

栀子总苷缓释片多组分体外释放度研究

闫光军^{1,2}, 李守信^{1,2,3*}, 刘武占^{1,2,3}, 苏瑞强^{1,2}, 张则平^{1,2}, 赵志全^{1,2}

1. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276006

2. 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006

3. 山东省中药制药新技术重点实验室, 山东 临沂 276006

摘要: 目的 探讨栀子总苷缓释片多组分体外释放度评价方法。方法 采用转篮法测定释放度, HPLC 法测定羟异栀子苷、京尼平龙胆二糖苷、栀子苷的释放速率, UV 法测定栀子总苷释放速率, 采用相似因子法和释放机制评价多组分释放的同步性。结果 羟异栀子苷、京尼平龙胆二糖苷、栀子总苷与栀子苷释放速率相近, 与栀子苷释放度的相似因子分别为 81%、72%、91%, 释放机制均符合 Higuchi 方程, 说明栀子总苷缓释片多组分是均衡释放的。结论 本法可用于栀子总苷缓释片多组分体外释放度评价。

关键词: 栀子总苷缓释片; 羟异栀子苷; 京尼平龙胆二糖苷; 栀子苷; 释放度

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)05-0485-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.05.008

Release of multi-components in Gardenia Total Glycosides Sustained-release Tablets *in vitro*

Yan Guang-jun^{1,2}, LI Shou-xin^{1,2,3}, Liu Wu-zhan^{1,2,3}, SU Rui-qiang^{1,2}, ZHANG Ze-ping^{1,2}, ZHAO Zhi-quan^{1,2}

1. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Linyi 276006, China

3. Shandong Provincial Key Laboratory of New Manufacture Technology of TCM, Linyi 276006, China

Abstract: Objective To explore the evaluation method for *in vitro* release of multi component in Gardenia Total Glycosides Sustained-release Tablets. **Methods** Rotating basket method was carried out to determine the release rate. HPLC method was employed to assess the release rate of gardenoside, genipingeniobioside, and geniposide, and UV method was used to determine the total glycosides. **Results** The release rates of gardenoside, genipingeniobioside, geniposide, and total glycosides were similar. Similarity factors were 81%, 72%, and 91%. The data of cumulative release rate fitted best with Higuchi model. The release of Gardenia Total Glycosides Sustained-release Tablets had a well-balanced release behavior. **Conclusion** Quality of multi-components in Gardenia Total Glycosides Sustained-release Tablets can be controlled effectively by the method.

Key words: Gardenia Total Glycosides Sustained-release Tablets; gardenoside; genipingeniobioside; geniposide; release

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效^[1]。栀子中主要有效成分为环烯醚萜苷类化合物^[2], 具有利胆、解热、抗炎、抗病毒、保护心脑血管等药理活性^[3], 但在体内消除快, 滞留时间短, 肠道内具广泛的吸收窗^[4-5], 因此制备成缓释制剂可减少服用次数, 提高患者顺应性, 减少

血药浓度的波动性, 避免峰谷现象, 降低药物的不良反应。本实验制备了持续释放 12 h 的栀子总苷缓释片, 对其多组分释放度的评价方法进行了探讨。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司), ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津大学无线电厂), CARY300 紫外分光光度计(瓦里安公司),

收稿日期: 2013-12-06

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2012CB724001)

作者简介: 闫光军(1970—), 男, 高级工程师, 主要从事中药新药开发。E-mail: menglianguren@163.com

*通信作者 李守信 Tel: (0539) 8336639 Fax: (0539) 8336078 E-mail: yihelaosou@sohu.com

AG285 分析天平 (梅特勒托利多公司)。

栀子苷 (批号 110749-200309, 中国食品药品检定研究院); 羟异栀子苷 (自制, 质量分数大于 98%); 京尼平龙胆二糖苷 (自制, 质量分数大于 98%); 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂均为分析纯。栀子总苷 (UV 法以栀子苷计质量分数为 91.2%, 自制); HPMC (K15M, 批号 ZB06012N01, 美国陶氏公司); MCC (PH102, 批号 212824109, 美国 FMC 公司); 硬脂酸镁 (批号 131011, 上海药用辅料厂)。

2 方法与结果

2.1 栀子总苷缓释片的制备

取栀子总苷 192 g、HPMC 144 g、MCC 144 g, 过 100 目筛, 混匀, 用 95%乙醇适量润湿, 制成软材, 过 20 目筛制粒, 50 °C 干燥, 过 18 目筛整粒, 加适量硬脂酸镁混匀, 用 12 mm 浅凹冲模压制成片, 即得栀子总苷缓释片。每片质量 480 mg, 含栀子总苷 192 mg, 制备 3 批, 批号分别为 1311-1、1311-2 和 1311-3。

2.2 羟异栀子苷、京尼平龙胆二糖苷、栀子苷的测定

2.2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 (A) - 0.05% 三氟乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 0~15 min, 95%~94%B; 15~23 min, 94%~90%B; 23~35 min, 90%~80%B; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 40 °C; 检测波长: 327 nm; 进样量: 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取羟异栀子苷、京尼平龙胆二糖苷、栀子苷对照品适量, 用水溶解, 定容, 制得含羟异栀子苷 0.121 0 mg/mL、京尼平龙胆二糖苷 0.215 6 mg/mL、栀子苷 1.113 0 mg/mL 混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取栀子总苷缓释片 10 片, 研细, 精密称取 53.3 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加水超声 10 min 使溶解, 加水至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得 (相当于 1 片栀子总苷缓释片溶解于 900 mL 溶出介质中)。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按处方比例精密称取空白辅料 21.3 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加水超声 10 min 使溶解, 加水至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.5 线性关系考察 取混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加水定容, 得到系列对照品溶液。按色谱条件进样测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行回归, 得线性方程。羟异栀子苷: $Y=1\ 608 X-1.966$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.121 0~1.452 0 μg; 京尼平龙胆二糖苷: $Y=1\ 002 X-6.455$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.215 6~2.587 2 μg; 栀子苷: $Y=1\ 359 X-2.130$, $r=1.000\ 0$, 线性范围 1.113 0~13.356 0 μg。

2.2.6 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL 注入色谱仪, 结果样品和对照品分离度均较好, 辅料没有干扰, 见图 1。

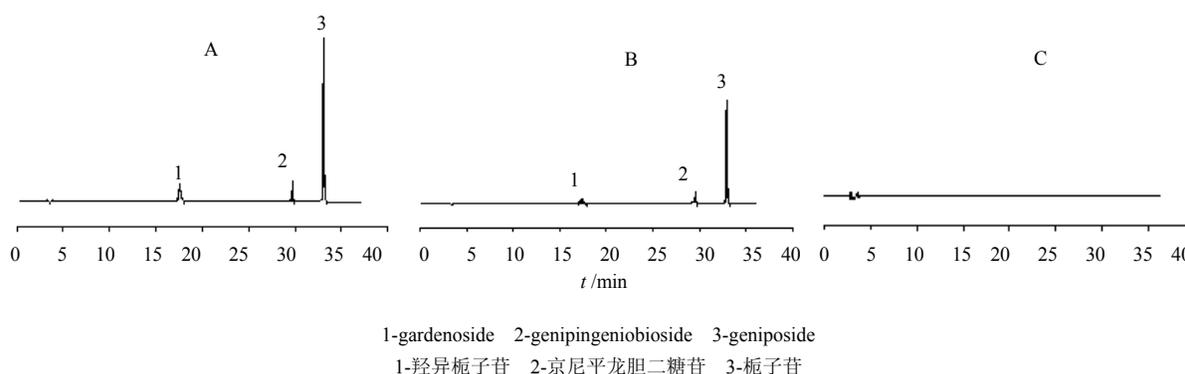


图 1 混合对照品 (A)、栀子总苷缓释片 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Gardenia Total Glycosides Sustained-release Tablets (B), and negative sample (C)

2.2.7 精密度试验 取混合对照品溶液 0.1、0.6、1.2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加水至刻度。按上述色谱条件, 重复进样 6 次, 其相对保留时间稳定, 记

录峰面积, 计算得羟异栀子苷、京尼平龙胆二糖苷、栀子苷峰面积的 RSD 值分别为 1.00%、0.67%、0.77%; 0.98%、0.79%、0.63%; 1.12%、0.59%、0.75%。

2.2.8 稳定性试验 取批号 1311-1 样品制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定, 羟异梔子苷、京尼平龙胆二糖苷和梔子苷峰面积的 RSD 值分别为 2.13%、2.03%、1.09%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 取批号 1311-1 样品 10 片研细, 平行制备供试品溶液 6 份, 分别测定, 记录峰面积, 计算得羟异梔子苷、京尼平龙胆二糖苷和梔子苷质量分数的 RSD 值分别为 1.03%、1.38%、0.95%。

2.2.10 回收率试验 精密称取干燥至恒定质量的梔子总苷原料 5.7、11.5、19.2 mg, 按处方比例加入相应空白辅料, 使梔子总苷含量相当于梔子总苷缓释片总量的 30%、60%、100%, 分别制备 3 份, 置于 100 mL 量瓶中, 制备供试品溶液, 分别测定, 计算得羟异梔子苷、京尼平龙胆二糖苷、梔子苷的平均回收率分别为 99.53%、99.97%、100.53%, RSD 值分别为 0.56%、0.47%、0.22%。

2.2.11 样品测定 取供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 按色谱条件测定, 计算各供试品溶液中羟异梔子苷、京尼平龙胆二糖苷和梔子苷的质量浓度。

2.3 梔子总苷的 UV 法测定

2.3.1 测定波长的选择 分别取梔子苷对照品溶液、供试品溶液溶液和阴性对照溶液, 以试剂作为空白, 在 200~400 nm 波长扫描, 结果对照品在 237.4 nm 处有最大吸收, 供试品溶液在 236.6 nm 处有最大吸收, 两者均在波长 237 nm 左右处有最大吸收, 与梔子苷的最大吸收波长接近, 阴性对照溶液在 237 nm 处几乎无吸收, 故选择 237 nm 作为检测波长。

2.3.2 线性关系的考察 精密称取梔子苷对照品, 加水配成 32.14 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 作为对照品溶液。精密量取梔子苷对照品溶液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 定容, 同时以水做空白。照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 版一部附录 VA) 在 237 nm 波长处测定吸光度值。以吸光度值为纵坐标, 梔子苷质量浓度为横坐标, 计算得回归方程 $C=38.96 A-0.020 4$, $r=0.999 9$ 。结果表明梔子苷在 6.428~32.140 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 配制质量浓度分别为 6.428、16.07、32.14 $\mu\text{g/mL}$ 梔子苷对照品溶液, 每个质量浓度均配制 3 份溶液, 平行测定吸光度, 计算得 RSD 值分别为 1.26%、1.12%、0.69%。

2.3.4 稳定性试验 取批号 1311-1 样品制备供试品溶液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 测定吸光度值, 结果其 RSD 值为 2.02%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3.5 重复性试验 取批号 1311-1 样品 10 片研细, 依照“线性关系的考察”项下方法制备供试品溶液 6 份, 分别测定, 记录吸光度值, 计算得其 RSD 值为 1.83%。

2.3.6 回收率试验 精密称取干燥至恒定质量的梔子总苷原料 5.7、11.5、19.2 mg, 按处方比例加入相应空白辅料, 使梔子总苷含量相当于梔子总苷缓释片总量的 30%、60%、100%, 分别制备 3 份, 依照“线性关系的考察”项下方法制备供试品溶液, 分别测定, 计算得梔子总苷回收率为 102.4%, RSD 值为 0.12%。

2.3.7 测定方法 取供试品溶液适当稀释, 以水为空白, 在 237 nm 波长处测定吸光度值, 以梔子苷计计算梔子总苷的质量分数。

2.4 累积释放度的测定

取 3 批梔子总苷缓释片样品, 依照《中国药典》2010 年版二部释放度测定法(附录 XD 第一法) 转蓝法, 转速 100 r/min, 溶出介质为脱气的水 900 mL, 溶出温度 $(37.0 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 。取梔子总苷缓释片 6 片, 分别投入 6 个转篮内, 从药片浸入溶出介质开始计时, 在 1、2、3、5、7、9、12 h 分别取溶液 5 mL, 同时补充相同温度体积的水, 所取溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 测定羟异梔子苷、京尼平龙胆二糖苷、梔子苷、梔子总苷的质量浓度(3 批样品平均值), 根据标准曲线的回归方程及累积释放度计算公式, 计算各时间点的累积释放率, 绘制累积释放曲线, 见图 2。

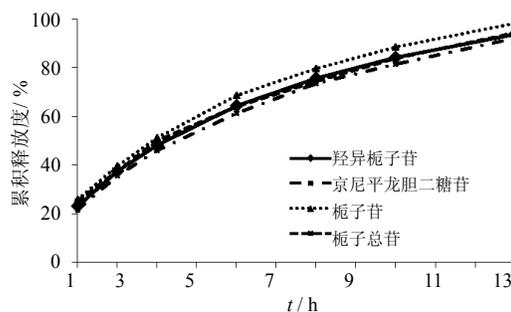


图 2 梔子总苷缓释片释放曲线

Fig. 2 Cumulative release curves of Gardenia Total Glycosides Sustained-release Tablets

结果表明, 梔子苷、京尼平龙胆二糖苷、羟异梔子苷和梔子总苷可持续释放 12 h, 12 h 累积释放率达到 90% 以上, 达到了缓释制剂要求, 4 条释放曲线比较接近, 表明各组释放同步较好。

$$\text{累积释放率} = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / (W \times D)$$

C_n 为第 n 个时间点溶出介质中药物的质量浓度, C_i 为第 $n-1$ 个时间点溶出介质中药物的质量浓度, V_i 为取样体积, V 为溶出介质的总体积, W 为缓释片的质量, D 为缓释片中药物的质量分数

2.5 各测定成分释放度相似性比较

采用相似因子法, 以梔子苷的累积释放率为参

比, 计算羟异梔子苷、京尼平龙胆二糖苷和梔子总苷累积释放率与其相比的相似因子 (f_2), f_2 分别为 81%、72%、91%, 说明释放的同步性较好, 实现均衡释放。

2.6 释放机制考察

分别将梔子苷、京尼平龙胆二糖苷、羟异梔子苷、梔子总苷的累积释放度 (M_t/M_∞) 或待释放度 ($1-M_t/M_\infty$) 与时间 (t) 分别按零级方程、一级方程和 Higuchi 方程进行拟合, 结果见表 1。结果表明梔子苷、京尼平龙胆二糖苷、羟异梔子苷、梔子总苷均以按 Higuchi 方程拟合的相关系数最大, $R^2 > 0.99$, 说明释放机制相同。

表 1 梔子总苷缓释片累积释放度拟合方程

Table 1 Cumulative release rate-time model fitting of Gardenia Total Glycosides Sustained-release Tablets

指标	零级释放方程	一级释放方程	Higuchi 方程
梔子苷	$M_t/M_\infty = 6.267 t + 26.06$ ($R^2 = 0.940$)	$(1 - M_t/M_\infty) = 4.622 - 0.220 t$ ($R^2 = 0.988$)	$M_t/M_\infty = 28.99 X - 3.198$ ($R^2 = 0.991$)
京尼平龙胆二糖苷	$M_t/M_\infty = 6.245 t + 24.09$ ($R^2 = 0.948$)	$(1 - M_t/M_\infty) = 4.611 - 0.202 t$ ($R^2 = 0.987$)	$M_t/M_\infty = 28.82 X - 4.904$ ($R^2 = 0.994$)
羟异梔子苷	$M_t/M_\infty = 6.449 t + 28.52$ ($R^2 = 0.939$)	$(1 - M_t/M_\infty) = 4.838 - 0.308 t$ ($R^2 = 0.938$)	$M_t/M_\infty = 29.85 X - 1.613$ ($R^2 = 0.991$)
梔子总苷	$M_t/M_\infty = 6.120 t + 27.22$ ($R^2 = 0.949$)	$(1 - M_t/M_\infty) = 4.619 - 0.220 t$ ($R^2 = 0.977$)	$M_t/M_\infty = 28.23 X - 1.159$ ($R^2 = 0.994$)

3 讨论

中药缓控释制剂的研究已取得了较大的进展^[6-7], 但中药不同于化学药物, 中药是通过多组分、多系统、多靶点发挥治疗作用的, 各组分之间通过对吸收、代谢和作用的相互影响, 产生综合治疗作用。中药各组分由于理化性质不同, 释放速度会有所不同, 在缓控释制剂能否同步释放应作为释放度评价的重点。本研究对梔子总苷缓释片中梔子苷、京尼平龙胆二糖苷、羟异梔子苷 3 个指标成分和梔子总苷的释放特度进行了测定, 可持续释放 12 h, 各组分释放率相似因子大于 70%, 基本达到了同步释放, 符合缓释制剂的要求。

本实验考察了盐酸溶液 (pH 1.2)、磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 和水 3 种溶剂, 结果梔子苷、京尼平龙胆二糖苷和羟异梔子苷 3 个指标成分的溶出差异不明显, 均符合漏槽条件, 这与梔子总苷水溶性较

好有关, 确定用水作为溶出介质。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 杨全军, 范明松, 孙兆林, 等. 梔子化学成分、药理作用及体内过程研究进展 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(9): 7-12.
- [3] 陈雁, 张现涛, 张雷红, 等. 梔子化学成分及药理研究进展 [J]. 海峡药学, 2010, 22(12): 1-5.
- [4] 杜先华, 牛欣, 冯前进, 等. 梔子苷大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(5): 558-560.
- [5] 王又红, 郭琳琳, 刘卫红, 等. 梔子苷在大鼠体内的药代动力学研究 [J]. 中医研究, 2011, 24(6): 29-31.
- [6] 魏元锋, 林晓, 张宁, 等. 中药口服缓控释给药系统质量评价体系的构建 [J]. 药学报, 2010, 45(4): 430-435.
- [7] 张立兵, 葛卫红, 张继稳. 我国中药缓控释制剂的研究状态分析 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2007, 9(5): 83-90.