

复方丹参 pH 依赖型延迟释药微丸在家犬体内的药效动力学

杨冬丽¹, 于叶玲¹, 唐 星^{1*}, 万慧杰¹, 宋洪涛²

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 南京军区福州总医院 药剂科, 福建 福州 350025)

摘要: 目的 制备复方丹参 pH 依赖型延迟释药微丸填充胶囊并进行家犬体内药效动力学研究。方法 分别用 HPMC, Eudragit L-30D-55, Eudragit L100/S100 (1:6) 包衣制备 pH 依赖型延迟释药微丸, 测定体外释放曲线, 并用血清药理学方法进行家犬体内的药效动力学研究。结果 制备了复方丹参 pH 依赖型延迟释药微丸, 体外溶出曲线呈 pH 依赖特征。单剂量给药后自制速释片 R 的药效动力学参数 T_{max} 为 0.58 h, E_{max} 为 34.63%, 延迟释药胶囊 T1 和 T2 的 T_{max} 分别延长至 2.42 和 3.17 h, E_{max} 分别降低至 13.57% 和 14.52%, 相对生物利用度分别为 99.3% 和 133.6%。多剂量给药后自制速释片 R 波动度 DF 7.32, 延迟释药胶囊 T1 和 T2 的波动度 DF 3.40 和 3.03。结论 复方丹参 pH 依赖型延迟释药胶囊体外释放具有 pH 依赖特征, 体内具有明显的延迟释药作用, 多剂量达到稳态时, 药效动力学波动系数低于普通片。

关键词: 复方丹参; pH 依赖型延迟释药微丸; 血清药理学; 药效动力学

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)12 - 1075 - 05

Pharmacodynamics of compound danshen pH-dependent delayed release pellets in dogs

YANG Dong-li¹, YU Ye-ling¹, TANG Xing^{1*}, WAN Hui-jie¹, SONG Hong-tao²

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

Abstract: **Aim** To prepare the compound danshen pH-dependent delayed release pellets and filled them in capsules and then study their pharmacodynamics. **Methods** The pH-dependent delayed release pellets were prepared by coating with HPMC, Eudragit L-30D-55 and Eudragit L100-Eudragit S100 (1:6), separately, and mixed in proper proportion to prepare the two pH-dependent delayed release systems T1 and T2. The release of delayed release pellets was determined according to the method of China Pharmacopoeia (2000) in the simulated gastrointestinal pH conditions. The pharmacodynamic parameters were evaluated by serum pharmacology method. **Results** The compound danshen pH-dependent delayed release pellets were prepared with the characteristics of pH dependent delayed release profile *in vitro*. In single oral dose, the pharmacodynamic parameters of rapid release tablets R E_{max} (%) and T_{max} (h) were 34.63% and 0.58 h, respectively. T_{max} s of delayed-release pellets T1 and T2 were extended to 2.42, 3.17 h and E_{max} s (%) were declined to 13.57%, 14.52%. The relative bioavailabilities of T1 and T2 were 99.3%, 133.6%, respectively. In multiple oral doses of R the pharmacodynamic parameter of DF was 7.32 and those T1, T2 DF were 3.40, 3.03, respectively. **Conclusion** The compound danshen pH-dependent delayed release capsules have characteristics of pH dependent releasing *in vitro* and characteristics of delayed release *in vivo*. In multiple oral doses the DF of delayed release capsules was lower than that of rapid release tablet at steady state.

Key words: compound danshen; pH-dependent delayed release pellet; serum pharmacology; pharmacodynamics

收稿日期: 2005-02-23.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (30200363).

* 通讯作者 Tel: 86 - 24 - 23986343, Fax: 86 - 24 - 23911736, E-mail: tangpham@sina.com

复方丹参 pH 依赖型延迟释药微丸处方来源于中国药典 (2000 年版一部) 复方丹参片, 本品可活血通络, 散瘀止痛, 用于治疗胸痹心痛、冠心病、心绞痛、心肌梗死^[1]等。将丹参、三七提取物、冰片-β-环糊精 (β-CD) 包合固化物, 用粉末层积技术及 pH 依赖型包衣技术, 分别制备于不同 pH 条件下释药的 3 种微丸, 以一定比例混合, 制成 pH 依赖型缓释胶囊, 期望在不同的生理部位释药, 以达到缓释的目的。以丹参酚酸类成分迷迭香酸为指标对其体外释放进行评价; 用血清药理学方法^[2]以离体豚鼠心脏冠脉流量变化率为检测指标, 按 Langendorff 法^[3]测定家犬服用 pH 依赖型复方丹参延迟释药微丸后在家犬体内的药效动力学。

中药血清药理学是近十年来发展起来的一种用于评价中药制剂药效动力学的新方法, 即动物给药后, 在一定时间内取血, 分离动物血清, 进行体外实验的方法^[2]。中药复方成分复杂, 尤其是用现有的方法无法进行体内测定, 采用血清药理学的实验方法对其进行药效动力学评价更具有合理性、可行性。

材料与方 法

材料与仪器 豚鼠 (300 ± 50) g, 雌雄兼用 (沈阳药科大学提供); 家犬 (20 ± 5) kg (沈阳军区陆军总医院提供); 复方丹参 pH 依赖型延迟释药微丸 (自制), 复方丹参速释片 (自制); Eudragit L-30D-55, Eudragit L100, Eudragit S100 型甲基丙烯酸树脂为德国 Röhm 公司产品; GS-H 型药用 RT 包衣剂 (主要成分羟丙基甲基纤维素 HPMC, 山东肥城瑞泰精细化工有限公司); 迷迭香酸 (百灵威化学制剂公司); Hitachi 高效液相色谱仪, 日立公司。任洛氏液 (临用前配制)、灌流装置 (沈阳药科大学药理教研室)。

pH 依赖型复方丹参延迟释药微丸的制备 分别制备丹参提取物、三七提取物、冰片-β-CD 包合物, 将其粉碎, 加入适宜的辅料, 采用粉末层积技术制备复方丹参延迟释药微丸, 分别用 5% RT 包衣剂 (主要成分羟丙基甲基纤维素 HPMC) 乙醇溶液, Eudragit L-30D-55 (pH 大于 5.5 时可迅速溶解) 水分散体, 增塑剂聚乙二醇 6000 (PEG6000); 8% 的 Eudragit L100-Eudragit S100 (1:6) (pH 大于 6.8 时可迅速溶解) 乙醇溶液, 增塑剂柠檬酸三乙酯进行包衣, 包衣增重分别为 6%, 8% 和 20%。

复方丹参速释片的制备 称取处方量的丹参提取物、三七提取物、冰片包合物, 加入微晶纤维素

(PH 101), 搅拌制粒, 过筛 (24 目), 减压干燥, 加入十二烷基硫酸钠、低取代羟丙基纤维素、滑石粉和硬脂酸镁混合, 压片、包薄膜衣即得。该薄膜衣片在 37 °C 水中可在 3 min 内崩解。

释放度测定法 按中华人民共和国药典 2000 年版二部附录释放度的测定方法第三法 (小杯法) 进行。转速 50 r·min⁻¹, 温度 37 °C, 迷迭香酸释放度测定开始时 pH 1.2 (人参皂苷 Rg1 开始时 0.001 mol·L⁻¹ 盐酸), 2 h 后加入磷酸盐缓冲液 3~5 mL (取磷酸氢二钾 K₂HPO₄·3H₂O 10 g, NaOH 4 g, 加蒸馏水 400 mL, 搅拌使溶解, 即得) 使 pH 为 5.8, 继续 2 h 计时取样, 在 2 h 后再加相同浓度磷酸盐缓冲液 3~5 mL 调节 pH 值为 7.0, 并使总体积为 100 mL, 继续 4 h 计时取样, HPLC 法测定迷迭香酸的浓度, 计算累积释放量。

家犬体内的药效动力学研究

受试制剂 将 RT 包衣微丸和 Eudragit L-30D-55 水分散体包衣微丸按 1:1 比例混合制备 pH 依赖型复方丹参延迟释药胶囊 T1; 将 RT 包衣微丸、Eudragit L-30D-55 水分散体包衣微丸和 Eudragit L100-Eudragit S100 (1:6) 乙醇溶液包衣微丸按 1:1:1 比例混合制备 pH 依赖型复方丹参延迟释药胶囊 T2。

参比制剂 复方丹参速释片 R 自制 (见复方丹参速释片的制备)。

受试对象及服药方法 雄性健康家犬 6 只, 体重 (20 ± 5) kg。随机分为 3 组, 于实验前 12 h 禁食、不禁水, 过夜, 早晨空腹口服单剂量药物 (相当于处方中丹参提取物 79 mg), 给药后于不同时间取血测定, 经 7 d 的洗净期后, 进行三制剂三周期交叉实验; 多剂量口服自制复方丹参速释片 R (次剂量相当于处方中丹参提取物 79 mg), 每天 2 次, 连续服用 7 d; 缓释胶囊, 每天 1 次, 连续服用 7 d (日剂量相当于处方中丹参提取物 158 mg)。经 10 d 的洗净期后, 进行三制剂三周期交叉试验。并于每天服药前采血测定血清对离体豚鼠心脏冠脉流量的增大百分率, 作为谷增大百分率, d 7 服药后于不同时间采血, 分离血清, 用血清药理学方法测定血清对离体豚鼠心脏冠脉流量的增大百分率, 结果连续给药 7 d 后, 增大百分率达到稳态。

豚鼠离体心脏的制备及冠脉流量的测定方法 取 300 g 左右的豚鼠 1 只, 击后脑至昏, 剪开胸腔与心包膜, 轻轻提起心脏, 剪断与心脏相连的血管, 取出心脏, 立即放入低温 (4 °C 左右) 的任洛氏液中并

轻轻挤压,排出余血。插入主动脉插管,按 Langendorff 氏法^[3]用任-洛氏液灌流(灌流液组成为氯化钠 9 g、氯化钾 0.42 g、氯化钙 0.24 g、碳酸氢钠 0.5 g、葡萄糖 1 g,加蒸馏水至 1 L),同时通以恒定的氧气,平衡 10 min,使心脏流量基本恒定。连续测量 3 min 内每分钟的冠脉流量,取平均值作为给药前的流量值,测定注入含药血清后 10 min 内每分钟冠脉流量值,找出极大值,求算给药后相对于给药前流量的最大增加百分率。流量增大百分率的计算公式如下:

流量最大增加百分率 =

$$\frac{\text{给药后灌流极值 (mL)} - \text{给药前灌流均值 (mL)}}{\text{给药前灌流均值 (mL)}} \times 100\%$$

最佳作用时间点的确定 豚鼠 12 只随机分为 2 组, A 组给药剂量为 $0.34 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于处方中丹参提取物 $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 给药 1 次, B 组连续给药 7 d, 给药剂量为 $1.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于处方中丹参提取物 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每天 2 次。两组分别于末次给药前、给药后 0.5, 1, 2, 3 和 4 h 颈静脉取血, 分离血清, 将所得相同时间点的含药血清合并, 于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。通过绘制给药一次和连续给药 7 d 的时效曲线, 给药后不同时间的作用程度具有明显差异, 以给药后 1 h 时间点作用最强。提示药物经口服给药后 1 h 的作用最强。连续给药 7 d 的含药血清对离体豚鼠心脏的冠脉流量的增大百分率明显优于 1 次给药。

剂量-效应曲线的绘制 豚鼠 7 组, 每组 6 只, 连续灌胃给药 7 d, 给药剂量为人日剂量的 0.33, 1, 1.5, 5, 10 和 15 倍, 每天 2 次, 空白对照组灌服生理盐水。并于末次给药后 1 h 颈静脉取血, 放置 0.5 h 后, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离血清, 分别制备含药血清, 合并同等剂量组合药血清, 作用于离体豚鼠心脏, 测定其冠脉流量, 绘制剂量-效应曲线。

家犬体内时间-效应曲线 取家犬服药前的空白血清及服药后不同时间点的含药血清, 照“豚鼠离体心脏的制备及冠脉流量的测定方法”进行离体豚鼠心脏灌流实验, 测定给予血清后豚鼠离体心脏冠脉最大流量增大的百分率, 以此作为家犬服药后不同时间点药效学指标绘制效应-时间曲线^[4]。

结果与讨论

1 复方丹参延迟释药微丸在模拟人体胃肠道 pH 变化条件下的释放度

对方剂中指标性成分进行释放度测定结果表

明, 两种指标性成分迷迭香酸 (rosmarinic acid) 和人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1) 均呈现 pH 依赖性释药特征, 释放曲线见图 1。

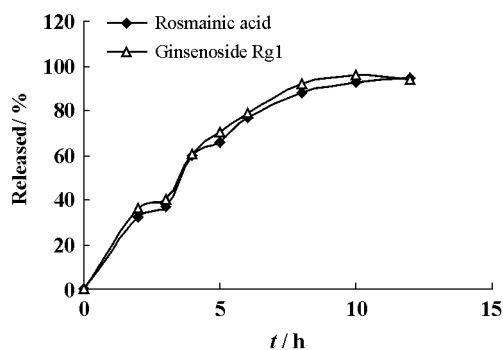


Figure 1 The release profiles of rosmarinic acid (pH 1.2, 0-2 h; pH 5.8, 2-4 h; pH 7.0, 4-12 h) and ginsenoside Rg1 (pH 3.0, 0-2 h; pH 5.8, 2-4 h; pH 7.0, 4-12 h) from compound danshen delayed-released capsule

2 剂量-效应曲线

不同剂量的含药血清对离体豚鼠冠脉流量增大百分率 (Y) 与剂量对数 (X) 呈线性正相关, 回归的剂量-效应方程为: $Y = 16.153X - 19.952$, $r = 0.9906$, 线性范围 $4.62 \sim 210 \text{ mg}$ (以处方中丹参提取物计)。

3 家犬体内时间-效应数据

不同时间家犬效应-时间曲线 (图 2、图 3), 用统计矩计算药代动力学参数 (表 1), 与参比制剂复方丹参片 R 相比, 复方丹参 pH 依赖型延迟释药胶囊的 E_{max} (最大流量增加百分率) 显著降低, 体内平均滞留时间显著延长。多剂量稳态药代动力学研究结果表明, 延迟释药胶囊 T1 与 T2 的作用较片剂平缓, 维持有效作用时间长, 药效波动度降低, 且延迟释药胶囊 T2 的缓释效果优于延迟释药胶囊 T1 (表 2)。

Table 1 Pharmacodynamic parameters of reference preparation R, test preparations T1 and T2 after a single oral dose in dogs ($n = 6$)

Parameter	R	T1	T2
$E_{\text{max}} / \%$	35 ± 6	$13.6 \pm 1.2^*$	$14.5 \pm 1.1^*$
$T_{\text{max}} / \text{h}$	0.58 ± 0.20	$2.4 \pm 2.5^*$	$3.2 \pm 1.8^*$
K_c / h^{-1}	0.44 ± 0.10	0.38 ± 0.23	0.29 ± 0.18
$T_{1/2} / \text{h}$	1.7 ± 0.4	3.0 ± 2.2	3.1 ± 1.6
$AUC_{0-t} / \% \cdot \text{h}^{-1}$	69 ± 9	67 ± 9	96 ± 16
$AUC_{0-\infty} / \% \cdot \text{h}^{-1}$	73 ± 9	73 ± 10	98 ± 16
MRT/h	2.4 ± 0.8	2.4 ± 1.0	6.7 ± 2.0
$F_r / \%$	100	99 ± 13	134 ± 21

* $P < 0.05$ vs R

Table 2 Pharmacodynamic parameters of reference preparation R, test preparations T1 and T2 after multiple oral doses at steady state in dogs ($n = 6$)

Parameter	R	T1	T2
$AUC_{0-1} / \% \cdot h$	103 ± 14	135 ± 20	174 ± 35
$AUC_{0-\infty} / \% \cdot h$	104 ± 14	146 ± 16	193 ± 49
MRT/h	3.3 ± 0.3	4.9 ± 2.8	10 ± 4
$E_{max} / \%$	33.4 ± 1.7	23 ± 5*	24 ± 5*
$T_{max} / \%$	1.7 ± 0.5	2.4 ± 1.1*	3.8 ± 2.8*
$E_{ss} / \%$	4.3 ± 0.6	4.9 ± 2.8	7.2 ± 1.4
DF	7.3 ± 1.0	3.4 ± 0.8*	3.0 ± 0.4*

* $P < 0.05$ vs R

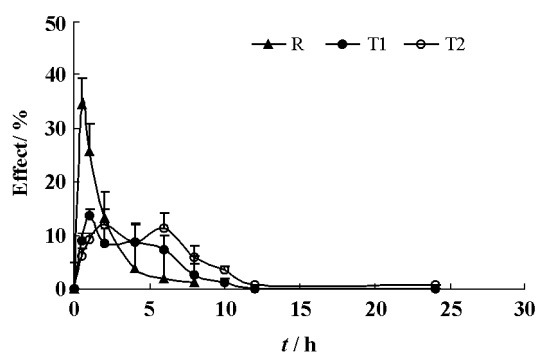


Figure 2 The effect-time curve in dogs after a single dose of reference preparation R, test preparation T1 and T2 ($n = 6$)

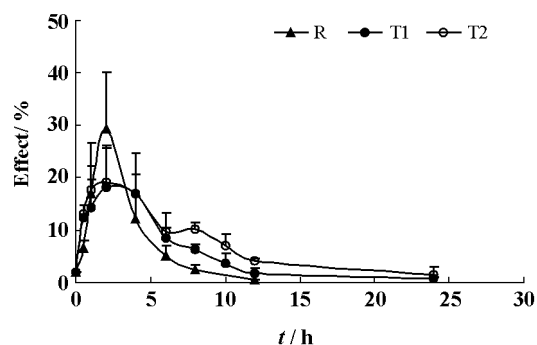


Figure 3 The effect-time curve in dogs after multiple oral doses of reference preparation R, test preparation T1 and T2 at steady state ($n = 6$)

4 生物等效性评价

分别对两种制剂的单次给药和多次给药的药代动力学参数 T_{max} , E_{max} 和 DF 进行 t 检验, 结果具有显著性差异 ($P < 0.05$), 个体间和周期间无显著性差异 ($P > 0.05$)。 $AUC_{0-\infty}$ 对数转化后进行方差分析, 双单侧 t 检验处理, 受试制剂 T1 与参比制剂 R 在家犬体内等效, 受试制剂 T2 与参比制剂 R 在家犬体内不等效, 说明延迟释药胶囊 T2 的生物利用度

(133.6%) 明显优于速释片。

5 讨论

胃内的 pH 值一般在 1 ~ 3, 十二指肠、空肠、回肠和结肠 pH 值分别为 4 ~ 6, 6 ~ 7, 7 和 8^[5]。微丸的平均胃排空时间不受食物影响^[6]。用 pH 依赖型包衣材料制备的 3 种包衣微丸, 其释药 pH 值分别对应于胃、十二指肠、空肠、回肠和结肠, 由于人参皂苷 Rg1 在 pH 1.2 溶液中不稳定, 通过不同 pH 值溶液中 Rg1 稳定性的考察, 最终确定 Rg1 的释放测定条件为 0.001 mol · L⁻¹ HCl 中 2 h, 其后条件与迷迭香酸一致, 结果, 两种指标性成分体外释放具有 pH 依赖性延迟释药特征。

目前中药药代动力学的研究主要有 3 种: ① 依据有效成分的代谢过程来表征整个复方的代谢。② 根据药效动力学指标反映复方的代谢。③ 血清化学的解决方案^[7]。药代动力学和药效动力学是按时间同步进行的两个密切相关的动力学过程, 而一个药物的最终价值在于它的药理效应, 故本文采用血清药理学方法对复方丹参 pH 依赖型延迟释药微丸药效动力学进行研究。

药效动力学研究表明, 速释片剂可在胃内迅速释药, 口服后, 可迅速产生药效, 而且药效降低相对迟缓, 与文献^[8]报道丹参成分在体内吸收快、消除慢相符。受试制剂 T2 由 3 种 pH 依赖型包衣微丸组成, 随着微丸在胃肠道的转运, 微丸在不同生理 pH 条件下释药, 所以导致受试制剂 T2 药效曲线产生双峰现象。而受试制剂 T1 由两种 pH 依赖型包衣微丸组成, 微丸分别在胃 (pH 1 ~ 3) 及十二指肠 (pH 4 ~ 6) 释药, 故受试制剂 T1 的药效曲线平缓下降, 未出现双峰现象, 与处方设计结果相符。

丹参是复方丹参处方中的君药, 水溶性酚酸类成分可显著增加冠脉流量^[9], 是丹参治疗冠心病、心绞痛的主要成分。处方中三七皂苷类可起到表面活性剂的作用, 促进丹参类成分的吸收; 冰片的脂溶性较高, 所以在小肠末端也有较好的吸收。3 种药物相互作用的结果使复方丹参 pH 依赖型延迟释药微丸的药效在小肠末端持续发挥, 达到缓释的目的。多剂量稳态研究进一步显示延迟释药的结果与分析结果相一致, 保持了速效、长效的特点。统计矩非隔室模型法计算药效动力学参数, 受试制剂 T1 具有较高的生物利用度, 可能有以下三方面原因: ① 微丸本身是一种多元给药系统, 口服进入胃肠道后, 分布面积广与胃肠道接触表面积增加, 胃排空不受食物影响, 从而吸收增加。② 冰片经过 β -CD 包合吸附

后,经考察吸湿性和溶出速度明显增加,在一定程度上也可降低冰片的挥发性,故可与丹参和三七同步释放,而冰片可促进其他药物通过脂质屏障的作用,因此增加了处方中药物在胃肠道的吸收。③经试验验证三七中皂苷类成分在酸中稳定性极差,在 pH 值为 1.2 的水溶液中发生水解,0.5 h 即降解 50% 左右,生成难溶于水的苷元。而胃内的 pH 值一般为 1~3,故普通片剂到达胃内,在胃酸的作用下部分三七中皂苷发生解离,使三七本身药效下降的同时不能有效发挥协同作用,导致丹参类成分吸收下降,三方面作用的结果使速释片的药效较低。而延迟释药微丸的生物利用度明显提高且受试制剂 T₂ 的生物利用度高于受试制剂 T₁。

References

- [1] Fang J. The review of the clinical application of danshen [J]. *Primary J Chin Mater Med* (基层中药杂志), 1995, 9(3): 46 - 47.
- [2] Zhao CL. The outline of pharmacokinetics of traditional Chinese medicine [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2003, 19(2): 125 - 128.
- [3] Chen Q. *The Pharmacology Empirical Method of Traditional Chinese Medicine* (中药药理研究方法学) [M]. 2nd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996. 493 - 634.
- [4] Sui Y, Sun Y, Guo T, et al. Studying the effect of Flos Carthami on the guinea pigs' heart *in vitro* by serum pharmacology [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(5): 373 - 376.
- [5] Liang WQ. *Biopharmacy and Pharmacokinetics* (生物药剂学和药代动力学) [M]. 2nd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003. 15.
- [6] Song HT, Guo T, Zhang RH, et al. Studies on heart protecting musk pH-dependent release pellets [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(10): 812 - 817.
- [7] Pan WS. Plasma pharmacology, plasma chemistry and herbal pharmacokinetics [J]. *World Sci Tech Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术—中药现代化基础研究), 2002, 4(3): 53 - 56.
- [8] Tian PP, Yuan ZF, Zhang LT. The review of pharmacokinetics of danshen and its dosages *in vivo* [J]. *China Pharm* (中国药房), 2003, 14(6): 375 - 376.
- [9] Pan GX, Zhang PL, Gao XM, et al. The review of the analysis on the chemical ingredients of danshen and sanqi in compound danshen [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医), 2002, 19(5): 75 - 78.