

吸波面积-HPLC 结合法测定白花蛇舌草组分胶囊中 整体和个体成分溶出度

胡悦, 赖宏强, 范哲贤, 姜梦丽, 李孝栋*
(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

[摘要] 目的:建立吸波面积-HPLC 结合法测定白花蛇舌草组分胶囊中整体和个体成分溶出度的方法。方法:以含0.5% 十二烷基硫酸钠的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质,转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,采用紫外-可见分光光度法和 HPLC 对混合药物及个体成分进行含量测定,比较测定结果的差异。结果:在 120 min 时,吸波面积法测得整体混合药物的累积溶出率 74.72%, HPLC 测得槲皮素、齐墩果酸和豆甾醇在同等时间段的累积溶出率分别为 77.16%, 82.78%, 71.70%;吸波面积法与 HPLC 计算的累积溶出量分别为 104.61, 102.25 mg。结论:2 种方法具有较好的一致性,吸波面积-HPLC 结合法可用于白花蛇舌草组分胶囊中整体和个体药物成分溶出度的测试,为其他复方制剂中不同药物成分的溶出度研究提供借鉴。

[关键词] 吸波面积法; 白花蛇舌草; 组分胶囊; 溶出度; 槲皮素; 齐墩果酸; 豆甾醇

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0004-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140004

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150527.1021.001.html>

[网络出版时间] 2015-05-27 10:21

Dissolution of Total Composition and Individual Material in Components Capsules of *Hedyotis diffusa* by Combination of Area Under Absorbance-wavelength Curve and HPLC HU Yue, LAI Hong-qiang, FAN Zhe-xian, JIANG Meng-li, LI Xiao-dong* (College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining dissolution of total composition and individual material in components capsules of *Hedyotis diffusa* by combination of area under absorbance-wavelength curve (AUAWC) and high performance liquid chromatography (HPLC). **Method:** Dissolution medium was pH 6.8 phosphate buffer containing 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) with a rotation speed of $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. Total composition and individual material was respectively analyzed by UV-Vis spectrophotometry and HPLC for content determination, data were compared scientifically. **Result:** Cumulative dissolution of total composition at 120 min by AUAWC was 74.72%, cumulative dissolution of quercetin, oleanolic acid and stigmasterol by HPLC at the same time was 77.16%, 82.78% and 71.70%, respectively. Final dissolution quantity of total composition by AUAWC and total quantity of three individual drugs by HPLC were 104.61 mg and 102.25 mg, respectively. **Conclusion:** Data under two methods have a good consistency. Combination of AUAWC and HPLC can be used for dissolution test of total composition and individual ingredient from components capsule, which will provide a good instruction for dissolution of different components from other preparations.

[Key words] area under absorbance-wavelength curve; *Hedyotis diffusa*; component capsules; dissolution; quercetin; oleanolic acid; stigmasterol

[收稿日期] 20141127(014)

[基金项目] 福建省科技平台建设项目(2010Y2004)

[第一作者] 胡悦,在读硕士,从事中药制剂与质量控制研究, Tel:18860131537, E-mail:247132703@qq.com

[通讯作者] *李孝栋,博士,教授,硕士生导师,从事中药物质基础、药物制剂及其药代动力学的研究, Tel:0591-22861135, E-mail:lxdtcm@163.com

白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* 的干燥或新鲜全草,主要有效成分有槲皮素等黄酮类、齐墩果酸等三萜皂苷类、豆甾醇等甾醇类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、增强免疫功能等作用^[1-3],临床常作为治疗肝癌及保肝护肝的药物或辅助药物^[4-5]。白花蛇舌草组分胶囊为本实验室自制,由槲皮素、齐墩果酸、豆甾醇 3 个化合物以一定比例组成,每粒胶囊含药物总量 0.14 g。

吸波面积法 (area under the absorbance-wavelength curve, AUAWC) 是将紫外-可见分光光度法在一定波长范围扫描所得的吸波面积与总药物浓度成线性关系的思路应用于体内外总药物含量测定的研究,对复方药物溶出度及体内药动学的研究具有指导意义。在前期研究基础上^[6-10],结合 AUAWC 与高效液相色谱法 (HPLC) 测定白花蛇舌草组分胶囊中槲皮素、齐墩果酸、豆甾醇 3 种成分的混合药物和各自单一成分的溶出度累积释放行为,开展整体和个体药物累积溶出率的比较,为中药复方制剂的体外溶出度及其体内外相关性评价研究提供参考,为白花蛇舌草组分胶囊的新药研制提供理论依据。

1 材料

Rcz-6C1 型药物溶出度仪 (上海黄海药检仪器厂), LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司), TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司), FA604A 型电子天平 (上海精天电子仪器有限公司)。白花蛇舌草组分胶囊 (自制,批号 20141021), 槲皮素、齐墩果酸、豆甾醇原料药 (西安小草植物科技公司,批号分别为 20130926, 20140312, 20131210), 槲皮素、齐墩果酸对照品 (中国食品药品检定研究院,批号分别为 100081-200406, 110709-200306), 豆甾醇对照品 (北京世纪奥科生物技术有限公司,批号 MUST-11030901), 甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 介质的配制 称取磷酸二氢钠 38.0 g, 磷酸氢二钠 5.04 g, 加水溶解并定容至 1 L, 加入十二烷基硫酸钠 (SDS) 5 g, 加热溶解, 用磷酸调 pH, 得含 0.5% SDS 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)。

2.2 溶出条件及供试品溶液制备 根据《中国药典》2010 年版二部 X C 项下溶出度测定法中的第一法 (转篮法), 以含 0.5% SDS 的磷酸盐缓冲液为溶出介质。取白花蛇舌草组分胶囊 6 粒放入沉降篮, 每杯放 1 粒胶囊, 沉入杯底后开始搅拌计时, 转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 分别于第 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min

定时取样 10 mL, 补充等体积等温度的溶出介质, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 溶液的制备 分别精密称取槲皮素、齐墩果酸及豆甾醇对照品 0.1, 0.3, 2.6 mg, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 得混合药物质量浓度 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。取空胶囊壳 1 粒代替白花蛇舌草组分胶囊, 按 2.2 项下方法制备空白溶液^[11-13]。

2.4 吸波面积法

2.4.1 标准曲线的制备 精密吸取混合对照品溶液 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 4 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用溶出介质溶解并定容, 得系列混合对照品溶液。以溶出介质为参比, 于 200 ~ 600 nm 全波长扫描, 以吸光度-波长曲线下面积为纵坐标, 混合药物质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 0.648X + 9.709$ ($r = 0.9995$), 线性范围 0.6 ~ 24 μg 。

2.4.2 精密度 将 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合对照品溶液, 于 200 ~ 600 nm 进行全波长扫描 6 次, 将数据导入 Origin 软件计算吸光度-波长曲线下面积的 RSD 0.3%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性 取同一批白花蛇舌草组分胶囊同一时间点 (20 min) 供试品溶液 6 份, 同法进行全波长扫描, 将数据导入 Origin 软件计算吸光度-波长曲线下面积的 RSD 1.0%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性 精密吸取 90 min 的供试品溶液, 分别于放置 0, 2, 4, 6, 8, 20 h 后在 200 ~ 600 nm 进行全波长扫描, 将数据导入 Origin 软件计算吸光度-波长曲线下面积的 RSD 2.1%, 表明该供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率 精密吸取 20 min 供试品溶液 6 份, 每份 2 mL, 各精密加入 $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合对照品溶液 2 mL, 进行全波长扫描, 将数据导入 Origin 软件计算吸光度-波长曲线下面积, 结果平均回收率 98.11%, RSD 1.9%。

2.4.6 溶出度试验^[14-16] 取白花蛇舌草组分胶囊 6 粒, 按 2.2 项下方法处理, 得不同时间段 (10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min) 的 6 组供试品溶液, 以 2.3 项下空白溶液作参比, 在 200 ~ 600 nm 进行全波长扫描, 将数据导入 Origin 软件拟合并计算累积溶出率分别为 10.50%, 27.55%, 44.35%, 57.57%, 66.16%, 71.70%。

2.5 高效液相色谱法

2.5.1 色谱条件 Vision HT C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, $5 \mu\text{m}$), 槲皮素、齐墩果酸和豆甾醇的流动

相分别为甲醇-0.5%磷酸水溶液(55:45),甲醇-0.5%磷酸水溶液(88:12),100%甲醇;检测波长均为210 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量20 μL。

2.5.2 标准曲线的制备 精密吸取2.2项下混合对照品0.1,0.25,0.5,1,3,4 mL,分别置于10 mL量瓶中,用溶出介质稀释并定容,得系列对照品溶液。按2.5.1项下条件检测,以各药物质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得槲皮素、齐墩果酸及豆甾醇的标准曲线分别为 $Y = 58\ 045X - 7\ 838.5$ ($r = 0.999\ 2$), $Y = 4\ 971.8X + 9\ 591.1$ ($r = 0.999\ 6$), $Y = 3\ 981X + 2\ 621.3$ ($r = 0.999\ 5$),线性范围依次为0.002~0.08,0.006~0.24,0.052~2.08 μg。

2.5.3 精密度 将2 mg·L⁻¹槲皮素对照品溶液按2.5.1项下条件平行进样6次,计算峰面积的RSD 1.7%,表明仪器精密度良好。

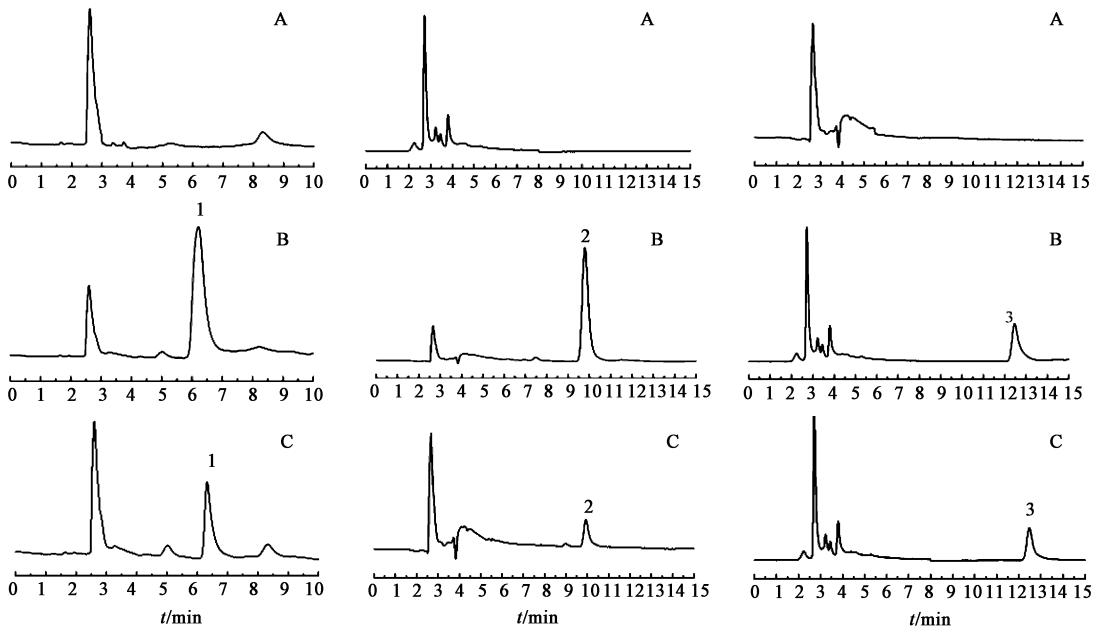
2.5.4 重复性试验 取同一批白花蛇舌草组分胶囊同一时间点(30 min)供试品溶液6份,按2.5.1项下条件测定,计算槲皮素、齐墩果酸及豆甾醇峰面积的RSD分别为1.4%,2.1%,1.7%,表明该方法

重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于制备后0,2,4,6,8,20 h按2.5.1项下条件检测,计算槲皮素、齐墩果酸及豆甾醇峰面积的RSD分别为2.6%,2.2%,2.0%,表明供试品溶液在20 h内稳定。

2.5.6 加样回收率试验 精密吸取60 min供试品溶液6份,每份0.5 mL,各精密加入4 mg·L⁻¹槲皮素对照品溶液0.5 mL,按2.5.1项下条件测定,计算平均加样回收率99.6%,RSD 2.7%。精密吸取60 min供试品溶液6份,每份0.5 mL,各精密加入6 mg·L⁻¹齐墩果酸对照品溶液0.5 mL,同法计算平均加样回收率98.7%,RSD 3.6%。精密吸取120 min供试品溶液6份,每份0.5 mL,各精密加入104 mg·L⁻¹豆甾醇对照品溶液0.5 mL,同法计算平均加样回收率99.2%,RSD 0.6%。表明该方法具有良好的回收率。

2.5.7 溶出度试验 取白花蛇舌草组分胶囊6粒,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.5.1项下条件检测,见图1。绘制溶出曲线,见图2。



A. 空白胶囊;B. 对照品;C. 供试品;1. 槲皮素;2. 齐墩果酸;3. 豆甾醇

图1 白花蛇舌草组分胶囊 HPLC

Fig.1 HPLC chromatograms of components capsules of *Hedyotis diffusa*

2.6 数据分析 将吸波面积法与HPLC计算的累积溶出量进行比较,见表1。结果发现混合药物、槲皮素、齐墩果酸、豆甾醇在120 min内的累积溶出率分别为74.72%,77.16%,82.78%,71.70%;吸波面积法计算的累积溶出量与HPLC的相近,表明2

种方法具有较好的一致性。

3 讨论

溶出度是评价口服固体剂质量的一种重要参数,槲皮素、齐墩果酸和豆甾醇3种成分均为难溶性药物,预试验测得整体药物在0.9%盐酸溶液中几

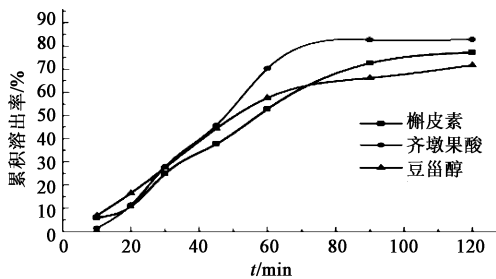


图 2 白花蛇舌草组分胶囊的累积溶出曲线

Fig. 2 Accumulation dissolution curves of components capsules of *Hedyotis diffusa*

表 1 不同方法测得白花蛇舌草组分胶囊中有效成分的累积溶出量

Table 1 Accumulation dissolution amount of effective ingredients in components capsules of *Hedyotis diffusa* by two methods

t/min	吸波面积法累积	HPLC 累积溶出量/mg			
	溶出量/mg	槲皮素	齐墩果酸	豆甾醇	总和
10	14.70	0.0016	0.20	8.36	8.56
20	33.17	0.56	1.60	20.08	22.24
30	39.17	1.16	3.91	33.45	38.52
45	56.25	1.76	6.40	53.84	62.00
60	82.52	2.46	9.84	69.90	82.20
90	102.81	3.20	11.57	80.33	95.10
120	104.61	3.60	11.59	87.06	102.25

乎不溶,在含 0.5% SDS 的 0.9% 盐酸溶液中溶解度也较小,120 min 的累积溶出率仅 12.09%,且有较多未溶颗粒,而在含 0.5% SDS 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中溶出较好,故选择含 0.5% SDS 的磷酸盐缓冲液为溶出介质。

中药制剂由于样品处理及其成分复杂,较难建立稳定可控的溶出度测定方法,本文结合吸波面积与 HPLC 测定整体成分与个体成分的溶出度,相当于将溶出度测定与含量测定有机结合,更具完整性与可控性,且更适用于样品的质量检测。HPLC 测得齐墩果酸在 120 min 的累积溶出度最大,达 82.78%,文献报道齐墩果酸的溶解度随 pH 升高快速增大,故其在肠中溶解度较胃中大,且可通过增加 pH 来提高溶解度^[17-18]。试验结果显示这 2 种方法具有较好的关联性,说明吸波面积-HPLC 结合法可用于中药复方制剂的体外溶出度测定。

[参考文献]

[1] 何小女,易辉亮. 白花蛇舌草提取物对肝组织的保护作用[J]. 医学信息,2011,24(9):4527-4528.

[2] 李秀萍,孙树凯,魏军,等. 白花蛇舌草对肝损伤小鼠 T 细胞亚群、TNF- α 和 IL-6 的影响[J]. 宁夏医学杂志,2010,32(6):495-497.

[3] 黄卫华,李友宾,蒋建勤. 白花蛇舌草化学成分研究(II)[J]. 中国中药杂志,2009,34(6):712-714.

[4] 张永勇,罗佳波. 白花蛇舌草化学成分研究[J]. 中药材,2008,31(4):522-524.

[5] 张瑜,谈献和,李伟,等. 白花蛇舌草中熊果酸的含量测定[J]. 中国野生植物资源,2005,24(3):46-47.

[6] 李孝栋,李素云,张丽红,等. 吸光度-波长曲线下面积和药物浓度的线性关系及其在中药药动学中的应用[J]. 福建中医药大学学报,2012,22(6):26-31.

[7] 张丽红,肖晓金,杨真真,等. 吸波面积法对养血注射液在大鼠体内药代动力学的研究[J]. 中医临床研究,2013,5(22):9-11.

[8] Zhang L H, Xiao X J, Yang Z Z, et al. A new method of area under the absorbance-wavelength curve for rats total metabolomic pharmacokinetics from Yangxue injection with multicomponents[J]. J Spectrosc, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/919023>.

[9] Zhang L H, Li S Y, Li X D, et al. Pharmacokinetic studies of mixture composed of sodium ferulate and tetramethylpyrazine hydrochloride in rats[C]. 上海:上海市研究生学术论坛—中医药发展与未来,2012.

[10] 李孝栋,张丽红,肖晓金. 吸波面积-高效液相色谱法联用研究养血注射液在 Beagle 犬体内的药动学[J]. 中国药学杂志,2014,49(16):1442-1447.

[11] 李存满,徐青,薛兴亚,等. 白花蛇舌草中环烯醚萜苷类化合物的稳定性研究[J]. 中医药现代化,2006,9(4):52-55.

[12] 辛勋,陆红云. 氨咖黄敏胶囊体外溶出度测定研究[J]. 中国医药指南,2008,6(2):125-126.

[13] 韩敏,姚忠明,龚益飞. 奥利司他胶囊溶出度检测[J]. 中国抗生素杂志,2013,38(4):268-270.

[14] 林海,龚又明,邓广海,等. 白花蛇舌草栽培品与野生品有效成分含量测定[J]. 中国现代应用药学,2013,20(12):1319-1322.

[15] 朱博,刘辰卉. 白花蛇舌草的化学成分与药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2011,23(5):52-53.

[16] 莫斌斌,王峰,向大雄,等. 高效液相色谱-质谱法测定齐墩果酸固体分散物的溶出度研究[J]. 中国新药与临床杂志,2005,24(4):290-293.

[17] 王峰,向大雄,陶昱斐,等. HPLC-MS/ESI 用于齐墩果酸溶出度含量测定[C]. 新昌:中国药学会医院药学术年会,2002.

[18] 王秋红,匡海学,吴伦,等. 二氢槲皮素固体分散体片的制备及体外溶出度的研究[J]. 中成药,2011,33(10):1692-1695.

[责任编辑 刘德文]