

论 著
(药学研究)

复方黄连灌肠液总生物碱含量测定研究

倪晓霞, 刘晓玲, 杨育儒, 王庆芬

【摘要】 目的 研究并建立复方黄连灌肠液中总生物碱含量测定方法。**方法** 采用柱色谱-紫外可见分光光度法,以盐酸小檗碱为对照品,采用盐酸-甲醇(1:100)水浴加热回流提取法提取,提取液用中性氧化铝进行液-固萃取净化处理,于 345 nm 处测定其含量。**结果** 盐酸小檗碱在 1.616~19.392 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内线性关系良好($r=0.999\ 98$),平均加样回收率 100.86%、RSD 为 1.852%($n=6$)。**结论** 柱色谱-紫外分光光度法简便、快速、稳定可靠,适用于复方黄连灌肠液总生物碱的含量测定。

【关键词】 复方黄连灌肠液;柱色谱-紫外可见分光光度法;总生物碱;含量测定

【中图分类号】 R917.74 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)01-0041-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.01.009

Optimization of determination for total alkaloids in compound Huanglian clysis

NI Xiao-xia, LIU Xiao-ling, YANG Yu-ru, WANG Qing-fen

(The Pharmacy Department, the 909th Hospital of PLA/the Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian, China)

【Abstract】 Objective To establish a method for the determination of the content of total alkaloids in compound Huanglian clysis. **Methods** The sample was extracted with HCl-CH₃OH(1:100) in water bath heating reflux extraction and total alkaloids were separated on an alumina column. The content of total alkaloids was determined by column chromatography-uv spectrophotometry at the detection wavelength of 345nm with berberine was used as the standard. **Results** A good linear relationship was observed in the concentration range of 1.616–19.392 $\mu\text{g/mL}$ for berberine ($r=0.999\ 98$), and the average recovery rate was 100.86% with RSD of 1.852% ($n=6$). **Conclusion** The method was simple, fast, stable and reliable, and it was proved to be applicable for the determination of the content of total alkaloids in compound Huanglian clysis.

【Key words】 compound Huanglian clysis; column chromatogram-UV spectrophotometry; total alkaloids; content determination

0 引言

复方黄连灌肠液是我院消化内科协定处方制成的复方中药灌肠液,临床上用于治疗溃疡性结肠炎,效果显著。组方由黄连、白头翁、黄芩、甘草、山药等 13 味中药组成,方中君药黄连、白头翁及其他多味中药均含有生物碱类物质。现代药理学研究表明,生物碱类物质

具有多种生物活性^[1-4],是重要有效成分,且生物碱含量与其作用功效之间存在正相关的量效关系。目前,总生物碱含量测定常用酸性染料比色法^[5-6]与紫外分光光度法,但酸性染料比色法,操作繁琐,干扰因素多,重现性与结果准确性有待考量^[7]。复方黄连灌肠液中总生物碱测定方法未见报道,为加强制剂质量控制,确保临床用药安全,本文参考有关文献^[5-11],建立柱色谱-紫外可见分光光度法测定复方黄连灌肠液中总生物碱含量,现报道如下。

1 仪器与试剂

紫外可见分光光度计(UV-2550,岛津-苏州),

基金项目:解放军第 175 医院青年苗圃课题项目(16Y025)

作者单位:363000 漳州,解放军联勤保障部队第九〇九医院/厦门大学附属东南医院制剂科(倪晓霞、刘晓玲、杨育儒、王庆芬)

电子分析天平(AUW120D,岛津-日本),华美冷柜(SY-176,杭州华美电冰箱厂),数控超声波清洗器(KQ-250DB 型,昆山市超声仪器有限公司)。

盐酸小檗碱对照品(贵州迪大生物科技有限责任公司,批号:633-65-8);盐酸、甲醇、无水乙醇、乙腈、95%乙醇等均购自西陇化工股份有限公司,试剂均为分析纯;水为纯化水;复方黄连灌肠液(本院自制,批号:20190828、20190829、20190830)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 精密称取盐酸小檗碱对照品 0.0101 g,置于 25 mL 量瓶中,加适量盐酸-甲醇(1:100)溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 0.404 mg/mL 的对照品储备液。精密量取对照品储备液 5.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,加 0.05 mol/L 硫酸溶液溶解并稀释至刻度,即得 80.8 μg/mL 的盐酸小檗碱对照品溶液。

2.2 提取方法考察

2.2.1 直接提取法 精密称取复方黄连灌肠液 5.0 mL(批号:20190828、20190829、20190830),每批次平行 3 份,置于 50 mL 量瓶中,加盐酸-甲醇(1:100)溶液定容,摇匀,静置 1.0 h,过滤,精密量取上述滤液 5.0 mL,置中性氧化铝柱上,用 0.05 mol/L 硫酸溶液洗脱并定容至 25 mL,摇匀,即得直接提取法供试液,精密量取供试液 3.0 mL 于 25 mL 量瓶中,用 0.05 mol/L 硫酸溶液稀释至刻度,摇匀,以 0.05 mol/L 硫酸溶液为参比,于 345 nm 测定吸光度,见表 1。

2.2.2 超声提取法 精密称取复方黄连灌肠液 5.0 mL(批号:20190828、20190829、20190830),每批次平行 3 份,置于 100 mL 烧杯中,加盐酸-甲醇(1:100)溶液 40 mL,超声 1 h(超声功率 250 W),过滤,滤液转移至 50 mL 量瓶中,用盐酸-甲醇(1:100)溶液定容,精密量取上述滤液 5.0 mL,置中性氧化铝柱上,用 0.05 mol/L 硫酸溶液洗脱并定容至 25 mL,摇匀,即得超声提取法供试液,供试液按“2.2.1”项下方法测定吸光度,见表 1。

2.2.3 水浴加热回流提取法 精密称取复方黄连灌肠液 5.0 mL(批号:20190828、20190829、20190830),每批次平行 3 份,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加盐酸-甲醇(1:100)溶液 40 mL,水浴加热回流 1 h,冷却至室温,过滤,滤液用盐酸-甲醇(1:100)

溶液定容至 50 mL,精密量取上述滤液 5 mL,置中性氧化铝柱上,用 0.05 mol/L 硫酸溶液洗脱并定容至 25 mL,摇匀,即得水浴加热提取法供试液,供试液按“2.2.1”项下方法测定吸光度,见表 1。

表 1 复方黄连灌肠液总生物碱提取方法考察结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

批号	A 值		
	直接提取法	超声提取法	水浴加热回流提取法
20190828	0.3607±0.023	0.4083±0.033	0.5357±0.053 *
20190829	0.3267±0.042	0.4183±0.043	0.4617±0.032 *
20190830	0.3047±0.013	0.3957±0.023	0.4413±0.002 *

与超声提取法比较, * $P<0.05$

结果表明,3 批复方黄连灌肠液的供试液,超声提取法与水浴加热回流提取法的吸光度值明显高于直接提取法,且与超声提取法比较,水浴加热回流提取法供试液的吸光度差异具有统计学意义($P<0.05$)。综合考虑选择水浴加热回流提取法作为供试液总生物碱的提取方法。

2.3 提取方法优化

2.3.1 提取溶剂考察 精密称取复方黄连灌肠液 5.0 mL(批号:20190828),置于 250 mL 圆底烧瓶中,分别加入 1% 盐酸溶液、乙腈-1% 乙酸溶液(80:20)、65% 乙醇溶液、85% 乙醇溶液及盐酸-甲醇(1:100)溶液 40 mL,编号 1 至 5 组,每组平行 3 份,水浴加热回流 1 h,冷却至室温,过滤,滤液用相应溶剂容至 50 mL,分别精密量取上述滤液 5 mL,置中性氧化铝柱上,用 0.05 mol/L 硫酸溶液洗脱并定容至 25 mL,摇匀,即得各组供试液,供试液按“2.2.1”项下方法测定吸光度,平行测定 3 次,以平均吸光度为纵轴做图,见图 1a。图谱提示,第 1 组、第 5 组供试液的吸光度大于其他溶剂提取组,且第 5 组(盐酸-甲醇(1:100)溶液)显著高于第 1 组。

2.3.2 提取时间考察 精密称取复方黄连灌肠液 5.0 mL(批号:20190828),置于 250 mL 圆底烧瓶中,分别加入盐酸-甲醇(1:100)溶液 40 mL,分别水浴加热回流 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,每组平行 3 份,冷却至室温,过滤,滤液用盐酸-甲醇(1:100)溶液定容至 50 mL,分别精密量取上述滤液 5 mL,置中性氧化铝柱上,用 0.05 mol/L 硫酸溶液洗脱并定容至 25 mL,摇匀,即得各组供试液,供试液按“2.2.1”项下方法测定吸光度,平行测定 3 次,以平均吸光度为纵轴做图,见图 1b。图谱提示,提取时间为 1.5 h

时,供试液吸光度值最大。

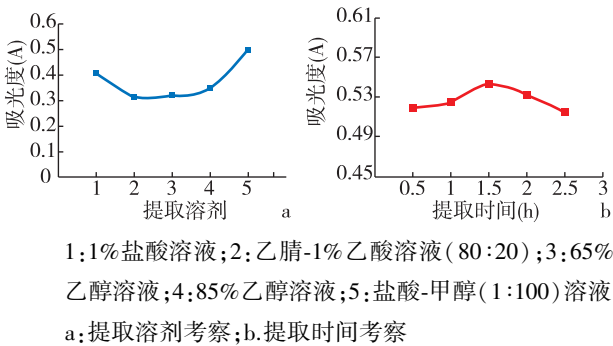


图1 复方黄连灌肠液提取方法优化考察结果

2.4 供试品溶液制备方法 结合上述实验结果,综合考虑实验过程的高效性与经济效益,最终确定供试品溶液的制备方法:精密称取复方黄连灌肠液 5.0 mL,置于 250 mL 圆底烧瓶中,加盐酸-甲醇(1:100)溶液 40 mL,水浴加热回流 1.5 h,冷却至室温,过滤,滤液用盐酸-甲醇(1:100)溶液定容至 50 mL,精密量取上述滤液 5 mL,置中性氧化铝柱上,用 0.05 mol/L 硫酸溶液洗脱并定容至 25 mL,摇匀,即得。

2.5 含量测定方法建立与方法学验证

2.5.1 最佳吸收波长选择 分别精密量取对照品溶液 3.0 mL、供试品溶液 5.0 mL (批号:20190828),置于 25 mL 量瓶中,用 0.05 mol/L 硫酸溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,以 0.05 mol/L 硫酸溶液为空白,于 200~600 nm 范围内扫描,见图 2。图示盐酸小檗碱对照品溶液在 345 nm 处有吸收峰;而供试品溶液的吸收峰略微红移在 335 nm 处,综合考虑,最后确定以 345 nm 为测定波长。

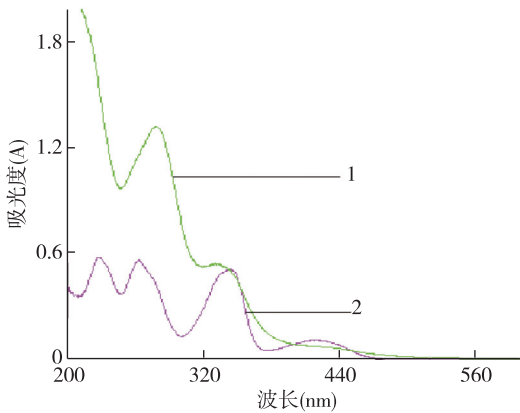


图2 复方黄连灌肠液紫外吸收光谱图

2.5.2 线性与回归方程 分别精密量取盐酸小檗碱对照溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,

置于 25 mL 量瓶中,用 0.05 mol/L 硫酸溶液定容至刻度,制备系列浓度对照品溶液;以 0.05 mol/L 硫酸溶液为参比溶液,于 345 nm 处波长处测定吸光度,以浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标绘制标准曲线。计算得回归方程为: $Y=0.17902X+0.0071(r=0.999\ 98)$,表明盐酸小檗碱对照品浓度在 1.616~19.392 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度之间呈现良好的线性关系。

2.5.3 精密度试验 精密称取盐酸小檗碱对照品溶液 3.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,平行 6 份,用 0.05 mol/L 硫酸溶液定容至刻度,并以 0.05 mol/L 硫酸溶液为参比,于 345 nm 处测定吸光度,以吸光度计算相对标准差(RSD),结果 RSD 为 0.364% ($n=6$),表明精密度良好,见表 2。

2.5.4 重复性试验 取同一批复方黄连灌肠液(批号:20190828),按“2.4”项下方法制备供试品溶液 6 份,分别精密称取供试品溶液 3.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,用 0.05 mol/L 硫酸溶液定容,并以 0.05 mol/L 硫酸溶液为参比,于 345 nm 处测定吸光度,以吸光度计算 RSD%,结果 RSD 为 0.389% ($n=6$),表明供试品重复性良好,见表 2。

2.5.5 稳定性试验 精密量取供试品溶液(批号:20190828)3.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,按“2.5.4”项下方法测定,每隔 10 min 测定 1 次,以吸光度计算 RSD 为 1.044% ($n=6$),供试品溶液在 60 min 内稳定,见表 2。

表2 复方黄连灌肠液中总生物碱含量测定方法精密度、重复性、稳定性试验结果($n=6$)

项目	吸光度(A)							RSD (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
精密度	0.375	0.374	0.377	0.373	0.374	0.375	0.375	0.364
重复性	0.497	0.498	0.497	0.499	0.500	0.502	0.499	0.389
稳定性	0.502	0.503	0.506	0.504	0.507	0.504	0.504	0.369

2.5.6 加样回收率试验 取同一批复方黄连灌肠液(批号:20190828,总生物碱含量为 3.554 4 mg/mL)3.0 mL,置于 250 mL 圆底烧瓶中,分别加入盐酸小檗碱对照品溶液(0.948 mg/mL)9.0 mL,按“2.4”项下方法制备加样回收试验供试品溶液,平行制备 6 份,分别精密量取上述加样回收试验供试品溶液 3.0 mL,按“2.5.4”项下方法测定,结果得平均回收率为 100.86%,RSD 为 1.852% ($n=6$),见表 3。

表 3 总生物碱含量测定方法加样回收率实验结果 ($n=6$)

样品取样量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
10.6632	8.532	19.1285	99.22		
10.6632	8.532	19.1791	99.81		
10.6632	8.532	19.4993	103.56	100.86	1.852
10.6632	8.532	19.2802	101.00		
10.6632	8.532	19.4150	102.58		
10.6632	8.532	19.1117	99.02		

2.6 复方黄连灌肠液总生物碱含量测定 取复方黄连灌肠液按“2.4”项下方法制备供试品溶液 3 批 (批号:20190828、20190829、20190830),分别精密量取供试品溶液 3.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,0.05 mol/L 硫酸溶液稀释至刻度,摇匀,以 0.05 mol/L 硫酸溶液为参比,于 345 nm 测定吸光度,外标法计算总生物碱含量,见表 4。

表 4 复方黄连灌肠液中总生物碱含量测定结果 ($n=3$)

批号	总生物碱 (mg/mL)	平均值 (mg/mL)	RSD (%)
	3.5589		
20190828	3.5841	3.5544	0.9071
	3.5201		
	3.3860		
20190929	3.3580	3.3453	1.4427
	3.2920		
	3.2810		
20190830	3.2910	3.2877	0.1756

3 讨 论

生物碱是存在于植物中具有最为显著活性的效部位成分具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗心血管疾病等作用^[16]。目前的文献报道多是研究植物药材中总生物碱的提取与质量控制^[7-9,12-15],对于富含生物碱的制剂成品研究报道较少^[16-17],本研究建立柱色谱-紫外分光光度法测定复方黄连灌肠液中总生物碱含量的方法,并根据 2015 版《中国药典》对所建立的方法进行方法学验证,该方法具有简便快速、准确可靠等优点,可以作为复方黄连灌肠液中总生物碱含量测定及质量控制提供依据。

本研究参考有关文献,考察采用总生物碱提取常用的直接静置、超声以及水浴回流等方法提取复方黄连灌肠液中总生物碱,结果表明水浴回流提取法,提取比较完全,紫外吸收度值高于其他两种方法;再经过预实验确定进一步优化考察 5 种提取溶剂和 5 个回流时间后,综合考虑提取效果,最终确定

提取方法为以盐酸-甲醇(1:100)溶液为溶剂水浴加热回流 1.5 h。

本研究考察最佳吸收波长时,盐酸小檗碱对照品溶液在 228、263、345 nm 处有吸收峰,而供试品溶液在 279、335 nm 处有强吸收,考虑是供试品溶液中其他成分对吸收峰位移的影响,并且在 345 nm 处供试品的吸收处于肩峰的位置,且波峰基线较平稳,峰形较好,最后确定 345 nm 为测定波长。

【参考文献】

- [1] 陈祥云,彭财英,卢 健,等.小檗碱类中草药总生物碱的提取工艺及其药理研究进展[J].江西中医药,2019,49(9):68-72.
- [2] 邢 宇,刘 鑫,林 园,等.小檗碱药理作用及其临床应用研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2017,31(6):491-502.
- [3] 罗小金.异钩藤碱对阿尔茨海默病及其他中枢神经系统疾病的药理作用研究进展[J].医学研究生学报,2015,28(10):1112-1115.
- [4] 陈 醒,骆雨璇,王 楠.镰形棘豆总生物碱抗肿瘤活性部位的体外筛选[J].东南国防医药,2017,19(1):37-41.
- [5] 蓝 松.酸性染料比色法测定黄柏中总生物碱的含量[J].广东化工,2018,45(24):37-38,49.
- [6] 边甜甜,司昕蕾,牛江涛,等.花椒及不同炮制品挥发油与总生物碱的比较研究[J].时珍国医国药,2018,12(29):2937-2939.
- [7] 张耀洲,李 娟,杨 俊,等.紫外分光光度法测定细叶十大功劳叶中总生物碱含量[J].黑龙江畜牧兽医,2017(6):288-289,292,300.
- [8] 莫家祺,王茂盛,李 艳,等.紫外分光光度法测定藏药小檗皮中总生物碱的含量[J].成都中医药大学学报,2017,40(4):27-29.
- [9] 蓝 松.柱色谱-紫外分光光度法测定黄柏中总生物碱的含量[J].广东化工,2017,44(24):89-90.
- [10] 王 宁,郝盛源,柳志诚,等.苦木注射液总生物碱及苦木酮含量测定研究[J].烟台大学学报(自然科学与工程版),2018,31(1):31-37.
- [11] 罗 兰.柱色谱-紫外分光光度法测定黄连上清片中总生物碱的含量[J].海峡药学,2013,25(7):83-84.
- [12] 李 航,李小芳,李 娜,等.星点设计-效应面法优化黄连提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(14):52-55.
- [13] 蒲忠慧,苏海国,王 力,等.正交试验法优选川芎总生物碱的提取工艺[J].成都中医药大学学报,2017,40(2):20-24.
- [14] 季晓娟,刘 杰,赵泳波.钩藤茎枝不同药用部位总生物碱的含量分析[J].临床合理用药,2018,11(3A):50-51.
- [15] 文喜艳,王兰霞,邵 晶.甘肃产藏药绿绒蒿中总黄酮和总生物碱的含量测定[J].安徽农业科学,2017,45(29):134-138.
- [16] 赖曼娜,林汝秀,钟 鸣.Box-Behnken 设计优化金线莲总生物碱提取工艺研究[J].中药材,2017,40(8):1910-1913.
- [17] 冯沼润,何先元,欧阳凯,等.响应面法优化天葵子总生物碱提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J].中药新药与临床药理,2018,29(2):199-204.

(收稿日期:2019-12-11; 修回日期:2020-02-10)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕煜烽)