

不同类型六味地黄丸的物质组释放动力学特征及其可视化表征

叶英响¹, 陈 烨², 翁夏蒙², 吴素香², 石森林^{2*}

1. 义乌市中心医院, 浙江 义乌 322200

2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 考察不同类型六味地黄丸的物质组释放动力学特征, 并对其进行可视化表征。**方法** 运用中药物质组释放动力学理论, 参照《中国药典》2015 年版, 采用桨法装置测定不同类型六味地黄丸各时间点物质组释放率, 拟合释放曲线, 计算释放动力学特征参数; 以市售最常见的水蜜丸、浓缩丸为参比制剂, 对其他类型的六味地黄丸进行 f_2 相似因子的计算评价; 并采用物质组释放图谱、释放增量图谱, 以期能够定量、整体并可视化评价不同类型六味地黄丸的物质组释放动力学特征。**结果** 不同类型六味地黄丸的物质组释放动力学特征符合 Weibull 释放模型, 计算各 Weibull 分布参数 T_{50} 和 T_d , 除浓缩丸与水泛丸外, 各类型丸剂组间均有显著性差异 ($P < 0.05$), 并运用 f_2 相似因子法对比, 发现不同类型六味地黄丸物质组释放具有一定的差异和相似性, 通过物质组释放图谱与释放增量图谱可直观可视化地评价各类型丸剂的释放动力学特征。**结论** 通过物质组释放动力学可以定量、整体并可视化地评价不同类型六味地黄丸的释放动力学特征, 与古语所述“水丸取其易化, 蜜丸取其缓化, 糊丸取其迟化, 蜡丸取其难化”基本相符。

关键词: 六味地黄丸; 中药物质组; 释放动力学; 可视化评价; 水蜜丸; 浓缩丸; f_2 相似因子

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)21-4425-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.21.010

Characteristics of materiome release kinetics and visual evaluation of different types of Liuwei Dihuang Pills

YE Ying-xiang¹, CHEN Ye², WENG Xia-meng², WU Su-xiang², SHI Sen-lin²

1. Yiwu Central Hospital, Yiwu 322220, China

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To investigate the characteristics of materiome release kinetics of Liuwei Dihuang Pills (LDP), and to evaluate its visualization. **Methods** According to the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, using the evaluation methods of release kinetics of Chinese material medica to determine the materiomics release kinetics and the release characteristic of LDP by the paddle method. Then f_2 fit factor was calculated and evaluated on other types of LDP in comparison with water-bindered pills and condensed pills as, which are two most common preparations in the market. Moreover, materiome release spectrum and release increment spectrum were used, hoping to quantify, integrate and visualise the materiome release characteristics of different types of LDP. **Results** The kinetic characteristics of the LDP accord with the Weibull release model, T_{50} and T_d were calculated, and there are significant differences between different types of pills ($P < 0.05$) in addition to condensed pills and water pills. Also, some differences and similarities in the materiomics release characteristic by f_2 fit factor were found in the study. Materiome release spectrum and release increment spectrum can be used to quantify, integrate and visualise the materiome release characteristics of LDP on different types. **Conclusion** The materiomics release kinetics can be applied to quantify, integrate and visualise the materiome release characteristic of LDP on different types. Basically in agreement with the saying, “water pills from the facilitation, honey pills take the slow, paste pills from the late of, wax-wrapped pills take the difficult”.

Key words: Liuwei Dihuang Pills; materiome of Chinese materia medica; release kinetics; visual evaluation; water-bindered pills; condensed pills; f_2 fit factor

收稿日期: 2017-06-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274090); 浙江省中医药科技项目 (2014ZB129)

作者简介: 叶英响 (1967—), 男, 主任中药师, 主要从事临床中药学研究。Tel: 13575949899

*通信作者 石森林 (1971—), 男, 博士, 教授, 从事药物新剂型与新技术研究。Tel: 13157106148 E-mail: pjstone@163.com

#并列第一作者 陈 烨 (1993—), 男, 硕士生。Tel: 18858162262 E-mail: 531489353@qq.com

六味地黄丸最早记录于宋代名医钱乙的《小儿药证直诀·卷下》，称地黄圆；由熟地黄、山茱萸、淮山药、泽泻、茯苓、丹皮6味药组成，有滋阴补肾的功效，被称为“千年补肾良药，补阴方药之祖”，被广泛应用于心脑血管、内分泌、泌尿生殖、妇科等临床疾病的治疗^[1-7]，是应用最广的传统丸剂之一。现临床应用主要以丸剂为主，有近650个批准文号，200多家厂家生产，主要有水蜜丸、大蜜丸、浓缩丸等，如广州白云山公司注册的水蜜丸，仲景宛西制药公司和九芝堂注册的浓缩丸，太原大宁药业注册的大蜜丸等，制剂类型多样^[8]。而目前对中药传统丸剂的物质组释放动力学特征研究方法已经趋于成熟^[9]，如冠心苏和丸^[10]、银翘解毒丸^[11]、五子衍宗丸^[12]、桂枝茯苓丸^[13]、龙胆泻肝丸^[14]等均有相关的研究报道，可以得出该评价方法具有操作相对简单，过程稳定，能够定量、整体地反映溶出/释放特征等特点，值得进一步推广。根据文献报道，六味地黄丸有效成分（丹皮酚、马钱苷）吸收部位主要在小肠^[15-16]，遂用中药物质组释放动力学评价方法，以pH 6.8磷酸盐缓冲液（PBS）模拟肠道环境，评价不同丸剂类型六味地黄丸的多组分动力学释放特征。以为不同类型六味地黄丸的质量控制和临床应用提供参考。

1 仪器与试药

UV-Vis2450 型紫外-可见分光光度仪，日本岛津公司；ZRS-6G 智能溶出试验仪，天津天大天发科技有限公司；XS105 DualRange 型分析天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；JA2003N 型电子天平，上海精密科学仪器科技有限公司；六味地黄丸，实验室自制，批号：大蜜丸 20140319（9 g/丸）、小蜜丸 20140701（0.2 g/丸）、水蜜丸 20140616（0.2 g/丸）、糊丸 20140705（0.2 g/丸）、水泛丸 20140711（0.2 g/丸）、浓缩丸 20140715（0.18 g/丸）、蜡丸 20140806（0.2 g/丸）。聚偏氟乙烯微孔滤膜，F 型，批号 20121120，上海兴亚净化材料厂；微孔滤膜混合纤维素脂，水系，批号 20121112，上海兴亚净化材料厂；水为纯水。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 储备液的制备 分取六味地黄丸大蜜丸1丸（1次给药量），精密称定，置溶出杯，加释放介质pH 6.8 PBS 900 mL，于（37.0±0.5）℃桨法 100 r/min 的条件下搅拌 12 h，使各组分充分释放。以释放介

质补足至 900 mL，取溶出液过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液 20 mL，置 100 mL 量瓶内，用溶出/释放介质稀释至刻度，即得系列标准物质组储备液。

2.1.2 检测方法 用紫外-可见分光光度仪对六味地黄丸各样本物质组溶液进行检测，各样本以溶出/释放介质为空白对照，在 220~400 nm 紫外波长范围内扫描，即得六味地黄丸物质组紫外测定谱。

2.1.3 物质组浓度标准谱测定 取各类型六味地黄丸物质组标准溶液适量，根据标准储备液在紫外和可见光波长范围内的吸收特征，选取 220~400 nm 的吸收光谱为六味地黄丸的物质组浓度标准谱，并记录每纳米波长处的吸光度（*A*）值，数据经 TCM Poly-Release 软件计算处理，即得物质组浓度标准谱。以波长为横坐标，各波长点的 *A* 值为纵坐标，得六味地黄丸物质组紫外浓度标准谱图，见图 1。

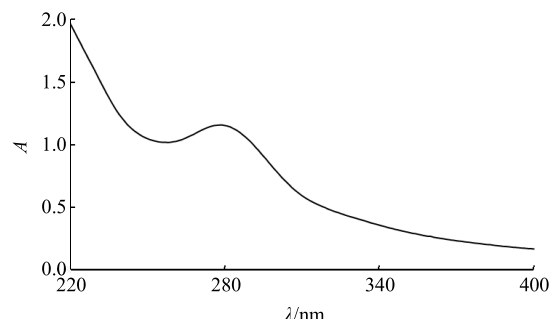


图1 pH 6.8 PBS 中不同类型六味地黄丸的物质组质量浓度标准谱

Fig. 1 Mass concentration standard spectra of different types of LDP in pH 6.8 PBS

2.1.4 线性关系考察 精密移取系列标准物质组储备液 1、2、3、5、7、10 mL 于 10 mL 量瓶内，分别加入溶出/释放介质至刻度，混匀，得 0.201、0.603、1.004、1.406、1.807、2.008 mg/mL 的供试液。依法测定，以 Kalman 滤波法计算获得各标准系列溶液的物质组质量浓度，以丸重标示的质量浓度（*G*）与物质组质量浓度（*X*）值进行最小二乘法线性回归，得系列回归方程为 $G=0.426\ 1\ X+0.019\ 7$ ， $r=0.999\ 2$ ；结果显示供试液质量浓度在 0.201~2.008 mg/mL 线性关系良好。

2.1.5 精密度考察 取 pH 6.8 PBS 中的低、中、高剂量的物质组标准液，质量浓度分别为 0.201、1.004、2.008 mg/mL，连续测定 6 次，依法测定其物质组质量浓度。结果表明，该低、中、高 3 种质量浓度的六味地黄丸供试液物质组质量浓度 RSD 值均小于 3%，表明物质组质量浓度测定方法精密度良好。

2.1.6 稳定性考察 取 pH 6.8 PBS 中的低、中、高剂量的物质组标准溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 取样, 依法测定其物质组质量浓度。结果表明其低、中、高 3 种质量浓度的六味地黄丸供试液在室温下放置 12 h 内物质组质量浓度变化较小, 各水平物质组质量浓度的 RSD 值分别为 1.12%、0.90%、0.38%。

2.2 不同类型六味地黄丸物质组释放度测定

2.2.1 多维释放特征模型的选择 参照《中国药典》2015 年版二部附录 XC 浆法, 以六味地黄丸水蜜丸为样品, 平行 6 份, 精密称定, 置溶出杯内, 分别加入 900 mL pH 6.8 PBS, 温度 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速 75 r/min, 分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 取样, 每次取样量为 5 mL, 并同时补充同温等量的溶出介质, 溶出液过 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取其续滤液, 稀释 5 倍, 即得待测样品, 依法测定各时间点样品液的物质组质量浓度, 并计算其物质组累积释放率 (R), 以时间 (t) 为横坐标, R 为纵坐标, 绘制释放曲线图 (图 2), 并用零级动力学模型、一级动力学模型、Higuchi 模型、Weibull 模型、Peppas 模型对其体外释放度结果进行拟合, 结果显示, 六味地黄丸水蜜丸累积释放率与 Weibull 模型相关性最佳, $r=0.985\ 0$, 见表 1。

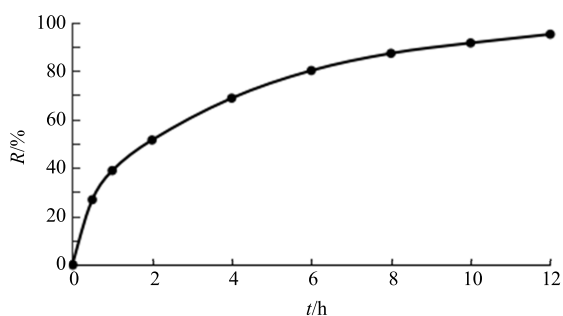


图 2 六味地黄丸水蜜丸在 pH 6.8 PBS 中物质组 R - t 曲线
Fig. 2 Material group R - t diagram of LDP water-bindered pills in pH 6.8 PBS

表 1 水蜜丸多维释放特征模型拟合结果

Table 1 Multidimensional release feature model fitting results of water-bindered pills

模型	回归方程	r
零级动力学模型	$Q=0.000\ 9\ t+0.465$	0.875 4
一级动力学模型	$\ln(1-Q)=-0.004\ 3\ t-0.459\ 2$	0.970 2
Higuchi 模型	$Q=0.03\ t^{1/2}+0.248\ 8$	0.944 2
Peppas 模型	$\ln Q=0.353\ 8\ \ln t-2.255\ 6$	0.973 1
Weibull 模型	$\ln\{\ln[1/(1-Q)]\}=0.688\ 5\ \ln t-3.297$	0.985 0

2.2.2 不同类型六味地黄丸物质组释放率测定 采用浆法装置, 分别取实验室自制的六味地黄丸大蜜丸 (1 丸)、小蜜丸 (45 丸)、水蜜丸 (30 丸)、浓缩丸 (8 丸)、水泛丸 (30 丸)、糊丸 (30 丸)、蜡丸 (30 丸), 各剂型平行 6 份, 方法同“2.2.1”, 以 t 为横坐标, R 为纵坐标, 绘制释放曲线图 (图 3)。由图 3 可知, 水泛丸与浓缩丸的释放速度最快, 释放量最高, 释放最完全; 小蜜丸、糊丸、水蜜丸次之, 后期释放比较完全, 具有一定的缓释特征; 大蜜丸释放速度和程度较慢, 在 6~8 h 前释放较蜡丸慢, 后期释放较快; 蜡丸的释放曲线最为平缓, 速度最慢, 释放量最小。

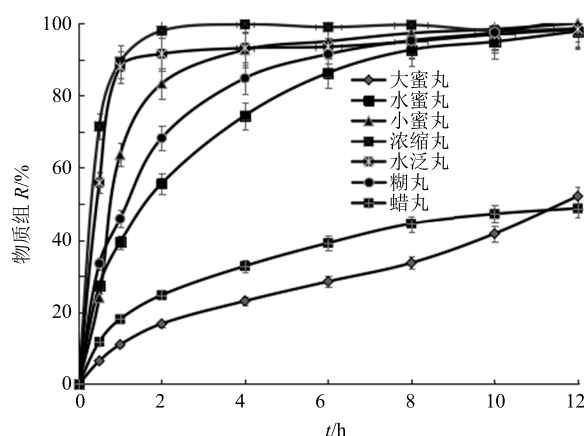


图 3 不同类型六味地黄丸物质组释放度曲线 ($n=6$)
Fig. 3 Release curve of substance in different types of LDP ($n=6$)

2.2.3 不同类型六味地黄丸物质组释放动力学特征分析 分别计算六味地黄丸水蜜丸、大蜜丸、小蜜丸、浓缩丸、水泛丸、糊丸、蜡丸在 pH 6.8 PBS 中的物质组释放曲线的 Weibull 分布参数 T_{50} 和 T_d , 并对其进行分析, 比较不同类型丸剂的释放动力学特征的差异性, 结果见表 2。经方差分析, 除浓缩丸与水泛丸外, 其余各类型丸剂 T_{50} 、 T_d 组间均有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.2.4 六味地黄丸不同丸剂物质组释放相似性评价 采用 f_2 相似因子法^[17-18]对各丸剂物质组释放曲线进行分析。相似因子法被 FDA 推荐为比较 2 条释放曲线的首选方法。本实验分别以六味地黄丸水蜜丸、浓缩丸为参比制剂, 以水蜜丸、小蜜丸、大蜜丸、糊丸、浓缩丸、水泛丸及蜡丸为受试制剂, 采用相似因子法计算 f_2 值, 评价剂型间的释放率差异, 结果见表 3。可知, 以水蜜丸为参比, 糊丸的 f_2 值为 54.697 2, 大于 50, 表明六味地黄丸糊丸多组分释放

表2 不同类型六味地黄丸物质组释放曲线的 Weibull 分布参数

Table 2 Weibull distribution parameter of release curve of substance in different types of LDP

丸剂类型	T_{50}/min	T_d/min
水蜜丸	96.00±5.93	177.67±13.06
大蜜丸	844.43±112.50	1 426.52±180.59
小蜜丸	56.33±7.87	88.00±18.58
浓缩丸	5.17±8.77	10.50±4.10
水泛丸	8.08±4.94	20.26±10.35
糊丸	68.17±16.23	104.00±19.63
蜡丸	701.67±80.99	1 421.33±231.78

表3 不同类型六味地黄丸物质组释放拟合相似因子 f_2 结果Table 3 Results of mass release fit similarity factor f_2 of different types of LDP

受试制剂	f_2	
	浓缩丸为参比	水蜜丸为参比
大蜜丸	5.137 5	13.628 8
小蜜丸	31.818 7	38.018 8
浓缩丸	无	23.218 1
水泛丸	54.817 0	27.276 9
糊丸	28.092 9	54.697 2
蜡丸	7.492 7	16.948 1
水蜜丸	23.218 1	无

特征与六味地黄水蜜丸最为相似,以浓缩丸为参比,水泛丸的 f_2 值为 54.817 0, 大于 50, 表明六味地黄丸水泛丸多组分释放特征与六味地黄丸浓缩丸最为相似。

$$f_2 = 50 \lg \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n W_i (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

R_i 与 T_i 分别代表参比制剂与受试制剂在时间点 t 的累积释放百分率, n 为测试时间点个数, W_i 为权重因子

2.3 六味地黄丸的可视化评价

2.3.1 物质组释放度二维图谱 各样本的各个取样时间点在每 1 nm 波长下的 A 值与标准谱同一波长下的 A 值进行比较, 计算 R , 得到物质组在此波长处的释放度, 以波长为横坐标, 取样时间为纵坐标, 绘制物质组释放二维图谱 (图 4)。图 4 右侧显示比色条, 其颜色代表 R 。由图 4 可直观得知, 各类型丸剂物质组释放特征存在差异, 以水泛丸、浓缩丸 R 最大, 其次是小蜜丸、糊丸, 再次是水蜜丸, 最低为大蜜丸、蜡丸。且在不同波长处, R 也有差异。

2.3.2 物质组释放增量三维图谱 将每 2 个相邻取样点的物质组紫外吸收谱相减, 得到各时间段的物质组谱增加值, 并除以同波长标准谱 A 值, 其比值即为物质组释放增量, 并绘制其物质组释放增量三维图谱。计算公式如下: $R_c = (A_{t1} - A_{t2})/A_0$, 其中, R_c 为物质组释放增量, A_{t1} 、 A_{t2} 为相邻时间点的物质组紫外吸光度值, A_0 为同波长处标准谱 A 值。结果见图 5。由图谱可知, 在该释放介质中, 水蜜丸、糊丸在前 6 h 内物质组释放增量较多, 6~12 h 内物质组释放增量较少; 小蜜丸在前 4 h 内物质组释放增量较多, 4~12 h 内物质组释放增量较少; 浓缩丸、水泛丸在前 2 h 内物质组释放增量较多, 2~12 h 内物质组释放增量较少; 大蜜丸各时间段物质组释放增量随着时间的增加而增加; 蜡丸各时间段的物质组释放增量较小, 随着时间的增加变化不大。

3 讨论

本实验采用中药物质组释放动力学的评价方法, 通过紫外扫描图谱, 以六味地黄丸的各组物质组成特征、量之间的相互关系为整体性的量化指标, 以指定剂量下大蜜丸中所含有的物质组各组分间的量特征关系为标准谱, 以各样本的物质组谱特征为依据, 采用 Kalman 滤波法计算, 获得释放介质中的物质组的量^[14], 对六味地黄丸的释放特征进行量化评价, 获得其物质组释放度特征, 实现对其多组分释放特征的定量描述。

该测定方法简便、准确, 能在一定程度上反映中药制剂的多组分释放特征^[19-20], 结果显示不同类型六味地黄丸 (除浓缩丸与水泛丸) 释放速度有显著性差异, 与传统中医理论“水丸取其易化, 蜜丸取其缓化, 糊丸取其迟化, 蜡丸取其难化”基本相符^[21], 以浓缩丸与水泛丸释药最快, 释放最完全, 前 0.5 h 释放约可达 50%~70%; 小蜜丸、糊丸、水蜜丸次之, 大蜜丸、蜡丸的释放曲线都较为平缓, 速度较慢, 释放量较小, 12 h R 只有 50% 左右。而且通过对各类型六味地黄丸丸剂物质组释放动力学数据进行二维、三维的可视化处理, 相对于传统释放度试验, 可以非常明显的更进一步的直观、准确地表征丸剂多组分释放特征的相似性与差异性, 这为中药 (复方) 丸剂的整体释药特征分析提供了一个新思路。

不同类型的六味地黄丸, 除浓缩丸与水泛丸外, 组间释放动力学参数具有显著性差异。故有必要以更直观、定量、准确的物质组释放技术对不同类型

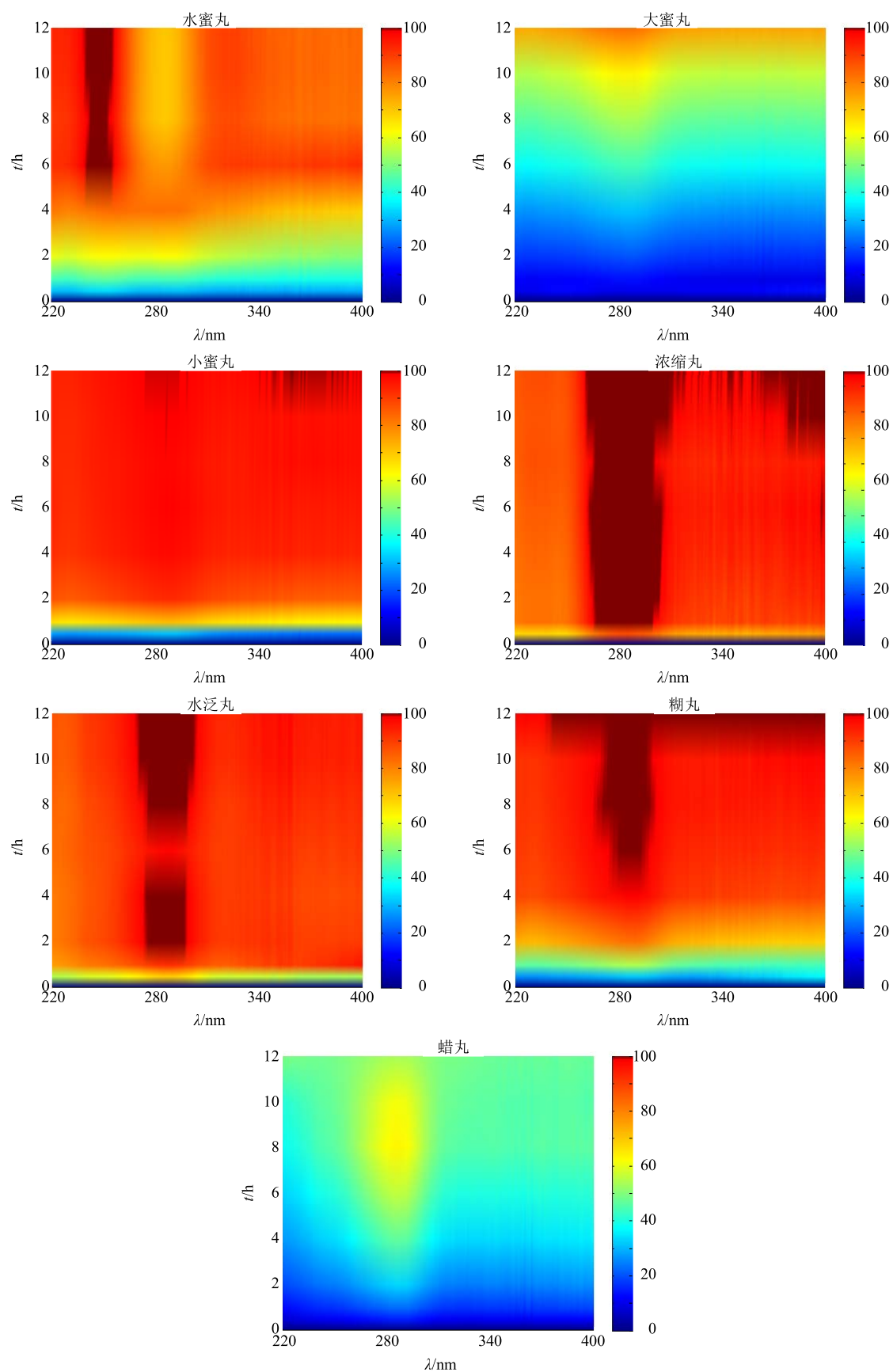


图 4 各类型丸剂在 pH 6.8 PBS 中的物质组释放二维图谱

Fig. 4 Two dimensional atlas of substance release of various types of pills in pH 6.8 PBS

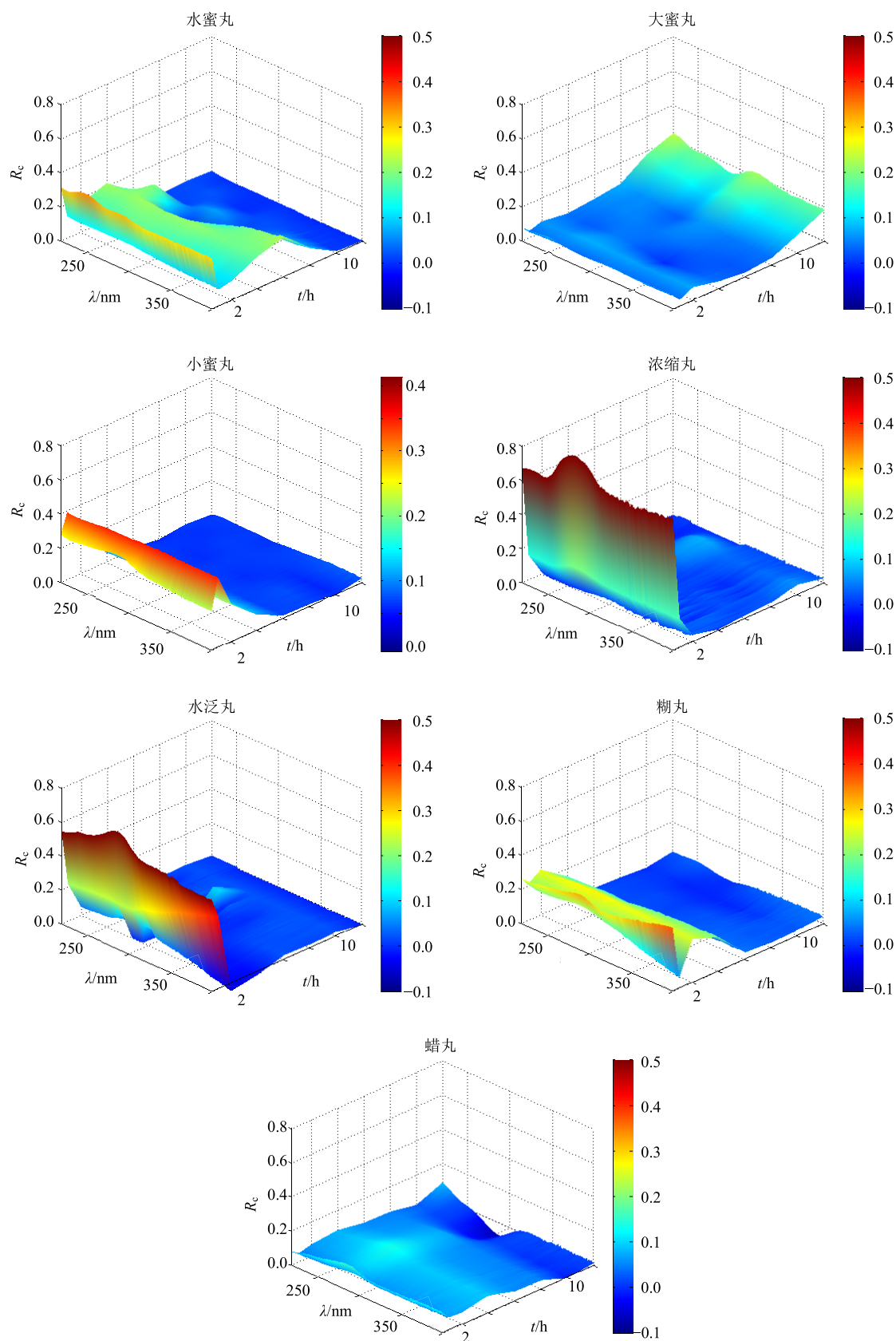


图 5 各类型丸剂在 pH 6.8 PBS 中的物质组释放增量三维图谱

Fig. 5 Three dimensional atlas of release increment of substance group of various types of pills in pH 6.8 PBS

的六味地黄丸内在质量进行更深入的研究和严格的控制,以便制定更全面的质量控制标准,本实验对提高丸剂的内在质量,保证疗效的一致性具有一定意义。

参考文献

- [1] 徐柳,张树峰.六味地黄丸的药理作用及临床应用研究[J].河北医药,2013,19(4):616-619.
- [2] 刘霞,李亚.六味地黄丸联合利拉鲁肽和二甲双胍治疗2型糖尿病的临床研究[J].现代药物与临床,2016,31(8):1146-1150.
- [3] 谢奇.六味地黄丸在2型糖尿病治疗中的作用与研究[J].中医临床研究,2013,5(1):116-118.
- [4] 柴彦军.六味地黄丸联合消渴丸治疗气阴两虚2型糖尿病的临床研究[J].药物评价研究,2016,39(3):445-448.
- [5] 王久香.六味地黄丸联合氯沙坦钾治疗早期糖尿病肾病的临床研究[J].现代药物与临床,2015,30(6):674-677.
- [6] 杜标炎,郭玉荣,易华,等.六味地黄丸含药血清对自杀基因治疗黑色素瘤增效作用的缝隙连接机制初探[J].中国中西医结合杂志,2013,33(5):651-658.
- [7] 曹占花.阿卡波糖联合六味地黄丸治疗早期糖尿病肾病的临床疗效观察[J].现代药物与临床,2013,28(5):760-762.
- [8] 翁夏蒙,石森林,吴素香,等.不同厂家六味地黄丸溶散与释药特性的比较[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(2):44-48.
- [9] 陈立兵,张继稳,顾景凯,等.中药制剂及给药系统的物质组释放/溶出动力学原理[J].中草药,2008,39(5):641-644.
- [10] 江叔奇,葛卫红,吴君金,等.冠心苏和丸的物质组释放动力学研究[J].中成药,2011,33(5):809-813.
- [11] 凌昉,张继稳,陈立兵,等.应用中药物质组释放动力学理论研究银翘解毒丸的缓释动力学及其同步性[J].药学学报,2008,43(11):1140-1146.
- [12] 楼云雁,石婷婷,陈立兵,等.运用UV-Vis考察五子衍宗丸物质组释放特征[J].中华中医药学刊,2011,29(7):1489-1491.
- [13] 吴佳佳,李智慧,石森林,等.桂枝茯苓丸的物质组释放动力学特征及可视化评价[J].浙江中医杂志,2014,49(4):299-302.
- [14] 郭桢,凌昉,张继稳,等.龙胆泻肝丸物质组释放动力学特征研究[J].中草药,2010,41(11):1806-1808.
- [15] 徐本亮,王冰,浦益琼,等.丹皮酚平衡溶解度与油水分配系数测定及大鼠在体肠吸收研究[J].中成药,2012,34(10):1892-1896.
- [16] 李文兰,扈正婷,季宇彬,等.马钱苷肠吸收机制的研究[J].中国中药杂志,2008,33(9):1052-1055.
- [17] 连赞芳,陈丹,蔡韦炜,等.基于特征图谱表征的玳玳黄酮滴丸组分群同步释药特性评价[J].中草药,2015,46(3):353-358.
- [18] 祝丽欣,陈芝,郭莹,等. f_2 相似因子法评价银杏酮酯缓释微丸大类成分总黄酮和各类成分的体外释放相关性研究[J].中草药,2015,46(23):3482-3488.
- [19] 张继稳,陈立兵,葛卫红,等.中药物质组相关概念释义[J].世界科学技术—中医药现代化,2008,10(2):1-4.
- [20] 张继稳,陈立兵,顾景凯,等.多组分中药化合物组释放同步性评价方法[J].药学学报,2008,43(6):647-651.
- [21] 王娟,狄留庆,单进军.中药传统丸剂的释药特点与机制分析[J].中成药,2012,34(4):723-726.