

基于细胞生物电传感效应的复方丹参片溶出动力学研究

马晓斐¹, 王建春², 潘金火^{1,2}, 谢辉¹, 陈军¹, 张倩¹, 韩星星¹, 严国俊^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 张家港市中医医院, 江苏省企业研究生工作站, 江苏 张家港 215600

摘要: 目的 建立复方丹参片的细胞生物电传感效应模型, 以此进行复方丹参片的溶出动力学研究。方法 以实时细胞电子分析技术 (real-time cell-based assay, RTCA) 为手段, 测定复方丹参片的体外溶出度, 建立溶出动力学模型, 并与紫外分光光度法进行比较验证。结果 CCK-8 实验和 RTCA 实验联合筛选出对复方丹参片有特定依赖性的细胞株, 建立基于 RTCA 技术的复方丹参片溶出动力学模型, 得到最佳拟合模型 Weibull 模型 $\ln\{\ln[1/(1-Q)]\} = 1.0714 \ln t - 3.7367$; 建立基于紫外分光光度法的复方丹参片溶出动力学模型, 得到最佳拟合模型 Weibull 模型 $\ln\{\ln[1/(1-Q)]\} = 1.0804 \ln t - 3.7234$; 两者的 Weibull 模型比较, RTCA 拟合的模型效果更佳。结论 RTCA 技术应用于中药复方固体制剂溶出动力学研究, 具有可行性, 并为中药及中药复方质量评价提供了新思路。

关键词: 复方丹参片; 体外溶出度; 实时细胞电子分析技术; 溶出动力学模型; CCK-8 实验; Weibull 模型

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)17-4131-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.018

Dissolution kinetics of Compound Danshen Tablets based on cell bioelectrical sensing effect

MA Xiao-fei¹, WANG Jian-chun², PAN Jin-huo^{1,2}, XIE Hui¹, CHEN Jun¹, ZHANG Qian¹, HAN Xing-xing¹, YAN Guo-jun¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Graduate Workstation of Enterprises in Jiangsu Province, Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang 215600, China

Abstract: Objective Establishing the model of cell bioelectrical sensing effect of Compound Danshen Tablets to study its dissolution kinetics. **Methods** By means of real-time cell-based assay, the *in vitro* dissolution of Compound Danshen Tablets can be investigated, and then the dissolution kinetics model can also be established. In addition, the result was compared and verified by UV-Vis. **Results** The cell line with specific dependence on Compound Danshen Tablets was screened by CCK-8 experiment and RTCA experiment. The dissolution kinetics model of Compound Danshen Tablets based on RTCA technology was established, and the best fitting model was obtained: Weibull model $\ln\{\ln[1/(1-Q)]\} = 1.0714 \ln t - 3.7367$; Establish a dissolution kinetic model of Compound Danshen Tablets based on UV spectrophotometry to obtain the best fitting model, Weibull model $\ln\{\ln[1/(1-Q)]\} = 1.0804 \ln t - 3.7234$; Comparing the two Weibull models, the RTCA fitted model worked better. **Conclusion** The application of RTCA in the dissolution kinetics of traditional Chinese medicine compound solid preparations is feasible, Which provides new ideas for traditional Chinese medicines and the quality evaluation of traditional Chinese medicine compounds.

Key words: Compound Danshen Tablets; *in vitro* dissolution; real-time cell-based assay; dissolution kinetics model; CCK-8 test; Weibull model

中国传统医药学十分重视人体气、血、津液的正常运行, 认为血瘀证是由气虚、气滞、火热、寒凝等引起, 血停滞不行而血行不畅。祛瘀活血法是

治疗血瘀证的基本方法, 在古代经典著作《伤寒论》《金匱要略》等中均有活血化瘀法的记载, 活血化瘀通过多种活血化瘀药物的综合, 具有化瘀行滞的作

收稿日期: 2019-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773910)

作者简介: 马晓斐, 硕士研究生, 研究方向为中药新型剂型及质量评价方法。E-mail: bigflyma@163.com

*通信作者 严国俊, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药新型剂型及质量评价方法。E-mail: yanguojun@njucm.edu.cn

用,通过平衡气血、调节阴阳与疏通活血等多重作用,帮助患者扶正祛邪,淤血消除,疼痛自然消失^[1]。现代临床研究^[2-5]显示,活血化瘀中药及其复方在改善血流动力学、抑制血栓形成、降低血压、抑制肿瘤疾病上有显著的临床疗效。随着活血化瘀中药及其复方作用机制不断深入研究,证明活血化瘀类中药对改善临床血瘀证具有积极意义,展现出良好的应用前景。复方丹参片作为最为常用的活血化瘀类中成药之一,由丹参、三七、冰片组成,对冠心病、心绞痛以及气滞血瘀所致的胸痹、胸闷等疾病^[6],有确切且显著的疗效,被广泛应用于临床。复方丹参片由于其药效物质成分较复杂,仍有许多疗效不明的未知成分^[7-10],目前所测的化学指标成分往往与其活血化瘀功效不是直接相关,传统的以单一化学指标成分为中心的质量评价方法已不适用,使其质量评价受到限制,亟需能够体现整体药效的新型质量评价与分析方法的建立。

本实验采用了一种新型的电子分析技术实时细胞电子分析技术(RTCA)。RTCA是一种基于阻抗的瞬态电池-电感应连续记录系统,通过监测细胞的动态变化过程(包括细胞增殖与分化、凋亡与衰老、黏附等多种细胞生理状态),转换成电信号细胞指数(cell index, CI),并形成时间剂量依赖性细胞反应曲线(TCRPs),间接反映药物对细胞作用(促进或抑制)的强弱,并可据此评价药物的生物活性^[11]。本实验将RTCA应用于复方丹参片血瘀功能相关的细胞生物活性的检测,尝试筛选出对药物反应灵敏、稳定且有特定浓度依赖性的细胞株,探索其用于质量评价的可能性。

1 材料

1.1 实验动物

健康成年SD大鼠,雄性,体质量200~240 g,购于南京青龙山动物养殖场,动物许可证号SYXK(苏)2017-0001。

1.2 主要试剂与仪器

CCK-8 溶液(日本同仁化学研究所);青链霉素(Gibco公司);胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技股份有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS, Gibco公司)、胰蛋白酶溶液(Gibco公司);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);RTCA板(杭州艾森生物有限公司);DMEM培养基(Corning公司);复方丹参片(广西药用植物园制药厂,批号171101-049);大鼠心肌细胞(H9C2细胞)、人脐静

脉内皮细胞(HUVEC细胞)购自中国科学院上海细胞库,大鼠胸主动脉平滑肌细胞(RA-VSMC细胞)来自大鼠原代分离。

RC-3 溶出度测试仪(天津新天光公司);UV-2401 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);RTCA 实时无标记细胞分析仪(杭州艾森生物有限公司);Sorvall ST16R 台式高速冷冻离心机、Sorvall ST16R 台式低速离心机(美国 Thermo 公司);3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);涡旋振荡仪(美国 Bio-Rad 公司);ECLIPSE Ti-S 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司);1300 SERIES A2 生物安全柜(美国 Thermo 公司)。

2 方法与结果

2.1 CCK-8 法筛选复方丹参片作用细胞的合适质量浓度

2.1.1 HUVEC 或 H9C2 细胞的培养 将复苏的 HUVEC 或 H9C2 细胞置于饱和湿度的细胞培养箱中,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基,在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养细胞至 85% 融合度时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,倒置显微镜中观察,取对数生长长期的细胞用于细胞实验。

2.1.2 RA-VSMC 细胞的制备及培养 取体质量约 220 g SD 大鼠,ip 10% 水合氯醛溶液(35 mL/kg),待大鼠麻醉后处死,迅速剪开胸腔并剪取大鼠胸主动脉组织,立即放入预冷的含 PBS 的 DMEM 培养基(含 1×10^5 U/L 青链霉素),并反复不断洗涤。用手术镊轻轻刮去血管外膜及血管内膜,将血管剪成 1 mm³ 左右的小块,分别均匀平铺于培养皿中,向培养皿中加入含 20% FBS 的培养液 3~5 mL,置于 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度细胞培养箱中培养,直至传代,取对数生长长期的细胞用于细胞实验。

2.1.3 复方丹参片供试样品的制备 取复方丹参片适量,置于研钵内捣碎,取 0.32 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶内,加入适量 pH 6.8 的 PBS 溶液,超声 30 min 溶解,再加入 pH 6.8 的 PBS 溶液定容至刻度,滤过不溶物质(辅料的残渣),4 ℃ 储存备用。取上述溶液稀释不同倍数配成 0、1.0、1.25、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、6.4 mg/mL 的药液用于 CCK-8 实验。

2.1.4 细胞种板及给药 取正常培养的处于对数生长长期的细胞,1 000 r/min 离心 5 min,计数板下计数,调整细胞密度为 2×10^4 个/mL,铺 96 孔板,每孔均

加入 100 μL 细胞悬液,贴壁培养过夜后,加入不同质量浓度(1.0、1.25、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、6.4 mg/mL)的复方丹参片供试样品,48 h 后每孔加入 10 μL 的 CCK-8 检测液,设置对照孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min,在波长 450 nm 测定吸光度(A)值,计算细胞存活率(细胞存活率= $A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$)。CCK-8 检测结果见图 1、2, HUVEC 和 H9C2 细胞在复方丹参片 1.0~6.4 mg/mL 反应灵敏,细胞存活率由高降到最低,可作为这 2 种细胞筛选的质量浓度范围,

因此选择 0、0.3、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6 mg/mL 这 8 个质量浓度。由图 2 可知, RA-VSMC 细胞在复方丹参片 1.0~2.5 mg/mL 时细胞存活率一直处于稳定水平,未显示差异,而在复方丹参片 4.0~6.4 mg/mL 时,细胞存活率下降幅度较大。为了更清楚地观察该细胞在复方丹参片不同质量浓度下的作用,需要拉大低质量浓度的间隔,缩小高质量浓度的间隔,因此选择 0、0.5、1、2、4、4.5、5、6 mg/mL 这 8 个质量浓度。

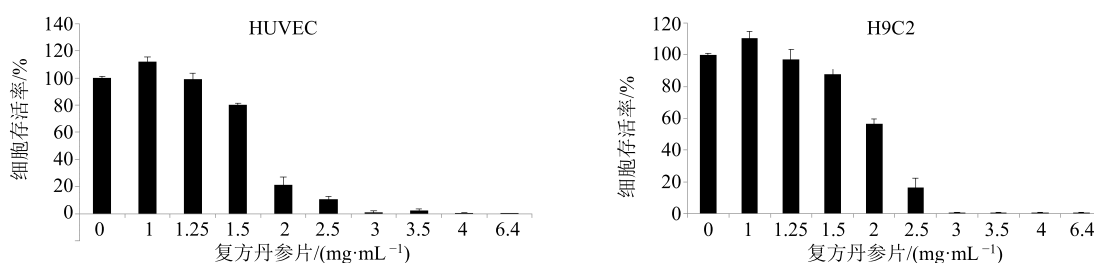


图 1 复方丹参片对 HUVEC 和 H9C2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of Compound Danshen Tablets on survival rate of HUVEC and H9C2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

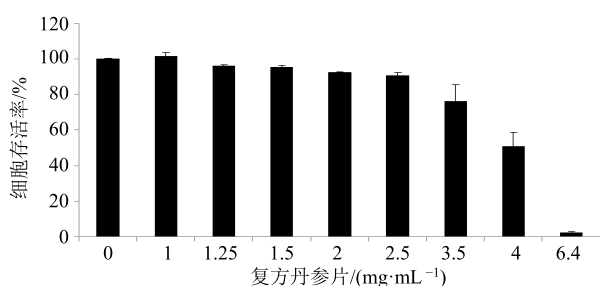


图 2 复方丹参片对 RA-VSMC 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of Compound Danshen Tablets on survival rate of RA-VSMC cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 RTCA 筛选复方丹参片的特定依赖性细胞株

2.2.1 RTCA 实验细胞培养 各细胞培养方法同“2.1.1”和“2.1.2”项。

2.2.2 复方丹参片 RTCA 实验样品的制备 取复方丹参片适量,置于研钵内捣碎,取 0.32 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶内,加入适量 pH 6.8 的 PBS 溶液,超声 30 min 溶解,再加入 pH 6.8 的 PBS 溶液定容至刻度,滤过不溶物质,4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。取上述溶液稀释不同倍数配成 0.3、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6 mg/mL 的药液用于 HUVEC 细胞和 H9C2 细胞实验,另取上述溶液稀释不同倍数配成 0.5、1.0、2.0、4.0、4.5、5.0、6.0 mg/mL 的药液用于 RA-VSMC 细胞实验。

2.2.3 RTCA 测定 依据复方丹参片的药理作用^[12-14],

本实验选取 HUVEC、H9C2、RA-VSMC 细胞,采用 RTCA 技术,测定 CI 值,测定各个样本的 TCRPs 曲线,通过直观判断和统计分析,考察细胞对药物效应反应的灵敏度、稳定性及浓度梯度依赖性。首先在细胞检测板中每个小孔加入 50 μL 生长介质,再加入密度为 2×10^4 个/mL 的特定细胞悬液 100 μL 。将此细胞检测板在室温下放置 30 min 后,放到培养箱中连续培养。24 h 后,当细胞数量稳定时,取 HUVEC 细胞和 H9C2 细胞的细胞检测板,除对照组外,向每孔中加入配好的复方丹参片供试药液 50 μL ,使小孔内的药液终质量浓度分别为 0.3、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6 mg/mL,每个质量浓度设 3 个复孔。另取 RA-VSMC 细胞的细胞检测板,除对照组外,向每个孔中分别加入终质量浓度 0.5、1.0、2.0、4.0、4.5、5.0、6.0 mg/mL 的复方丹参片供试样品 50 μL ,每个质量浓度设 3 个复孔。将加好样的检测板放入实时细胞电子分析仪中,检测 72 h,测出各药液作用于细胞后所产生的 TCRPs 曲线,筛选出对复方丹参片具有较好浓度依赖性响应的细胞株(即在一定时间内不同质量浓度药物的 TCRPs 曲线明显分开)。结果见图 3 和 4。

由图 3 可以看出, HUVEC 细胞对不同质量浓度的复方丹参片反应较灵敏,给药后 CI 值有明显波动。给药初期,低质量浓度样品组及对照组促进 CI

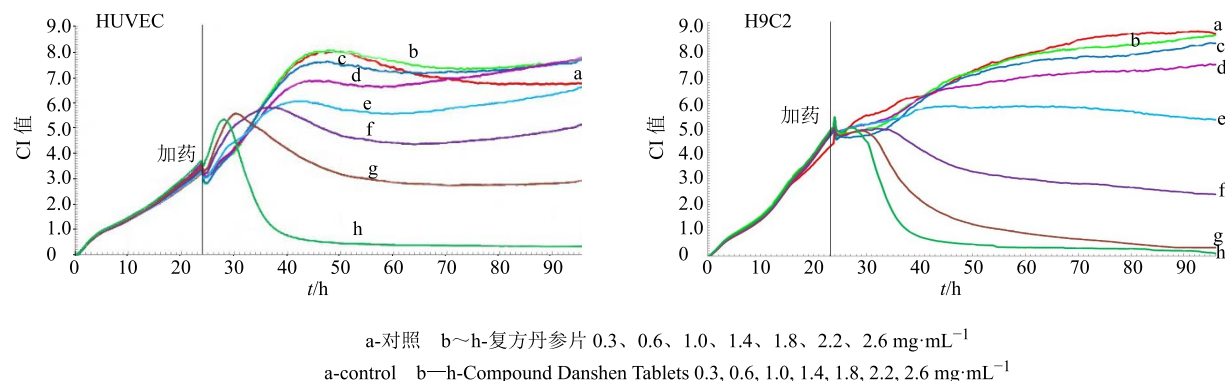
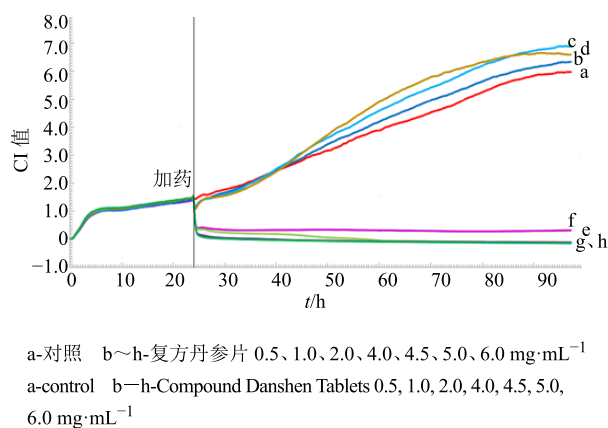


图3 复方丹参片作用于 HUVEC、H9C2 细胞的 TCRPs 曲线

Fig. 3 TCRPs Curve of Compound Danshen Tablets on HUVEC and H9C2 cells

图4 复方丹参片作用于 RA-VSMC 细胞的 TCRPs 曲线
Fig. 4 TCRPs curve of Compound Danshen Tablets on RA-VSMC cells

值的增加,在一段时间后趋向平稳。CI 值在高质量浓度样品组作用下先快速增加,随即大幅度减少,2.6 mg/mL 样品作用强烈,其 40 h 后 CI 值趋近于 0。给药后期,与对照组相比较,低质量浓度样品组对 CI 值起促进作用,高质量浓度样品组对 CI 值起抑制作用。但是,后期不同质量浓度样品所对应的曲线有重叠现象,难以区分,没有明显的质量浓度梯度依赖性,无法为后期实验做准备。

H9C2 细胞对不同质量浓度的样品反应也较灵敏。给药后 CI 值均出现明显波动。给药初期,低质量浓度样品组及对照组对 CI 值起促进作用,质量浓度越低,促进作用越强,在一段时间后趋向平稳。高质量浓度样品组对 CI 值起抑制作用,且质量浓度越高,其抑制作用越强。整体来看,不同质量浓度所对应的曲线呈现较好的分离,H9C2 对样品也有明显的质量浓度梯度依赖性,可以作为后期实验的细胞。从 CI 值变化来看,有效的质量浓度范围应是

0.3~1.8 mg/mL。

图 4 可见,给药初期,低质量浓度样品组及对照组对 RA-VSMC 细胞 CI 值起促进作用,但幅度较小。高质量浓度样品组对细胞的作用过于强烈,导致 CI 值快速趋于 0,细胞接近凋亡。并且,RA-VSMC 细胞没有明显的质量浓度梯度依赖性。

综上,选择 H9C2 细胞作为复方丹参片溶出度评价的细胞。

2.3 基于 RTCA 的复方丹参片溶出度的测定及动力学模型的建立

2.3.1 溶液的配制 (1) 空白人工胃液的配制:按照《中国药典》2015 年版四部,取稀盐酸 16.4 mL,加水约 800 mL 与胃蛋白酶 10 g,摇匀使其充分溶解后,加水稀释定容至 1 000 mL,即为人工胃液。空白人工胃液的配制:除不含胃蛋白酶外,其余与人工胃液配制相同^[15]。(2) 空白人工肠液的配制:按照《中国药典》2015 年版四部,取磷酸二氢钾 6.8 g,加水 500 mL 使其溶解,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8;另外称取 10 g 胰蛋白酶加适量水溶解,将 2 液混合后,加水定容至 1 000 mL,即为人工肠液。空白人工肠液的配制:除不含胰蛋白酶外,其余与人工肠液配制相同^[15]。(3) 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)的配制:按照《中国药典》2015 年版四部,取磷酸二氢钾 1.36 g,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 79 mL,用水稀释至 200 mL,即得。

2.3.2 复方丹参片溶出度供试样品的制备 (1) 不同溶出时间样品:取空白人工胃液 1 000 mL 置溶出杯中,加热至 37 °C,调节转篮转速为 100 r/min,将精密称定质量的复方丹参片分别放入转篮内,以空白人工胃液接触药片时为零时刻开始计时,然后按 10、20、30、40、50、60、70 min 定时取样,每

次取样 10 mL (立即补充同温同体积的空白人工胃液), 用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液调节至 pH 6.8 (模拟肠液环境), 取 10 mL 于蒸发皿水浴蒸干, 用 3 mL 细胞培养液溶解, 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。(2) 完全溶出样品: 另取复方丹参片 10 片, 精密称定, 计算出平均片质量 (W), 将称定的片剂研细, 再精密称取相当于 W 的量, 置 1 000 mL 量瓶中, 加入空白人工胃液至刻度, 混匀, 置于 $(37.0 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 水浴中 2 h 以上, 每隔 15 min 振摇 1 次。冷至室温, 取 10 mL, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液调节至 pH 6.8, 精确测量体积, 于蒸发皿水浴蒸干, 用 3 mL 细胞培养液溶解, 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

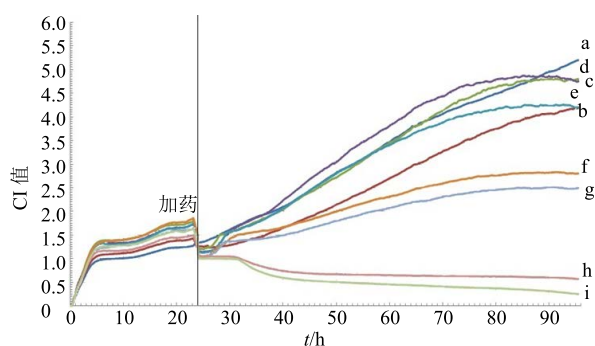
2.3.3 CI 测定 将 H9C2 细胞置于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中、在 37°C 下、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养。取对数生长期的细胞, 800 r/min 离心 5 min, 计数板下计数, 调整细胞浓度至 2×10^4 个/mL, RTCA 板每孔中加入 100 μL 细胞悬液, 贴壁培养过夜, 24 h 后, 换液, 按照要求加入“2.3.2”项下的复方丹参片溶出度供试样品溶液 200 μL , 继续检测 72 h, 得到样品溶液作用于 H9C2 细胞后所产生的 TCRPs 曲线, 结果见图 5。

由图 5 可知, 溶出时间短的样品对 CI 呈促进趋势, 溶出时间长的样品对 CI 呈抑制趋势。加药前

CI 上升, 加药后 1~2 h 内 CI 下降较快, 2 h 后溶出时间短的样品组 CI 呈稳定上升趋势, 溶出时间长的样品 CI 持续下降, 说明细胞在给药 1~2 h 内受药物影响最大, 且呈现一定的质量浓度梯度依赖性, 故选择图 5 所示 24.10~25.85 h 的数据 (表 1) 进行累积溶出率 (Q) 计算, 并绘制溶出曲线 (图 6)。

$$Q = (\text{CI}_t - \text{CI}_{\text{ck}}) / (\text{CI}_0 - \text{CI}_{\text{ck}})$$

CI_t 指各时间点溶出样品的 CI 值, CI_{ck} 指不加药物时的 CI 值, CI_0 指药物完全溶出时的 CI 值



a-对照 b-h-复方丹参片溶出 10、20、30、40、50、60、70 min 样品
i-复方丹参片完全溶出样品
a-control b-h-Compound Danshen Tablets samples of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 min dissolution i-Compound Danshen Tablets samples of complete dissolution

图 5 复方丹参片溶出度供试样品的 TCRPs 曲线
Fig. 5 TCRPs curve of Compound Danshen Tablets

表 1 复方丹参片不同溶出时间点样品的 CI 值
Table 1 CI value of Compound Danshen Tablets at different time points

样品	CI 值									$Q/\%$
	24.10 h	24.35 h	24.60 h	24.85 h	25.10 h	25.35 h	25.60 h	25.85 h	均值	
溶出 10 min	1.270 1	1.262 1	1.263 3	1.261 2	1.252 8	1.263 7	1.266 4	1.278 8	1.264 8	26.94
溶出 20 min	1.205 6	1.212 6	1.206 9	1.206 3	1.199 3	1.222 0	1.223 9	1.237 8	1.214 3	41.03
溶出 30 min	1.154 2	1.154 5	1.151 8	1.140 8	1.145 6	1.153 5	1.155 5	1.156 1	1.151 5	58.56
溶出 40 min	1.137 5	1.135 8	1.135 5	1.126 8	1.125 3	1.135 9	1.139 9	1.140 1	1.134 6	63.27
溶出 50 min	1.064 1	1.069 2	1.052 8	1.052 0	1.050 5	1.060 1	1.061 4	1.066 7	1.059 6	84.20
溶出 60 min	1.043 8	1.042 2	1.043 7	1.033 9	1.040 0	1.046 0	1.046 0	1.052 3	1.043 5	88.70
溶出 70 min	1.044 3	1.042 2	1.047 7	1.039 7	1.032 7	1.045 6	1.047 8	1.049 6	1.043 7	88.64
完全溶出	1.008 0	1.003 0	1.005 0	1.001 3	1.000 1	1.002 17	1.002 2	1.002 2	1.003 0	—
对照	1.343 3	1.345 1	1.349 4	1.354 4	1.360 3	1.367 6	1.379 4	1.391 0	1.361 3	—

2.3.4 复方丹参片的 CI 溶出动力学模型拟合 为更好地考察复方丹参片的溶出情况, 将利用一定的已知数学模型对该溶出过程进行拟合, 这也是释药机制研究的常用方法。目前的模型主要有零级模型、一级模型、Weibull 模型、Higuchi 模型、Ritger-Peppas 模型等。其中零级模型考察是否恒速释药, 一级模型考察是否非恒速释药。Weibull 模型应用广泛, 几乎适用

于所有溶出曲线。Higuchi 模型主要用于研究缓释制剂等, Ritger-Peppas 模型主要用于研究圆球型制剂的释放机制。考虑到本实验中复方丹参片的制剂特点, 选用零级模型、一级模型及 Weibull 模型进行拟合。结果见表 2。可知, 复方丹参片的累积溶出率与时间有很好的相关性, 且与上述模型具有较好的拟合度, 其中最佳拟合模型为 Weibull 模型。

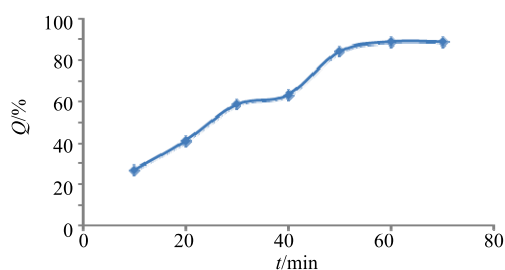


图 6 复方丹参片的累积溶出曲线

Fig. 6 Cumulative dissolution curve of Compound Danshen Tablets

表 2 RTCA 法溶出曲线拟合结果

Table 2 Dissolution curve fitting result by RTCA

模型	方程	r
零级模型	$Q=1.0932t+20.747$	0.9412
一级模型	$\ln(1-Q)=-0.0352t+0.1325$	0.9455
Weibull 模型	$\ln\{\ln[1/(1-Q)]\}=1.0714\ln t-3.7367$	0.9657

2.4 紫外分光光度法测定复方丹参片的溶出度及拟合模型的建立

2.4.1 线性关系考察 量取“2.3.2”项下复方丹参片完全溶出溶液适量,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液调节至 pH 6.8,滤过,将此时的滤液作为 100%溶出量,并用 pH 6.8 的空白人工肠液稀释成相对溶出量为 90%、70%、50%、30%、20%、10% 的浓度系列,以 pH 6.8 的人工肠液为空白,测定在 283 nm 条件下的 A 值。以相对溶出量为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y),计算回归方程^[16],回归方程为 $Y=0.0218X-0.0027$, $r=0.9994$ 。

2.4.2 稳定性试验 吸取适量相对溶出量为 50% 的溶液,分别在 0、1、2、4、6、12 h 测定 A 值,结果分别为 0.064、0.065、0.065、0.066、0.064、0.065, RSD 为 1.16%, $RSD < 3.0\%$,表明药液稳定性较好。

2.4.3 精密度试验 吸取适量复方丹参片完全溶出的药液,重复 6 次测定 A 值,测得 A 值分别为 0.127、0.128、0.128、0.127、0.128、0.128, RSD 为 0.4%, $RSD < 3.0\%$,表明该仪器精密度良好。

2.4.4 样品溶出度测定 取复方丹参片 10 片,精密称定,计算出平均片质量 (W),将称定的片剂研细,再精密称取相当于 W 的量,置 1 000 mL 量瓶中,加入空白人工胃液至刻度,混匀,置于 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 水浴中 2 h 以上,每隔 15 min 振摇 1 次。冷至室温,取 10 mL,用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液调节至 pH 6.8,取样,微孔滤膜滤过,取续滤液用紫外可见分光光

度计于 283 nm 处测定 A 值 ($A_{\text{总}}$)。

取空白人工胃液 1 000 mL 置溶出杯中,加热至 37°C ,调节转篮转速为 100 r/min,将精密称定质量的复方丹参片 1 片 (W_1) 放入转篮内,以空白人工胃液接触药片时为零时刻开始计时,然后按 10、20、30、40、50、60、70、80 min 定时取样 10 mL (立即补充同温同体积的空白人工胃液),用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液调节至 pH 6.8,取样,微孔滤膜滤过,取续滤液用紫外可见分光光度计于 283 nm 处测定 A 值 (A_i)。按公式计算 Q 。绘制溶出度曲线 (图 7)。

$$Q = WA_i / W_1 A_{\text{总}}$$

2.4.5 复方丹参片的紫外分光光度法溶出动力学模型拟合 以零级模型、一级模型、Weibull 模型对溶出过程进行拟合,结果见表 3。复方丹参片的累积溶出率与时间有较好的相关性,与 3 种模型有较好的拟合度,其中与 Weibull 模型的拟合度最佳。

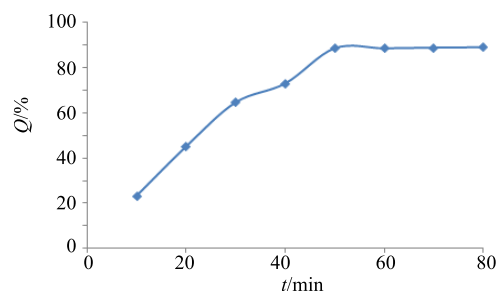


图 7 复方丹参片的累积溶出曲线

Fig. 7 Cumulative dissolution curve of Compound Danshen Tablets

表 3 紫外分光光度法溶出曲线拟合结果

Table 3 Dissolution curve fitting result by UV spectrophotometry

模型	方程	r
零级模型	$Q=0.9095t+29.116$	0.8229
一级模型	$\ln(1-Q)=-0.0305t-0.1145$	0.8891
Weibull 模型	$\ln\{\ln[1/(1-Q)]\}=1.0804\ln t-3.7234$	0.9644

2.5 2 种方法比较

综合 RTCA 和紫外分光光度法进行复方丹参片的溶出动力学研究可以发现,2 种方法有一定的一致性和差异性。从 2 者的溶出曲线上来看,药液均在 50 min 以后达到稳定状态,溶出 50% 所需时间 (T_{50}) 相近,均与 Weibull 模型的拟合度最佳。通过比较两者 Weibull 模型,RTCA 和紫外分光光度法有一定的相关性,但是 RTCA 拟合结果的 r 更高些,可见 RTCA 方法的优越性,表明 RTCA 有作为溶出

度研究新方法的可能性。

3 讨论

中药固体制剂大多为中药复方制剂，由于中药本身的复杂性，发挥疗效可能不是某种单一成分，而是多种成分整合后的总体效果。中药复方制剂中有效成分的量效关系尚不明确，若是单单套用化学药的质量控制模式，仅对一个或几个单体指标成分进行研究，进行体外溶出机制的研究，并不能获得中药固体制剂质量评价的完整参数，也不能真实反映中药复方制剂的整体效应特征^[17]。而溶出度的测定对于中药制剂的质量评价尤为重要，但只用单体成分的溶出曲线来衡量固体制剂的质量仍然可能存在偏差，甚至与药物的真正疗效相差较远。

中药复方制剂作为复杂的多成分化合物集合体，将此集合体作用于体外细胞群落，经 RTCA 系统实时监控，利用活细胞电阻抗生物传感属性，将药物作用于细胞的效应转换成可定量的电信号，并形成 TCRPs 曲线，由此构建的模型可以成为目前已知从细胞水平模拟体内的药物作用机制与药物代谢变化过程最接近于体内的离体动力学模型^[18]。此模型以 CI 为指标，在不以化学成分为目标的基础上，从整体出发，对中药复方制剂进行体外药效的评价。相较于传统的检测细胞的生长率的方法：荧光细胞活性分析方法和人工计算每个孔的实际细胞数量，RTCA 技术具有动态、实时、高效等优点，能够更实时、真实地反映药物作用于细胞的动态过程，从而更有利于将药物的体外细胞效应和体内生物效应建立相关性。当然，本实验中还存在一定的不足之处，但 RTCA 技术仍突破了中药复方研究唯成分论的局限，从整体观念出发，为中药及中药复方质量评价提供了一个很有前景与希望的方法。

参考文献

[1] 杨程. 活血化癥法在中医内科临床中的应用 [J]. 黑龙江医药科学, 2018, 41(3): 39-40.
[2] 王丽霞. 活血化癥药物在心脑血管疾病治疗中的应用效果观察 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(19): 155.
[3] 唐振豪, 兰聪颖, 林丽珠. 从肿瘤微环境正常化探讨活血化癥法及除痰散结法在肿瘤治疗中的机制 [J]. 广州

中医药大学学报, 2019, 36(7): 1091-1098.
[4] 周满霞, 邓可培, 赵向丽. 活血化癥汤治疗急性缺血性脑卒中的效果及对患者血液流变学的影响 [J]. 海峡药学, 2019, 31(6): 217-218.
[5] 刘颖, 张楠, 艾民. 活血化癥汤治疗高血压性脑出血的临床疗效 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(11): 2605-2607.
[6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[7] 吴春艳, 耿姝, 伊晓娇, 等. 中药质量分析与评价的研究进展 [J]. 理化检验: 化学分册, 2015, 51(7): 1035-1042.
[8] 肖小河, 金城, 赵中振, 等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1377-1381.
[9] Xie J, Yang Z, Zhou C, *et al.* Nanotechnology for the delivery of phytochemicals in cancer therapy [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(4): 343-353.
[10] 李发美, 熊志立, 鹿秀梅, 等. 中药质量控制和评价模式的发展及系统生物学对其的作用 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2009, 11(1): 120-126.
[11] 雷飞飞, 王建春, 张咏梅, 等. 实时细胞电子分析应用于复方丹参滴丸质量评价的初步研究 [J]. 中成药, 2015, 37(5): 1119-1123.
[12] 任宏强, 赵利, 王忠, 等. 复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关蛋白的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(12): 1084-1088.
[13] 王东霞, 王孝铭, 许晶兰. 复方丹参滴丸对血管内皮细胞功能及形态保护作用的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(5): 933-937.
[14] 马增春, 高月, 谭洪玲, 等. 复方丹参方对 TNF- α 刺激血管平滑肌细胞影响的蛋白质组学研究 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(1): 49-55.
[15] 张利文, 董德明, 郭志勇, 等. 荧光分光光度法测定水样中氧氟沙星的含量 [J]. 科学技术与工程, 2016, 16(18): 111-115.
[16] 张丽丽, 解红梅. 丹参片溶出度测定研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(10): 191.
[17] Yan G J, Wang X B, Wu X H, *et al.* In-silico ADME studies for new drug discovery: From chemical compounds to Chinese herbal medicines [J]. *Curr Drug Metabol*, 2017, 18(6): 535-539.
[18] 严国俊, 裴燕芳, 朱贞宏, 等. 实时细胞电子分析技术的应用研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(3): 169-173.