豆腐果苷缓释片的研制及在 Beagle 犬体内的药动学

李红莲，舒　婷，刘　源，刘　涛，孙文霞*

（成都大学药学院，四川抗菌素工业研究所，四川省药物制剂及装备工程技术研究中心，四川成都 610052）

摘要：为延长豆腐果苷在体内的作用时间、减少给药次数，以羟丙甲纤维素和卡波姆为骨架材料，采用湿法制粒制备豆腐果苷缓释片，并考察了该缓释片的体外释放及在 Beagle 犬体内的药动学过程。体外释放结果表明，豆腐果苷缓释片在去离子水中 10 h 累积释放率为 98.3%，释放行为符合 Higuchi 方程（r=0.998 2）。Beagle 犬体内药动学结果显示，缓释片与普通片的 $AUC_{0\to\infty}$、c_{max}、$t_{1/2}$ 分别为（1.665±0.264）和（1.552±0.076）μg·ml^{-1}·h、（0.46±0.05）和（1.24±0.12）μg/ml、（5.29±2.30）和（0.57±0.12）h。上述试验结果表明，豆腐果苷缓释片具有明显的缓释特征，减小了血药浓度波动。

关键词：豆腐果苷；缓释片；羟丙甲纤维素；体外释放；药动学

中图分类号：R944.4　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）08-1162-05

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.08.010

Preparation and Pharmacokinetics in Beagle Dogs of Helicid Sustained-release Tablets

LI Honglian, SHU Ting, LIU Yuan, LIU Tao, SUN Wenxia*

(*Engineering Research Center for Pharmaceuticals and Equipments of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, School of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610052*)

ABSTRACT: To prolong action time and reduce administration frequency, helicid sustained-release tablets were prepared by wet granulation with hypromellose and carbomer as the matrix materials. And the *in vitro* release and pharmacokinetics in Beagle dogs were investigated. The results of *in vitro* release test showed that the cumulative release at 10 h in deionized water reached 98.3%, and Higuchi equation fit the release data of helicid well (r=0.998 2). The pharmacokinetics was carried out in Beagle dogs. The parameters $AUC_{0\to\infty}$, c_{max}, $t_{1/2}$ for the sustained-release tablets and the common tablets were as follows: (1.665±0.264) and (1.552±0.076) μg·ml^{-1}·h, (0.46±0.05) and (1.24±0.12) μg/ml, (5.29±2.30) and (0.57±0.12) h, respectively. The above results showed that helicid sustained-release tablets had an obvious sustained-release characteristics and reduced the fluctuation of blood drug concentration.

Key Words: helicid; sustained-release tablet; hypromellose; *in vitro* release; pharmacokinetics

豆腐果苷（helicid，**1**），又名昆明神衰果素，是龙眼科植物萝卜树（*Helicia erratica* Hook.f.）中的天然药效成分。**1** 是 20 世纪 70 年代从云南民间发掘出来的民族药，对神经衰弱或神经衰弱综合征引起的睡眠障碍的治疗作用显著[1—2]；对中枢神经系统的作用与天麻素相似，但止痛、安眠、镇静作用较强[3]。有研究者发现，**1** 还具有一定的抗抑郁作用。杨敏进行了小鼠悬尾试验和小鼠强迫游泳试验[4]，观察到 **1** 能明显缩短小鼠的悬尾不动时间和小鼠强迫游泳的不动时间，在绝望动物模型中呈现抗抑郁作用。由于镇静安眠类化学药品本身的耐受性、成瘾性等缺点，中药及中药方剂目前用于治疗神经衰弱已被临床广泛接受，实践证明其疗效明确且不良反应小。

收稿日期：2022-02-17

基金项目：四川省科技厅应用基础项目（2018JY0592）、省级大学生创新创业大赛资助项目（S202111079134S）

作者简介：李红莲（1996—），女，硕士研究生，专业方向：药物新剂型与新技术。

通信作者：孙文霞（1980—），女，副研究员，从事药物分析及药代动力学研究。

E-mail：sunwenxia2003@163.com

1 适于长期服用，目前市售制剂为普通片，存在患者依从性差、血药浓度波动大等缺点。因此，研制 **1** 缓释制剂具有重要的临床意义。基于此，本研究设计了一种以羟丙甲纤维素（HPMC）和卡波姆为骨架材料的 **1** 缓释片，考察其体外释放特征，并进一步通过 Beagle 犬体内试验探索该缓释片的动力学特征。

1 仪器与试药

BS 210s 型电子天平（北京赛多利斯天平有限公司）；Waters 2695 型高效液相色谱仪［沃特世科技（上海）有限公司］；TU-1800 型紫外 - 可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）；RC806D 型溶出试验仪（天津市天大天发科技有限公司）；CJY-2C 型硬度仪（上海黄海药检仪器有限公司）；G10 型湿法混合制粒机、Mini-XYT 型流化制粒包衣机、P100 型粉碎整粒机、MD-6 型万向混合机和 ZPT9B 型旋转压片机（深圳市信宜特科技有限公司）。

1 对照品（含量≥ 98%，批号 MUST-19011003）和原儿茶醛（**2**，内标，含量≥ 98%，批号 MUST-19090405）（成都曼思特生物科技有限公司）；市售 **1** 普通片（云南白药集团大理药业有限责任公司，批号 DAA2102，规格 25 mg）；聚维酮 K30（PVP K30，安徽山河药用辅料股份有限公司，批号 170118）；卡波姆（CP934，深圳市优普惠药品有限公司，批号 0101347730）；HPMC（日本信越化学工业株式会社，K100M，批号 6055326）；甲醇、乙腈、乙酸为色谱纯，其余试剂为分析纯。

健康成年 Beagle 犬 6 只［四川抗菌素工业研究所提供，雌雄各半，(11.5±1.2)kg，动物合格证编号 SCXK（川）2014-01］。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

对照品溶液：精密称取 **1** 对照品约 10 mg，置 50 ml 量瓶中，用水溶解并定容，摇匀，得 **1** 对照品贮备液。再用超纯水稀释成质量浓度不同的系列对照品溶液，置冰箱中备用。

内标溶液：精密称取 **2** 约 5 mg，置 25 ml 量瓶中，用 10% 乙酸溶液溶解并定容，摇匀，得 200 μg/ml 的 **2** 贮备液。再用 10% 乙酸溶液稀释成 20 μg/ml 的内标溶液，置冰箱中备用。

2.2 1 缓释片的制备

本试验采用湿法制粒制备 **1** 缓释片。将原、辅料（**1** 187.5 g，HPMC 375 g，卡波姆 75 g，PVP 150 g）过 60 目筛（孔径 250 μm）后置湿法混合制粒机中进行干混（混合参数为：搅拌速度 200 r/min，切碎速度 2 000 r/min，混合时间 6 min），加入适量 30% 乙醇溶液以喷雾状态制粒（制粒参数为：搅拌速度 250 r/min，切碎速度 2 500 r/min，制粒时间 6 min），制粒得到的颗粒通过粉碎整粒机进行湿整粒（湿整粒参数为：整粒速度 350 r/min，整粒孔径 2 mm），然后进行流化干燥（干燥参数为：进风温度 55 ℃，进风量 350 m^3/h，物料温度 45 ℃，干燥时间 10 min）。干燥完毕后进行干整粒（干整粒参数为：整粒速度 500 r/min，整粒孔径 1.5 mm），然后加入 0.5% 硬脂酸镁进行总混（总混参数为：主轴速度 10 r/min，副轴速度 5 r/min，混合时间 5 min），最后用旋转压片机压片，共制备 5 000 片。所得 **1** 缓释片片重为（156.76±2.42）mg、直径为 7.5 mm、硬度为（62.44±4.67）N。用紫外（UV）分光光度法进行含量测定，得 **1** 含量为（100.69±2.37）%，符合相关规定。

2.3 体外释放度考察

参考《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 0931、9013 及有关文献[5—6]，采用第二法（桨法）测定释放度。选用经脱气处理的 37 ℃去离子水 900 ml 为介质，设置转速为 50 r/min，定时（缓释片分别于 1、2、4、6、8 和 10 h，普通片分别于 5、10、15、30、45、60 min）取释放液或溶出液 5 ml（同时补充同温等量介质），过滤，精密量取续滤液 2 ml，置 5 ml 量瓶中，用去离子水稀释定容，供测定。取系列对照品溶液，用 UV 法在 270 nm 波长处测定 **1** 吸光度 D。以质量浓度 c 为横坐标、D 为纵坐标，进行线性回归，得标准曲线方程 D=0.057 9c+0.003 7，r=0.999 9。结果表明，**1** 在 2 ～ 20 μg/ml 的范围内线性关系良好。采用 UV 法测定供试品的 D 值，计算样品中 **1** 的质量浓度，并计算 **1** 累积释放率（Q），绘制释放曲线。结果如图 1 所示。

由图 1 可见，**1** 普通片溶出速度快，1 h 基本溶出完全；而缓释片可持续释放至少 10 h，药物累积

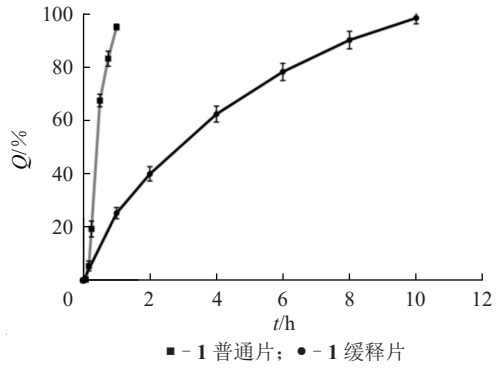


图 1　1 制剂的体外释放和溶出曲线（*n*=6）

Fig.1　*In vitro* Release and Dissolution Curves of **1** Preparations（*n*=6）

释放率达到 98.3%。体外释放数据的拟合结果显示，**1** 缓释片的释放行为符合 Higuchi 方程（*r*=0.998 2）。

2.4　1 含量的 HPLC 测定法及方法学考察

2.4.1　HPLC 色谱条件

色谱柱 Hypersil BDS C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 乙腈：甲醇：0.02 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液（用 0.01 mol/L 乙酸溶液调至 pH 3.0）（1∶9∶90），等度洗脱；检测波长 270 nm；流速 1.0 ml/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μl。

2.4.2　血浆样品处理方法

精密量取血浆 0.5 ml，加入超纯水 20 μl 和内标溶液 20 μl，加入 10% 高氯酸溶液 50 μl 和甲醇 0.5 ml，旋涡 3 min，离心（8 318×*g*）5 min，取上清液，室温自然挥干，用流动相 100 μl 复溶，离心（8 318×*g*）5 min 后，取上清液进样，在上述色谱条件下分离测定，记录色谱峰面积，以内标法计算血浆中 **1** 的质量浓度。

2.4.3　专属性试验

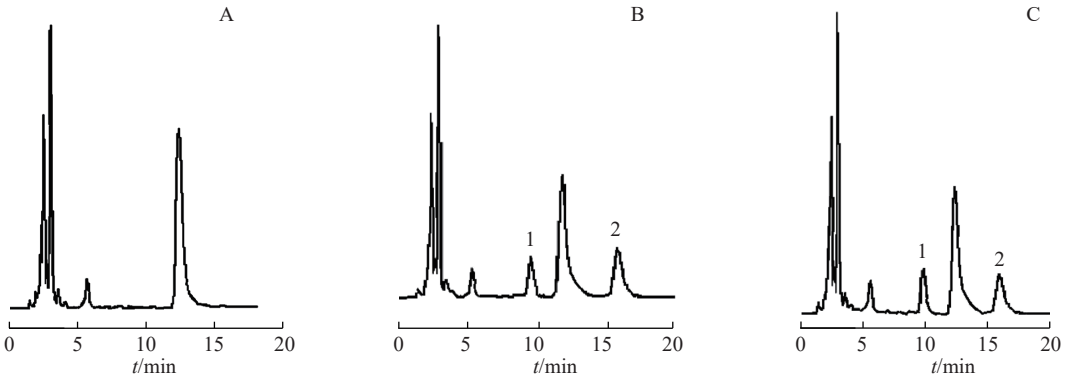
在“**2.4.1**”项下色谱条件下，分别将空白血浆、对照品 + 内标 + 空白血浆、Beagle 犬血浆样品照“**2.4.2**”项下方法处理后进样检测，色谱图见图 2。由图 2 可见，血浆中 **1** 和内标的出峰时间约为 10 和 17 min，且内源性物质不干扰 **1** 和 **2** 的测定，表明该方法专属性良好。

2.4.4　标准曲线与定量限

取空白血浆 0.5 ml，分别精密加入不同质量浓度的 **1** 对照品溶液 20 μl，使血浆中 **1** 的质量浓度分别为 0.02、0.04、0.18、0.37、0.73、1.83 和 3.67 μg/ml，按“**2.4.2**”项下方法处理后进样测定。以 **1** 与内标 **2** 峰面积之比（*Y*）为纵坐标、**1** 的质量浓度（*c*）为横坐标进行回归运算，得线性回归方程为 *Y*=1.229*c*+0.037，*r*=0.999 5；表明 **1** 在 0.02 ～ 3.67 μg/ml 范围内线性关系良好。检测限采用信噪比法，制备系列质量浓度的生物样品，进样测定峰面积，以 *S*/*N*>3 计算得本法的检测限为 10 ng/ml。

2.4.5　精密度与方法回收率试验

取空白血浆，平行制备 3 份低、中、高浓度的 **1** 血浆样品，按“**2.4.2**”项下方法处理后进样检测，



A：空白血浆，B：空白血浆 + 内标（0.2 μg/ml）+ **1** 对照品（0.18 μg/ml），C：Beagle 犬口服给药后 2 h 的血浆样品

1－**1**；2－内标

图 2　典型 HPLC 图谱

Fig.2　Typical HPLC Chromatograms

连续 3 d 测定样品的浓度，计算日内和日间 RSD；以测得值与加入值之比计算回收率。结果见表 1，可见日内和日间 RSD 均≤ 15%，表明该法精密度良好；低、中、高浓度样品样品的方法回收率分别为 97.93%、98.51%、102.81%，表明该法准确度良好，可用于 **1** 含量测定。

2.4.6 血浆样品稳定性试验

取适量空白血浆样品，配制成含 **1** 0.04、0.37 和 1.83 μg/ml 的血浆样品。将样品分别于室温放置 8 h、冷冻 30 d、冻融循环 3 次，按“**2.4.2**”项下方法处理后进样分析。测得低、中、高浓度样品中的 **1** 含量为 94.02%～ 99.38%，表明在上述条件下 **1** 稳定性良好。

2.5 药动学试验设计与给药方案

采用双交叉自身对照试验设计。6 只成年 Beagle 犬随机分为 2 组，即 **1** 缓释片（37.5 mg）和普通片（25 mg）组，试验前禁食 12 h，d2 分别口服 **1** 缓释片 2 片和 **1** 普通片 3 片，给药后继续禁食 4 h。给药前取空白血，给药后定时采前肢静脉血（缓释片分别为 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、8、10 和 12 h，普通片分别为 0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3 和 4 h）约 4 ml，置肝素化离心管中，离心（8 318×*g*）5 min，分离血浆后于 －20 ℃低温保存待测。间隔 1 周后，两组交换用药，于相同时间点取血。

将血浆样品按“**2.4.2**”项下方法处理后进样分析，测定血浆中 **1** 的含量，绘制药 - 时曲线，结果见图 3。由图 3 可知，普通片达峰时间短、血中 **1** 浓度下降较快。与普通片比较，**1** 缓释片的血药峰浓度显著降低，达峰时间延迟，且 **1** 浓度下降缓慢，$t_{1/2}$ 约是普通片的 9 倍，提示其具有缓释作用。采用 DAS 2.0 药动学软件对血药浓度数据进行分析，结果见表 2。

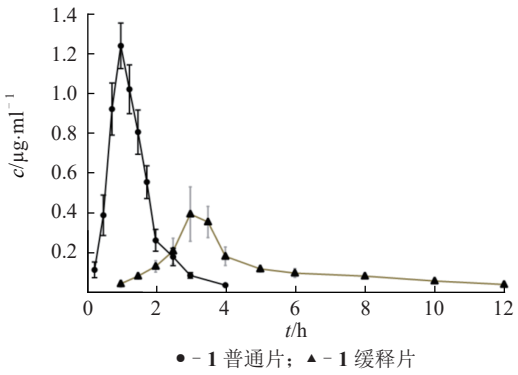


图 3 Beagle 犬口服 1 普通片或 1 缓释片后血浆中的药 - 时曲线（*n*=6）

Fig.3 Plasma Concentration Curves of **1** in Beagle Dogs after Oral Administration of **1** Common Tablets or **1** Sustained-release Tablets (*n*=6)

表 2 1 普通片和 1 缓释片的主要药动学参数（$\bar{x}\pm s$，*n*=6）

Tab.2 Main Pharmacokinetic Parameters of **1** Common Tablets and **1** Sustained-release Tablets ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

参数	**1** 普通片	**1** 缓释片
$AUC_{0\to t}$/μg·ml^{-1}·h	1.526±0.073	1.324±0.051
$AUC_{0\to\infty}$/μg·ml^{-1}·h	1.552±0.076	1.665±0.264
$MRT_{0\to t}$/h	1.362±0.056	4.963±0.241
$MRT_{0\to\infty}$/h	1.432±0.074	7.584±1.238
$t_{1/2}$/h	0.57±0.12	5.29±2.30
t_{max}/h	1.00	3.17±0.26
c_{max}/μg·ml^{-1}	1.24±0.12	0.46±0.05

3 结论

HPMC 是一种非离子型纤维素混合醚，是由纤维素醚化而成的半合成高分子聚合物，目前是国内外制备凝胶骨架缓控释制剂最常用的辅料之一[7]，

表 1 1 精密度、回收率及稳定性（$\bar{x}\pm s$，*n*=3）

Tab.1 Precision, Recovery and Stability of **1** ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

质量浓度/μg·ml^{-1}	RSD/%		方法回收率/%	稳定性/%		
	日内	日间		室温放置 8 h	冷冻 30 d	冻融循环 3 次
0.04	8.11	12.45	97.93±7.94	97.56±2.58	96.24±4.95	99.38±8.12
0.37	9.01	4.89	98.51±8.87	94.02±1.73	95.16±2.53	97.35±1.23
1.83	2.84	4.06	102.81±2.92	96.01±0.89	96.71±1.45	96.59±1.05

同时具有良好的生物黏附性，可延长制剂在体内的停留时间[8—9]。袁晓炫等用 HPMC 制备了天麻素微孔渗透泵缓释片[10]，并证明其在家兔体内延长了天麻素的半衰期，明显增加了 $MRT_{0\to\infty}$和 $AUC_{0\to t}$，提示减少单次给药剂量也可达到相同的生物利用度。卡波姆也是一种良好的缓释和生物黏附材料，在较低浓度时即具有良好的生物黏附效果，亦可作吸收促进剂[11—12]。

本试验采用湿法制粒制备了 **1** 缓释片，对其体外释放和体内药动学进行了初步研究。体外释放结果表明，**1** 缓释片可持续释放至少 10 h。HPMC 作为缓释骨架材料时，药物释放多呈先快后慢的趋势。HPMC 是亲水凝胶型缓释骨架材料，用量越大，凝胶强度越大、缓释效果越好，但用量过多也会导致释药不完全[13—14]。

市售 **1** 普通片在使用时可根据需要口服 1 ～ 3 片，本试验照最大剂量给药。药动学研究结果显示，同等给药剂量下，**1** 缓释片 AUC 与普通片相当，而 c_{max} 仅为普通片的 37%。现有研究资料中暂未检索到明确的 **1** 有效血药浓度范围，推测与其安全性高、有效剂量范围广有关。Beagle 犬药动学试验结果表明，**1** 缓释片达到了延长 **1** 的体内作用时间、减小血药浓度波动的目的，提示其有利于减少患者服药次数、提高顺应性。

参考文献：

[1] 张袁祥, 周安成, 张晓彤, 等. 豆腐果苷对间歇低氧大鼠记忆损伤的保护作用[J]. 皖南医学院学报, 2020, **39**(5): 413-417.

[2] 蒲崇德. 大有潜力的山龙眼科植物[J]. 中国中药杂志, 1991, **16**(7): 63.

[3] 刘史佳, 居文政, 谈恒山. 豆腐果苷研究进展[J]. 中国医药导刊, 2008, **10**(6): 911-913.

[4] 杨　敏. 豆腐果苷抗抑郁活性的研究[J]. 四川生理科学杂志, 2017, **39**(1): 12-15.

[5] 贾春建, 王雪芹, 赵军霞, 等. 泼尼松缓释片中泼尼松的测定及其体外释放度研究[J]. 现代药物与临床, 2021, **36**(5): 892-896.

[6] 余灯广, 杨祥良, 王运赣, 等. 三维打印技术制备控释药片工艺研究[J]. 中成药, 2007, **29**(5): 679-683.

[7] MAŠKOVÁ E, KUBOVÁ K, RAIMI-ABRAHAM B T, *et al*. Hypromellose – a traditional pharmaceutical excipient with modern applications in oral and oromucosal drug delivery [J]. *J Control Release*, 2020, **324**: 695-727.

[8] ZHENG J, WANG B, XIANG J, *et al*. Controlled release of curcumin from HPMC (hydroxypropyl methyl cellulose) co-spray-dried materials [J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2021, **2021**: 7625585.

[9] ZHANG J, MEI L, MA P, *et al*. Microgel-stabilized hydroxypropyl methylcellulose and dextran water-in-water emulsion: influence of pH, ionic strength, and temperature [J]. *Langmuir*, 2021, **37**(18): 5617-5626.

[10] 袁晓炫, 要　辉, 张　欣, 等. 天麻素微孔渗透泵缓释片的制备及其药动学评价[J]. 中国医院药学杂志, 2021, **41**(17): 1742-1748.

[11] 黄　洋, 臧　萍, 钟雪彬, 等. 盐酸普拉克索缓释片工业化生产处方研究[J]. 山东化工, 2021, **50**(8): 44-46.

[12] 姜　帆, 李　鑫, 张文君, 等. 辛伐他汀缓释片的制备工艺研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2017, **33**(6): 647-650.

[13] 叶晓霞, 葛雨琦, 乐　健, 等. 缓释制剂辅料导致盐酸二甲双胍降解产生*N*-亚硝基二甲胺的影响因素研究[J]. 药物分析杂志, 2021, **41**(2): 293-299.

[14] 韩　冰, 吴继卫. 羟丙基甲基纤维素在医药领域中的应用现状[J]. 德州学院学报, 2016, **32**(2): 71-73.