

不同厂家三黄片中大黄素、大黄酚的溶出度

张艳菊, 吴清*, 倪健, 韩立炜

(1. 首都医科大学附属北京儿童医院, 北京 100045; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立三黄片中大黄素、大黄酚溶出度测定方法以及考察市售不同厂家的三黄片中大黄素、大黄酚的溶出度情况。方法: 采用高效液相色谱方法进行含量测定, 色谱条件为 Grace C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 CH₃OH-0.1% H₃PO₄ (85:15), 检测波长 254 nm, 流速 1 mL·min⁻¹; 筛选出溶出度测定条件, 计算并分别绘制大黄素与大黄酚的累积溶出曲线, 且对各曲线进行相似因子的比较及溶出模型拟合。结果: 溶出度测定条件为采用桨法, 转速 100 r·min⁻¹, 以 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液加 0.5% 十二烷基硫酸钠为溶出介质。不同厂家三黄片中大黄素和大黄酚的溶出曲线相似因子 f_2 值大多小于 50, 且两成分的体外溶出的模型拟合不统一。结论: 不同厂家的三黄片中大黄素、大黄酚的溶出度存在显著性差异, 应将中成药主要成分的溶出度增加至质量控制体系中, 且应寻求适宜描述中药制剂成分的溶出机制模型。

[关键词] 三黄片; 溶出度; 溶出模型; 相似因子

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0104-05

Dissolution of Emodin and Rheic Acid in Sanhuang Tablets of Different Pharmaceutical Factory

ZHANG Yan-ju, WU Qing*, NI Jian, HAN Li-wei
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the dissolution method of emodin and rheic acid in Sanhuang Tablets and research the dissolution behavior of emodin and rheic acid in Sanhuang Tablets of different pharmaceutical factory. **Method:** The content of emodin and rheic acid was determined by HPLC. The Grace-C₁₈ (4.5 mm × 250 mm, 5 μm) column was used, the mobile phase was CH₃OH-0.1% H₃PO₄ (85:15), the detection wavelength was 254 nm and flow velocity was 1 mL·min⁻¹. The determination conditions of dissolution were selected, accumulation dissolution curves were calculated, drawn and compared by similarity factor values (f_2) and do the model simulation. **Result:** The determination conditions of dissolution included paddle method with the rotating speed of 100 r·min⁻¹ and 0.1 mol·L⁻¹ hydrochloric acid plus 0.5% sodium dodecyl sulfate as dissolution medium. The result of determination showed that the similarity factor values (f_2) of emodin and rheic acid dissolution curves of different pharmaceutical factory of Sanhuang tablets were mostly less than 50. And the dissolution model simulations of this two components are not uniform. **Conclusion:** There was significant difference in emodin and rheic acid dissolution among Sanhuang tablets of different pharmaceutical factory. The dissolution of the main components should be added to the quality control systems of Chinese patent medicines, and should seek appropriate dissolution mechanism model to describe the dissolution behavior of traditional Chinese medicine.

[Key words] Sanhuang tablets; dissolution; dissolution mechanism model; similarity factors

[收稿日期] 20110626(004)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项; 北京中医药大学复方中药制药研究创新团队

[第一作者] 张艳菊, 药师, 从事中药研究, Tel: 010-59612369, E-mail: daisyreyes@163.com

[通讯作者] * 吴清, 教授, 博士生导师, E-mail: qwu@vip.sina.com

三黄片由大黄、黄芩浸膏和盐酸小檗碱组成,来源于中医学中的传统有效方剂——三黄泻心汤,具有清热解毒、泻火通便之功效,在临床上具有广泛的应用,生产厂家众多。本文测定了不同厂家的三黄片中大黄素、大黄酚 2 种主要成分的溶出度曲线,并将不同厂家样品的溶出情况作一比较,对三黄片的体外溶出情况做初步的考察。

1 仪器与试剂

RC-8DC 型溶出度测试仪(天津市光学仪器厂);SD-20 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);CX-250 型超声波清洗机(北京市医疗设备二厂);METTLER-AE240 型电子分析天平;烘箱(宁波自动化仪表研究所)。

对照品大黄素(批号 0756-200110,购自中国药品生物制品检定所),大黄酚(批号 110796-200615,购自中国药品生物制品检定所),甲醇(Promptar Company Ltd,色谱级),水为纯净水,磷酸等试剂均为分析纯。

10 个厂家的三黄片样品(A 厂 108496, B 厂 0806171; C 厂 20081001; D 厂 081101; E 厂 0802004; F 厂 080606; G 厂 081002; H 厂 081202; I 厂 090401; J 厂 080801)。

2 方法与结果

2.1 大黄素、大黄酚含量测定方法的建立

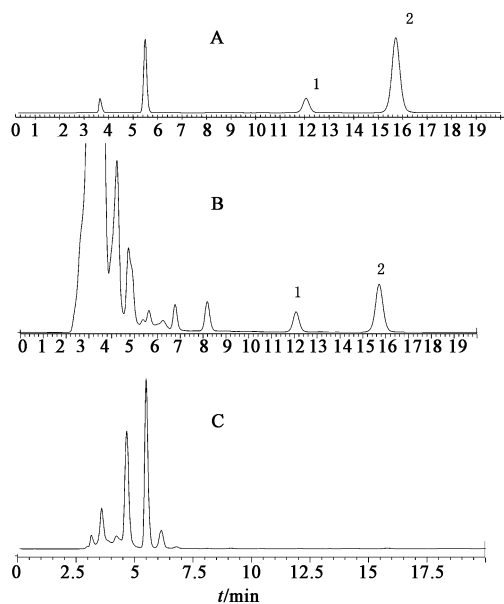
2.1.1 对照品溶液的配制 分别精密称取大黄素和大黄酚对照品,置于同一量瓶中,加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)溶解并稀释至刻度,摇匀后得大黄素质量浓度为 $0.058 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和大黄酚质量浓度为 $0.238 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,精密移取该溶液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加无水乙醇-乙酸乙酯(2:1)稀释至刻度,摇匀,即得含 $11.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄素和 $47.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取三黄片 20 片,去包衣,精密称定,研细,取约一片重(0.25 g),精密称定,置于锥形瓶中,精密加乙醇 25 mL,密塞,称定质量,置水浴上加热回流 1 h,放冷,用乙醇补足缺失的质量,滤过,精密量取续滤液 10 mL,置烧瓶中,水浴蒸干,加 30% 乙醇-盐酸(10:1)溶液 15 mL,置水浴中加热水解 1 h,立即冷却,用氯仿-乙酸乙酯(2:1)溶解,移至 25 mL 量瓶中并稀释至刻度,摇匀,滤过即得。

2.1.3 色谱条件及系统适用性 Grace C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 CH₃OH-0.1% H₃PO₄(85:15),检测波长 254 nm,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温

30 ℃。

分别取大黄素、大黄酚混合对照品、样品溶液、阴性对照溶液,在上述色谱条件下进行测定。结果:对照品出峰时间处,样品有相同峰出现,阴性对照无干扰,表明该条件系统适应性良好。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性; 1. 大黄素; 2. 大黄酚

图 1 三黄片中大黄素、大黄酚高效液相色谱

2.1.4 标准曲线的建立 分别取大黄素和大黄酚的混合对照品溶液 1, 4, 7, 10, 13, 16 μL, 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积。分别以峰面积为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,得大黄素线性回归方程为 $Y = 5\,433\,266.01 X - 4\,061.70$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围 $0.0116 \sim 0.0856 \mu\text{g}$;大黄酚线性回归方程 $Y = 5\,062\,767.51 X - 10\,287.07$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围 $0.0476 \sim 0.7616 \mu\text{g}$,峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取供试品溶液,按上述色谱条件重复进样 5 次,测得大黄素峰面积 RSD 0.22%,大黄酚峰面积 RSD 0.07%,符合精密度试验要求。

2.1.6 重复性试验 取三黄片样品,平行制作 5 份样品溶液,按上述色谱条件测定峰面积,计算大黄素和大黄酚含量,RSD 分别为 0.23%,0.05%,结果表明方法的重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取新配制的三黄片供试品溶液,分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样 1 次,共测定 6 次,结果样品中的大黄素峰面积的 RSD 0.05%,大黄酚峰面积的 RSD 0.07%,表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密称定已知大黄素和

大黄酚含量的三黄片粉末 5 份,各置于锥形瓶中,分别加入一定量的混合对照品溶液,按 2.1.2 所述进

行操作,得续滤液,进样 100 μL ,记录峰面积,分别计算大黄素和大黄酚的回收率,结果见表 1,2。

表 1 大黄素加样回收率试验

No.	称样量/mg	样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	均值/%	RSD/%
1	5.410 7	10.040 2	11.6	21.254 0	96.67		
2	5.810 7	10.782 5	11.6	21.884 8	95.71		
3	5.720 7	10.615 5	11.6	21.671 6	95.31	96.62	1.88
4	5.830 5	10.819 1	11.6	22.388 2	99.73		
5	5.400 4	10.021 1	11.6	21.117 5	95.66		

表 2 大黄酚加样回收率试验

No.	称样量/mg	样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	均值/%	RSD/%
1	5.410 7	36.665 1	47.6	83.683 4	98.78		
2	5.810 7	39.376 0	47.6	87.467 6	101.03		
3	5.720 7	38.766 1	47.6	86.382 4	100.03	99.16	1.86
4	5.830 5	39.511 6	47.6	85.294 6	96.18		
5	5.400 4	36.597 3	47.6	84.077 9	99.75		

2.2 溶出条件考察

2.2.1 溶出介质的脱气处理 参照文献^[1],室温条件下减压(0.45 μm 滤膜)过滤,再超声 15 min,备用。

2.2.2 溶出介质的选择 试验选择了 8 种溶出介质进行溶出度的测定,分别为蒸馏水、0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液、pH 6.8 的磷酸缓冲液(取 0.2 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 250 mL 与 0.2 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 118 mL,加已脱气的冷水稀释至 1 000 mL,摇匀,用酸度计校正)、pH 7.2 的磷酸缓冲液(取 0.2 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液 50 mL,与 0.2 mol·L⁻¹氢氧化钠溶液 35 mL,加已脱气的冷水稀释至 200 mL,摇匀,用酸度计校正)以及在各介质中加入 0.5% 表面活性剂(十二烷基硫酸钠)。

取三黄片,按《中国药典》2005 版二部附录 XC 浆法测定,溶出介质体积 900 mL(均符合漏槽条件),转速 100 r·min⁻¹,温度(37 \pm 0.5)°C,依法操作。不同时间点取样 2 mL,0.45 μm 滤膜滤过,注入高效液相色谱仪测定峰面积,计算累积溶出度。

结果表明,三黄片在以 0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液加 0.5% 十二烷基硫酸钠作为溶出介质的溶液中溶出适宜,而在其他介质中溶出量均很少,故采用 0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液加 0.5% 十二烷基硫酸钠溶液作为溶出介质。

2.2.3 转速的选择 参考文献^[2],三黄片在 100 r·

min⁻¹的转速下溶出率适中,因此溶出试验中选用 100 r·min⁻¹的转速。

2.3 样品测定

2.3.1 10 个不同厂家三黄片中大黄素、大黄酚的含量 按含量测定的色谱条件,供试品和对照品溶液各进样 10 μL 注入液相色谱仪,依法测定 10 个不同厂家三黄片样品每片中大黄素、大黄酚的含量,结果见表 3。

表 3 10 个厂家三黄片中大黄素、大黄酚的含量(n=5)

厂家	批号	大黄素	大黄酚
A	108496	0.556	1.931
B	0806171	0.626	1.953
C	20081001	0.688	1.011
D	081101	0.378	1.835
E	0802004	0.181	1.461
F	080606	0.314	1.438
G	081002	0.331	1.516
H	081202	0.420	1.263
I	090401	0.481	1.279
J	080801	0.371	1.049

2.3.2 不同厂家三黄片中大黄素、大黄酚的溶出度测定 根据 2005 年版《中国药典》二部附录溶出度

测定法,选用第二法浆法测定。取三黄片,以经脱气处理后的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸(加 0.5% 十二烷基硫酸钠)溶液 900 mL 为溶出介质,转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,依法测定。取样时间点为 $10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 \text{ min}$,每次取样 2.0 mL ,经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤,按 HPLC 方法分别测定峰面积,计算大黄素、大黄酚溶出量,以 2.3.1 中测得的每片含大黄素、大黄酚的量为 100% ,计算每片中两种成分的累积溶出度。见图 2。每次取样后补加同体积同温度的溶出介质。

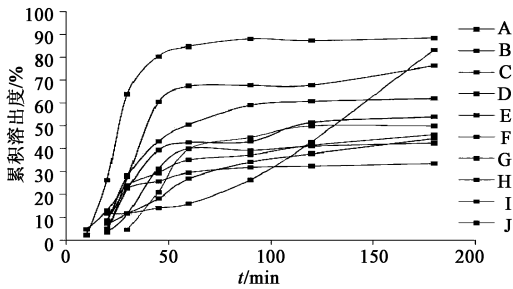


图 2 不同厂家的三黄片中大黄素的溶出曲线比较

表 4 不同厂家三黄片中大黄素的溶出曲线相似因子拟合

厂家	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	100	32.69	42.01	25.90	19.00	31.80	10.51	40.62	38.95	49.72
B	32.69	100	54.39*	53.24*	36.39	35.23	21.10	55.33*	48.20	43.32
C	42.01	54.39*	100	40.21	29.65	35.04	17.26	59.27*	56.42	53.73
D	25.90	53.24*	40.21	100	46.71	30.66	26.04	41.29	39.05	33.75
E	19.00	36.39	29.65	46.71	100	24.25	32.73	29.45	28.30	24.89
F	31.80	35.23	35.04	30.66	24.25	100	14.87	37.34	36.07	34.00
G	10.51	21.10	17.26	26.04	32.73	14.87	100	18.07	15.97	15.25
H	40.62	55.33*	59.27*	41.29	29.45	37.34	18.07	100	49.65	67.75*
I	38.95	48.20	56.42	39.05	28.30	36.07	15.97	49.65	100	42.53
J	49.72	43.32	53.73	33.75	24.89	34.00	15.25	67.75*	42.53	100

注: * 表示相似因子拟合大于 50 者。

2.3.4 三黄片大黄素、大黄酚的溶出机制探讨 制剂的溶出数据通常用数学模型进行拟合,从而推测其溶出过程的机制。中药固体制剂体外溶出过程则未达到模型化水平,因为中药成分复杂,与西药纯度较高的单体成分不同,若要其从固体制剂中溶解出来,必须突破其他成分的约束,中药制剂是否符合西药制剂适用的这些模型,必须根据实际情况考察。本论文采用了几种最常用模型进行拟合,以寻求中药制剂中成分的溶出机制。

零级动力学方程: $M_t/M_\infty = kt$

2.3.3 不同厂家样品的溶出曲线相似因子拟合 为更精确地分析不同溶出曲线间是否存在差异,采取相似因子法对各溶出曲线进行分析。相似因子法由 Moore 和 Flanner 首先提出,并被 FDA 推荐为比较两条溶出曲线的首选方法,相似因子 f_2 的数学表达式为:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Rt_i - Tt_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

f_2 : 相似因子; Rt : t 时间参比制剂累积溶出率; Tt : t 时间受试制剂累积释药率; n : 取点数目。 f_2 愈接近 100, 相似程度就愈高, 愈接近 0, 相似度愈低。一般认为, 当 f_2 在 50 ~ 100 时, 认为两制剂的体外溶出行为为无显著性差异。

由表 4 拟合结果可知, 不同厂家之间相似度大于 50 的共 5 组, 说明在所考察的市售三黄片样品中不同厂家之间大黄素的溶出曲线都存在很大差异。

由表 5 拟合结果可知, 不同厂家之间相似度大于 50 的共 9 组, 仅占不同厂家样品相互拟合组数的 16.36%, 说明在所考察的市售三黄片样品中不同厂家之间大黄酚的溶出曲线都存在很大差异。

一级动力学方程: $\ln(1 - M_t/M_\infty) = -kt$

Higuchi 模型: $M_t/M_\infty = kt_{1/2}$

根据 Fick 定量推导而来, Higuchi 方程基于以下的假设: 药物释放时保持伪稳态; 溶质保持过量; 理想的漏槽状态; 药物颗粒比骨架小得多; 扩散系数保持恒定, 药物与骨架没有相互作用。

根据各模型方程, 对三黄片的溶出数据进行拟合, 药物溶出规律采用何种模型应用拟合优度 (R) 来衡量, 即 R 越接近 1, 说明拟合的结果越准确。结果见表 6 ~ 7。

表 5 不同厂家三黄片中大黄酚的溶出曲线相似因子拟合

厂家	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	100	50.92 *	61.55	23.08	39.86	38.49	14.76	38.86	24.36	33.78
B	50.92 *	100	70.76	31.13	59.96 *	37.13	19.78	56.06 *	33.75	47.01
C	61.55 *	70.76	100	28.28	51.05 *	38.44	18.01	47.87	27.42	41.45
D	23.08	31.13	28.28	100	36.99	23.64	35.72	37.72	47.19	44.86
E	39.86	59.96	51.05	36.99	100	33.28	22.93	64.88 *	34.32	58.77 *
F	38.49	37.13	38.44	23.64	33.28	100	14.73	33.23	23.31	30.94
G	14.76	19.78	18.01	35.72	22.93	14.73	100	24.03	31.07	26.40
H	38.86	56.06 *	47.87	37.72	64.88 *	33.23	24.03	100	34.08	61.72 *
I	24.36	33.75	27.42	47.19	34.32	23.31	31.07	34.08	100	41.07
J	33.78	47.01	41.45	44.86	58.77 *	30.94	26.40	61.72 *	41.07	100

注: * 表示相似因子拟合大于 50 者。

表 6 不同厂家三黄片中大黄素溶出曲线的模型拟合度

模型	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
零级	0.701	0.652	0.558	0.640	0.542	0.933	0.484	0.767	0.643	0.560
一级	0.724	0.737	0.589	0.725	0.668	0.890	0.637	0.830	0.694	0.597
Higuchi	0.801	0.769	0.688	0.770	0.667	0.843	0.656	0.895	0.752	0.685

表 7 不同厂家三黄片中大黄酚溶出曲线的模型拟合度

模型	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
零级	0.797	0.744	0.736	0.814	0.654	0.857	0.651	0.804	0.744	0.798
一级	0.827	0.794	0.669	0.934	0.713	0.789	0.813	0.864	0.840	0.862
Higuchi	0.880	0.856	0.882	0.911	0.774	0.749	0.806	0.923	0.841	0.901

由拟合结果表 6~7 可看出,不同厂家的大部分三黄片样品中大黄素、大黄酚成分的溶出行为较符合 Higuchi 释放方程;厂家 D、G 样品中大黄酚的溶出行为符合一级方程;厂家 E 样品中大黄素的溶出行为符合一级方程;厂家 F 样品中两种成分溶出均符合零级方程,通过以上统计,可以看出不同厂家三黄片样品没有统一的溶出模型。

3 讨论

结果表明:①不同厂家的三黄口服固体制剂的体外溶出度存在显著性差异,这些差异是否会引起体内生物利用度及临床疗效的不同,还有待于进一步研究证实。②不同厂家的三黄口服固体制剂的体外溶出的模型拟合不统一,这种不确定的溶出行为有可能会影响到药物在体内的释放、吸收,影响疗效。而且,这些基于西药制剂溶出过程建立的模型不适用于成分复杂的中药制剂的溶出过程分析,仍需进一步分析探讨,寻找出适用于中药制剂的溶出

模型。

中药制剂生产多为传统工艺,过程复杂,质量控制过程不够完善,均可能造成产品质量参差不齐,出现的问题也比化学药品多。《中国药典》中仅以崩解时限作为中药固体制剂的溶解释放的控制指标,显然是不全面的。《美国药典》在仅有的几个植物制剂中,也部分收载溶出度试验项目,且其考察破裂时限的方法也值得借鉴。我国是中药制剂大国,因此有必要增加溶出度检查项目作为质量评价和控制的标准,以确保药品质量和临床疗效的稳定。

[参考文献]

- [1] 周凤梅. 溶剂脱气方法对溶出度仪系统实用性校正结果的影响[J]. 齐鲁药事, 2005, 24(11): 674.
- [2] 田书霞, 蒋晔. HPLC 测定三黄片的溶出度[J]. 中成药, 2006, 28(6): 918.

[责任编辑 蔡仲德]