炒制温度>炒制时间, 确定最佳炮制工艺为加入12%胆汁, 100℃炒制10 min。结论 本研究对规范胆黄连的炮制工艺具有一定的意义, 为制备胆黄连标准饮片以进行下一步研究工作奠定了基础。

**关键词:**胆黄连; 炮制工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1296-03

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。味苦, 性寒, 归心、胃、肝、胆、大肠经。功效清热燥湿、清热泻火、泻火解毒。其主要活性成分为原小檗碱型生物碱。黄连的主要炮制品种有酒黄连、姜黄连、胆黄连、吴萸连、萸黄连<sup>[1]</sup>。经炮制后, 黄连成分发生不同程度变化, 可导致药性改变<sup>[2]</sup>。为了从现代药性理论角度探讨炮制对药物寒热药性的影响, 本实验选择苦寒之性的胆汁炮制黄连, 确定胆汁黄连的炮制工艺, 为控制黄连炮制品种质量、探讨炮制机制以及最终考察性味相反辅料对同一药物可能产生的不同影响提供参考。

## 1 仪器和材料

Dionex Ultimate3000 液相色谱仪, PDA-3000 二极管阵列紫外检测器, Chromleon 工作站, KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), Mettler AE 240 型十万分之一, 电子天平(瑞士 Mettler), Sartorius 万分之一电子天平(德国赛多利斯), Raynger ST 型红外测温仪(美国 Raytek)。

盐酸小檗碱(批号 110713-200207)、巴马汀(批号 0732-200011)、药根碱(批号 0733-200008)对照品均购自为中国药品生物制品检定所。黄连购于樟树药材市场, 经江西中医学院中药鉴定教研室刘庆华鉴定为三角叶黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的根茎。猪胆购自农贸市场, 剪碎取汁。试验用甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钾为分析纯, 水为重蒸水,

其他试剂均为分析纯。

## 2 方法和结果

### 2.1 盐酸小檗碱、药根碱、巴马汀的测定<sup>[3,4]</sup>

2.1.1 色谱条件: Hypersil ODS C<sub>18</sub> 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(28:72, 磷酸调节 pH 值为 3.0); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 345 nm; 柱温 30℃。理论塔板数按盐酸小檗碱峰计算不低于 5 000。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备: 分别精密称取盐酸小檗碱、巴马汀、药根碱对照品 13.32、3.1、4.99 mg, 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇-盐酸(99:1)溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备液。分别精密吸取对照品储备液各 15 mL, 置同一 50 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 作为混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备: 精密称取生黄连及各号胆黄连粉末(过三号筛)约 1 g, 置于具塞锥形瓶中, 加甲醇-盐酸(99:1) 50 mL, 称定质量, 静置 30 min 后, 连接冷凝管, 加热至沸腾, 并保持微沸 30 min, 再超声 30 min, 放冷, 用混合溶剂补足减失的质量, 摇匀, 备用。取提取液 2 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 加入混合溶剂定容, 摇匀, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

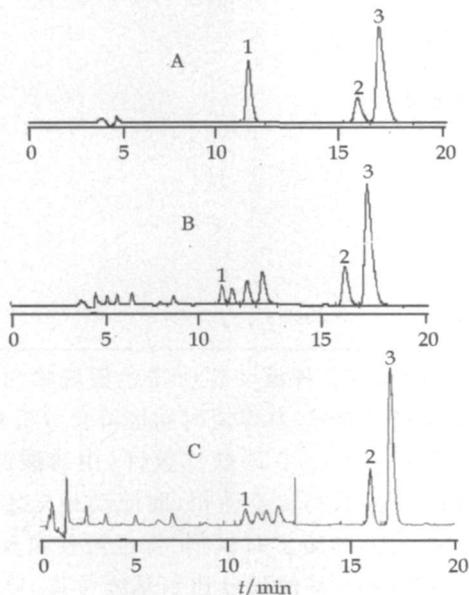
2.1.4 线性关系考察: 精密吸取混合对照品溶液 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 μL 依次注入液相色谱仪, 进行分析, 以进样量为横坐标, 3 次测得的峰面积均值为纵坐标, 峰面积对相应进样量进行线性回归计

\* 收稿日期: 2009-12-27

基金项目: 江西省青年科学家(井冈之星)培养对象计划(2007185)

作者简介: 钟凌云(1971-), 女, 江西南昌人, 副教授, 博士, 主要从事中药饮片质量标准及炮制机制研究。E-mail: ly1638163@163.com

算,得回归方程。盐酸小檗碱:  $Y = 64\ 834 X + 0\ 193$ ,  $r = 1$ ; 盐酸巴马汀:  $Y = 67\ 168 X - 0\ 009\ 7$ ,  $r = 0\ 999\ 9$ ; 盐酸药根碱:  $Y = 68\ 71 X + 0\ 086\ 3$ ,  $r = 0\ 999\ 4$ , 其结果表明分别在  $0\ 079\ 9 \sim 1\ 998\ 0$ 、 $0\ 018\ 6 \sim 0\ 465\ 0$ 、 $0\ 029\ 94 \sim 0\ 748\ 50\ \mu\text{g}$  进样量与峰面积呈良好的线性关系。



1- 盐酸药根碱 2- 盐酸巴马汀 3- 盐酸小檗碱  
1- jatrorrhizine hydrochloride 2- palmatine hydrochloride  
3- berberine hydrochloride

图 1 混合对照品 (A)、生黄连 (B) 和胆黄连 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substance (A), *Coptidis Rhizoma* (B), and *Coptidis Rhizoma* stir-baked with bile (C)

2.1.5 精密度试验: 精密吸取生黄连供试品溶液  $10\ \mu\text{L}$ , 连续进样 5 次, 测定各组分的峰面积值, 计算得盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱峰面积的 RSD 分别为  $0\ 42\%$ 、 $0\ 10\%$ 、 $0\ 17\%$ 。

2.1.6 重现性试验: 取生黄连细粉, 制备供试品溶液, 平行制备 5 份, 在上述色谱条件下进行测定, 计算得 5 份样品中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱质量分数的 RSD 分别为  $0\ 56\%$ 、 $1\ 24\%$ 、 $1\ 39\%$ 。

2.1.7 稳定性试验: 精密吸取生黄连供试品溶液  $10\ \mu\text{L}$ , 分别于  $0\ 2$ 、 $4$ 、 $6$ 、 $8$ 、 $12\ \text{h}$  进样, 测定各组分的峰面积值, 计算得盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱峰面积的 RSD 分别为  $0\ 99\%$ 、 $0\ 89\%$ 、 $0\ 92\%$ 。结果表明, 供试品溶液在  $12\ \text{h}$  内基本稳定。

2.1.8 加样回收试验: 取 5 份黄连药材, 各约  $30\ \text{mg}$ , 精密称定, 分别精密加入适量对照品 (其中含盐酸小檗碱  $2\ 04\ \text{mg}$ , 盐酸巴马汀  $0\ 52\ \text{mg}$ , 盐酸药

根碱  $0\ 16\ \text{mg}$ ), 制备供试品溶液, 进样测定, 结果小檗碱、巴马汀、药根碱平均回收率分别为  $98\ 1\%$  (RSD 为  $0\ 44\%$ )、 $98\ 0\%$  (RSD 为  $0\ 6\%$ )、 $99\ 9\%$  (RSD 为  $0\ 75\%$ )。

## 2.2 炮制方法

2.2.1 生黄连的制备: 取原药材, 去除杂质, 润透后切成薄片, 晾干, 即得生黄连样品<sup>[5]</sup>。

2.2.2 胆黄连的制备: 取猪胆剪碎, 取汁去渣。依照  $L_9(3^4)$  正交表安排, 取黄连片  $200\ \text{g}$ , 加入适当的胆汁拌匀闷润吸尽后, 炒干为度。

2.3 正交试验设计安排及结果: 采用  $L_9(3^4)$  正交表对胆汁用量 (A)、炒药温度 (B)、炒药时间 (C) 进行考察, 以炮制后的饮片性状、醇浸出物、生物碱总量 (小檗碱、药根碱、巴马汀之和) 3 个指标的综合评分为考察指标, 对黄连的胆汁炮制工艺正交试验结果进行筛选。因素与水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A/ %	B/ °C	C/ min
1	6	80	8
2	12	100	10
3	24	120	12

请有经验药工按照炒制后饮片颜色、片形完整度对饮片性状分为 5 等分值:  $100$  分、 $90$  分、 $80$  分、 $70$  分、 $60$  分。浸出物测定按照《中国药典》2005 年版附录中醇浸出物测定的方法进行测定<sup>[5]</sup>。将各样品醇浸出物的量和生物碱总量最高的一项值定为  $100$  分, 均为第 9 号样品, 分别用公式  $Y_1^* = 63\ 55 + Y_1$  和  $Y_2^* = 89\ 76 + Y_2$ , 把各号样品的醇浸出物和生物碱总量转化为分数。综合加权评分标准为: 醇浸出物的量、生物碱总量各占  $40\%$ , 饮片性状外观占  $20\%$ 。采用正交设计助手 V3.1 版计算机软件分析数据, 数据见表 2, 方差分析见表 3。

可以看出, 加入胆汁用量对胆汁制黄连工艺影响最大。通过方差分析表明, 加入胆汁用量和炒药温度对黄连胆汁制工艺具有显著性影响, 从直观分析极差的结果可知 3 个因素的影响程度为  $A > B > C$ , 故胆黄连的最佳炮制工艺为  $A_2B_2C_2$ , 即加入  $12\%$  的胆汁,  $100\ ^\circ\text{C}$  炒制  $10\ \text{min}$ 。

2.4 炮制工艺验证: 按照优选出的胆黄连饮片炮制工艺条件: 加入  $12\%$  胆汁,  $100\ ^\circ\text{C}$  炒制  $10\ \text{min}$ , 分别制备 3 批样品并测定各指标成分。所制备的胆黄连无焦斑, 片形完整, 且灰屑杂质少, 饮片性状好, 测得样品饮片整体性状较好, 所得样品醇浸出物分别为

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果

Table 2 Results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test

试验号	A	B	C	D(空白)	饮片性状	浸出物的量/ %	生物碱总量/ %	综合加权评分
1	1	1	1	1	60	27.33	9.03	87.868
2	1	2	2	2	80	27.92	9.57	92.320
3	1	3	3	3	60	29.21	9.71	88.892
4	2	1	2	3	90	28.30	10.17	94.712
5	2	2	3	1	100	26.27	10.12	95.880
6	2	3	1	2	70	30.19	9.95	91.380
7	3	1	3	2	70	33.57	9.84	92.760
8	3	2	1	3	80	33.50	9.89	94.680
9	3	3	2	1	70	36.45	10.24	94.000
ivj	269.08	275.34	273.93	277.75				
⊕ <sub>j</sub>	281.97	282.88	281.03	276.46				
⊗ <sub>j</sub>	281.44	274.72	277.53	78.28				
ivj 平均	89.69	91.78	91.31	92.58				
⊕ <sub>j</sub> 平均	93.99	94.29	93.68	92.15				
⊗ <sub>j</sub> 平均	93.81	91.42	92.51	92.76				
R	4.30	2.87	2.37	0.608				

表 3 方差分析结果

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	方差	显著性
A	35.47	2	60.53	P < 0.05
B	14.68	2	25.05	P < 0.05
C	8.41	2	14.36	
误差	0.59	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

36.41%、36.37%、36.48%；生物碱(盐酸小檗碱、药根碱、巴马汀之和) 总量分别为 10.25%、10.27%、10.23%，表明优选的工艺条件稳定合理可行。

### 3 讨论

研究结果表明，胆汁用量和炒药温度对黄连胆汁制工艺具有显著性影响，同时盐酸小檗碱遇高温易被破坏，炮制过程中应注意炮制温度的控制，过高破坏有效成分，过低又延长炒药时间，增加能源损耗，因此以加入 12% 的胆汁，100℃炒制 10 min 最为合理。

采用全波长扫描时发现，盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱这 3 种生物碱在 345 nm 附近都有最大吸收，因此选择 345 nm 为检测波长。

实验曾比较了流动相乙腈-0.1% 磷酸(28:72)、乙腈-0.1% 磷酸(含 0.1% 三乙胺)(25:75) 以及乙腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾(用磷酸调 pH 3.0(28:72))，结果显示第 1 种流动相所得待检色谱峰有严重拖尾现象，影响色谱峰的分离；第 2 种流动相所得色谱峰峰形对称性不好，且药根碱不能与其他

成分完全分开；第 3 种流动相所得色谱峰峰对称性及分离度均符合要求，其保留时间也符合分析要求，故选择已腈-0.05mol/L 磷酸二氢钾(用磷酸调 pH 3.0)(28:72) 为本实验流动相，此流动相未使用对色谱柱损害较大的离子对试剂<sup>[6]</sup>，也可使黄连中 3 种主要的生物碱与其他成分达到基线分离，峰形及保留时间均较合适。

虽然胆黄连非《中国药典》收载品种，但作为地方炮制品种使用历史悠久，同时也与药典收载的黄连炮制品种酒黄连、姜黄连和萸黄连所选择的炮制辅料性味完全相反，可以作为考察辅料对药物寒热药性影响的研究品种，具有一定代表性。本实验确定了胆黄连最佳炮制工艺参数，为规范胆黄连的炮制工艺提供技术参数，为制备胆黄连标准饮片进行下一步研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 蒋俊, 高成材, 贾晓斌, 等. 萸黄连寒热药性研究概况及其研究思路与方法[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1492-1495
- [2] 钟凌云, 孙莹莹, 龚干锋. 炮制影响黄连药性研究现状及展望[J]. 中草药, 2010, 41(2): 323-325
- [3] 晁若冰, 张浩, 庄燕黎, 等. 高效液相色谱法测定黄连药材中的小檗碱型生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(5): 354
- [4] 贾海鹰, 贾海波, 杨慧, 等. 正交试验设计黄连中盐酸小檗碱的提取工艺[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(11): 686
- [5] 中国药典[S]. 一部, 2005
- [6] 樊冬丽, 廖庆文, 肖小河, 等. 黄连不同炮制品中生物碱类成分的比较研究[J]. 解放军药学报, 2006, 8, 22(4): 276