

• 药剂与工艺 •

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

祝丽欣¹, 陈 芝¹, 郭 莹², 黄绳武¹, 石森林¹, 刘 会¹, 熊 阳^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学生命科学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 引入 f_2 相似因子法对银杏酮酯(GBE)缓释微丸的大类成分总黄酮和各类成分(包括黄酮类和萜内酯类)的释放曲线进行分析,以能较全面地评价其体外释放。方法 运用紫外分光光度法、高效液相-质谱联用(HPLC-MS)测定 GBE 缓释微丸中总黄酮和各类成分(总黄酮)和各类成分(槲皮苷、异鼠李素、芦丁、槲皮素、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯)的体外释放率,并进行 f_2 相似因子计算;采用扫描电镜法观察微丸释药前后的微观结构,结合方程拟合分别对微丸中总黄酮和各类成分的释药机制解析,以验证 f_2 相似因子法的可靠性。结果 优化工艺的 GBE 微丸黄酮类和内酯类的各成分与总黄酮的 f_2 均大于 50,说明总黄酮与各类成分体外释放曲线具有较好的相关性。释药机制解析进一步验证了该结果的可靠性。结论 f_2 相似因子法可运用于多组分中药缓释制剂大类成分和各类成分的体外释放评价。

关键词: f_2 相似因子法;银杏酮酯微丸;黄酮;萜类内酯;体外释放;槲皮苷;异鼠李素;芦丁;槲皮素;银杏内酯 A;银杏内酯 B;银杏内酯 C;白果内酯

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)23-3482-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.23.007

Correlation of *in vitro* release between total flavonoids and different ingredients in sustained-release pellets of *Ginkgo biloba* extract by f_2 fit factor method

ZHU Li-xin¹, CHEN Zhi¹, GUO Ying², HUANG Sheng-wu¹, SHI Sen-lin¹, LIU Hui¹, XIONG Yang¹

1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To find a new method to evaluate the *in vitro* release of *Ginkgo biloba* extract (GBE) sustained-release pellets, f_2 fit factor method was used to study the correlation of *in vitro* release between total flavonoids and different ingredients (including flavonoids and terpenoids). **Methods** The release rates *in vitro* of total flavonoids and different ingredients (quercitrin, isorhamnetin, lutein, quercetin, ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C, and bilobalide) were detected by UV and HPLC-MS respectively, and then f_2 fit factor was calculated between total flavonoids and different ingredients. Also the micro-structures of pellets before and after drug release were detected by scanning electron microscopy (SEM), which could explain the drug release mechanism combined with the fitted equation. **Results** All f_2 values were greater than 50 between the total flavonoids and different ingredients of the *in vitro* release from GBE pellets of optimized preparation, which indicated that there might be a good correlation between them. The drug release mechanism further verified the reliability of the results. **Conclusion** The f_2 fit factor method could be applied in the evaluation of *in vitro* release for multi-component sustained-release preparations of Chinese materia medica.

Key words: f_2 fit factor method; *Ginkgo biloba* extract sustained-release pellets; flavonoids; terpenoids; *in vitro* release; quercitrin; isorhamnetin; lutein; quercetin; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgolide C; bilobalide

收稿日期: 2015-07-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473434, 81274090); 国家自然科学基金青年基金(81202926, 81503206)

作者简介: 祝丽欣(1992—), 女, 硕士研究生, 浙江衢州人, 研究方向为中药新剂型与新型给药系统。

Tel: (0571)86613524 E-mail: zlxzhulixin@126.com

*通信作者 熊 阳 Tel: (0571)86613524 E-mail: xyxnb@126.com

体外释放是研究中药缓释制剂最重要的评价指标之一,由于中药是多种成分综合作用的结果,理化性质及生物学性质各异,其体外释放度的评价复杂且没有较为统一的方法。目前最常见的评价方法是以单一指标成分、多个指标成分或大类成分为指标进行体外释放度研究^[1-2]。这种方法最大的不足之处是如果仅研究其中的一个或几个指标成分的释放,难以反映中药组分的整体体外释放行为,且目前大部分中药的有效成分尚不清楚,因此,个别指标成分的释放与药效之间很难有平行性;而测定大类成分非常笼统,难以反映各类成分的释放行为差异,很容易掩盖中药不同批次之间各成分的释放差异,从而影响其药效重现性。因此,在评价多组分中药缓释制剂的体外释放时,应该尝试摸索各类成分释放与大类成分释放之间的规律,将两者紧密联系起来。

缓释微丸的制备工艺过程需要较多的摸索,在整个实验过程中需要对溶出液进行大量的分析,因此在总类成分和大类成分相关性良好的前提下,是否可以考虑用简便可行的总类成分测定进行体外释放研究,这对于节省实验耗费,提高实验效率具有极其重要的作用。

近年来, f_2 相似因子(f_2 fit factor)法^[3-4]作为定量描述体外溶出曲线相似性的非模型依赖方法因为计算简单、判定方法可靠,已经被美国FDA的CDER(Center for Drug Evaluation and Research,药品评价和研究中心)和欧盟的EMA(Europe, the Middle East and Africa)推荐使用^[5-6],但多用于受试制剂与参比制剂之间的溶出曲线相关性研究^[7]。本实验尝试引入 f_2 相似因子法对多组分中药缓释制剂的大类成分和总类成分的体外释放之间进行相似因子分析,希望能找到一种较为全面评价中药多组分缓释制剂体外释放的新方法,并希望能为中药缓释制剂的制备和质量检测过程提供新的思路。

本实验选择银杏酮酯(GBE)作为模型药物,GBE活性成分群清楚,主要含有总黄酮和萜内酯2大组分群,其中黄酮类成分群中含有芦丁、槲皮素、槲皮苷、异鼠李素等^[8],内酯类成分群中含有银杏内酯A、B、C和白果内酯,黄酮类与内酯类的比例相对固定,且已大量商品化生产,便于质量控制^[9]。另外,黄酮类和萜内酯类成分的理化性质存在较大的差异,因此具有一定的代表性,能为多组分中药缓释制剂的研究提供一定参考。

1 仪器与材料

ZRS-6 G溶出试验仪,天津市天大天发科技有限公司;UV 759 s紫外-可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;KQ 5200 DE型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;CPA225D分析天平,北京赛多利斯;Mini-250低温挤出滚圆微丸机,深圳市信宜特制药设备有限公司;JHQ-100型流化沸腾颗粒包衣机,辽宁医联新药技术研究所;6460 Triple Quad质谱仪、1290 Infinity液相色谱仪,美国Agilent公司;扫描电镜,日立S3000N。

槲皮素(批号MUST-12072505)、银杏内酯A(批号MUST-12120501)、银杏内酯C(批号MUST-12032214),成都曼斯特生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;槲皮苷(批号111538-201105,质量分数92.7%)、芦丁(批号100080-200707,质量分数90.5%)、异鼠李素(批号110860-201109,质量分数99.0%)、银杏内酯B(批号110863-201209,质量分数99.9%)、白果内酯(批号110865-200605,质量分数100.0%),中国食品药品检定研究院;GBE(含总黄酮 $\geq 24.0\%$ 、银杏内酯 $\geq 6.0\%$,HPLC),批号20130228,上海得恩德医药科技有限公司;格列本脲,批号100135-200404,质量分数 $>99\%$,中国食品药品检定研究院。羧甲基淀粉钠,烟台金显变性淀粉有限公司;尤特奇RS 30 D、尤特奇RL 30 D,德国罗姆公司;柠檬酸三乙酯,昌乐屹立化工有限公司;聚山梨酯-80,上海强顺化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 大类成分总黄酮体外测定方法的建立^[10]

2.1.1 线性方程和线性范围 精密称取干燥至恒定质量的GBE 19.0 mg置于100 mL量瓶中,用甲醇超声至溶解,过膜,即得GBE储备液。精密吸取GBE储备液,加蒸馏水稀释成系列质量浓度,266 nm处测定吸光度。以吸光度对质量浓度进行线性回归,得回归方程: $Y=9.505 X+0.008 5$, $r=0.999 9$,线性范围为15.2~76.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.2 方法专属性试验 精密称取处方量的辅料,置于100 mL量瓶中,按样品方法处理,滤过,取续滤液于200~600 nm扫描,结果辅料无干扰。

2.1.3 精密度试验 精密移取GBE储备液3 mL,加蒸馏水稀释至10 mL(质量浓度为57.0 $\mu\text{g/mL}$),连续测定6次,RSD为0.53%,表明精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 取样品溶液(按照“2.1.1”项下方法制备)分别于0、2、4、6、10、24 h测定,

其RSD为2.12%，表明溶出样品在24 h内稳定。

2.1.5 重复性试验 精密移取溶出样品（按照“2.1.1”项下方法制备）6份，分别测定吸光度，其RSD为0.84%，表明重复性符合要求。

2.1.6 加样回收率试验 精密移取“2.1.1”项下GBE储备液3 mL，加入处方量的辅料，按样品方法处理，滤过，取续滤液连续测定6次，RSD为0.57%，表明加样回收率良好。

2.2 HPLC-MS同时测定黄酮类和萜内酯中各类成分体外分析方法的建立

2.2.1 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 ESI (Turbo Spray)；去溶剂气流： N_2 ，10 L/min；碰撞气： N_2 ；扫描方式为多反应监测（MRM）。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB- C_{18} 柱（50 mm×2.1 mm，1.85 μm ）；体积流量 0.4 mL/min；柱温 30 $^{\circ}C$ ；进样量 4 μL ；流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈；梯度洗脱程序：0~2 min，15%~30%乙腈；2~4 min，30%~50%乙腈；4~6 min，50%~90%乙腈；6~6.1 min，90%~85%乙腈；6.1~8.0 min，85%乙腈。

2.2.3 线性方程和线性范围 分别精密称取各对照品适量，加甲醇配成含银杏内酯 B 3 981.4 $\mu g/mL$ 、槲皮素 1 037.5 $\mu g/mL$ 、白果内酯 4 125.0 $\mu g/mL$ 、银杏内酯 A 3 789.0 $\mu g/mL$ 、芦丁 4 843.8 $\mu g/mL$ 、银杏内酯 C 3 851.5 $\mu g/mL$ 、异鼠李素 1 042.0 $\mu g/mL$ 、槲皮素 5 382.8 $\mu g/mL$ 的对照品溶液，按 1:2.5:2:2:2.5:2:5:2 稀释混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液，以甲醇稀释成系列质量浓度的对照品溶液，分别进样，以峰面积对质量浓度进行线性回归，各成分线性方程和线性范围分别为槲皮素 $Y=0.002\ 363\ C-0.045\ 367$ ， $r=0.998\ 2$ ，线性范围 21.53~2 153 ng；异鼠李素 $Y=0.014\ 025\ C+0.037\ 368$ ， $r=0.997\ 3$ ，线性范围 4.168~1 042 ng；槲皮苷 $Y=0.005\ 651\ C+0.002\ 700$ ， $r=0.997\ 0$ ，线性范围 4.15~1 037 ng；芦丁 $Y=0.004\ 386\ C-0.009\ 801$ ， $r=0.997\ 8$ ，线性范围 19.375~1 937.5 ng；银杏内酯 A $Y=0.004\ 524\ C+0.014\ 901$ ， $r=0.997\ 3$ ，线性范围 15.156~1 515.6 ng；银杏内酯 B $Y=0.010\ 068\ C+0.023\ 561$ ， $r=0.998\ 3$ ，线性范围 15.937 5~1 593.75 ng；银杏内酯 C $Y=0.005\ 299\ C+0.029\ 427$ ， $r=0.998\ 9$ ，线性范围 15.406 0~1 540.6 ng；白果内酯 $Y=0.003\ 038\ C+0.001\ 46$ ， $r=0.998\ 8$ ，线性范围 16.5~1 650 ng。

2.2.4 方法专属性试验 按处方比例分别精密称取空白辅料和缓释微丸，加蒸馏水超声震荡 2 h，定容至 100 mL，过膜，分别得到空白辅料和缓释微丸贮备液，移取辅料贮备液、对照品贮备液和缓释微丸贮备液 50 μL 吹干，分别加入内标（格列本脲）溶液 100 μL 复溶，混匀离心，移取上清液进样，结果各成分分离完全，辅料无干扰。见图 1。

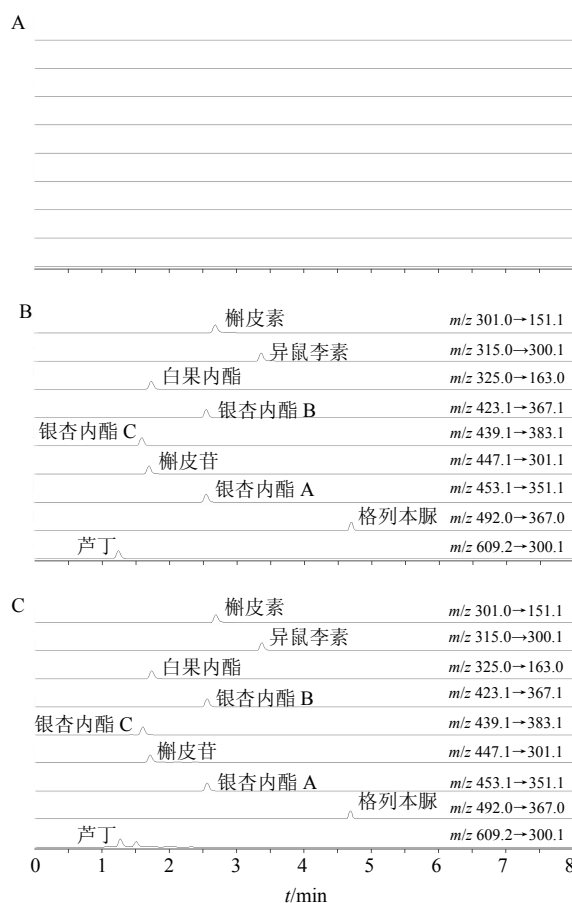


图1 空白溶液 (A)、混合对照品溶液 (B) 和样品溶液 (C) 的 HPLC-MS 图谱

Fig. 1 HPLC-MS chromatograms of blank solution (A), mixed standard solutions (B), and sample solution (C)

2.2.5 精密度试验 取混合对照品溶液，连续进样 6 次，测定峰面积，计算各成分的精密度，结果各成分的精密度 RSD 测定结果分别为槲皮素 4.8%、异鼠李素 3.6%、槲皮苷 3.3%、芦丁 2.1%、银杏内酯 A 1.6%、银杏内酯 B 0.9%、银杏内酯 C 1.3%、白果内酯 1.4%。

2.2.6 稳定性试验 取样品溶液，分别于 0、2、4、8、12 h 测定，结果表明样品中各类成分在 12 h 内基本稳定，其 RSD 分别为槲皮素 4.4%、异鼠李素 5.0%、槲皮苷 4.3%、芦丁 4.1%、银杏内酯 A 4.3%、

银杏内酯B 3.7%、银杏内酯C 3.9%、白果内酯3.5%。

2.2.7 重复性试验 精密移取 GBE 微丸溶出液 6 份,按“2.2.4”项方法处理样品,测定峰面积并计算各成分质量分数的 RSD,测定结果分别为槲皮素 1.5%、异鼠李素 1.0%、槲皮苷 1.3%、芦丁 1.4%、银杏内酯 A 1.8%、银杏内酯 B 2.0%、银杏内酯 C 1.7%、白果内酯 0.7%。

2.2.8 回收率试验 精密称定已测定的缓释微丸溶出液 6 份,分别精密加入混合对照品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,移取上清液 100 μL 吹干,加入 167 ng/mL 的内标(格列本脲)甲醇溶液 100 μL 复溶,混匀离心,移取上清液进行 HPLC/MS 测定并计算各成分的加样回收率。结果各成分的加样回收率分别为槲皮素(99.37±4.59)%;异鼠李素(100.34±3.21)%;槲皮苷(94.38±3.92)%;芦丁(91.56±4.70)%;银杏内酯 A(102.44±4.26)%;银杏内酯 B(97.11±2.88)%;银杏内酯 C(94.34±5.74)%;白果内酯(102.64±4.54)%。各成分的回收率 RSD 测定结果分别为槲皮素 4.8%、异鼠李素 4.3%、槲皮苷 3.3%、芦丁 1.2%、银杏内酯 A 4.7%、银杏内酯 B 2.9%、银杏内酯 C 3.1%、白果内酯 2.9%。

2.3 GBE 缓释微丸制备

2.3.1 速释丸芯的制备 采用挤出滚圆法,经过筛选和优化,确定速释丸芯的基本处方为 GBE 40%,微晶纤维素 58%,羧甲基淀粉钠 2%;通过考察挤出速度、滚圆速度、滚圆时间确定最后的制备工艺为挤出速度为 50 Hz,滚圆速度为 40 Hz,滚圆时间为 5 min,制得的速释丸芯重现性好,2 h 内基本释放完全。

2.3.2 缓释微丸的制备 采用尤特奇 RS/RL 30 D 作为包衣材料,流化床包衣法对速释丸芯进行包衣(制备工艺暂未发表),通过筛选和优化后的包衣工艺为鼓风机频率为 35 Hz,喷气压力为 20 kPa,蠕动泵转速为 0.4~1.5 r/min,熟化时间 24 h。处方工艺为 Eudragit RS 30 D 4.5 g、Eudragit RL 30 D 0.5 g、柠檬酸三乙酯(TEC) 0.3 g、硬脂酸甘油酯(GMS) 0.075 g、聚山梨酯 80 0.06 g;蒸馏水 10 mL。

2.3.3 微丸中总黄酮和各类成分的定量测定

(1)总黄酮定量测定:称取适量的 GBE 微丸(相当于含 GBE 0.013 g),置于 100 mL 量瓶中,平行 3 份,加甲醇超声震荡 2 h,使 GBE 充分溶出,甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 2 mL 置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,

摇匀,266 nm 下测定吸光度。结果总黄酮的量为每克微丸中含总黄酮(132.76±2.99) mg。

(2)各类成分定量测定:称取适量的 GBE 微丸(相当于含 GBE 0.013 g),置于 100 mL 量瓶中,平行 3 份,加甲醇超声震荡 2 h,甲醇定容至刻度,摇匀,3 000 r/min 离心 15 min,0.45 μm 微孔滤膜滤过,移取上清液 50 μL 吹干,加入 167.0 ng/mL 的内标(格列本脲)甲醇溶液 100 μL 复溶,混匀离心,移取上清液进行 HPLC-MS 测定。结果每克微丸中各类成分的量分别为槲皮素(22.41±1.28) mg、异鼠李素(4.56±0.15) mg、槲皮苷(1.72±0.07) mg、芦丁(3.05±0.24) mg、银杏内酯 A(10.60±0.36) mg、银杏内酯 B(8.20±0.17) mg、银杏内酯 C(4.90±0.24) mg、白果内酯(11.60±0.51) mg。

2.4 体外释放率测定方法

2.4.1 UV 法 精密称取一定质量的 GBE 微丸,置于溶出仪中,以 900 mL 蒸馏水为溶出介质,转速 100 r/min,温度 37 ℃,平行 3 份。在 1、2、4、6、8、10、12 h 取样 10 mL 于 0.45 μm 微孔滤膜滤过,并补加 10 mL 蒸馏水,取续滤液 2 mL 加甲醇定容至 5 mL,摇匀,于 266 nm 处测定其吸光度,计算释放率,计算公式如下^[11]:

$$Q_t = R_t + V_1/V_2 \cdot \sum_{n=1}^{t-1} R_n$$

Q_t 为 t 时间的累积释放率, R_t 为 t 时间测定的释放率, V_1 为取样体积, V_2 为释放介质体积

2.4.2 HPLC-MS 法 各时间点取样品 100 μL, N_2 吹干,加入 167.0 ng/mL 内标(格列本脲)甲醇溶液 100 μL 复溶,离心后上清液进样测定各成分的量,计算各成分的累积释放率。

2.5 f_2 相似因子法进行 GBE 缓释微丸体外释放率的相似性分析

2.5.1 GBE 微丸总类成分和各类成分的释放曲线以 HPLC-MS 检测得到的各类成分的体外释放曲线与 UV 检测的总黄酮的体外释放曲线对比图见图 2。

2.5.2 GBE 缓释微丸体外释放的统计分析方法 f_2 相似因子法^[3-4]计算相似度的基本方程为:

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

R_i 与 T_i 分别代表对照制剂与试验制剂在时间点 t 的累积释药百分率, n 为测试时间点个数, W_i 为权重因子

经计算,GBE 微丸中各类成分与总黄酮的 f_2 相似因子分析结果分别为黄酮类:槲皮素 69.92、异

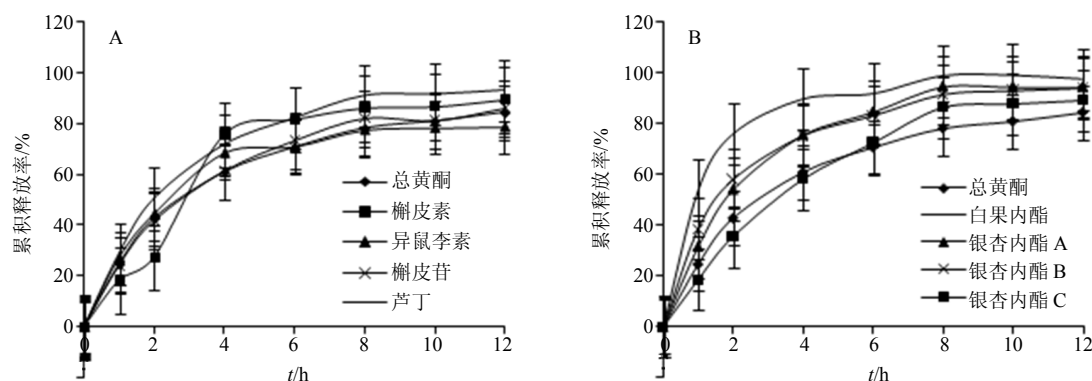


图2 总黄酮和黄酮类 (A) 及萜内酯 (B) 成分释放率比较

Fig. 2 Comparison chart of release curves of total flavonoids with different kinds of flavonoids (A) and terpenoid lactone (B)

鼠李素 87.48、槲皮苷 95.30、芦丁 70.68, 内酯类: 白果内酯 51.75、银杏内酯 A 65.56、银杏内酯 B 64.75、银杏内酯 C 81.03。

FDA 规定 f_2 在 50~100 认为两条曲线相似, f_2 越大表明体外释放率越接近。通过比较得出总黄酮和各成分体外释放曲线的相似因子均大于 50, 说明对于优化工艺的 GBE 微丸, 采用 UV 测定得到的总

黄酮体外释放曲线与 HPLC-MS 测定得到的各成分体外释放曲线具有较好的相关性。

2.6 GBE 微丸体外释药机制的研究

2.6.1 总黄酮和各类成分释药机制研究 对总黄酮和各成分的释药机制进行拟合, 结果表明 GBE 缓释微丸释药机制符合一级动力学和 Higuchi 动力学方程, 见表 1。

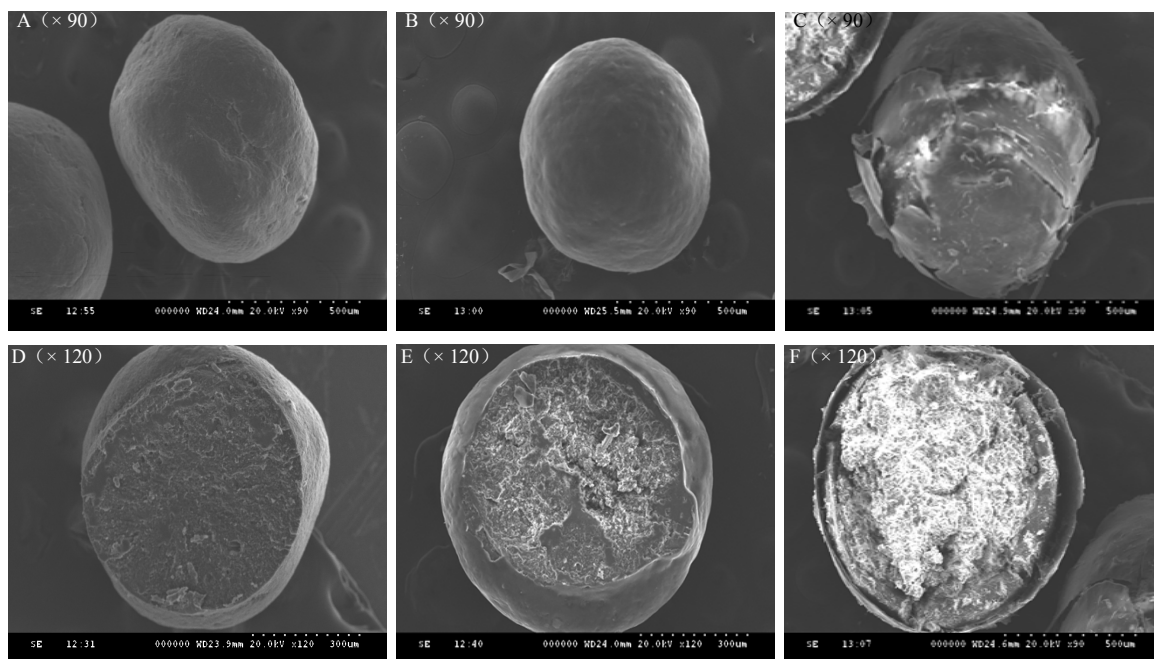
表1 GBE 缓释微丸总黄酮和各类成分释药动力学方程及相关系数

Table 1 Drug release kinetics equation and correlation coefficients of total flavonoid and various ingredients in GBE sustained-release pellets

类别	成分	数学模型	方程	类别	成分	数学模型	方程
总黄酮		零级动力学	$Q=13.097t-1.8946$, $r=0.9124$	内酯类	白果内酯	零级动力学	$Q=6.0091t+43.403$, $r=0.7682$
		一级动力学	$\ln(100-Q)=6.272t-0.986$, $r=0.9818$			一级动力学	$\ln(100-Q)=-0.3472t+4.0506$, $r=0.9227$
		Higuchi	$Q=3.8151t^{1/2}-0.0778$, $r=0.9868$			Higuchi	$Q=0.0315t^{1/2}-0.3458$, $r=0.9151$
黄酮类	槲皮素	零级动力学	$Q=7.4046t+18.261$, $r=0.8880$	银杏内酯 A		零级动力学	$Q=6.9993t+28.403$, $r=0.8774$
		一级动力学	$\ln(100-Q)=-0.1966t+4.4353$, $r=0.9471$			一级动力学	$\ln(100-Q)=-0.2587t+4.3695$, $r=0.9644$
		Higuchi	$Q=0.0307t^{1/2}+0.2548$, $r=0.9517$			Higuchi	$Q=0.0328t^{1/2}-0.1265$, $r=0.9716$
	异鼠李素	零级动力学	$Q=5.733t+24.877$, $r=0.8603$	银杏内酯 B		零级动力学	$Q=6.5478t+31.478$, $r=0.8631$
		一级动力学	$\ln(100-Q)=-0.1271t+4.3062$, $r=0.9255$			一级动力学	$\ln(100-Q)=-0.2353t+4.3125$, $r=0.9798$
		Higuchi	$Q=0.0389t^{1/2}-0.126$, $r=0.9621$			Higuchi	$Q=0.0344t^{1/2}-0.2533$, $r=0.9686$
	槲皮苷	零级动力学	$Q=6.5328t+21.063$, $r=0.9114$	银杏内酯 C		零级动力学	$Q=7.3525t+16.287$, $r=0.9391$
		一级动力学	$\ln(100-Q)=-0.162t+4.4228$, $r=0.9752$			一级动力学	$\ln(100-Q)=-0.1986t+4.5433$, $r=0.9839$
		Higuchi	$Q=0.037t^{1/2}+0.0378$, $r=0.9843$			Higuchi	$Q=0.0339t^{1/2}+0.1456$, $r=0.9865$
芦丁		零级动力学	$Q=13.097t-1.8946$, $r=0.8906$				
		一级动力学	$\ln(100-Q)=6.272t-0.986$, $r=0.9794$				
		Higuchi	$Q=3.8151t^{1/2}-0.0778$, $r=0.9771$				

2.6.2 释药机制解析 微丸包衣前、包衣后和溶出后扫描电镜图 (scanning electron microscopy, SEM) 见图 3。结果表明, 由图 3-A、B 可知包衣前微丸表面较为粗糙, 没有光泽, 包衣之后微丸表面光滑, 衣膜致密, 无裂痕; 由图 3-B、C 可以看出溶出后微丸表面有裂隙, 包衣膜破裂, 药物通过裂隙释放达到完全释放的效果; 由图 3-D、E 可以看出微丸表面的包衣层比较均匀; 由图 3-E、F 可以看出溶出后包衣层内的药物明显减少。

Eudragit RS/RL 是含有季胺基的阳离子聚合物, 季胺基的量决定衣膜在水中的溶胀性和渗透性。Eudragit RS 中季胺基的量较低, 渗透性和溶胀性较小, 其形成的衣膜可有效阻滞药物释放; Eudragit RL 中季胺基的量较高, 渗透性和溶胀性较大, 当与 Eudragit RS 配合使用时, 通过调整混合比例可灵活改变衣膜通透性, 从而调节包衣制剂的释药速率, 药物主要通过衣膜中季胺基形成的亲水孔道扩散释放^[12]。



A、B、C 分别为包衣前、后及溶出后微丸表面; D、E、F 分别为包衣前、后及溶出后微丸切面
SEM of the surface of uncoated pellets (A), coated pellets (B), and pellets after dissolution (C); SEM of the cross-section of uncoated pellets (D), coated pellets (E), and pellets after dissolution (F)

图 3 包衣前、后微丸 SEM 图

Fig. 3 SEM of uncoated and coated pellets

本实验制备的 GBE 缓释微丸是经过挤出滚圆法制备骨架速释丸芯, 再进行膜控包衣得到的缓释微丸, 药物的释放动力由衣膜扩散、水性通道和渗透压差共同提供。通过对 SEM 结果进行分析, 发现释放前缓释微丸衣膜完整, 药物先缓慢释放, 最后衣膜溶胀破裂, 内层药物随之由骨架结构疏散的部位缓缓释出, 骨架变得松弛, 并且由 GBE 中存在许多水溶性的成分, 因此产生许多水性通道, 由于药物通过水性孔道进行扩散为主的释放。

3 讨论

GBE 的组分群主要为总黄酮和萜类内酯, 总内酯目前的测定方法大多都是采用 HPLC 方法测定各内酯类成分然后进行加和, 没有较好的非常简便的

测定方法, 而 HPLC 运行和维护成本较高, 需大量消耗化学试剂^[13], 即使建立总内酯与各成分的相关性并不能减少后续的工作量, 因此本实验仅选择了总黄酮作为大类成分的测量指标。从总黄酮和各成分体外释放情况的 f_2 相似因子结果可得出: 尽管各类成分和总黄酮的释放均具有一定的相似度, 但内酯类成分除银杏内酯 C 以外, 其余与总黄酮的相似度普遍较黄酮类成分低, 这应该是由黄酮类成分比内酯类成分更接近总黄酮的理化性质决定的。

尽管 GBE 中各类成分中黄酮和内酯类成分的理化性质相差较大, 但从体外释药机制来看, 各成分和总黄酮的释药机制基本一致, 均能较好地符合一级释放动力学和 Higuchi 动力学方程。这可能是

由于本实验中制备缓释微丸的方式是采用膜包衣法,当包衣膜破裂后,各成分的释放主要取决于溶解度,由于溶出是在漏槽条件下进行,因此与总黄酮理化性质差别大的内酯类成分与总黄酮之间也会具有较好的相似度。内酯类成分白果内酯虽然极性较小,累积释放率却相对较大,且前期释放较快,可能与其在 GBE 中的量相对较少有关。

由于中药成分的复杂性和特殊性,目前中药缓释制剂的评价方法多样,如以释放度与指纹图谱相结合评价,以药效评价^[14],或采取“统计矩总量动力学”“总量释放动力学”等评价模式^[15],旨在突破单一成分逐个评价的束缚,使中药缓释制剂的释放评价更能吻合中医中药的整体观念,这些方法均具有较好的借鉴作用。但至今尚未见到引入 f_2 相似因子法研究多组分中药缓释制剂的大类成分和总类成分的体外释放相关性的方法。本实验考虑到后期与体内实验统一测定方法进行体内相关性研究,采用了 HPLC-MS 仪器测定,费用较高,因此仅对优化后的工艺进行了评价,但如果能够用于简化优化过程,更能体现该方法的值,并能较好地贯彻质量源于设计的理念。

参考文献

- [1] 王艳明,杜守颖,翟永松,等.自制益智方渗透泵片的体外释放度考察[J].中华中医药杂志,2012,27(6):1632-1635.
- [2] 岳鹏飞,郑琴,朱根华,等.基于物质粗糙集理论的中药复方缓释制剂“总量”释放动力学评价模式[J].药学学报,2010,45(11):1354-1360.
- [3] Rockville M D. Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of *in vitro/in vivo* correlation [S]. *FDA Guid Ind*, 1997, 423: 269-88.
- [4] Kassaye L, Genete G. Evaluation and comparison of *in-vitro* dissolution profiles for different brands of amoxicillin capsules [J]. *Afr Health Sci*, 2013, 13(2): 369-375.
- [5] Karalis V, Magklara E, Shah V P, *et al.* From drug delivery systems to drug release, dissolution, IVIVC, BCS, BDDCS, bioequivalence and biowaivers [J]. *Pharm Res*, 2010, 27(9): 2018-2029.
- [6] Shah V P. IVIVC for topically applied preparations-a critical evaluation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60(2): 309-314.
- [7] Saranadasa H, Krishnamoorthy K. A multivariate test for similarity of two dissolution profiles [J]. *J Biopharm Stat*, 2005, 15(2): 265-278.
- [8] Tang D Q, Yang D Z, Tang A B, *et al.* Simultaneous chemical fingerprint and quantitative analysis of *Ginkgo biloba* extract by HPLC-DAD [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(8): 3087-3095.
- [9] 聂黎行,戴忠,鲁静,等.银杏叶、银杏叶提取物及其制剂质量控制研究进展[J].中国药事,2011,25(2):171-174.
- [10] 王俊.银杏提取物缓释微丸的研制[D].上海:复旦大学,2005.
- [11] 刘清飞,周莉玲.水性包衣制备银杏总内酯缓释微丸及其质量评价[J].中国药理学杂志,2009,44(14):1074-1080.
- [12] 李云,王玉丽,杨美燕,等.功能性包衣辅料的混合使用在药物控释递送系统中的应用[J].中国新药杂志,2014,23(23):2729-2733.
- [13] 刘会,黄绳武,郭莹,等.HPLC法测定不同厂家银杏叶提取物中黄酮醇苷和萜类内酯含量[J].中华中医药杂志,2015,30(2):598-601.
- [14] 岳鹏飞,唐剑彬,郑琴,等.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[J].中草药,2010,41(6):885-888.
- [15] 李雅菁,石森林,吴素香,等.有毒中药丸剂小活络丸物质组释放动力学特征研究[J].中华中医药杂志,2014,29(11):3614-3618.