

左金丸不同提取方法的比较研究

赵祥军¹, 程丹红^{1,2}, 赵艳玲^{1*}, 杨宏博^{1,3}, 王伽伯¹, 贾雷^{1,2}, 肖小河¹

1. 解放军302医院 全军中药研究所, 北京 100039

2. 成都中医药大学, 四川 成都 610015

3. 昆明理工大学, 云南 昆明 650224

摘要: **目的** 优选左金丸最佳提取方法。**方法** 采用超高效液相色谱法(UPLC), 建立左金丸的指纹图谱以及5种生物碱的测定方法; 以指纹图谱相似度和5种生物碱的总量作为评价指标, 对左金丸的水提、70%乙醇提取、盐酸-甲醇(1:100)提取、半仿生提取方法进行比较。**结果** 左金丸的色谱峰在8 min内检测完, 共检测到9个共有峰, 基线平稳, 峰形较好。5种生物碱的线性关系良好, 分离度高; 不同提取方法的左金丸指纹图谱相似度>0.98; 而5种生物碱的量差异较大, 其中盐酸-甲醇(1:100)提取的左金丸中5种生物碱的总量最高, 水提方法最低。**结论** 本实验建立的方法操作简便, 分析速度快; 基于指纹图谱的定性判别和指标成分的定量分析, 可以综合全面地评价比较左金丸的提取方法; 其中盐酸-甲醇(1:100)提取左金丸的方法优于其他3种方法。

关键词: 左金丸; 超高效液相色谱(UPLC); 提取方法; 指纹图谱; 生物碱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)06-1105-04

Comparative study on extraction method of Zuojin Pills

ZHAO Xiang-jun¹, CHENG Dan-hong^{1,2}, ZHAO Yan-ling¹, YANG Hong-bo^{1,3}, WANG Jia-bo¹, JIA Lei^{1,2}, XIAO Xiao-he¹

1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610015, China

3. Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China

Abstract: **Objective** To study Zuojin Pills with different extraction methods and select the best one. **Methods** To establish the fingerprints and determination the content of five alkaloids in Zuojin Pills by ultra performance liquid chromatography (UPLC), compare the water extraction, 70% ethanol extraction, HCl-methanol (1:100) extraction, and semi-bionic extraction according to the similarity of fingerprints and content of five alkaloids. **Results** The appearance time of all chromatographic peaks of Zuojin Pills was within 8 min and 9 common chromatographic peaks were obtained. The linear is stable and peak form is better. The linear relationship and resolution of the five alkaloids are nice. The similarity of the fingerprints exceed 0.98; The contents of the five alkaloids are much more different, the content of the five alkaloids in the HCl-methanol sample is the most, however, the least is the water extraction sample. **Conclusion** This study shows that the UPLC method is convenient with quick analysis rate. On account of indicated component quantitative analysis, it could be used to synthetically evaluate the extraction method. HCl-methanol (1:100) extraction method is the best one.

Key words: Zuojin Pills; ultra performance liquid chromatography (UPLC); extraction method; fingerprint; alkaloid

左金丸出自《丹溪心法·火六》，为丹溪名方之一。该方由黄连、吴茱萸按6:1组成。具有泻火、疏肝、和胃、止痛的功效。用于肝火犯胃、脘胁疼痛、口苦嘈杂、呕吐酸水、不喜热饮^[1-2]。具有多方面

的药理作用，临床常用于胃肠道疾病，疗效显著^[3-5]。相关研究表明左金丸中生物碱是其主要活性成分，因此生物碱量的高低决定了其临床疗效。中药复方所含成分复杂，各成分理化性质差异很大，不同的

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2007CB512607); 国家自然科学基金资助项目(30772740); 国家科技重大专项课题(2009ZX10005-017)

作者简介: 赵祥军(1956—), 副主任药师, 研究方向为中药研究与管理。Tel: 13701323618 E-mail: ltxz1997@yahoo.com.cn

*通讯作者 赵艳玲 E-mail: zhao2855@263.net

提取溶剂、提取方法可能使复方中化学成分组成和有效成分的量有很大的差异。目前,左金丸的提取方法主要有水提、醇提、盐酸-甲醇提取、盐酸水提、半仿生提取等^[6-9]。对左金丸中生物碱的分析测定主要采用柱色谱-紫外分光光度法^[10]、胶束薄层扫描法^[11]、高效液相色谱法^[12-13]等。而将超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC)^[14-15]方法用于左金丸中生物碱测定的研究少见报道。因此本实验采用分析速度快、分离度好、准确度和精密度高的 UPLC 建立左金丸的指纹图谱以及 5 种生物碱的测定方法,同时以指纹图谱的相似度和 5 种生物碱的量作为评价指标,综合比较左金丸的水提、70%乙醇提取、盐酸-甲醇 (1:100) 提取以及半仿生提取,优选左金丸最佳提取方法,为左金丸的制备及临床应用提供理论依据。

1 仪器与材料

ACQUITY™超高效液相色谱仪(Waters 公司); KQ—500B 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); AL 204 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; LABOROTA 4000 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

盐酸小檗碱(批号 11073-200609)、盐酸药根碱(批号 0733-200005)、盐酸巴马汀(批号 110732-200506)、盐酸黄连碱(批号 20080229)、硫酸表小檗碱(批号 20080228)均购自中国药品生物制品检定所,质量分数均大于 99.8%。乙腈为色谱纯,试验用水为 Milli.Q 超纯水,其他试剂均为分析纯。所有试样进样前均经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

黄连与吴茱萸均购于北京同仁堂药房,经中国人民解放军 302 医院全军中药研究所肖小河研究员鉴定,黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎,吴茱萸为芸香科植物 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟的果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[16]

色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,洗脱程序见表 1,柱温 22.5 °C,检测波长 347 nm,进样量 2 μL (全自动进样)。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、硫酸表小檗碱对照品适量,分别置 50 mL 量瓶中,加入适量甲醇超声 30 min,冷却,

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	体积流量/(mL·min ⁻¹)	乙腈/%	0.05%磷酸水溶液/%
0	0.40	9	91
1.0	0.40	11	89
1.5	0.25	20	80
4.2	0.25	20	80
4.7	0.40	25	75
6.0	0.40	49	51

甲醇定容,制成 18.4、11.6、12.8、7.7、2.3 μg/mL 对照品储备液。分别精密移取各对照品储备液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 左金丸水提取^[17] 称取黄连 12 g,吴茱萸 2 g,去离子水浸泡 30 min,回流提取 3 次,第 1 次 10 倍量水提取 1.5 h,第 2 次 8 倍量水提取 1 h,第 3 次 6 倍量水提取 0.5 h。合并药液,浓缩,水浴蒸干得浸膏。取浸膏适量(相当于 150 mg 生药量),甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,即得左金丸水提供试品溶液。

2.3.2 左金丸盐酸-甲醇提取 称取黄连 12 g,吴茱萸 2 g,盐酸-甲醇 (1:100) 提取,方法同上。

2.3.3 左金丸 70%乙醇提取 称取黄连 12 g、吴茱萸 2 g,70%乙醇提取,方法同上。

2.3.4 左金丸半仿生提取 (SBE 法)^[9,18] 称取黄连 12 g、吴茱萸 2 g,加热回流提取 3 次,第 1 煎用水以 0.1 mol/L HCl 调 pH 值为 2.0,第 2、3 煎用水以 0.1 mol/L NaOH 调 pH 值为 7.0、9.0,其余操作同上。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取各对照品溶液 1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀。吸取一定量的对照品溶液经 0.22 μm 滤膜滤过,置专用的样品瓶中,自动进样,记录色谱峰,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程(表 2),各对照品与峰面积线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液,进样 2 μL,连续进样 5 次,记录峰面积,分别计算 5 种生物碱峰面积的 RSD 值。结果小檗碱、巴马汀、药根碱、黄连碱、表小檗碱的 RSD 分别为 0.37%、0.43%、0.32%、0.45%、0.49%。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取左金丸水提供试品溶液,分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样测定,计算各生物碱峰面积的 RSD 值。结果小檗碱、巴马汀、

表 2 5 种生物碱的线性方程

Table 2 Linear equations of five alkaloids

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
小檗碱	$Y=8\times10^6X+232\ 29$	0.999 3	1.84~9.20
药根碱	$Y=1\times10^7X+7\ 442.7$	0.999 8	1.16~5.80
巴马汀	$Y=8\times10^6X+10\ 222$	0.999 4	1.28~6.40
黄连碱	$Y=2\times10^7X-2\ 172.4$	0.999 7	0.77~3.85
表小檗碱	$Y=1\times10^7X+7\ 268$	0.999 6	0.23~1.15

药根碱、黄连碱、表小檗碱的 RSD 分别为 2.5%、1.6%、2.1%、2.8%、1.9%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 重现性试验 平行制备左金丸水提供试品溶液 5 份，测定小檗碱、药根碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱的量，计算计算得小檗碱、药根碱、黄连碱、巴马汀、表小檗碱质量分数的 RSD 分别为 2.5%、3.1%、1.8%、2.6%、2.3%。

2.4.5 加样回收率试验 取左金丸水提样品 5 份，每份约 15 mg，精密称定，分别加入各对照品溶液适量，制备供试品溶液，依法测定，计算 5 种生物碱的回收率。结果盐酸小檗碱平均回收率为 99.12%，RSD 为 1.3%；盐酸巴马汀平均回收率为 98.78%，RSD 为 1.9%；盐酸药根碱平均回收率为 98.34%，RSD 为 1.8%；黄连碱平均回收率为 97.65%，RSD 为 1.6%；表小檗碱平均回收率为 95.78%，RSD 为 2.2%。

2.5 指纹图谱的建立

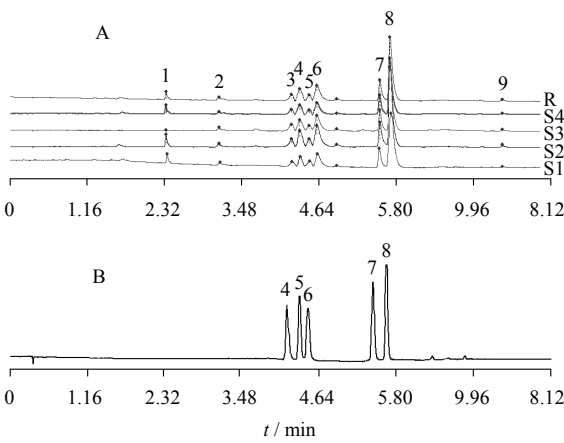
分别精密吸取不同方法提取的左金丸供试品溶液 2 μL，注入 UPLC 色谱仪，记录 8 min 内的色谱图。在上述色谱条件下，确定特征共有峰为 9 个。同时并记录混合对照品溶液的色谱图，见图 1。

2.6 指纹图谱相似度评价

将不同提取方法的左金丸 UPLC 指纹图谱导入国家药典委员会研发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版（2004 A），经过峰点校正和数据匹配，生成对照图谱 R，采用“中位数法”计算不同提取方法的左金丸样品指纹图谱之间的相似度，结果见表 3。

由该软件计算得到的相似度数越接近 1，说明样品中所含主要化学成分的相似度越高。由表 1 可以看出，各样品之间的相似度均大于 0.98，说明左金丸经不同方法提取后，各样品中所含化学成分在组成上非常相似。

2.7 样品中主要生物碱的测定



S1-水提取 S2-70%乙醇提取 S3-盐酸-甲醇提取
S4-半仿生提取 R-对照指纹图谱
4-表小檗碱 5-药根碱 6-黄连碱 7-巴马汀 8-小檗碱
S1-water extraction sample S2-70% ethanol extraction sample
S3-HCl-methanol extraction sample S4-semi-bionic extraction sample
R- reference fingerprint
4-epiberberine 5-jateorrhizine 6-coptisine 7-palmatine 8-berberine

图 1 左金丸不同提取方法供试品 (A) 和混合对照品 (B) 的 UPLC 特征指纹图谱
Fig. 1 UPLC characteristic fingerprint of Zuojin Pills samples with different extraction methods (A) and mixed reference substances (B)

表 3 不同提取方法的左金丸样品指纹图谱的相似度
Table 3 Similarities among Zuojin Pills with different extraction methods

提取方法	S1	S2	S3	S4	R
S1	1.000	0.991	0.985	0.991	0.990
S2	0.991	1.000	0.996	0.998	0.999
S3	0.985	0.996	1.000	0.993	0.998
S4	0.991	0.998	0.993	1.000	0.998
R	0.990	0.999	0.998	0.998	1.000

分别取各供试品溶液适量，0.22 μm 滤膜滤过，置于样品瓶中，进样 2 μL，记录色谱峰，计算各样品中 5 种生物碱的量，结果见表 4。左金丸经水提、盐酸-甲醇提取、70%乙醇提取以及半仿生提取后，5 种生物碱的质量分数存在明显差异；盐酸-甲醇（1：100）提取的左金丸样品中，5 种生物碱的总量最大；水提样品总量最小。另外，不同提取方法的左金丸样品中，相同生物碱的量差异也很大，其中盐酸小檗碱和硫酸表小檗碱的量最大的是盐酸-甲醇提取的样品；而巴马汀、药根碱、黄连碱的量最大的则是 70%乙醇提取的样品。

3 讨论

与 HPLC 相比，本实验采用的 UPLC 法大大缩

表 4 不同提取方法的左金丸中 5 种生物碱的测定结果 ($n=3$)Table 4 Determination of five alkaloids in Zuojin Pills with different extraction methods ($n=3$)

提取方法	质量分数/%					
	小檗碱	巴马汀	药根碱	黄连碱	表小檗碱	总量
70%乙醇提取	5.386	1.319	0.388	1.140	0.935	9.168
盐酸甲醇提取	5.921	1.306	0.288	1.092	1.306	9.913
半仿生提取	4.595	1.072	0.212	0.792	0.702	7.373
水提取	3.686	0.875	0.158	0.674	0.610	6.003

短了分析时间,减少了进样量,降低了溶剂消耗;且 UPLC 灵敏度、精密度、分离度都远远高于 HPLC^[19]。对于流动相的选择,采用乙腈-磷酸水溶液作为流动相,有利于更好的保护色谱柱,避免了以往由于采用含有金属离子对试剂的流动相对色谱柱造成的损伤。另外,试验中发现柱温对黄连碱、药根碱、表小檗碱以及 3 号色谱峰的分离度影响较大。当柱温为 22.5 °C 时,分离度好,基线平稳,峰形较好;当柱温高于 23 °C 时,这 4 种物质较难分离。

本实验采用 UPLC 建立了左金丸的指纹图谱以及 5 种生物碱的测定方法,同时采用该方法对左金丸的不同提取工艺进行了比较研究,从而确定左金丸的最佳提取工艺。左金丸经不同方法提取后,各提取物的指纹图谱经中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行计算,相似度>0.98,表明不同提取方法的左金丸中所含化学成分组成基本相同。但所测 5 种生物碱总量的结果显示:盐酸-甲醇(1:100)提取>70%乙醇提取>半仿生提取>水提取,以 5 种生物碱的总量作为评价指标,则盐酸-甲醇(1:100)提取左金丸的方法优于其他 3 种方法。原因可能是由于左金丸中的生物碱一般以季铵型生物碱的状态存在,可以离子化呈强碱性,当与酸结合后,形成生物碱盐,增加了其溶解度。研究结果表明,提取方法不同,左金丸中的有效成分总生物碱的量相差很大,这种差异会影响到其临床疗效,所以优选提取方法,是保证中药复方疗效的关键所在。

参考文献

- [1] 孔维军,赵艳玲,肖小河,等.左金丸的最新研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(5):119-123.
- [2] 中国药典[S].一部.2010.
- [3] 刘陶世,赵新慧,狄留庆,等.左金胃漂浮缓释片中小檗碱、巴马汀、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的体外释放规律和机制研究[J].中草药,2008,39(8):1154-1157.
- [4] 鲍晨汝,潘宗海,年莉.左金丸的药理作用及临床研究进展[J].上海中医药杂志,2010,44(11):79-82.

- [5] 廖庆文,杨宏博,鄢丹,等.左金丸胃漂浮缓释片的制剂配方研究[J].中草药,2009,40(10):1559-1563.
- [6] 刘陶世,赵新慧,黄耀洲.不同溶媒对左金丸小檗碱和吴茱萸碱等 5 种生物碱溶出行为的影响[J].南京中医药大学学报,2007,23(3):172-174.
- [7] 彭明兴,吴永江,程翼宇.不同溶媒对黄连-吴茱萸药对中小檗碱型生物碱溶出率的影响[J].中国现代应用药学,2003,20(6):461-463.
- [8] 赖庆宽,廖芳,李世娟,等.左金丸提取工艺的优化研究[J].中成药,2008,30(10):1560-1562.
- [9] 张颖,张兆旺.均匀设计法优选左金丸方药的半仿生提取工艺[J].中国中药杂志,2008,33(4):466-469.
- [10] 叶富强,徐颂芬,陈蔚文,等.黄连与吴茱萸配伍比例对黄连生物碱含量的影响[J].河北中医,2000,22(5):397-398.
- [11] 戈早川,周建明.胶束薄层扫描法测定黄连及其制剂中的小檗碱、巴马汀和药根碱[J].分析化学,2004,32(1):99-101.
- [12] 张朔,张广财,万琳琳,等.RP-HPLC 同时测定左金丸中多指标成分含量[J].中成药,2009,31(6):873-876.
- [13] 朱妙琴.反相高效液相色谱法同时测定黄连、左金丸及反左金丸中三种生物碱的含量[J].分析试验室,2007,26(增刊):144-146.
- [14] 单鸣秋,高静,丁安伟.超高效液相色谱法测定侧柏炭中 5 个黄酮类成分[J].中草药,2011,42(2):282-284.
- [15] 吴剑威,赵润怀,陈波,等.超高效液相色谱在中药领域的应用[J].中草药,2009,40(增刊):79-81.
- [16] 程丹红,赵艳玲,杨宏博,等.左金丸及类方的体外溶出行为研究[J].中成药,2010,32(11):1895-1898.
- [17] 杨宏博,赵艳玲,李宝才,等.基于小鼠温度趋向行为学表征的左金丸及反左金丸寒热属性[J].药学报,2010,45(6):791-796.
- [18] 刘晓东,闫明,高丽丽,等.均匀设计优选驱虫斑鸠菊的半仿生提取工艺研究[J].中草药,2009,40(1):49-52.
- [19] 杨立伟,郑传奇,蒋忠军,等.超高效液相色谱法测定西洋参中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 的含量[J].中药材,2008,31(1):55-57.