

较大时挥发较快，而且与体液环境的差别较大，故最终确定 30% 乙醇-生理盐水作为透皮接收液^[15]。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：1334-1335.

[2] 赵 英. 桂枝茯苓丸治疗妇科病临床研究[J]. 河北中医药学报，2016，31(1)：30-31，47.

[3] 樊 斌. 加味桂枝茯苓丸治疗子宫肌瘤临床疗效分析[J]. 世界最新医学信息文摘，2015，15(79)：178-185.

[4] 韩萌萌，高 岑，宋俊生. 桂枝茯苓丸（胶囊）与激素治疗子宫内膜异位症疗效对比的 Meta 分析[J]. 中国中医急症，2016，25(6)：961-964.

[5] 张彬琴. 浅谈桂枝茯苓丸和艾灸对卵巢囊肿的治疗[J]. 世界最新医学信息文摘，2015，15(2)：127-128.

[6] 石凤娟，张素娟，谢爱华. 慢性盆腔炎采用桂枝茯苓丸治疗的临床研究[J]. 中医临床研究，2016，8(16)：57-58.

[7] 张 丹. 桂枝茯苓复方有效部位制备及其质量控制研究[D]. 郑州：河南中医学院，2009.

[8] 周小凤，杨中林，李 萍，等. 不同纯度苦杏仁苷巴布剂的透皮吸收比较研究[J]. 药学与临床研究，2008，16(4)：285-287.

[9] 卢晓阳，蒋小红，梁文权. 不同透皮促进剂及基质对黄体酮透皮作用的影响[J]. 中国医院药学杂志，2000，20(10)：582-584.

[10] 王 曦. 透皮吸收促进剂的临床应用研究[J]. 湖北中医杂志，2011，33(3)：52-53.

[11] 吴素香，石森林，葛卫红，等. 桂枝茯苓丸有效成分与物质组的溶出相关性[J]. 中成药，2016，38(11)：2360-2365.

[12] 冷 静，傅超美，邹 亮. 中药经皮给药制剂的研究进展[J]. 成都大学学报（自然科学版），2008，27(3)：183-186，218.

[13] 梁秉文，叶祖光. 中药经皮给药制剂技术[M]. 北京：化学工业出版社，2006：81.

[14] 李 燕，赵利刚，彭宏峰，等. 罗替戈汀压敏胶分散型贴剂的制备及质量评价[J]. 中国医药工业杂志，2015，46(6)：601-605.

[15] 原素敏，倪 健. 脉炎宁透皮贴剂成型工艺及体外透皮释放研究[J]. 中国中药杂志，2009，34(13)：1654-1657.

黄芩苷-小檗碱复合物的形成规律

雷艳丽¹， 孙 磊¹， 隋 宏^{1,2,3}， 王文苹^{1,2,3*}

(1. 宁夏医科大学药学院，宁夏 银川 750004；2. 宁夏医科大学，宁夏回药现代化工程技术研究中心，宁夏 银川 750004；3. 宁夏医科大学，回医药现代化教育部重点实验室，宁夏 银川 750004)

摘要：目的 研究黄芩苷-小檗碱复合物的形成规律。**方法** 在不同黄芩苷和小檗碱比例、加热方法、介质（pH、离子强度）的条件下，HPLC 法测定共煎沉淀的产量和组成。**结果** 当黄芩苷、小檗碱用量分别为 0.5、1 g 时，沉淀量最高。加热温度升高、pH 近中性（6.8）、葡萄糖加入均有利于沉淀生成，而 NaCl 加入则恰好相反。**结论** 黄芩苷-小檗碱复合物的产量和组成主要受加热温度、添加剂的影响。

关键词：黄芩苷-小檗碱复合物；共煎沉淀；HPLC

中图分类号：R284 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2018)03-0577-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.013

Formation rules of baicalin-berberine complex

LEI Yan-li¹， SUN Lei¹， SUI Hong^{1,2,3}， WANG Wen-ping^{1,2,3*}

(1. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ningxia Engineering and Technology Research Center for Modernization of Hui Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory for Hui Ethnic Medicine Modernization, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

收稿日期：2017-05-16
基金项目：宁夏自然科学基金资助项目（NZ14090）
作者简介：雷艳丽（1992—），女，硕士生，研究方向为中、回药物质基础及新产品开发。E-mail：912567436@qq.com
* **通信作者：**王文苹（1977—），女，博士，教授，从事新型载药材料及给药系统研究。Tel：（0951）6880581，E-mail：784490228@qq.com

ABSTRACT: AIM To study the formation rules of baicalin-berberine complex. **METHODS** Under the conditions of different ratios of baicalin to berberine, heating methods and media (pH, ionic strength), the yield and composition of mixed decoction precipitation were determined by HPLC. **RESULTS** 0.5 g Baicalin and 1 g berberine produced the highest amount of precipitation. Higher heating temperature, nearly neutral pH (6.8) and glucose addition were beneficial to precipitate generation, in sharp contrast to NaCl addition. **CONCLUSION** The yield and composition of baicalin-berberine complex are mainly influenced by heating temperature and additives.

KEY WORDS: baicalin-berberine complex; mixed decoction precipitation; HPLC

黄芩-黄连为清热燥湿配伍的经典药对^[1-2], 两者皆属苦寒之品, 入手阳明大肠经, 功效清热燥湿、泻火解毒, 常相须为用, 临床用于急性肠炎、细菌性痢疾、急性胃炎、慢性萎缩性胃炎、牙痛、糖尿病等^[3-4]。但黄芩、黄连共煎会产生大量絮状沉淀^[5], 其原因可能是黄连中的小檗碱型生物碱与黄芩中的黄芩苷等多酚类酸性化合物结合, 从而生成了相对分子质量较大的水不溶物^[6], 而且为两者的络合物^[7]。有研究表明, 黄芩苷、小檗碱共煎同样会产生黄色絮状沉淀^[5,7], 故本实验以这2种成分为研究对象, 通过考察不同配比、加热方法、介质条件对沉淀物形成的影响, 旨在阐明黄芩苷-小檗碱复合物的形成规律, 并优化其制备工艺。

1 材料与仪器

盐酸小檗碱原料药(95%, 陕西凯达生物医药科技有限公司, 141208); 黄芩苷原料药(90%, 南京景竹生物科技有限公司, JZ20131026); 葡萄糖(分析纯, 烟台市双双化工有限公司, 20131017); 氯化钠(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂, 20130221); 透析袋(MD34, 8 000~14 000 Da, 北京索莱宝科技有限公司)。甲醇、乙腈、二氯甲烷均为色谱纯, 购自美国Fisher公司; 实验用水均为超纯水。ABS210S电子天平(德国Sartorius公司); QL-861涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); KQ-500E超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司); HH-2数显恒温水浴锅(金坛市顺华仪器有限公司); TDL-40B离心机(上海安亭科学仪器厂); FD-1C冷冻干燥机(北京德天佑仪器有限公司); Agilent 1220 Series高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Milli-Q超纯水处理系统(美国Millipore公司)。

2 方法与结果

2.1 复合物制备 分别称取一定量黄芩苷和小檗碱装入透析袋中, 加入6 mL水分散, 扎紧袋口,

置于加入300 mL水的烧杯中, 密封, 于一定温度下加热一段时间后放冷至室温, 4 000 r/min离心5 min, 分离上清液与沉淀, 沉淀物加入少量蒸馏水反复洗涤2~3次, 真空冷冻干燥24 h, 即得。

2.2 黄芩苷、小檗碱配比及用量对共煎沉淀的影响 固定黄芩苷用量为0.5 g, 分别与0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g小檗碱于80℃下磁力搅拌加热5 h, 观察沉淀产生情况, 并分别测定最终溶液及所得沉淀中两者含有量变化, 结果见图1。

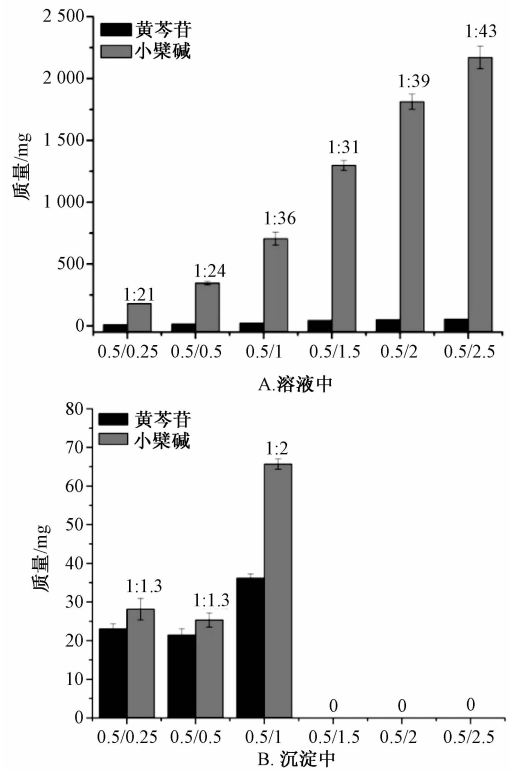


图1 黄芩苷与小檗碱配伍比例对共煎沉淀的影响 (n=3)
Fig. 1 Effect of baicalin-berberine compatibility ratio on mixed decoction precipitation (n=3)

由图可知, 随着黄芩苷和小檗碱配伍比例的增加, 共煎液中后者含有量显著提高。配伍比例在0.5/0.25~0.5/1之间时, 两者摩尔比随着其增加而增大(1:21~1:36); 在0.5/0.25~0.5/0.5之间时, 两者摩尔比均为1:1.3; 当小檗碱继续

增加至 1 g 时, 所得沉淀量最大 (101.93 mg), 此时沉淀中两者摩尔比为 1 : 2, 煎液中为 1 : 36, 并且继续增加时未能形成沉淀。

然后, 控制黄芩苷与小檗碱的质量比为 1 : 1, 考察两者用量分别为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g, 其余步骤同上, 结果见图 2。

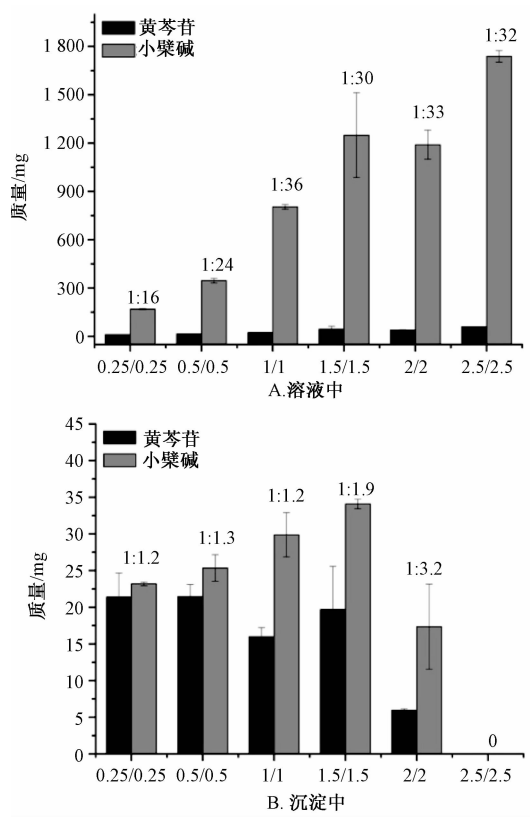


图 2 黄芩苷与小檗碱用量对共煎沉淀的影响 (n=3)
Fig. 2 Effects of baicalin and berberine amounts on mixed decoction precipitation (n=3)

由图可知, 共煎液中黄芩苷和小檗碱的含有量随着两者总投料量的增加而逐渐升高, 并且两者摩尔比不断发生变化。用量比在 0.25/0.25 ~ 1/1 之间时, 复合物中两者摩尔比为 1 : 1.2 或 1 : 1.3, 未发生较大变化; 用量继续增加至 1.5 g 时, 沉淀量最大 (53.78 mg), 此时沉淀中两者摩尔比为 1 : 1.9, 煎液中为 1 : 30; 进一步增加两者用量时, 其摩尔比增加到 1 : 3.2, 沉淀量开始下降直至未能形成。

综上所述, 该复合物形成过程较复杂, 沉淀反应与两者的配伍比例 (即用量) 有很大关系, 尤其是两者比例在 1 : 1、1 : 2 时, 复合物得率明显偏高, 此时两者摩尔比接近 1 : 2。因此, 本实验选择黄芩苷 0.5 g、小檗碱 1 g 作为最佳配伍用量。

2.3 加热方法对共煎沉淀的影响 固定黄芩苷、

小檗碱用量分别为 0.5、1.0 g, 分别考察两者在 40、80 ℃ 磁力搅拌和 100 ℃ 煮沸时沉淀的产生情况及其随时间的变化规律, 结果见图 3 ~ 6。

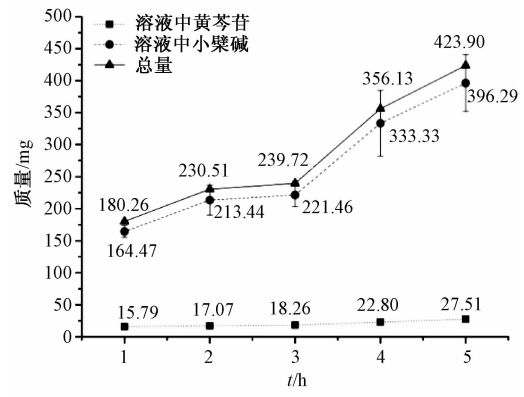


图 3 40 ℃ 超声对共煎沉淀的影响 (n=3)
Fig. 3 Effect of 40 °C ultrasound on mixed decoction precipitation (n=3)

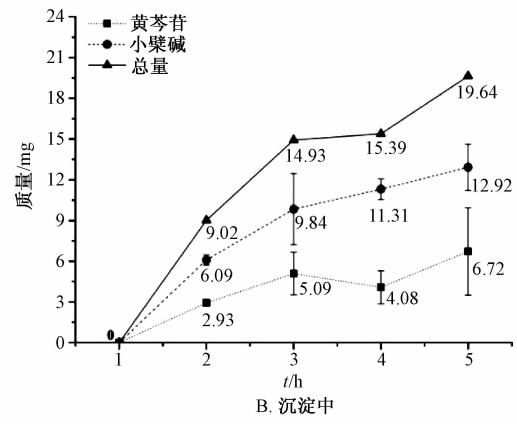
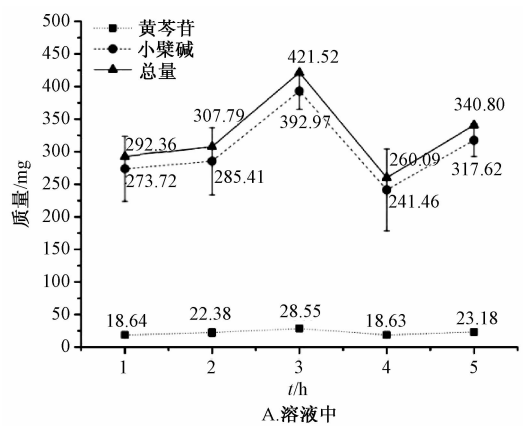


图 4 80 ℃ 磁力搅拌对共煎沉淀的影响 (n=3)
Fig. 4 Effect of 80 °C magnetic stirring on mixed decoction precipitation (n=3)

由图 3 可知, 40 ℃ 超声处理时, 随着加热时间延长共煎液中黄芩苷和小檗碱的含有量逐渐增加; 处理 4、5 h 时, 两药含有量增加更为显著, 但均未能形成复合物。因此, 该方法不适宜作为复

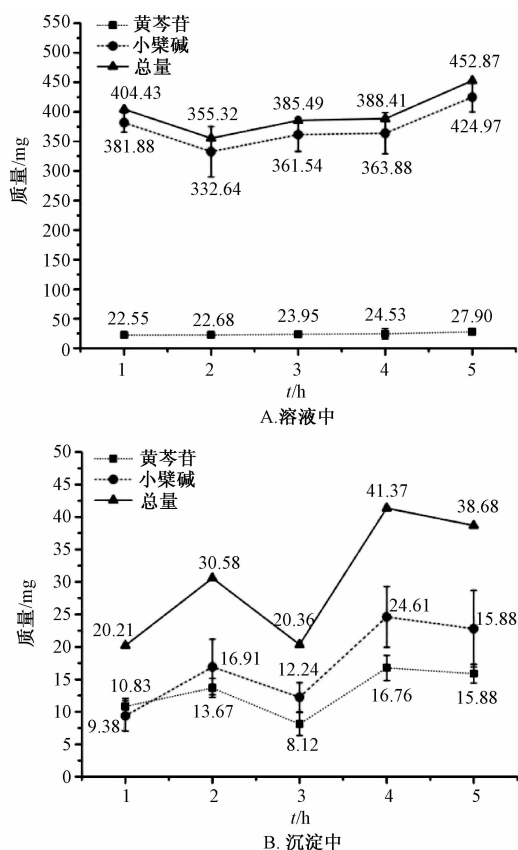


图5 100 °C煮沸对共煎沉淀的影响 ($n=3$)

Fig. 5 Effect of 100 °C boiling on mixed decoction precipitation ($n=3$)

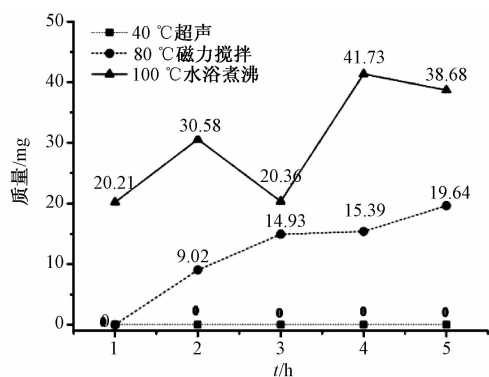


图6 不同加热方法对共煎沉淀的影响 ($n=3$)

Fig. 6 Effects of different heating methods on mixed decoction precipitation ($n=3$)

合物制备的处理方法。

由图4可知,80 °C磁力搅拌处理时,随着时间延长共煎液中黄芩苷和小檗碱的含有量不断变化;处理3 h内时,两者含有量逐渐递增;处理4 h时,两者含有量突然下降,小檗碱更为明显;继续处理时,两者含有量又开始提高。同时,复合物的得率随着搅拌时间延长逐渐增大,当处理5 h

时沉淀最多(19.64 mg),分别由6.72 mg黄芩苷和12.92 mg小檗碱组成。因此,选择80 °C磁力搅拌制备复合物时,需要注意调控加热时间,以便获得产量较高的复合物。

由图5可知,100 °C煮沸处理时,随着时间延长共煎液中黄芩苷和小檗碱的含有量先降低后逐渐增大,沉淀中则无明显规律;处理4 h时,复合物产量最大;处理5 h后,沉淀量又开始略微下降。以上结果显示,100 °C煮沸制备复合物时,沉淀的生成是一个动态过程,随着加热时间的变化可能会导致沉淀发生部分复溶的现象,从而使得其生成量随时间波动,并在某一时刻突然下降。

由图6可知,沉淀产量随着温度升高而增大,其主要原因可能是由于黄芩苷和小檗碱的溶解为吸热过程,而其沉淀为放热过程^[5],加热温度越高,越有利于两者溶解,从而易于产生更多难溶于水的沉淀。因此,制备复合物的加热方法确定为100 °C煮沸。

2.4 pH对共煎沉淀的影响 固定黄芩苷、小檗碱用量分别为0.5、1.0 g,分别考察两者在pH 1.2、6.8、7.4、8.0下100 °C煮沸2 h时沉淀的产生情况,结果见图7。

由图可知,共煎沉淀受pH影响较大;pH在1.2时,无共煎沉淀产生;在6.8时,沉淀量最高(97.83 mg);pH进一步增大时,沉淀产量开始减少。同时,pH对黄芩苷和小檗碱含有量的影响不明显,当pH为8.0时,煎液中小檗碱含有量明显增加。以上结果显示,过酸环境难以产生沉淀,或者沉淀物在酸性环境下被溶解^[5,8],这可能是因为当小檗碱遇到少量酸时,可促进部分醇胺型、醛型结构转变成碱性较强的季铵型,产生OH⁻以中和酸中的H⁺,生成由酸根离子直接与季铵离子结合的盐^[9]。因此,pH 6.8更有利于沉淀形成,此时沉淀组成为黄芩苷:小檗碱摩尔比1:1.9。

2.5 NaCl浓度对共煎沉淀的影响 固定黄芩苷、小檗碱用量分别为0.5、1.0 g,分别考察两者在氯化钠浓度0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L条件下100 °C煮沸4 h时沉淀的产生情况,结果见图8。

将NaCl加入煎液中后,并未出现黄色絮状沉淀物,而是黄色针状沉淀物,而且随着离子强度的增加其产量显著提高,但黄芩苷和小檗碱含有量随着氯化钠浓度提高无明显变化。由于小檗碱带有正电荷^[10],加入NaCl后在共煎液盐析的同时也提供了氯离子,可能促使盐酸小檗碱结晶析出,从而无

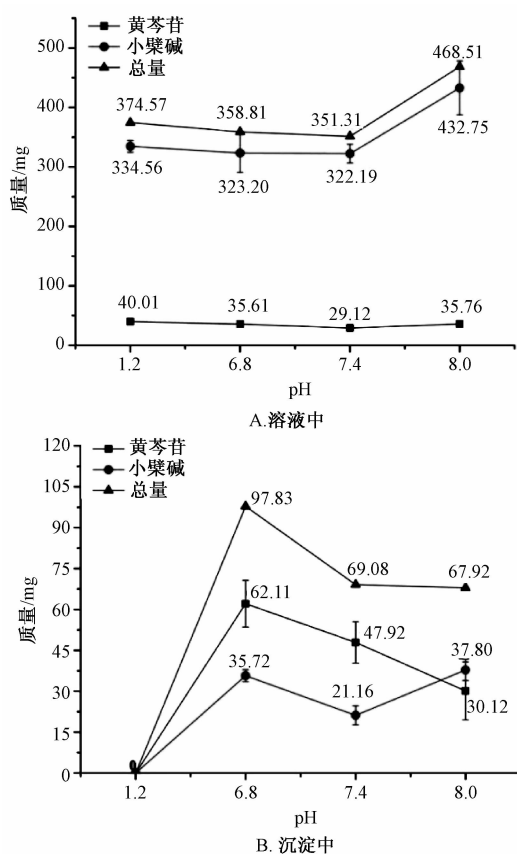


图7 不同 pH 值对共煎沉淀的影响 ($n=3$)
Fig. 7 Effects of different pH values on mixed decoction precipitation ($n=3$)

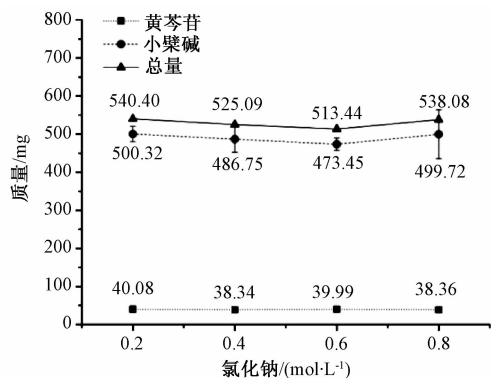


图8 不同 NaCl 浓度对共煎沉淀的影响 ($n=3$)
Fig. 8 Effects of different NaCl concentrations on mixed decoction precipitation ($n=3$)

法形成复合物。

2.6 葡萄糖浓度对共煎沉淀的影响 固定黄芩苷、小檗碱用量分别为 0.5、1.0 g，分别考察两者在葡萄糖浓度 3%、4%、5%、6% 条件下 100 ℃ 煮沸 4 h 时沉淀的产生情况，结果见图 9。

由图可知，随着葡萄糖浓度增加，黄芩苷和小檗碱含量在煎液中的变化不明显，但是共煎沉淀

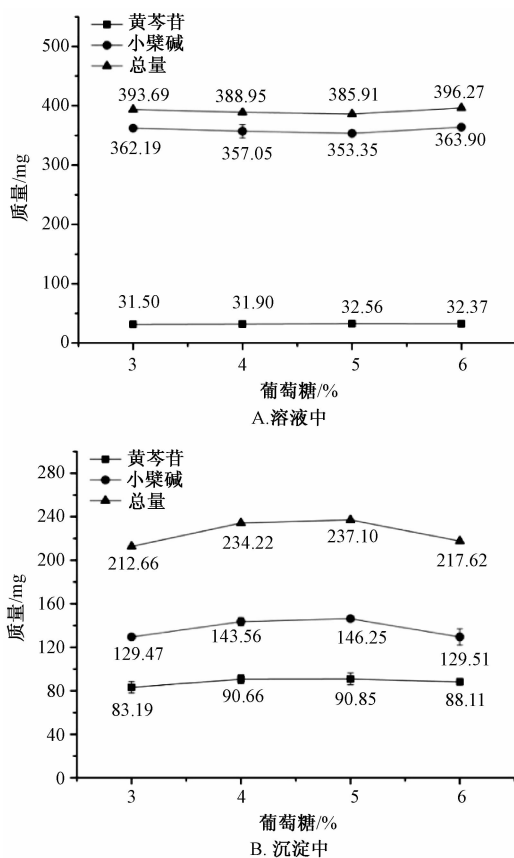


图9 不同葡萄糖浓度对共煎沉淀的影响 ($n=3$)

Fig. 9 Effects of different glucose concentrations on mixed decoction precipitation ($n=3$)

生成量显著提高 2~3 倍；当浓度达到 5% 时，沉淀生成量最多 (237.10 mg)，此时两者摩尔比为 1:1.8；继续增加浓度，沉淀生成量反而开始下降，此时两者摩尔比 1:1.6。由此推测，随着葡萄糖浓度的提高，分子间氢键减少，而分子内氢键增加^[11]，可能会增加黄芩苷和小檗碱的结合位点^[12]，从而生成大量沉淀物。

3 讨论

3.1 黄芩苷-小檗碱复合物的形成机制 实验结果显示，当煎液中小檗碱和黄芩苷达到一定浓度时，将发生分子间相互作用，进而析出沉淀，随着两者用量变化，复合物摩尔比也随之发生变化，得率最大时黄芩苷与小檗碱的摩尔比为 1:2。研究发现，小檗碱会与某些化合物通过非共价键形成胶体粒子^[13-14]，而且摩尔比均为 2:1。另外，小檗碱具有较强的非共价键^[6]，从而介导静电作用和 $\pi-\pi^*$ 堆叠，导致复合物再次结合未结合的位点，从而形成水不溶性复合物，然后聚集、形成沉淀，可以推测黄芩苷和小檗碱由于这种作用将形成一种难溶于水的复合物，导致溶液中两者平衡状态被破坏，使

得其溶出率增加。

3.2 黄芩苷-小檗碱复合物的影响因素 尽管影响沉淀生成的因素很多,但配伍比例和用量是最直接的。在本实验中黄芩苷与小檗碱用量比为 1 : 0.5 ~ 1 : 2 时均有沉淀产生,超过此比例则未能形成沉淀,主要是因为不同比例的配伍导致两者的溶出量不同^[15],从而影响沉淀物的形成及产量,当两者超出一定浓度范围时则无法形成沉淀。基于葡萄糖显著增加沉淀产量的作用,最终将沉淀反应的煎液条件设定为 5% 葡萄糖溶液。由于共煎后不能立即观察到沉淀物^[5],因此还应注意放置时间和放置温度对其的影响。

参考文献:

[1] 陈维华. 试论黄连的对药配伍应用[J]. 中医药临床杂志, 2005(5): 506-508.

[2] 王 付. 仲景方黄连药对研究与应用[J]. 中医药通报, 2007, 6(5): 28-29.

[3] Liu S Z, Deng Y X, Chen B, *et al.* Antihyperglycemic effect of the traditional Chinese scutellaria-coptis herb couple and its main components in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(2): 490-498.

[4] Tong X L, Zhao L H, Lian F M, *et al.* Clinical observations on the dose-effect relationship of Gegen Qin Lian Decoction on 54 out-patients with type 2 diabetes [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 31(1): 56-59.

[5] Yi L, 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] 乔善义,郭继芬,张瑞萍,等. 黄连与黄芩共煎之沉淀物的 ESI MS/MS 和 CSI MS 分析 [C] //中国有机质谱学第十三届全国学术大会论文集. 广州:《分析测试学报》编辑部, 2005.

[7] Wang J R, Tanaka T, Zhang H, *et al.* Formation and conformation of baicalin-berberine and wogonoside-berberine complexes[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2012, 60(6): 706-711.

[8] 乔 梁,彭嘉柔,濮训生,等. 黄连-黄芩药对煎煮液沉淀物的分析[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(6): 352-353.

[9] 张振巍,张娜娜,李月梅. 黄芩、黄连配伍前后的主要化学成分含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 58-62.

[10] 裴妙荣,宣春生,段秀俊,等. 酸碱对药所含酸碱性成分共煎形成复合物的结构研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3054-3059.

[11] 陈 聪,李维仲,宋永臣,等. 葡萄糖水溶液氢键结构和动力分析[J]. 物理化学学报, 2011, 27(6): 1372-1378.

[12] 黄 芸,崔力剑,陈 晨,等. 黄芩素及黄芩苷与牛血清白蛋白结合作用比较研究及葡萄糖的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 754-758.

[13] Patel A R, Seijen-ten-Hoorn J, Heussen P C, *et al.* Straight forward preparation of organic colloidal particles by harnessing spontaneous non-covalent interactions of active molecules from natural origin[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2012, 374(1): 150-156.

[14] Patel A R, Drost E, Adel R D, *et al.* Temperature responsive colloidal particles from non-covalently interacting small molecular weight natural bioactive molecules[J]. *Soft Matter*, 2012, 8: 3515-3517.

[15] 胡律江,赵晓娟,胡志方,等. 黄连与黄芩配伍时主要有效成分溶出率变化规律研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(4): 613-615.