

柴胡总皂苷提取物制剂前的评价

封传华¹, 张国松², 罗晓健^{1,2}, 胡鹏翼¹, 何秀菊², 王跃生^{1,3*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 对柴胡总皂苷提取物进行制剂前研究, 为设计合理的剂型提供依据。方法: 采用分光光度法和高效液相色谱法研究柴胡总皂苷提取物的表观溶解度、油水分配系数、稳定性及初步考察柴胡总皂苷提取物对胃黏膜的刺激性。结果: 柴胡总皂苷提取物在水中的表观溶解度为 $0.145 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 pH 5.0 的缓冲液中, 油水分配系数为 34.72; 在 pH 9.0 的缓冲液中, 油水分配系数为 60.36; 高湿度试验结果不符合规定; 刺激性较大。结论: 柴胡总皂苷提取物的表观溶解度小, 在碱性溶液中的油水分配系数大于酸性溶液中的分配系数, 稳定性较好, 但具有一定的吸湿性, 具有较大的胃黏膜刺激性。

[关键词] 柴胡; 总皂苷; 制剂前评价研究

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0012-04

Evaluation on Pre-Preparation of Total Saponins Extract from Bupleuri Radix

FENG Chuan-hua¹, ZHANG Guo-song², LUO Xiao-jian^{1,2}, HU Peng-yi¹, HE Xiu-ju², WANG Yue-sheng^{1,3*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study on pre-preparation of total saponins extract from Bupleuri Radix and provide a basis for rational design of dosage forms. **Method:** Using spectrophotometry and high performance liquid chromatography to investigate of the appraent aqueous solubility, oil-water partition coefficient, stability and preliminary gastric irritation of extracts of total saponins extract from Bupleuri Radix. **Result:** The appraent aqueous

[收稿日期] 20110401(007)

[基金项目] 重大新药创制专项(2009ZX09103)

[第一作者] 封传华, 在读硕士, 从事药物新剂型与新制剂研究, Tel:0791-7119617, E-mail: fengch1986@126.com

[通讯作者] *王跃生, 研究员, 博士生导师, Tel:0791-7119617, E-mail: Wylw915@126.com

具有较大的接触面积, 所以在上样和水洗过程中对样品的吸附量较大而损失较小; 在洗脱过程中, 生物碱因与酸形成盐酸盐类成分不被吸附而被洗脱。在优选工艺条件下纯化的提取物总生物碱质量分数达到 80% 以上, 出膏率减少 60% 以上, 总生物碱回收率在 70% 以上, 能较好适应中药现代剂型的进一步开发要求。

[参考文献]

- [1] 杨云. 天然药物化学成分提取分离手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 676.
- [2] 赵庆国, 吴素体, 王颖. 不同品种和产地黄连的总生物碱含量测定[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(11): 974.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 285, 286.
- [4] 徐晓宏, 张铁军, 廖茂梁, 等. 大孔吸附树脂分离纯化黄连总生物碱的工艺研究[J]. 中草药, 2007, 38(8): 1167.

[责任编辑 全燕]

solubility in water was $0.145 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. In buffer of pH 5.0, oil-water partition coefficient was 34.72; In buffer of pH 9.0, oil-water partition coefficient was 60.36, High-humidity test results didn't meet requirements; Had greater irritating. **Conclusion:** Appraent aqueous solubility of total saponins extract from Bupleuri Radix was small, oil-water partition coefficient in alkaline solution was greater than in acidic solution, had good stability, but with a certain degree of hygroscopicity, and had a large irritation to gastric.

[**Key words**] Bupleuri Radix; total saponins; evaluation on pre-preparation

柴胡总皂苷提取物是以北柴胡为原料,经提取、分离纯化、干燥而制得,其主要有效成分为柴胡皂苷 a, d 等,属齐墩果烷型皂苷。近现代药理学研究表明,柴胡皂苷具有抗炎、保肝、抗肝纤维化、降低血中胆固醇和调节内分泌等多方面药理活性^[1,2],拥有极大的开发潜力。药物的制剂前的评价研究在新药的剂型设计和老药的剂型改进中已逐步成为常规化的研究项目^[3],它对提高制剂的安全性及给药途径的合理性具有重要的意义。为了将柴胡总皂苷提取物开发成为安全性好、剂型合理的新药,本实验对与剂型密切相关的柴胡皂苷的溶解性能、油水分配系数、初步的化学稳定性等性质进行了考察,以期对处方设计和工艺优化提供科学依据。

1 材料

柴胡总皂苷提取物(自制),其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠(170~210)g,清洁级,雌雄兼用,江西中医学院动物中心提供,许可证号 SCXK(赣)2005-0001。

DZF-1B 型真空干燥箱(上海跃进医疗仪器厂), Agilent 1100 型高效液相色谱仪(DAD 二极管阵列检测器), HH-6 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司), 240 型电子天平(Mettler), AL104/01 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), TDZ4-WS 型台式低速自动平衡离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司), LS-20000A 型低温恒温光照仪(上海黄海药检), UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津)。

2 方法与结果

2.1 柴胡总皂苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取柴胡皂苷 d 对照品适量,加甲醇并定容至 5 mL 的量瓶中,制成每 1 mL 含 0.5 mg 柴胡皂苷 d 的溶液,摇匀,备用。

2.1.2 线性关系考察^[4] 精密吸取柴胡皂苷 d 对照品溶液 0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.8, 1 mL, 分别置于 1 mL 量瓶中,用甲醇定容,各精密吸取 0.2 mL 置于 5

支具塞试管中,加 0.1% 对二甲氨基苯甲醛乙醇溶液 0.4 mL, 70 °C 水浴中加热 10 min, 取出放冷至室温,各加入磷酸 4.0 mL, 70 °C 水浴中加热 30 min, 取出放冷至室温,在 546 nm 处测定吸光度。以对照品质量浓度(C)和吸光度(A)进行线性回归,得柴胡皂苷 d 的线性回归方程 $A = 0.5221C - 0.0821$ ($r = 0.9993$),柴胡皂苷 d 在 $0.01 \sim 0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度线性关系良好。

2.2 柴胡皂苷 a, d 的含量测定

2.2.1 色谱条件^[5] Hypersil ODS2 C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(0 min, 33:67; 20 min, 40:60; 35 min, 53:47; 40 min, 60:40; 45 min, 33:67), 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25 °C, 检测波长 210 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取柴胡皂苷 a, d 对照品适量,加甲醇并定容至 5 mL 的量瓶中,制成每 1 mL 含柴胡皂苷 a 0.5 mg、柴胡皂苷 d 0.4 mg 的混合对照品溶液,摇匀,备用。

2.2.3 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20, 50 μL , 注入高效液相色谱仪,测定,以进样量(X)与峰面积(Y)作图得标准曲线,经回归得柴胡皂苷 a, d 的回归方程分别为 $Y_a = 1.5081X + 6.3165$ ($r = 0.9970$), $Y_d = 1.4341X + 5.9944$ ($r = 0.9978$); 线性范围分别为柴胡皂苷 a 0.5~25 μg , 柴胡皂苷 d 0.4~20 μg 。

2.4 柴胡总皂苷提取物溶解度的测定 称取过量的柴胡总皂苷提取物 9 份,分别置具塞锥形瓶中,每 3 份各加入蒸馏水、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸、pH 6.8 磷酸盐缓冲液各 20 mL,置恒温振荡器(37 ± 0.5)°C 上振荡(频率为 120 次/min),分别于 24, 48, 72 h 取上清液 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,续滤液置小瓶中。精密量取续滤液 1 mL,样品置恒重坩锅内,挥去溶剂,60 °C 减压干燥至恒重后,精密称重,计算固体溶解的量。取续滤液,按分光光度法测定柴胡总皂苷的方法,测定续滤液中柴胡总皂苷的

浓度。结果见表 1。

表 1 柴胡总皂苷提取物在不同介质中的溶解性能比较

溶媒	t/h	含固量 /g·L ⁻¹	柴胡总皂苷 /g·L ⁻¹
水	24	2.65	0.143 6
	48	2.25	0.145 7
	72	1.5	0.145 4
0.1 mol·L ⁻¹ 盐酸溶液	24	1.9	0.086 7
	48	2.2	0.073 7
	72	1.8	0.072 7
pH 6.8 磷酸缓冲液	24	8.8	0.086 2
	48	9.95	0.111 4
	72	9.85	0.117

溶解度测定结果表明,柴胡总皂苷溶解性较差,做成制剂时需考虑增溶问题。柴胡总皂苷提取物在 pH 6.8 缓冲液时,所溶出固体的量比在水中要大,但总皂苷的含量却比在水中要小。在 0.1 mol·L⁻¹

表 2 柴胡总皂苷提取物在不同 pH 缓冲液中的油水分配系数($\bar{x} \pm s, n = 3$)

目标物	pH			
	5.0	6.8	7.4	9.0
固体物	0.013 ± 0.06	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.06	0.06 ± 0.07
柴胡总皂苷	34.72 ± 0.09	41.26 ± 0.06	42.95 ± 0.10	60.36 ± 0.08
柴胡皂苷 a	1.66 ± 0.04	1.82 ± 0.08	2.02 ± 0.09	1.98 ± 0.07
柴胡皂苷 d	6.99 ± 0.10	8.08 ± 0.06	8.19 ± 0.10	8.05 ± 0.07

从试验结果来看,药物在碱性环境中 P 值高于在酸性环境中的 P 值, pH 7.4 时 P 最高。

2.5 柴胡总皂苷提取物稳定性的考察 按照《中国药典》(2010 年版)对原料药柴胡总皂苷提取物进行影响因素试验,每项试验平行做 3 次。

2.5.1 高温试验 在 60 °C 时,柴胡总皂苷粉末在 60 °C 条件下,外观无变化,5 d 时的质量变化为 -2.77%,10 d 时的质量变化为 -3.70%,总皂苷含量、柴胡皂苷 a、d 的量略有损失,无明显变化。

2.5.2 高湿度试验 柴胡总皂苷粉末在 25 °C,相对湿度 95% ± 5% 及 75% ± 5% 条件下,外观无变化,5,10 d 增重均大于 5%。故柴胡总皂苷粉末在高湿度条件下稳定性较差。

2.5.3 强光照射试验 柴胡总皂苷粉末在 25 °C,照度为 (4 500 ± 500) lux 的条件下,外观及质量无明显变化,总皂苷含量、柴胡皂苷 a、d 的量略有损失,无明显变化。

HCl 中所溶出固体的量和总皂苷的含量都非常小。

2.4 柴胡总皂苷提取物油水分配系数的测定 分别用 pH 5.0, 6.8, 7.4, 9.0 的磷酸盐缓冲溶液配制适宜质量浓度的柴胡总皂苷溶液。分别取该溶液 20 mL 与正辛醇 20 mL 混合,置于 100 mL 锥形瓶中。(37 ± 0.5) °C, 150 r·min⁻¹ 恒温振荡 24 h 后取出,静制 30 min,离心分离两相,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,续滤液置小瓶中。精密量取不同缓冲液的水相和正辛醇相各 1 mL,样品置恒重坩锅内,挥去溶剂,60 °C 减压干燥至恒重后,精密称重,计算所溶解固体的量,即含固量的表观油水分配系数。用分光光度法测定平衡后水相和正辛醇相中药物的浓度,即可得到总皂苷的表观油水分配系数。用 HPLC 测定平衡后水相和正辛醇相中柴胡皂苷 a、d 的量,即可分别得到柴胡皂苷 a、d 的表观油水分配系数 (P),每个样品平行做 3 份。结果见表 2。

$$P = \frac{\text{油相中药物的质量浓度}}{\text{水相中药物的质量浓度}}$$

2.6 柴胡总皂苷提取物对胃刺激性试验

2.6.1 大鼠急性溃疡试验 取大鼠 70 只,禁食 24 h 后随机分成 7 组,每组 10 只,雌雄各半,其中 3 组分别灌胃给予柴胡皂苷溶液(给药剂量分别为 300, 500, 700 mg·kg⁻¹),另取 3 组分别给予阿司匹林溶液灌胃(给药剂量分别为 50, 75, 100 mg·kg⁻¹),另一组为对照组,给予等体积纯化水(20 mL·kg⁻¹)。灌胃后 5 h 将大鼠用乙醚麻醉,脱臼处死,剖腹取出全胃,沿胃大弯剪开,放入 1% 甲醛溶液中固定 10 min,取出平展在蜡板上,在前胃部黏膜面观察溃疡程度,测量每个溃疡的面积,将每只大鼠胃溃疡面积的总和分为 5 个等级,作为溃疡指数。溃疡指数计算方法如下。0 级:无病变;1 级:出血点、溃疡点直径 < 1 mm;2 级:1 ~ 5 个小溃疡,1 mm ≤ 溃疡直径 ≤ 3 mm;3 级:6 个以上小溃疡,或 1 个大溃疡(溃疡直径 > 3 mm);4 级:≥ 2 个大溃疡;5 级:穿孔性溃疡^[6]。

$$\text{溃疡发生率} = \frac{\text{形成溃疡大鼠数}}{\text{参加实验大鼠数}} \times 100\%$$

对大鼠灌胃给予柴胡总皂苷后,低、中、高3个剂量致溃疡指数分别为0.50,1.00,2.50;阿司匹林低、中、高3个剂量组致溃疡指数分别为0.60,1.10,2.50。可见柴胡总皂苷产生溃疡程度接近于阿司匹林。结果见表3。

表3 大鼠灌胃给药急性溃疡试验($n=12$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	溃疡程度/级	发生率/%
柴胡总皂苷	300	0.5	75
	500	1.0	90
	700	2.5	100
阿司匹林	50	0.6	90
	75	1.1	100
	100	2.5	100
溶媒对照	-	0.1	15

2.6.2 大鼠慢性溃疡试验 取大鼠70只,禁食24h后随机分成7组,每组10只,雌雄各半,其中3组分别灌胃给予柴胡总皂苷溶液(给药剂量分别为200,350,500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和阿司匹林溶液(给药剂量分别为50,100,200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),另一组为溶媒对照组,灌胃给予等体积纯化水(20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续给药14d,末次给药后将大鼠禁食16h,再用乙醚麻醉后脱臼处死,剖腹取出全胃,沿胃大弯剪开,放入1%甲醛溶液中固定10min后取出,平展在蜡板上,在前胃部黏膜面观察溃疡程度,测量每个溃疡的面积,将每只大鼠胃溃疡面积的总和分为5个等级,作为溃疡指数。

对大鼠连续灌胃给予柴胡总皂苷14d后,低、中、高3个剂量致溃疡指数分别为1.00,1.60,2.20;阿司匹林低、中、高3个剂量组致溃疡指数分别为1.10,1.70,2.30。可见柴胡总皂苷产生溃疡程度接近于阿司匹林。结果见表4。

3 讨论

溶解度测定结果表明,柴胡总皂苷溶解性较差,做成制剂时需考虑增溶问题。柴胡总皂苷在水中的溶解度比在酸水中及pH6.8缓冲液中要好,酸性条

表4 大鼠灌胃给药慢性溃疡试验

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	溃疡程度/级	发生率/%
柴胡总皂苷	200	1.0	90
	350	1.6	100
	500	2.2	100
阿司匹林	50	1.1	100
	100	1.7	100
	200	2.3	100
溶媒对照	-	0.2	15

件下,可能是由于皂苷发生水解反应,生成苷元或次生苷和糖,故使其所溶解的总皂苷量明显下降。

药效的产生首先要求药物分子通过生物膜。生物膜相当于类脂屏障,油水分配系数是分子亲脂特性的度量。从实验结果来看,药物在小肠中的吸收效果可能比在胃中要好,特别是在小肠中远端可能有良好吸收。但药物的吸收与 P 值并不总是简单的呈线性关系,还受分子量大小、化合物结构等多种因素影响,故具体情况还需进一步研究。

柴胡总皂苷溶液对胃有较强刺激性。因此,在剂型设计时应考虑如何降低其对胃的刺激性,如采用包肠溶衣,避免柴胡总皂苷与胃接触,从而达到降低对胃黏膜的刺激性。

[参考文献]

- [1] 李琰. 柴胡药理作用研究进展[J]. 河北医学, 2010, 16(5): 633.
- [2] 李芳, 李建北, 张东明. 柴胡的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(2): 120.
- [3] 汤丽娟, 魏树礼. 处方前研究的意义及方法[J]. 中国医药工业杂志, 1989, 20(3): 133.
- [4] 王鹏, 王玉生, 刘斌, 等. 不同产地中柴胡总皂苷及柴胡皂苷a的含量测定[J]. 中国药物与临床, 2008, 8(2): 228.
- [5] 张宏娜, 赵玉英, 梁鸿, 等. HPLC-ELSD法同时测定柴胡中柴胡皂苷a, c, d, f的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(8): 1150.
- [6] 梁云, 崔若兰. 柴胡皂苷d治疗抗肾小球基膜型肾炎的实验研究[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(7): 416.

[责任编辑 仝燕]