

双黄连即型凝胶体外释药性研究

陈两绵, 王锦玉, 仝燕*, 刘德文

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究双黄连即型凝胶的体外释放特性。方法: 以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 为释放介质, 以 HPLC 同时测定释放液中绿原酸、黄芩苷、连翘苷的含量, 用 franz 扩散池法研究双黄连即型凝胶的体外释放特性。结果: 双黄连即型凝胶中绿原酸、黄芩苷、连翘苷的释放曲线均符合 Ritger-Peppas 方程, 但绿原酸的释放速率明显快于黄芩苷和连翘苷的释放。结论: 双黄连即型凝胶释药机理为非 Fick 扩散。

[关键词] 双黄连即型凝胶; 体外释药; 高效液相色谱法; franz 扩散池

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0007-03

Study on Drug-releasing of Shuanghuanglian in-situ Gel *in Vitro*

CHEN Liang-mian, WANG Jin-yu, TONG Yan*, LIU De-wen

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To study the drug release characteristics of Shuanghuanglian in-situ gel *in vitro*. **Method:** The phosphate buffer of pH 7.4 was taken as the releasing mediator, the content of the chlorogenic acid, baicalin and phillyrin in the releasing mediator was determined by HPLC, the drug release characteristics of the Shuanghuanglian in-situ gel was studied by Franz diffusion cell method. **Result:** The releasing curve of the chlorogenic acid, baicalin and phillyrin followed the Ritger-Peppas equation kinetics, but the releasing rate of the chlorogenic acid was faster than that of the baicalin and phillyrin. **Conclusion:** the drug release mechanism of Shuanghuanglian in-situ was non-fickian diffusion release.

[Key words] Shuanghuanglian in-situ gel; drug release *in vitro*; HPLC; franz diffusion cell

即型凝胶俗称原位凝胶, 是指高分子材料以溶液或半固体状态给药后在用药部位发生相变, 形成的半固体或液体制剂。该制剂具有凝胶制剂的亲水性三维网络结构和独特的溶液-凝胶转变性能, 并具有良好的组织相容性和生物黏附性^[1]。双黄连即型凝胶是以泊洛沙姆 407 和 188 为高分子辅料, 由黄芩、银翘提取物制备而成的直肠用温度敏感型即型凝胶, 可疏风解表、清热解毒, 具有安全有效、性能稳定、质量可控、制备简单、给药方便、患者顺应性强等

优点。本论文对双黄连即型凝胶的体外释药性能进行了研究。

1 仪器与试药

Agilent HP1100 高效液相色谱仪(四元泵, 自动进样器, DAD 检测器)(美国安捷伦公司); Satorius BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); franz 扩散池(自制); 透析袋 MD-34(截留相对分子质量 7 000, 北京经科宏达生物技术有限公司)。

黄芩提取物(市售, 含黄芩苷 97.5%); 银翘提取物(自制, 含绿原酸 7.0%, 含连翘苷 1.2%); 泊洛沙姆 407(德国, BASF); 泊洛沙姆 188(德国, BASF)

绿原酸(批号 110753-200413)、黄芩苷(批号 110715-200514)、连翘苷对照品(批号 110821-200610)(均购自中国药品生物制品检定所); 乙腈(色谱纯, 美国 fisher 公司); 重蒸馏水(自制); 磷酸、

[收稿日期] 2010-07-08

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划(2006BAI09B08)

[第一作者] 陈两绵, 硕士, 研究方向: 中药制剂及中药分析, E-mail: chris-clm@163.com

[通讯作者] * 仝燕, 研究员, 研究方向: 中药制剂工艺, E-mail: tongyan1012@sohu.com

磷酸二氢钾、氢氧化钠、苯甲酸钠等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 双黄连即型凝胶的制备 称取处方量的苯甲酸钠、黄芩、银翘提取物,依次置适量蒸馏水中,加适量碱液使溶解,得双黄连水液;取处方量的泊洛沙姆 188 置双黄连水液中,于室温下搅拌使溶解,再加入处方量的泊洛沙姆 407,置冰箱中冷藏,使成澄明均一溶液;调节 pH,补水至全量,湿热灭菌,即得。

2.2 黄芩苷、绿原酸、连翘苷的 HPLC 测定法

2.2.1 对照品溶液的制备 取黄芩苷、绿原酸、连翘苷对照品适量,精密称定,加 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) 分别制成每 1 mL 中含 0.542 mg 黄芩苷的对照品溶液,每 1 mL 中含 0.160 mg 绿原酸的对照品溶液和每 1 mL 中含 0.014 5 mg 连翘苷的对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 2.3 项下体外释放试验的释放液,过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,弃去初滤液,

取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照液的制备 以相同提取纯化工艺自制金银花、连翘、银翘提取物,按照双黄连即型凝胶的制备工艺分别制备缺黄芩、金银花、连翘的阴性即型凝胶样品,再按 2.2.2 项下操作制备各溶液,即得。

2.2.4 色谱条件与系统适应性^[2] 色谱柱 Kromasil- C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.4% 磷酸水溶液进行梯度洗脱,梯度洗脱程序(0 ~11) min,乙腈 12% ~15%;(11 ~20) min,乙腈 15% ~27%;(20 ~35) min,乙腈(27% ~30%);流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 30 ;检测波长 235 nm;进样量 50 μL 。理论塔板数以绿原酸计不低于 1 万,黄芩苷与连翘苷的分离度大于 3.0;在此条件下,绿原酸、黄芩苷和连翘苷能与其他成分得到较好的分离,阴性样品中其他成分对绿原酸峰、黄芩苷峰和连翘苷峰均无干扰,结果见图 1。

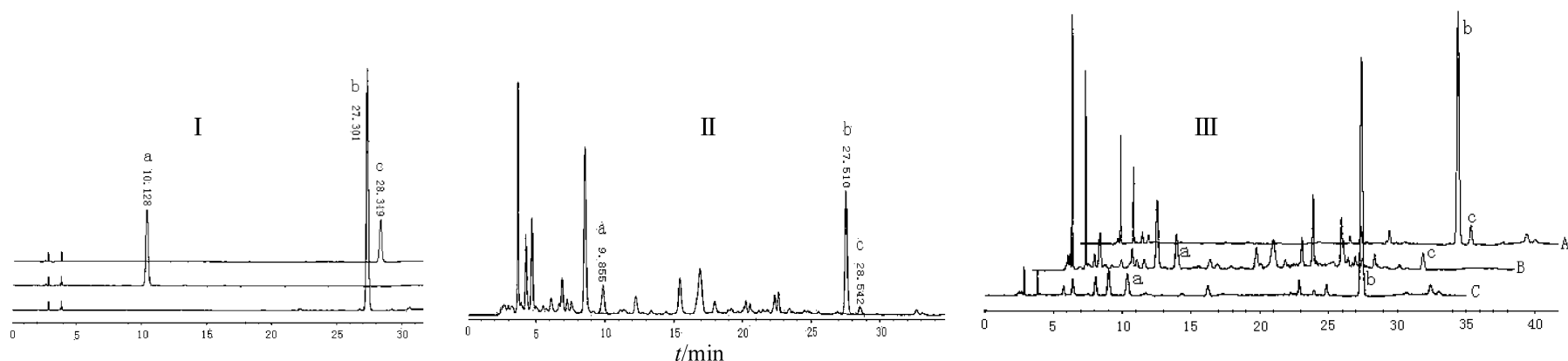


图 1 双黄连即型凝胶体外释放 HPLC

·对照品; ·供试品; ·阴性样品;a.绿原酸;b.黄芩苷;c.连翘苷;A.缺金银花阴性对照;B.缺黄芩阴性对照;C.缺连翘阴性对照

2.2.5 标准曲线的制备 分别取黄芩苷、绿原酸和连翘苷对照品溶液各 2, 4, 8, 12, 16 和 20 μL 进样,按 2.2.4 项下色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),进样量(X)为横坐标,得回归直线方程,结果见表 1。

表 1 各组分的线性及范围

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
绿原酸	$Y = 380.5X - 20.0$	0.999 9	0.32 ~3.20
黄芩苷	$Y = 423.8X - 24.2$	0.999 9	1.08 ~10.1
连翘苷	$Y = 153.4X - 4.46$	0.999 9	0.03 ~0.29

2.2.6 精密度试验 精密吸取供试品溶液 50 μL ,连续进样 6 次,测定绿原酸、黄芩苷和连翘苷的峰面积,三者的 RSD 分别为 0.76%, 0.65%, 0.97%。说明精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 50 μL ,分别于 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 测定绿原酸、黄芩苷和连翘苷峰面积,三者的 RSD 分别为 0.72%,

1.2%, 0.88%。说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 精密量取已知含量的释放液 6 份,分别加入一定量的黄芩苷、绿原酸和连翘苷对照品,按 2.2.2 项下方法制备成供试品溶液,按 2.2.4 项下色谱条件测定,结果绿原酸、黄芩苷和连翘苷的平均回收率分别为 100.8%, 102.2%, 99.1%;RSD 分别为 1.2%, 1.0%, 1.3%。

2.3 体外释药试验 采用改良 franz 立式扩散池的方法研究其体外释药情况:将预处理过的半透膜(截留相对分子质量为 7 000)固定在自制二室扩散池的释放池底部,取双黄连即型凝胶约 0.3 g,精密称定,置于释放池内,使其均匀分布在半透膜的表面,置 (37.0 ± 0.5) 烘箱中 10 min 以形成凝胶;并于接受池中加入已预热至 (37.0 ± 0.2) 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 7.4) 10 mL 作为释放液,池内内置一电磁搅拌子以 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速转动;排掉半

透膜与释放液接触面的气泡,水浴恒温(37.0 ± 0.2) 释放,于 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 h 时间点将释放液全部取出,并迅速补加等量预热的释放液。测定样品含量,计算累积释放率。

2.4 双黄连即型凝胶体外释药特性

2.4.1 释放曲线绘制

测定双黄连即型凝中绿原酸、黄芩苷和连翘苷在 8 h 内各时间点的累积释放率,绘制释放曲线,见图 2。由图 2 可知,双黄连即型凝胶中绿原酸的释放率 8 h 达 86%,而黄芩苷和连翘苷 8 h 内的释放率分别为 62%,64%。绿原酸的释放速率明显快于黄芩苷和连翘苷。

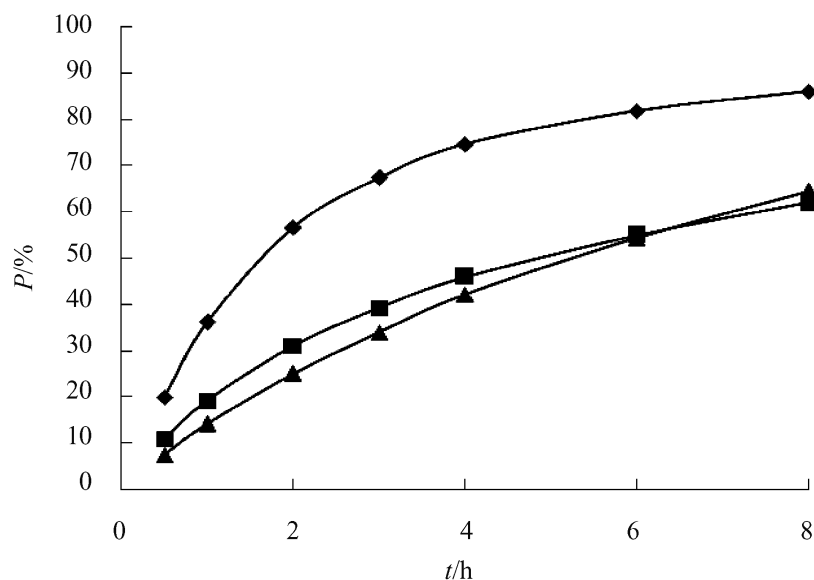


图 2 绿原酸、黄芩苷、连翘苷的累积释放曲线($n=3$)
· 绿原酸; · 黄芩苷; · 连翘苷

2.4.2 相似因子拟合

拟合因子包括差异因子 f_1 和相似因子 f_2 ,其中相似因子 f_2 乃被 FDA 推荐为比较两条释放曲线相似性的首选方法^[3],相似因子 f_2 愈接近 100,相似程度越高。当 f_2 在 50 ~100 时,表明其释放度相似或者等同。 f_2 数学表达式如下:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

式中 R_t 和 T_t 分别为 t 时间点参比组分和试验组分的累积释药率; n 为取点数目。按此式计算绿原酸、黄芩苷、连翘苷的相似因子 f_2 ,结果见表 2。

表 2 相似因子 f_2 结果

No.	参比组分	试验组分	f_2
1	绿原酸	黄芩苷	31.2
2	绿原酸	连翘苷	28.6
3	黄芩苷	连翘苷	68.5

2.4.3 释药机制拟合

为说明双黄连即型凝胶的释药机制,对其释放数据进行 Ritger-Peppas 方程拟合^[4]。Ritger-Peppas 方程为 $\ln Q = a + n \ln t$ 。式中 Q 是 t 时刻的累积释放度; a 为常数, n 为 peppas 方程拟合的释放参数, r 为相关系数。Peppas 认为,当

$0.45 < n < 0.89$ 时,药物释放为非 Fick 扩散(即扩散和骨架溶蚀协同作用);当 $n < 0.45$ 时,为 Fick 扩散;当 $n > 0.89$ 时,为骨架溶蚀作用。各成分 Ritger-Peppas 方程拟合结果见表 3。

表 3 各成分 Ritger-Peppas 方程拟合结果

成分	Ritger-Peppas 方程	r	n
绿原酸	$\ln Q = 0.524 \ln t + 3.52$	0.969 9	0.524
黄芩苷	$\ln Q = 0.628 \ln t + 2.91$	0.992 8	0.628
连翘苷	$\ln Q = 0.779 \ln t + 2.62$	0.997 3	0.779

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

由图 2 的释放曲线和表 2 的相似因子结果表明,双黄连即型凝胶的体外释放,绿原酸的释放度明显大于黄芩苷和连翘苷,而黄芩苷和连翘苷的释放度相似($f_2 = 68.5$)。故当以体外释放来控制双黄连即型凝胶的质量时,需以绿原酸、黄芩苷或绿原酸、连翘苷为指标,仅以某一有效成分为指标不能全面反应制剂的质量。

由表 3 各方程的相关系数表明,Ritger-Peppas 方程作为双黄连即型凝胶各成分体外释放的释放模型较为合适;由释放参数 n 值可知,双黄连即型凝胶中绿原酸、黄芩苷和连翘苷的 n 值符合 $0.45 < n < 0.89$,其释药机理均为非 Fick 扩散,其释药机制主要由 2 个过程控制: 水的渗透和扩散; 基质的水化和溶蚀。

双黄连即型凝胶在直肠内的释药是一个复杂的过程,受多种因素的影响,包括直肠温度、直肠黏膜的黏附性等,本试验仅对其体外释药性能进行了考察,能否反应其体内情况,有待于进一步对其体内外相关性进行研究。

[参考文献]

- [1] 陈两绵,王锦玉,仝燕,等.黏膜给药原位凝胶的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(8):76.
- [2] 陈两绵,王锦玉,仝燕,等.HPLC 同时测定双黄连即型凝胶中绿原酸、黄芩苷及连翘苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(12):18.
- [3] 洪燕龙,冯怡,徐德生.关于缓控释制剂的处方优化指标[J].中国中药杂志,2006,31(1):15.
- [4] Ritger P L, Peppas W A. A simple equation for description of solute release . Fickian and anomalous release from swellable devices[J]. Control Release, 1987, 5(1):37.

[责任编辑 仝燕]