

夏天无提取物基本理化性质研究*

★ 吴安明^{1**} 桂婵² 徐兰² 杨小妹³ 何雁² 简晖^{2***} (1. 江西天施康中药股份有限公司 鹰潭 335000; 2. 江西中医学院 南昌 330004; 3. 深圳市南山区蛇口人民医院 深圳 518067)

摘要:目的:以毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素和巴马汀为指标,测定夏天无提取物的表观溶解度和表观油水分配系数,考察其在高温高湿强光照条件下的稳定性,并研究其粉体学性质。方法:采用摇瓶法测定表观油水分配系数,按中国药典(2010版)原料药稳定性试验指导原则进行影响因素试验。结果:37℃下,介质的 pH 越大,夏天无提取物和 4 个指标成分的表观溶解度越小,但表观油水分配系数越大。高温高湿强光照条件下,4 个指标成分均稳定。夏天无提取物粉末流动性不佳,不易吸湿。结论:建立的方法可准确测定夏天无提取物及其指标成分的表观溶解度和表观油水分配系数等,为夏天无提取物的剂型设计以及其他药学研究提供实验依据。

关键词:夏天无提取物;表观油水分配系数;表观溶解度;稳定性;粉体学性质

中图分类号:R 944.2⁺⁷ **文献标识码:**A

Study on the basic physicochemical properties of *Corydalis decumbens* extract

WU An-ming¹, GUI Chan², XU Lan², YANG Xiao-mei³, HE Yan²

1. Jiangxi Herbi-sky Co. Ltd, Yingtan 335000, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
3. Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China

并且简便,同时充分体现其综合化,宏观化和可量化等优于其他鉴别手段的优势,该法可用以对中药材和中成药进行真伪鉴别,评价原料药材,半成品和成品质量的均一性和稳定性等,本实验同时利用 HPLC-MS 等手段在获得较多结构信息的同时,对当归化学成分进行了初步定性分析,鉴定出 8 个化合物,可为当归化学成分的进一步研究及质量控制提供参考^[6-8]。

通过 HPLC-TOF-MS 确定的精确质量数、可能分子式,并对 HPLC-TRAP-MS_n 可采用正离子模式和负离子模式两种,预实验发现,正离子模式比负离子模式相比出峰多,响应好。这可能与当归中为有机酸,生物碱类的物质,其比较容易形成 $[M+1]^+$ 或 $[M+Na]^+$, 在负离子模式下都有很好的响应,最后确定采用采集正离子模式下的总离子流图。HPLC-TOF/MS, 利用所得化合物离子的精确质荷比进行分子式匹配。

参考文献

- [1] 沈敬仁. 浅谈当归功效[J]. 天津中医, 1996, 13(6): 34.
- [2] 黄伟晖, 宋纯青. 当归的化学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 147-151.
- [3] 韦玮, 龚苏晓, 张铁军, 等. 当归多糖类成分及其理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 130-134.
- [4] 裴媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酞类和萜类成作用的虚拟评价[J]. 中草药, 2010, 41(6): 938-941.
- [5] 陈耀祖, 陈能煜, 马学毅, 等. 当归化学成分分析研究-毛细管气相色谱-质谱法鉴定当归挥发油成分[J]. 高等学校化学学报, 1984, 5(1): 124-148.
- [6] 罗国安. 中药指纹图谱-质量控制与新药研发(第一版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 11-12.
- [7] 乔善磊. 中药色谱指纹图谱相似度评价研究[D]. 第二军医大学药物分析学, 2004, 5.
- [8] 罗国安, 王义明. 中药指纹图谱的分类和发展[J]. 中国新药杂志, 2002, 11: 46-51.

(收稿日期: 2011-11-26)

* 基金项目: 科技人员服务企业行动项目(2009GJC50010)

** 作者简介: 吴安明, 男, 高级工程师, 研究方向: 中药制剂, Tel: 13870107333 E-mail: wuanming0217@163.com

*** 通讯作者: 简晖, 男, 教授, 研究生导师, 研究方向: 中药新剂型, Tel: 13870065130 E-mail: jianhui126@126.com

Abstract: Objectives: To determine the apparent solubility and partition coefficients of *Corydalis decumbens* extractive, and its stability under high temperature, high humidity, bright light conditions by taking bicuculline, protopine, tetrahydropalmatine and palmatine as index; The power properties of *Corydalis decumbens* extractive were also studied. Methods: A high performance liquid chromatography method and shaking flask method were used to detect the concentrations and the partition coefficients of four marker components for the n-octanol-water/buffer solution systems respectively. According to the principles referring to the drug stability in China Pharmacopoeia (2010 Edition), the experiment of influence factors was also carried out. Results: The higher pH value of buffer solutions and n-octanol-water/buffer solution systems was, the apparent solubility of four marker components were bigger, however the apparent oil-water distribution coefficient were smaller. Under high temperature, high humidity and bright light conditions, the four marker components were steady. The flowability of *Corydalis decumbens* extractive power was not good, and the hygroscopicity was low. Conclusions: The methods described in this paper can be used to determine the apparent solubility and the partition coefficient of *Corydalis decumbens* extractive, and can help to provide experiment basis for the dosage form design of *Corydalis decumbens* extractive and other pharmaceutical researches.

Key words: *Corydalis decumbens* extract; apparent solubility; apparent partition coefficient; stability; power properties

夏天无为罂粟科植物状生紫堇 *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. 的干燥块茎,是江西省著名的民间草药,具有活血止痛,舒筋活络,祛风除湿之功效,用于中风偏瘫,头痛,跌扑损伤,风湿痹痛,腰腿疼痛等^[1],主要含有毕枯枯林(bicuculline, BI)、原阿片碱(protopine, PRO)、延胡索乙素(tetrahydropalmatine, THP)、巴马汀(palmatine, PAL)等生物碱。药理实验表明,夏天无生物碱具有增加心肌营养性流量、扩张外周血管、脑血管和下肢血管、对抗血小板聚集、松弛平滑肌、抑制实验性血栓形成、镇静、镇痛等作用,近来有研究报道夏天无总生物碱具有抗胆碱酯酶活性^[2]。为了提高夏天无的疗效,充分发挥夏天无的疗效,我们采用乙醇提取,离子交换树脂精制得到了夏天无提取物(生物碱类成分含量大于50%),药理实验证明具有较好的镇痛消炎等作用。本试验以 BI、PRO、THP、PAL 为指标,对夏天无提取物的基本理化性质如表观溶解度、表观油水分配系数、粉体学性质以及在高温高湿强光照条件下的稳定性进行研究,为夏天无提取物的制剂处方设计和制备工艺研究提供参考。

1 仪器与材料

美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪(配 DAD、低压四元泵、在线脱气装置、自动进样器、Chemstation 工作站)(Agilent 科技有限公司); Milli-Q 纯水处理系统(美国 MILLIPORE 公司); HH-2 型数显恒温水浴锅(金坛市江南仪器厂); AL104-01 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); PB-10 型 pH 酸度计(北京赛多利斯仪器系统有限公司); KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SHZ-82 气浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司); LRH-250-S 恒温恒湿培养箱(广东医疗器械

厂); LS-2000A 低温恒温光照仪(上海黄海药检所); 101-3-BS-II 电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

BI、PRO、THP、PAL 对照品(批号分别为 1022-101019、1369-100918、1361-080213、1024-101019,纯度 >98%,均购至中药固体制剂技术国家工程研究中心); 夏天无提取物(自制,含 BI 4.68%、PAL 2.44%、THP 10.45%、PRO 38.53%); 甲醇(色谱纯,上海振兴化工一厂); 乙腈(色谱纯,山东蜀王实验有限公司); 其他试剂均为分析纯; 配制溶液所用水均为双重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 夏天无提取物和指标成分在不同介质中的表观油水分配系数实验

将蒸馏水与正辛醇混合后室温搅拌 24 h,静置过夜,分层后得水饱和的正辛醇和正辛醇饱和的水。取适量夏天无提取物粉末溶解于被水饱和的正辛醇中,制成药物的正辛醇溶液(精密吸取 1 mL 药物的正辛醇溶液置恒重坩埚内,干燥至恒重,精密称重,记为 m 总)。精密吸取上清液 5 mL 于离心筒中,分别加入正辛醇饱和的水、pH 5、pH 6、pH 7.2、pH 8 磷酸盐缓冲液各 30 mL,封口膜封口后,于 37℃ 恒温振荡器中振摇 48 h,离心(5000 r·min⁻¹, 15 min)后取下层水相,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液按照文献方法进行含量测定^[3],计算夏天无提取物 4 个指标成分的浓度。吸取上层正辛醇液置恒重坩埚内,干燥至恒重,精密称重,记为 m 正。

精密移取 1 mL 药物的正辛醇溶液,氮气吹干,加 10 mL 甲醇,涡旋 5 min,离心(5000 r·min⁻¹, 10 min)后取上清液过微孔滤膜,取续滤液注入 HPLC,按外标法以峰面积计算夏天无提取物 4 个指标成分

的浓度,即为各成分的初始浓度 ρ 。

按下列方程式计算 BI、PRO、THP 和 PAL 的表观油水分配系数(P_{app}):

$$P_{app} = (\rho v - \rho_w v_w) / \rho_w v_w$$

ρ 为 BI、PRO、THP 和 PAL 在正辛醇中的初始浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); v 为被水饱和的正辛醇体积(5 mL); ρ_w 为药物分配平衡时在水相中测得的 BI、PRO、THP 和 PAL 的浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); v_w 为水相体积(30 mL)。

按下列方程式计算夏天无提取物的表观油水分配系数(P_{app})。

$$P_{app} = 5m_{总} / (5m_{总} - m_{正})$$

其中, $m_{总}$ 为 1 mL 药物的正辛醇溶液干燥恒重后,夏天无提取物的重量(g); $m_{正}$ 为样品中正辛醇层夏天无提取物的重量(g)。

夏天无提取物和 4 个指标成分在正辛醇-不同介质中的 $\log P_{app}$ 值见表 1。由表 1 可知,除了蒸馏水外,水相介质的 pH 值越大,夏天无提取物和 4 个指标的成分 $\log P_{app}$ 值越大,说明介质的 pH 会显著影响夏天无提取物和 4 个指标成分的 $\log P_{app}$ 。在蒸馏水中,提取物和各指标成分的 $\log P_{app}$ 值大小顺序为:BI > 提取物 > THP > PAL > PRO,表明 BI 的脂溶性最好。当磷酸盐缓冲液的 pH 小于 7.2 时,THP 的 $\log P_{app}$ 值最大,而 pH 值为 8.0 时,BI 的 $\log P_{app}$ 值最大。

表 1 夏天无提取物和 4 个指标成分在不同溶剂中的 $\log P_{app}$

介质	$\log P_{app}$				
	BI	PRO	THP	PAL	提取物
蒸馏水	1.42	0.01	1.01	0.04	1.33
pH 5.0	0.011	0.05	1.21	0.03	0.67
pH 6.0	0.29	0.05	1.32	0.04	0.87
pH 7.2	1.15	0.12	1.53	0.04	1.23
pH 8.0	1.66	0.50	1.56	0.05	1.54

2.2 夏天无提取物和指标成分在不同介质中的表观溶解度实验

在 10 mL 离心筒中分别加入 9 mL 以下介质:蒸馏水、无水乙醇、pH 5、pH 6、pH 7.2、pH 8 磷酸盐缓冲液。取过量夏天无提取物加入离心筒中,放置于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温培养振荡器中振摇 96 h,于 24、48、72、96 h 分别取适量上清液 1.5 mL,经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,精密移取续滤液 1 mL 置恒重坩埚内,干燥至恒重,精密称重,记为 $m_{总}$ 。另外取续滤液按照上述色谱条件测定各个时间段夏天无提取物中 4 个指标成分的浓度。另精密移取 1 mL pH 5、pH 6、pH 7.2、pH 8 空白磷酸盐缓冲液置恒重坩埚内,干燥至恒重,精密称量,记为 $m_{盐}$,则提取物的重量等

于 $m_{总}$ 减 $m_{盐}$ 。

夏天无提取物和 4 个指标成分在不同介质中的表观溶解度见表 2。样品振摇 96 h 后,夏天提取物和 4 个指标成分的溶解度在不同介质中均达到平衡。夏天无提取物和 4 个指标成分在无水乙醇中的表观溶解度最大,指标成分溶解度的大小顺序为 PRO > BI > THP > PAL,但在蒸馏水中的表观溶解度最小。磷酸缓冲溶液的 pH 值越大,夏天无提取物和指标成分的表观溶解度越小。

表 2 夏天无提取物和指标成分在不同溶剂中表观溶解度

介质	表观溶解度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$				提取物
	BI	PRO	THP	PAL	
pH5.0	786.24	6569.64	830.01	268.73	12.65
pH6.0	190.33	2292.39	203.19	109.98	4.63
pH7.2	36.69	481.74	30.47	44.56	3.85
pH8.0	17.52	219.57	13.66	31.48	2.95
无水乙醇	3047.06	4921.26	2604.08	364.45	12.30
蒸馏水	15.89	129.35	19.23	22.91	0.95

2.3 夏天无提取物粉体学基本性质的测定

2.3.1 振实密度的测定 取过 100 目筛的夏天无提取物粉末适量,精密称重后转移至 10 mL 量筒内,然后将量筒自 10 cm 高度处自然下落到垫有泡沫的实验台上,直至粉末体积不再变化为止,读取其容积 V1,用量筒中样品量 W1 除以最后容积,计算样品的振实密度,重复操作 6 次,取平均值,计算得出夏天无提取物粉末振实密度的平均值为 0.84 g/cm^3 。

2.3.2 堆密度的测定 取过 100 目筛的夏天无提取物粉末适量,精密称重后转移至 10 mL 量筒内,不施加任何外力,读取其容积 V2,用量筒中样品量 W2 除以最后容积,计算样品的堆实密度,重复操作 6 次,取平均值,计算得出夏天无提取物粉末堆密度的平均值为 0.42 g/cm^3 。

2.3.3 休止角的测定 采用固定漏斗法测量夏天无提取物粉末的休止角:将三个漏斗串联并固定于水平放置的坐标纸上 1 cm 高度处,将已过 100 目筛的夏天无提取物粉末沿漏斗壁倒入最上的漏斗中,直到坐标纸上形成的粉末圆锥体尖接触到最下面的漏斗口为止,由坐标纸测出圆锥底部的直径(2R),测定其堆高 H,根据 $\tan \theta = H/R$ 求出休止角,重复操作 6 次,求平均值。结果测得夏天无提取物粉末的休止角为 50.40° 。休止角 $\theta < 30^\circ$ 时流动性很好, $\theta > 45^\circ$ 时流动性差, $\theta \leq 40^\circ$ 时可以满足生产过程中流动性的需求,而本实验测得的休止角 $\theta > 45^\circ$,表明夏天无提取物粉末流动性不佳。

2.4 稳定性影响因素试验

参照 2010 年中国药典第二部附录 XI X C 中关于原料药稳定性试验指导原则对杏香兔耳风提取物

进行影响因素试验^[3]。

夏天无提取物中4个指标成分在高温、高湿、强光照射环境中的含量变化见表3。由表3可知,样品在高温、高湿、强光照射条件下放置10天后,夏天无提取物中4个指标成分的含量变化不显著,说明夏天无提取物对光、湿、热不敏感。在相对湿度为95%的环境下,提取物的吸湿率小于0.15%,说明提取物不易吸湿,且提取物粉末的外观无明显变化,提示夏天无提取物中4个指标成分的稳定性较好。

表3 BI、PRO、THP和PAL在高温高湿强光照射条件下含量变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

条件	第5天降解残存百分率/%			
	BI	PRO	THP	PAL
高温	100.6 ± 23.41	99.41 ± 1.83	97.3 ± 2.42	98.34 ± 13.64
强光	100.84 ± 0.86	96.23 ± 5.40	95.63 ± 2.48	97.42 ± 6.53
高湿	101.99 ± 6.36	97.93 ± 4.09	102.27 ± 5.74	99.73 ± 2.17
条件	第10天降解残存百分率/%			
	BI	PRO	THP	PAL
高温	99.8 ± 2.04	100.52 ± 0.67	101.7 ± 1.16	99.88 ± 2.41
强光	102.25 ± 3.55	98.46 ± 6.19	99.34 ± 6.45	103.03 ± 2.55
高湿	102.01 ± 2.34	95.81 ± 1.58	95.11 ± 1.88	102.73 ± 4.83

3 讨论

夏天无提取物的成分复杂,限于条件限制,不能对其中成分逐一测定。本实验测定了夏天无提取物和4个指标成分的表现溶解度和表现油水分配系数。采用重量法测定夏天无提取物在介质中的含量,对提取物的表现溶解度和表现油水分配系数有了初步了解,而用HPLC法测定介质中4个指标成分的含量,能够准确测定4个指标成分的表现溶解度和油水分配系数。综合两者实验结果,更有助于了解夏天无提取物的基本性质,可为选择制剂处方与工艺、确定溶出度测定方法、预测口服吸收行为提供参考。

表现溶解度结果表明,夏天无提取物在蒸馏水中几乎不溶,4个指标成分表现溶解度的大小为THP > PAL > THP > BI。夏天无提取物和4个指标成分的表现溶解度随介质pH值的减小而增加,但增加的程度不同,是因为4个指标成分的碱性大小不同,在酸性环境中可成盐,溶解度提高。夏天无提取物和4个指标成分在无水乙醇中的表现溶解度明

显大于水,表明夏天无提取物有一定的亲脂性。

细胞膜的类型要求药物只有透过类脂膜才能容易被体内吸收,故药物的脂溶性是药物吸收重要影响因素,而药物的脂溶性取决于它本身的分子结构及所处pH条件下的分子型比例^[4,5]。表现溶解度和表现油水分配系数结果表明,夏天无提取物中4个指标成分为弱碱性。当pH值较大时,指标成分以游离碱分子型为主,溶解度减小,油水分配系数增大,即脂溶性提高;当pH较小时,指标成分以离子型为主,溶解度增大,油水分配系数减小,即脂溶性降低,可预测夏天无提取物的口服吸收与pH值密切相关。

粉体学基本性质的测定可为制剂的处方工艺设计提供重要的试验依据,流动性会影响粉体的产品质量均匀性,堆密度的大小会影响粉体的充填性。试验研究结果表明,夏天无提取物粉末休止角为50.40°,振实密度为0.84 g/cm³,说明夏天无提取物流动性欠佳,堆密度较小,在制剂工艺中可能会出现充填不均匀,重量差异较大等问题,故在处方设计时,可通过制粒或加入适量的助流剂等方法予以预防。稳定性影响因素试验表明,高温、高湿、强光照射对夏天无提取物指标成分的含量变化无显著影响。因夏天无提取物是经离子交换树脂精致纯化后得到,除去了大部分多糖、蛋白类、鞣质等易吸潮成分,因此夏天无提取物粉末不易吸潮。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 982.
- [2] 盛瑞, 顾振纶, 蒋航, 等. 夏天无对小鼠学习记忆及脑内乙酰胆碱酯酶的影响[J]. 中草药, 2003, 34(6): 543-545.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录176.
- [4] 王亚乐, 贾晓斌, 陈彦, 等. 淫羊藿苷平衡溶解度和表现油水分配系数的测定[J]. 中华中医药杂志, 2008, 9: 779-780.
- [5] 王英姿, 任天池, 孙秀梅. 高乌甲素的油水分配系数及透皮吸收速率常数的相关性研究[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(2): 155-156.

(收稿日期: 2012-01-12)