

## • 药剂与工艺 •

## 基于生物效价-多成分整合的中药固体制剂体外溶出度研究

戴 领<sup>1,2</sup>, 申宝德<sup>1</sup>, 吕青远<sup>1</sup>, 徐 和<sup>1,2</sup>, 白金霞<sup>1,2</sup>, 于 超<sup>1</sup>, 肖云芝<sup>1,2</sup>, 尹蓉莉<sup>2</sup>, 韩 晋<sup>1\*</sup>, 袁海龙<sup>1\*</sup>

1. 中国人民解放军第302医院 药学部, 北京 100039

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

**摘 要:** **目的** 探讨符合中医药特点的中药固体制剂质量控制与评价的化学-生物联合评价模式。**方法** 以复方鳖甲软肝片为模型药, 考察在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液溶出介质中, 不同溶出时间的复方鳖甲软肝片溶出液对 LX-2 肝星状细胞的抑制作用, 提出基于细胞抑制率所得复方鳖甲软肝片的累积溶出度, 与 HPLC 法所测的芍药苷、连翘苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 各指标成分的溶出度及自定义权重系数的多成分整合的溶出度运用  $f_2$  相似因子法分别进行相关性评价。**结果** 芍药苷、连翘苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 各指标成分的溶出度及其整合的溶出度  $f_2$  相似因子依次为 43、58、61、59, 说明多成分整合的溶出度能较为全面地反映全方的生物效价。**结论** 以生物活性为导向的多成分整合的溶出度评价方法有望成为评价中药固体制剂体外溶出度的有效手段之一。

**关键词:** 中药固体制剂; 溶出度; MTT 比色法;  $f_2$  相似因子; 复方鳖甲软肝片

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)19-2666-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.19.007

## *In vitro* dissolution of Chinese materia medica solid preparation based on biological activity-multicomponents integration

DAI Ling<sup>1,2</sup>, SHEN Bao-de<sup>1</sup>, LV Qing-yuan<sup>1</sup>, XU He<sup>1,2</sup>, BAI Jin-xia<sup>1,2</sup>, YU Chao<sup>1</sup>, XIAO Yun-zhi<sup>1,2</sup>, YIN Rong-li<sup>2</sup>, HAN Jin<sup>1</sup>, YUAN Hai-long<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacy, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To explore the chemical-biological assay pattern for quality control and evaluation of Chinese materia medica solid preparations (CMMSP). **Methods** MTT assay was used to obtain the characteristic cell inhibitory rate on LX-2 hepatic stellate cells by Compound Biejia Ruangan Tablet (CBRT) dissolving solutions in PBS dissolution medium with pH 7.4 for different time periods. From these results, the cumulative dissolution of CBRT was obtained based on the cell inhibitory rate. The dissolution rates of paeoniflorin, phillyrin, and ginsenosides Rg<sub>1</sub> were determined by HPLC method. A novel approach of self-defined weighting coefficient based on the quality had been created to establish the integrated dissolution rate model. Then  $f_2$  similar factor method was used to evaluate the relevance of these two methods. **Results** The  $f_2$  values for paeoniflorin, phillyrin, ginsenosides, and the integration dissolution were 43, 58, 61, and 59, respectively. It was indicated that the dissolution of multicomponent integration could fully reflect the biological potency of all parties. **Conclusion** The biological activity-multicomponents integrated evaluation method of dissolution is expected to be one of the effective means for *in vitro* dissolution test of CMMSP.

**Key words:** Chinese materia medica solid preparations; dissolution; MTT assay;  $f_2$  similar factor; Compound Biejia Ruangan Tablet

收稿日期: 2013-05-07

基金项目: 国家新药创制重大专项 (2011ZX09201-201-14, 2011ZX09201-201-35); 国家自然科学基金资助项目 (81073069)

作者简介: 戴 领 (1989—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: dailingflying@163.com

\*通信作者 韩 晋 E-mail: hanjin302emba@163.com

袁海龙 E-mail: yhlpharm@126.com

中药固体制剂应用广泛,但目前尚缺乏有效、可靠的中药固体制剂评价技术,通常是根据《中国药典》选择某一种或几种成分进行定量测定来控制其质量。但中药复方固体制剂的药效是多成分协同作用的结果,单纯检测一种或几种指标成分会导致与整体药效的偏差,不能完全衡量中药固体制剂的质量<sup>[1]</sup>,并且这些定量测定的指标不一定是在生物体内发挥药效的物质,所以中药固体制剂质量的评价方法有待进一步提升。

溶出度检测已成为评价制剂处方和生产工艺的重要手段,也是评价制剂活性成分生物利用度和药物质量的内在指标<sup>[2-3]</sup>。中药固体制剂的溶出度评价研究较少,通常是借鉴化学药质量控制模式对单个或少数指标成分的量进行分析测定,溶出度与内在质量关联的研究已有部分报道<sup>[4]</sup>。四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法是一种细菌活性检测方法,广泛应用于新药筛选、细胞毒性实验、肿瘤放射敏感性实验<sup>[5-6]</sup>。大量研究表明 MTT 比色法具有工作量小,操作简单、快速等优点,由于生物评价方法的专属性较强,将其作为质量标准推广比较困难,可把其作为中药固体制剂质量化学评价的补充方法。

本实验旨在将 MTT 比色法与溶出度测定方法相结合,以复方鳖甲软肝片(Compound Biejia Ruangan Tablet, CBRT)为模型药,以其对肝星状细胞的抑制率为着眼点,建立一种以生物活性为导向的化学溶出度检测方法,以补充单纯检测某一种或几种成分的不足。考察在磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)溶出介质下,复方鳖甲软肝片溶出液对 LX-2 肝星状细胞的生长抑制作用,并绘制细胞抑制率-溶出时间( $I-t_d$ )曲线。同 HPLC 法测定指标成分溶出度进行自定义权重系数的整合,运用 $f_2$ 相似因子法将生物溶出曲线与化学溶出曲线进行相关性评价<sup>[7]</sup>,以期建立以“效”为导向,化学成分检测为基准的多成分整合的溶出度评价模式,为建立复方鳖甲软肝片的质量标准,提高中药固体制剂的质量控制提供研究基础。

## 1 仪器与材料

BSA124S 型精密电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); LGJ-18 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂制造); LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); RC-6 型溶出度测试仪(天津新天光技术开发有限公司); XDS-1B 型倒置生物显微镜(北京京瑞天下科技有限公司); Forma Series II 水套

CO<sub>2</sub> 培养箱(3110 Series II 水套, Thermo Fisher); 全波长酶标仪(Multiskan GO 型, Thermo Scientific); LX-2 肝星状细胞(北京协和细胞资源中心); 复方鳖甲软肝片(内蒙古福瑞医疗科技股份有限公司, 批号 200110901); 对照品芍药苷(批号 110736-200422)、连翘苷(批号 110821-200508)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(批号 110703-200322)均购自中国药品生物制品检定所; 色谱甲醇(Oceanpak, 瑞典), 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 定量方法的建立

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Alltima C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 体积流量均为 1.0 mL/min; 均为室温检测, 进样量 10 μL。芍药苷: 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-甲醇(70:30), 检测波长为 232 nm; 连翘苷: 流动相为乙腈-水(25:75); 检测波长为 230 nm; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>: 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~35 min, 19%乙腈; 35~55 min, 19%~28%乙腈; 55~70 min, 28%乙腈; 检测波长 203 nm。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取对照品芍药苷、连翘苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 适量, 配制成质量浓度分别为 73.36、65.28、310.4 μg/mL 的对照品储备液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 按照《中国药典》2010 年版附录 XC 溶出度测定法第三法(小杯法)<sup>[8]</sup>, 以脱气处理的 pH 7.4 PBS 200 mL 为溶出介质, 转速 75 r/min, 温度 37 °C, 依法操作, 30 min 时, 取样 2 mL, 立即滤过, 取续滤液, 即为供试品溶液。

**2.1.4 阴性对照溶液的制备** 按处方比例取缺少赤芍、连翘、三七的其他药材, 按其工艺制成缺赤芍、连翘、三七的阴性制剂, 再按“2.1.3”项下方法制备, 即得阴性对照溶液。

**2.1.5 专属性考察** 分别将对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液按“2.1.1”项下方法进行测定, 供试品中芍药苷、连翘苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 与其他组分色谱峰达到基线分离, 阴性对照溶液在与对照品相同保留时间处无色谱峰, 可认为处方中其他药材与辅料对此 3 种成分的测定无干扰, 色谱图见图 1。

**2.1.6 线性关系考察** 分别精密吸取芍药苷、连翘苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对照品储备液适量, 用甲醇将对照品储备液稀释 2、4、8、20、40 倍, 分别吸取上述溶液, 按“2.1.1”项下方法进行测定, 以峰面积积分值为纵坐标(Y), 进样质量浓度为横坐标(X)

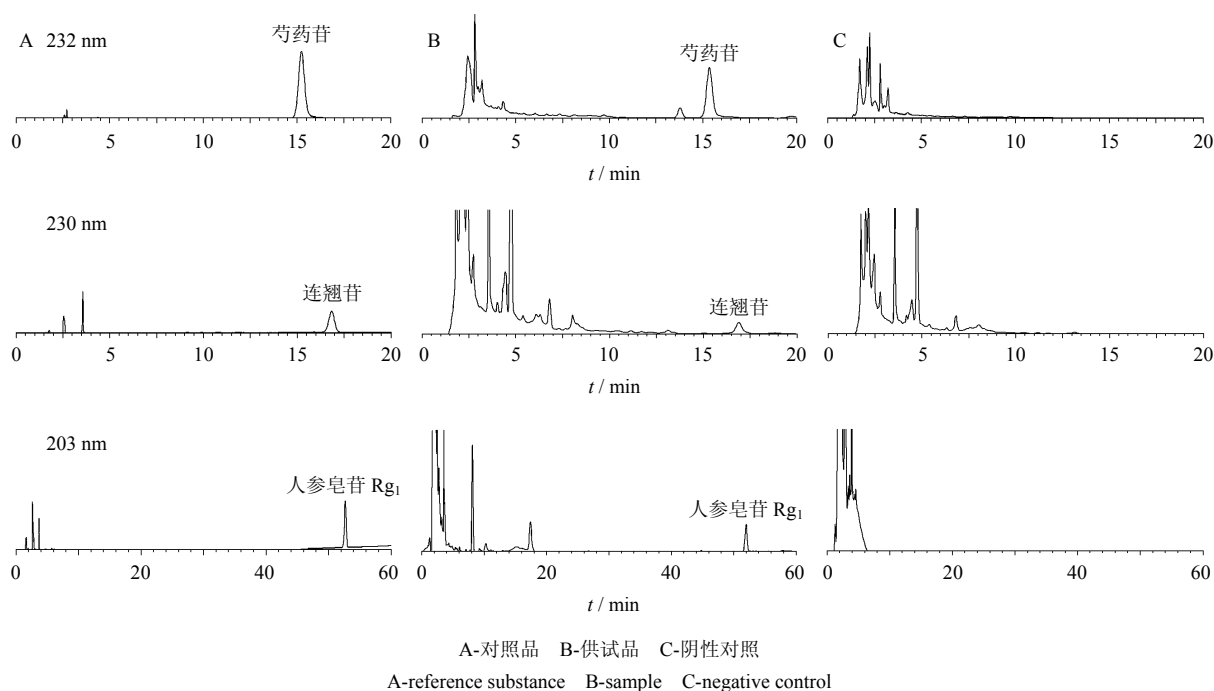


图1 复方鳖甲软肝片中3种成分专属性试验

Fig. 1 Specificity test of three components in CBRT

进行线性回归,得回归方程:芍药苷  $Y=29\,676X-11\,835$ ,  $r=0.998\,4$ ,表明其在  $1.834\sim36.68\,\mu\text{g/mL}$  线性关系良好;连翘苷  $Y=20\,208X-2\,626$ ,  $r=0.999\,9$ ,表明其在  $1.632\sim32.64\,\mu\text{g/mL}$  线性关系良好;人参皂苷  $\text{Rg}_1$   $Y=2\,041X-882.5$ ,  $r=0.999\,9$ ,表明其在  $7.76\sim155.20\,\mu\text{g/mL}$  线性关系良好。

**2.1.7 精密度试验** 分别精密吸取  $9.17\,\mu\text{g/mL}$  芍药苷对照品溶液,  $8.16\,\mu\text{g/mL}$  连翘苷对照品溶液,  $38.8\,\mu\text{g/mL}$  人参皂苷  $\text{Rg}_1$  对照品溶液按“2.1.1”项下方法测定芍药苷、连翘苷、人参皂苷  $\text{Rg}_1$  的峰面积,在1 d内连续进样5次,以考察日内精密度;每天进样1次,连续5 d,以考察日间精密度。结果芍药苷日内精密度 RSD 为 0.48%,日间精密度 RSD 为 0.95%;连翘苷日内精密度 RSD 为 1.09%,日间精密度 RSD 为 1.22%;人参皂苷  $\text{Rg}_1$  日内精密度 RSD 为 0.89%,日间精密度 RSD 为 1.36%。

**2.1.8 稳定性试验** 取供试品溶液于 0、2、6、8、12 h 测定峰面积,结果显示,供试品溶液在 12 h 内,芍药苷峰面积的 RSD 为 1.39%,连翘苷峰面积的 RSD 为 1.65%,人参皂苷  $\text{Rg}_1$  峰面积的 RSD 为 1.70%,结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.1.9 重复性试验** 取复方鳖甲软肝片 5 片,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下方法测定芍药苷、连翘苷、人参皂苷  $\text{Rg}_1$  的峰面

积,结果样品中芍药苷质量分数的 RSD 为 1.45%,连翘苷质量分数的 RSD 为 1.68%,人参皂苷  $\text{Rg}_1$  质量分数的 RSD 为 1.90%,结果表明,本方法重复性良好。

**2.1.10 加样回收率试验** 先按“2.1.1”项下方法测定供试品中芍药苷、连翘苷、人参皂苷  $\text{Rg}_1$  的量;另量取已知质量浓度的供试品,共 9 份,加入相当于所取样品溶液标示量 80%、100%、120%的芍药苷、连翘苷、人参皂苷  $\text{Rg}_1$  对照品溶液,依法测定,计算回收率。结果显示芍药苷平均回收率为 98.92%,RSD 为 1.89%;连翘苷平均回收率为 99.51%,RSD 为 1.65%;人参皂苷  $\text{Rg}_1$  平均回收率为 99.32%,RSD 为 1.48%;表明本法回收率较好,准确度较高。

## 2.2 溶出度测定

按照《中国药典》2010年版附录 XC 溶出度测定法第三法(小杯法),以脱气处理的 pH 7.4 PBS 200 mL 为溶出介质,转速 75 r/min,温度 37 °C,取本品 6 片,精密称定质量( $W_i$ ),分别投入 6 个溶出杯中,药片接触溶出介质开始计时,分别于 10、20、30、45、60、90 min,取样 2 mL,同时补加等量同温溶出介质,0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液即得供试品溶液(样品 1、2、3、4、5、6),取供试品溶液 2 mL 冷冻干燥。按“2.1.1”项下方法

测定样品溶出液峰面积 ( $A_i$ ), 代入回归方程中, 计算复方鳖甲软肝片不同时间 3 种成分的平均累积溶出度, 结果见表 1。

$$\text{累积溶出度} = [\rho_n + (\rho_1 + \rho_2 + \cdots + \rho_{n+1})]V_{\text{取}} / (\rho_0 V_{\text{总}})$$

式中  $\rho_n$  为第  $n$  个取样点的质量浓度,  $V_{\text{总}}$  为溶出体积,  $V_{\text{取}}$  为取样体积,  $\rho_0$  为超声提取液质量浓度

表 1 复方鳖甲软肝片不同时间的平均累积溶出率 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Average accumulation dissolution rate of CBRT at different time points ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| $t / \text{min}$ | 平均累积溶出率 / %      |                  |                    |
|------------------|------------------|------------------|--------------------|
|                  | 芍药苷              | 连翘苷              | 人参皂苷 $\text{Rg}_1$ |
| 10 (样品 1)        | 30.91 $\pm$ 1.03 | 46.68 $\pm$ 1.20 | 29.24 $\pm$ 0.98   |
| 20 (样品 2)        | 59.87 $\pm$ 1.41 | 86.46 $\pm$ 1.47 | 73.97 $\pm$ 1.23   |
| 30 (样品 3)        | 84.40 $\pm$ 1.67 | 92.08 $\pm$ 1.82 | 91.99 $\pm$ 1.51   |
| 45 (样品 4)        | 97.81 $\pm$ 1.29 | 94.13 $\pm$ 1.74 | 94.50 $\pm$ 1.48   |
| 60 (样品 5)        | 99.67 $\pm$ 1.84 | 96.88 $\pm$ 2.02 | 96.37 $\pm$ 1.97   |
| 90 (样品 6)        | 99.79 $\pm$ 1.92 | 98.00 $\pm$ 1.59 | 97.71 $\pm$ 2.11   |

## 2.3 复方鳖甲软肝片抑制肝星状细胞 LX-2 生物活性检测方法的建立

**2.3.1 LX-2 细胞传代与培养** 复苏后的 LX-2 细胞以含体积分数 20% 胎牛血清、 $1 \times 10^4$  U/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液均匀接种于培养瓶, 于 37 °C, 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中连续培养传代。

**2.3.2 细胞抑制率的测定** 当细胞处于对数生长期时, 用胰酶消化, 培养液悬浮细胞。调整细胞密度, 每孔 200  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板培养 24 h<sup>[9]</sup>, 吸除 96 孔板的上清液, 取冷冻干燥处理的样品加入 1.5 mL 含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 培养规定时间后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 液 20  $\mu\text{L}$ , 继续孵育 4 h, 加入 DMSO 200  $\mu\text{L}$ , 振荡 10 min 后, 使结晶物充分溶解。在 490 nm 波长下, 用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度 ( $A$ ) 值, 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白对照}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{空白对照}}$$

**2.3.3 细胞接种数考察** 取对数生长期的细胞, 调整细胞浓度分别约为  $4.0 \times 10^4$ 、 $4.5 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^4$  个/mL, 培养 12、24、36 h, 按“2.3.2”项下方法操作, 结果见表 2。细胞浓度为  $4.5 \times 10^4$  个/mL 孵育 48 h 细胞处于对数生长期, 且  $A$  值 24 h 时在 1.0 左右, 具有较好的细胞密度, 即确定其为最佳细胞浓度条件。

表 2 不同时间点 3 个细胞浓度的  $A$  值 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2  $A$  values of three concentration cells at different time points ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 细胞浓度 /<br>( $\times 10^4$ 个/mL) | $A$ 值           |                 |                 |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                 | 12 h            | 24 h            | 36 h            |
| 4.0                             | 0.77 $\pm$ 0.03 | 0.88 $\pm$ 0.02 | 0.95 $\pm$ 0.02 |
| 4.5                             | 0.82 $\pm$ 0.04 | 1.03 $\pm$ 0.05 | 1.57 $\pm$ 0.02 |
| 5.0                             | 0.99 $\pm$ 0.03 | 1.56 $\pm$ 0.04 | 1.69 $\pm$ 0.03 |

**2.3.4 药物作用时间考察** 精密称取复方鳖甲软肝片 10 片, 研细后精密称取相当于平均片质量 1 片的样品量 ( $W$ ), 置于 200 mL 量瓶中, 加入溶出介质 200 mL, 超声处理 60 min, 取出, 放冷, 补加同一溶出介质至刻度, 摇匀; 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过得样品 7 (对照)。选用对数生长期 LX-2 细胞, 调整细胞数浓度为  $4.5 \times 10^4$  个/mL, 在冷冻干燥后的样品中加入含 1.5 mL 的培养基。按“2.3.2”项下方法操作, 分别培养 6、12、24 h, 结果见表 3。随着药物作用时间延长, 溶出介质对细胞影响使  $A$  值误差变大, 药物作用 12 h 时, 细胞抑制梯度较为明显, 所以确定药物作用细胞时间为 12 h。

**2.3.5 基于肝星状细胞抑制率的复方鳖甲软肝片体外溶出度** 基于常规化学分析, 计算中药固体制剂平均累积溶出率的方法, 运用细胞生长抑制率 ( $I$ ) 提出肝星状细胞抑制率中药固体制剂的体外溶出度。实验结果见表 4 ( $I$  计算已扣除溶出介质的影响)。

$$\text{溶出度} = (I_i \times W_7) / (I_7 \times W_i)$$

式中  $W_7$  为复方鳖甲软肝片平均片质量,  $W_i$  为复方鳖甲软肝片单片质量,  $I_7$  为样品 7 细胞抑制率,  $I_i$  为各点溶出液细胞抑制率

## 2.4 自定义权重系数的复方鳖甲软肝片溶出曲线整合模型的建立

根据复方鳖甲软肝片中各成分在平均 1 片中的量 ( $C_i$ ) 在 3 种成分总量 ( $C$ ) 所占比值自定义为各成分在总量中的权重系数 ( $\omega_i$ )。将每一时间点下 3 种单体成分累积溶出度 ( $c$ ) 赋以各自的权重系数, 计算各成分的整合累积溶出率。复方鳖甲软肝片各成分自定义权重系数及整合累积溶出率的计算按公式进行。

$$\omega_i = c_i / (c_{\text{Pae}} + c_{\text{Ph}} + c_{\text{Rg}})$$

$$c_i = \omega_{\text{Pae}} \times c_{\text{Pae}} + \omega_{\text{Ph}} \times c_{\text{Ph}} + \omega_{\text{Rg}} \times c_{\text{Rg}}$$

下标 Pae、Ph、Rg 分别代表芍药苷、连翘苷、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ ,  $i$  分别代表 3 种成分,  $c_i$  表示各时间点的整合累积溶出率

表3 不同药物作用时间对 LX-2 细胞的增殖的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )Table 3 Effect of dissolution media at different concentration on proliferation of LX-2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

| $t/h$ | A 值       |           |           |           |           |           |           |           |           |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|       | 样品 1      | 样品 2      | 样品 3      | 样品 4      | 样品 5      | 样品 6      | 样品 7      | PBS       | 空白对照组     |
| 6     | 1.14±0.02 | 1.10±0.01 | 0.98±0.04 | 0.92±0.03 | 0.88±0.02 | 0.90±0.01 | 0.86±0.02 | 1.12±0.02 | 1.13±0.02 |
| 12    | 0.85±0.03 | 0.72±0.04 | 0.55±0.07 | 0.50±0.04 | 0.53±0.04 | 0.51±0.04 | 0.49±0.05 | 1.07±0.04 | 1.15±0.02 |
| 24    | 0.70±0.07 | 0.52±0.06 | 0.42±0.09 | 0.40±0.08 | 0.49±0.09 | 0.44±0.13 | 0.42±0.10 | 1.03±0.05 | 1.21±0.03 |

表4 复方鳖甲软肝片生物溶出度 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )Table 4 Bio-dissolution rates of CBRT ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

| 样 品 | $I/\%$     | 体外溶出度 / %  |
|-----|------------|------------|
| 1   | 18.26±1.22 | 36.21±2.42 |
| 2   | 40.87±1.06 | 81.03±2.10 |
| 3   | 47.83±1.16 | 94.83±2.30 |
| 4   | 43.48±1.39 | 86.21±2.75 |
| 5   | 46.96±1.20 | 93.10±2.38 |
| 6   | 48.70±1.13 | 96.55±2.23 |
| 7   | 50.43±1.61 | —          |

复方鳖甲软肝片3种成分自定义 $\omega_i$ 分别为芍药苷0.12、连翘苷0.03、人参皂苷 $R_{g1}$ 0.85,不同时间点其溶出度的整合计算结果 $c_t$ 分别为24.86、69.25、91.08、94.88、96.77、97.96。整合溶出曲线与各成分溶出曲线比较见图2。

## 2.5 $f_2$ 相似因子法判断释放度曲线相似性

本研究应用美国FDA推荐的 $f_2$ 相似因子法对释放度曲线的相似度进行判定。 $f_2$ 相似因子可以用如下公式表示<sup>[10]</sup>。

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

式中 $R_i$ 和 $T_i$ 分别代表参比制剂和受试制剂在时间 $t$ 的释放度, $n$ 为时间点的个数

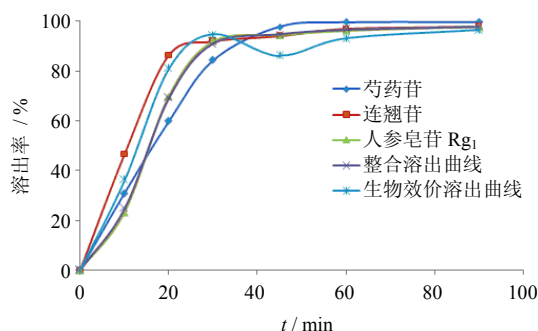


图2 各条溶出曲线比较图

Fig. 2 Comparative dissolution profiles of various components

在使用 $f_2$ 相似因子法时遵循以下的条件:(1)受试制剂和参比制剂的溶出度在完全一致的条件下测定;(2)对于任何1个制剂,只能有1个累积释放量超过85%的点参与比较。对于2条溶出曲线,如果其 $f_2$ 相似因子值 $\geq 50$ ,则认为该2条溶出曲线相似,反之,则认为不相似。

运用 $f_2$ 相似因子法分别将芍药苷、连翘苷、人参皂苷 $R_{g1}$ 和整合溶出曲线与生物溶出曲线比较,结果 $f_2$ 相似因子分别为43、58、61、59,结果表明整合溶出曲线与生物溶出曲线相似,基本能反映全方的生物效价。

## 3 讨论

本实验考虑到样品溶解性、漏槽条件和细胞实验条件,选择小杯法且在pH 7.4 PBS下测定复方鳖甲软肝片的溶出度。同时从细胞抑制率的角度,提出基于肝星细胞抑制率的体外溶出度,以期透过“化学”成分看“药效”本质,以评价复方鳖甲软肝片的质量变化。对于成分复杂、药理作用多样的中药固体制剂来说,单一成分难以代表全方的生物效价,本实验参考符合中药多组分、多靶点整体药效作用特征的多成分整合药动学<sup>[11]</sup>提出自定义权重系数的复方鳖甲软肝片溶出曲线整合模型,将化学检测的成分溶出曲线进行整合,结果表明整合溶出曲线能基本代表全方药效,而单一成分芍药苷不能完全代表全方药效,同时,发现连翘苷和人参皂苷 $R_{g1}$ 与生物溶出曲线同样具有相似性,且人参皂苷 $R_{g1}$ 与生物溶出曲线比较的 $f_2$ 相似因子为61,略高于整合溶出曲线与生物溶出曲线比较的 $f_2$ 相似因子(59),可以为实际应用增加复方鳖甲软肝片的质量控制指标成分提供依据。

专属、灵敏、快捷,能反映综合因素的方法及其整合体系将是生物测定方法发展的方向。复方鳖甲软肝片临床主要用于治疗抗乙型病毒型肝炎肝纤维化及早期肝硬化,有文献报道其对肝星状细胞的增殖有明显的抑制作用<sup>[12]</sup>,故本实验采用LX-2肝

星状细胞系为细胞模型对复方鳖甲软肝片溶出液的生物活性进行评价。复方中药的药理活性是多种多样的,每种活性检测方法都有其适用范围。本课题组研究表明,MTT法通过模型生物体的改变,可以应用于抗菌、抗病毒及抗肿瘤等中药,相关工作将陆续报道。生物效价分析有望成为研究中药固体制剂体外溶出度的重要辅助评价手段之一,为构建符合中药特点的质量控制与评价的适宜模式和方法提供了支持<sup>[13]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 肖小河,金城,鄢丹,等. 中药大质量观及实践[J]. 中草药, 2010, 41(4): 505-508.
- [2] 袁海龙,黄雪,肖小河. 中药固体制剂溶出度研究与展望[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2010, 12(6): 915-919.
- [3] 谢沐风. 如何科学、客观地评价口服固体制剂内在品质——纵论我国固体制剂仿制药质量[J]. 药品评价, 2010, 7(14): 19-23.
- [4] 黄雪,袁海龙,肖小河,等. 基于生物热动力学表征的中药固体制剂体外溶出度分析方法初步研究[J]. 药学学报, 2010, 45(3): 338-342.
- [5] 黄银久,宋宝安,金林红,等. SRB法和MTT法抗肿瘤药物筛选结果相关性研究[J]. 生物学杂志, 2009, 26(4): 13-16.
- [6] Han M, Li J F, Tan Q, *et al.* Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2010, 19(3): 195-200.
- [7] *Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalences Studies for Orally Administered Drug Products—General Considerations* [S]. 2003.
- [8] 中国药典 [S]. 二部. 2010.
- [9] 王晓红,曹琦,胡成穆. JAK/STAT通路调节IL-4诱导的肝星状细胞系LX-2 I型胶原基因的表达[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(4): 423-427.
- [10] 郁丹红,黄洋,贾晓斌,等. 通脉微丸多元释药系统释药特性评价[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2889-2893.
- [11] 李晓宇,郝海平,王广基,等. 三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究[J]. 中国天然药物, 2008, 6(5): 377-381.
- [12] 赵景民,周光德,李文淑,等. 复方鳖甲软肝片抗肝纤维化机制的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(7): 560-562.
- [13] 鄢丹,肖小河. 基于道地药材和生物测定的中药质量控制模式与方法研究——黄连质量生物测定[J]. 药学报, 2011, 46(5): 568-572.