

· 制剂与质量 ·

指纹图谱评价雷公藤胃漂浮缓释制剂的体外释放度研究

张 伟^{1,2}, 宋洪涛^{1*}, 张 倩³

(1. 南京军区福州总医院 药学科, 福建 福州 350025; 2. 福建中医学院 药理学系, 福建 福州 350003;

3. 福建医科大学药学院, 福建 福州 350004)

摘要:目的 考察雷公藤胃漂浮缓释制剂的体外释放行为,建立其质量评价方法。方法 采用 HPLC 法进行释放介质指纹图谱分析,选择雷公藤内酯醇为参照峰,分别求出其他指纹峰与对照峰面积的线性相关方程,计算相对释放度及相似因子 f_2 值。结果 雷公藤胃漂浮缓释片和胃漂浮缓释微丸中的各成分在缓释的同时未能达到同步释放,而采用多元定时释药技术制备的雷公藤胃漂浮缓释胶囊中的各成分在缓释的同时达到了同步释放。结论 以指纹图谱特征峰为指标可以更加科学全面地评价雷公藤缓释制剂的体外释放行为及其制剂的质量。

关键词:雷公藤胃漂浮缓释制剂; HPLC 指纹图谱; 体外释放

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0376-05

Evaluation on in vitro release of gastric floating sustained-release preparation of *Tripterygium wilfordii* by HPLC fingerprints

ZHANG Wei^{1,2}, SONG Hong-tao¹, ZHANG Qian³

(1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Pharmacy, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China; 3. School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

Abstract : Objective To investigate the drug *in vitro* release behavior of gastric floating sustained-release preparation of *Tripterygium wilfordii* and establish their quality evaluating methods. **Methods** HPLC was Employed to gain the fingerprints of releasing medium of preparations. Triptolide was selected as marker to calculate the linear equation concerning peak area then the relative drug release and f_2 similarity factor value were acquired. **Results** Various components in gastric floating sustained-release tablets and pellets of *T. wilfordii* could not release synchronously while sustained-releasing but all of them in the gastric floating sustained-release capsules of *T. wilfordii* prepared by using multiparticulate site-controlled release technology could release synchronously while sustained-releasing. **Conclusion** The quality and *in vitro* release behavior of gastric floating sustained-release preparation of *T. wilfordii* could be evaluated more scientifically and comprehensively by using HPLC fingerprints method.

Key words: *Tripterygium wilfordii* gastric floating sustained-release preparation; HPLC fingerprints; *in vitro* release

中药成分复杂,各成分的量较低,只有在体内同时释放吸收、同时作用于靶点部位才能发挥中药多层次、多靶点的综合优势,若将其割裂开来,不仅违背了中医用药的整体观,而且必将降低中药的临床疗效。所以,中药缓释制剂制备的关键技术及难点就在于如何使中药的各成分在缓释的同时达到同步释

放,以使各成分在体内能够相互协同、相辅相成^[1]。然而,如何科学全面地考察和评价中药缓释制剂的质量,又是研究者必须慎重考虑和选择的关键问题。本实验制备了3种雷公藤胃漂浮缓释制剂,采用 HPLC 指纹图谱考察了多组分的释放行为,以期对中药缓释制剂的制备和质量评价提供参考。

收稿日期:2009-07-03

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2006J0116)

作者简介:张 伟(1984—),女,河南南阳人,硕士研究生,研究方向为中药制剂与质量控制。

Tel: (0591) 22859972 E-mail: weiweiann61845654@yahoo.com.cn

*通讯作者 宋洪涛 Tel: (0591) 22859459 E-mail: sohoto@vip.sohu.com

1 仪器与试药

HP1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);RCZ-5A 型智能药物溶出度仪(天津大学精密仪器厂);TDP-5 型单冲压片机(上海天凡制药机械厂);JHQ-100 型微型流化床包衣机(沈阳医联新药研究所);JBZ-300 型包衣制粒机(沈阳医联新药研究所);BT1-100E 型恒流泵(上海琪特分析仪器有限公司)。

雷公藤内酯醇对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111567-200502);雷公藤提取物(无锡开立达实业有限公司,批号 070203);羟丙基甲基纤维素(HPMC_{K4M}、HPMC_{E5},上海卡乐康包衣有限公司);十六醇、十八醇(广东汕头西陇化工厂);微晶纤维素(MCC,江苏常熟药用辅料厂);低取代羟丙基纤维素(L-HPC,营口奥达药用辅料厂);乙基纤维素水分散体(Surelease,上海卡乐康包衣有限公司);聚维酮(PVPK₃₀,国药集团化学试剂有限公司);碳酸氢钠(NaHCO₃,国药集团化学试剂有限公司);硬脂酸镁(上海实验试剂有限公司);十二烷基硫酸钠(SDS,浙江豪森制药有限公司);乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 雷公藤胃漂浮缓释制剂的制备

2.1.1 雷公藤胃漂浮缓释片的制备^[2]:按处方量分别称取 20%雷公藤提取物、10%MCC、30%HPMC_{K4M}、15%十六醇、10%PVP 和 15%碳酸氢钠,过 80 目筛,混合,加入适量硬脂酸镁混合均匀,用直径 9 mm 的冲头,采用粉末直接压片法压制成平弧片,片质量为 200 mg,即得。

2.1.2 雷公藤胃漂浮缓释微丸的制备:按处方量分别称取 10%的微晶纤维素(MCC)和 90%的十八醇,过筛混匀,加入 40%(0.40 g/mL)的水制软材,采用挤出滚圆法制备空白胃漂浮微丸(24~40 目)。将雷公藤提取物混悬于含 1%HPMC(5 mPa·s)和 0.5%SDS 的水溶液中制成载药包衣液,使用流化床对微丸进行载药包衣,制备载药胃漂浮微丸。以含 3%PVP 的乙基纤维素水分散体为缓释层包衣材料,包衣增重 20%,然后于 40℃烘箱中热处理 12 h,即得。

2.1.3 采用多元定时释药技术制备雷公藤胃漂浮缓释胶囊^[3]:称取适量 2.1.2 项下制备的载药胃漂浮微丸,置流化床包衣机内,以 3%L-HPC、1%HPMC(5 mPa·s)和 1%SDS 的混悬液作为内层溶胀材料进行包衣,包衣增重 15%,继以乙基纤维素

水分散体作为外层控释材料进行包衣制备不同包衣增重的胃漂浮定时释药包衣微丸,然后于 40℃烘箱中热处理 12 h。等量称取控释层包衣增重分别为 0%、8%、12%、15%、22%的包衣微丸,混均装入硬胶囊中,即得。

2.2 色谱条件:XB-C₁₈ 色谱分析柱(200 mm×4.6 mm,5 μm)(上海月旭材料科技有限公司);流动相:0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:20%B~40%B(0~45 min),40%B~50%B(45~75 min),50%B~60%B(75~85 min),60%B~90%B(85~120 min),90%B~100%B(120~130 min);体积流量:1.0 mL/min;柱温:35℃;检测波长:218 nm,进样量:20 μL。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备:称取雷公藤内酯醇对照品适量,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 432 μg/mL 对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备:照《中国药典》2005 年版释放度测定法(附录 D 第一法),采用溶出度测定(附录 C)第三法的装置,以 0.1%SDS 的人工胃液 250 mL 为溶出介质,转速(100±1) r/min,温度(37±0.5)℃。在每个溶出杯中投入已精密称重的雷公藤胃漂浮缓释制剂适量,立即计时,分别在 1、2、4、6、8、10、12 h 滤过,取样 10 mL,置 25 mL 具塞试管内,加醋酸乙酯 10 mL,振摇。待静置分层,吸取上层溶液 9 mL,水浴加热蒸干,加乙腈 200 μL 溶解,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样 6 次,对各色谱峰进行比较,其相对保留时间 RSD 均小于 0.3%,相对峰面积 RSD 均小于 3%,表明其精密度良好。

2.4.2 重现性试验:取同一样品 6 份,分别制备供试品溶液,测定,各色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 0.3%,相对峰面积 RSD 均小于 3%,表明重现性良好。

2.4.3 稳定性试验:取同一样品溶液,分别在 0、4、8、12、16、24 h 进样测定,各色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 0.3%,相对峰面积 RSD 均小于 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 释放特征指纹图谱中共有峰与对照峰的确定:经比较不同时间点取样的供试品指纹图谱,发现在 1、2 h 取样时间点的供试品中有些峰未给出峰面积,在每个取样时间点供试品中均能给出峰面积的

约有 14 个峰,故确定这 14 个峰为释放指纹图谱的特征共有峰。其中 2 号峰为雷公藤内酯醇,其分离度较高、峰面积较大、稳定性好,且方便购得,故选为对照峰。雷公藤胃漂浮缓释片、雷公藤胃漂浮缓释微丸和采用多元定时释药技术制备的雷公藤胃漂浮缓释胶囊的释放特征指纹图谱分别见图 1。

2.6 特征指纹峰成分体外释放度的测定

2.6.1 对照峰标准曲线的制备:精密吸取雷公藤内酯醇对照溶液 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加乙腈至刻度,摇匀,进样测定。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 2.0194X + 17.227$, $r = 0.9999$ 。结果表明,雷公藤内酯醇的进样量在 8.64~864 ng 与峰面积呈良好的线性关系。

2.6.2 特征指纹峰成分释放度的计算:将胃漂浮缓释制剂分别进行释放度测定,记录指纹图谱。以特征指纹峰对相应时间雷公藤内酯醇的峰面积进行线性回归,求出相关性方程(r 均大于 0.95),通过相关性方程将指纹峰面积折算出相当于相应对照品峰面积,将此值代入雷公藤内酯醇回归方程,求出指纹峰成分相当于雷公藤内酯醇的量,即该成分的相对释放量,以单元中实际相对量为 100%,计算指纹峰对应成分的累积释放率^[4]。以雷公藤内酯醇释放度为对照成分释放度,采用 f_2 相似因子法计算各特征指纹峰的释放相似度。雷公藤胃漂浮缓释片、雷公藤胃漂浮缓释微丸和采用多元定时释药技术制备的雷公藤胃漂浮缓释胶囊的 14 个特征指纹峰成分的体外释放曲线分别见图 2,相似因子 f_2 值见表 1。

3 讨论

雷公藤是有毒中药,临床用于类风湿关节炎、肾小球肾炎、肾病综合征等的治疗,疗效显著,但不良反应较大且常见,同时鉴于小肠是雷公藤主要有效成分雷公藤内酯醇的主要吸收部位,所以,研制雷公藤胃漂浮缓释制剂具有较高的实用价值和现实意义。

参考文献报道的方法^[5,6],曾选择使用了乙腈-水、乙腈-1%醋酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液等多种流动相系统,结果表明以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱效果较好。二萜内酯类化合物和倍半萜类生物碱是雷公藤中的主要有效成分,其中二萜内酯类化合物含有不饱和内酯环,在 218 nm 附近有最大吸光值;而倍半萜类生物碱在 220、267 nm 有其特征吸收峰。为了最大程度地反映出雷公藤制剂中所含的主要有效成分的化学信息,本实验选择了 210、215、218、225、267 nm 波长进行测

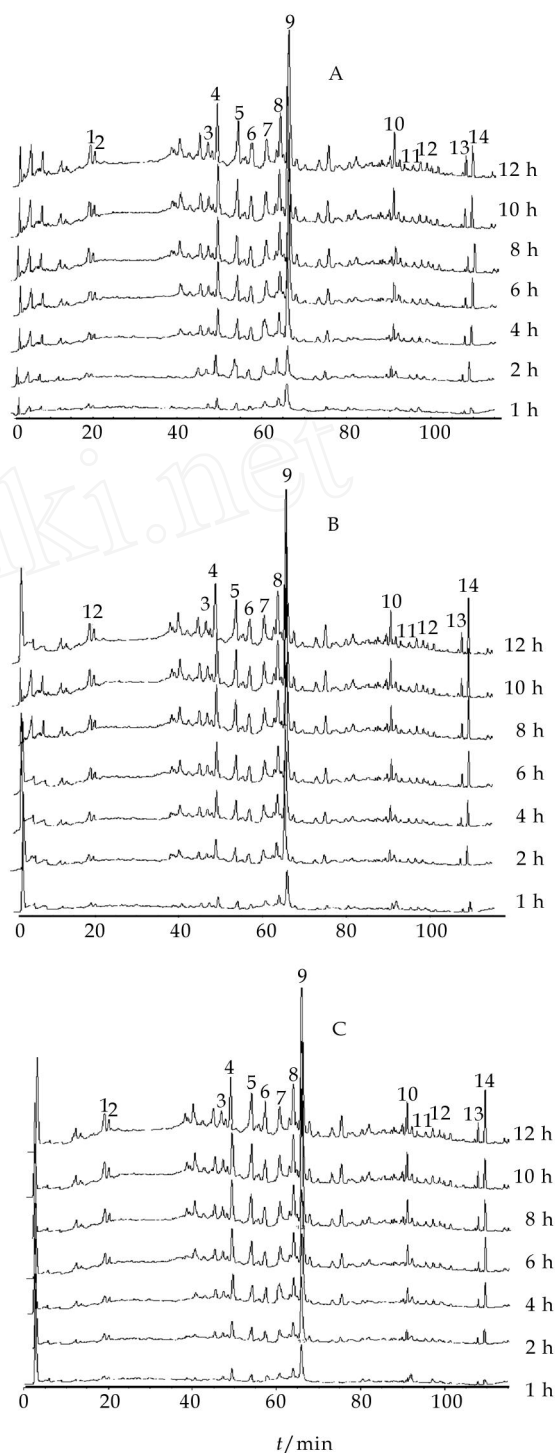


图 1 雷公藤胃漂浮缓释片(A)、胃漂浮缓释微丸(B)和胃漂浮缓释胶囊(C)不同时间点释放样品的 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC Fingerprints of dissolution samples of gastric floating sustained-release tablets (A), pellets (B), and capsules (C) of *T. wilfordii* at different times

定,结果在波长 218 nm 下出现的色谱峰适中,峰形完整,故选择 218 nm 作为雷公藤制剂体外释放度的测定波长。

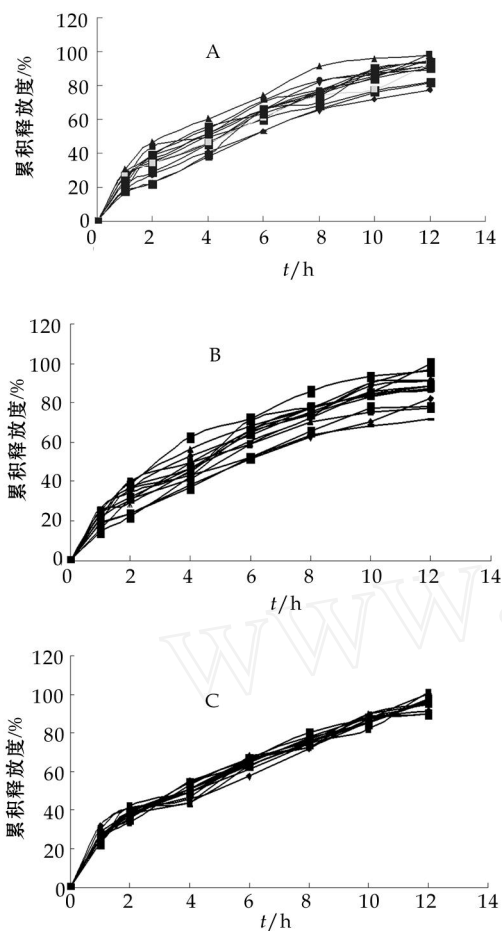


图 2 雷公藤胃漂浮缓释片 (A)、胃漂浮缓释微丸 (B) 和胃漂浮缓释胶囊 (C) 中多成分的释放曲线

Fig 2 Release profiles of different components from gastric floating sustained-release tablets (A), pellets (B), and capsules (C) of *T. wilfordii*

表 1 制剂中各特征指纹峰成分的体外释放 f_2 值 (n = 6)

Table 1 f_2 Values of in vitro release of every peak in fingerprints of three kinds of sustained-release preparation (n = 6)

| 峰号 | f_2 值 | | |
|----|---------|-------|-------|
| | 缓释片 | 缓释微丸 | 缓释胶囊 |
| 1 | 60.0 | 47.1 | 73.7 |
| 2 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| 3 | 43.2 | 57.6 | 65.7 |
| 4 | 64.1 | 64.8 | 74.5 |
| 5 | 62.0 | 60.1 | 80.5 |
| 6 | 59.4 | 62.8 | 69.0 |
| 7 | 49.1 | 47.9 | 71.9 |
| 8 | 60.4 | 69.9 | 83.0 |
| 9 | 67.8 | 48.6 | 88.6 |
| 10 | 42.9 | 73.0 | 70.3 |
| 11 | 62.3 | 61.0 | 69.0 |
| 12 | 49.3 | 57.4 | 72.3 |
| 13 | 48.6 | 49.8 | 77.9 |
| 14 | 66.5 | 49.2 | 82.3 |

从缓释制剂体外释放的 HPLC 指纹图谱及释

放曲线可以直观看出,雷公藤胃漂浮缓释片和缓释微丸中各成分的体外释放不同步。进一步以雷公藤内酯醇释放度为对照,采用相似因子法定量评价各成分的释放行为,结果有 1/3 的指纹峰成分释放的 f_2 值 < 50,说明这些指纹峰成分与雷公藤内酯醇的体外释放度有较大差异,表明雷公藤胃漂浮缓释片和缓释微丸中各成分在缓释的同时未达到同步释放。究其原因,亲水凝胶骨架型胃漂浮缓释片的释药机制是以扩散与溶蚀相结合,膜控缓释微丸是以药物扩散为主要释药机制,由于中药中的多种成分均匀分布在固体制剂中,它们受到制剂处方因素和工艺条件的影响是相同的,因此,对于这类制剂,各种成分的释放行为差异主要取决于药物本身的理化性质如分子大小、极性、溶解度、油水分配系数等。而雷公藤中的化学成分相当复杂,各种成分的理化性质差异较大,其释药速率必然也有较大差异。也就是说,采用常用的凝胶缓释骨架片和膜控缓释微丸的制备技术,难以保证中药中的各成分在缓释的同时达到同步释放。

而采用多元定时释药技术制备的雷公藤胃漂浮缓释胶囊,各指纹峰成分体外释放的相似度良好,50 f_2 100,显示各指纹峰成分在缓释的同时达到了同步释放。该制备技术依据的是双层膜时控-爆破原理,即在载药层之外首先包一层溶胀层,最后再包一层控释层。当水分进入控释层后,溶胀层首先吸水膨胀,当溶胀压足够大时,控释层衣膜破裂,药物迅速释放。通过选择和改变溶胀层和控释层的材料和包衣增重,可以制备具有不同释药时滞的定时脉冲释药微丸,将其按一定比例混合装入胶囊即可制成缓释制剂,该胶囊中的微丸在释放介质中可于不同时间依次胀破释药,从而确保中药缓释制剂中各成分达到同步释放,并在整体上呈现出一种缓释特征。由于药物的释放主要与包衣膜的材料及厚度有关,而与药物本身的理化性质关系较小,所以可使理化性质不同的各成分在缓释的同时达到同步释放。

如果只采用一个成分或采用比色法测定雷公藤总二萜内酯作为释放度考察指标,3 种制剂均具有良好的缓释特征,但由于任何一种成分或某类成分不能代替中医用药的整体疗效,所以仅靠一个指标无法区分缓释制剂的优劣,也无法证明中药缓释制剂中的各成分是否达到了整体同步缓释,雷公藤叶提取物的指纹图谱研究已有报道^[7],而采用 HPLC 指纹图谱技术可以充分了解中药缓释制剂中各成分的体外释放行为,并且可以区分采用不同缓释技术

制备的中药缓释制剂的优劣,达到了预期目的。因此,在目前条件下,采用色谱指纹图谱来考察中药缓释制剂多组分的体外释放行为,评价中药缓释制剂的质量,具有较强的科学性、代表性、可行性和适用性,值得进一步研究推广。

参考文献:

- [1] 张伟,宋洪涛,张倩. 中药口服缓释制剂的研究进展[J]. 中国药房,2009,20(6):472-474.
- [2] 张伟,宋洪涛,林方清. 雷公藤胃漂浮缓释片的制备与质量评价[J]. 中草药,2009,40(2):210-214.
- [3] 李丹,宋洪涛,初阳,等. 采用多元定时释药技术制备复方丹参缓释胶囊的研究[J]. 中草药,2009,40(4):544-548.
- [4] 李俊松,冯怡,徐德生,等. 白芍总苷缓释微丸体外释放评价方法的研究[J]. 中成药,2008,30(3):357-361.
- [5] 周雯,李红茹,李淑芬,等. 雷公藤超临界CO₂提取物的HPLC指纹图谱建立[J]. 中国中药杂志,2007,32(8):706-708.
- [6] 杨春欣,梁健,沈熊,等. 雷公藤多苷片高效液相指纹图谱的研究[A]. 中国中西医结合学会. 第五届全国雷公藤学术会议论文汇编[C]. 福建泰宁,2008.
- [7] 李克,王曙东,陈爽. 雷公藤叶提取物高效液相色谱指纹图谱的研究[J]. 中草药,2006,37(11):1671-1673.

甘草次酸脂质体的制备及其药剂学性质的研究

郭波红^{1,2},程怡^{1*},林绿萍¹

(1. 广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006; 2. 广东药学院 药剂教研室,广东 广州 510006)

摘要:目的 研究甘草次酸阳离子脂质体的制备方法并考察其药剂学性质。方法 采用正交设计筛选处方,乙醇注入法制备甘草次酸脂质体;用葡聚糖凝胶 G-50 柱分离脂质体和游离药物,用 HPLC 法测定包封率;用透射电镜观察脂质体的外观形态,并用粒径分析仪测定脂质体的粒径和 zeta 电位;进一步考察脂质体的释放规律。结果 所得脂质体包封率为(91.61 ± 1.16)%;形态为粒径均匀的球形和类球形,粒径为(141 ± 10) nm, Zeta 电位为(35.9 ± 5) mV;脂质体的体外释放符合 Higuchi 方程;具有较好的稳定性。结论 优选得到的甘草次酸脂质体处方和制备工艺合理、稳定,其体外释放具有缓释特点。

关键词:甘草次酸脂质体;包封率;体外释放

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)03-0380-04

Preparation and pharmaceutical characterization of glycyrrhetic acid liposomes

GUO Bo-hong^{1,2}, CHENG Yi^{1*}, LIN Lüping¹

(1. Department of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Pharmacy, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China)

Abstract : Objective To prepare and characterize glycyrrhetic acid cationic liposomes. **Methods** Liposomes were prepared by ethanol injection technique. An orthogonal test was utilized to optimize the formulation and preparation of glycyrrhetic acid liposomes. The unencapsulated glycyrrhetic acid and liposomes were separated by Sephadex gel G-50, the encapsulation efficiency was detected by HPLC. The morphological examination of glycyrrhetic acid liposomes was performed using transmission electron microscopy. The particle size and Zeta potential of the liposomes were measured. The release rate of glycyrrhetic acid from liposomes was tested. **Results** The liposomes with spherical or ellipsoidal shape and better stability featured the encapsulation efficiency of (91.61 ± 1.16)%, the mean particle size of (141 ± 10) nm, and Zeta potential of (35.9 ± 5) mV. The *in vitro* release kinetics were consistent with Higuchi equation. The stability of glycyrrhetic acid liposomes was better. **Conclusion** The selected formulation and preparation technic of glycyrrhetic acid liposomes could be rational, stable, and with a sustained feature *in vitro* release.

Key words : glycyrrhetic acid liposome; encapsulation efficiency; *in vitro* release

收稿日期:2009-08-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772790);高等学校博士学科点专项科研基金(20060572012)

作者简介:郭波红(1976—),女,湖南人,2007级在读博士研究生,讲师,主要从事药物新剂型的研究。

Tel: (020) 39352117 E-mail: bohong-g @163.com

*通讯作者 程怡 E-mail: ncchengyi @21cn.com