黄连总生物碱提取物稳定性、理化性质的考察

梅紫薇[1]， 徐艳艳[1]， 田伟强[1*]， 石森林[2]， 黎启帆[2]， 吴查青[3]
(1. 丽水市中心医院，浙江 丽水 323000；2. 浙江中医药大学，浙江 杭州 310053；3. 丽水市食品药品与质量技术检验检测院，浙江 丽水 323000)

摘要：目的 考察黄连总生物碱提取物稳定性及其理化性质。**方法** 根据《原料药物与制剂稳定性试验指导原则》，对提取物进行高湿（92.5%、75%）、高温（60 ℃）、强光照（4 500 lx）试验，考察其外观、含量变化。采用指标分析法，分别测定黄连总生物碱在 pH 2.3、3.5、4.2 的磷酸盐缓冲液，超纯水，0.1 mol/L HCl，甲醇，乙醇，乙酸乙酯，正辛醇中的溶解性。采用摇瓶法，分别测定黄连总生物碱在不同正辛醇-水、磷酸盐缓冲液、人工肠液、人工胃液中的表观油水分配系数。**结果** 黄连总生物碱含量在高温、高湿、强光条件下无明显变化，在 pH=2.3 磷酸盐缓冲液中溶解度最高，正辛醇中最低，lg*P* 均在−1~0 范围内。**结论** 黄连总生物碱提取物性质稳定，水溶性好，脂溶性差，渗透性理想，pH 可影响其溶解性。

关键词：黄连总生物碱提取物；稳定性；溶解性；表观油水分配系数
中图分类号：R284 **文献标志码**：B **文章编号**：1001-1528(2021)06-1579-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.035

黄连为毛茛科黄连 *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，功效清热燥湿、泻火解毒等[1]，主要成分为生物碱[2]，其中小檗碱、巴马汀碱、黄连碱、表小檗碱、药根碱具有较强的药理活性[3-4]。研究表明，黄连总生物碱对应激所致的胃黏膜损伤具有保护作用；抑制肉芽组织增长，减弱特异性免疫功能[5-6]；抑制幽门螺旋杆菌和胃酸分泌，防止其附着于胃壁，预防胃溃疡的形成；明显降低胃蛋白酶活性，减少其对胃黏膜的侵害，从而保护胃黏膜[7-8]。课题组前期研究了黄连总生物碱在家兔体内的药动学特征，发现其 $t_{1/2}$ 短，口服生物利用度差[9]，故再将其制成胃内漂浮型缓释片，使其黏附于胃黏膜，延长作用时间，增加药物吸收[10-11]。

稳定性是制剂在保存过程中重要的考察指标之一，对其制备与质量评价具有重要作用，而溶解性、表观油水分配系数是考察药物理化性质重要的参数。为了将黄连总生物碱制成安全有效、质量可控的胃内漂浮型缓释片，本实验考察其稳定性、溶解性、表观油水分配系数，以期为相关制剂工艺的研究提供依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 黄连总生物碱（自制，批号 20190822）。盐酸小檗碱（批号 M24A10K86772）、盐酸黄连碱（批号 Z22A10X94861）、药根碱（批号 Z11M8S35794）、盐酸巴马汀（批号 Z16J10X79792）、表小檗碱（批号 F26O10X95974）对照品（上海源叶生物科技有限公司）。胰酶（批号 A25N10L103650）、胃蛋白酶（批号 L05N10J102095）（上海源叶生物科技有限公司）。磷酸二氢钾（批号 20180308）、乙酸乙酯为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；十二烷基硫酸钠为分析纯（天津市大茂化学试剂厂）；磷酸、乙醇为分析纯（成都市科隆化学品有限公司）；甲醇、正辛醇为分析纯（上海麦克林生化科技有限公司）；甲醇、乙腈为色谱纯（默克股份两合公司）；水为超纯水。

1.2 仪器 XS105DU 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；TU-1901 紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）；Milli-Advantagea A10 超纯水系统［默克化工技术（上海）有限公司］；Agilent 1200 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；KQ-300DB 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；酸度计［梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司］；LABOPORT 真空泵 N816（德国 KNF 公司）；振荡器（上海一恒科学仪器有限公司）

2 方法与结果

2.1 黄连总生物碱含量测定

2.1.1 溶液制备

2.1.1.1 对照品溶液 精密称取盐酸小檗碱对照品 1.6 mg，甲醇超声溶解并定容至 50 mL，摇匀，即得。

2.1.1.2 供试品溶液 精密称取黄连总生物碱提取物 8.5 mg，甲醇超声溶解并定容至 100 mL，摇匀，再精密量

收稿日期：2020-06-28
基金项目：浙江省中医药科技计划项目（2013ZB148，2019ZQ047）；丽水市科技计划项目（2016GYX40）；吴阶平医学基金会（320.6750.2020-04-44）
作者简介：梅紫薇（1991—），女，硕士，初级药师，从事药物新剂型与新技术研究。Tel：17858199601，E-mail：783778036@qq.com
*通信作者：田伟强（1963—），男，主任药师，从事医院药学研究。Tel：（0578）2285717，E-mail：lstianwq@163.com

取 0.95 mL，甲醇稀释至 10 mL，摇匀，即得。

2.1.2 检测波长确定 吸取对照品、供试品溶液适量，置于紫外分光光度计中，在 200～400 nm 波长范围内进行光谱扫描。结果显示，2 种溶液均在 345 nm 波长处有最大吸收，故选择其作为检测波长。

2.1.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液 1.0、1.2、1.3、1.5、1.8、2.0 mL，分别用甲醇稀释并定容至 10 mL，置于紫外分光光度计中，在 345 nm 波长处测定吸光度。以对照品质量浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（A）进行回归，得方程为 $A=0.067\ 6X-0.000\ 3$（$r=0.999\ 9$），在 3.2～6.4 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 取对照品溶液，按“2.1.3”项下方法测定 6 次吸光度，测得其 RSD 为 0.035%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 取提取物 6 份，按“2.1.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项下方法测定吸光度，测得黄连总生物碱含量 RSD 为 0.08%，表明该方法重复性较好。

2.1.6 稳定性试验 取同一份提取物，按“2.1.1.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1.3”项下方法测定吸光度，测得其 RSD 为 1.83%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 加样回收试验 称取 9 份黄连总生物碱含量已知的提取物，分成 3 组，分别加入 80%、100%、120% 水平的对照品，甲醇超声溶解并定容至 100 mL，精密量取1 mL，甲醇溶解定容至 10 mL，摇匀，按“2.1.3”项下方法测定吸光度，计算回收率。结果，黄连总生物碱平均加样回收率为 99.07%，RSD 为 0.99%。

2.2 5 种生物碱含量测定

2.2.1 溶液制备

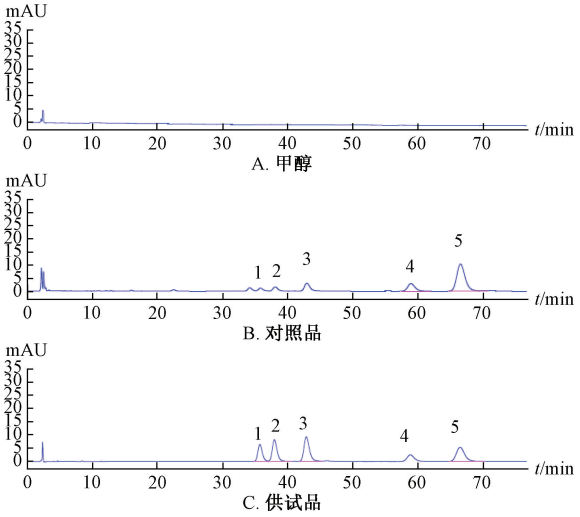
2.2.1.1 对照品溶液 精密称取对照品盐酸小檗碱 1.1 mg、盐酸黄连碱 1.4 mg、药根碱 0.8 mg、盐酸巴马汀 1.9 mg、表小檗碱 0.9 mg，置于同一量瓶中，甲醇超声溶解并定容至 25 mL，摇匀，即得（盐酸小檗碱 44 μg/mL、盐酸黄连碱 56 μg/mL、药根碱 32 μg/mL、盐酸巴马汀 76 μg/mL、表小檗碱 36 μg/mL）。

2.2.1.2 供试品溶液 精密称取黄连总生物碱提取物 1.1 mg，甲醇溶解并定容至 10 mL，摇匀，即得。

2.2.2 色谱条件 ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱；流动相乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾（38∶62），每 100 mL 加入十二烷基硫酸钠 0.4 g（磷酸调 pH 至 4.0）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 40 ℃；检测波长345 nm；进样量 10 μL。

2.2.3 系统适用性试验与专属性考察 取对照品、供试品溶液，在“2.2.2”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，5 种生物碱色谱峰峰形良好，均能达到基线分离（分离度均大于 1.5），对称因子均在 0.92～1.05 之间，理论塔板数均大于 10 000，甲醇不干扰测定。

2.2.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.5、1、2、3、4、5 mL，甲醇稀释并定容至 10 mL，摇匀，在“2.2.2”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得方程分别为盐酸小檗碱 $Y=35.784X-7.094\ 5$（$r=0.999\ 9$），在 2.2～22 μg/mL 范围内线性关系良好；盐酸黄连碱 $Y=30.382X-9.167\ 2$（$r=0.999\ 8$），在 3.0～30 μg/mL 范围内线性关系良好；药根碱 $Y=32.552X-3.265$（$r=0.999\ 9$），在 1.6～16 μg/mL 范围内线性关系良好；盐酸巴马汀 $Y=8.492\ 1X-5.123\ 4$（$r=0.999\ 5$），在 3.8～38 μg/mL 范围内线性关系良好；表小檗碱 $Y=39.595X-8.089\ 6$（$r=0.999\ 8$），在 1.8～18 μg/mL 范围内线性关系良好。



1. 药根碱 2. 表小檗碱 3. 盐酸黄连碱 4. 盐酸巴马汀 5. 盐酸小檗碱

图 1 各生物碱 HPLC 色谱图

2.2.5 精密度试验 取对照品溶液，在“2.2.2”项色谱条件下进样测定 6 次，测得各生物碱峰面积 RSD 分别为盐酸小檗碱 0.872%、盐酸黄连碱 0.830%、药根碱 0.909%、盐酸巴马汀 0.974%、表小檗碱 0.977%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一份提取物，按“2.2.1.2”项下制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.2.2”项色谱条件下进样测定，测得各生物碱峰面积 RSD 分别为盐酸小檗碱 0.80%、盐酸黄连碱 0.82%、药根碱 2.10%、盐酸巴马汀 0.49%、表小檗碱 1.01%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取 6 份提取物，每份约为 8.5 mg，精密称定，按“2.2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，在“2.2.2”项色谱条件下进样测定，测得各生物碱含量 RSD 分别为盐酸小檗碱 0.820%、盐酸黄连碱 0.825%、药根碱 2.506%、盐酸巴马汀 0.611%、表小檗碱 1.207%，表明该方法重复性较好。

2.2.8 加样回收试验 称取各生物碱含量已知的提取物 9 份，分成 3 组，分别加入 80%、100%、120% 水平的盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、药根碱、盐酸巴马汀、表小檗碱，

按“2.2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.2”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，盐酸小檗碱平均加样回收率为 98.91%，RSD 为 0.68%；盐酸黄连碱平均加样回收率为 98.53%，RSD 为 0.53%；药根碱平均加样回收率为 98.89%，RSD 为 0.41%；盐酸巴马汀平均加样回收率为 98.58%，RSD 为 0.137%；表小檗碱平均加样回收率为 98.89%，RSD 为 0.41%。

2.3 稳定性研究

2.3.1 高湿试验 根据《原料药物与制剂稳定性试验指导原则》（以下简称《指导原则》），称取提取物适量，置于培养皿中，摊成≤5 mm 厚的薄层，分别敞口置于温度 25 ℃、相对湿度 92.5%（KNO_3 饱和溶液）及温度 25 ℃、相对湿度 75%（NaCl 饱和溶液）的密闭容器中，于放置后第 0、5、10 天取样，准确称定实验前后供试品质量，结果见表 1。由此可知，在 2 种相对湿度条件下，提取物吸湿增重均<5%。

表 1 高湿试验结果（n=3）

相对湿度/%	吸湿增重/%		
	第 0 天	第 5 天	第 10 天
92.5	1.529	1.606	1.603
75	1.614	1.633	1.634

2.3.2 高温试验 根据《指导原则》称取提取物适量，置于培养皿中，摊成≤5 mm 厚的薄层，敞口置于 60 ℃下，于放置后第 0、5、10 天取样，测定含量，结果见表 2。由此可知，在该温度下各成分含量无明显变化。

表 2 高温试验结果（n=3）

成分	含量/%		
	第 0 天	第 5 天	第 10 天
总生物碱	65.71	66.98	66.98
盐酸小檗碱	36.80	37.47	36.32
盐酸巴马汀	7.82	8.00	7.72
盐酸黄连碱	9.83	9.95	9.63
盐酸表小檗碱	4.07	4.12	3.99
盐酸药根碱	3.84	3.87	3.79

2.3.3 强光照试验 根据《指导原则》称取提取物适量，置于培养皿中，摊成≤5 mm 厚的薄层，室温下敞口置于 4 500 lx光照强度下，于放置后第 0、5、10 天取样，观察供试品外观，测定含量，结果见表 3。由此可知，供试品外观、各成分含量均无明显变化。

表 3 强光照试验结果（n=3）

成分	含量/%		
	第 0 天	第 5 天	第 10 天
总生物碱	65.71	66.89	66.76
盐酸小檗碱	36.80	38.94	36.72
盐酸巴马汀	7.82	8.24	7.78
盐酸黄连碱	9.83	10.56	9.95
盐酸表小檗碱	4.07	4.35	4.13
盐酸药根碱	3.84	4.06	3.84

2.4 溶解度测定 量取 pH 2.3、3.5、4.2 的磷酸盐缓冲液，超纯水，0.1 mol/L HCl，甲醇，乙醇，乙酸乙酯，正辛醇各 5 mL，加入过量提取物，置于恒温振荡器中，在（37±0.5）℃下 120 r/min 振摇 24 h 充分溶解，静置，微孔滤膜过滤，按“1.1.2”项下方法测定吸光度，计算溶解度，结果见表 4。

表 4 溶解度测定结果

溶剂	溶解度/（mg·mL^{-1}）	程度
pH=2.3 磷酸盐缓冲液	36.218	溶解
pH=3.5 磷酸盐缓冲液	30.816	略溶
pH=4.2 磷酸盐缓冲液	27.671	略溶
超纯水	30.792	略溶
0.1 mol/L HCl	5.052	微解
甲醇	9.527	微解
乙醇	3.203	微解
乙酸乙酯	2.456	微解
正辛醇	0.040	几乎不溶

2.5 表观油水分配系数测定 吸取适量正辛醇溶液，分别与同体积 pH=2.6、pH=4.0、pH=6.8 磷酸盐溶液，超纯水，人工胃液，人工肠液混合后置于试管中，在（37±0.5）℃下 120 r/min 振摇 24 h，12 000 r/min 离心 10 min，分别取上、下层，其中上层（油相）为水饱和正辛醇溶液，下层（水相）为正辛醇饱和水溶液。

精密吸取上层溶液（油相）至试管中，加入过量提取物，置于恒温振荡仪中，在（37±0.5）℃下 120 r/min 振摇 24 h，离心，取水层，0.45 μm 微孔滤膜过滤，按“1.1.2”项下方法测定吸光度，计算质量浓度 C_0；精密吸取上层溶液（油相）3 mL 至试管中，加入下层溶液（水相），置于恒温振荡器中，在（37±0.5）℃下 120 r/min 振摇 24 h，离心，取水层，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，按“1.1.2”项下方法测定吸光度，计算质量浓度 C_w，再计算表观油水分配系数 P，公式为 $P=(C_0-C_w)/C_w$，结果见表 5。

表 5 表观油水分配系数测定结果

pH	C_0	C_w	P	lg$P$
1.0	92.307 7	63.814 1	0.446 5	−0.350 2
4.5	123.717 9	83.830 1	0.475 8	−0.322 6
6.8	158.974 4	99.343 0	0.600 3	−0.221 7
超纯水	72.435 9	54.855 8	0.320 5	−0.494 2
人工胃液	201.602 6	112.131 4	0.797 9	−0.098 1
人工肠液	104.166 7	69.343 0	0.502 2	−0.299 1

3 讨论

本实验建立了黄连总生物碱 UV、HPLC 含量测定方法，并进行了方法学考察，发现其准确度高；考察了该成分分别在高温、高湿、强光照条件下含量变化，发现均无明显变化，表明它在上述条件下性质稳定，再通过指标成分法研究该成分在不同介质中的溶解性[12]，发现 pH 为 2.3~4.2 时其溶解性呈下降趋势，在 pH = 2.3 磷酸盐缓冲液中溶解量最大，表明在酸性溶液中该成分溶解性较号。

油水分配系数可模拟药物在生物体内水相和生物相之间的分配情况，从而预测药物在肠道的吸收情况。大部分药物的溶解度参数为 8~12，而正辛醇为 10.24，接近细胞膜溶解度参数 10.3，可使药物形成近似理想的溶液，具有更好的极性和溶解性，故选择该溶剂作为油相来模拟生物膜[13]。

表观油水分配系数 P 的对数（lg$P$）在 -1~2 范围内时，可认为药物在胃肠道吸收较好[14-16]。人体胃肠道 pH 值在 1.4~8 之间，而本实验发现，黄连总生物碱在上述 pH 范围内的 lg$P$ 为 -1~2，表明其渗透性较好，为药物最佳吸收范围，可被胃肠道吸收，而且在人工胃液中的渗透性优于其他溶液，可为相关剂型制备工艺开发提供参考。

参考文献：

[1] 李淑娇，王宇卿，庄 果. 基于 HPLC-DAD 结合 HPLC-Q-TOF/MS 的黄连活性成分筛选[J]. 中国医院药学杂志，2019，39(8)：781-785.

[2] 盖晓红，刘素香，任 涛，等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药，2018，49(20)：4919-4927.

[3] 张纯刚，唐静雅，于琛琛，等. 黄连五种主要生物碱的提取纯化及含量测定[J]. 中国现代中药，2018，20(9)：1146-1149；1156.

[4] 蒋晓梅，刘 翀，朱延焱. 黄连总生物碱对溃疡性结肠炎模型大鼠肠黏膜损伤及 p38-PPARγ/NF-κB 通路的影响[J]. 中国药师，2019，22(12)：2188-2193.

[5] 梅 刚，袁常珍. 黄连素治疗胃溃疡的临床应用分析[J]. 中西医结合心血管病电子杂志，2016，4(12)：58-59.

[6] 张晶晶，谈恒山. 黄连素的临床应用研究进展[J]. 药学与临床研究，2015，23(3)：287-290.

[7] 孙 洁，严广华. 黄连化学成分及有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国继续医学教育，2018，10(8)：140-143.

[8] 包雨晴，凌 云，石银龙，等. 不同浸渍条件下大黄黄连泻心汤对大鼠胃溃疡的疗效及胃组织 PGE_2 含量的影响[J]. 中华中医药杂志，2018，33(1)：291-293.

[9] 梅紫薇，丁美红，董 莉，等. 黄连提取物中盐酸小檗碱及其单体在家兔体内的药动学差异[J]. 中成药，2017，39(8)：1605-1608.

[10] Wójcikpastuszka D，Golonka I，Drys A，*et al*. Application of an anionic polymer in the formulation of floating tablets containing an alkaline model drug[J]. *Adv Clin Exp Med*，2017，26(9)：1319-1327.

[11] Eberle V A，Schoelkopf J，Gane P A C，*et al*. Floating gastroretentive drug delivery systems：Comparison of experimental and simulated dissolution profiles and floatation behavior[J]. *Eur J Pharm Sci*，2014，58：34-43.

[12] 丁克敏，刘 力，程雪梅，等. 骆驼蓬总生物碱提取物溶解性能表征方法的探讨[J]. 中国中药杂志，2010，35(17)：2250-2253.

[13] 史小玉，张广彬，魏赛丽，等. HPLC-荧光法测定土大黄苷平衡溶解度和油水分配系数[J]. 西安交通大学学报(医学版)，2013，34(5)：682-685.

[14] 王群星，吴瑾瑾，徐菲拉，等. 延胡索总生物碱的稳定性影响因素与理化性质研究[J]. 中华中医药杂志，2019，34(8)：3750-3754.

[15] 李晓琦，张光霁，申 力，等. 高效液相色谱法研究天麻素的理化性质及溶液稳定性[J]. 中华中医药杂志，2014，29(3)：851-854.

[16] 朱 慧，耿 婷，张 丽，等. 荆芥内酯平衡溶解度和油水分配系数的测定[J]. 中国中药杂志，2010，35(23)：3144-3146.