

复方丹参黏附微丸黏附性能的测定及体外释放度的考察

王振^{1,2} 赵壮¹ 李鹏跃¹ 杜守颖¹ 孙晶¹ 陆洋¹ 白洁¹

(1.北京中医药大学 中药学院,北京 100102;2.济宁市中医院,山东 济宁 272000)

摘要 通过体内外黏附实验优选复方丹参黏附微丸黏附材料,并对微丸体外释放度进行考察.利用挤出滚圆法制备普通微丸、HPMC微丸、壳聚糖微丸、壳聚糖/HPMC混合微丸.以在体肠黏附实验评价微丸黏附性能,结果显示壳聚糖/HPMC混合微丸具有更高的黏附指数.通过转篮法测定微丸体外释放度,结果显示丹酚酸B、三七皂苷类成分及丹参酮ⅡA于12 h内持续释放,其中丹酚酸B于12 h内释放接近80%;三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁于12 h内均释放完全.人参皂苷Rb₁ 12 h内释放达84.23%,人参皂苷Rd达81.93%.丹参酮ⅡA释放缓慢,12 h内持续释放,达48.02%,成功实现在体黏附和缓释.

关键词 复方丹参;体外黏附;体内黏附;体外释放

中图分类号 R932

文献标识码 A

复方丹参制剂是由丹参、三七及冰片组成,其主要的酚酸类成分、丹参酮类成分、皂苷类成分均具有活血化瘀的功效^[1,2],在临床上是治疗冠心病、心绞痛的重要药物^[3].为解决复方丹参口服制剂生物利用度较低、有效成分如丹酚酸B、丹参酮ⅡA、三七总皂苷等吸收较差的问题^[4],本实验拟通过添加生物黏附材料的方法,将其制备成复方丹参黏附微丸,提高制剂的肠道滞留时间,同时增大微丸与胃肠道的接触面积,促进有效成分的吸收,从而提高药物成分生物利用度.因此,为验证微丸的黏附性能,本实验通过体外、体内黏附实验对其进行全面评价,以求提高实验的准确性,最后对优选出的微丸进行体外释放度考察.

1 仪器与试药

1.1 仪器

THZ-82A 水浴恒温振荡器(金坛市科析仪器有限公司),LC-20AD型高效液相色谱仪(PDA检测器,日本岛津公司),Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Sartorius BS 110S型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司).

1.2 试药及实验动物

丹酚酸B对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:111562-201212);丹参酮ⅡA对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:110766-200619);三七皂苷R₁对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:110745-201318);人参皂苷Rg₁对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:150119);人参皂苷Rb₁对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:110704-201213);人参皂苷Rd对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:111818-201302).

乙腈、甲醇(美国 Fisher 公司,质谱级/色谱级),纯净水(杭州娃哈哈集团),普通微丸、黏附微丸(实验室自制).

SD大鼠,雄性♂,体重(230-250)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2012-0001,新鲜猪小肠(购于北京华诚为民市场).

收稿日期:2019-01-05

基金项目:国家科技重大专项(2014ZX09301306-008)资助

通讯作者:李鹏跃,男,汉族,博士,副教授,研究方向:中药新剂型与新技术,E-mail:pengyuelee@126.com.

2 试验方法

2.1 体外黏附试验

取新鲜猪小肠,用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液冲掉小肠中的内容物,剪成 10 cm 肠段,纵向剪开,铺于玻璃板上,长尾夹固定.分别取一定处方的微丸 100 粒,均匀撒在肠黏膜表面,在饱和 KNO_3 环境(相对湿度 92%)中放置 5 min,取出,于 37 °C 人工肠液中振荡 3 min,振荡频率 60 次/min,详细记录下滞留于肠黏膜表面的微丸个数.

2.2 体内黏附试验

SD 大鼠,禁食给水 24 h,其中对照组给予普通微丸,其它组给予不同处方黏附微丸作为试验组.每只大鼠给予 100 粒微丸,以 2 mL 生理盐水灌服.给药后大鼠禁食禁水,4 h 后处死大鼠,解剖,取出胃及小肠,水平铺伸于白色搪瓷盘上,量取小肠的长度,纵向剖开,将小肠分为上、中、下三段,分别计数大鼠胃中的微丸个数及小肠各段微丸存留长度.大鼠小肠的分段方法为:量取每个小肠的长度,平均分成三段,统计每段的微丸滞留情况,每组试验平行六份.

2.3 体外释放度的考察

采用 2015 年版《中国药典》四部 0931 第一法测定,取复方丹参黏附微丸 0.8 g,以 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液为溶出介质,体积为 500 mL,转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 37 °C,分别在 60、90、120、180、240、360、480、600、720 min 取样 1 mL,0.45 μm 滤膜过滤,每次取样后补加同体积同温度的溶出介质,HPLC 测定,计算累积溶出度.

3 实验结果

3.1 体外黏附实验结果见表 1.

表 1 不同处方微丸体外滞留率 ($n=6, \bar{X} \pm SD$)

组别	滞留率%	SD
普通微丸	3.2	1.3
壳聚糖微丸	33.8	5.5
HPMC 微丸	95.4	2.2
壳聚糖/HPMC 混合微丸	94.4	2.7

体外黏附试验结果显示,复方丹参黏附微丸与普通微丸相比黏附性能较好,且有显著性差异($p < 0.05$).

3.2 体内黏附实验结果见表 2、图 1-4.

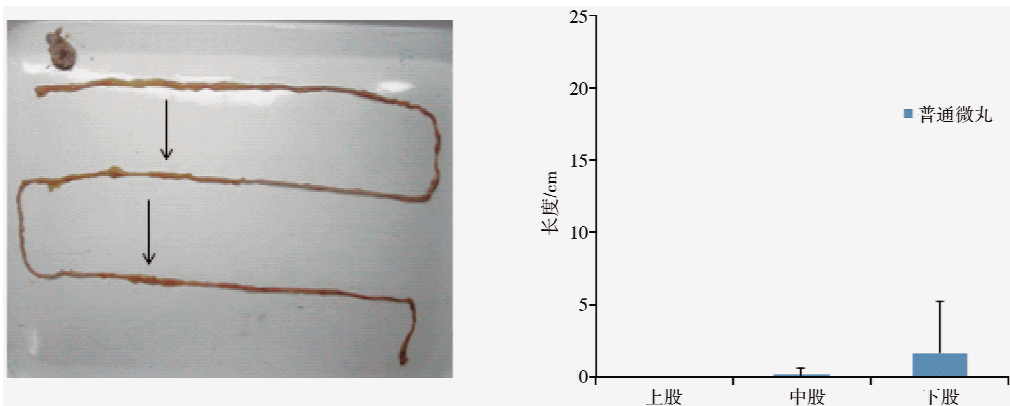
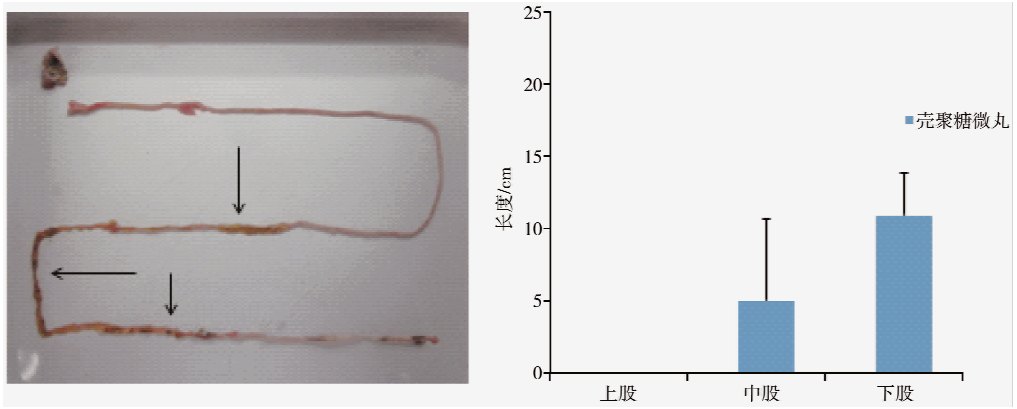
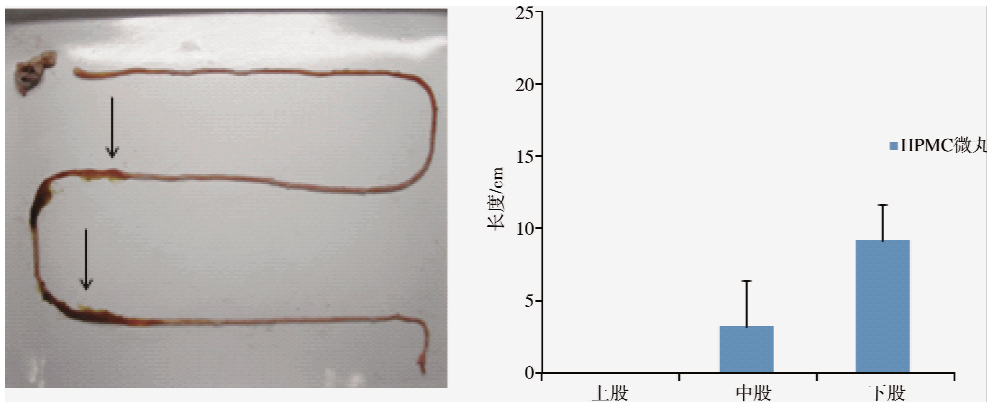
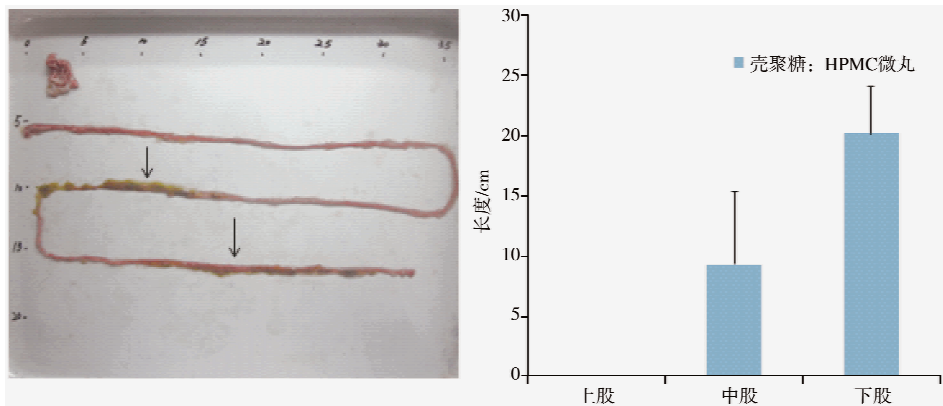


图 1 普通微丸上、中、下肠段存留长度 ($n=6$)

图2 壳聚糖微丸上、中、下肠段存留长度($n=6$)图3 HPMC 微丸上、中、下肠段存留长度($n=6$)图4 壳聚糖/HPMC 混合微丸上、中、下肠段存留长度($n=6$)

微丸给大鼠灌胃 4 h 后,在小肠上段已基本无法找到,主要集中于小肠中段与下段.为方便对黏附情况进行比较,对上、中、下段黏附长度进行加权计算,微丸滞留的位置越趋于小肠前端,说明微丸的黏附性越好,权重越大,设置黏附指数 N ,公式为 $N=0.5 L_1 + 0.3 L_2 + 0.2 L_3$.

表2 微丸的大鼠小肠滞留指数

组别	上段加权值	中段加权值	下段加权值	黏附指数
普通微丸	0.00	0.05	0.33	0.38
壳聚糖微丸	0.00	1.50	2.20	3.70
HPMC 微丸	0.00	0.98	1.88	2.86
壳聚糖/HPMC 混合微丸	0.00	2.80	4.03	6.83

体内黏附实验显示壳聚糖与 HPMC 混合具有更好的黏附效果.在此基础上进一步对混合黏附材料微丸的体外释放度进行研究.

3.3 体外释放度结果见图 5-6.

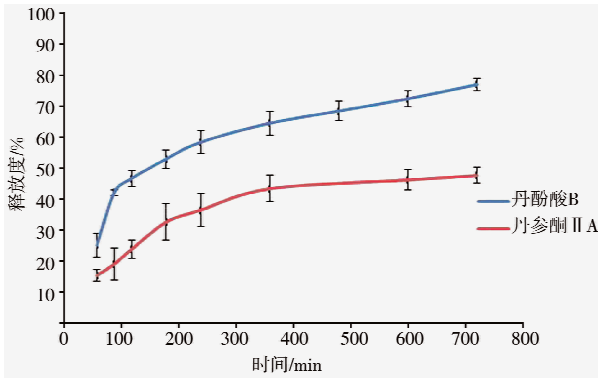


图 5 丹酚酸 B、丹参酮 II A 体外释放度结果

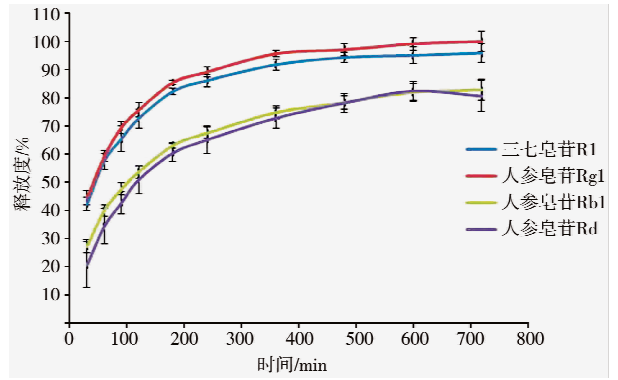


图 6 三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rd 体外溶出度结果

3.4 对外体溶出曲线模型拟合结果见表 3.

表 3 各成分溶出曲线模型拟合结果

成分	最佳拟合方程	方程	R
丹酚酸 B	一级动力学方程	$\ln(100-Q) = -0.0016t + 4.1982$	0.9698
丹参酮 II A	Peppas	$\ln Q = 0.4528 \ln t + 1.0137$	0.9688
三七皂苷 R ₁	一级动力学方程	$\ln(100-Q) = -0.0045t + 3.8323$	0.9758
人参皂苷 Rg ₁	一级动力学方程	$\ln(100-Q) = -0.0084t + 4.1726$	0.9978
人参皂苷 Rb ₁	Peppas	$\ln Q = 0.3384 \ln t + 2.3084$	0.9770
人参皂苷 Rd	Peppas	$\ln Q = 0.4131 \ln t + 1.8441$	0.9676

Ritger-Peppas 方程为 $\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$, 其中 t 为释放时间, M_t 为 t 时间的累计释放量; M_∞ 为药物含量, n 为

释放指数, 是表征释放机制的特征参数. Peppas 公式中, 对于微丸这类圆球型制剂, 当 $n \leq 0.43$ 时, 药物释放机制为 Fickian 扩散 (Fickian diffusion); $0.43 < n < 0.89$ 时, 药物释放机制为 non-Fickian 扩散 (Anomalous transport), 即扩散与骨架溶蚀机制相结合; 当 $n \geq 0.89$ 时, 药物释放机制为骨架溶蚀.

拟合结果显示, 丹酚酸 B、三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的释放规律最趋近于一级释放动力学模型; 丹参酮 II A、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd 及龙脑的释放规律最趋近于 Peppas 动力学模型, 其中丹参酮 II A 脂溶性成分释放机制为 non-Fickian 扩散, 属于药物扩散和骨架溶蚀协同作用; 人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd 释放机制为 Fickian 扩散.

4 讨论

(1) 相关文献^[5]中常以流速 22.0 mL/min 的磷酸盐缓冲液冲洗均匀铺在大鼠肠黏膜上的微丸, 一定时间后, 计数滞留于大鼠肠黏膜上的微丸个数, 评价微丸的滞留率. 但此种方法不能保证所有微丸被均匀的冲洗, 且冲洗流速过快, 重现性较差. 改进后的体外黏附试验, 使微丸处于人工肠液中, 在饱和 KNO₃ 环境中放置的过程模拟了黏附过程, 恒速振荡模拟肠道蠕动, 实验中微丸均匀受力, 具有良好的重现性和可操作性, 适合于体外快速优选黏附微丸处方. 体外试验结果表明, 微丸在增加 HPMC 黏附材料后, 其黏附性能较普通微丸及卡波姆微丸显著增加. 但体外黏附实验并不能真实反映微丸在体内的黏附情况, 故本实验在体外黏附实验的基础上对其在体内的黏附情况进行考察.

(2) 体内黏附试验发现, 含有 HPMC 的微丸遇水后发生溶胀, 大鼠肠道解剖后发现, 不能找到成型的微丸, 而是以食糜状物分布于小肠各段, 因此体内黏附试验以微丸的小肠内留存位置和长度作为评价微丸体内黏附性的依据. 给禁食 24 h 的 SD 大鼠灌服普通微丸, 4 h 以后, 在大鼠胃与小肠内基本不能找到微丸, 说明微丸在大鼠整个小肠基本被排空; 给禁食 24 h 的 SD 大鼠灌服黏附微丸, 4 h 以后, 在胃内找不到各个处方的黏附微丸, 说明在胃中已排空, 而在大鼠小肠中能够找到滞留的微丸, 说明各个处方的黏附微丸在大鼠小

肠中有一定的滞留作用.从黏附微丸滞留的位置和滞留长度的统计结果得出,4 h后微丸主要集中于小肠中段及下段.有实验研究表明,壳聚糖可与胃黏蛋白发生特异性结合^[6],HPMC在一定的相对分子质量下有利于扩散进入黏膜表面黏液层^[7],故含有 HPMC、壳聚糖的微丸在体内黏附试验中表现出较好的黏附性能.

(3) 体外释放试验结果发现,复方丹参黏附微丸,对各成分均有一定的缓释作用.丹酚酸 B、三七皂苷类成分及丹参酮 II A 于 12 h 内持续释放,其中丹酚酸 B 于 12 h 内释放接近 80%;三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 与人参皂苷 Rd 于 12 h 内均释放完全.丹参酮 II A 释放缓慢,12 h 内持续释放,未释放完全.方中各成分释放过程比较一致,丹酚酸 B、三七皂苷 R1 和人参皂苷 Rg1 释放过程趋向一级动力学方程,丹参酮 II A、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rd 释放过程趋向 Peppas 方程.对冰片的体外释放度研究发现,与市售的复方丹参片相比,复方丹参黏附微丸中的龙脑具有明显的缓释效果,在一定程度上降低了冰片对胃肠黏膜的刺激作用,提高了药物的安全性^[8],避免长期服用造成潜在出血的风险^[9].

(4) 本实验通过前期优选出来的黏附材料^[10],将复方丹参制剂制备成复方丹参黏附微丸,通过增加复方丹参制剂在体内的滞留时间及与肠黏膜的接触面积,促进机体对其有效成分的吸收,解决其有效成分如丹酚酸 B、丹参酮 II A、三七总皂苷吸收差、生物利用度低的问题^[11-13].一般来说,对黏附材料的筛选常采用体外评价方法,而对制剂黏附性能的评价,则通常以体内实验结果为准.这种做法可以明显减少实验动物的用量,但通过体外评价方法筛选的生物黏附材料在体内并不一定具有良好的黏附能力^[7].本实验通过体外、体内实验综合对黏附微丸评价,来解决单一的体外评价不能真实反映出其体内黏附情况的问题^[14-17].最后对通过体内外黏附实验优选出来的处方进行体外释放度测定,对其进行进一步的评价.体外释放结果显示,将复方丹参制备成黏附制剂后,各个成分均有一定的缓释作用,促进药物在体内的吸收,减少了药物的服用次数.为对复方丹参黏附微丸进行综合评价,在后续实验中,本课题组还将与市售的复方丹参片进行对比,在体内药动学方面进行研究,以对其进行完整评价.

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:1213-1219.
- [2] 张静静,刘桂芹,王庆鹏,等.植物三七中皂苷类化学成分的研究进展[J].聊城大学学报(自然科学版),2018,31(2):43-52.
- [3] 洪艳,文晓霞,李莎,等.LC-MS/MS法同时测定复方丹参颗粒和复方丹参滴丸中6种成分[J].中成药,2019,41(2):270-274.
- [4] 王振,陈笑南,黎丹奇,等.不同处方复方丹参黏附微丸黏附性能的评价[J].北京中医药大学学报,2016,39(11):945-948.
- [5] 徐梅霞,孙敏捷,张灿,等.5-氨基水杨酸结肠定位黏附微丸的制备及评价[J].中国药科大学学报,2013,44(5):432-436.
- [6] Bigucci F, Luppi B, Musenga A, et al. Chitosan Salts Coated with Stearic Acid as Colon-Specific Delivery Systems for Vancomycin [J]. Drug Deliv, 2008, 15(5):289-293.
- [7] 李鹏跃,杜守颖,陆洋,等.生物黏附递药系统的研究进展及其在中药领域的应用[J].中国中药杂志,2017,42(24):4687-4693.
- [8] 王振,杜守颖,陆洋,等.复方丹参肠黏附微丸中龙脑含量测定方法的建立及不同剂型龙脑溶出度的研究[J].中国中药杂志,2015,40(16):3194-3199.
- [9] 束云,李贻奎,李连达.复方丹参制剂药理作用的比较研究[J].中药药理与临床,2012,28(1):132-134.
- [10] 赵壮,杜守颖,陆洋,等.卡波姆等6种生物黏附材料体内外黏附性能评价[J].中国药学杂志,2014,49(24):2188-2192.
- [11] 张英丰,李玉洁,杨庆,等.大鼠在体单向肠灌注法进行丹参素、丹酚酸 B 的肠吸收研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):96-100.
- [12] 韩旻,傅韶,方晓玲.三七皂苷中人参皂苷 Rg1 与 Rb1 口服吸收及其体内药代动力学的研究和比较[J].药学学报,2007,42(8):849-853.
- [13] 闫红波,吴清,杜守颖,等.丹参酮类成分及丹参脂溶性提取物在大鼠小肠内的吸收机制比较研究[J].中国中药杂志,2010,35(21):2917-2922.
- [14] 丁劲松,蒋学华.胃肠道生物粘附剂及其评价方法[J].中国药房,2002,13(6):371-374.
- [15] 陈卫,朱春燕.三七总皂苷胃肠道生物黏附片的体外释药及黏附特性考察[J].中国药学杂志,2006,41(12):917-920.
- [16] 张悦.土荆芥油胃滞留微丸给药系统的研究[D].上海:第二军医大学,2009.
- [17] 付劼,孙逊,张志荣.采用 γ 照相机考察卡波姆 934 在狗体内的黏附性[J].生物医学工程学杂志,2002(3):423-425.