

穿心莲滴丸中穿心莲内酯的体外溶出度研究

宋 英^{1,2}, 宋 崎¹, 周小初¹, 王 冰^{1*}

(1. 上海市中药研究所, 上海 201203; 2. 上海复旦大学, 上海 200032)

[摘要] 目的: 对穿心莲滴丸中的穿心莲内酯进行体外溶出度研究。方法: 采用体外溶出度试验和 HPLC 法, 以穿心莲内酯为指标, 考察穿心莲滴丸在不同时间的累积溶出百分数。结果: 穿心莲内酯在(4.932~394.56) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 穿心莲滴丸中的穿心莲内酯在 15 min 时累积溶出数可达 85%。结论: 制成穿心莲滴丸可以提高穿心莲内酯类难溶性药物的溶出度, 从而提高生物利用度。

[关键词] 穿心莲滴丸; 穿心莲内酯; 体外溶出度

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)10-0011-03

Research on in vitro Dissolution of Chuanxinlian Dropping Pills

SONG Ying^{1,2}, SONG Qi¹, ZHOU Xiao-chu¹, WANG Bing^{1*}

(1. The Institute of Shanghai Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Fu Dan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of the dissolubility of *Andrographis paniculata* dropping pills. **Methods:** Andrographolide as the indicator, the in vitro dissolution and HPLC method were applied to determine the accumulated dissolution rate of andrographolide at the different time. **Results:** The calibration curve was linear in the range of (4.932~394.56) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9999$). The accumulated dissolution rate of Chuanxinlian dropping pills reached over 85% in 15 min. **Conclusion:** Chuanxinlian dropping pills which were prepared can improve the dissolution rate of poorly soluble drugs of the kind of andrographolide and advance the bioavailability.

[Key words] Chuanxinlian Dropping Pills; andrographolide; In vitro dissolution

穿心莲为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculate* (Burm. f.) Nees 的干燥地上部分。穿心莲片具有清热解毒、凉血消肿的作用^[1], 存在溶出慢、起效慢、生物利用度低等缺点。本文采用固体分散体技术制备的穿心莲滴丸, 解决了由于穿心莲内酯类成分疏水性较强而造成穿心莲片溶出度过低的问题, 进一步对滴丸中穿心莲内酯的溶出度特性进行了研究。

1 仪器与试剂

ZRS-8C 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂);

Agilent-1100 色谱仪; Sartorius-BS 224S 电子天平; DWJ-2000 试验型滴丸机(烟台百药泰中药科技发展有限公司)。穿心莲内酯对照品(中国药品生物制品检定所); 穿心莲滴丸(自制); 穿心莲片为市售(批号: 20021221); 人工胃液、人工肠液、磷酸盐缓冲液(pH6.8)均按药典方法制备。其它试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 穿心莲内酯含量测定方法研究

2.1.1 色谱条件^[1] 检测器: 紫外检测器 MWD shimpack VP-ODS(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(26:74); 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取五氧化二磷减压干燥 24 h 的穿心莲内酯 25 mg, 置 25 mL 量瓶, 加

[收稿日期] 2008-01-04

[通讯作者] * 王冰, Tel: (021) 58956227; E-mail: annabel_cn@sina.com

乙醇溶解至刻度摇匀, 作为储备液。分别精密量取 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mL 置 5 mL 量瓶, 加乙醇稀释置刻度, 摇匀, 分别进样测定, 以穿心莲内酯对照品进样量(μg)为 Y 坐标轴, 峰面积为 X 坐标轴进行回归, 得到的线性方程为: $Y = -4.42 \times 10^{-3} + 1.92 \times 10^{-3} X$ ($r = 0.9999$), 结果表明: 穿心莲内酯在(4.932~394.56) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好线性关系。

2.1.3 精密度试验 取上述穿心莲内酯对照品的储备液适量, 用乙醇配制成浓度为 $98.64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的穿心莲内酯对照品溶液, 摇匀, 平行进样 5 次, 每次 10 μL , 结果表明精密度良好, RSD 为 0.943%。

2.1.4 重复性试验 取穿心莲滴丸 20 丸, 研匀。分别称取 5 份, 各约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加乙醇 40 mL, 分别超声提取 15 min, 取出, 放冷至室温, 加乙醇至刻度, 摇匀, 过滤。取续滤液作供试品溶液, 进样测定, 结果表明重复性良好, RSD 为 0.92%。

2.1.5 稳定性考察 取穿心莲滴丸 20 丸, 研匀, 分别称取 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加乙醇 40 mL, 超声提取 15 min, 取出, 放冷至室温, 加乙醇至刻度, 摇匀, 过滤。取续滤液作供试品溶液, 进样测定,

结果表明样品溶液稳定性良好, 于室温放置 24 h 内稳定, RSD 为 2.35%。

2.1.6 回收率试验 采用加样回收法测定穿心莲滴丸中的穿心莲内酯的回收率。在已知含量的样品中加入定量穿心莲内酯对照品(2.959 2 mg), 平行 6 份。结果得平均回收率为 98.13%, RSD 为 2.72%。

2.1.7 溶出样品溶液的含量测定 将每个取样时间点所取的样品溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进样测定, 计算累积溶出百分含量。

2.2 溶出度试验 穿心莲滴丸: 溶出度测定法^[2]。

2.2.1 穿心莲滴丸溶出度测定的溶媒选择 量取经脱气处理的不同溶出介质 250 mL, 注入每个操作容器内, 加温使溶剂温度保持在(37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。取供试品 6 份, 一份为 1 个剂量(18 粒), 分别投入 6 个操作容器内, 立即启动旋转并开始计时, 转速 100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在规定取样点吸取溶液 5 mL, 同时补充等量等温溶液, 立即经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 自取样至滤过在 30s 内完成。取滤液, 用 HPLC 检测, 代入标准曲线计算相应的药物含量, 求出累积释药百分比。本文分别选择了磷酸盐缓冲液(pH6.8)、人工胃液、人工肠液、人工胃液: 乙醇(9:1)等为溶出介质进行溶出度试验考察(浆法), 结果见表 1($n = 6$), 表 2, 图 1。

表 1 穿心莲内酯在不同溶出介质中溶出度数据

溶出时间 (min)	穿心莲内酯累积溶出百分数($\bar{x} \pm s, \%$)			
	1: 磷酸盐缓冲液(pH6.8)	2: 人工胃液	3: 人工肠液	4: 人工胃液: 乙醇(9:1)
5	53.93 \pm 2.891 1	64.10 \pm 2.410 9	54.73 \pm 3.114 3	80.04 \pm 2.014 6
15	62.46 \pm 2.530 9	63.94 \pm 2.987 2	57.42 \pm 2.486 1	98.08 \pm 2.487 8
30	62.99 \pm 2.081 3	68.08 \pm 2.304 8	64.03 \pm 2.937 8	99.73 \pm 2.221 8

本文采用两两间多重比较的检验方法 Turkey 法^[3]来检验上述 4 种不同溶出介质之间有无差异, $T = q_{\alpha}(k, k(m-1)) S/m^{1/2}$ 。其中 $S = MS_E^{1/2}$ 表示共同的总体标准差的联合估计, m 表示每个水平的实验次数, k 为水平个数, q_{α} 为 t -化极差分位数, 给定显著水平 α 可查表求得。

$$MS_E = \frac{\sum_{j=1}^k (n_j - 1) s_j^2}{n - k}$$

n : 总体的实验次数。

计算要比较的两个总体的样本均数之差 $d_{ij} = \bar{x}_i - \bar{x}_j$, 将 d_{ij} 的绝对值对 T 值进行比较:

(1) 如果 $|d_{ij}| > T$, 则认为第 i 个总体与第 j 个总体均数间差异显著;

(2) 如果 $|d_{ij}| \leq T$, 则认为第 i 个总体与第 j 个总体均数间差异不显著。

给定显著水平 $\alpha = 0.05$ 和 $\alpha = 0.01$, 查表得 $q_{0.05}(4, 8) = 4.53$, $q_{0.01}(4, 8) = 6.20$, 又因为 $MS_E = 43.59$, 算出 $S = MS_E^{1/2} = 6.60$, 从而得出 $T_{0.05} = 17.26$, $T_{0.01} = 23.63$ 。4 组不同介质之间的 d_{ij} 值见表 2。

表 2 不同介质之间的 d_{ij} 值

i	j	$ d_{ij} $	
1	2	5.58	
1	3	1.06	
1	4	32.83*	$> T_{0.01} = 23.63$
2	3	6.64	
2	4	27.25*	$> T_{0.01} = 23.63$
3	4	33.89*	$> T_{0.01} = 23.63$

结论: 从表 1 可以发现, 以人工胃液: 乙醇(9:1)

为溶出介质结果最佳, 到 15 min 时累积溶出量达到 85% 以上, 同时从表 2 得出总体 1, 2, 3 与总体 4 有非常显著差异, 而其余任意两两组间均无显著差异, 表示溶出介质人工胃液: 乙醇(9: 1)与其它 3 种溶出介质有显著差异, 而他们 2 组两两间均无显著差异。

2.2.2 穿心莲滴丸溶出取样时间的考察

表 3 穿心莲滴丸溶出度试验结果($n=3$)

样品	样品累积溶出百分数($\bar{x} \pm s$)					
	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
1	56.13 ± 2.501 3	78.99 ± 2.891 1	88.59 ± 2.741 8	93.83 ± 2.654 1	94.56 ± 2.589 1	95.99 ± 2.493 1
2	56.55 ± 2.114 9	78.63 ± 2.543 1	85.59 ± 2.323 3	89.73 ± 2.718 3	91.5 ± 2.702 5	94.3 ± 2.110 9
3	59.56 ± 2.136 5	78.63 ± 2.358 7	86.57 ± 2.481 6	89.73 ± 2.302 7	91.19 ± 2.102 5	95.05 ± 2.121 8
RSD(%)	3.21	2.64	1.76	2.60	2.02	0.89
\bar{x} (%)	57.41	78.75	86.92	91.10	92.42	95.11

将得到的 3 组实验数据药物累积溶出百分数的平均值按零级释放、一级释放 Higuchi 方程进行拟合, 得到各方程的相关系数 r , 依次为 0.793 0, 0.935 8, 0.867 4。

结果: 通过对以上 3 种方程拟合, 得到一级释放的相关系数最好, $r=0.935 8$, $k_1=0.072 3$, 常数 $M=34.06$, 故选择一级释放方程 $1(y_{\infty}-y)=1.532 3-0.031 4t$ 来表征穿心莲内酯在体外的溶出释放特征。试验也表明, 15 min 后溶出百分率基本趋于平稳, 且结果比较稳定, 基本符合一级释放特征。故选择 15 min 作为溶出度考察的取样时间。

2.2.3 穿心莲滴丸和穿心莲片的溶出度试验比较

各取穿心莲滴丸 18 丸和穿心莲片 3 片(相当于 18 丸中穿心莲内酯的量), 每个平行 6 份, 以人工胃液: 乙醇(9: 1) 250 mL 为溶剂, 转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 依溶出度测定法操作, 分别在 3, 5, 10, 15, 20, 30 min 取样各 5 mL(同时补充等量等温溶出介质), $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 取续滤液进样测定, 计算各个时间点的累积溶出百分率。结果表明, 穿心莲滴丸中的穿心莲内酯在 15 min 时能达 85% 以上的溶出度, 而穿心莲片中的穿心莲内酯在 45 min 时都测不到溶出峰面积, 说明穿心莲滴丸在相同条件下具有溶出速度快, 生物利用度高的优点。

2.2.4 穿心莲滴丸 3 批样品溶出度试验 取 3 批穿心莲滴丸样品(批号为: 20060922, 20060924, 20060926), 按溶出度测定方法测定 15min 穿莲内酯的溶出百分率, 依次为 92.92%, 95.89%, 93.99%。

3 讨论

莲滴丸 18 丸, 平行 3 份, 以人工胃液: 乙醇(9: 1) 250 mL 为溶剂, 转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 依溶出度测定法操作, 分别在 3, 5, 10, 15, 20, 30 min 取样各 5 mL(同时补充等量等温溶出介质), $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 取续滤液进样测定, 计算各个时间点的累积溶出百分率。结果见表 3。

2005 版中国药典规定了穿心莲内酯的限度, 未制定穿心莲内酯的含量测定方法, 本文通过对穿心莲内酯含量测定方法的摸索, 比较了一系列流动相如甲醇-水(35: 65)、乙腈-水(35: 65)、乙腈-水(26: 74)等, 最终选择乙腈-水(26: 74)为流动相, 得到较理想的结果。其色谱图中穿心莲内酯的吸收峰与相邻峰的分度大于 1.5, 阴性对照样品中在与内酯相同保留时间处均无吸收峰, 同时本流动相的类型和比例对脱水穿心莲内酯的分离效果也较理想。该实验方法稳定可靠, 结果准确。

对于不同溶出介质所测得的累积溶出百分数, 通过体外释放的统计分析 f_2 相似因子法($f_2=50 \times \lg\{[1+1/n \sum W_t(Rt-Tt)^2]^{-0.5} \times 100\}$) 计算 f_2 相似因子, 得到磷酸盐缓冲液(pH6.8)、人工胃液、人工肠液 3 种溶出介质与人工胃液: 乙醇(9: 1)的 f_2 相似因子分别为 24, 27, 23(f_2 值越大, 体外溶出度越接近), 表明磷酸盐缓冲液(pH6.8)、人工肠液、人工胃液 3 种溶出介质与人工胃液: 乙醇(9: 1)的释放曲线差异较大, 所以选择人工胃液: 乙醇(9: 1)作为较佳的溶出介质。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 549.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 二部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 73—74.
- [3] 祝国强. 医药数理统计方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 181-183.