

· 研究报告 ·

芦丁片剂药理学综合性实验的流程及方法研究

陈莉,杜红丽,曾仁韬,张叶叶,鲁莹,蔡国君(第二军医大学药学院,上海 200433)

[摘要] **目的** 以芦丁为模型药物,探讨新药片剂制备及药理学评价的多学科综合性实验流程和方法。**方法** 采用薄层色谱定性鉴别槐米中的芦丁成分;采用高效液相色谱法测定槐米中芦丁含量及芦丁精制品的含量;采用紫外分光光度法测定芦丁片含量;采用离体大鼠胸主动脉环舒张实验考察芦丁的药效;利用粉末直接压片法制备芦丁片剂。**结果与结论** 本实验完成了槐米的质量评价,槐米中芦丁的提取纯化、含量测定,芦丁药理学考察及芦丁片处方工艺研究等内容,提高了实验操作技能,实践了芦丁临床前研究的部分内容。

[关键词] 多学科综合性实验;芦丁;药理学;片剂

[中图分类号] R961;R943

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)04-0359-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.04.018

Research on the technological process and methods of the comprehensive pharmaceutical experiment of rutin tablets

CHEN Li, DU Hongli, ZENG Rentao, ZHANG Yeye, LU Ying, CAI Guojun (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To imitate the development process of new drugs with rutin as the model and to do multidisciplinary experiments of preparation and pharmacodynamics of rutin tablets. **Methods** Thin-layer chromatography was used to identify rutin in Pagodatree flower bud. High-performance liquid chromatography was used for quantitative determination of rutin in Pagodatree flower bud and rutin products. The vasodilatation effect of rutin was investigated. The preparation of rutin tablets was completed. **Results and Conclusion** We completed the identification of Pagodatree flower bud, extraction and purification of rutin from Pagodatree flower bud, the assay of rutin, the pharmacodynamics study and the formulation of rutin tablets. The experiments helped the postgraduates to be familiar with the research process of new drugs and to improve their experimental operation skills.

[Key words] multidisciplinary experiments; rutin; pharmacodynamics; tablets

芦丁(rutin)又名芸香苷、维生素 P,是一种典型的黄酮类化合物,几乎所有的芸香科和石楠科植物中均含有芦丁,尤其是在芸香科的芸香草、豆科植物的槐米中,芦丁含量较为丰富,可用作提取芦丁的原料^[1-3]。芦丁作为一种重要的中药化学成分,具有较强的药理活性且毒性低。芦丁具有降低毛细血管通透性和脆性,促进细胞增生和防止血细胞凝聚,以及抗炎、降血脂等方面的作用^[4,5]。芦丁在水中的溶解度较小,在胃肠道内易被破坏,因此限制了其临床应用。随着现代制剂研究的发展,改进了芦丁的剂型,使其溶解度和生物利用度均有所提高^[6,7]。

第二军医大学药学专业学位硕士研究生以 4 人为一组,查阅文献、制订实验方案、实施实验、整理数据,以芦丁为模型药物模拟新药研究流程,完成了芦丁片剂制备及药理学评价的研究内容。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);ALC-210.4 艾科勒分析天平(万分之一精度,德国赛多利斯集团);倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司);PowerLab 数据采集分析系统(埃德仪器国际贸易有限公司);紫外分光光度计(上海棱光技术有限公司);溶出测定仪(富科思科技);M10039 小型单冲压机(上海天和制药机械有限公司)等。

1.2 试剂 芦丁对照品购自大连美仑生物技术有限公司,含量 $\geq 98\%$;去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)购自 Sig-

[作者简介] 陈莉,硕士研究生。Tel: 18321780962;E-mail: cl287506433@163.com

[通讯作者] 蔡国君,副教授。研究方向:心血管药理学。Tel: (021) 81871282;E-mail: cai_gj@yahoo.com

ma公司;羟丙基甲基纤维素(HPMC)、微晶纤维素(MCC)、可压性淀粉、硬脂酸镁均为药用规格;乙腈、冰醋酸为色谱纯,购自国药集团化学试剂有限公司;双蒸水,其他试剂为分析纯。

1.3 实验动物 雄性SD大鼠,体重(200±10)g,由第二军医大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

2 方法与结果

2.1 槐米的质量评价

2.1.1 性状观察 原药材(生槐米)呈椭圆形,长2~4 mm,直径约2 mm,花萼下部有数条纵纹,花萼上方为未开放的花瓣,花梗细小,体轻,气微,符合《中华人民共和国药典》(以下简称:药典)规定。

2.1.2 显微鉴别 本品粉末呈黄绿色,在显微镜下可观察到类球形或钝三角形的花粉粒,非腺毛及簇状草酸钙方晶,符合药典规定。

2.1.3 理化鉴别 取生槐米粗粉1.002 g,置于50 ml锥形瓶中,加入甲醇25 ml,超声提取10 min,过滤,即得供试品溶液。

取供试品溶液1 ml,进行盐酸-镁粉反应,溶液变成红色,说明提取物中可能含黄酮类化合物;另取供试品溶液1 ml进行Molish反应,产生紫色圆环,说明提取物中可能含糖。

另取芦丁对照品,加甲醇制成每1 ml含4 mg的溶液作为对照品溶液。吸取上述两种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,展开剂为乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1),展开,取出,晾干后喷以三氯化铝试液,待乙醇挥干后置于紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显示相同颜色的荧光斑点,两者的比移值均为 $R_f=0.31$,说明槐米中存在芦丁。

2.1.4 槐米中芦丁的含量测定 取槐米0.1004 g,置于100 ml具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,称量。超声处理30 min,放冷,称量并用甲醇补足减少的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液1 ml,置于10 ml量瓶中,加流动相至刻度,摇匀即得供试品溶液。精密称取芦丁对照品50 mg,置于100 ml容量瓶中,加甲醇溶解,定容;再精密量取1 ml置于10 ml量瓶中,用流动相稀释并定容,得到浓度约为50 μg/ml的对照品溶液。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(Spherisorb ODS2 C₁₈柱,250 mm×4.6 mm,5.0 μm);以乙腈-冰醋酸-水(20:4:80)为流动相;检测波长为257 nm。理论板数按芦丁峰计算应不低于2 000。分别精密吸取对

照品溶液与供试品溶液各10 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图。供试品溶液色谱图中有与芦丁保留时间一致的色谱峰,按外标法以峰面积计算,槐米中含芦丁15.92%,符合药典规定的槐米中芦丁含量不低于15%的要求。

2.2 槐米中芦丁的提取与精制 称取20.02 g的槐米置于烧杯中,加入200 ml开水,直火加热至使其沸腾,30 min后趁热滤过,重复3次。每次趁热滤过并合并滤液后静置。48 h后抽滤,用蒸馏水洗滤渣得到芦丁粗制品。之后将其置于圆底烧瓶中,加200 ml工业乙醇冷凝回流20 min,趁热抽滤。滤液于65℃旋转蒸发至50 ml左右,然后将其倒入烧杯中冷却析晶,最后进行抽滤及干燥,得芦丁精制品,称重为1.91 g。

2.3 芦丁精制品的含量测定 精密称取芦丁精制品50 mg,置于100 ml容量瓶中,加甲醇溶解定容;再精密量取1 ml,置于10 ml容量瓶中,用流动相稀释并定容,得供试品溶液(按此步骤配制3份,并于进样前用微孔滤膜过滤)。精密称取芦丁对照品50 mg,置于100 ml容量瓶中,加甲醇溶解,定容;再精密量取1 ml置于10 ml容量瓶中,用流动相稀释并定容,得浓度约为50 μg/ml的对照品溶液。按照“2.1.4”项下色谱条件,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图。按外标法以峰面积计算,芦丁含量为89.02%。故芦丁提取率为53.35%,计算公式如下:

芦丁提取率=

$$\frac{\text{芦丁精制品质量} \times \text{精制品中芦丁的含量}}{\text{槐米质量} \times \text{槐米中芦丁的含量}} \times 100\%$$

2.4 芦丁药效学实验 断头处死大鼠,迅速取胸主动脉,置于通以95% O₂和5% CO₂混合气体的K-H液中,小心去除周围结缔组织后将血管剪成2~3 mm宽的血管环,避免过度牵拉,以防损伤内皮。将血管环放入含K-H液的浴槽内,调节静息张力,在37℃下稳定一段时间。

用Ach检验血管内皮活性:待动脉环稳定后,换液1次,浴槽中加入10 μmol/L的NE,收缩达峰值15 min后,加入10 μmol/L的Ach,若加Ach后使NE预收缩的血管舒张60%~90%,可认为内皮完整;反之,则认为内皮被破坏。

NE(10 μmol/L)预收缩达稳态后,加入芦丁对照品,使灌流液中药物浓度达80 μmol/L。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组之间的比较采用非成对的t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果见图1,与对照组相比,加入NE后,血管张

力明显升高,说明主动脉环收缩;与NE组相比,加入芦丁使血管张力明显下降,说明主动脉环舒张。证明芦丁对离体大鼠的胸主动脉环可能有舒张作用。

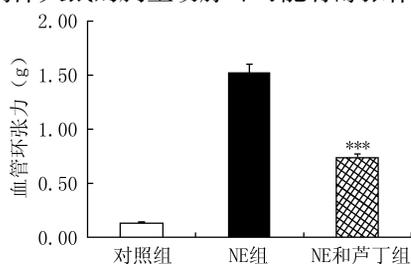


图1 芦丁对主动脉环张力的影响 (n=4)
*** P<0.001,与NE组比较

2.5 芦丁片剂的制备与评价 采用粉末直接压片法,芦丁片剂的处方量见表1。称取芦丁及各种辅料,分别过80目筛,混匀,粉末直接压制成10mm片剂,预计得到芦丁含量为40mg/片的片剂。制得的片剂表面光洁、色泽均匀一致、无杂质、无异物(图2)。

表1 芦丁片剂处方(100片)

成分	用量(m/g)
芦丁	4.0
可压性淀粉	3.6
硬脂酸镁	0.2
羟丙基甲基纤维素(HPMC)	2.4
微晶纤维素(MCC)	0.4

注:芦丁购自大连美仑生物技术有限公司

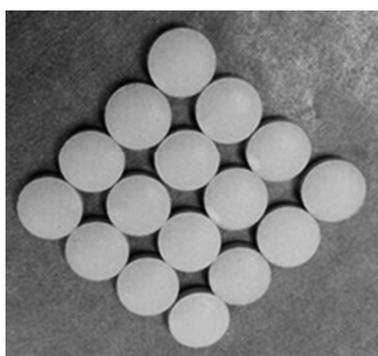


图2 芦丁片剂外观

2.6 芦丁片剂的检查

2.6.1 片重差异 随机精密称定20片芦丁片,计算平均片重,片重差异<5.1%,符合药典规定。

2.6.2 硬度 随机取6片,用片剂四用测定仪测定,其平均硬度为(490±50)kPa。

2.6.3 芦丁含量 取20片制备好的芦丁片剂,充分研细,精密称取细粉适量(相当于芦丁10mg),置

于50ml量瓶中,加入适量甲醇,振荡,使芦丁溶解,继续加入甲醇稀释并定容至刻度,滤纸滤过,取续滤液1.3ml,用甲醇定容至25ml量瓶中,得供试品溶液。精密称取芦丁对照品10mg于50ml量瓶中,甲醇定容;再从中取1.3ml置于25ml量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,得到浓度约为10.4μg/ml的对照品溶液。选择257nm为测定波长,用紫外分光光度计测定供试品、对照品溶液的吸光度。按外标法以吸光度计算,芦丁含量表示为标示量的百分含量,为95.86%。

2.6.4 释放度 采用篮法,溶出介质为新鲜蒸馏水,约900ml;温度37℃;转速100r/min;取样品6片,分别放入篮中,从转篮降入容器立即开始计时。选取时间点为1、2、4、6、8、10、12h。吸取溶液适量,立即过滤,精密量取续滤液1.3ml置于25ml量瓶中,甲醇稀释定容,得供试品溶液。精密称取芦丁对照品10mg于50ml量瓶中,甲醇定容;再从中精密量取1.3ml置于25ml量瓶中,甲醇稀释定容,得浓度约为10.4μg/ml的对照品溶液。取适量供试品溶液、对照品溶液测定吸光度。按外标法以吸光度计算平均累积溶出百分比(%),结果见图3。

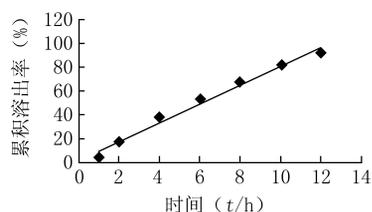


图3 12h内芦丁片剂平均累积溶出率

3 讨论

3.1 文献检索 文献的可行性及真实性会影响实验方案的设计。例如,在查阅有关芦丁药理学方面的文献时,宋必卫等^[8]介绍芦丁有镇痛作用,但是该文发表时间较为久远并且之后未见有类似报道,实验的可操作性和可重复性可能存在问题,尽管镇痛实验操作简便、结果便于观察,但在最终设计芦丁的药效学实验时,并未借鉴这篇文献的思路。

3.2 实验实施

3.2.1 槐米的质量评价 药典及相关文献显示,生槐米中芦丁含量较高,且原药材来源简单,可以作为芦丁的提取原料^[1,9]。本实验中需注意的是,供试品制备时加入甲醇的量要严格控制,在超声提取前后要精密称量,准确补足因超声引起的甲醇重量的减少。最初的实验由于未能重视这一环节,加入过多的甲醇,导致芦丁浓度降低,结果不准确。

3.2.2 槐米中芦丁的提取精制与含量测定 采用水提醇沉法提取精制槐米中的芦丁,然后检测精制品中芦丁的含量,计算其提取率。从原药材中提取芦丁 1.91 g,精制品芦丁含量为 89.02%,提取率仅为 53.35%。经过分析发现,提取率低的原因主要是趁热过滤这一步骤出现问题,由于当时室温较低,加之操作不熟练,导致部分产物析出,从而得到的芦丁精制品的量较少。此外,芦丁作为植物来源的药物,在提取过程中会带入其他成分的杂质,部分杂质具有与芦丁近似的溶解性^[10],并且加热提取常生成一些水解产物^[11]。实验过程中由于实验设备、实验时间等的限制,未能采取有效的提取步骤和高效的纯化步骤,故芦丁提取率较低,并且精制品内芦丁含量不高。

3.2.3 芦丁的药效学 通过调研文献,我们了解到芦丁具有抗自由基活性、抗脂质过氧化作用、血管舒张作用、抗病毒作用、拮抗血小板活化因子作用等多种生物学活性^[5]。考虑到实验室设备、实验时间及实验操作的简便性等因素,在保证文献真实可靠的情况下,我们选择检测芦丁的血管舒张作用作为其药效学实验的考察对象。为避免芦丁含量不准确所产生的影响,药效学实验中我们选用芦丁对照品。实验中应注意,将大鼠主动脉剪成 2~3 mm 宽的血管环时,避免过度牵拉,以防损伤内皮。原因是芦丁在一定浓度范围内对内皮完整的离体大鼠胸主动脉环具有舒张作用,而对 NE 预收缩后内皮去除动脉环的血管张力无明显影响^[4]。此外,实验中 1 000 ml K-H 液含 NaCl 6.92 g、KCl 0.35 g、CaCl₂ 0.28 g、KH₂PO₄ 0.16 g、MgSO₄ 0.29 g、NaHCO₃ 2.1 g 和葡萄糖 2.0 g,配制时应注意 CaCl₂、NaHCO₃、MgSO₄ 需分别溶解后再与其他溶液混合,否则易产生沉淀,影响药效学结果。本实验因条件所限存在的不足:实验应多设几组,每组加入不同量的芦丁,使灌流液中芦丁浓度形成梯度,以检测芦丁是否在一定浓度范围内对内皮完整的主动脉环具有浓度依赖性的舒张作用。此外,还应增设内皮损伤组,以验证芦丁对 NE 预收缩后内皮去除动脉环的血管张力无明显影响。

3.2.4 芦丁片剂的制备与评价 由于实验自制的芦丁含量不高,产率有限,故制备芦丁片剂时采用大连美仑生物技术有限公司提供的芦丁。为改善芦丁在水中溶解度低和在生物体内稳定性差的问题,提

高其药理活性,研究人员对芦丁的剂型做了改进^[12]。普通芦丁片剂的芦丁含量较低,需服 3~4 次/d,每次 1~2 片,血药浓度不稳定,增加了药物不良反应,患者用药依从性较低。故本实验将其制成缓释片。对制得的片剂需进行质量检查,包括外观形状、片重差异、崩解时限、溶出度或释放度、含量均匀度等。药典规定每片主药标示量不大于 25 mg 或每片含量不大于 25% 时,均应检查其含量均匀度^[13]。本实验制备的芦丁片剂的标示量为 40 mg/片,每片芦丁含量为 37.74% (>25%),所以本实验不涉及含量均匀度的检查。对于缓释制剂一般都需检查释放度。对已检查释放度的制剂不再进行崩解时限的检查^[13]。由于实验时间的限制,检测片剂中芦丁含量及不同时间的释放度时,未采用之前含量测定所用的高效液相色谱法,使用的是操作较为简便但同样灵敏的紫外分光光度法^[6]。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2010 年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:333-334.
- [2] 童婧,郭晓蓉,房文亮,等.槐米中芦丁提取工艺研究[J].中外医疗,2011,26:41-42.
- [3] 李飞,李秋红,李廷利.槐米有效成分含量测定方法研究进展[J].中医药信息,2008,25(4):19-21.
- [4] 周新妹,姚慧,夏满莉,等.槲皮素与芦丁对离体大鼠主动脉环的舒张作用及机制[J].浙江大学学报(医学版),2006,35(1):29-33.
- [5] 臧志和,曹丽萍,钟铃.芦丁药理作用及制剂的研究进展[J].医药导报,2007,26(7):758-760.
- [6] 李淑云.紫外分光光度法测定芦丁控释片含量[J].中国医药指南,2010,8(35):196-196.
- [7] 陈代勇,赵森,臧志和,等.制片工艺对芦丁缓释骨架片释药机制影响研究[J].西南国防医药,2003,13(6):598-600.
- [8] 宋必卫,马传庚,田薇,等.芦丁的镇痛作用[J].安徽医科大学学报,1995,30(3):177-179.
- [9] 赵红丹,王卓,王巍,等.炮制对槐米中芦丁含量的影响[J].吉林医学学院学报,2010,31(6):330-332.
- [10] 王玉枝,旷亚非,彭琳,等.食疗食补功效的重要物质——芦丁[J].大学化学,2010,25(B04):109-113.
- [11] 黄尚荣.药用芦丁化学成分提取方法及其药理学研究进展[J].现代农业科技,2009,23:100-103.
- [12] 艾凤伟,李诗莹,成效天,等.芦丁制剂的研究新进展[J].中成药,2012,34(7):1347-1350.
- [13] 崔福德.药剂学[M].北京:人民卫生出版社,2011:266,490.

【收稿日期】 2014-06-25 【修回日期】 2015-01-12

【本文编辑】 李睿呈