

基于壳聚糖的丹参酮 II_A 固体分散体的研究

刘其媛^{1,2}, 张振海¹, 蒋艳荣¹, 金鑫¹, 陈小云¹, 贾晓斌^{1*}

1. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 将壳聚糖(CS)应用于丹参酮 II_A (TS II_A) 固体分散体的制备, 考察并比较以不同相对分子质量(M_w)的 CS 为载体的 TS II_A 固体分散体的溶出度。方法 以 CS 为载体, 采用溶剂法制备 TS II_A 固体分散体, 对不同 M_w 的 CS 以及药物与载体的不同比例所制备固体分散体的溶出行为进行了比较研究, 并进行物相分析。结果 TS II_A-CS(M_w 3 000~5 000) 按 1:9 比例制备的固体分散体的体外溶出效果最好, 60 min 时药物的体外累积溶出率达到 90% 以上; 经差示扫描量热(DSC) 和扫描电镜(SEM) 分析, 固体分散体中药物以非晶形式存在于载体中。结论 以 CS 为载体制备的 TS II_A 固体分散体能显著改善 TS II_A 的溶出; CS 作为 TS II_A 一种新型的固体分散体载体, 具有实际应用价值。

关键词: 丹参酮 II_A; 壳聚糖; 固体分散体; 溶出度; 溶剂法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)04-0000-00

Studies on chitosan applicatied in solid dispersion of tanshinone II_A

LIU Qi-yuan^{1,2}, ZHANG Zhen-hai¹, JIANG Yan-rong¹, JIN Xin¹, CHEN Xiao-yun¹, JIA Xiao-bin¹

1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Jiangsu Province, Nanjing 210028

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province, Nanjing 210046

Abstract: Objective To prepare and characterize the solid dispersions of tanshinone II_A (TS II_A), using chitosan (CS) with the intention of improving drug dissolution. **Methods** TS II_A solid dispersion was prepared by the solvent method with CS as carriers. Its physical characteristics and *in vitro* dissolution were further evaluated. **Results** The ideal TS II_A solid dispersion was prepared under the condition as follows, the weight ratio of TS II_A and CS was 1:9. The differential scanning calorimetry (DSC) and Scanning electron microscopy (SEM) demonstrated that TS II_A existed in carriers as amorphous state. The *in vitro* dissolution of TS II_A solid dispersion is up to 90% at 60 min. **Conclusion** The results indicated that *in vitro* dissolution of TS II_A was improved greatly by the solid dispersion with CS as its carriers. The solid dispersion was a stabilizing system which having actual applied value. As a new type of solid dispersion carrier of TS II_A, CS has its practical value.

Key words: tanshinone IIA (TS II_A); chitosan (CS); solid dispersion; dissolution; solvent method

丹参酮 II_A (TS II_A) 是从中药丹参根茎提取的有效成分, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等广泛的药理活性^[1-3]。由于 TS II_A 难溶于水, 口服溶出速度慢, 导致其口服生物利用度低 (仅为 2%~3%)^[4]。

应用固体分散体技术可改善难溶性药物的溶解性能, 提高溶出速率^[5-8], 从而提高口服生物利用度。目前, 大多数固体分散体以 PVP、聚乙二醇或泊洛沙姆等作为载体, 然而药物在固体分散体中处于一种热力学不稳定状态, 经一段时间放置后, 会出现

老化、结晶析出、药物溶出度下降等现象; 同时, 由于这些载体吸湿性和黏性较大, 不利于制剂加工及产业化的实施。壳聚糖(CS)是一种天然无毒、可降解的多糖, 具有生物相容性好、增强肠上皮细胞转运通透性的优点^[9-10]。本实验对以 CS 为载体的 TS II_A 固体分散体进行体外研究。

1 仪器与材料

TS II_A 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110766-200518); TS II_A (南京泽郎医药科技有

收稿日期: 2012-08-23

基金项目: 江苏省中医药领军人才项目 (2006); “国家中医药管理局中药口服制剂释药系统重点实验室” 开放基金课题 (2011NDDCM01002)

作者简介: 刘其媛, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂剂型研究。Tel: 15850530729 E-mail: lqiyuan670@163.com

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

限公司, 批号 ZL201106010B, 质量分数 >98%); 相对分子质量 (M_w) 分别为 3 000~5 000、30 000、50 000、100 000 的 CS (浙江金壳生物化学有限公司, 批号分别为 D120221022、D120302040、D120302041、D120302042); 柠檬酸 (南京化学试剂有限公司, 批号 070160038); 泊洛沙姆 188 (F68, 巴斯夫上海有限公司, 批号 WP0D644F, 质量分数 99%)。ZRS—8G 型智能溶出试验仪 (天津大学无线电厂); DSC204 差热分析仪 (德国 Netzsch 公司); 高效液相色谱仪 (Waters, 600 型泵, 717 自动进样器, 2996DAD 紫外检测器, Empower 数据处理系统); 数显气浴恒温振荡器 (金坛市双捷实验仪器厂); RE—52A 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); METTLERAL204 十万分之一天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 甲醇为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品制备

2.1.1 CS 的预处理 分别称取各 M_w 的 CS 溶于水, 加柠檬酸调 pH 6.0, 减压蒸干溶剂, 真空干燥, 研细过 80 目筛, 备用。

2.1.2 以不同 M_w 的 CS 为分散介质的固体分散体的制备 称取 TS II_A 原料药, 加 95%乙醇溶解。按药物与载体质量比 1:3 分别准确称取各 M_w 的 CS, 加 95%乙醇分散或溶解。药物与载体的乙醇溶液充分混匀。40 °C 减压下, 旋转蒸发除去溶剂, 真空干燥, 研细过 80 目筛, 得 4 种不同 M_w 的 CS 为载体的 TS II_A 固体分散体, 备用。

2.1.3 不同比例 TS II_A-CS 固体分散体的制备 将 TS II_A 原料药与 M_w 3 000~5 000 的 CS 分别以 1:3、1:6、1:9、1:12 的质量比, 按照“2.1.2”项下所述操作分别制备 4 种 TS II_A-CS 固体分散体, 备用。同法制备 TS II_A-F68 (1:9) 固体分散体。

2.1.4 物理混合物的制备 称取 TS II_A 原料药适量, 按照 1:9 的质量比称取 CS (M_w 3 000~5 000), 置于研钵中研细, 混匀, 过 80 目筛, 置干燥器内保存备用。

2.2 体外溶出试验

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Heder ODS-2 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇-水 (86:14); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 270 nm; 进样量 10 μL。

2.2.2 标准曲线的绘制 取 TS II_A 对照品 5.00 mg,

精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 精密吸取 2 mL 置于 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 得 8.00 μg/mL 的 TS II_A 对照品储备液。分别精密吸取储备液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液进样, 测定峰面积 (A), 将质量浓度 (C) 与 A 值进行线性回归, 得回归方程 $A=92.764 C+0.719 3$, $r=0.999 7$, 线性范围 0.800~6.400 μg/mL。

2.2.3 回收率试验 分别精密量取“2.2.2”项下的储备液 1.0、6.0、8.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 按处方比例加入载体材料各 3 份, 加甲醇稀释至刻度, 超声溶解, 滤过, 取续滤液作为回收率试验样品溶液, 按以上方法测定, 以 M_w 3 000~5 000 的 CS 为载体时, 平均回收率为 100.6%, RSD 为 0.74% ($n=9$); 以 M_w 30 000 的 CS 为载体时, 平均回收率为 99.4%, RSD 为 0.91% ($n=9$); 以 M_w 50 000 的 CS 为载体时, 平均回收率为 100.9%, RSD 为 0.67% ($n=9$); 以 M_w 100 000 的 CS 为载体时, 平均回收率为 99.2%, RSD 为 0.92% ($n=9$); 以 F68 为载体时, 平均回收率为 100.3%, RSD 为 0.85% ($n=9$)。

2.2.4 药物的溶出度测定 精密称取 TS II_A 原料药和各种固体分散体 (相当于含 TS II_A 5 mg) 分别装于胶囊中, 按溶出度测定方法 (《中国药典》2010 年版二部附录 XC 桨法), 以 0.5%十二烷基磺酸钠 (SDS) 溶液 900 mL 为溶出介质, 转速 50 r/min, 温度 (37±0.5 °C), 分别于 15、30、45、60、90、120 min 取样 5 mL (同时补加同温度等体积溶出介质), 高速离心后取上清液进行 HPLC 测定, 测定结果代入回归方程计算质量浓度, 并换算成累积溶出率, 结果见图 1、2。

图 1 结果表明几种不同 M_w 的 CS 作为 TS II_A

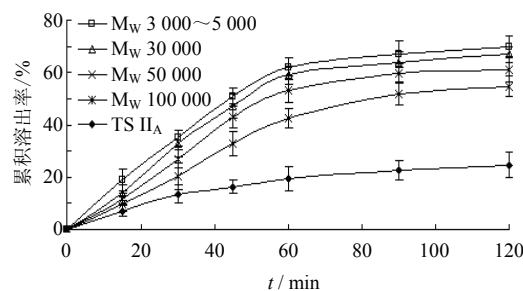


图 1 不同 M_w 的 CS 对 TS II_A 溶出的影响 (TS II_A-CS 1:3, $n=6$)

Fig. 1 Dissolution profiles of TS II_A from solid dispersions prepared using different M_w CS ($n=6$)

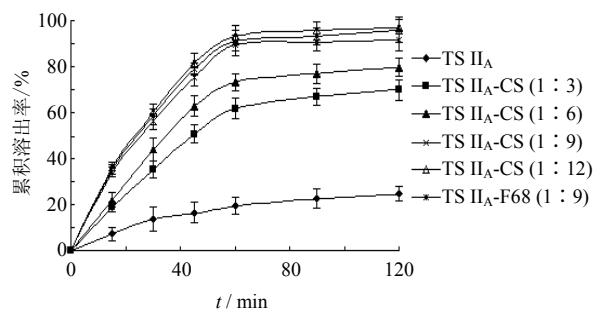


图2 CS (M_w 3 000~5 000) 不同比例对 TS II_A 溶出的影响 ($n=6$)

Fig. 2 Different proportion of CS (M_w 3 000—5 000) on TS II_A dissolution effect ($n=6$)

的载体材料, 均可明显提高 TS II_A 的溶出速率和程度。其中, M_w 为 3 000~5 000 的 CS 促进 TS II_A 溶出的效果较其他几种 M_w 的 CS 更为显著, 故选择 M_w 3 000~5 000 的 CS 作为 TS II_A 固体分散体的载体。从图中可以看出, 随着 CS M_w 的增大, 其促进溶出的效果相对减弱, 可能是由于小 M_w 的 CS 水溶性相对较好, 从而更好地促进药物的溶出。图 2 结果表明随着载体用量的增加, TS II_A 溶出度增大, 当 TS II_A 与 CS 比例大于 1 : 9 时, 随着载体比例增大, TS II_A 溶出度增加并不显著, 故选择药物与载体的比例为 1 : 9。该条件下 TS II_A 60 min 的溶出度高于 90%, 且高于同比例的 TS II_A 与 F68 形成的固体分散体。

2.3 溶解度

分别取过量的 TS II_A-CS (M_w 3 000~5 000) (1 : 9) 固体分散体 3 份于 10 mL 具塞刻度试管中, 加 10 mL 蒸馏水, 置于 37 °C 恒温振荡器中避光振荡 24 h, 达到平衡后取出, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后进样, 按“2.2.1”项色谱条件测定 TS II_A 的量, 取平均值。

TS II_A 原料药的溶解度仅为 16.5 ng/mL, 与文献报道一致^[11]; TS II_A-CS (M_w 3 000~5 000) (1 : 9) 固体分散体的 TS II_A 溶解度为 41.3 ng/mL, 固体分散体使原料药的溶解度提高至原来的 2.5 倍。

2.4 差示量热扫描分析 (differential scanning calorimetry, DSC)

测试条件: 铝坩埚为参比; 气氛为氮气; 升温速率 10.0 °C/min; 升温范围 25~400 °C。分别对 TS II_A 原料药、CS、TS II_A/CS 物理混合物、TS II_A-CS 固体分散体进行 DSC 分析, 结果见图 3。DSC 曲线图显示, TS II_A 原料药在 205 °C 左右有一明显的吸热峰; CS 在 80 °C 左右有一较宽的吸热峰, 与文献

报道一致^[12]; TS II_A-CS 的物理混合物有两个吸热峰, 表明该混合物是原料药和载体的简单混合; 固体分散体中药物的吸热峰消失, 而在 80 °C 只有载体的吸热峰, 提示药物与载体形成了固体分散体, 药物以非晶形态分散于载体中。

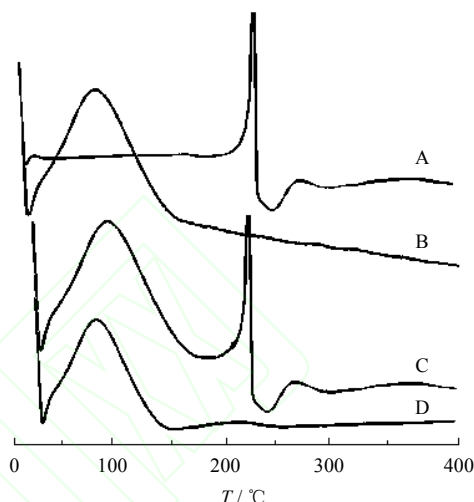


图3 TS II_A 原料药 (A)、CS (B)、TS II_A/CS (1 : 9) 物理混合物 (C)、TS II_A-CS (1 : 9) 固体分散体 (D) DSC 图

Fig. 3 DSC curves of TS II_A (A), CS (B), physical mixture (C) and solid dispersions at TS II_A/CS (1 : 9) (D)

2.5 扫描电镜分析 (Scanning electron microscopy, SEM)

分别对 TS II_A 原料药和 TS II_A-CS 固体分散体进行 SEM 分析, 结果见图 4。SEM 图显示, TS II_A 为块状晶体, 而在固体分散体中没有观察到游离的药物晶体, 提示 TS II_A 以非晶状态分散于载体材料中, 形成了固体分散体。

3 讨论

以水溶性 CS 为载体, 将 TS II_A 制成固体分散体提高了其溶出速率。在固体分散体中, 随着载体比例的增加, TS II_A 溶出速率加快。这是由于 TS II_A 在载体 CS 中形成非结晶的无定形物, 载体用量的

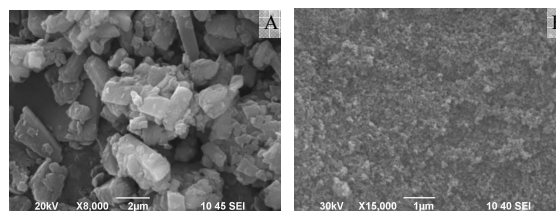


图4 TS II_A 原料药 (A)、TS II_A-CS 固体分散体 (B) 的 SEM 图

Fig. 4 SEM photos of TS II_A (A) and solid dispersions at TS II_A-CS (1 : 9) (B)

增大提高了 TS II_A 在载体中的分散程度, 使其溶解度和溶出速率增大。

由于 TS II_A 在酸性条件下较为稳定^[13], 因此本实验中通过柠檬酸预处理的方法调节体系的 pH 至弱酸性。与原料药相比, 固体分散体中 TS II_A 的溶解度虽有增加, 但幅度不大。可知药物溶出度显著增加并非主要因其溶解度增大, 而是因为固体分散体使 TS II_A 分散度提高, 粒度减小, 比表面积增加, 从而促进了 TS II_A 的溶出。

以 CS 为 TS II_A 固体分散体的载体, 明显改善了药物的溶出。CS 作为一种天然无毒的多糖, 与通常使用的载体相比, 具有生物相容性好、增强肠上皮细胞转运通透性、粘性小等优点, 从而推测其更有利于保持产品的质量稳定和提高生物利用度, 也更有助于制剂加工和实现产业化。本文为 TS II_A 口服给药制剂的研究与发展提供了参考。

参考文献

- [1] Chen Y L, Wu X M, Yu S S, *et al.* Neuroprotective capabilities of tanshinone II_A against cerebral ischemia/reperfusion injury via anti-apoptotic pathway in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(2): 164-170.
- [2] Lu Q, Zhang P R, Zhang X, *et al.* Experimental study of the anti-cancer mechanism of tanshinone II_A against human breast cancer [J]. *Int J Mol Med*, 2009, 24(6): 773-780.
- [3] Shang Q H, Xu H, Huang L. Tanshinone II_A: A promising natural cardioprotective agent [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, doi: 10.1155/2012/716459, 2012-02-06.
- [4] Yu X Y, Lin S G, Zhou Z W, *et al.* Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of tanshinone II_A, a major active ingredient in the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8(4): 325-340.
- [5] 韩立炜, 张贵英, 龚卫红, 等. 葛根素聚维酮 K30 固体分散体的制备及体外评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20): 1-4.
- [6] 熊秀莉, 郑 颖, 王一涛. 辅料联用固体分散技术在丹参提取物多组分释放中的研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 50-55.
- [7] Li J, Liu P, Liu J P, *et al.* Novel tanshinone II_A ternary solid dispersion pellets prepared by a single-step technique: *In vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80(2): 426-432.
- [8] 韩 刚, 阎林奇, 索 炜, 等. 大黄素固体分散体的制备及其溶出度测定 [J]. *中草药*, 2011, 42(3): 487-490.
- [9] Canali M M, Pedrotti L P, Balsinde J, *et al.* Chitosan enhances transcellular permeability in human and rat intestine epithelium [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80(2): 418-425.
- [10] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(4): 290-295.
- [11] 袁菊勇, 毛声俊, 沈千万, 等. 载体联用固体分散技术对丹参酮 II_A 体外溶出的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(6): 685-689.
- [12] 付 宁, 杨俊玲, 倪 磊. 壳聚糖制备条件的研究和结构表征 [J]. *天津工业大学学报*, 2009, 28(2): 63-66.
- [13] 王秀丽, 刘永刚, 孙 茂, 等. 丹参中丹参酮 II_A 的提取分离研究 [J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(1): 34-38.