

## · 中药工业 ·

荷叶中荷叶碱的溶出度考察<sup>△</sup>

韩婷婷, 任晓亮\*, 任德飞, 王萌

(天津中医药大学 中药学院, 天津 300193)

**[摘要]** 目的: 考察药材粒径、溶液 pH 对荷叶中荷叶碱溶出度的影响; 方法: 采用 HPLC 法考察药材粒径、溶液 pH 对荷叶碱溶出规律, 并采用 Weibull 模型、相似因子法对其数据进行处理并评价其溶出曲线; 结果: 荷叶碱的溶出量随时间延长而增加, 溶出量为中粉 > 细粉 > 最细粉 > 粗粉。在不同缓冲溶液中溶出量为 pH 1.2 > pH 4.5 > 水 > pH 6.8。结论: 以荷叶碱为模型, 考察粒径和溶液 pH 对其溶出度的影响, 从动力学角度描述药材提取过程, 以期对中药开发和应用提供方法和思路。

**[关键词]** 荷叶碱; 溶出度; 荷叶; Weibull 模型

## Study on Dissolution of Nuciferine in Lotus Leaf

HAN Ting-ting, REN Xiao-liang\*, REN De-fei, WANG Meng

(Tianjin University of traditional Chinese medicine, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of particle size and pH on the dissolution of nuciferine. **Methods:** The effects of pH and the particle size of medicinal material on the dissolution of nuciferine were studied by HPLC. The Weibull model and similar factor method were used to process the data and evaluate the dissolution curve. **Results:** The amount of dissolution of nuciferine increased with time, the descending order was powder, fine powder, coarse, most fine. With the decrease of pH, the amount of dissolution increased. **Conclusion:** Research on dissolution from the perspective of biopharmaceutical may provide reference for grinding degree and extraction process.

**[Keywords]** nuciferine; dissolution; lotus leaf; Weibull model

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180507001

荷叶为睡莲科植物荷叶 *Nelumbo nucifera* Gaerth. 的干燥叶, 味苦涩, 性平, 其作为天然有效的保健食品和药物, 越来越受到人们的青睐。荷叶中含有的荷叶碱是一种阿朴啡型生物碱, 药理研究表明其为荷叶中主要的降脂成分<sup>[1]</sup>。中药材的有效成分含量直接影响中成药和中药饮片的质量。在中药中, 有效成分从药材中转移至提取液中, 除受溶解度的影响, 还受溶出度的影响。本实验对不同粒径荷叶粉体中荷叶碱的体外溶出度进行研究, 考察在不同粒径、pH 下溶出规律, 并采用 Weibull 模型进行拟合, 初步探讨粉碎度及 pH 对有效成分溶出度的量变关系。采用相对较正因子法( $f_2$ )对不同条件下的溶出曲线进行相似性评价, 以期对中药开发和应用提供方法和思路。

## 1 材料

## 1.1 药品

对照品荷叶碱(批号: 111566-2000703, 含量 99.7%)购于中国食品药品检定研究院。

药材: 荷叶(产地: 山东), 为莲 *Nelumbo nucifera* Gaerth. 的叶(鉴定专家: 天津中医药大学, 李天祥教授)。

## 1.2 试剂

甲醇(美国 sigma 公司, 色谱纯); 乙醇(天津市康科德科技有限公司, 分析纯); 甲酸(天津化学试剂批发公司, 分析纯); 蒸馏水(屈臣氏集团有限公司)。

<sup>△</sup> [基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473543)

\* [通信作者] 任晓亮, 副教授, 研究方向: 药物分析; Tel: (022)59596221, E-mail: xiaoliang\_ren@sina.com

### 1.3 仪器

Waters ACQUITY UPLCTM 超高效相色谱仪, 美国 Waters 公司; Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪, 日本 Shimadzu 公司; TG16-WS 台式高速离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; S312-90 电动搅拌器, 山海申生科技有限公司; PB-10 pH 计, 德国 Sartorius 公司; BT125D 十万分之一天平, 德国 Sartorius 公司; 2、4、5、6、7 号药典筛, 浙江上虞市五星冲压筛具厂。

## 2 方法与结果

### 2.1 粒径、pH 值对荷叶中荷叶碱体外溶出度的影响

#### 2.1.1 色谱条件及方法学考察

2.1.1.1 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC BEH shield RP18(2.1 × 100 mm, 1.7 μm) (Waters 科技有限公司)

流动相: B 为甲醇, A 为 0.1% 甲酸-水, 进样量: 3 μL; 流速: 0.2 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 45 °C。检测波长: 270 nm。荷叶碱的保留时间为 5.64 min。

2.1.1.2 对照品的配制 称取荷叶碱对照品 4.03 mg 于 5 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容制成 0.806 g · L<sup>-1</sup> 的对照品贮备液。

2.1.1.3 标准曲线的绘制 取对照品溶液适量, 加甲醇配制成 0.787 1 μg · mL<sup>-1</sup> 至 50.38 μg · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 进样分析并记录峰面积。以对照品质量浓度 C(μg · mL<sup>-1</sup>) 为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标, 以最小二乘法求得回归方程, 荷叶碱回归方程  $Y = 45\,441X - 4\,523.4$  ( $r = 0.999\,9$ ), 结果表明荷叶碱在 0.787 1 ~ 50.38 μg · mL<sup>-1</sup> 线性关系良好。

2.1.1.4 精密度试验 精密吸取细粉样品, 连续进样 6 次, 以峰面积计, RSD 为 0.4%, 表明仪器精密度良好。

2.1.1.5 重复性试验 取荷叶细粉 10 g, 精密称定, 分别置于溶出杯中, 浆降入溶出介质中, 以脱气纯净水 900 mL 为溶出介质, 温度为 (37.0 ± 0.5) °C, 转速为 100 r · min<sup>-1</sup>, 搅拌 2 h, 吸取溶液 2 mL, 离心取上清液, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 按照“2.1”项色谱条件测定, 平行 6 份, RSD 为 2.6%, 重复性良好。

2.1.1.6 稳定性试验 取“2.1.1.5”项下配制好的溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定, RSD% 为 2.7%, 样品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.1.7 加样回收率 向配制好的样品溶液中加入一定量荷叶碱对照品, 测定其含量, 测得荷叶碱加样回收率为 96.98%, RSD 为 2.3%, 符合方法学要求。

2.1.2 不同粒径荷叶粉体制备 取荷叶药材适量, 经粉碎机粉碎过筛得粗粉、中粉、细粉、最细粉:

粗粉(全过 2 号筛, 能通过 4 号筛的为 20%);

中粉(全过 4 号筛, 能通过 5 号筛的为 30%);

细粉(全过 5 号筛, 能通过 6 号筛的为 97%);

最细粉(全过 6 号筛, 能通过 7 号筛的为 97%)。

2.1.3 不同 pH 缓冲溶液配制 pH 1.2 盐酸溶液: 取 8.33 mL 盐酸稀释至 1000 mL;

pH 4.5 磷酸缓冲溶液: 取 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾 250 mL, 加至 1000 mL 量瓶中, 稀释至刻度;

pH 6.8 磷酸缓冲溶液: 取 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾 250 mL, 加至 1000 mL 量瓶中, 加 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠 119 mL, 稀释至刻度, 以 pH 计对所制备的溶液进行校正。

2.1.4 不同粒径荷叶中荷叶碱溶出度的测定<sup>[2-5]</sup> 采用 2015 年版《中华人民共和国药典》(二部)制剂通则 0931 溶出度测定方法中第二法进行测定。以脱气纯净水 900 mL 为溶出介质, 温度 (37.0 ± 0.5) °C, 转速为 100 r · min<sup>-1</sup>, 取荷叶粗粉、中粉、细粉、最细粉 10 g(平行 3 份)分别置于杯中, 浆降入溶出介质中立即计时, 至 1、5、10、15、20、40、60、80、100 min 时取样 2 mL, 离心取上清经微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过, 备用(同时补充同温介质 2 mL 及离心沉淀)。按“2.1.1”项下色谱条件测定荷叶碱溶出量, 计算累积溶出百分率, 并绘制累积溶出曲线。不同粒径荷叶中荷叶碱累积溶出曲线见图 1; 不同粒径荷叶中荷叶碱溶出量见表 1。

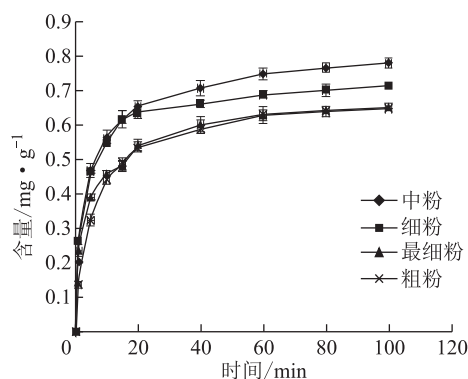


图1 不同粒径荷叶粉体中荷叶碱累积溶出量曲线

表 1 不同粒径荷叶粉体中荷叶碱累积溶出量( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| $t/\text{min}$ | 粗粉/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | 中粉/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | 细粉/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | 最细粉/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ |
|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1              | $0.135 1 \pm 0.009$                 | $0.202 4 \pm 0.009$                 | $0.264 0 \pm 0.013$                 | $0.233 5 \pm 0.005$                  |
| 5              | $0.323 1 \pm 0.017$                 | $0.469 1 \pm 0.020$                 | $0.464 2 \pm 0.003$                 | $0.391 1 \pm 0.010$                  |
| 10             | $0.437 8 \pm 0.012$                 | $0.561 2 \pm 0.023$                 | $0.548 7 \pm 0.003$                 | $0.457 0 \pm 0.010$                  |
| 15             | $0.492 5 \pm 0.012$                 | $0.615 7 \pm 0.024$                 | $0.615 3 \pm 0.012$                 | $0.481 0 \pm 0.015$                  |
| 20             | $0.533 5 \pm 0.010$                 | $0.653 4 \pm 0.016$                 | $0.633 3 \pm 0.014$                 | $0.538 9 \pm 0.022$                  |
| 40             | $0.585 0 \pm 0.010$                 | $0.706 3 \pm 0.021$                 | $0.660 9 \pm 0.010$                 | $0.600 1 \pm 0.025$                  |
| 60             | $0.626 6 \pm 0.016$                 | $0.747 8 \pm 0.016$                 | $0.686 9 \pm 0.011$                 | $0.628 1 \pm 0.010$                  |
| 80             | $0.637 8 \pm 0.015$                 | $0.765 4 \pm 0.013$                 | $0.700 4 \pm 0.019$                 | $0.643 0 \pm 0.011$                  |
| 100            | $0.645 3 \pm 0.008$                 | $0.778 4 \pm 0.015$                 | $0.714 4 \pm 0.008$                 | $0.650 4 \pm 0.013$                  |

2.1.5 不同 pH 荷叶中荷叶碱溶出度的测定<sup>[6-7]</sup> 采用 2015 年版《中华人民共和国药典》(四部)制剂通则 0931 溶出度测定方法中第二法进行测定。以脱气 pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, 蒸馏水(试验中蒸馏水 pH 6.79)900 mL 为溶出介质, 温度为  $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 转速为  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 取荷叶细粉, 置不同 pH 溶液中(平行三份), 浆降入溶出介质中立即计时, 至 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100 min 时取样 2 mL, 离心取上清经微孔滤膜( $0.22 \mu\text{m}$ )滤过, 备用(同时补充同温介质 2 mL 及离心沉淀)。按“2.1.1”项下色谱条件测定荷叶碱溶出量, 计算累积溶出百分率, 并绘制累积溶出曲线图 2。不同 pH 下粉体中荷叶碱溶出量见表 2。

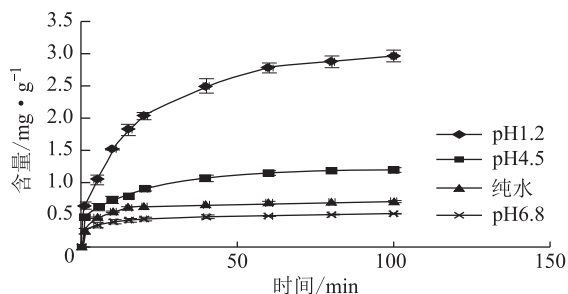


图 2 荷叶细粉在不同 pH 溶液中荷叶碱累积溶出曲线

2.1.6 Weibull 分布参数的处理 分别以不同粒径荷叶粉体 2 h 溶出量  $0.662 5$ ,  $0.790 8$ ,  $0.738 4$ ,  $0.668 1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  为荷叶粗粉、中粉、细粉、最细粉中荷叶碱 100% 溶出量。以细粉在不同缓冲溶液中 2 h 的溶出量  $3.005$ ,  $1.200$ ,  $0.539 9$ ,  $0.738 4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  作为 pH 1.2, pH 4.5, pH 6.8, 纯水中的平衡溶出量<sup>[8-10]</sup>。

根据荷叶碱的累积溶出百分率, 按照 Weibull 模型进行数据处理, 以  $X = \ln t$ 、 $Y = \ln [-\ln(1-F)]$  为变量( $F$  为累积释放百分数), 求得不同粒径、不同 pH 下荷叶粉体中荷叶碱的溶出时间与累积溶出百分率的关系, 结果见表 3。

并求出各溶出度参数  $T_{50}$ 、 $T_d$ 、 $Q_{45}$ 、 $m$  ( $T_{50}$ : 累计溶出 50% 的时间;  $T_d$ : 累计溶出 63.2% 的时间;  $Q_{45}$ : 45 min 时的累积溶出率;  $m$ : 曲线形状参数), 结果见表 4。

不同粒径荷叶粉体荷叶碱溶出量无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 采用 Weibull 模型对数据处理, 由拟合所得溶出度参数计算荷叶碱溶出速率。至各样品溶出 50% 进行考察, 溶出速率: 细粉 > 最细粉 > 中粉 > 粗粉; 不同 pH 下, 溶出速率为 pH 6.8 > 水 > pH 4.5 > pH 1.2。

表 2 不同 pH 下荷叶细粉中荷叶碱累积溶出量( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| $t/\text{min}$ | pH 1.2              | pH 4.5              | pH 6.8              | H <sub>2</sub> O    |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1              | $0.644 5 \pm 0.006$ | $0.471 3 \pm 0.018$ | $0.250 9 \pm 0.033$ | $0.264 0 \pm 0.013$ |
| 5              | $1.041 \pm 0.054$   | $0.631 3 \pm 0.074$ | $0.343 7 \pm 0.029$ | $0.464 2 \pm 0.003$ |
| 10             | $1.521 \pm 0.073$   | $0.736 3 \pm 0.056$ | $0.394 8 \pm 0.037$ | $0.548 7 \pm 0.003$ |
| 15             | $1.823 \pm 0.006$   | $0.792 6 \pm 0.056$ | $0.420 4 \pm 0.032$ | $0.615 3 \pm 0.012$ |
| 20             | $2.037 \pm 0.087$   | $0.902 8 \pm 0.044$ | $0.436 7 \pm 0.038$ | $0.633 3 \pm 0.014$ |
| 40             | $2.499 \pm 0.006$   | $1.066 \pm 0.030$   | $0.471 4 \pm 0.031$ | $0.660 9 \pm 0.010$ |
| 60             | $2.783 \pm 0.110$   | $1.154 \pm 0.052$   | $0.486 4 \pm 0.026$ | $0.686 9 \pm 0.011$ |
| 80             | $2.876 \pm 0.077$   | $1.189 \pm 0.037$   | $0.507 3 \pm 0.017$ | $0.700 4 \pm 0.019$ |
| 100            | $2.963 \pm 0.089$   | $1.197 \pm 0.032$   | $0.518 9 \pm 0.008$ | $0.714 4 \pm 0.008$ |

注: 水由超纯水仪制备, pH 6.77。

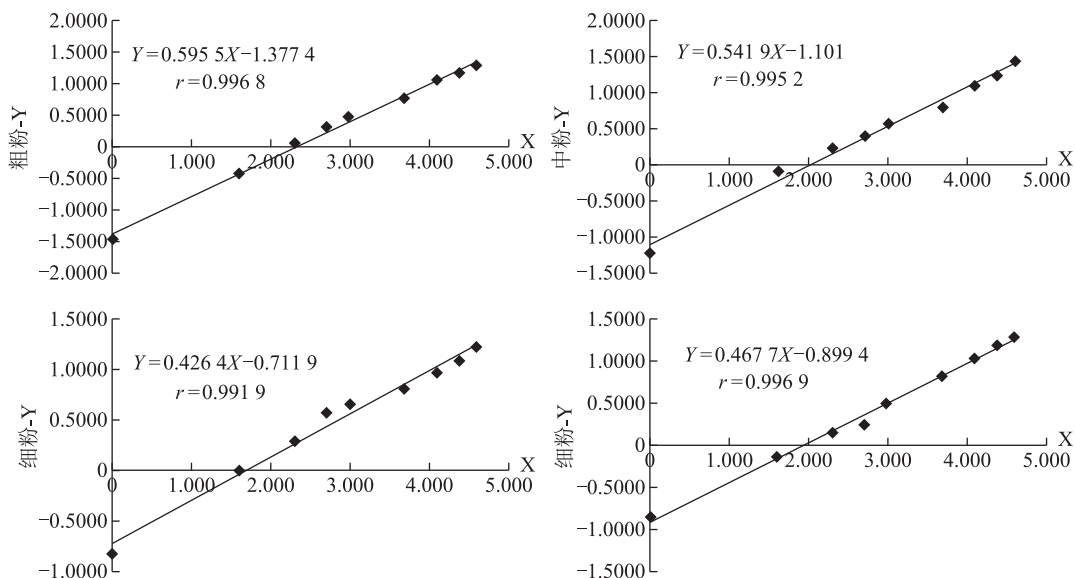
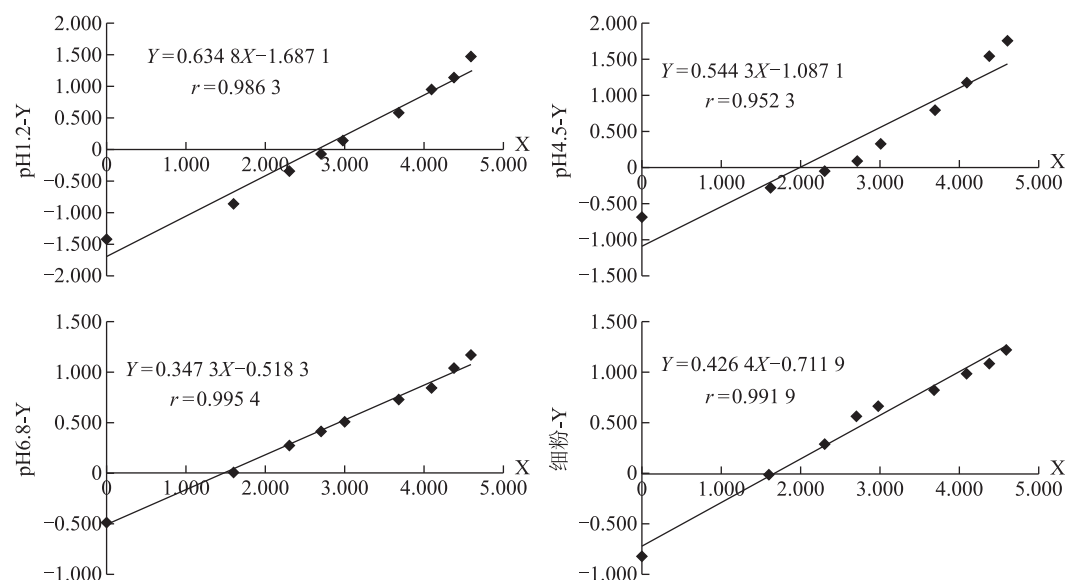
表 3 不同粒径、不同 pH 荷叶粉体

| 中荷叶碱溶出回归方程( $X = \ln t$ , $Y = \ln [-\ln(1-F)]$ ) |                        |        |
|---------------------------------------------------|------------------------|--------|
| 样品                                                | 荷叶碱回归方程                | $r$    |
| 粗粉                                                | $Y = 0.5955X - 1.3774$ | 0.9968 |
| 中粉                                                | $Y = 0.5419X - 1.101$  | 0.9952 |
| 细粉                                                | $Y = 0.4264X - 0.7119$ | 0.9919 |
| 最细粉                                               | $Y = 0.4677X - 0.8994$ | 0.9969 |
| pH 1.2                                            | $Y = 0.6348X - 1.6871$ | 0.9863 |
| pH 4.5                                            | $Y = 0.5443X - 1.0817$ | 0.9523 |
| H <sub>2</sub> O                                  | $Y = 0.4495X - 0.7330$ | 0.9919 |
| pH 6.8                                            | $Y = 0.3473X - 0.5183$ | 0.9954 |

表 4 不同粒径、不同 pH 下荷叶粉速率溶出参数

| 样品               | $T_{50}/\text{min}$ | $T_d/\text{min}$ | $m$    | $Q_{45}(\%)$ |
|------------------|---------------------|------------------|--------|--------------|
| 粗粉               | 5.461               | 10.10            | 0.5955 | 0.9125       |
| 中粉               | 3.878               | 7.623            | 0.5419 | 0.9269       |
| 细粉               | 2.248               | 5.306            | 0.4264 | 0.9169       |
| 最细粉              | 3.125               | 6.837            | 0.4677 | 0.9105       |
| pH 1.2           | 8.007               | 14.26            | 0.6348 | 0.8743       |
| pH 4.5           | 3.721               | 7.292            | 0.5443 | 0.9323       |
| H <sub>2</sub> O | 2.248               | 5.306            | 0.4495 | 0.9169       |
| pH 6.8           | 1.548               | 4.443            | 0.3473 | 0.8929       |

注:  $T_{50}$ : 累计溶出 50% 的时间;  $T_d$ : 累积溶出 63.2% 的时间;  $Q_{45}$ : 45 min 时的累积溶出率;  $m$ : 曲线形状参数。

图 3 不同粒径荷叶碱溶出拟合曲线( $X = \ln t$ ,  $Y = \ln [-\ln(1-F)]$ )图 4 不同 pH 溶出介质中荷叶碱溶出拟合曲线( $X = \ln t$ ,  $Y = \ln [-\ln(1-F)]$ )

2.1.7 相似因子法( $f_2$ )评价溶出曲线的相似 相似因子法为美国FDA推出的采用溶出曲线评价药物内在品质的方法,计算公式如下:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (R_k - T_k)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (1)$$

$R_k$ 为参比制剂平均累积溶出量,  $T_k$ 为 $t$ 时间自制制剂的溶出度,  $n$ 为取样点数目( $3 \leq n \leq 5$ , 参比制剂累积溶出量大于85%的取样点数目 $\leq 1$ )。若 $50 \leq f_2 < 100$ , 则认为两条溶出曲线相似<sup>[11]</sup>。荷叶细粉在pH 1.2 盐酸溶液, pH 4.5, pH 6.8 磷酸缓冲溶液和水中 $f_2$ 分别为89.7, 99.2, 99.8( $n=5$ ), 表明各缓冲溶液中荷叶碱溶出行为与其在水中溶出行为具有相似性。

不同粒径荷叶粉体在蒸馏水中溶出行为, 粗粉与中粉、粗粉与细粉、粗粉与最细粉间的 $f_2$ 分别为99.84, 99.85, 99.97( $n=5$ ), 表明在蒸馏水中, 各粒径荷叶粉体中荷叶碱溶出规律与粗粉中荷叶碱溶出规律具有相似性。

### 3 讨论

#### 3.1 采用 Weibull 模型考察粒径和 pH 对荷叶碱溶出规律结果

不同粒径荷叶粉体中荷叶碱的溶出量随时间延长而增加, 溶出量为中粉>细粉>粗粉>最细粉。提示不同粒径粗粉、中粉、细粉、最细粉荷叶碱体外溶出过程中宜将粒径控制在适宜范围, 不宜过细, 为药材粉碎工艺提供参考。不同pH溶出介质中, 溶出量为pH 1.2>pH 4.5>水>pH 6.8, 即随pH的降低溶出量增大。

#### 3.2 Weibull 模型参考意义

不同pH溶出介质中, 荷叶中荷叶碱溶出量随时间延长增加。pH 4.5, pH 6.8, 蒸馏水中细粉在60 min后荷叶碱溶出量增加趋于平缓, pH 1.2 缓冲溶液中荷叶细粉中荷叶碱在80 min后溶出量趋于平缓。建立与溶出度有关的Weibull模型, 具有一定参考意义, 因Weibull模型只能描绘不能充分突出药物溶出动力学性质<sup>[12]</sup>。试验中分别采用超声、浆法对

平衡溶出量进行了测定, 当超声测定所得溶出量与100 min时测得溶出量相差较大时, 采用Weibull方程拟合所得曲线线性关系较差, 故采用浆法120 min所得荷叶碱含量作为溶出量。从溶出量分析, 荷叶粉体在所考察的溶出介质经2 h后溶出量不存在显著性差异。

#### 3.3 相似因子法( $f_2$ )评价溶出曲线的相似性

结果显示各粒径荷叶粉体中荷叶碱溶出行为与粗粉中荷叶碱溶出规律具有相似性; 各缓冲溶液中荷叶碱溶出行为与荷叶碱在水中溶出行为具有相似性。

### 参考文献

- [1] 刘婧婧, 罗旭彪, 陈波, 等. 制备高效液相色谱分离纯化荷叶碱[J]. 中草药, 2006, 37(1): 55-57.
- [2] 荆蕴杰, 张文品, 张海宁. 不同粒径扶正散粉体人参皂苷体外溶出度研究[J]. 中成药, 2012, 34(2): 362-364.
- [3] 刘新义, 张水寒, 李健和, 等. 不同粒径连翘粉体中连翘苷体外溶出研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3233-3235.
- [4] 何杰, 向丽, 张水寒, 等. 不同粒径的防风粉体体外溶出度研究[J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4449-445.
- [5] 鹿丽丽, 萧伟, 徐连明, 等. 不同粒径三七粉物理性质及体外溶出度的比较研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013, 15(2): 305-309.
- [6] 陈桥, 章弘扬, 王帅, 等. pH值对丹参水提动力学过程的影响[J]. 中成药, 2011, 33(1): 148-150.
- [7] 陶伟博, 冷柏榕, 严相平. 不同溶出介质中利福昔明片体外溶出行为比较[J]. 中国药业, 2015, 24(4): 21-22.
- [8] 荆蕴杰, 张文品, 张海宁. 不同粒径扶正散粉体人参皂苷体外溶出度研究[J]. 中成药, 2012, 34(2): 362-364.
- [9] 熊亚群, 李兰, 刘雁鸣. 阿莫西林胶囊溶出曲线相似性评价[J]. 中国药物评价, 2015, 32(2): 65-68.
- [10] 任桂林, 韩丽, 王小平, 等. 微粉化对酒制当归粉体性质及溶出度的影响[J]. 中成药, 2015, 37(4): 762-767.
- [11] 祝丽欣, 陈芝, 郭莹, 等.  $f_2$ 相似因子法评价银杏酮酯缓释微丸大类成分总黄酮和各类成分的体外释放相关性研究[J]. 中草药, 2015, 46(23): 3482-3488.
- [12] 孔文琦, 李亚巍. 荷叶活性化学成分及药理研究进展[J]. 中国现代中药, 2005, 7(6): 22-24, 44.

(收稿日期 2018-05-07)