



Extraction and Comparative Analysis of Berberine Hydrochloride Content from *Cortex Phellodendri Chinense* and *Cortex Phellodendri Amurensis*

Pan Huimin, Shu Shiyu, Wang Jiaqi, Ning Chailin, Li Tiechun, Hui Ruihua*

College of Chemistry and Life Science, Anshan Normal University, Anshan, China

Email address:

ruihuahui@163.com (Hui Ruihua)

*Corresponding author

To cite this article:

Pan Huimin, Shu Shiyu, Wang Jiaqi, Ning Chailin, Li Tiechun, Hui Ruihua. Extraction and Comparative Analysis of Berberine Hydrochloride Content from *Cortex Phellodendri Chinense* and *Cortex Phellodendri Amurensis*. *Asia-Pacific Journal of Chemistry*. Vol. 1, No. 1, 2019, pp. 8-12.

Received: April 10, 2019; Accepted: May 14, 2019; Published: May 27, 2019

Abstract: Berberine hydrochloride was extracted from *Cortex Phellodendri Chinense* and *Cortex Phellodendri amurensis*, and the content of berberine hydrochloride was analyzed and compared. Extraction of berberine hydrochloride from *Cortex Phellodendri Chinense* and *Cortex Phellodendri amurensis* by ultrasonic method was carried out, and extraction conditions such as extraction reagent concentration, extraction time, extraction temperature and liquid ratio were optimized. The content of berberine hydrochloride in *Cortex Phellodendri Chinense* and *Cortex Phellodendri amurensis* was determined by HPLC, and the mobile phase was methanol-acetonitrile-phosphoric acid (0.01 mol/L) (10:28:62, V/V), the flow rate was 1 mL/min, and the detection wavelength was 350 nm. The sample input is 10 μ L. The linear range is 2.20 mm g/mL ~ 13.20 mm g/mL, the standard deviation (RSD) is less than 2.70 %, and the standard recovery rate is 93.21 ~ 99.38 %. The contents of berberine hydrochloride from *Cortex Phellodendri Chinense* and *Cortex Phellodendri amurensis* were 57.80mg/g and 48.20 mg/g respectively. The content of berberine hydrochloride in *Cortex Phellodendri Chinense* was higher than that in *Cortex Phellodendri amurensis*.

Keywords: Cortex Phellodendri Chinense, Cortex Phellodendri Amurensis, Ultrasonic Extraction, Berberine Hydrochloride, HPLC

川黄柏和关黄柏盐酸小檗碱的提取与含量分析

潘慧敏, 叔思宇, 王嘉琦, 宁彩琳, 李铁纯, 回瑞华*

鞍山师范学院化学与生命科学学院, 鞍山, 中国

邮箱

ruihuahui@163.com (回瑞华)

摘要: 采用超声法提取川黄柏和关黄柏中盐酸小檗碱, 对提取试剂浓度、超声提取时间、提取温度和料液比等提取条件进行了优化, 进一步通过正交试验, 得出了最优提取条件。采用高效液相色谱法分别对川黄柏和关黄柏中盐酸小檗碱含量测定, 流动相为甲醇-乙腈-磷酸 (0.01 mol/L) (10:28:62, V/V), 流速为 1 mL/min, 检测波长为350 nm; 进样量为10 μ L。线性范围为2.20 μ g/mL ~ 13.20 μ g/mL, 标准偏差(RSD) 小于2.70 %, 加标回收率为93.21 ~ 99.38 %。实验结果表明: 川黄柏和关黄柏中盐酸小檗碱含量分别为57.80mg/g 和48.20 mg/g, 即川黄柏中盐酸小檗碱含量高于关黄柏中盐酸小檗碱含量。

关键词: 黄柏, 超声法提取, 盐酸小檗碱, 高效液相色谱法

1. 引言

黄柏源于芸香科植物黄皮树 (*Phellodendron chinese* Schneid) 和黄檗 (*Phellodendron anurense* Rupr) 的干燥树皮, 分别被称为川黄柏和关黄柏。关黄柏主产于长江以北的辽宁、吉林、内蒙古、黑龙江、河北等省, 辽宁产量最大。川黄柏主要产于长江以南的四川、贵州、陕西、湖北、云南、广西、湖南等省[1]。现代研究表明, 黄柏具有抗菌、抗滴虫、抗炎、抗溃疡、抗氧化、抗痛风、抗癌、利尿、降压、降血糖、免疫调节、促进皮下溢血吸收等多种药理活性, 在医药领域有着广阔的应用和开发前景[2-5]。黄柏中最主要的活性成分为生物碱类, 其中小檗碱是黄柏中总生物碱的主要活性物质[6-9]。通常认为川黄柏、关黄柏有着相同的功效和性味, 但二者在成分组成上还存在有差异, 尤其是含量上, 川黄柏和关黄柏中主要有效成分盐酸小檗碱的含量存在明显的差异。

本文采用超声法提取川黄柏和关黄柏中盐酸小檗碱, 对提取试剂浓度、超声提取时间、温度和料液比等提取条件进行了优化, 进一步通过正交试验, 得出了最优提取条件。采用高效液相色谱法测定川黄柏和关黄柏盐酸小檗碱的含量, 为黄柏的开发利用提供实验依据。

2. 方法

2.1. 仪器、试剂和样品

2.1.1. 仪器

1525-2996 液相色谱仪 (美国 Waters 公司), KQ-250B 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司), AL-204 电子天平 (梅特勒-托利多), 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm 迪马公司), HX-200A 型华西高速中药粉碎机 (浙江永康溪岸五金药具厂)。

2.1.2. 试剂

甲醇 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯)、磷酸 (色谱纯)、无水乙醇 (分析纯)、盐酸 (分析纯)、水为二次蒸馏水。盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所)。

2.1.3. 样品及前处理

关黄柏和川黄柏购于鞍山药房, 粉碎后过孔径 0.90 mm 筛备用。

2.2. 川黄柏和关黄柏中盐酸小檗碱提取条件的优化及提取

2.2.1. 提取溶剂浓度的选择

取黄柏样品粉末 1.0g, 以不同浓度的乙醇与盐酸体积比为 1:100 的提取溶剂 15mL, 在温度 30℃ 下超声提取 20min, 过滤残渣再反复提取 2 次, 合并滤液, 除去溶剂,

产物即为盐酸小檗碱, 用甲醇溶解并定容至 10mL, 过 0.45μm 微孔滤膜, 进行 HPLC 分析, 实验结果如图 1 所示。

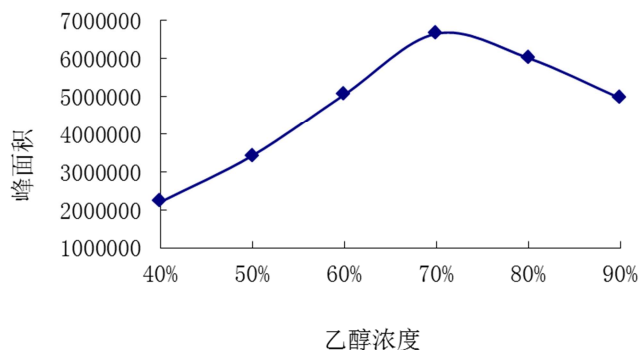


图1 乙醇浓度对小檗碱提取率的影响。

实验结果表明乙醇浓度为 70%, 盐酸小檗碱提取率最高。

2.2.2. 提取温度的选择

取黄柏样品粉末 1.0g, 以 70% 乙醇与盐酸体积比为 1:100 的提取溶剂 15mL, 在温度分别为 0℃、10℃、20℃、30℃、40℃ 下超声提取 20min, 过滤残渣再反复提取 2 次, 合并滤液, 除去溶剂, 产物为盐酸小檗碱, 用甲醇溶解并定容至 10mL, 过 0.45μm 微孔滤膜, 进行 HPLC 分析, 实验结果如图 2 所示。

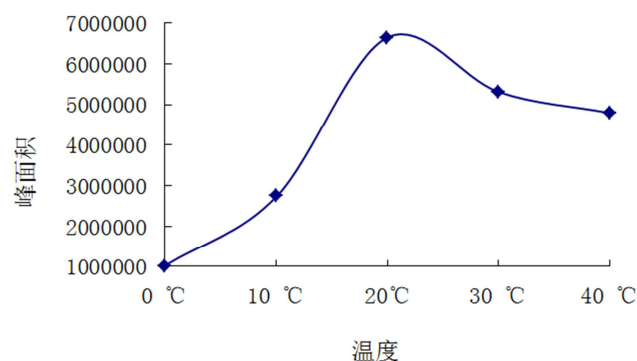


图2 超声温度对小檗碱提取率的影响。

实验结果表明提取温度为 20℃, 盐酸小檗碱提取率最高。

2.2.3. 提取时间的选择

取黄柏样品粉末 1.0g, 以 70% 乙醇与盐酸体积比为 1:100 的提取溶剂 15mL, 在温度为 20℃, 超声提取时间分别为 10min、20min、30min、40 min、50min、60min 提取, 过滤残渣再反复提取 2 次, 合并滤液, 除去溶剂, 产物为盐酸小檗碱, 用甲醇溶解并定容至 10mL, 过 0.45μm 微孔滤膜, 进行 HPLC 分析, 实验结果如图 3 所示。

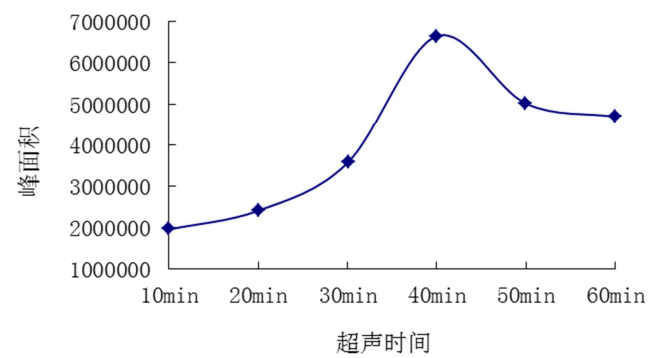


图3 提取时间对小檗碱提取率的影响。

实验结果表明超声提取时间为40 min，盐酸小檗碱提取率最高。

2.2.4. 料液比的选择

分别配制黄柏样品粉末与提取溶剂浓度比为1:5、1:10、1:15、1:20、1:25的溶液，在温度为20℃，超声提取时间分别为40 min提取，过滤残渣再反复提取2次，合并滤液，除去溶剂，产物为盐酸小檗碱，用甲醇溶解并定容至10mL，过0.45μm微孔滤膜，进行HPLC分析，实验结果如图4所示。

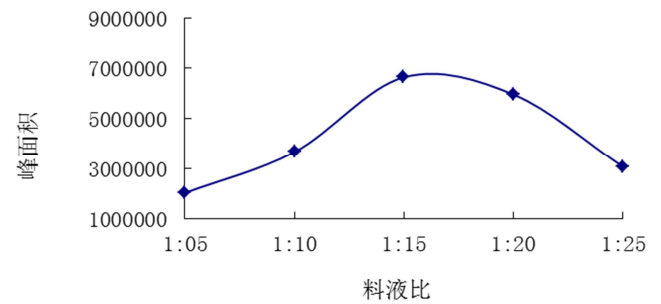


图4 料液比对小檗碱提取率的影响。

实验结果表明料液比为1:15，盐酸小檗碱提取率最高。

2.2.5. 正交试验

上述盐酸小檗碱提取条件的优化中探讨了溶剂浓度等各因素的影响，实验中存在各因素的相互交叉影响，通过正交试验寻求最佳的提取条件，正交试验如表1所示：

由表1确定的因素和水平，设计正交试验[10]，通过HPLC分析，结果列于表2和表3中，对各因素对盐酸小檗碱提取的影响程度做了分析。

表1 正交试验因素水平表。

因素	乙醇浓度A	超声时间B（min）	料液比C	超声温度D（℃）
水平				
1	80%	20	1:10	10
2	70%	30	1:15	20
3	60%	40	1:20	30

表2 正交试验设计及数据处理表。

序号	乙醇浓度A	超声时间B(min)	料液比C(℃)	超声温度D（℃）	峰面积（微伏×秒）
1	1	1	1	1	535224
2	1	2	2	2	2670717
3	1	3	3	3	2090424
4	2	1	2	3	5508471
5	2	2	3	1	4014982
6	2	3	1	2	2121030
7	3	1	3	2	2602954
8	3	2	1	3	1025183
9	3	3	2	1	1238277
K ₁	5296365	8646595	3681437	5788483	
K ₂	11644483	7710882	9417465	7394701	
K ₃	4866414	5449731	8708360	8624078	
K ₁	1765455	2882216	1227146	1929494	
K ₂	3881494	2570294	3139155	2464900	
K ₃	1622138	1816577	2902787	2874693	
R	2259356	1065639	1912009	945198	

表3 正交试验方差分析表。

方差来源	平方和S	自由度f	均方V	F值	显著性
A	9.603×10 ¹²	2	4.802×10 ¹²	7.12	-
B	1.801×10 ¹²	2	0.9005×10 ¹²	1.34	-
C	6.519×10 ¹²	2	3.260×10 ¹²	4.84	-
D	1.348×10 ¹²	2	0.647×10 ¹²	1.00	-
误差	1.348×10 ¹²	2	0.647×10 ¹²		
主次顺序	A	C	B	D	

当F临界值为0.1时，F_{0.1}（2,2）=9.00，由表2和表3可知，该实验中提取率最高的是4号实验，即最佳提取条件：

乙醇浓度70%，料液比1:15，提取时间20min，超声温度30℃。

2.2.6. 黄柏中盐酸小檗碱的提取

取黄柏样品粉末1.0g, 加入盐酸-70%乙醇 (1:100) 15mL, 温度30℃下超声提取20min, 过滤残渣再反复提取2次, 合并滤液, 除去溶剂, 产物为盐酸小檗碱, 用甲醇溶解并定容至10mL, 过0.45μm微孔滤膜, 滤液即为样品溶液。

2.3. 川黄柏和关黄柏中盐酸小檗碱的分析

2.3.1. 盐酸小檗碱对照品的配制

精密称取盐酸小檗碱对照品0.0100 g, 用甲醇溶解定容至10 mL, 经0.45μm微孔滤膜过滤, 备用。

2.3.2. 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)柱; 流动相: 甲醇-乙腈-磷酸 (0.01 mol/L) =(10:28:62, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 350 nm; 进样量: 10 μL; 检测器: 紫外检测器。

2.3.3. 分析步骤

将2.3.1方法配制的盐酸小檗碱标准品溶液和2.2.6方法配制样品溶液, 按2.3.2 色谱条件进行液相色谱分析, 液相色谱图如图5-图7所示。

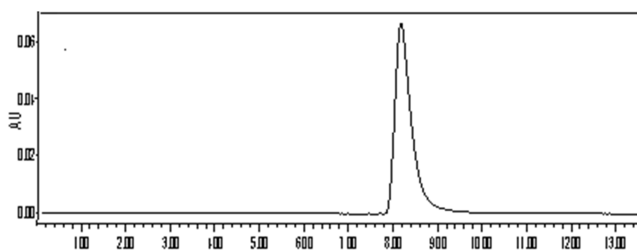


图5 盐酸小檗碱标准品溶液高效液相色谱图。

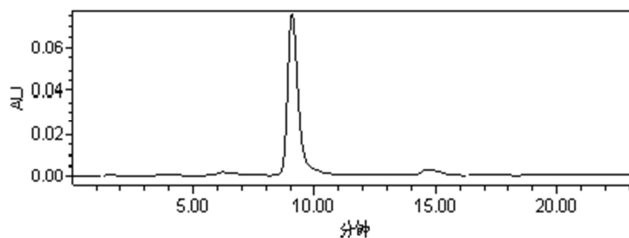


图6 川黄柏样品溶液高效液相色谱图。

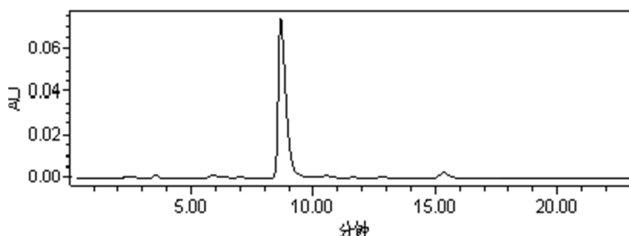


图7 关黄柏样品溶液高效液相色谱图。

2.3.4. 标准曲线的绘制

移取等梯度浓度的小檗碱标准品溶液0.20 ~ 1.20 mL, 以甲醇定容至10mL。在3.2色谱条件下进行HPLC分析, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作图, 绘制标准曲线, 得到回归线方程: $A = 3.8996C - 1.2379$, $r = 0.9997$, 线性范围: 2.20 μg/mL ~ 13.20 μg/mL。

2.3.5. 精密度试验

取小檗碱标准品溶液, 重复进样测定7次, 记录峰面积, 计算相对标准偏差和变异系数, 小檗碱的标准偏差(RSD) 小于2.70%。

2.3.6. 回收率试验

精确称取三份样品溶液, 分别加入不同质量的标准品溶液, 混合均匀进样测定, 方法的回收率结果如表4所示:

表4 回收率实验。

编号 (No.)	样品浓度(μg/mL)	加标量(μg/mL)	应测值(μg/mL)	实测值(μg/mL)	回收率(%)
1	3.24	3.24	6.48	6.26	93.21
2	3.24	4.86	8.10	8.08	99.38
3	3.24	6.48	9.72	9.69	99.07

由表4可知本实验方法的回收率为93.21~99.38 %。

3. 结果

按2.2.6方法配制样品溶液, 进行HPLC测定, 由标准曲线测得川黄柏和关黄柏中小檗碱含量分别为57.80mg/g 和48.20 mg/g。

4. 讨论

为了提高川黄柏和关黄柏中小檗碱的提取率, 对提取试剂浓度、超声提取时间、提取温度和料液比等提取条件进行了优化, 进一步通过正交试验, 得出了最优提取条

件。建立了HPLC法测川黄柏和关黄柏中小檗碱的含量的方法, 并对川黄柏和关黄柏中小檗碱含量进行了测定, 为川黄柏和关黄柏的开发利用提供了科学实验依据。

5. 结论

小檗碱是黄柏中的主要活性成分, 对多种革兰阳性及阴性菌均具有抑菌作用, 对溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、淋球菌和弗氏、志贺氏痢疾杆菌均有抗菌作用。在临床有多种应用, 可抑菌、消炎、除湿等。由黄柏中提取小檗碱作为活性原料, 在多种化妆品中发挥了其各种不同的功效。但在应用中通常认为川黄柏、关黄柏有着相同的功效和组成, 而关于川黄柏和关黄柏中小檗碱含量的比较研究未见报道。本文采用超声法提取川黄柏和关黄柏

中小檗碱,采用高效液相色谱法分别对川黄柏和关黄柏中小檗碱含量测定。实验结果表明,川黄柏和关黄柏中主要有效成分小檗碱的含量存在明显的差异,川黄柏和关黄柏中小檗碱含量分别为57.80mg/g 和48.20 mg/g,即川黄柏中小檗碱含量大于关黄柏中小檗碱含量,为川黄柏和关黄柏的开发利用提供实验依据。

基金项目

国家级大学生创新创业项目(201810169001)。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会,《中国药典》(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2010,137
- [2] 吴嘉瑞,张冰,张光敏.黄柏药理作用研究进展[J].亚太传统医药,2009,5(11):160—162
- [3] 王衡奇,秦民坚,余国奠.黄柏的化学成分及药理学研究进展[J].中国野生植物资源,2000,20((4):6—8
- [4] 侯小涛,戴航,周江煜.黄柏的药理研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(2):498—500
- [5] 张义虎,孙静.黄柏的临床应用总述[J].中国医学创新,2010,7(3):182—183
- [6] 俞丹,尹莲.黄柏总生物碱提取工艺的优化研究[J].海峡药学,2008,20(7):19-21

- [7] 蒋国良,吴珂.黄柏提取工艺的优化[J].医药导报,2007,26(7):792—793
- [8] 王楠楠,汪治,杨建琼.秃叶黄皮树叶子的化学成分研究(英文)[J].天然产物研究与开发,2010,22(3):419-421
- [9] 王跃华,苟小军,徐文俊.川黄柏不同部位中盐酸小檗碱的研究[J].成都大学学报(自然科学版),2004,23(1):15-17
- [10] 程弘夏,雷晓璐,王仲,等.正交设计法优化黄柏涂膜剂成膜材料的制备工艺[J].化学与生物工程,2016,29(8):63-65

作者简介



潘慧敏,女,(1996.07-)鞍山师范学院化学与生命科学学院,16级学生。现担任国家级大学生创新创业项目的项目负责人。曾经在大学生创新创业比赛中获得鞍山市级三等奖。



回瑞华,女,(1945.07-),教授,硕士生导师。中国质谱学会第五、六届理事。现为中国质谱学报编委。从事天然产物有机化学的教学与研究,在国内外权威学术杂志发表研究论文200余篇。现担任国家级大学生创新创业项目的指导教师。