

# 基于生物热动力学表征的中药固体制剂体外溶出度分析方法初步研究

黄 雪<sup>1,2</sup>, 袁海龙<sup>1\*</sup>, 肖小河<sup>1\*</sup>, 张甜甜<sup>1,2</sup>

(1. 解放军第三〇二医院, 解放军中药研究所, 北京 100039; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 610075)

**摘要:** 本文采用微量量热法从生物热活性角度、结合 UPLC 法, 首次探讨生物检测中药固体制剂体外溶出度的可行性, 旨在弥补单纯化学方法难以客观反映中药固体制剂溶出度检测的不足。以银黄片为模型药, 考察在 pH 6.8 (磷酸盐缓冲液) 溶出介质中, 不同溶出时间的银黄片溶出液对金葡萄菌抑制作用, 测定金葡萄菌生长代谢热曲线特征谱图, 得到一系列生物热动力学参数, 提出基于生物热活性所得银黄片的累积溶出度, 并与 UPLC 法测定绿原酸和黄芩苷两个指标成分所得的溶出度运用  $f_2$  相似因子法进行相关性评价。结果显示,  $f_2$  相似因子均大于 50, 表明两方法所测的溶出度具有较好的相关性。生物热活性检测有望成为中药固体制剂的体外溶出度评价手段之一。

**关键词:** 中药固体制剂; 溶出度; 生物热活性; 银黄片

中图分类号: R939.9

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 03-0338-05

## An *in vitro* analytical method based on bio-thermal activity for the determination of dissolution rate of Chinese medicine solid preparation

HUANG Xue<sup>1,2</sup>, YUAN Hai-long<sup>1\*</sup>, XIAO Xiao-he<sup>1\*</sup>, ZHANG Tian-tian<sup>1,2</sup>

(1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 100075, China)

**Abstract:** To explore the new pattern of Chinese medicine solid preparations (CMSP) *in vitro* dissolution, a method testing the bio-thermal activity in combination with UPLC was used. Microcalorimetry was used to obtain the characteristic metabolic growth power-time curves and a series of biothermodynamic parameters of the inhibition of *Staphylococcus aureus* by Yinhuang tablet dissolving solutions at the pH 6.8 (phosphate buffer) dissolution medium at different times. From these results, the cumulative dissolution of Yinhuang tablet based on bio-thermal activity was obtained. The dissolution rates of two components of chlorogenic acid and baicalin were determined by UPLC method. Then  $f_2$  similar factor method was used to evaluate the relevance of these two methods. The result showed that  $f_2$  values all were more than 50, indicating that there is a good correlation between the two methods of measuring the dissolution rate. It is feasible to determine CMSP *in vitro* dissolution by using bio-thermal activity, and to provide new evaluation methods for controlling the quality of CMSP.

**Key words:** Chinese medicine solid preparation; dissolution rate; bio-thermal activity; Yinhuang tablet

自 1967 年由美国首先开展溶出度试验后, 溶出度现已成为评价制剂处方和生产工艺的重要手段,

是直接影响药物在体内的吸收和利用、评价药物质量的内在指标<sup>[1]</sup>。中药固体制剂的溶出度评价鲜有报道, 对其体外溶出度测定, 主要借鉴化学药质量控制模式, 集中于单个或少数指标成分的化学分析研究。对于化学药品而言, 含量测定可以直接关联药效, 反映化学药品的内在质量。但是对于中药复方固体制剂, 其药效是多成分共同作用的结果, 检测一种或几

收稿日期: 2009-08-08.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09502-022); 国家杰出青年科学基金 (30625042).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66933324, E-mail: yhlpharm@126.com

Tel: 86-10-66933322, E-mail: pharmacy302@126.com

种指标成分,可能与整体药效出现偏差,从而不能完全衡量中药固体制剂的质量<sup>[2]</sup>。因此,为了寻求中药固体制剂体外溶出度分析方法的新突破,作者尝试从生物活性评价的角度,在药物成分的化学分析基础上,建立化学分析-生物效价相关联的检测方法,以期客观表征中药固体制剂的体外溶出度。

生物效价检测方法选取应遵循“相关性、重复性、灵敏性、适用性和定性定量”的原则。基于生物热力学的微量热分析 (microcalorimetry) 具有快速、定量、灵敏和客观的特点,是一种较好的生物活性评价方法,主要用于研究生命体系的热力学过程以及化学反应的微量热量变化的生物热力学效应,实时、在线、准确地得到生命体生长代谢热曲线特征谱图,具有良好的重现性和明显的特征性,可作为研究中药固体制剂溶出度的新方法<sup>[3]</sup>。本研究以银黄片为模型药,以其抑菌活性为着眼点,将 UPLC 法与微量量热法结合,考察在磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 溶出介质下,银黄片溶出液对金葡菌的抑制作用,并绘制细菌生长抑制率-溶出时间 ( $I-t_d$ ) 曲线。同 UPLC 法测定活性成分溶出度运用  $f_2$  相似因子法进行相关性评价<sup>[4]</sup>,初步探讨基于生物热动力学对银黄片体外溶出度生物效价检测的可行性,以期为银黄片建立质量标准,为中药固体制剂的质量控制提供研究基础。

## 材料与方 法

**仪器与试剂** 美国 Waters Acquity UPLC™ system (Waters, Milford, MA, USA) 超高压液相色谱仪;瑞典 Thermometric 公司产的 TAM Air Isothermal Calorimeter 微量量热仪;智能溶出实验仪 ZRS-8G (天津大学无线电厂)。银黄片 (江西心诚药业有限公司,批号 20080301);绿原酸对照品 (批号 110753-200413) 和黄芩苷对照品 (批号 110715-200514) 均购自中国药品生物制品检定所;金葡菌 (*Staphylococcus aureus*, CCTCC AB910393) 由中国药品生物制品检定所提供;乙腈 (加拿大 Promptar 有限公司),水为二次重蒸水,其余试剂均为分析纯。

**培养基的制备** 采用 LB 液体培养基,取氯化钠 5 g,酵母膏 5 g,蛋白胨 10 g,溶解于蒸馏水 1 L 中,调至 pH 7.0~7.2 后分装。121 °C 高压蒸气灭菌 30 min,冷却后放置 4 °C 冰箱中备用。

**溶出度测定** 采用小杯法<sup>[5]</sup>,以脱气处理的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液,以 75 r·min<sup>-1</sup> 为转速,温度 37 °C。取本品 6 片,精密称重 ( $W_i$ ),于 6 个溶出杯中分别投

入 1 片待测药品,当药片接触溶出介质开始计时,分别于 10、20、30、45、60 和 90 min,取样 5 mL,同时补加等量同温溶出介质,备用 (样品 1、2、3、4、5 和 6)。

**比较 A 值的测定** 精密称取样品 10 片,研细后精密称取相当于平均片重一片的样品量 ( $W$ ),置于 250 mL 量瓶中,加入以脱气处理的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液约 200 mL,超声处理 20 min,取出,放冷,加同一溶剂至刻度,摇匀,备用 (样品 7)。

**UPLC 法色谱条件** 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (50 mm × 2.1 mm ID, 1.7 μm);流动相为 0.1% 磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B),梯度洗脱 (0 → 1 min, 10% → 11% B; 1 → 1.5 min, 11% → 16% B; 1.5 → 3 min, 16% → 18% B; 3 → 4 min, 18% → 20% B; 4 → 5 min, 20% → 22% B; 5 → 8 min, 22% → 32% B);流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>;室温检测,波长为 320 nm<sup>[6]</sup>。

**对照品溶液的制备** 精密称取绿原酸对照品适量置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇使溶解并稀释至刻度,得绿原酸对照品溶液质量浓度 3.7 μg·mL<sup>-1</sup>;另精密称取黄芩苷对照品适量置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇使溶解并稀释至刻度,得 9.1 μg·mL<sup>-1</sup> 黄芩苷对照品溶液。0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液,备用。

**供试品溶液的制备** 分别取 7 个样品药液 1 mL 置 7 个 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,0.22 μm 滤膜过滤,取续滤液,进样 5 μL,测定峰面积值  $A_i$  和  $A$ ,计算相对累积溶出百分率<sup>[7,8]</sup>。

平均累积溶出百分率 (%) =  $(A_i \times W) / (A \times W_i) \times 100\%$

**银黄片溶出度的生物热活性测定** 在恒温 37 °C 下,采用微量量热法测定。先将金葡菌接种到蛋白胨培养基中形成悬浮液 (细胞  $2 \times 10^6$ ·mL<sup>-1</sup>),分别与 7 个样品药液 300 μL 混合后,一并加入安瓿瓶中,置于量热计的测定通道中。在约 30 min 后待安瓿瓶达到 37 °C 时,以 PicoLog TC-80 工作站实时记录热谱曲线,直到曲线回到基线时停止。

**数据处理** 生物热动力学数据用生物热活性检测仪配置的 Pico TC-80 数据采集和 Origin 软件 (美国 Origin Lab 公司) 分析进行线性拟合。

## 结 果

### 1 UPLC 法对银黄片溶出度测定

对 UPLC 实验条件进行方法学考察,结果表明,仪器的精密度、稳定性和方法的重现性良好,RSD 均小于 2.0%,且空白无干扰;按“UPLC 法色谱条件”

项下操作, 记录银黄片不同时间点的溶出液 8 min 内的色谱图, 求算银黄片不同时间的平均累积百分溶出率, 结果见表 1。

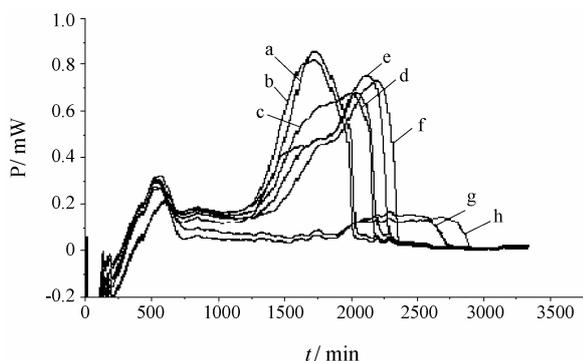
**Table 1** Dissolution rate of the accumulation of Yinhuang tablet ( $n = 6$ )

Time/min	Percentage of dissolution /%	
	Chlorogenic acid	Baicalin
10	21.45	31.47
20	35.70	50.47
30	49.74	54.15
45	68.10	58.66
60	75.78	64.34
90	76.44	66.92

**2 生物热动力学法对银黄片溶出度测定**

**2.1 金葡菌生长代谢产热曲线** 在 37 °C 下, 采用安瓿法测定了金葡菌生长代谢产热曲线, 见图 1。在相同的实验条件下, 重复实验 6 次, 结果有良好的重现性。结果表明, 银黄片在不同溶出时间下, 对金葡菌的生长代谢产热均不相同。这是因为银黄片含绿原酸和黄芩苷等有效成分, 有较强的抑菌作用, 随着溶出时间的延长, 药液所含有有效成分的浓度依次增大, 抑菌作用相比空白组 (曲线 a) 逐步明显, 金葡菌的产热时间逐渐延迟且产热量随之减小, 所以导致金葡菌的生长代谢产热曲线各不相同。其中曲线 g 和曲线 h 由于有效成分浓度高, 抑菌作用较其余曲线更为明显, 传代时间延长多, 最大产热功率较小。结果表明不同浓度的药液对金葡菌生长代谢存在较稳定的差异。

**2.2 金葡菌生长速率常数  $k$  确定** 由于安瓿瓶中特殊生长环境, 细菌的整个生长过程处于恒温恒压的



**Figure 1** Thermal power-time curves of *Staphylococcus aureus* growth at different dissolution times of Yinhuang tablet at 37 °C. a: Control; h: A value of comparison (sample 7). b-g refers to the dissolution sample in 10 min (sample 1), 20 min (sample 2), 30 min (sample 3), 45 min (sample 4), 60 min (sample 5), and 90 min (sample 6), respectively

条件下, 养分和氧气的供应量有限。然而, 在运用微量热技术研究细菌的生长动力学时发现, 在新鲜培养基中, 当接种量很小时, 生长初期能近似满足无限制生长条件, 热曲线呈现出指数生长特征。据此, 在分析细菌指数生长期热曲线的基础上, 建立了细菌生长的热动力学模型, 即在细菌细胞的生长过程中, 其指数生长期内的产热功率与培养时间之间符合公式:  $P_t = P_0 \cdot \exp(kt)$  或  $\ln P_t = \ln P_0 + kt$  ( $P_0$ 、 $P_t$  分别是细菌在指数生长的起始点和  $t$  时的热功率)。从金葡菌的热谱曲线可以直观地得到指数生长期的最大发热功率 ( $P_m$ )。将热谱曲线上指数生长期的  $P_t$ 、 $t$  值代入 Origin 软件, 线性拟合可得金葡菌指数生长期的生长速率常数 ( $k$ ),  $k$  反映细菌增值的速度<sup>[9]</sup>。对金葡菌重复 6 次实验, 其指数生长期的  $k$  值 RSD 小于 1%, 表明结果有很好的重现性和相关性。以  $P_m$  对  $k$  进行线性拟合,  $P_m$  与  $k$  的关系式为:  $P_m = 473.7k - 0.009$ ,  $r = 0.9803$ 。 $P_m$  与  $k$  呈正相关, 线性关系良好。将  $k$  对  $t_d$  作线性回归, 并对  $k-t_d$  数据进行线性拟合, 得到  $k$  与  $t_d$  之间的关系式为:  $k = -6 \times 10^{-6}t_d + 0.001$ ,  $r = 0.9854$ 。结果表明银黄片作用于金葡菌, 随着溶出时间的延长, 金葡菌的生长均受到抑制, 指数生长期的  $k$  依次减小。

**2.3 细菌生长抑制率  $I$  确定** 细菌生长抑制率  $I$  定义<sup>[10, 11]</sup>为:  $I\% = [(k_1 - k_2)/k_1] \times 100\%$  ( $k_1$  为空白对照组细菌的生长速率常数,  $k_2$  为试药组的生长速率常数), 7 个样品药液对金葡菌的生长抑制率见表 2。结果显示不同溶出时间点均能对金葡菌有抑制作用, 样品 7 被近似看作银黄片完全溶解的比较 A 值, 对金葡菌的生长抑制速率是 37.16%, 而其余 6 个样品溶出液对其细菌的生长抑制率均小于样品 7 (比较 A 值), 并且随着时间的延长, 溶出的药液浓度逐渐增大, 其抑菌作用逐步增强, 与用化学方法所得结果相似, 由此

**Table 2** Thermokinetics parameters of *Staphylococcus aureus* growth and the dissolution rate at 37 °C ( $n = 6$ )

Sample	$t_d$ /min	$t_p$ /min	$P_m$ /mW	$k$ /min <sup>-1</sup>	$r$	$I$ /%	Dissolution rate/%
Control	-	1 708	0.823 8	0.001 83	0.995 5	-	-
1	10	1 715	0.809 9	0.001 70	0.992 6	7.10	18.96
2	20	1 996	0.636 4	0.001 62	0.994 7	11.48	30.63
3	30	2 033	0.680 5	0.001 53	0.991 6	16.39	43.76
4	45	2 117	0.715 3	0.001 43	0.991 3	21.86	58.35
5	60	2 190	0.734 8	0.001 34	0.992 1	26.78	71.48
6	90	2 297	0.589 3	0.001 29	0.993 6	29.51	78.77
7	-	2 300	0.266 7	0.001 15	0.993 8	37.16	-

1-7: Yinhuang tablet sample

**Table 3** Comparison of the biological value and chlorogenic acid and baicalin at different dissolution times

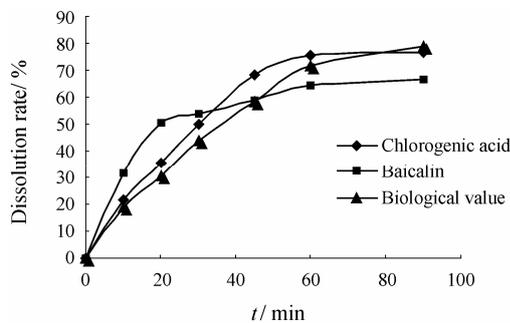
Time /min	Chlorogenic acid /%	Baicalin /%	Biological value/%	C&B			B&B		
				Sum of square	Q value	$f_2$ value	Sum of square	Q value	$f_2$ value
10	21.45	31.47	18.96	6.185			156.425		
20	35.70	50.47	30.63	25.679			393.525		
30	49.74	54.15	43.76	35.751			107.936		
45	68.10	58.66	58.35	95.108	186.675	62.33	0.098	156.425	64.19
60	75.78	64.34	71.48	18.525			50.921		
90	76.44	66.92	78.77	5.426			140.407		

C&B: Comparison between the dissolution rate of chlorogenic acid and biological value; B&B: Comparison between the dissolution rate of baicalin and biological value

初步得出银黄片的体外溶出度可以透过生物热活性直观反映并在线检测。

**2.4 基于生物热效应的银黄片体外溶出度** 基于常规化学分析, 计算中药固体制剂平均累积百分溶出率的方法, 运用生物热动力学参数 (细菌生长抑制率  $I$ ), 提出生物热活性测定中药固体制剂的体外溶出度, 结果见表 2。溶出度 (%) =  $(I_i \times W) / (I_A \times W_i) \times 100\%$ 。

**2.5  $f_2$  相似因子法** 比较 UPLC 分析方法同生物热效应两者所绘制的累积溶出曲线相关性 (图 2)。如果  $50 \leq f_2 \leq 100$ , 则表示两方法所测的溶出度相似<sup>[12]</sup>, 结果见表 3。生物效价分别与银黄片的两个指标成分的溶出度进行  $f_2$  相似因子比较, 结果显示均大于 50, 表明两方法所测的溶出度具有较好的相关性。



**Figure 2** The dissolution rate curve of the accumulation based on chemical analysis and bioassay at different dissolution times

## 讨论

本实验所选择的模型药银黄片, 仅由金银花和黄芩两味中药组成, 其化学指标成分基本明确, 通过常规化学分析方法, 能较直接反映该中药固体制剂的溶出度情况。考察在 4 种基本溶出介质 (pH 1.2 溶液、pH 4.0 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和水) 条件下银黄片的绿原酸和黄芩苷溶出度, 在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中银黄片的溶出值最大, 同时考虑到样品溶解性和漏槽条件, 选择小杯法且在 pH 6.8 磷

酸盐缓冲液下测其溶出度。对照紫外扫描图谱可知绿原酸、黄芩苷分别在 327 及 278 nm 处有最大吸收, 考虑绿原酸含量仅为黄芩苷 1/10 左右, 为使绿原酸有较大响应值, 检测波长在黄芩苷的另一吸收峰 318 nm 附近选取, 故选择 320 nm 为检测波长<sup>[6]</sup>, 测定银黄片的两个指标成分。同时从生物热活性的角度, 用已知的溶出时间  $t_d$  代替未知的药液浓度  $C$ , 透过“化学”成分看“药效”本质, 实时、在线、微量、灵敏地评价银黄片的质量变化, 其生物效价分别与银黄片的两个指标成分的溶出度进行  $f_2$  相似因子比较, 均大于 50, 表明两方法所测的溶出度具有相关性, 初步判定运用生物热活性评价银黄片的体外溶出度是可行的, 能较客观地反映其药物的体外溶出度。

针对银黄片的生物活性而言, 抗菌活性是其主要药理活性, 采用金葡萄菌为模式菌的生物热活性图谱能够较好反应其药效。当然, 复方中药的药理活性是多种多样的, 每种活性检测方法都有其适用范围。本课题组研究表明, 生物热活性法通过模式生物体的改变, 可以应用于抗菌、抗病毒及免疫调节等中药<sup>[13, 14]</sup>, 相关工作将陆续报道。生物热动力学分析有望成为中药固体制剂体外溶出度研究的重要评价手段之一, 以期化学和生物关联并用, 共同控制中药固体制剂质量。

## References

- [1] Xie MF. Dissolution *in vitro* and bioavailability *in vivo* [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2005, 36: 447-451.
- [2] Jing TL, Huo HR. Pay great attention to study on integration effects of multi-component of traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol: Mod Tradit Chin Med (世界科学技术: 中医药现代化), 2003, 5: 1.
- [3] Li X, Liu Y, Wu J, et al. The action of the selenomorpholine compounds on *Escherichia coli* growth by microcalorimetry [J]. J Therm Anal Calorim, 2002, 67: 589.

- [4] Guidance for industry — bioavailability and bioequivalences studies for orally administered drug products: general considerations[EB/OL]. Rockville, MD: FDA, 2003. [2009-04-28]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>.
- [5] China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2005 ed. Part I. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 598-599.
- [6] Chen XQ, Li LS, Yang HR, et al. Simultaneous HPLC determination of chlorogenic acid and baicalin in Yinhuang preparations [J]. Chin Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27: 52-54.
- [7] Xia XJ, Tao ZH, Ren Y, et al. Preparation and *in vitro* study of buagafuran solid dispersions [J]. Acta Pharm Sin (药学期刊), 2008, 43: 548-552.
- [8] Xin X, Lu HY. Investigation on the dissolution rate of Yinhuang tablets *in vitro* [J]. Res Pract Chin Med (现代中药研究与实践), 2004, 18: 48-50.
- [9] Zhao YL, Wang JB, Xiao XH. Biothermodynamic characteristics of Radix Isatis by microcalorimetry [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38: 193-196.
- [10] Liu Y, Liang HG, Qu SS, et al. Kinetics of the action of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on *Bacillus subtilis* growth as studied by microcalorimetry [J]. Chin J Chem, 2002, 20: 117-122.
- [11] Zhao RM, Liu Y, Qu SS, et al. Microcalorimetric study of the action of Ce (III) ions on the growth of *E. coli* [J]. Biol Trace Elem Res, 2002, 86: 167-175.
- [12] Xia JH, Liu CX. Evaluation of dissolution testing statistics *in vitro* of solid drug preparation [J]. Chin Pharm J (中国药学期刊), 2000, 35: 130-131.
- [13] Zhou DL, Yan D, Li BC, et al. Investigation of metabolic action of *Cordyceps sinensis* and its cultured mycelia on *Escherichia coli* by microcalorimetry [J]. Acta Pharm Sin (药学期刊), 2009, 44: 640-644.
- [14] Zhao YL, Shan LM, Jin C, et al. Study on quality evaluation of Radix Isatis based on analysis of biothermic activity [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2008, 31: 743-747.

---

### 关于推荐 2010 年中国药学会-赛诺菲安万特青年生物药物奖的通知

中国药学会-赛诺菲安万特青年生物药物奖是中国药学会与赛诺菲-安万特公司共同设立的青年生物药物奖,旨在奖励中国优秀青年生物药物工作者,致力于生物药物新药研究。该奖项面向全国,从 2009 年起每年评选一次,每次奖励 5 至 8 名从事生物药物研究的青年学者,奖励金额为每人 20 000 元人民币(含税),同时颁发奖杯和证书。有关评奖条件、申报方式和推荐材料要求等事宜可从中国药学会网站([www.cpa.org.cn](http://www.cpa.org.cn))查询相关通知。

申报时间: 2010 年 4 月 30 日前,以邮戳为准。

联系方式:

地 址: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1802 室; 邮 编: 100022

联系人: 孙文虹 (010-58699275-819); E-mail: [sunwenhong2002@163.com](mailto:sunwenhong2002@163.com)