

妇科再造丸的体外溶出度测定^Δ

郑晓霞*, 徐 剑#, 田洪星, 胡 蝶, 刘 慧(贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002)

中图分类号 R283.6;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)18-2497-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.18.12

摘要 目的:建立测定妇科再造丸体外溶出度的方法。方法:采用高效液相色谱法测定制剂中黄芩苷和橙皮苷的含量,色谱柱为WondaSil-C₁₈,流动相为0.2%甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL;采用桨法测定制剂的累积溶出度,溶出介质为磷酸盐缓冲液(pH 6.8),转速为100 r/min,温度为(37±0.5)℃,取样量为2 mL。结果:黄芩苷和橙皮苷检测质量浓度线性范围分别为6.936~23.12 μg/mL($r=0.999\ 8$)、0.620~3.10 μg/mL($r=0.999\ 0$);定量限分别为4.624、0.620 μg/mL,检测限分别为2.312、0.155 μg/mL;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率分别为95.28%~99.22%(RSD=0.97%, $n=9$)、96.10%~99.84%(RSD=1.98%, $n=9$)。样品中黄芩苷和橙皮苷10 h时的平均累积溶出度分别为(97.10±0.09)%、(78.50±0.08)%;溶出63.2%所需时间(T_{63})分别为(1.88±0.12)、(3.26±0.10)h,溶出50%所需时间(T_{50})分别为(0.88±0.09)、(1.67±0.14)h。结论:该方法操作简便、准确,可用于妇科再造丸的体外溶出度测定。

关键词 妇科再造丸;桨法;体外溶出度

Detection on *in vitro* Dissolution of Fuke Zaizao Pills

ZHENG Xiaoxia, XU Jian, TIAN Hongxing, HU Die, LIU Hui(Pharmacy of College, Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of *in vitro* dissolution of Fuke zaizao pills. METHODS: HPLC method was adopted to determine the contents of baicalin and hesperidin in preparation. The determination was performed on WondaSil-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.2% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 280 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. The dissolution of the preparation was determined by paddle method using phosphate buffer solution (pH 6.8) as dissolution medium with rotate speed of 100 r/min, temperature was (37±0.5)℃, sample size was 2 mL. RESULTS: The linear range of baicalin and hesperidin

- [17] FREITAG MT, MÁRTON G, PAJER K, et al. Monitoring of short-term erythropoietin therapy in rats with acute spinal cord injury using manganese-enhanced magnetic resonance imaging[J]. *J Neuroimaging*, 2015, 25(4):582-589.
- [18] BOUZAT P, MILLET A, BOUE Y, et al. Changes in brain tissue oxygenation after treatment of diffuse traumatic brain injury by erythropoietin[J]. *Crit Care Med*, 2013, 41(5):1316-1324.
- [19] NAKKA VP, GUSAIN A, MEHTA SL, et al. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities[J]. *Mol Neurobiol*, 2008, 37(1):7-38.
- [20] PLESNILA N, ZHU C, CULMSEE C, et al. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(4):458-466.
- [21] CAO G, XING J, XIAO X, et al. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(35):9278-9293.
- [22] CHIARUGI A. Poly (ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The "suicide hypothesis" revisited[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23(3):122-129.
- [23] MOUBARAK RS, YUSTE VJ, ARTUS C, et al. Sequential activation of poly (ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(13):4844-4862.
- [24] KOKAWA K, SHIKONE T, OTANI T, et al. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix[J]. *Cancer*, 2015, 85(8):1799-1809.
- [25] ZHANG T, TIAN F, WANG J, et al. Atherosclerosis-associated endothelial cell apoptosis by MiR-429-mediated down regulation of Bcl-2[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4):1421-1430.

Δ 基金项目:国家苗药工程技术研究中心组建项目(No.2014FU125Q09);贵州省科学技术基金项目(No.黔科合LH字[2014]7332号);贵州省普通高等学校工程研究中心项目(No.黔教合KY字[2014]22号);贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目(No.黔科合人字[2015]23号);贵州省普通高等学校特色重点实验室建设项目(No.黔教合KY字[2016]005)

* 硕士研究生。研究方向:中药、民族药的新剂型及新制剂。E-mail:935122907@qq.com

通信作者:教授。研究方向:中药、民族药的新剂型及新制剂。E-mail:10423108@qq.com

(收稿日期:2018-01-19 修回日期:2018-08-02)
(编辑:段思怡)

were 6.936-23.12 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 8$) and 0.620-3.10 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 0$), respectively. Limits of quantitation were 4.624, 0.620 $\mu\text{g/mL}$, limits of detection were 2.312, 0.155 $\mu\text{g/mL}$, respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2%; the recoveries were 95.28% -99.22% (RSD=0.97%, $n=9$) and 96.10% -99.84% (RSD=1.98%, $n=9$), respectively. The accumulative dissolution rates of baicalin and hesperidin in sample were (97.10 \pm 0.09)% and (78.50 \pm 0.08)% at 10 h, respectively. T_b were (1.88 \pm 0.12), (3.26 \pm 0.10)h, T_{50} were (0.88 \pm 0.09), (1.67 \pm 0.14)h, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the determination of *in vitro* dissolution of Fuke zaizao pills.

KEYWORDS Fuke zaizao pill; Paddle method; *in vitro* dissolution rate

妇科再造丸主要由当归、白芍、地黄、益母草、阿胶、杜仲等42味中药材组合而成,可养血调经、补益肝肾、暖宫止痛,在临床上常用于治疗月经不调等妇科慢性病。近年来研究表明,妇科再造丸对子宫肌瘤^[1-2]、乳腺增生、黄褐斑、不孕、妇科炎症复发^[3]等有一定的改善效果,并且还黑色素细胞的生长具有一定的抑制作用^[4-6]。目前,评价中药口服固体制剂质量的方法主要是体外溶出度试验,其不仅可用于指导处方筛选和产品开发以获得最佳处方、制剂工艺和剂型,还可用于评价中药口服固体制剂的体内生物利用度。妇科再造丸现行质量标准相关研究尚不全面,仅有个别药材的薄层鉴别^[7-8]、显微鉴定^[9]及少数成分的含量测定^[10-12],尚无溶出度测定的研究。因此,有必要建立符合妇科再造丸特点的溶出度测定方法。本试验以黄芩苷、橙皮苷为指标成分,以不同溶出介质模拟体内环境,优选妇科再造丸的最佳溶出介质,并考察该制剂中上述指标成分的体外溶出特征,旨在为提高和完善其质量标准提供借鉴。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪,包括紫外检测器等(美国Agilent公司);SK8200型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司);AE240型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);JA2003型电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司);TGL-16C型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);RC-3型溶出度测试仪(天津市国铭医药设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

妇科再造丸(贵阳德昌祥药业有限公司,批准文号:国药准字Z20025056,批号:20111247,规格:0.26 g/丸);黄芩苷对照品(批号:H-016-140729,纯度:99.9%)、橙皮苷对照品(批号:C-006-140728,纯度:99.9%)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:WondaSil-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.2%甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~22 min, 2% B \rightarrow 20% B; 22~30 min, 20% B \rightarrow 28% B; 30~36 min, 28% B \rightarrow 35% B);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 缓冲液 制备磷酸盐缓冲液(pH 6.8)^[13],室温静置,备用。

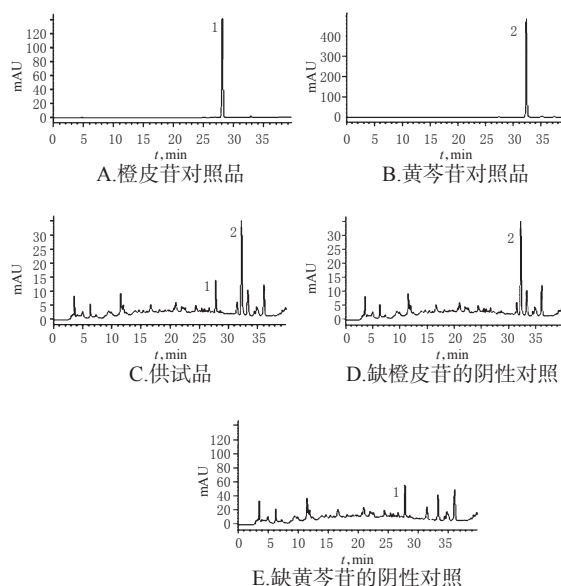
2.2.2 对照品溶液 精密称取黄芩苷对照品、橙皮苷对照品各适量,分别置于25 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得单一对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取不同时间点的溶出液各适量,以10 000 r/min离心10 min,上清液经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液 按妇科再造丸处方和工艺分别制备缺黄芩或陈皮的阴性样品,并按“2.2.3”项下方法制成各自阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下对照品溶液和供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。结果,理论板数按黄芩苷、橙皮苷峰计均不低于3 000;基线分离良好,分离度均大于1.5。



注:1.橙皮苷;2.黄芩苷

Note: 1. hesperidin; 2. baicalin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 专属性试验

取“2.2”项下对照品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。结果,阴性对照在与黄芩苷、橙皮苷对照品保留时间相同处无干扰峰,表明本方法专属性良好。

2.5 线性关系考察

分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液各适量,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,制成黄芩苷质量浓度为6.936、9.248、11.560、13.872、18.496、23.120 $\mu\text{g/mL}$,橙皮苷质量浓度为0.155、0.31、0.62、0.93、1.24、1.55、1.86、2.48、3.10 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各10 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以黄芩苷和橙皮苷质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得黄芩苷和橙皮苷回归方程分别为 $y=17.426x-11.563(r=0.9998)$ 、 $y=189.51x-1.3156(r=0.9990)$ 。结果表明,黄芩苷和橙皮苷检测质量浓度线性范围分别为6.936~23.12、0.620~3.10 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液各适量,倍比稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限与检测限^[13]。结果,黄芩苷和橙皮苷的定量限分别为4.624、0.620 $\mu\text{g/mL}$,检测限分别为2.312、0.155 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,黄芩苷和橙皮苷峰面积的RSD分别为1.20%、0.51% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芩苷和橙皮苷峰面积的RSD分别为0.20%、0.30% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.9 重复性试验

精密称取样品适量,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,黄芩苷和橙皮苷含量平均值分别为0.9、5.0 $\mu\text{g/mL}$,RSD分别为0.17%、0.30% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的样品9份,每份1 g,分别加入低、中、高质量浓度的待测成分对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

2.11 溶出度测定

2.11.1 溶出介质考察 按2015年版《中国药典》(四部)通则“溶出度与释放度测定法”项下浆法^[13]进行操作,选择4种经超声(功率:250 W,频率:40 kHz)脱气处理的不同溶出介质[磷酸盐缓冲液(pH 6.8)、蒸馏水、人工胃液、人工肠液]^[13],转速为100 r/min,温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,分别于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 h时取样2 mL,并补加等

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回 收率, %	RSD, %
黄芩苷	0.90	1.08	1.93	95.56	97.65	0.97
	0.90	1.08	1.93	95.65		
	0.90	1.08	1.93	95.28		
	0.90	0.90	1.79	98.89		
	0.90	0.90	1.79	99.22		
	0.90	0.90	1.79	98.56		
	0.90	0.72	1.61	98.33		
	0.90	0.72	1.61	98.75		
	0.90	0.72	1.61	98.47		
	橙皮苷	5.18	6.22	11.39		
5.18		6.22	11.31	98.60		
5.18		6.22	11.23	97.27		
5.16		5.16	10.20	97.69		
5.20		5.16	10.19	96.71		
5.16		5.16	10.20	97.75		
5.18		4.13	9.24	98.31		
5.16		4.13	9.22	98.26		
5.16		4.13	9.13	96.10		

量同温溶出介质,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定黄芩苷和橙皮苷在不同溶出介质中各取样时间点的含量,并计算累积溶出度:累积溶出度= $(\rho_1+\rho_2+\dots+\rho_n+\rho_{n+1})V_{\text{取}}/(\rho_0V_{\text{总}})$ (式中, ρ_n 为第 n 个取样时间点的质量浓度, $V_{\text{总}}$ 为溶出体积, $V_{\text{取}}$ 为取样体积, ρ_0 为取样前溶液的质量浓度),结果见图2。

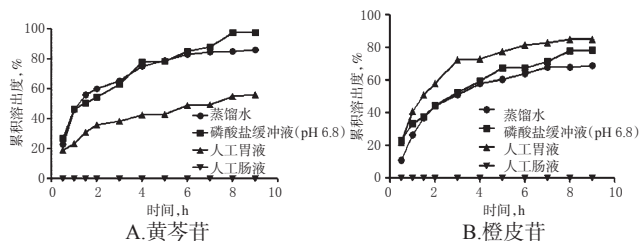


图2 黄芩苷、橙皮苷在不同溶出介质中各取样时间点的累积溶出度

Fig 2 Cumulative dissolution of baicalin and hesperidin at different sampling points in different dissolution media

由图2可知,黄芩苷和橙皮苷在人工肠液中未被检出,而在磷酸盐缓冲液(pH 6.8)中的总体累积溶出度最大,因此,确定磷酸盐缓冲液(pH 6.8)为样品的溶出介质。

2.11.2 样品溶出度测定 称取样品6份,每份约为2.6 g(1次给药剂量),按2015年版《中国药典》(四部)通则“溶出度与释放度测定法”项下浆法^[13]进行操作,溶出介质为磷酸盐缓冲液(pH 6.8),转速为100 r/min,温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,分别于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 h时取样2 mL,并补加等量同温溶出介质,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行操作6次,记录峰面积,计算样品含量并计算平均累积溶出度,结果见表2。

表2 取样样品不同取样时间点的平均累积溶出度($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Average cumulative dissolution of sampling at different time points($\bar{x} \pm s, n=6$)

时间, h	平均累积溶出度, %	
	黄芩苷	橙皮苷
1	46.35 ± 0.09	33.24 ± 0.05
2	50.41 ± 0.11	37.09 ± 0.11
3	54.27 ± 0.13	44.54 ± 0.12
4	63.03 ± 0.09	52.57 ± 0.14
5	77.84 ± 0.10	59.46 ± 0.05
6	78.21 ± 0.08	67.39 ± 0.11
7	84.77 ± 0.08	67.25 ± 0.09
8	87.67 ± 0.10	71.20 ± 0.09
9	97.10 ± 0.12	78.05 ± 0.06
10	97.10 ± 0.09	78.50 ± 0.08

2.11.3 样品体外溶出动力学分析 将样品中黄芩苷和橙皮苷的平均累积溶出度数据分别以零级动力学、一级动力学、Weibull、Higuchi、Retger-peppas 模型进行拟合^[14-15], 结果见表3(表中, Q 为平均累积溶出度, t 为取样时间)。

表3 样品中黄芩苷和橙皮苷的体外溶出动力学模型拟合效果

Tab 3 Kinetic mode of *in vitro* dissolution fitting of baicalin and hesperidin in sample

拟合模型	黄芩苷		橙皮苷	
	回归方程	r	回归方程	r
零级动力学	$Q=6.66t+48.06$	0.954 5	$Q=5.65t+38.30$	0.949 6
一级动力学	$\ln(1-Q)=0.5t+0.01$	0.964 6	$\ln(1-Q)=0.16t-0.40$	0.984 3
Weibull	$\ln[1/(1-Q)]=0.7\ln t-0.36$	0.953 1	$\ln[1/(1-Q)]=0.55\ln t-0.65$	0.994 7
Higuchi	$Q=26.1t_{0.5}-26.13$	0.983 7	$Q=22.30t_{0.5}+19.39$	0.985 2
Retger-peppas	$\ln Q=0.31\ln t+3.95$	0.986 6	$\ln Q=0.34\ln t+3.7$	0.993 1

由表3可知, 样品中黄芩苷和橙皮苷的体外溶出动力学均符合 Weibull 模型, 将所得数据带入回归方程进行计算, 得黄芩苷和橙皮苷溶出 63.2% 所需时间(T_b)分别为(1.88 ± 0.12)、(3.26 ± 0.10)h; 溶出 50% 所需时间(T_{50})分别为(0.88 ± 0.09)、(1.67 ± 0.14)h。

3 讨论

影响口服固体制剂溶出度的因素有溶出方法、转速及溶出介质等, 因此, 预试验中笔者考察了样品在不同方法(桨法、篮法)、不同转速(50、75、100、125 r/min)、不同溶出介质[蒸馏水、磷酸盐缓冲液(pH 6.8)、人工胃液、人工肠液]条件下的溶出情况。结果表明, 在桨法、转速 100 r/min、磷酸盐缓冲液(pH 6.8)条件下, 样品中黄芩苷和橙皮苷的溶出度最佳; 而在人工肠液中未检出上述成分, 可能是由于两种成分在其中不稳定造成的。

通过对样品体外溶出度的测定发现, 以黄芩苷和橙

皮苷为指标成分的妇科再造丸的体外溶出动力学符合 Weibull 模型。此结论可为该药在体内的生物利用度评价提供一定参考。

综上所述, 该方法操作简便、准确, 可用于妇科再造丸的体外溶出度测定。

参考文献

- [1] 赵燕. 妇科再造丸对 E₂、P 负荷诱导实验性大鼠子宫肌瘤的抑制作用[J]. 吉林医学, 2016, 37(10): 2395-2396.
- [2] 胡颖, 罗俊, 黄能慧. 妇科再造丸对子宫肌瘤模型大鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4427-4429.
- [3] 胡颖, 罗俊, 李玲, 等. 妇科再造丸镇痛、抗炎、止血作用的实验研究[J]. 贵阳医学院学报, 2005, 30(5): 406-409.
- [4] 张晴, 罗俊, 黄能慧. 妇科再造丸对体外酪氨酸酶活性的抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 862-863.
- [5] 张晴, 罗俊, 黄能慧. 妇科再造丸含药血清对体外培养人黑色素细胞的抑制作用[J]. 中草药, 2008, 39(4): 577-579.
- [6] 张晴, 罗俊, 黄能慧. 妇科再造丸对中波紫外线照射所致豚鼠皮肤色素沉着的抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 556-557.
- [7] 李零, 郝小燕, 肖海涛, 等. 妇科再造丸中地榆指标性成分的确定及薄层鉴别[J]. 贵阳医学院学报, 2006, 31(1): 61-63.
- [8] 肖海涛, 郝小燕, 梁妍, 等. 妇科再造丸中五味药材的薄层鉴别[J]. 中成药, 2006, 28(12): 1861-1863.
- [9] 王世清, 郑芸. 妇科再造丸的显微鉴定研究[J]. 中成药, 2003, 25(12): 1026-1028.
- [10] 舒柯, 裴玲, 廖敏, 等. HPLC 测定妇科再造丸中黄芩苷的含量[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(14): 22-23.
- [11] 李谦, 肖海涛, 郝小燕. 高效液相色谱法测定妇科再造丸中黄芩苷的含量[J]. 贵阳医学院学报, 2006, 31(2): 146-147.
- [12] 王颖, 肖海涛, 郝小燕. 妇科再造丸挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 数理医药学杂志, 2006, 19(6): 632-633.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 121-124, 263, 325.
- [14] 石婷婷, 葛卫红, 陈立兵, 等. HPLC 法考察五子衍宗丸物质组释放特征[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(1): 64-66.
- [15] 叶英响, 陈焯, 翁夏蒙, 等. 不同类型六味地黄丸的物质组释放动力学特征及其可视化表征[J]. 中草药, 2017, 48(21): 4425-4431.

(收稿日期: 2017-12-07 修回日期: 2018-03-19)

(编辑: 张 静)