

# 黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的溶解度与油水分配系数测定

孙磊, 冯军, 雷艳丽, 隋宏, 王文革\*

(宁夏医科大学药学院, 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 银川 750004)

**[摘要]** **目的:**测定黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的平衡溶解度与油水分配系数,为相关制剂研究奠定基础。**方法:**建立HPLC分别测定盐酸小檗碱和黄芩苷含量, Pantulips™ BP-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2%磷酸水溶液(30:70), 检测波长230 nm, 流速1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温30 ℃。采用摇瓶法测定黄芩苷-盐酸小檗碱复合物在水、不同pH介质中的平衡溶解度;测定该复合物在正辛醇-水中的浓度并计算油水分配系数。**结果:**在pH 6.8~8.0的介质中,复合物中黄芩苷和盐酸小檗碱的溶解度与原药相比分别降低了50,2倍左右;复合物中黄芩苷和盐酸小檗碱的油水分配系数分别为0.109和0.399,分别较原药提高了2.37,4.69倍。**结论:**黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的溶解度和油水分配系数与原药存在差异,可能会影响药物的体内行为和口服给药后的胃肠道吸收情况。

**[关键词]** 黄芩苷; 盐酸小檗碱; 溶解度; 油水分配系数; 共煎; 沉淀; 复合物

**[中图分类号]** R283.6; R284; TQ316.6+2; O645.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0035-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2017210035

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1126.064.html>

**[网络出版时间]** 2017-08-09 11:26

## Determination of Equilibrium Solubility and Oil-water Partition Coefficient of Baicalin-berberine Hydrochloride Complex

SUN Lei, FENG Jun, LEI Yan-li, SUI Hong, WANG Wen-ping\*

(Key Laboratory of Hui Ethnic Medicine Modernization, Ministry of Education, Ningxia Engineering and Technology Research Center For Modernization of Hui Medicine, School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the equilibrium solubility and the oil-water partition coefficient of baicalin-berberine hydrochloride complex for further study on the related preparations. **Method:** HPLC was validated for analysis of berberine hydrochloride and baicalin. The equilibrium solubilities of baicalin-berberine hydrochloride complex in water and media with different pH were measured by shaking flask method. The concentration of this complex in *n*-octanol and water was determined to calculate the oil-water partition coefficient. **Result:** The solubilities of berberine hydrochloride and baicalin in the complex were 2-fold and 50-fold lower than that of crude drugs in medium with pH of 6.8-8.0. The oil-water partition coefficients of baicalin and berberine hydrochloride in the complex were 2.37 times and 4.69 times higher than that of the pure drugs, respectively. **Conclusion:** Differences of solubility and partition coefficient are revealed between baicalin-berberine hydrochloride complex and pure drugs, which may affect the *in vivo* performance and gastrointestinal absorption of the complex.

**[Key words]** baicalin; berberine hydrochloride; solubility; oil-water partition coefficient; mixed decoction; precipitation; complex

**[收稿日期]** 20170327(015)

**[基金项目]** 宁夏自然科学基金项目(NZ14090)

**[第一作者]** 孙磊, 硕士, 实验师, 从事中药药活性物质基础及应用研究, Tel:0951-6880522, E-mail:sunlei\_668@126.com

**[通讯作者]** \*王文革, 教授, 博士, 从事新型载药材料及给药系统研究, Tel:0951-6880581, E-mail:784490228@qq.com

盐酸小檗碱是存在于黄连等植物中的一种季胺类异喹啉生物碱,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等多种活性,常用于肠道炎症、糖尿病和急性肺损伤等的治疗<sup>[1]</sup>。黄芩苷是唇形科植物黄芩的重要有效成分,具有降压、镇静、保肝、利胆、抗菌、消炎等多种药理作用<sup>[2-3]</sup>。研究表明小檗碱与黄芩苷共煎后会产生一种黄色絮状沉淀<sup>[4-5]</sup>,为二者的难溶性复合物。该复合物仍具有较强活性<sup>[6]</sup>,其抗菌活性低于盐酸小檗碱,但优于黄芩提取物<sup>[4-5]</sup>,且对  $\text{CoCl}_2$  诱导的神经毒性具有保护作用<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究发现黄芩苷-盐酸小檗碱复合物对溃疡性结肠炎小鼠模型具有较好的疗效,且口服急性毒性显著低于盐酸小檗碱。深入研究该复合物的理化性质将有助于更好地了解方剂配伍机制,对指导相关制剂的工艺设计及临床应用具有重要意义<sup>[4]</sup>。目前针对黄芩苷-盐酸小檗碱复合物基本性质的研究较少,本实验拟考察该复合物在不同 pH 介质中的平衡溶解度及其油水分配系数,以期揭示复合物的吸收过程及其制剂设计与研究提供参考。

## 1 材料

SQP 124 型电子天平(德国 Sartorius 公司),QL-861 型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司),TDL-40B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),FD-1C 型冷冻干燥机(北京德天佑仪器有限公司),1220 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),Milli-Q 型超纯水处理系统(美国 Millipore 公司)。

盐酸小檗碱、黄芩苷对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-10090303, MUST-12112909,纯度均为 98%),盐酸小檗碱原料药(陕西凯达生物医药科技有限公司,批号 141208,纯度 95%),黄芩苷原料药(南京景竹生物科技有限公司,批号 JZ20131026,纯度 90%),透析袋 MD34(相对分子质量 8~14 kDa,北京索莱宝科技有限公司),水为超纯水,甲醇、乙腈、二氯甲烷均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

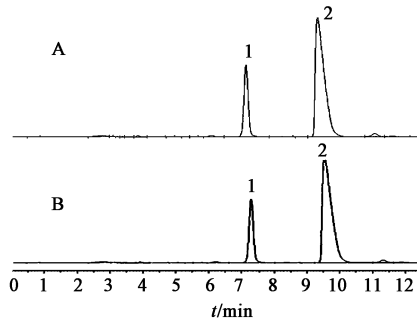
**2.1 黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的制备** 分别称取黄芩苷原料药 0.5 g 和盐酸小檗碱原料药 1.0 g,装入透析袋(相对分子质量 8 kDa)中,用水 6 mL 分散,扎紧透析袋口,置于含有水 300 mL 的烧杯中,密封,于 100 °C 水浴煎煮 4 h,冷却至室温后离心(转速设定  $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 5 min),分离上清液与

沉淀,沉淀物加少量水反复洗涤 2~3 次,真空冷冻干燥 24 h,即得。

## 2.2 HPLC 方法学研究

**2.2.1 对照品溶液的配制** 精密称取黄芩苷对照品 50 mg,用甲醇溶解并定容至 100 mL,摇匀,即得  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩苷对照品溶液;精密称取盐酸小檗碱对照品 50 mg,同法制得  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸小檗碱对照品溶液。

**2.2.2 色谱条件** 采用 Pentulips™ BP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸水溶液(30:70),检测波长 230 nm,柱温 30 °C,流速  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。黄芩苷和盐酸小檗碱在此色谱条件下的保留时间分别为 7.25, 9.95 min,吸收峰对称性良好且没有拖尾现象,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 黄芩苷; 2. 盐酸小檗碱

图 1 黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of baicalin-berberine hydrochloride complex

**2.2.3 标准曲线绘制** 精密称取黄芩苷及盐酸小檗碱对照品各 15 mg 于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,吸取该混合对照品溶液适量置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制质量浓度分别为 30, 75, 120, 180, 240, 300  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的系列混合对照品溶液。按 2.2.2 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得盐酸小檗碱、黄芩苷的回归方程分别为  $Y = 17\,035X + 128\,805$  ( $R^2 = 0.999\,5$ ),  $Y = 5\,776.6X - 12\,492$  ( $R^2 = 0.999\,8$ ),线性范围均为 30~300  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.2.4 精密度试验** 取质量浓度均为 120  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的黄芩苷及盐酸小檗碱混合对照品溶液,按 2.2.2 项下色谱条件测定 6 次,重复测定 3 d,结果发现黄芩苷、盐酸小檗碱峰面积日内精密度 RSD 分别为 1.9% 和 0.7%;二者峰面积日间精密度 RSD 分别为 4.4% 和 2.2%,表明仪器精密度良好。

**2.2.5 稳定性考察** 取适量黄芩苷-盐酸小檗碱复合物,用甲醇溶解,分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.2.2 项下色谱条件测定,计算黄芩苷、盐酸小檗碱

峰面积的 RSD 分别为 1.6% 和 1.2%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.6 最低定量限及最低检测限** 在所确定的色谱条件下,按照  $S/N = 10$  和  $S/N = 3$  计算,黄芩苷、盐酸小檗碱的最低定量限分别为  $6.7, 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;最低检测限分别为  $2.0, 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.2.7 加样回收试验** 分别精密称取黄芩苷-盐酸小檗碱复合物 9 份,每份 10 mg,置于量瓶,分别加入相对于样品中所含药量 80%,100% 和 120% 的黄芩苷和盐酸小檗碱对照品,加甲醇适量,超声使完全溶解,按 2.2.2 项下色谱条件测定,计算平均回收率及 RSD,见表 1。结果表明黄芩苷和盐酸小檗碱的加样回收率在 98% ~ 105%,RSD 均 < 3.0%,表明该分析方法的回收率符合方法学要求。

表 1 黄芩苷和盐酸小檗碱的加样回收率测定

Table 1 Recovery tests of baicalin and berberine hydrochloride

样品	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
黄芩苷	3.53	2.82	6.34	99.6	101.3	2.2
	3.53	2.83	6.47	103.9		
	3.54	2.81	6.36	100.4	100.8	1.3
	3.52	3.51	7.01	99.4		
	3.53	3.52	7.12	102.0		
	3.54	3.52	7.09	100.9		
	3.55	5.72	9.21	99.0	99.5	1.3
	3.53	5.73	9.32	101.0		
	3.52	5.71	9.15	98.6		
	盐酸小檗碱	6.44	5.16	11.51	98.3	98.8
6.48		5.18	11.61	99.0		
6.50		5.17	11.62	99.0	99.9	0.9
6.48		6.43	12.92	100.2		
6.43		6.50	12.86	98.9		
6.44		6.52	13.01	100.8		
6.42		7.82	14.19	99.4	100.4	1.0
6.50		7.62	14.22	101.3		
6.44		7.71	14.20	100.6		

**2.3 黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的溶解度测定** 采用摇瓶法<sup>[8,9]</sup>测定黄芩苷-盐酸小檗碱复合物样品的平衡溶解度。分别将过量的黄芩苷原料药、盐酸小檗碱原料药、黄芩苷-盐酸小檗碱复合物置于 5 mL 离心管中,分别加入不同介质[pH 1.2 的盐酸溶液, pH 6.8, 7.4, 8.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)和水] 4 mL,置于(37 ± 0.1) °C 恒温气浴摇床内,于转速 100 r·min<sup>-1</sup> 平衡 48 h,以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液稀释至一定倍数,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按 2.2.2 项下色谱条件测定药物浓度,计算饱和溶解度,见表 2。

由表 2 可知,黄芩苷-盐酸小檗碱复合物在水和 pH 1.2 介质中的溶解度与原料药的溶解度接近,且显著低于其他 pH 介质组。由于黄芩苷含有羧

表 2 原料药及黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的溶解度测定

Table 2 Determination of solubilities of baicalin and berberine hydrochloride in raw materials and complex

介质	原料药		黄芩苷-盐酸小檗碱复合物	
	黄芩苷	盐酸小檗碱	黄芩苷	盐酸小檗碱
pH 1.2	0.04	0.10	0.05	0.08
pH 6.8	10.70	4.05	0.22 <sup>2)</sup>	2.88 <sup>1)</sup>
pH 7.4	12.03	4.20	0.35 <sup>2)</sup>	2.46 <sup>1)</sup>
pH 8.0	11.84	4.26	0.37 <sup>2)</sup>	2.73 <sup>1)</sup>
水	0.14	2.30	0.24 <sup>1)</sup>	2.37

注:与原料药比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

基<sup>[10]</sup>,酸性条件下解离程度较弱,导致大部分药物为难溶于水的分子状态;当溶液 pH 偏低时,盐酸小檗碱在酸性溶液中失去电子以盐的形式存在,由于特殊的物理性质导致盐酸小檗碱的溶解度极低<sup>[11]</sup>。因此,黄芩苷-盐酸小檗碱复合物在 pH 1.2 的介质中溶解度非常低。当介质 pH 在 6.8 ~ 8 时,该复合物中黄芩苷和盐酸小檗碱的溶解度分别下降了 50, 2 倍左右;复合物在各 pH 介质中的溶解度与水中相近,表明黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的溶解度不受 pH 的影响。因此与单一成分相比,黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的形成导致 2 个成分在多数介质中的溶解度下降。

**2.4 油水分配系数( $P_{o/w}$ )的测定** 精密称取适量黄芩苷原料药、盐酸小檗碱原料药、黄芩苷-盐酸小檗碱复合物适量,用正辛醇饱和的水溶解,于转速 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 8 min,按 2.2.2 项下色谱条件测定上清液中药物浓度( $C$ );精密量取该上清液 20 mL,加入水饱和的正辛醇 20 mL,摇匀,置于气浴摇床振荡(37 °C,100 r·min<sup>-1</sup>)平衡 72 h 后取出静置,分离水层并测定其药物浓度( $C_w$ ),按  $P_{o/w} = (C - C_w)/C_w$  计算<sup>[12]</sup>。结果黄芩苷-盐酸小檗碱复合物中盐酸小檗碱和黄芩苷的  $P_{o/w}$  分别为  $0.399 \pm 0.010$  和  $0.109 \pm 0.022$ ;盐酸小檗碱和黄芩苷原料药的  $P_{o/w}$  分别为  $0.085 \pm 0.006$  和  $0.046 \pm 0.018$ 。说明盐酸小檗碱和黄芩苷在正辛醇-水中的  $P_{o/w}$  均 < 0.1,与其他文献中报道的盐酸小檗碱油水分配系数 0.084<sup>[8]</sup> 和黄芩苷的油水分配系数 0.049<sup>[13]</sup> 接近。将黄芩苷和盐酸小檗碱共煎制备成复合物后,黄芩苷和盐酸小檗碱的油水分配系数分别提高了 2.37 和 4.69 倍。由溶解度试验可知,该复合物在水中的溶解度与原料药差异不显著。因此,所制备的复合物可能是增大了黄芩苷和盐酸小檗碱在正辛醇中的分配程度,从而使二者的  $P_{o/w}$  提高。

### 3 讨论

溶解度与  $P_{o/w}$  是影响药物在胃肠道吸收的 2

个重要因素,但药物溶解于胃肠液及胃肠黏膜是药物吸收的首要前提。因此,研究药物在不同介质中的溶解度差异对了解药物在不同部位吸收情况有重要意义<sup>[14]</sup>。本实验研究结果显示,pH 对黄芩苷和盐酸小檗碱的溶解度影响较大。黄芩苷为弱酸性药物,在碱性条件下溶解度增大<sup>[13]</sup>,但是当 pH 接近 8.0 时,黄芩苷易水解生成苷元黄芩素从而导致黄芩苷的平衡溶解度有所下降<sup>[11]</sup>。酸性环境中,盐酸小檗碱失去电子以盐的形式存在且具有极低的溶解度,随着 pH 的增加,盐酸小檗碱逐渐由盐的形式向氮杂缩醛的形式转变<sup>[8]</sup>,大大提高了溶解度。黄芩苷-盐酸小檗碱复合物的溶解度显著低于 2 个原料药,可能是因为黄芩苷的羧基官能团与盐酸小檗碱的强碱性季氨碱官能团结合在一起,亲水性的羧基和季氨碱存在于复合物的内侧,使黄芩苷和盐酸小檗碱的疏水性部位面向复合物的外侧<sup>[4]</sup>,导致形成的复合物难溶于水<sup>[7]</sup>,提示该复合物可能会因为极低的溶解度而影响其在胃肠道内的吸收。复合物溶解度高度依赖 pH 环境,可以推测该复合物口服后在胃内并未解离或者是仅有少量药物可供吸收,进入肠道后复合物可能会溶解进而在该部位吸收。上述提示复合物可能更适合设计制成口服肠溶制剂,或用于治疗肠道疾病。

本实验结果显示,黄芩苷和盐酸小檗碱在水中的  $\lg P_{o/w}$  分别为 -1.33 和 -1.07,表明黄芩苷和盐酸小檗碱在胃肠道吸收较差,这可能是文献报道黄芩苷<sup>[15]</sup>和盐酸小檗碱<sup>[16]</sup>口服生物利用度低的主要原因之一。将黄芩苷和盐酸小檗碱制备成复合物之后,其  $P_{o/w}$  较单一成分增大,但并没有像 WANG 等<sup>[4]</sup>研究的复合物会使黄芩苷和盐酸小檗碱的  $\lg P_{o/w}$  分别增大 12,20 倍左右,原因可能是因为复合物的制法不同。一般认为  $\lg P_{o/w}$  在 2~3 时,药物在肠道中较易被吸收,而当药物的  $\lg P_{o/w} < 0$  时,则在胃肠道内极其难吸收<sup>[17]</sup>。上述结果提示尽管复合物的  $\lg P_{o/w}$  较原药有所提高,但仍可能无法显著改善药物的生物利用度。因此在制剂设计过程中,复合物的上述特性可能不利于其体内吸收,有必要通过制剂学手段等加以改善。

溶解度和  $P_{o/w}$  的测定可进一步了解黄芩苷-盐酸小檗碱复合物在胃肠道的吸收特性,进而减少剂型设计的盲目性。黄芩苷和盐酸小檗碱共煎形成复合物后,其溶解度和  $P_{o/w}$  发生显著改变,但这种改变对其口服后胃肠道吸收及药物体内行为的影响有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 郝乘仪,李妍,张秀荣. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2008,29(5):295-298.
- [2] 黄志军. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 天津药学,2012,24(3):61-65.
- [3] 王雅芳,李婷,唐正海,等. 中药黄芩的化学成分及药理研究进展[J]. 中华中医药学刊,2015,33(1):206-211.
- [4] WANG J R, Tanaka T, ZHANG H, et al. Formation and conformation of baicalin-berberine and wogonoside-berberine complexes [J]. Chem Pharm Bull, 2012, 60(6):706-711.
- [5] LI Y, XU X. Study on the precipitation reaction between baicalin and berberine by HPLC [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 810(1):165-168.
- [6] 邬玉玉,袁慧雅,陈晓辉,等. 黄连-黄芩药对在泻心汤和葛根苓连汤组方配伍中主要成分的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6):91-95.
- [7] ZHANG C Z, ZHAO R, YAN W Q, et al. Compositions, formation mechanism, and neuroprotective effect of compound precipitation from the traditional chinese prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang [J]. Molecules, 2016, doi:10.3390/molecules21081094.
- [8] 陆秀玲,胡雄彬,向小四,等. pH 值对盐酸小檗碱表观油水分配系数的影响[J]. 中南药学,2011,9(10):748-751.
- [9] 薛璟,贾晓斌,谭晓斌,等. 雷公藤甲素表观油水分配系数的测定及其对吸收预测的研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(20):1560-1563.
- [10] 王弘,陈济民,张清民. 黄芩苷的物化常数测定[J]. 沈阳药科大学学报,2000,17(2):105-106.
- [11] 李朝,夏新华,周宇,等. 黄芩苷的处方前研究[J]. 湖南中医药大学学报,2016,36(7):51-55.
- [12] 陈超,郑珊,胡宇莉,等. pH 值对盐酸小檗碱烷基化衍生物表观油水分配系数的影响[J]. 中兽医杂志,2014(4):11-13.
- [13] 何琳,丁沐淦,卢秀霞,等. 黄芩苷在不同 pH 值缓冲液中理化常数的测定[J]. 西北药学杂志,2012,27(3):208-212.
- [14] Brater D D C. Clinical pharmacology of loop diuretics [J]. Drugs, 1991, 41(3):14-22.
- [15] 谈唯,丁冬梅,张振海,等. 黄芩苷固体分散体的制备及其体外溶出行为考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):12-15.
- [16] 陈颖,杨庆,邹丽娟,等. 黄连生物碱在大鼠在体单向肠灌流模型中的转运特性研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(24):3523-3527.
- [17] 金玉燕,张钧寿,张瑛,等. 西红花苷大鼠小肠吸收研究及油水分配系数的测定[J]. 中国药科大学学报,2004,35(3):283-284.

[责任编辑 刘德文]