

## ·制剂与质量·

基于抑制中性粒细胞呼吸爆发效应的复方丹参缓释片  
体外释放行为评价研究

岳鹏飞,唐剑彬,郑 琴,徐国良,杨 明,刘荣华

(江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室,江西 南昌 330004)

**摘要:**目的 从效应动力学角度研究复方丹参缓释片体外释放行为过程,探讨并阐释复方丹参缓释片体外释放行为特征。方法 基于中性粒细胞呼吸爆发效应的生物化学发光检测技术,在规定的时间点对复方丹参缓释片体外释放样品进行测定,以表征体外释放行为的变化。结果 复方丹参缓释片体外可缓释12 h,基本达到缓释制剂设计的要求。结论 借鉴效应动力学的评价方法,成功构建了一种基于中性粒细胞呼吸爆发效应的生物化学发光检测技术,为中药复方缓控释制剂的体外释放评价提供新的借鉴和参考。

**关键词:**复方丹参缓释片;中性粒细胞呼吸爆发效应;生物化学发光;体外释放动力学

**中图分类号:**R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)06-0885-04

In vitro release evaluation of compound Danshen sustained-release tablet  
based on inhibition of neutrophil respiratory burst

YUE Peng-fei, TANG Jian-bin, ZHENG Qin, XU Guo-liang, YANG Ming, LIU Rong-hua

(Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**Abstract : Objective** Based on the biological effect-kinetic methods, to study the compound Danshen sustained release tablets *in vitro* release kinetics of the process, and to explain the *in vitro* release characteristics of compound Danshen tablets. **Methods** Biochemical effects with chemiluminescence detection technology based on the neutrophil respiratory burst, the *in vitro* release samples of compound Danshen preparations were analyzed in the determined timepoints, which could show the differences of compound Danshen tablets *in vitro* release. **Results** Compound Danshen sustained tablets could release in 12 h, which achieved the quality design requirements of sustained release preparation. **Conclusion** In this study, the biological effect-kinetic method is successfully used. The method of the biochemical effects of chemiluminescence detection technology based on neutrophil respiratory burst is first constructed and used to study compound Danshen tablets *in vitro* release kinetics, which could be referred as the *in vitro* release evaluation of compound Chinese medicine sustained release preparation.

**Key words :** Compound Danshen preparation; neutrophil respiratory burst effect; biochemical luminescence; *in vitro* release kinetics

制剂体外释放测定是预测不同剂型设计的快速筛选与评价方法。由于中药及其复方制剂含有众多组分,而现行多数中药制剂释放度评价的研究模式基本上是模仿化药缓控释制剂的控制模式<sup>[1]</sup>,即通过对某一指标性成分进行定性或/和定量分析来实

现中药缓释制剂体外释放评价,不能反映中药复方作用的整体性特色,更难以全面反映复方制剂体内药理效应的整体变化,对中药制剂体内外的相关性、安全性和有效性可能“难控难评,难以预测”。复杂多组分是中药复方缓控释制剂的基本特征,如何从

①收稿日期:2009-09-11

基金项目:“十一五”科技支撑计划项目(2006BA109B08-01);国家“十一五”重大新药创制专项(2009ZX09310-005);江西省卫生厅中医药科研项目(2009A059,2009A061)

作者简介:岳鹏飞(1982—),男,山东淄博人,硕士,讲师,主要从事药物新剂型与新技术研究。

Tel: (0791) 7119010 E-mail: ypfpharm@126.com

\*通讯作者 杨 明 E-mail: yangming16@126.com

整体角度对中药复方缓控释制剂进行体外释放评价,已成为制约中药剂型发展的难点问题<sup>[2]</sup>。以生物药理效应为基础的药理信息学的发展,为阐明决定中药疗效的多组分因素,以整体性理论研究中药缓控释制剂提供了新的契机。本研究以临床疗效显著、药效物质基础及作用机制研究相对清楚的复方丹参方为模型方,以自制复方丹参缓释片为研究对象,针对中药复方缓释剂型研究发展的难点问题——如何对中药复方缓释剂型体外释放行为进行评价,以中性粒细胞呼吸爆发效应的生物化学发光值及抑制率为评价指标,通过观察不同时间点自制复方丹参缓释片体外溶出物抑制中性粒细胞呼吸爆发效应的生物效应变化,表征复方丹参缓释片体外释放行为特征,旨在建立适用于复方丹参缓释制剂体外释放行为的快速、灵敏的评价技术方法,该法具备灵敏、快速、高效的特点,期望为中药复方缓控释制剂的体外释放行为评价提供新的借鉴和参考。

## 1 仪器、试剂与材料

BPCL 型超微弱化学发光分析仪(中国科学院生物物理研究所);ZRC-8D 型智能溶出测定仪(天津大学精密仪器厂)。

复方丹参缓释片(以丹酚酸 B 计,含丹参水溶性部位 31.5 mg/片;以三七皂苷  $R_g$  计,含三七总皂苷 93.5 mg/片;本实验室自制)。淋巴细胞分离液(上海浩然生物技术有限公司);葡聚糖 T500(上海源叶生物科技发展有限公司);HEPES 试剂(北京东胜创新生物技术有限公司);Tris 试剂(北京东胜创新生物技术有限公司);3-氨基邻苯二甲酰肼(上海 Sigma 公司);趋化三肽(上海 Sigma 公司),其他试剂均为市售分析纯。SD 大鼠(250~300 g),雌雄均可。

## 2 方法与结果

2.1 大鼠中性粒细胞的分离与制备<sup>[3]</sup>:取 SD 大鼠,乙醚麻醉,眼眶取血,1%肝素钠抗凝,葡聚糖 T500 沉降红细胞,淋巴细胞分离液分离,低渗除去残留红细胞,得纯度和活度均为 95% 以上大鼠 PMN,用细胞稀释液(2%小牛血清的 HBSS 液)调整 PMN 细胞为  $2 \times 10^5$  个/mL,4 °C 保存,在 12 h 内使用,PMN 活力恒定,对实验结果无影响。

2.2 抗大鼠中性粒细胞(PMN)呼吸爆发的生物化学发光值的测定<sup>[4]</sup>:PMN 在受到外源性刺激剂 PMA 激活后发生呼吸爆发,产生大量的活性氧自由基,自由基被发光剂 luminol 捕获产生化学发光(chemiluminescence, CL),PMN-CL 强度与 PMN 的

细胞数量及 PMN 的呼吸爆发和吞噬功能正相关。

取 PMN 悬液 1 mL 放入微弱发光测量仪发光杯中,加入 luminol 50  $\mu$ L,置于 37 °C 发光池中孵育 10~12 min,同时监测其自发光过程,按 5 s 记数 1 次,然后加入各溶出时间点溶出液 10  $\mu$ L (以 10  $\mu$ L 空白辅料溶出液为对照)继续测定 5 min,再加入 20  $\mu$ L PMN 刺激剂,继续测定 15~20 min,连续记录测定结果。PMN-CL 强度以峰高表示。分别采集 2 组数据:PMN 自发光稳定期的 CL 值,以此为底;PMN 刺激后的 PMN-CL 最高峰值。PMN 呼吸爆发的发光值 PMN-CL 以 PMA 刺激后的 PMN-CL 最高峰值减去本底来表示即 PMN-CL 呼吸爆发 = PMN-CL PMN 刺激后 - PMN-CL 自发光稳定期。

## 2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验:分别考察对照组(蒸馏水)、DMSO、空白辅料的溶出液对中性粒细胞呼吸爆发效应的影响。结果表明蒸馏水、DMSO、空白缓释片辅料的溶出介质均对生物化学发光法检测方法无干扰。

2.3.2 量效关系曲线:按复方丹参方 1 d 处方量称取复方药材提取物用 DMSO 配成 20 mL 溶液备用,再稀释适当比例(50、100、200、400、800、1 600、3 200 倍)分别作为不同质量浓度稀释液测定。复方丹参标准液抑制中性粒细胞呼吸爆发效应的量效曲线见图 1,结果显示复方丹参成分有抑制中性粒细胞呼吸爆发的药理效应,与文献报道一致<sup>[2,3]</sup>。生物化学发光值与稀释倍数剂量单位之间存在良好的指数线性关系(图 2),化学发光值转换为对数值后,在制剂处方稀释 50~3 200 倍的剂量,稀释倍数剂量单位与化学发光对数值之间存在良好的线性关系,见图 3,回归方程为  $Y = 0.6349 X + 9.8743$ ,  $R^2 = 0.995$ 。

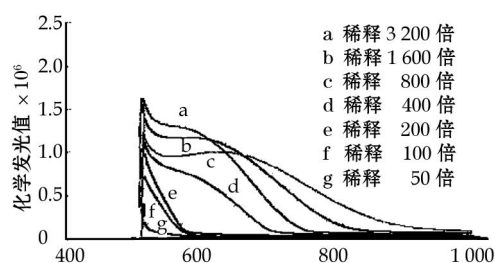


图1 复方丹参方不同稀释倍数标准液的化学发光值

Fig 1 Chemiluminescence values of different dilution standard solution of compound Danshen prescription

## 2.4 体外释放行为过程

2.4.1 复方丹参缓释片等效完全释放标准液:取复方丹参储备液稀释配成等效于复方丹参缓释 900

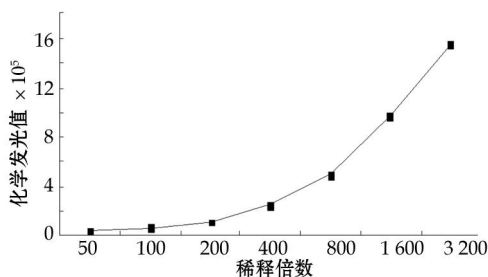


图 2 复方丹参方不同稀释倍数标准工作液发光值

Fig 2 Chemluminescence values of different dilution standard solution of compound Danshen prescription

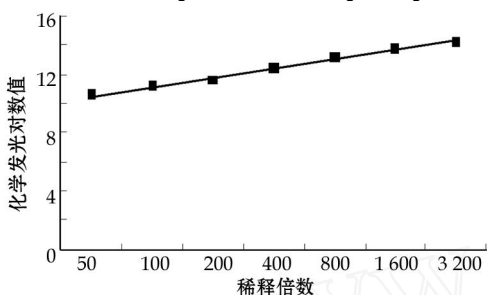


图 3 化学发光值经过对数变换后与稀释倍数的线性关系

Fig 3 Linear relationship of dilution multiple dose with chemluminescence after logarithmic transformation

mL 溶出液完全释放,得到的标准液。

2.4.2 复方丹参缓释片体外释放样品液制备:取复方丹参缓释片样品,照释放度测定法(《中国药典》2005 年版二部附录 XD),采用第一法装置,量取蒸馏水 900 mL,注入每个溶出杯,加热使溶液温度保持在  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ,调整转速( $100 \pm 1$ ) r/min 并保持稳定,取 3 份样品分别投入溶出杯中,开动仪器,在规定取样点吸取溶液 1 mL,立即经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,同时补加同温介质 1 mL。分别测定各释放样品液及标准液的生物化学发光值。

2.4.3 复方丹参缓释片对中性粒细胞的呼吸爆发效应的抑制率(inhibition ratio,  $I$ )和释放量(release,  $R$ )的规定:既定数量的中性粒细胞 PMN 在受到外源性刺激剂 PMA 激活后发生呼吸爆发,产生大量的活性氧自由基,自由基被发光剂 luminol 捕获产生化学发光,PMN-CL 强度与 PMN 的呼吸爆发产生的活性氧自由基正相关。抑制率( $I$ )定义为: $I = (k_0 - k_c) / k_c \times 100\%$ ,其中  $k_0$  和  $k_c$  分别为中性粒细胞未受到药物抑制和受到药物量为  $C$  的药物抑制作用时的生物化学发光值。释放量( $R$ )定义为: $R = I_c / I_0 \times 100\%$ ,其中  $I_0$  为复方丹参缓释片等效完全释放标准液的抑制率, $I_c$  为中性粒细胞受到不同时间点缓释片溶出液抑制作用的生物化学发光值。

不同时间点的生物化学发光值、相对抑制率、相对释放量的变化见图 4、5。在 5 min~12 h 的释放过程中,复方丹参缓释片释放液抑制中性粒细胞呼吸爆发效应的抑制率由 35% 增加到 95%;对应的相对释放量 5 min 时释放 40%,缓慢上升,60 min 释放量达到稳定值 90%,逐渐达到峰值,说明复方丹参缓释片体外可缓释 12 h,基本达到缓释制剂设计的要求,可见基于中性粒细胞呼吸爆发效应的生物化学发光检测技术可以作为快速评价复方丹参缓释片体外释放行为的一种评价方法和手段。

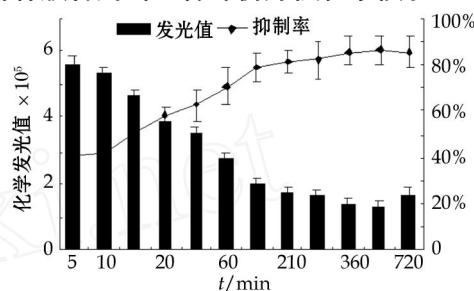


图 4 复方丹参缓释片化学发光值、抑制率-释放时间关系( $n=5$ )

Fig 4 Relationship of release time with CL and  $I$  of compound Danshen sustained-release tablet ( $n=5$ )

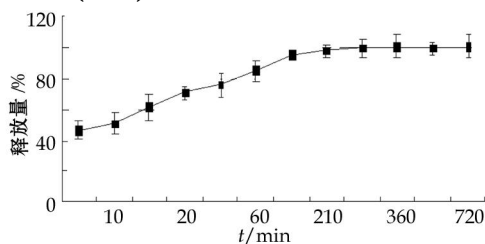


图 5 复方丹参缓释片释放量-释放时间关系( $n=5$ )

Fig 5 Relationship of release amount with release time of compound Danshen sustained-release tablet ( $n=5$ )

### 3 讨论

生命活动的有氧代谢可以不断产生各种自由基,超氧阴离子自由基  $\text{O}_2^{\cdot-}$  是其中 3 种有代表性的自由基(超氧阴离子自由基  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、羟基自由基  $\cdot\text{OH}$ 、酯自由基  $\text{RCOO}\cdot$ )之一。过剩的超氧阴离子自由基  $\text{O}_2^{\cdot-}$  对生物细胞有巨大的破坏作用,是引起冠心病和动脉硬化等多种疾病诱因之一。复方丹参属研制方,其组方丹参、三七、冰片等,前期研究表明其效应组分均具有显著的清除氧自由基(即 ROS)的能力<sup>[5~7]</sup>。而基于中性粒细胞呼吸爆发效应的生物化学发光检测技术,作为氧自由基生物效应的一种检测手段,尤其适用于研究治疗与氧自由基损伤有密

切关系疾病的中药,如文献报道利用生物化学发光检测技术考察酸枣仁<sup>[8]</sup>、银杏叶<sup>[9]</sup>、麦冬皂苷<sup>[10]</sup>、山楂叶<sup>[11]</sup>抗中性粒细胞的呼吸爆发效应进行药效物质的筛选和控制研究等,目前常用的自由基检测方法有:电子自旋共振法、电化学法、毛细管电泳法、荧光光谱法、光度法、色谱法等<sup>[12,13]</sup>。这些方法存在仪器昂贵、操作复杂、选择性差或灵敏度低等缺点,而生物化学发光法具有灵敏、快速、操作简单、重现性好等优点。

本实验采用了基于中性粒细胞呼吸爆发效应的生物化学发光检测技术进行了中药复方缓释制剂体外释放行为的评价,结果证实复方丹参缓释片体外可缓释 12 h,基本达到缓释制剂设计的要求,期望为治疗冠心病类中药复方缓释新剂型的评价探索出一种新方法,改变测定单一成分或某一有效部位不能综合评价、或者药效实验评价费时费钱且操作烦琐的局面,较好表征复方丹参缓释片的体外释放行为特征,弥补了常规复方缓释制剂体外释放评价方法的不足,可以为中药复方的体外释放评价提供新的借鉴和手段。

#### 参考文献:

- [1] 张秀玲. 缓释制剂释放度及含量的分析方法[J]. 天津药学, 2000, 12(4): 59-60.
- [2] 许海玉, 张铁军, 刘昌孝, 等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路[J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 17-22.
- [3] Flastett C, Guthrie L A, Kopaniak M M, et al. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or ty-ace concentrations of bacterial lipopolysaccharide [J]. *Am J Pathol*, 1985, 119 (1): 101.
- [4] 李会军, 李 萍, 张重义, 等. 金银花类中药提取物清除自由基的作用 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(6): 496-498.
- [5] 许罗玲. 丹参酮对中性粒细胞氧自由基释放的抑制效应[J]. 中国病理生理杂志, 1994, 10(6): 635-639.
- [6] 卢荐生. 丹参总丹酚酸与三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注及中性粒细胞呼吸爆发的影响[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(7): 391-392.
- [7] 向志军. 复方丹参对氧化损伤的血管内皮细胞的保护机理 [D]. 天津: 天津大学, 2005.
- [8] 王少敏, 李 萍, 赵明强. 生物化学发光法测定酸枣仁的抗氧化活性[J]. 中草药, 2003, 34(5): 417-419.
- [9] 张 中, 李湘君, 卫涛涛. 银杏叶提取物对巨噬细胞呼吸爆发、炎性细胞因子和 COX-2 mRNAs 及蛋白表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15(5): 538-541.
- [10] 林以宁, 朱丹妮, 余伯阳, 等. 麦冬类药材皂苷元含量与其抑制中性粒细胞呼吸爆发的相关性[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(6): 549-552.
- [11] 刘荣华, 余伯阳, 陈兰英, 等. 山楂叶抗大鼠 PMN 呼吸爆发谱效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(15): 1884-1889.
- [12] Rhodes C J, Tran T T, Morris H. A determination of antioxidant efficiencies using ESR and computational methods [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2004, 60: 1401.
- [13] 张国灿, 肖尚友, 穆小静, 等. 自由基检测技术进展[J]. 广州化学, 2006, 31(3): 37.

## 纤维素酶转化淫羊藿苷制备宝藿苷 I 的研究

贾东升<sup>1,2</sup>, 贾晓斌<sup>1,2</sup>, 赵江丽<sup>2</sup>, 施 峰<sup>2</sup>, 蒋 俊<sup>1</sup>, 黄 洋<sup>1</sup>

(1. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

**摘 要:**目的 研究宝藿苷 I 的制备工艺。方法 采用纤维素酶水解淫羊藿苷制备宝藿苷 I, 以转化率为指标, 通过单因素考察 pH 值、温度、底物的浓度、酶用量、反应时间及金属离子对转化率的影响<sup>L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)</sup>, 正交试验优化制备工艺; 采用 MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 鉴定水解产物。结果 酶解反应的最适条件为温度 50 °C、反应介质 pH 5.2 醋酸-醋酸钠缓冲液, 底物浓度为 10 mg/mL, 酶与底物质量比 1:1, 反应时间 48 h, 钠离子、钙离子、镁离子、锌离子、对酶解反应无显著影响 ( $P > 0.05$ ), 铁离子对酶解反应有抑制作用 ( $P < 0.01$ ); 反应产物相对分子质量为 514, 核磁共振证实产物为宝藿苷 I。结论 纤维素酶水解淫羊藿苷制备宝藿苷 I, 工艺简单可靠, 反应条件温和, 适合工业化生产。

**关键词:**淫羊藿苷; 宝藿苷 I; 纤维素酶; 生物转化

**中图分类号:** R284.2; R286.02

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2010)06-0888-05

①收稿日期: 2009-09-29

基金项目: 江苏省医药高新技术计划项目 (BG2007614); 江苏省中医药领军人才项目 (2006)

作者简介: 贾东升, 男, 河北石家庄人, 硕士在读, 主要研究方向为中药新型给药系统。E-mail: jiadongsheng\_1@163.com

\* 通讯作者 贾晓斌 Tel/Fax: (025) 85637809 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com