

重黄温敏凝胶中重楼皂苷VI含量测定及体外释放研究*

孙媛^{1,2,3}, 丁江生^{1,2,3}, 万近福^{1,2,3}

(云南省药物研究所, 昆明 650111; 2. 云南白药集团创新研发中心, 昆明 650111; 3. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111)

摘要: [目的] 建立重黄温敏凝胶中重楼皂苷VI的含量测定方法, 并进行体外释放研究。 [方法] 采用 HPLC-ELSD 法, 色谱柱为 CAPCELL PAK C₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5μm), 乙腈(A)-水(B)为流动相, 梯度洗脱(0~15 min, 25%~35% A; 15~35 min, 35%~40% A; 35~40 min, 40%~60% A), 柱温 25℃, 流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 漂移管温度 92℃, 载气流速 2.9 L/min。以体外溶蚀法, 对重黄温敏凝胶的累积释放情况, 进行考察。 [结果] 重楼皂苷VI在 0.430 0~4.300 0 mg 范围内线性良好, $\lg A = 1.796 9 \lg C + 4.398 9$ ($r^2 = 0.999 9$), 定量限为 0.054 0 mg, 平均回收率为 101.70% (RSD=1.17%, n=9), 体外释放符合 Higuchi 方程。 [结论] 该方法方便、稳定、高效, 可用于重黄温敏凝胶体外释放研究。

关键词: 重黄温敏凝胶; 重楼皂苷VI; 体外释放; 高效液相色谱-蒸发光散射检测

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9043(2020)02-0226-05

重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla Smith var. yunnanensis* (Franch.) Hand.-M.azz. 或七叶一枝花 *Paris polyphylla Smith var. chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎, 性凉, 味苦, 微寒, 有小毒, 归肝经。具有清热解毒、消炎消肿、凉肝熄风、利胆退黄、除风定痉、止血止痛、攻坚化积、截疟等功效。可补水、气、血, 通气血。现代药理研究表明, 重楼具有抗肿瘤、止血止痛、抗病毒, 抑菌消炎和免疫调节及肝脏保护等作用。现已分离并鉴定出 50 余种化合物, 主要为皂苷类成分, 约占化合物总含量的 80%。重楼皂苷具有抗肿瘤、清热解毒、消炎止痛、止血等功效, 是云南白药、宫血宁等中成药的主要成分之一^[1-6]。

重楼皂苷主要活性成分是甾体皂苷及苷元, 其中又分为薯蓣皂苷类化合物和偏诺皂苷类化合物。《中华人民共和国药典》规定了薯蓣皂苷类化合物重楼皂苷 I、II 和偏诺皂苷类化合物重楼皂苷 VI、VII 作为衡量重楼植物药用价值的指标。近年来的研究进一步表明偏诺类皂苷在药理活性上更具优势,

* 基金项目: 云南省科技厅项目 (2018DC002)。

作者简介: 孙媛 (1982-), 女, 高级工程师, 主要从事新药制剂研究。

特别是其中的重楼皂苷VI有止血、祛痰、抑菌、镇静镇痛、抗早孕杀灭精子、抗肿瘤等作用, 临床用于治疗功能性子宫出血等。因此, 采用主要含偏诺类皂苷的重楼提取物进行组方, 制备重黄温敏凝胶。同时, 鉴于偏诺皂苷类化合物的 4 个主要指标成分中重楼皂苷VI含量最低, 也最易被干扰出现检测误差而影响重黄温敏凝胶的质量判断。因此, 本实验选择重楼皂苷VI作为检测指标, 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法 (HPLC-ELSD) 对重黄温敏凝胶的质量情况和体外溶蚀释放情况进行考察, 为该药制剂成型和体内释药研究提供理论依据^[7-10]。

1 材料

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦); 2000ES ELSD 检测器 (美国奥泰公司); XWK-III 型空气发生器 (天津市津分分析仪器制造有限公司); ZRS-8G 智能溶出实验仪 (天津大学无线电厂); THZ-82 恒温振荡器 (金坛市富华仪器有限公司); ETS-4fuzzy 磁力搅拌器 (德国 IKA); AR2130 型电子天平 (美国 Capintec 公司); Delta320 PH 计 (梅特勒托利多); KH3200E 黏度测定仪 (昆山禾创超声有限公司); KH3200E 超声波清洗仪 (昆山禾创超声有限公司); DZKW-S-6 电热恒温水浴锅 (北京

市永光明医疗)。

1.2 试剂和药品 重楼皂苷VI对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111592-201203);重黄温敏凝胶(自制);泊洛沙姆 407(Poloxamer 407,德国 BASF 公司);泊洛沙姆 188(Poloxamer 188,德国 BASF 公司);丙二醇(国药试剂集团);乙腈(色谱纯,默克股份);超纯水;其他试剂为分析醇。

2 方法与结果

2.1 重黄温敏凝胶的制备 精密称取处方量的重楼等提取物,加入丙二醇分散,再在连续搅拌下依次加入水、苯扎溴铵和泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 188,搅拌直至完全溶解,加水定重,放置 4℃冷藏 24 h,即得。

2.2 含量测定

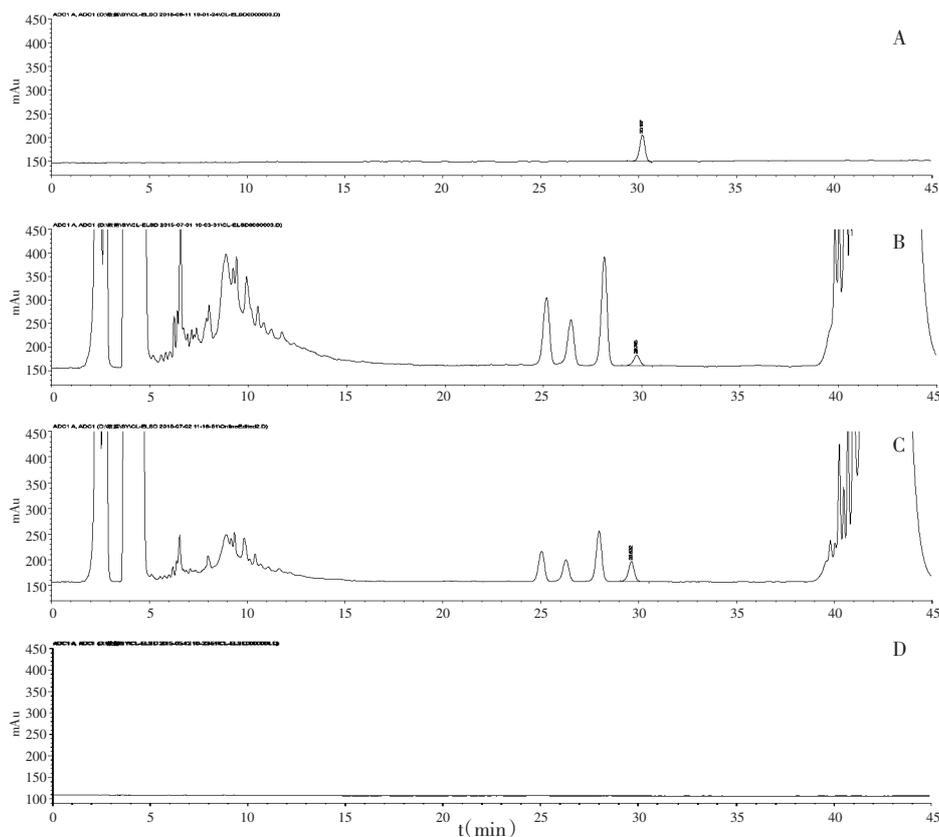
2.2.1 色谱条件 CAPCELL PAK C₈ 色谱柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm, 资生堂),乙腈(A)-水(B)为流动相,梯度洗脱(0~15 min, 25%~35% A; 15~35 min, 35%~40% A; 35~40 min, 40%~60% A),柱温 25℃,流速 1.0 mL/min,进样量 10 μL,漂移管温度 92℃,载气流速 2.9 L/min,增益 2,撞击器关。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取重楼皂苷VI对照品 21.5 mg,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,超声(150 W, 40 kHz)5 min,摇匀,即得。

2.2.3 样品溶液制备 精密称取 2.0 g 重黄温敏凝胶,置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇 8 mL,超声 20 min,放冷,甲醇定容至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2.4 专属性实验 分别将重楼皂苷VI对照品溶液、样品溶液、空白溶液以及样品加对照品溶液按上述色谱条件进行测定,记录色谱图。此条件下重楼皂苷VI分离良好,无干扰。见图 1。

2.2.5 线性关系和定量限考察 分别精密量取 2.2.2 项下重楼皂苷VI对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,0.45 μm 滤膜过滤,按 2.2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积。以峰面积的常数对数值(lgA)对浓度的常数对数值(lgC)进行线性回归,得回归方程为:lgA=1.796 9 lgC+4.398 9(r²=0.999 9),0.430 0~4.300 0 mg 范围内,线性关系良好。以信噪比(S/N)约为 10 的重楼皂苷VI对照品溶液为定量限:0.054 0 mg。



A: 对照品溶液 B: 样品溶液 C: 对照及样品混合溶液 D: 空白溶液

图 1 专属性实验 HPLC 图

2.2.6 精密度实验 精密量取 2.2.5 项下对照品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,计算重楼皂苷 VI 的峰面积的 RSD 为 1.51%($n=6$),表明精密度良好。

2.2.7 稳定性实验 取同一份样品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算重楼皂苷 VI 的峰面积的 RSD 为 3.08%($n=6$),表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 重复性实验 精密称取 2.0 g 重黄温敏凝胶 6 份,按 2.2.3 项下要求,配制样品溶液,按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算重楼皂苷 VI 的含量, RSD 为 2.70%($n=6$),表明重复性良好。

2.2.9 回收率实验 精密称取已知含量的重黄温敏凝胶,分别按含量的 50%、100%、150%精密加入重楼皂苷 VI 对照品,按 2.2.3 项制备样品溶液,每个浓度平行制备 3 份,按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算回收率。见表 1。

表 1 加样回收率实验结果表($n=9$)

比例(%)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
50	0.060 4	0.180 3	99.76	101.70	1.17
	0.060 4	0.180 6	99.25		
	0.060 4	0.183 3	103.70		
100	0.120 7	0.244 1	102.20		
	0.120 7	0.245 3	103.20		
	0.120 7	0.245 2	103.10		
150	0.181 1	0.304 1	101.30		
	0.181 1	0.305 0	101.80		
	0.181 1	0.304 2	101.40		

2.2.10 含量测定 分别精密称取 3 批重黄温敏凝胶,按 2.2.3 项制备样品溶液,每个样品平行制备 2 份,按上述色谱条件测定,记录峰面积,计算含量,为标示量的 90%~110%。见表 2。

2.3 胶凝时间测定 采用试管倒置法来判断凝胶的相变温度:平行称取 6 份重黄温敏凝胶于试管中,将试管置于水浴中缓慢升温,于分别于(31.0±

表 2 重楼皂苷 VI 含量测定结果表

批号	浓度(mg/mL)	含量(对比标示量%)	结果
1805001	0.121 6	100.76	合格
1805002	0.119 5	99.02	合格
1805003	0.125 9	104.27	合格

0.1) °C、(32.0±0.1) °C、(35.0±0.1) °C、(37.0±0.1) °C、(39.0±0.1) °C、(41.0±0.1) °C、(43.0±0.1) °C和 (45.0±0.1) °C测定胶凝时间,每间隔 30 s 倾斜一次试管,直至凝固,记录时间。见图 2。

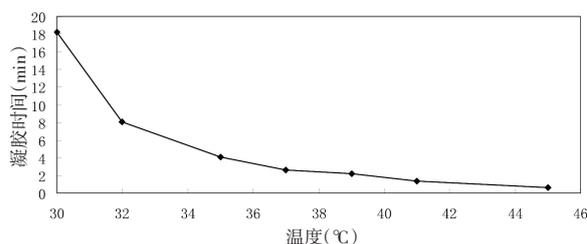


图 2 胶凝曲线图($n=6$)

证明此温敏凝胶从(35.0±0.1) °C起,胶凝时间明显加快,在体温时(37±0.1)°C仅需(2.90±0.58) min 即可成胶。

2.4 体外释放考察 取 25 mL 具塞试管,精密称取 5.0 g 重黄温敏凝胶于试管内,置于(37±0.1)°C恒温水浴振荡器中,待完全凝胶后,缓缓加入已脱气的 pH4.0 的磷酸盐缓冲液 5.0 mL,平行制备 6 份样品,放入(37.0±0.1) °C恒温水浴振荡器中,振荡频率为 120 r/min,于 0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、30、36、48 h 取样,取出全部溶蚀介质,称重后将试管放回恒温水浴振荡器中胶凝,缓慢补加相同温度的空白溶蚀介质 5.0 mL,重复操作,直至剩余凝胶质量不足初始重量的 10%。相邻时间点间质量差异即为重黄温敏凝胶溶蚀量。每个时间点取样后,按相应比例加入甲醇稀释至规定体积,0.45 μm 微孔滤膜过滤,采用上述色谱条件进行检测,记录峰面积,计算重楼皂苷 VI 的累积释放量。并对各时间点的药物累积释放率进行探讨。见表 3 和图 3。

表 3 重黄温敏凝胶溶蚀释放拟合表

溶蚀介质	指标	模型	方程	r^2
PH4.0	累积释放量 (重楼皂苷 VI)	零级动力学方程	$Q=0.0383t+22.199$	0.883 2
		一级动力学方程	$\ln(1-Q)=4E-05t-0.0223$	0.891 4
Higuchi 方程	溶蚀总重量 (重黄温敏凝胶溶蚀量)	零级动力学方程	$Q=2.3774t^{1/2}-4.0879$	0.976 4
		一级动力学方程	$Q=0.001 6t+0.5135$	0.947 0
Higuchi 方程			$\ln(1-Q)=2E-06t-0.0005$	0.947 2
Higuchi 方程			$Q=0.431t^{1/2}-0.8895$	0.967 1

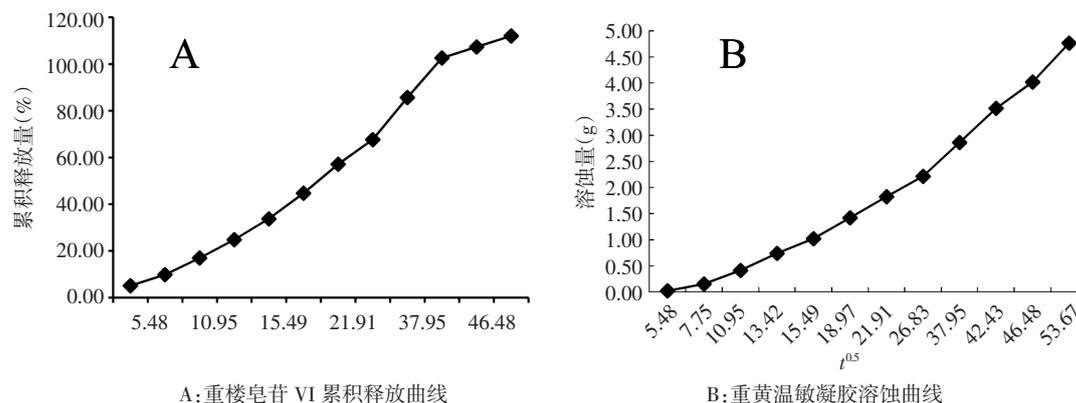


图 3 重黄温敏凝胶 pH4.0 缓冲液中溶蚀释放情况

结果显示,重黄温敏凝胶溶蚀量和重楼皂苷 VI 体外释放均符合 Higuchi 方程,12 h 释放 67.63%, 24 h 释放 85.65%。表明重黄温敏凝胶在人体阴道微环境中释药,基质溶蚀是限速条件。

3 讨论

2015 版《中华人民共和国药典》重楼项下的紫外检测波长为 203 nm,重黄温敏凝胶在该波长下测定时重楼皂苷 VI 干扰明显,无法达到预期检测效果。本研究采用 HPLC-ELSD 检测,不仅药典项下的 4 种重楼皂苷实现良好的分离检测,还将偏诺重楼皂苷 VI、重楼皂苷 VII、重楼皂苷 PA 和重楼皂苷 H 进行了较好的分离,为进一步研究重楼偏诺皂苷提供了技术支持。

重黄温敏凝胶的体外溶蚀释放符合 Higuchi 方程,且在 12 h 释放可达 67.63%,不仅满足用药需求,还能减少药物给药次数,保证药效的同时,增加患者的用药顺应性,为重黄温敏凝胶制剂推广提供依据。

本实验主要对药物从重黄温敏凝胶制剂中释放的情况进行了研究,对于释放后在人体阴道中的吸收利用情况还需进一步探讨。

重黄温敏凝胶需在体内以半固体形态存在,且随着处方中黏性物质比例的增加,凝胶强度进一步加大,药物释放较低温时的液体形态发生明显改变。因此,体外溶蚀释放研究对药物的利用和疗效有指导意义。

参考文献:

[1] 何含杰,章怀云,陈丽莉,等.重楼皂苷的药理作用和临床应用研究进展[J].中药材,2014,37(3):527-530.
HE H J,ZHANG H Y,CHEN L L,et al. Research progress on pharmacological action and clinical application of Paris Polyphylla saponins[J]. Journal of Chinese Medicinal Mate-

rials,2014,37(3):527-530.
[2] 王跃虎,牛红梅,张兆云,等.重楼属植物的药用价值及其化学物质基础[J].中国中药杂志,2015,40(5):833-839.
WANG Y H,NIU H M,ZHANG Z Y,et al. Medicinal value and chemical basis of Paris[J]. China Journal of Chinese Materia Medica,2015,40(5):833-839.
[3] 何明生,李秀.重楼药理作用的研究进展[J].世界中医药,2012,7(6):579-582.
HE M S,LI X. Research progress on pharmacological action of Paris Polyphylla[J]. World Chinese Medicine,2012,7(6):579-582.
[4] Yong C S,OH Y K,JUNG S H,et al. Preparation of ibuprofen-loaded liquid suppository using eutectic mixture system with menthol[J]. Eur J Pharm Sci,2004,23(51):347-350.
[5] 熊伟,陈思如,修光辉,等.中药重楼的抗炎作用机制研究进展[J].云南中医中药杂志,2018,39(1):92-94.
XIONG W,CHEN S R,XIU G H,et al. Research progress on anti-inflammatory mechanism of Rhizoma Paridis [J]. Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica,2018,39(1):92-94.
[6] 涂渝娇,蒋蕾,杨亚玲.超临界 CO₂ 萃取重楼偏诺皂苷的工艺研究[J].昆明理工大学学报(自然科学),2018,43(4):98-104.
TU Y J,JIANG L,YANG Y L. Study on supercritical CO₂ extraction of vinoside from Rhizoma Paridis[J]. Journal of the Kunming University of Science and Technology,2018,43(4):98-104.
[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015:260.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing:China Medical Science and Technology Publishing House,2015:260.
[8] 陈锡琨.HPLC 测定宫血宁胶囊中重楼皂苷 I、II、VI 及 VII 的含量[J].中国现代应用药学,2013,30(12):1346-1349.
CHEN X K. Determination of Paris Polyphylla Saponin I ,

II, VI and VII in gongxuening capsule by HPLC[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2013, 30(12): 1346-1349.

[9] 刘佳, 杨亚利, 张鹏, 等. 4种重楼不同部位4种重楼皂苷含量的分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16): 44-48.

LIU J, YANG Y L, ZHANG P, et al. Analysis of Saponin contents in different parts of 4 Paris species [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(16): 44-48.

[10] 许榛云, 杨欣怡, 贾梅琳, 等. 近5年宫血宁胶囊在妇科疾病的应用概况[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(54): 77-79.

XU S Y, YANG X Y, JIA M L, et al. Application of gongxuening capsule in gynecological diseases in recent 5 years[J]. Digest of the World Latest Medical Information, 2017, 17(54): 77-79.

(收稿日期: 2019-12-20)

Determination and release *in vitro* of polyphyllin VI in ChongHuang thermosensitive in situ gel

SUN Yuan^{1,2,3}, DING Jiangsheng^{1,2,3}, WAN Jinfu^{1,2,3}

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 2. Yunnan Baiyao Group Innovation and R&D Center, Kunming 650111, China; 3. Yunnan Province Company Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

Abstract: [Objective] To establish a determination method for the content of polyphyllin VI in ChongHuang thermosensitive in situ gel and to study the release *in vitro*. [Methods] A HPLC-ELSD method was adopted with the CAPCELL PAK C₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase consisting of acetonitrile (A)-water (B) at the flow rate of 1.0 mL/min (0~15 min, 25%~35% A; 15~35 min, 35%~40% A; 35~40 min, 40%~60% A), with the column temperature 25 °C, with the injection volume 10 μL, with the drift tube temperature 92 °C and the carrier gas pressure was 2.9 L/min. [Results] The polyphyllin VI has good linearity in the range of 0.430 0~4.300 0 mg, lgA=1.796 9lgC+4.398 9 (R²=0.999 9), The average recovery rate was 101.70% (RSD=1.17%, n=9). The *in vitro* release study indicated that drug release of polyphyllin VI was best fitted to Higuchi equation. [Conclusion] The established method is proved to be convenient, stable and efficient.

Keywords: Chonghuang thermosensitive in situ gel; polyphyllin VI; *in vitro* release; HPLC-ELSD

.....

·消息·

天津中医药大学校长、主编张伯礼院士武汉前线所作诗词一首

《菩萨蛮·战冠厄》

疫情蔓延举国焦,初二星夜奉国诏。
晓飞江城疾,疫茫伴心悌。
隔离防胜治,中西互补施。
冠魔休猖獗,众志成城可摧灭。