

# 三清降糖方总苷缓释片的制备及其体内外相关性分析

吕立勋\*, 李唐棣, 赵琳琳, 赵利刚

(河北联合大学药学院, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的: 优选三清降糖方总苷缓释片的处方工艺并考察其体外释放情况及兔体内药动学。方法: 以羟丙甲基纤维素为骨架材料, 采用湿法制粒压片制备缓释片。以 1, 4, 8, 12 h 的累积释放率为综合评价指标, 通过正交试验考察羟丙甲基纤维素、微晶纤维素用量及淀粉-乳糖对三清降糖方总苷缓释片处方工艺的影响, 测定自制缓释片的体外释放度和兔体内药动学参数。采用 HPLC 测定黄芩苷含量, 色谱条件为 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.4% 磷酸 (三乙胺调 pH 3.0, 48:52), 检测波长 270 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温室温, 进样量 20 μL。结果: 最佳处方为羟丙甲基纤维素 20%, 微晶纤维素 1%, 淀粉-乳糖 (3:1), 5% 聚乙烯吡咯烷酮乙醇为黏合剂; 制备的三清降糖方总苷缓释片 12 h 累积释放率 > 90%。黄芩苷的体内过程以单室模型拟合较好, 2 种制剂的药动学参数 *t*<sub>max</sub>, *C*<sub>max</sub>, AUC 均存在显著性差异。结论: 三清降糖方总苷缓释片的体外释放良好, 在兔体内吸收具有良好的相关性, 相对生物利用度显著提高, 达到了缓释制剂的要求。

**[关键词]** 三清降糖方; 缓释片; 正交试验; 体外释放度; 体内外相关性; 药代动力学研究

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0023-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013220023

## Preparation and *in vitro-in vivo* Correlation Analysis in Rabbits of Total Glycosides Sustained-Release Tablets of Sanqing Jiangtang Decoction

LV Li-xun\*, LI Tang-di, ZHAO Lin-lin, ZHAO Li-gang

(School of Pharmaceutical Sciences, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize prescription of total glycosides sustained-release tablets of Sanqing Jiangtang decoction, then investigate its *in vitro* release profile and pharmacokinetics in rabbits. **Method:** With hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) as matrix material, sustained-release tablets was prepared by wet granulation tableting technique. With cumulative release rates in 1, 4, 8, 12 h as comprehensive evaluation index, orthogonal test was adopted to investigate effects of HPMC amount, microcrystalline cellulose (MCC)

**[收稿日期]** 20130425(002)

**[基金项目]** 唐山市科技计划项目(1113020112a)

**[通讯作者]** \* 吕立勋, 硕士, 副教授, 从事中药药效物质基础及制剂研究, Tel: 0315-3726307, E-mail: tslx@126.com

- [6] Yoichi S, Shiho S, Takako N, et al. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72 (3):483.
- [7] YIN X L, ZHOU J B, JIE C F, et al. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549 [J]. *Life Sci*, 2004, 75 (18):2233.
- [8] 栾连军, 王叶飞, 吴永江. 半枝莲总黄酮中 4 种有效成分含量测定 [J]. *浙江大学学报*, 2011, 40(1):24.
- [9] 肖海涛, 李锐. 半枝莲化学成分和药理活性研究进展 [J]. *中药研究与信息*, 2005, 7(4):20.
- [10] 涂琪顺, 蔡光明, 黄媛, 等. 大孔树脂分离纯化半枝莲总黄酮的研究 [J]. *中南药学*, 2008, 6(2):171.
- [11] 马河, 董世波. 大孔吸附树脂对半枝莲总黄酮的吸附-解吸性能研究 [J]. *齐鲁药事*, 2010, 29(10):584.
- [12] 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 IX B.

[责任编辑 仝燕]

consumption and starch-lactose on formulation technology, *in vitro* release and *in vivo* pharmacokinetics in rabbits of these prepared sustained-release tablets were determined. HPLC was used to determine the content of baicalin, mobile phase of methanol-0.4% phosphoric acid (pH adjusted to 3.0 by triethylamine, 48:52), detection wavelength 270 nm. **Result:** Optimum prescription was the mass fraction of HPMC-K4M 20%, MCC 1%, starch and lactose as filler with dosage ratio of 3:1, 5% PVP ethanol as binders; Cumulative release rate of these prepared sustained-release tablets was > 90% in 12 h. *In vivo* release of baicalin fitted well with single compartment model,  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ , AUC of two preparations had significant differences. **Conclusion:** A good correction of *in vitro* release and *in vivo* absorption of total glycosides sustained release tablets prepared as optimized prescription was satisfied, the relative bioavailability significantly increased, which reached requirements of sustained-release formulations.

**[Key words]** Sanqing Jiangtang decoction; sustained-release tablets; orthogonal test; *in vitro* release; *in vitro-in vivo* correlation; pharmacokinetic study

笔者根据糖尿病的中医辨治规律,结合现代中药药理学的最新研究进展,拟成了临床经验方——三清降糖方,由黄芩、知母、生地黄、地骨皮、桑白皮、黄连、干姜共 7 味药材组成,经试用疗效较好<sup>[1]</sup>。该方临床以汤剂服药,存在日服药次数多、剂量大、使用不便、患者依从性差等问题,且药物在体内的血药浓度峰谷比较大<sup>[2]</sup>。本实验拟将三清降糖方改制为缓释片,测定自制缓释片总苷的体外释放度,比较三清降糖方汤剂与自制缓释片在兔体内的药动学过程,考察自制缓释片的体内外相关性,利用亲水凝胶骨架片的黏附性,延长缓释片在胃肠道的滞留时间,使药物缓慢持久地到达吸收部位,获得较平稳持久的血药浓度,既减少服药次数,同时提高患者依从性,以满足临床安全用药的要求。

## 1 材料

TDP 型单冲压片机(上海天峰制药设备公司), ZRS-8G 型溶出仪(天津大学精密仪器厂), 78-2 型片剂四用仪(上海黄海药检仪器厂), 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司), FA1004 型 1/万电子天平(上海恒平科学仪器有限公司)。

黄芩等药材(购于北京同仁堂唐山连锁药店有限公司,经河北联合大学于德红副教授鉴定,均符合《中国药典》2010 年版相关项下规定),黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110715-201106),羟丙甲基纤维素(HPMC-K4M,上海卡乐康公司),微晶纤维素(MCC,天津雅博生物有限公司),聚乙烯吡咯烷酮(PVPK30,天津天泰精细化学有限公司),药用级淀粉、乳糖、硬脂酸镁(天津市凯通化学试剂有限公司),D101 型大孔树脂(天津海光化工有限公司),甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

清洁级雄性新西兰大白兔,体重(2.5 ± 0.3) kg,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号 SLXK(京)2009-0004。

## 2 方法与结果

### 2.1 三清降糖方总苷缓释片的制备

**2.1.1 提取工艺**<sup>[3]</sup> 按 5:5:5:5:5:3:3 处方比例称取各药材,共 9.3 kg,混合均匀,粉碎至粒径 40 目,加 10 倍量水煎煮 2 h,残渣加 8 倍量水煎煮 1.5 h,合并 2 次提取液,减压浓缩至生药质量浓度 1 g·L<sup>-1</sup>,加无水乙醇至醇浓度达 80%,上清液回收乙醇,上 D101 型大孔树脂柱,分别用水和体积分数为 10%,30%,50%,70%,90% 的乙醇溶液各 4 BV 梯度洗脱,流速 4.0 BV·h<sup>-1</sup>,洗脱至弃去洗脱液 Molish 反应呈阴性,得醇洗部分,浓缩成浸膏,减压干燥得粉末。

**2.1.2 成型工艺** 称取适量原料、辅料,干燥 1 h,过 100 目筛,按处方量称取药粉、HPMC-K4M、MCC 等,按等量递增法混合均匀,加入适量 80% 乙醇,制软材,过 16 目筛制粒,于 60 °C 干燥 1 h,称定混合药粉质量,加入适量硬脂酸镁,压片。

### 2.2 释放度的测定

**2.2.1 释放介质的选择** 分别测定了黄芩苷在 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液、纯水、pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液(PBS)、0.1% 和 0.5% 十二烷基磺酸钠(SDS)溶液等不同释放介质中的溶解度,结果发现只有 pH 6.8 PBS 满足漏槽条件。

**2.2.2 色谱条件**<sup>[4]</sup> DiamonsilC<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.4% 磷酸(三乙胺调 pH 3.0,48:52),检测波长 270 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温室温,进样量 20 μL。

**2.2.3 标准曲线的绘制** 精密称取于 60 °C 减压干

燥 4 h 的黄芩苷对照品适量,加 50% 甲醇溶解并稀释成  $80.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。分别精密量取对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,按 2.2.2 项下色谱条件测定,以对照品质量浓度为自变量,峰面积为因变量,得回归方程  $Y = 2.69 \times 10^5 X + 7135$  ( $r = 0.9999$ ),表明黄芩苷在  $4.0 \sim 80.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好线性关系。

**2.2.4 释放度的综合评分<sup>[5]</sup>** 按《中国药典》2010 年版二部附录 XD 释放度测定法(第一法)测定,释放介质 900 mL 经脱气处理,转速  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,温度  $(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ 。在预定的间隔时间取样 5 mL,并及时补加等体积同温新鲜介质。样品液根据需要浓缩,用  $0.45 \text{ } \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液进样,按 2.2.2 项下色谱条件测定,计算药物的累积释放率。依照《中国药典》2010 年版二部附录 XI XD 缓控释制剂指导原则,采用综合评分法,选择 1, 4, 8, 12 h 的累积释放率为评价指标,释放标准分别为 1 h 累积释放率 30%, 4 h 累积释放率 60%, 8 h 累积释放率 80%, 12 h 累积释放率 90%, 将各时间点的权重均定为 1, 综合评分 =  $|Q_1 - 30\%| \times 1 + |Q_4 - 60\%| \times 1 + |Q_8 - 80\%| \times 1 + |Q_{12} - 90\%| \times 1$ 。评分最低者为最优,表明累积释放量与设定的标准最接近,处方设计越合理。

**2.3 处方工艺优选** 在预试验基础上,选取 HPMC 用量、MCC 用量及淀粉-乳糖为考察因素,每个因素取 3 个水平,按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,测定各处方的体外释放度,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

由直观分析可知,各因素对方剂工艺的影响主次为  $A > C > B$ ,用 SPSS 13.0 软件将正交数据进行方差分析,结果发现因素 A, C 对缓释片中黄芩苷释放效果的影响具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),因素 B 则无统计学意义。结合实际生产要求,确定最佳处方为  $A_2B_1C_3$ 。

**2.4 验证试验** 按优选的处方工艺制备 3 批缓释片,显示色泽均匀、光滑、无黏冲、无杂质、无异物,测得 12 h 累积释放率  $> 90\%$ ,符合 2010 年版《中国药典》要求,见图 1,说明按优化处方制备的三清降糖方总苷缓释片批间重复性良好,质量稳定。

## 2.5 兔体内药动学研究

**2.5.1 给药方案与血样采集** 采用自身对照单剂量双周期交叉给药方案,将 6 只大白兔随机均分为 A, B 组,禁食 12 h 后, A 组灌服三清降糖方汤剂, B

表 1 三清降糖方总苷缓释片处方工艺正交试验因素水平

水平	A HPMC 用量 /%	B MCC 用量 /%	C 淀粉-乳糖
1	10	1	1:2
2	20	3	1:1
3	30	5	2:1

表 2 三清降糖方总苷缓释片处方工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	综合评分
1	1	1	1	1	27.3
2	1	2	2	2	22.4
3	1	3	3	3	21.7
4	2	1	2	3	13.9
5	2	2	3	1	10.1
6	2	3	1	2	15.2
7	3	1	3	2	12.5
8	3	2	1	3	14.8
9	3	3	2	1	25.6
$K_1$	23.8	17.9	19.1		
$K_2$	13.1	15.8	20.6		
$K_3$	17.6	20.8	14.8		
R	10.7	5.1	5.9		

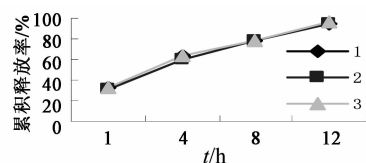


图 1 3 批三清降糖方总苷缓释片的累积释放率

组灌服三清降糖方总苷缓释片,给药剂量  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (以黄芩苷计),服药后 4 h 内禁食,于给药前及给药后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 耳缘静脉采血 1.5 mL,给药 1 w 后 2 组交叉给药,相同时间点取血。将所有采集的血样均置于肝素化离心管中,于  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,分离上层血浆,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冷冻保存待测。

**2.5.2 色谱条件** 同 2.2.2 项下色谱条件。

**2.5.3 血浆样品处理** 精密量取待测血浆样品  $200 \text{ } \mu\text{L}$ ,置于离心管中,加入乙腈  $200 \text{ } \mu\text{L}$ ,涡旋振荡 2 min,于  $14000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液  $200 \text{ } \mu\text{L}$  经  $0.22 \text{ } \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液进样。

**2.5.4 药动学参数** 用房室判别指标 (AIC) 和残差平方和 (Re) 作为识别模型指标<sup>[6]</sup>,利用 3p97 药动学软件处理测得的药-时数据。采用  $t$  检验对药动学参数进行统计分析,结果显示黄芩苷的体内过

程以单室模型拟合较好。比较 2 种制剂的药动学参数  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ , AUC 存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 三清降糖方在兔体内主要药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	缓释片	汤剂
$K_a/h^{-1}$	0.59 ± 0.16	1.97 ± 0.32
$K_e/h^{-1}$	0.33 ± 0.07	0.46 ± 0.11
$t_{1/2} K_a/h$	1.98 ± 0.43	0.51 ± 0.13
$t_{1/2} K_e/h$	7.92 ± 1.25	2.38 ± 0.57
$t_{max}/h$	4.55 ± 0.83	2.64 ± 0.56
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	17.58 ± 3.02	38.12 ± 5.83
AUC/mg · L <sup>-1</sup> · h	251.07 ± 13.22	154.32 ± 12.16
CL/L · h <sup>-1</sup> · kg <sup>-1</sup>	0.10 ± 0.003	0.13 ± 0.005
Vd/L · kg <sup>-1</sup>	4.91 ± 1.84	6.72 ± 2.18
MRT/h	18.53 ± 3.87	11.26 ± 3.59

**2.5.5 体内外相关性考察** 因自制缓释片体内吸收符合单室模型, 依据 2010 年版《中国药典》指导原则, 采用 Wagner-Nelson 方程计算体内吸收率 ( $F_a$ )<sup>[7]</sup>, 对体外累积释放率 ( $Fr$ ) 作线性回归, 得回归方程  $F_a = 2.126Fr - 0.237 (r = 0.9975)$ , 采用 SPSS 软件对方程相关系数进行相关性检验得  $P < 0.05$ , 说明体内外相关性显著, 即建立的体外释放度测定方法具有良好的体内相关性, 在一定程度上可预估药物在体内的吸收过程<sup>[8]</sup>。

### 3 讨论

为使三清降糖方在临床具有更广泛的应用, 将其主要活性成分总苷制成骨架型缓释片, 结果表明方中君药的主要有效成分黄芩苷的体外释放性能符合  $M_t/M_\infty = kt_{1/2}$  释药模型, 说明药物的释放是扩散和骨架溶蚀的协同作用<sup>[9]</sup>。拟合得到的 Higuchi 方程为  $M_t/M_\infty = 0.2528t_{1/2} + 0.0853 (r = 0.9897)$ , 作为 12 h 给药 1 次的缓释片在临床用药中可提高患者的顺应性, 又保证了用药的安全性和有效性。

试验过程中发现处方中缓释材料存在较大黏

性, 仅用乙醇作为润湿剂制出软材后虽然过筛容易, 但颗粒过于蓬松, 且细粉较多。以 PVPK30 作黏合剂时对药物释放具有缓释作用, 提高药物溶出性能, 而且还可改善颗粒可压性, 使片剂美观。随着 HPMC-K4M 用量得增加, 释药速率降低; 淀粉有崩解剂的作用, 可促使缓释片崩解, 加快药物的释放。乳糖使骨架材料的孔隙率增加, 减小药物的扩散阻力, 并增大药物的扩散途径, 但乳糖用量的增加会使片剂硬度增大, 并对缓释片的溶出有一定阻滞作用。

### [参考文献]

[1] 吴范武, 王雪, 李继安, 等. 三清降糖方对实验性 2 型糖尿病大鼠血糖和血脂的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 164.

[2] 高秀娟, 吴范武, 马会霞, 等. 三清降糖方改善 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的临床研究[J]. 西部中医药, 2012, 25(4): 58.

[3] 吕立勋, 李唐棣, 王旭, 等. 三清降糖方的药效物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 267.

[4] 邓开英, 王晓琳, 夏永鹏, 等. 葛根芩连片中 3 种活性成分的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(10): 784.

[5] 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 73, 179.

[6] 黄琳凤, 胡强, 余伟民, 等. 盐酸二甲双胍混合材料骨架缓释片的研制[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(8): 673.

[7] 祝诚诚, 李自强, 刘志东, 等. 药物溶出仿生系统研究黄芩苷固体制剂的释放规律[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(1): 11.

[8] 刘清飞, 罗国安, 王义明. 缓控释制剂释放度相似性评价方法的应用进展[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(15): 1121.

[9] 陈丽华, 徐德生, 冯怡. 中药口服缓控释制剂体内外相关性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 333.

[责任编辑 仝燕]