



## · 制剂与炮制 ·

# 不同相对分子质量膜处理对黄连解毒汤 HPLC 特征图谱的影响

须明玉<sup>1</sup>, 周洪亮<sup>2</sup>, 郭立玮<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学 中药复方分离工程重点实验室, 江苏 南京 210029;

2. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:以黄连解毒汤为研究对象,探讨其采用不同相对截留分子量聚醚砜(PES)超滤膜处理后 HPLC 特征图谱的变化。方法:用 pes-5w, pes-3w, pes-2w, pes-1w, pes-6k 的超滤膜处理黄连解毒汤离心液,应用特征图谱技术,分析经各级膜处理后黄连解毒汤成分的种类和含量情况;并测定其浊度、粘度等理化参数。结果:各级膜处理液的药根碱、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素逐级变小明显,栀子苷有明显的逐级上升的现象;各药液的理化参数(pH、浊度、电导率)也呈规律性的变化;以离心液为参照,按膜相对分子量由大到小排序样品的相似度依次为 0.993, 0.992, 0.984, 0.982, 0.975。结论:本实验运用了膜技术这一较新的分离精制工艺,采用特征图谱全面地反映黄连解毒汤的成分变化,发现各药液成分在种类和含量方面有差异,并探讨了理化参数变化的原因。

**[关键词]** 黄连解毒汤;超滤;理化参数;特征图谱

黄连解毒汤始载于《外台秘要》,由黄连、黄芩、黄柏、栀子 4 味药组成,是清热解毒方中的经典方剂。随着近年来黄连解毒汤药理研究的不断深入(尤其是对其在脑缺血方面),这种研究必然会给医药界带来喜悦,但是由于黄连解毒汤是一个中药复方,里面的成分复杂多样,仅凭单一指标性成分含量难以确定其质量。2010 年版药典<sup>[1]</sup>对黄连的含量测定已经从简单地测定小檗碱的含量上升到同时测定小檗碱、表小檗碱、黄连碱和巴马汀 4 种成分。欧共体在草药质量指南中亦称,单靠测定某种有效成分考查质量的稳定性是不够的;中药及其制剂均为多组分复杂体系,建立中药特征图谱将能较为全面地反映中药及其制剂中所含化学成分的种类与数量,进而对药品质量进行整体描述和评价。本着上述见解,本实验采用高效液相色谱法建立经不同分子量聚醚砜膜处理后渗透液的特征图谱,并测定各

溶液的理化参数,发现各药液成分在种类和含量方面有差异,并探讨了导致这些变化的原因。

## 1 材料

超滤膜组件(根据中国科学院上海原子核研究所的 MSC 300 杯式超滤器改制),内设磁力搅拌桨,外加压力通过氮气钢瓶内普通氮气提供,聚醚砜超滤膜(pes-5w, pes-3w, pes-2w, pes-1w, pes-6k 型,有效膜面积 45.34 cm<sup>2</sup>,上海斯纳普膜分离科技有限公司)。

Waters e2695, 2998 检测器(美国 Waters 公司),Empower 工作站;HH-1 型恒温水浴锅(国华电器有限公司);LXJ-IIB 型飞鸽牌低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂);pHSJ-4A 型实验室 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);DDSJ-308A 型电导率仪(上海精密科学仪器有限公司);SZD-2 型智能化散射光浊度仪(上海棱谱仪表有限公司);Brookfield DV-1 Cp 型旋转黏度计(上海精密科学仪器有限公司)。

黄连、黄芩、栀子(安徽省亳州市中药饮片厂),黄柏(河南聚仁中药饮片有限公司),经鉴定这 4 种药材均符合《中国药典》2005 年版一部各项下规定。盐酸小檗碱(批号 110713-200208)、栀子苷(批号 110749-200512)、黄芩苷(批号 110715-200506)、盐酸巴马汀(批号 110723-200815)、汉黄芩素(批号

**[稿件编号]** 20101129009

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30873449);南京中医药大学基础研究项目(08XYC05)

**[通信作者]** \* 郭立玮,教授,博士生导师,主要研究方向为中药制备高新技术和中药生物药剂学, E-mail: guoliwei815@yahoo.com.cn

**[作者简介]** 须明玉,硕士研究生,主要从事生物药剂学和中药新药方面的研究, E-mail: xumingyubemadat@163.com



111514-200403)、野黄芩苷(批号 110842-200605)、盐酸药根碱(批号 110733-200806)、黄芩素(批号 111595-200402)对照品均购自中国药品生物制品检定所;黄连碱(含量 >98%,南京泽朗医药科技有限公司)。色谱纯乙腈(德国 Merck 公司);色谱纯甲醇(江苏汉邦公司);水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法

### 2.1 黄连解毒汤的制备及预处理

分别称取黄连 90 g,黄柏 60 g,黄芩 60 g,栀子 90 g,煎煮 2 次,第 1 次加 10 倍量水,煎煮 1 h;第 2 次加 8 倍量水,煎煮 1 h,趁热过滤,合并滤液,5 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 10 min。

### 2.2 超滤实验

实验温度 70 ℃,操作压力 0.20 MPa,磁力搅拌器转速 300 r·min<sup>-1</sup>。新膜用去离子水浸泡 2 h;将处理过的膜片固定在超滤杯中,加入去离子水,在 0.2 MPa 下预压 0.5 h,使其性能稳定;补充超滤杯中的去离子水,调节压力测定膜的纯水通量。加入一定体积的黄连解毒汤离心液或相应的渗透液进行滤过,收集滤过液。

### 2.3 物理化学参数的测定

**2.3.1 pH 测定** 取样品 20 mL,在恒温水浴 70 ℃ 条件下保持 10 min,以 pH SJ-4A 实验室 pH 计测定样品的 pH。

**2.3.2 电导率测定** 取样品 20 mL,在恒温水浴 70 ℃ 条件下保持 10 min,以 DDSJ-308A 电导率仪测定其电导率。

**2.3.3 浊度测定** 取样品 50 mL,在恒温水浴 70 ℃ 条件下保持 10 min,以 SZD-2 型浊度仪测定样品的浊度。

**2.3.4 黏度测定** 取样品 16 mL,70 ℃ 条件下,以 Brookfield DV-1 Cp 型旋转式黏度计测定样品的黏度。

### 2.4 黄连解毒汤特征图谱研究

**2.4.1 色谱条件** 参考文献[2-5]并经过筛选试验,确定最佳色谱条件为 Heder a ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(含 0.05% 三乙胺,B),梯度洗脱,0~25 min,13% A;25~35 min,13%~22% A;35~70 min,22% A;70~85 min,22%~60% A;85~110 min,60% A。流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 255 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

**2.4.2 供试品溶液的制备** 取各级渗透液及黄连解毒汤离心液,在沸水浴中加热 0.5 h 各取 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 20% 乙腈-0.1% 磷酸溶液(含 0.05% 三乙胺)适量,超声溶解,放冷,加上述溶液至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜处理,作为供试品溶液。同时取 pes-3w 渗透液 5 份按上述步骤处理制得 5 份溶液。

**2.4.3 混合对照品溶液的制备** 取减压干燥至恒重的栀子苷、野黄芩苷、黄连碱、药根碱、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素对照品适量,精密称定,加甲醇制成各贮备液。分别取上述配制好的单一对照品适量配成每 1 mL 含栀子苷 51.24 μg,野黄芩苷 44.40 μg,黄连碱 19.97 μg,药根碱 15.56 μg,黄芩苷 47.90 μg,巴马汀 13.88 μg,小檗碱 26.18 μg,黄芩素 9.66 μg,汉黄芩素 4.72 μg 的混合对照品溶液。

**2.4.4 样品测定** 取各供试品溶液 10 μL,分别注入液相色谱仪,按 2.4.1 项下方操作,记录 110 min 色谱图及各共有特征图谱峰的相对保留时间和相对峰面积。pes-3w 样品溶液连续进样 5 次测定仪器的精密度;取 pes-3w 样品液,分别于 0,2,4,6,8,10,24 h 进样测定其稳定性;取 2.4.2 项下配置的 5 份 pes-3w 溶液,进样测定其重复性。

## 3 结果

### 3.1 理化参数变化

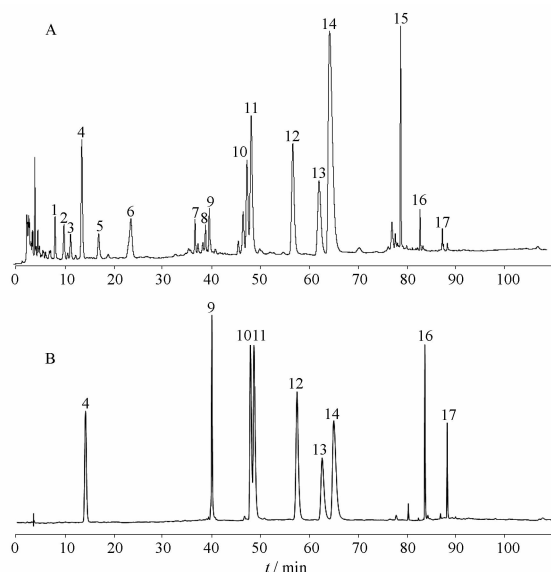
离心液及各级渗透液的理化参数值见表 1。电导率随着膜过程从离心液的 1.943 持续上升到最终 pes-6k 渗透液的 3.740。电导率表示溶液传导电流的能力,系溶液中所含盐成分、离子成分、杂质成分等物质的重要指标。本实验电导率逐级升高的原因可能是:①超滤过程是一个精制过程,在每次的过膜过程中药液体积缓慢变小;②离子成分等没有被截留下来。浊度是水的透明程度的量度,由于水中含有悬浮及胶体状态的微粒,使得原来无色透明的水产生浑浊现象,浊度随膜过程逐级下降,说明膜过程中除去了很多物质,特别是经过 pes-5w 膜处理后,离心液中物质的除去作用尤为明显。黏度指液体在流动时,其分子间产生内摩擦大小的指标。黏度变化不大,或由于此数据为药液在 70 ℃ 时所测,而温度可能是黏度的主要决定因素所致。pH 大小可以衡量溶液酸碱程度,pH 呈微弱的递增趋势,但是通过空白试验表明这种变化趋势与膜过程本身无关,可能是由膜过程中除去了某些物质有关。

表1 样品的理化参数

溶液	电导率/ $\text{ms} \cdot \text{cm}^{-1}$	pH	浊度/NTU	黏度
离心液	1.943	4.002	288.0	7.4
pes-5w	2.540	4.278	73.2	7.8
pes-3w	2.630	4.337	56.9	7.9
pes-2w	2.800	4.431	47.1	7.3
pes-1w	3.040	4.500	40.2	8.0
pes-6k	3.740	4.743	10.9	6.3

### 3.2 黄连解毒汤的混合对照品 HPLC 图及离心液的样品 HPLC 图

黄连解毒汤离心液经处理后和黄连解毒汤中主要指标性成分混合组成的对照图见图1。结果显示,9个对照品中除了10号黄连碱和11号药根碱分离度不够理想外,其他都能达到很好的分离。

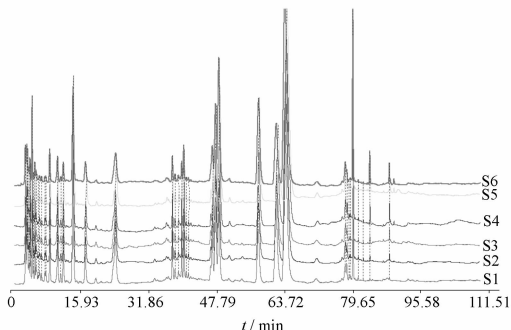


4. 栀子苷;9. 野黄芩苷;10. 黄连碱;  
11. 号药根碱;12. 黄芩苷;13. 巴马汀;14. 小檗碱;  
16. 号黄芩素;17. 号汉黄芩素。

图1 黄连解毒汤离心液(A)和混合对照品(B)的 HPLC 图

### 3.4 离心液和各级渗透液的特征图谱图变化

离心液和各级渗透液的特征图谱见图2。图中各峰的分布形态可按时间分为3段:前30 min 有环烯醚萜类成分栀子苷,在这段时间内所有的峰都能达到很好的分离;30~65 min 以黄酮类和生物碱类成分为主,黄芩苷、巴马汀、小檗碱分离度好且这3个峰的峰面积比较大;65 min 后以黄酮类成分为主。



S1. pes-6k 渗透液;S2. pes-1w 渗透液;  
S3. pes-2w 渗透液;S4. pes-3w 渗透液;  
S5. pes-5w 渗透液;S6. 离心液。

图2 各渗透液样品的特征图谱

以离心液图谱为参照图谱,进行匹配,相似度见表2。随着过膜过程的进行,从 pes-5w 渗透液到 pes-6k 渗透液的相似度变化为 0.993,0.992,0.984,0.982,0.975,即相似度随着过膜过程呈降低趋势。

各级渗透液中各化学成分的峰面积值见表3。结果显示的峰1~17均为图1所标示样品中的物质。由表3中峰面积可求出,S1至S6各样品中9个对照品峰的面积之和均占总峰面积的80%以上。

### 4 讨论

本实验进行了方法学考察,精密度实验中测得相似度为1.000,各共有峰的相对峰面积 RSD 小于5%,相对保留时间 RSD 小于1%,表明仪器精密度

表2 各级样品的相似度比较

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	对照指纹图谱
S1	1.000	0.999	0.998	0.992	0.993	0.975	0.995
S2	0.999	1.000	0.999	0.996	0.997	0.982	0.998
S3	0.998	0.999	1.000	0.997	0.997	0.984	0.999
S4	0.992	0.996	0.997	1.000	1.000	0.992	0.999
S5	0.993	0.997	0.997	1.000	1.000	0.993	1.000
S6	0.975	0.982	0.984	0.992	0.993	1.000	0.991
对照指纹图谱	0.995	0.998	0.999	0.999	1.000	0.991	1.000



表 3 各样品峰面积值

峰号	离心液	5w	3w	2w	1w	6k
1	107 763	114 839	115 050	117 259	119 949	133 360
2	119 694	127 217	126 819	133 329	139 408	148 154
3	83 555	92 746	94 418	96 381	103 097	113 563
4	466 878	521 525	514 885	525 622	564 038	626 894
5	112 362	115 995	114 932	112 218	118 413	129 687
6	309 507	289 728	272 355	347 779	351 996	388 197
7	85 725	95 230	93 366	94 835	98 057	109 809
8	73 522	59 301	59 097	63 315	59 454	64 231
9	134 053	123 454	123 483	125 857	122 370	126 984
10	486 379	490 969	484 935	470 157	485 654	495 029
11	879 702	608 714	586 343	500 247	491 033	475 102
12	803 539	576 816	555 834	452 139	445 800	403 028
13	675 165	700 080	689 333	693 520	701 647	736 606
14	2 588 635	2 271 668	2 309 090	2 040 935	2 067 249	2 027 088
15	449 889	495 164	490 821	495 387	512 878	509 058
16	78 508	57 797	39 969	19 954	13 962	4 761
17	50 341	48 305	32 269	19 696	12 297	2 941

良好;重复性试验测得相似度大于 0.990,各共有峰的相对峰面积 RSD 小于 5%,相对保留时间 RSD 小于 1%,表明实验重复性良好;稳定性实验表明样品溶液在 24 h 内稳定,各共有峰的相对峰面积 RSD 小于 5%。

关于超滤膜在高温下是否会扩大膜孔径的疑问,在本实验中也进行了考察,实验表明从 20 ℃ 开始,随着温度的升高,膜通量有缓慢地升高,到 80 ℃ 时,膜通量有个大幅度升高,说明温度不能超过 80 ℃;通过对黄连解毒汤离心液的浊度研究表明,黄连解毒汤在 70 ℃ 时浊度最小,说明不溶物最少,综合以上 2 点原因选择 70 ℃ 为过膜温度。由于黄连解毒汤冷置时不断地产生沉淀,过膜前都进行预热,同时因为过膜温度为 70 ℃,因此所有的理化参数测定都是在 70 ℃ 进行的,以保持结果的一致性。

潘林梅等<sup>[6]</sup>关于黄连解毒汤中沉淀问题做了研究,以小檗碱为代表的总生物碱和黄芩苷在溶液中的浓度有一平衡点,超过此浓度则可导致平衡破坏,促进沉淀的产生。图 1 中峰 11,12,14 分别代表了药根碱、黄芩苷、小檗碱,这 3 种物质的降低趋势在这 17 种物质中是最大的,可能是在过膜过程中打破了平衡导致这 2 种物质结合成沉淀而被截留。

黄连解毒汤中成分比较复杂,存在着很多弱酸弱碱性物质,所以 pH 的少许变化都可能对某些成分的存在状态产生影响。因溶液体系中存在很多弱酸弱碱的平衡反应,即使药液经过逐级过膜后 pH

呈现较小的上升趋势,亦可能有很多的反应发生,其结果可能促进溶解也可能产生沉淀,从而造成了表 3 中数据的复杂变化。虽然各级渗透液之间物质发生复杂变化,但是中药指纹图谱的评价不同于含量测定,它强调的是相似性,而不是相同性,也即着重辨识完整图谱“面貌”,而不是求索细枝末节。分析比较的结果是对供试品之间的差异性 or 一致性做出的评价。相似性的比较可以用“相似度”表达,相似度可借助国家药典委员会推荐的“中药指纹图谱计算机辅助相似度评价软件”计算,一般情况下相似度在 0.9~1.0 即认为符合要求。由表 2 可知样品的相似度变化为 0.993,0.992,0.984,0.982,0.975,说明了样品的多级超滤膜对黄连解毒汤的总体影响甚微;但是表 3 中也可以看出某些物质如黄芩素、汉黄芩素、药根碱等含量降低至一半或更多,尤其是黄芩素和汉黄芩素随着膜过程损失了 90% 以上。各种样品的药理作用是否有区别,有何区别有待进一步研究,并通过研究可以为黄连解毒汤精制工艺选择提供参考。

黄连解毒汤中除了图 1 中这些能够通过液相测定出来的小分子物质外,药液中还存在很多大分子物质。中药中这些水溶性高分子化合物如多糖类(淀粉、树胶、黏液质等)在水煎煮液中能形成胶团,包藏或吸附某些难溶或不溶性成分,从而使其在水中溶解率增大,这种作用称为增溶,如糊化淀粉能帮助酚类、麻黄碱、芦丁等在水中的溶出。膜过程中随



着膜的相对分子质量的变小,这些大分子物质被不断截留,被增溶的物质也在过膜过程中析出、被截留而损失,即膜过程可能除去了某些能够促进生物碱类等成分溶解的“伴生物质”<sup>[7]</sup>。因而如何从保证药效与除杂效果 2 方面综合考虑选膜孔径,仍是值得深入研究的课题。

[参考文献]

[1] 中国药典[S]. 一部. 2010; 285.  
[2] 孙健,马吉胜,金瑾,等. 黄连解毒汤各成分的 HPLC-UV/MS 定量测定方法研究[J]. 药学学报,2006, 41(4): 380.

[3] 沈嘉,曹现峰,刘九飞. 几种黄连解毒汤的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2003, 25(6): 433.  
[4] 曹现峰,沈嘉. 黄连解毒汤的 HPLC 指纹图谱测定条件初探[J]. 中成药, 2003, 25(7): 519.  
[5] 刘韶,雷鹏,李新中,等. 黄连解毒汤饮片汤剂和颗粒汤剂的指纹图谱比较[J]. 中国药师,2005, 8(2): 117.  
[6] 潘林梅,傅佳,朱华旭,等. 黄连解毒汤提取动态过程及沉淀产生机制的初步研究[J]. 中国中药杂志,2010, 35(1): 10.  
[7] 郭立玮,潘林梅,朱华旭. 中药提取物伴生物质的生物药剂学特性及其制剂意义[J]. 中草药,2007, 38(9): 1281.

## Effect of ultrafiltration by different membranes on HPLC fingerprint of Huanglian Jiedu decoction after being

XU Mingyu<sup>1</sup>, ZHOU Hongliang<sup>2</sup>, GUO Liwei<sup>1\*</sup>

(1. Nanjing university of Chinese medicine, Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound, Nanjing 210029, China;

2. Nanjing university of Chinese medicine, College of Pharmacy, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the change of HPLC fingerprint of Huanglian Jiedu decoction. Huanglian Jiedu decoction was ultrafiltered by different membranes. **Method:** Different relative molecular weight cutoff membranes were used (pes-5w, pes-3w, pes-2w, pes-1w, pes-6k) to explore its effects on content differences among all samples in HPLC. The turbidity, viscosity and other physical and chemical parameters were measured. **Result:** Berberine, baicalein and jatrorrhizine became smaller while geniposide increased. Physical and chemical parameters also showed regular changes. Taking centrifugate as reference, the similarities of the samples treated with high to low molecular weight cutoff membranes were 0.993, 0.992, 0.984, 0.982, 0.975, respectively. **Conclusion:** In this study, the ultrafiltration was used, HPLC fingerprint showed the differences of the samples, and the change of the physical and chemical parameters was explored.

[Key words] Huanglian Jiedu decoction; ultrafiltrate; physical and chemical parameters; HPLC fingerprint

doi:10.4268/cjcm20111207

[责任编辑 马超一]