

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.009

◇ 药学研究 ◇

复方龙脉宁磷脂复合物制备工艺及初步吸收评价

王景媛, 史亚军, 黄维, 王春龙

作者单位: 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

通信作者: 史亚军, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术, E-mail: iottsyj@163.com

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2012KTCQ03-13)

摘要:目的 制备复方龙脉宁磷脂复合物并进行口服十二指肠体外吸收评价。方法 以复合率为评价指标, 结合前期试验结果, 采用正交法优选复方龙脉宁磷脂复合物的影响因素, 包括药物浓度、复合时间、复合温度和药脂比; 分别制备复方龙脉宁提取物与磷脂复合物, 对二者采取外翻肠囊法测定改性前后在十二指肠段的吸收情况。结果 确定了以乙醇作为反应溶剂, 提取物与大豆卵磷脂比例为 1:3, 提取物的投料浓度为 80 mg/mL, 在 40 ℃条件下复合 12 h 为最佳复合条件; 采用磷脂复合物技术制备的复方龙脉宁磷脂复合物肠吸收较提取物显著增加。结论 磷脂复合物技术对于复方龙脉宁口服生物利用度的提高具有一定的适用性。

关键词: 复方龙脉宁; 磷脂复合物; 制备工艺; 外翻肠囊法

The study on preparation of Fufang Longmaining phospholipid complex and preliminary absorption evaluation

WANG Jingyuan, SHI Yajun, HUANG Wei, WANG Chunlong

Author Affiliation: College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China

Abstract: Objective To study the preparation of Fufang Longmaining extract phospholipid complex and evaluate duodenum absorption characteristic. **Methods** The evaluation criterion was complex ratio. Combined with pretest results, the experiment inspect the significance influential factor such as phospholipids/drug, the drug concentration, the reaction time and temperature by orthogonal design. Everted gut sac method was used to evaluating the absorption situation of Fufang Longmaining extract and phospholipid complex. **Results** The ethyl alcohol was adopted as reaction solvent. The screening process was as follows: the ratio of extract and phospholipid was 1:3, extract concentration was 80 mg/mL, react time was 12 h at temperature 40 ℃. The absorption of phospholipid complex was significantly increased. **Conclusion** Phospholipid complex technology has certain applicability in promoting the oral bioavailability of Fufang Longmaining.

Key words: Fufang Longmaining; Phospholipid complex; Preparation technology; Gut sac method

冠心病主要是由冠状动脉发生粥样硬化引起管腔狭窄或闭塞, 导致心肌缺血缺氧或坏死而引起的心脏病^[1]。复方龙脉宁方是陕西中医药大学第一附属医院脑病科陶根鱼教授的经验方, 处方由葛根、川芎、穿山龙、蜂胶四味中药组成, 功能通络活血, 消炎化瘀, 临床应用于冠心病的治疗。虽然复方龙脉宁提取物的活性成分有确切的药理效应, 但由于其水溶性、脂溶性均较差的特点造成了口服吸收较为困难, 且药物在体内的生物利用度不高, 从而极大地限制了药物的临床使用^[2]。相关研究证明, 磷脂复合物作为一种新型给药系统, 用于中药有效部位的改性时可有效提高有效部位的脂溶性和水溶性^[3]。本研究自 2017 年 12 月至 2018 年 4 月将复方龙脉宁提取物的制备工艺与磷脂复合物技

术相结合, 通过评价改性前后提取物和磷脂复合物在十二指肠段的吸收情况, 以论证此工艺能改善复方龙脉宁的生物药剂学特性^[4], 对复方龙脉宁的生物利用度的提高做出理论支持。

1 材料

梅特勒-托利多 AR114 电子天平; 78-1 型磁力搅拌器; Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400R 台式离心机; RE-3000 旋转蒸发器; SHB-III 循环水式多用真空泵。Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪。

SD 大鼠由西安交通大学医学部实验动物中心提供[合格证号: SYXK(陕)2017-014]; 葛根(批号 20171226)、穿山龙(批号 20171011)、川芎(批号 20170907)均购自宝鸡向源中药饮片有限责任公司; 蜂胶(陕西省咸阳市自然之子蜂产品公司, 批号

20170821)。葛根素对照品(中国药品生物制品检定所,批号110773-201612,纯度≥98%);大豆卵磷脂(上海太伟药业,批号040801,PC≥82%);复方龙脉宁提取物、复方龙脉宁磷脂复合物、Krebs-Ringers 肠营养液均为自制;乙腈、甲醇为色谱纯(美国Fisher);水为蒸馏水;其他试剂均为分析纯(天津科密欧试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 复方龙脉宁磷脂复合物制备工艺

2.1.1 复方龙脉宁提取物制备工艺^[5] 按原方比例取葛根,穿山龙,川芎三味药材,用8倍量70%浓度的乙醇回流提取3次,每次2 h,提取完成后回收乙醇,提取液减压浓缩至适量,采用大孔吸附树脂法对提取液进行纯化,树脂型号为AB-8,提取液与树脂比例为1 mL:1 g,洗脱液为80%浓度乙醇,洗脱速度为0.5 BV/h,收集洗脱液,将洗脱液减压浓缩至适量后,按原方比例加入除蜡后的蜂胶,混匀,喷雾干燥,即得。

2.1.2 磷脂复合物制备及评价^[6] 将“2.1.1”项下制得的复方龙脉宁提取物和一定量的磷脂置于圆底烧瓶中,加入一定量无水乙醇,将圆底烧瓶置于磁力搅拌器上进行恒温搅拌,反应一段时间后,减压回收无水乙醇,将圆底烧瓶内壁上的产物刮取下来,置于减压干燥箱中干燥,得到复方龙脉宁磷脂复合物。

2.1.3 复合率测定方法的建立^[7] 分别称取已经研磨成细分的复方龙脉宁提取物1 g于50 mL三角瓶中,分别加入表1中的试剂20 mL,置于室温(25℃)下,每5 min强力震荡30 s,持续30 min,滤过,滤液用恒重后的蒸发皿收集,置于80℃水浴锅上烘干后,转移至烘箱烘干至恒重,试验结果见表1。

溶解率 = $(W_1 - W_2) / W_3 \times 100\%$, W_1 = 蒸发皿 + 溶解物质量, W_2 = 蒸发皿质量, W_3 = 龙脉宁提取物质量。

从表1可得,复方龙脉宁提取物在甲苯中的溶解性较低,为0.7%,因此选择甲苯作为测定复合率的溶剂。

利用龙脉宁提取物难溶于甲苯,而大豆卵磷脂和龙脉宁提取物磷脂复合物易溶于甲苯的特点^[8],将定量的龙脉宁提取物和大豆卵磷脂复合后,减压除去反应溶剂,取出,研磨成细粉,精密称定1 g龙脉宁提取物磷脂复合物,将复合物置于锥形瓶中,充分溶解其中的磷脂及磷脂复合物,以3 000 r/min的转速离心10 min,取出,将上清液转移至已恒重的蒸发皿中,除去甲苯,称定其重量。复方龙脉宁提取

表1 复方龙脉宁提取物在不同溶剂中的溶解度

溶剂	W ₁	W ₂	W ₃	溶解率/%
无水乙醇	51.981 0	51.362 8	1.035 7	59.68
三氯甲烷	55.258 6	55.214 5	1.002 1	4.40
二氯甲烷	57.308 3	57.236 9	1.057 6	6.75
乙酸乙酯	49.267 6	49.235 8	1.102 9	2.88
正丁醇	52.189 1	52.146 8	1.085 5	3.90
乙醚	54.273 8	54.201 4	1.062 3	6.81
蒸馏水	58.353 5	58.210 6	1.045 9	13.66
95%乙醇	45.906 3	45.213 6	1.095 3	63.26
四氢呋喃	49.350 4	49.215 8	1.047 6	12.86
正辛醇	51.307 6	51.268 5	1.069 9	3.66
磷酸盐缓冲液(pH5.8)	57.324 4	57.236 9	1.114 2	7.85
石油醚	52.375 8	52.360 2	1.063 4	1.47
甲苯	53.222 2	53.214 8	1.075 1	0.69
正己烷	61.309 7	61.287 6	1.006 5	2.20
丙酮	56.551 8	56.239 9	1.096 1	28.46

物与大豆卵磷脂复合率(%) = $[M_2 - (M_1 - M_2) \times \lambda] / M_1 \times 100\%$ (M_1 = 磷脂复合物质量, M_2 = 磷脂复合物溶于甲苯的质量, λ = 磷脂与药物质量比)。依照此法检验三批样品,计算各样品复合率的平均值,从而计算出复方龙脉宁与大豆卵磷脂的复合率。

2.1.4 单因素实验 复合率的影响因素包括复合溶剂的类型、复合的时间与温度、药脂比以及药物的浓度,由于提取物与磷脂的复合实质上是分子间的结合^[9],这就要求复方龙脉宁提取物在进行复合的溶剂中溶解度较高,结合预实验结果,最终复合溶剂为无水乙醇,且复合率的影响因素为复合时间、药物浓度以及药脂比等,而复合温度对复合效果的影响为低浓度时提取物与磷脂的复合率受反应温度的影响较小,而高浓度时提取物与磷脂的复合率则受反应温度影响较大,具体表现为温度在40℃以上时复合率随着温度的增高而降低。

2.1.5 正交实验设计 根据单因素试验的考察结果,选择最佳反应溶剂为乙醇、反应温度为40℃、高药物浓度时,以药物浓度(A)、药脂比(B)和复合时间(C)做三因素三水平的正交实验设计。采用 $L_9(3^3)$ 表,因素水平表见表2,结果见表3,4。

表2 因素水平表

水平	因素		
	A 药物浓度/(mg/mL)	B 药脂比/w:w	C 复合时间/h
1	80	1:2	8
2	100	1:3	10
3	120	1:4	12

表3 正交实验结果

试验号	因素			复合率/%
	A	B	C	
1	1	1	1	75.20
2	1	2	2	78.31
3	1	3	3	78.53
4	2	1	2	65.25
5	2	2	3	81.29
6	2	3	1	75.59
7	3	1	3	59.79
8	3	2	1	63.64
9	3	3	2	65.97
K_1	77.35	66.75	71.48	
K_2	74.04	74.41	69.84	
K_3	63.13	73.36	74.20	
R	14.21	7.67	3.60	

表4 方差分析表

因素	离均差平方和(SS)	自由度(f)	F值	P值
A	331.96	2	19.60	0.03
B	103.66	2	6.12	0.59
C	19.94	2	1.00	0.90

由直观分析可知,最佳工艺参数为A₁B₂C₃,即药物浓度为80 mg/mL,药脂比为1:3,反应时间为12 h,方差分析结果显示药脂比以及反应时间对结果无显著性影响。按此优化条件制得3批复方龙脉宁磷脂复合物,测得磷脂复合物的平均复合率为86.72%。

2.2 复方龙脉宁磷脂复合物十二指肠吸收研究以葛根素为指标,使用HPLC进行测定,采用外翻肠囊法研究复方龙脉宁提取物改性前后在十二指肠的吸收变化,以评价复方龙脉宁提取物改性前后的改善情况。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Hypersil ODSC₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(25:75),检测波长为250 nm,流速为1 mL/min,理论板数按葛根素峰计算应不低于4 000。

2.2.2 供试品溶液的配制 取葛根素对照品,用“2.2.1”项下流动相稀释成浓度为0.051 2 mg/mL的葛根素溶液作为对照品储备液。取过量复方龙脉宁提取物及磷脂复合物于锥形瓶中,加入Krebs-Ringers肠营养液,充分搅拌,得药物饱和液,以3 000 r/min

的速率离心10 min,取上清液,按照“2.2.1”项下色谱条件测定溶液中葛根素的含量,分别配置含量为0.1, 0.5, 1.0 mg/mL的溶液作为供试品溶液。

2.2.3 十二指肠吸收实验 取受试SD大鼠禁食24 h,期间自由饮水,试验时取10%水合氯醛将大鼠腹腔注射麻醉后,取出10 cm左右十二指肠,分离出肠系膜,用37 ℃ Krebs-Ringers肠营养液将肠系膜冲洗干净,翻转十二指肠,结扎一端,固定另一端,加入Krebs-Ringers肠营养液饱和平衡5 min,将其放入“2.2.2”项下保持37 ℃恒温的供试液中,保持氧及二氧化碳的供入,分别在0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3 h吸取0.2 mL肠囊内溶液,同时向肠囊内补充0.2 mL Krebs-Ringers肠营养液,测定各时间点样品中的葛根素含量。

2.2.4 含量测定及数据处理 将各样品置于离心机中,以3 000 r/min离心5 min,取上清液,按“2.2.1”项下色谱条件测定上清液中葛根素的含量,计算各样品累计渗透量Q,以各样品的Q测定值对时间进行零级、一级、Higuchi方程拟合,通过相关系数的计算确定数据处理模型。

$$Q=(V_0\times C_n+V_i\sum_{i=1}^{n-1}C_i)/A$$

上式中Q:单位面积的累积渗透量;V₀:接收液体积(mL);C_n:第n次取样的药物浓度;V_i:每次的取样体积(mL);C_i:第n-1次测得的药物浓度);A:离体十二指肠肠管吸收面积。

方法学试验:分别精密吸取对照品储备液4、8、10、12、16、20 μL进样,以峰面积A对进样量C(μg)进行回归,得到回归方程为A=10⁷x+10⁶,R²=0.999,结果表明,葛根素在0.2~1.02 μg处线性关系良好。专属性试验显示,葛根素峰分离良好,在空白样品处没有吸收,专属性良好。精密度试验显示,连续进样5次,葛根素峰面积RSD为0.96%;分别于0、2、8、12、24 h进样,葛根素峰面积RSD为2.15%,仪器精密度高,样品在24 h内稳定。对照品与供试品HPLC图见图1。

2.2.5 样品测定结果 对不同时间点两种样品的含量进行测定,将各样品的累计渗透量对时间分别按

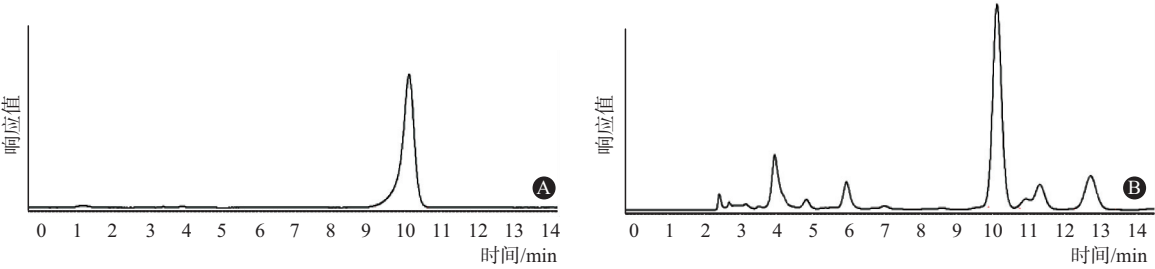


图1 HPLC图:A为葛根素对照品,B为复方龙脉宁提取物供试品

照零级、一级、Higuchi进行拟合,结果表明以零级拟合最佳,这表明复方龙脉宁中的葛根素在十二指肠中表现出了被动扩散的吸收特征,不同浓度样品测定结果见表5,将三个浓度条件下的累积吸收量对时间作图,见图2~4。

表5 不同浓度样品测定结果($n=5$)

样品	浓度/ (mg/mL)	回归方程	相关系数 (r^2)	吸收速度常数/ $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$
复方龙脉宁 提取物	0.106 7	$Q=1.943\ 6t-0.170\ 4$	0.981 0	1.943 6
	0.510 9	$Q=5.520\ 7t-0.992\ 1$	0.982 1	5.520 7
	1.005 2	$Q=10.3213t-2.054\ 2$	0.984 1	10.321 3
提取物磷脂 复合物	0.109 6	$Q=3.214\ 6t-0.210\ 6$	0.994 6	3.214 6
	0.496 2	$Q=8.834\ 6t-0.143\ 7$	0.987 6	8.834 6
	0.988 4	$Q=13.006\ 4t-1.092\ 1$	0.988 1	13.006 4

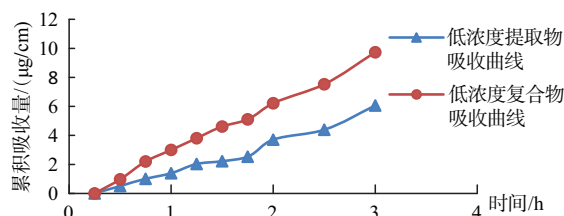


图2 低浓度样品吸收曲线($\bar{x}\pm s, n=5$)

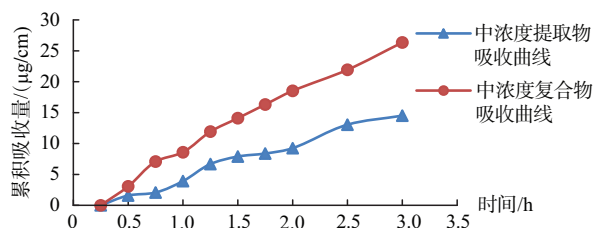


图3 中浓度样品吸收曲线($\bar{x}\pm s, n=5$)

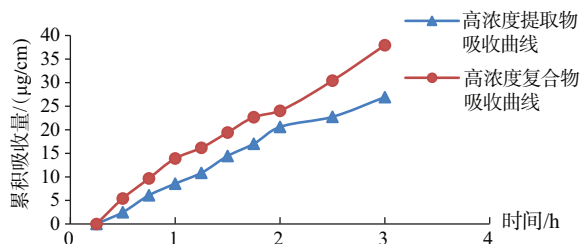


图4 高浓度样品吸收曲线($\bar{x}\pm s, n=5$)

结果表明,提取物的肠吸收累积量与样品浓度呈现的正相关,吸收速度常数呈线性递增,这表明复方龙脉宁中的葛根素为被动扩散吸收。复方龙脉宁提取物经与磷脂复合后,葛根素的肠吸收量明显增加,高、中、低三个浓度提升量分别为65%、60%和26%。结果表明,将磷脂复合技术与复方龙脉宁提取物相结合,可明显改善复方龙脉宁中葛根素的十二指肠吸收,这对提高复方龙脉宁的生物利用度提供了理论依据。

3 讨论

复方龙脉宁方主治心脑血管疾病,在临床应用

广泛,疗效确切,本课题在前期研究中选择了滴丸作为剂型,取得了一定的研究进展,但仍存在生物利用度低、用药量大、用药次数多等弊端。经过方中各味药有效成分分析,发现含有大量的黄酮类及其他含羟基成分,文献研究表明,这些物质与磷脂结合可改善其理化性质及生物利用度^[10],为了改善原方中的有效成分不利于吸收的缺点,本研究结合磷脂复合物技术^[11],对复方龙脉宁提取物进行处理,使其与磷脂复合,复合率较高,改善了药物在体内的吸收,提高了药物在体内的生物利用度。

据文献报道,葛根素单体的磷脂复合物复合率可达100%^[2],但考虑到中药复方成分的复杂性,以及提取物中含有其他不含羟基的化合物无法与大豆卵磷脂进行复合,86.72%的复合率已经是一个较为理想的结果。本试验的复合溶剂为无水乙醇,并且对复合效果具有一定影响的复合时间、药物浓度以及药脂比等因素进行了考察,从而确定了复合工艺为药物浓度为80 mg/mL,药脂比为1:3,反应时间为12 h。

离体十二指肠吸收研究结果表明,磷脂复合物中葛根素的肠吸收情况相较原提取物显著提高,吸收机制为被动扩散。但是,提取物与大豆卵磷脂复合后吸湿性增强,且给药剂量、剂型选择及药物规格相应改变,后续将对这些问题进行研究。

参考文献

- [1] 任勇,刘娟,徐果,等.冠心病易感性及其与冠状动脉病变严重程度的相关性分析[J].安徽医药,2015,19(11):2170-2172.
- [2] 顾海滨.药物磷脂复合物的研究进展[J].中国中药杂志,2015,13(33):33-35.
- [3] 张志,高雪梅,陈冰,等.葛根素磷脂复合物的制备及表征[J].时珍国医国药,2017,28(10):2411-2413.
- [4] 孙静,史亚军,张小飞,等.丹参片提取物磷脂复合物的制备及初步吸收评价[J].中药材,2017,40(1):164-166.
- [5] 王景媛,王昌利,史亚军.星点设计-效应面法优化复方龙脉宁滴丸提取工艺[J].中南药学,2014,12(8):743-747.
- [6] 吴军勇,李泳江,胡雄斌,等.葛根素与磷脂复合后对葛根素微乳经淋巴转运的影响[J].中草药,2018,49(12):2914-2918.
- [7] 史亚军,吴品江,许润春,等.黄芩苷磷脂复合物基本性质研究[J].中草药,2012,43(1):78-82.
- [8] 陈小云,张振海,刘丹,等.丹酚酸组磷脂复合物制备研究[J].中国中药杂志,2014,39(2):216-221.
- [9] 丁冬梅,张振海,蒋艳荣,等.中药磷脂复合物的研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(13):2046-2050.
- [10] 李强强,王凯,薛晓峰,等.黄酮类化合物磷脂复合物的制备与功能活性研究进展[J].中国现代应用药学,2018,35(1):132-137.
- [11] 郑林,李毅,邓盛齐,等.磷脂复合物对中药制剂口服吸收的影响[J].中国抗生素杂志,2015,40(6):468-473.

(收稿日期:2018-06-13,修回日期:2018-08-25)