黄连厚朴配伍在不同提取工艺中主要成分含量的变化

吴安国[1,2], 曾宝[1,2*], 林乔[1], 何百寅[1], 陈建南[1], 赖小平[1,2]
(1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510006;
2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的: 比较黄连厚朴不同提取工艺, 不同配伍比例主要成分含量的变化。方法: 1. 黄连厚朴以水和乙醇 2 种溶剂, 采用分提与合提 2 种提取方法; 2. 以乙醇为溶剂, 黄连厚朴以 3∶1, 2∶1, 1∶1, 1∶2, 1∶3不同配伍比例提取, 采用高效液相色谱法, 测定小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚的含量。结果: ①黄连厚朴的乙醇提取工艺的提取率优于水提取, 而在水合提工艺中小檗碱的含量下降 40%, 在醇提工艺中只下降 1%, 厚朴的含量在合提工艺中均比分提提高了 2% 左右。②当配伍比例为 1∶1 的时候小檗碱的提取率较高, 厚朴比例越低, 其提取率越高。结论: 黄连厚朴应采取醇合提的工艺, 在提取工艺中, 应考虑中药化学成分的不同理化性质, 采取适宜的提取溶剂和提取方法。

[关键词] 黄连; 厚朴; 提取工艺; 高效液相色谱法
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)05-0019-04

Changes of Content of Main Components in Coptis and Magnolia with Different Extractions

WU An-guo[1,2], ZENG Bao[1,2], LIN Qiao[1], HE Bai-yin[1], CHEN Jian-nan[1], LAI Xiao-ping[1,2]*
(1. Research Center of New Drug Development, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Research Institute of Mathematical Engineering of Guangzhou University of Chinese Medicine in Dongguan, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the different extraction techniques for Coptis and Magnolia and the changes of the main components in extracting Coptis and Magnolia with different proportion. **Method:** Coptis and Magnolia were extracted together or alone by using two kinds of solvents including water and alcohol with different proportions as 3∶1, 2∶1, 1∶1, 1∶2 and 1∶3 to determine the content of berberine, magnolol and honokiol by HPLC. **Result:** The extraction rate of Coptis and Magnolia with alcohol was better than that with water. The content of berberine was decreased 40% as extracting together by water, but was decreased only 1% as extracting together by alcohol. The content of magnolol and honokiol was increased 2% as extracting together with alcohol or water. The extraction rate of berberine was high when the ratio was 1∶1. The higher of the extraction rate, the lower of the content of magnolol and honokiol would be. **Conclusion:** Coptis and Magnolia should be extracted together by alcohol. In the extraction process, in order to take the appropriate solvent and extraction methods, the chemical constituents of traditional Chinese medicine should be considered in different physical and chemical properties.

[Key words] Coptis; *Magnolia officinalis*; extraction process; high performance liquid chromatography

[收稿日期] 20101104(007)
[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAI11B08-04)
[第一作者] 吴安国, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药新药与药代动力学, Tel: 13631460643, E-mail: wag1114@foxmail.com
[通讯作者] * 曾宝, 助理研究员, 博士生, Tel: 020-39358045, E-mail: zb-101@tom.com

黄连、厚朴为经典古方王氏连朴饮中的君药和臣药,目前对于连朴饮加减药味以及它在临床上的新应用的研究越来越多[1-5]。古代医书《普济方》中也有两药配伍的黄连厚朴汤。方中黄连清热燥湿,厚朴行气化湿,两药合用,苦降辛开,使气行湿化,湿去热清,为治湿热霍乱的良方[6]。虽然目前在对黄连厚朴单味药材的提取工艺和质量标准的控制得到了广泛的应用,但是对于配伍中的药物之间的相互作用,不同配伍比例、不同提取工艺的各成分的含量的变化研究极少[7-8],为此本实验考察了黄连厚朴在不同比例、不同提取工艺的各成分的含量的变化,为药材的临床应用提供了重要的参考。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪(岛津 LC-20A(UV/Vis),SPD-20A 紫外检测器(Prominence UV/Vis DETECTOR),SIL-20A 自动进样器(Prominence),SH585 柱温箱(DIONEX),分析软件(LC Solution Ver1.22. SPI 英文版),D2251 电子天平 1/10 万(广州市正一科技有限公司)。

厚朴酚(批号 110729-200310)、厚朴酚(批号 110730-200609)、小檗碱(批号 110713-200609)购于中国药品生物制品检定所,黄连、厚朴药材(广州致信中药饮片公司)按照《中国药典》2010 年版的含量测定均合格。

2 方法与结果

2.1 不同提取工艺(表 1)

表 1 黄连厚朴不同提取工艺的药材组合

No.	提取方法	药材
1	75% 乙醇回流	黄连
2	75% 乙醇回流	厚朴
3	75% 乙醇回流	黄连 +厚朴
4	水回流	黄连
5	水回流	厚朴
6	水回流	黄连 +厚朴

2.1.1 乙醇回流 分提:取黄连药材 10 g,厚朴药材 20 g,各平行 2 份,分别加 10 倍量的 75% 乙醇回流提取 2 次,第 1 次 1 h,第 2 次 0.5 h,滤过,合并 2 次提取液,并定容到 1 000 mL;合提:取黄连药材 10 g,厚朴药材 20 g,合并药材,平行 2 份,同上法提取定容到 1 000 mL。

2.1.2 水回流 分提:取黄连药材 10 g,厚朴药材 20 g,各平行 2 份,分别加 10 倍量的水回流提取 2 次,第 1 次 1 h,第 2 次 0.5 h,滤过,合并 2 次提取液,并定容到 1 000 mL;合提:取黄连药材 10 g,厚朴药材 20 g,合并药材,平行 2 份,同上法提取定容到 1 000 mL。

2.1.3 不同配伍比例的提取 黄连-厚朴药材比例分别为 3∶1,2∶1,1∶1,1∶2,1∶3,每个比例平行 2 份,按 **2.1.1** 法提取定容到 1 000 mL。取以上适量的提取液分别用 0.45 μm 的滤头过滤,备用。

2.2 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 Kromasil 100-5 C_{18} 色谱柱(4.5 mm ×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.3% 磷酸(三乙胺调节 pH 4)梯度洗脱,洗脱时间和比例见表 2,流速 1 mL·min^{-1},柱温 25 ℃,检测波长 265 nm;进样量 10 μL。

表 2 流动相洗脱梯度变化

t/min	乙腈/%	3% 磷酸(三乙胺)/%
0	20	80
25	35	65
35	75	25
36	20	80
45	20	80

2.2.2 检测波长的选择 选择 203 nm 和 265 nm 2 个波长,小檗碱的最大吸收波长 265 nm,厚朴酚、和厚朴酚最大的吸收波长 294 nm,在 265 nm 下各个色谱峰分离度很好,具有代表性,信息量较大,且基线平稳。因此选择 265 nm 作为检测波长。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取以五氧化二磷干燥至恒重的小檗碱,厚朴酚,和厚朴酚对照品分别为 7.44,13.30,13.3 mg。置 10 mL 棕色量瓶中,加入甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,小檗碱,厚朴酚,和厚朴酚对照品的质量浓度为 0.74,13.30,13.30 g·L^{-1},用 0.45 μm 滤头过滤即得。

2.2.4 供试品溶液的制备 取提取物样品,滤过,即得。空白供试品的制备:取空白提取的溶剂滤过,即得。

2.2.5 各样品溶液的 HPLC 图 分别吸取上述各样品供试品溶液以及对照品溶液 10 μL,按照上述色谱条件进行测定。色谱图见图 1。

2.2.6 线性关系的考察 取 **2.2.2** 项下的对照品溶液,按照上述色谱条件分别进 0.5,1,2,4,8,10 μL。测定峰面积。以色谱峰面积为纵坐标,对照品进样量为横坐标,绘制标准曲线并进行线性回归,

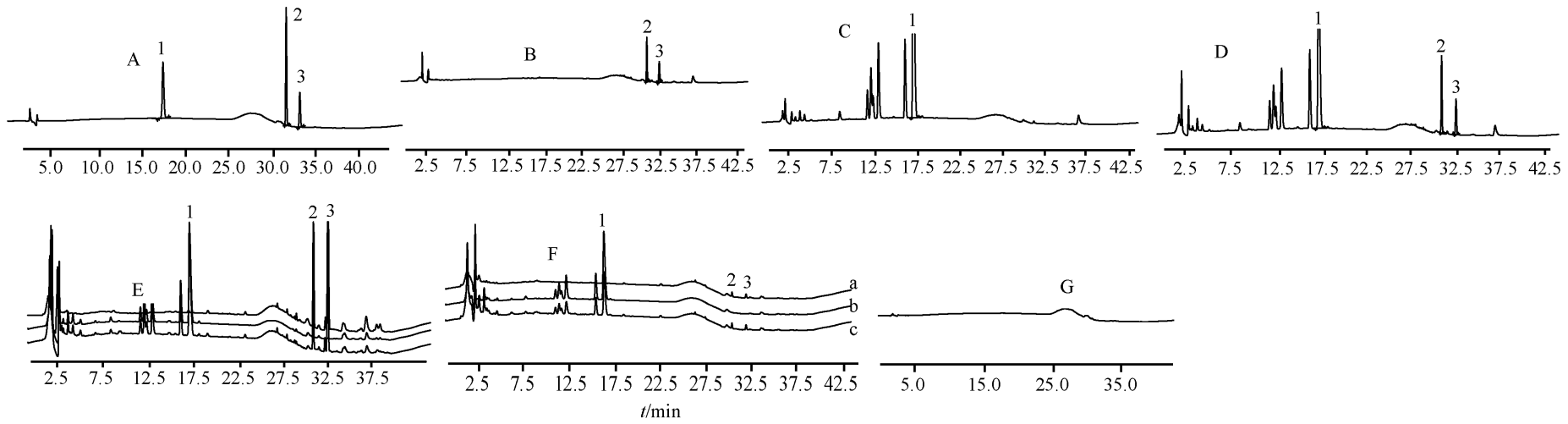

图 1　黄连厚朴不同配伍 HPLC

A. 小檗碱, 厚朴酚, 和厚朴酚混合对照品; B. 厚朴药材; C. 黄连药材; D. 黄连厚朴药材合提; E. 黄连厚朴药材醇提; F. 黄连厚朴水提; G. 空白溶剂; 1. 小檗碱; 2. 和厚朴酚; 3. 厚朴酚; a. 厚朴单提; b. 黄连单提; c. 黄连厚朴合提

得回归方程小檗碱: $Y = 3.40 \times 10^6 X - 1.41 \times 10^5$, $r = 1$, 和厚朴酚: $Y = 2.30 \times 10^6 X - 8.48 \times 10^2$, $r = 0.999$, 厚朴酚: $Y = 1.00 \times 10^6 X + 3.82 \times 10^3$, $r = 0.999\ 9$。线性范围小檗碱 0.007 4 ~0.744 μg; 厚朴酚, 和厚朴酚0.013 3 ~1.33 μg。

2.2.7　精密度试验　精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 进样, 连续测定 5 次, 测得色谱峰面积, 小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚峰面积 RSD 分别为 0.10%, 1.26%, 0.15%。表明仪器的精密度良好。

2.2.8　稳定性试验　精密吸取品溶液 10 μL, 分别在 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 进样, 测得色谱峰面积, 小檗碱、和厚朴酚、厚朴酚峰面积 RSD 分别为 0.26%, 1.51%, 0.40%。表明黄连厚朴样品在 8 h 内的稳定性好。

2.2.9　重复性试验　分别取黄连药材粗粉 10 g, 厚朴药材粗粉 20 g 共 6 份, 按 **2.1.1** 项下的方法制备提取物, 并按照 **2.2.3** 项下的方法制备供试品溶液, 小檗碱质量分数的平均值分别为 4.00%, 和厚朴酚质量分数的平均值 0.70%, 厚朴酚质量分数的平均值为 0.42%, RSD 分别为 0.49%, 0.96%, 0.70%。

2.2.10　回收率试验　分别取黄连药材粗粉 10 g, 厚朴药材粗粉 20 g 共 9 份, 平行 3 份, 每 3 份分别加入对照品溶液 4, 6, 8 mL 的对照品溶液按 **2.1.1** 项下的方法制备提取物, 并按照 **2.2.3** 项下的方法制备供试品溶液, 平行 3 份每份分别加入对照品溶液 4, 6, 8 mL 的对照品溶液, 摇匀, 即得。按照上述色谱条件进行测定, 以测定浓度与配制浓度的比值计算回收率(见表 3) 结果表明, 加样回收率符合定量分析要求。

2.2.11　样品含量测定　分别精密吸取 **2.2.2** 项和 **2.2.3** 项的对照品和供试品溶液 10 μL, 按照上述色谱条件进行测定, 结果见表 4, 5。

表 3　黄连厚朴中的主要成分加样回收率

加入体积 /mL	主要成分	加入质量浓度 /g·L⁻¹	测得质量浓度 /g·L⁻¹	配制的质量浓度 /g·L⁻¹	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
4	小檗碱	1.33	3.84	3.74	102.67	102.23	0.68
6	小檗碱	1.33	3.73	3.64	102.60		
8	小檗碱	1.33	3.59	3.54	101.43		
4	和厚朴酚	0.74	1.05	0.99	106.06	108.22	1.99
6	和厚朴酚	0.74	1.06	0.98	108.24		
8	和厚朴酚	0.74	1.07	0.97	110.36		
4	厚朴酚	0.74	1.38	1.36	101.77	104.03	1.96
6	厚朴酚	0.74	1.39	1.33	104.56		
8	厚朴酚	0.74	1.38	1.30	105.75		

表 4　黄连厚朴不同提取工艺主要成分的含量

样品	提取方法	主要成分	质量浓度 /g·L⁻¹	质量 /mg	提取率 /%
黄连	乙醇回流	小檗碱	0.46	456.59	4.57
厚朴	乙醇回流	和厚朴酚	0.09	88.67	0.44
		厚朴酚	0.13	126.40	0.63
		小檗碱	0.41	408.93	4.09
黄连 + 厚朴	乙醇回流	和厚朴酚	0.10	101.50	0.51
		厚朴酚	0.14	140.81	0.70
黄连	水回流	小檗碱	0.32	319.15	3.19
厚朴	水回流	和厚朴酚	0.00	2.83	0.01
		厚朴酚	0.00	2.41	0.01
		小檗碱	0.20	196.69	1.97
黄连 + 厚朴	水回流	和厚朴酚	0.00	3.29	0.02
		厚朴酚	0.00	3.33	0.02

注: 提取率 = 指标成分的质量/提取药材的质量 ×100% (表 5 同)。

从上表可以看出黄连厚朴的乙醇回流提取工艺优于水回流提取工艺, 黄连水回流提取小檗碱的质量分数有少量的降低, 但是厚朴水回流提取厚朴酚, 和厚朴酚的质量分数很低(相当于乙醇回流提取的 3%) 这主要是由厚朴酚, 和厚朴酚的基本的性质决定的。黄连与厚朴一起用乙醇回流提取比黄连单独提取的小檗碱

表 5　黄连厚朴不同配伍各主要成分的含量

黄连∶厚朴	质量浓度/g·L⁻¹			质量/mg			提取率/%		
	小檗碱	和厚朴酚	厚朴酚	小檗碱	和厚朴酚	厚朴酚	小檗碱	和厚朴酚	厚朴酚
3∶1	1.18	0.06	0.09	1184.03	57.15	86.89	3.95	0.57	0.87
2∶1	0.86	0.06	0.09	864.40	56.94	85.68	4.32	0.57	0.86
1∶1	0.50	0.05	0.08	503.44	51.15	78.50	5.03	0.51	0.78
1∶2	0.41	0.10	0.14	408.93	101.50	140.81	4.09	0.51	0.70
1∶3	0.43	0.15	0.20	432.91	149.26	197.24	4.33	0.50	0.66

质量分数略有降低(约 10%),然而黄连与厚朴一起用水回流提取比黄连单独提取的小檗碱质量分数急剧降低(约 38%)。厚朴与黄连一起回流提取的总酚质量分数比厚朴单独回流提取都略有升高。

从上表可以看出,当厚朴一定量的时,黄连在二者的比例越高,其提取率就相对低,然而厚朴中的总酚的提取率越高,当黄连比例为 1∶1的时候小檗碱的提取率最高;当黄连一定量时,小檗碱的提取率也会因为厚朴的比例的变化而变化,然厚朴的比例越高,其提取率则越低。总体说来三者的提取率变化不是很大,厚朴酚的 RSD 9.9%,厚朴酚的 RSD 5.4%,小檗碱的提取率的 RSD 8%。

3　讨论

本文乙醇回流提取和水回流提取所用的药材都来源于同一批药材,2 种溶剂的提取条件基本一致,定量的方法都采用平行比较,研究结果具有科学可行性。

由小檗碱,厚朴酚,和厚朴酚的含量测定的结果可知,当用不同溶剂提取方法相同时,采用乙醇提取小檗碱,厚朴酚,厚朴酚的提取率明显高于用水回流提取,因此提取时候需选择合适的提取溶剂。黄连与厚朴合提水回流提取的小檗碱的含量明显降低,二选择醇提含量略有降低,其原因可能是用水回流提取时药物成分之间发生共沉淀的原因。因此对于传统的煎药来说,要注意药物之间的相互作用以及各成分的含量的变化对疾病的疗效的影响。

复方中黄连与其他药材不同比例配伍提取时小檗碱的含量会发生显著变化,黄连与大黄配伍配伍比例相差越大,则被研究成分-小檗碱含量下降的程度也越大[9];将黄连与吴茱萸分别按 9 个不同比例配伍,其溶出率与黄连在药对中所占比例呈线性关系[10];黄连与甘草、大黄、黄芩配伍后,黄连生物碱成分与甘草、大黄、黄芩中含羧基成分结合,形成沉淀的缘故[11]。本试验中黄连厚朴常配伍使用,其配伍比例的改变也使各指标成分发生了变化。

由结果可知,黄连厚朴单提和合提的提取工艺适宜于含水乙醇为提取溶剂;为了便于操作和节省时间,提取方法采用混合提取。

中药复方成分复杂,不能片面地以单提,合提来判断处方的质量。为了更加科学合理评价处方的疗效,应结合药理,药效,以及各成分在体内的吸收和临床实验来进行综合评价。

[参考文献]

[1] 章美琼. 王氏连朴饮加味治疗胆汁返流性胃炎 80 例[J]. 实用中西医结合临床, 2002, 6(2): 17.
[2] 赵书刚, 陈昕, 雷开键. 王氏连朴饮加丹参、赤芍对高脂血症兔血脂水平及炎症因子影响的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(3): 178.
[3] 孙继铭. 王氏连朴饮加味治疗脾胃湿热型慢性胃炎临床研究[J]. 实用中医内科杂志, 2005, 19(6): 517.
[4] 宋素花. 王氏连朴饮的临床研究概况[J]. 福建中医药, 2002, 33(2): 45.
[5] 赵书刚. 王氏连朴饮加味干预湿热夹瘀型动脉粥样硬化的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
[6] 哈小博. 漫谈“连朴饮”[J]. 开卷有益(求医问药), 2003, (9): 21.
[7] 李欣, 尹莲, 段金廒, 等. 二妙丸类方抗湿热证痛风有效部位群指纹图谱比较研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 1971.
[8] 武荣兰, 徐世美, 封顺, 等. 液相色谱指纹图谱在当归、黄芪及其复方有效成分分析中的应用[J]. 分析试验室, 2007, 26(10): 93.
[9] 关怀, 穆阳, 高燕许, 等. 不同配伍剂量对大黄-黄连药对的有效成分及药理作用的影响研究[J]. 北京中医, 2000, (2): 53.
[10] 彭明兴, 吴永江, 程翼宇. 黄连与吴茱萸配伍时黄连中主要化学组分溶出率变化规律研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 629.
[11] 王桂红. 中药配伍对黄连有效成分煎出率的影响[J]. 湖北中医杂志, 2001, 23(6): 49.

[责任编辑　仝燕]