

· 药物制剂与药品质量控制 ·

丹参提取物中脂溶性成分检测及体外溶出行为考察*

高秀容, 许小红, 杨恒博, 张旭, 李望, 汪少

(成都医学院药学院, 成都 610083)

摘要 目的 建立丹参脂溶性成分丹参酮 I、丹参酮 II_A 及隐丹参酮高效液相色谱(HPLC) 同步测定方法, 并考察其体外溶出行为。方法 选用 Agilent HC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水(含 0.1% 甲酸)为流动相梯度洗脱, 同时测定丹参酮 I、丹参酮 II_A 及隐丹参酮含量, 考察十二烷基硫酸钠(SDS) 浓度、溶出液 pH 值和溶出仪转速对 3 种成分溶出行为的影响。结果 丹参酮 I 回归方程为 $Y = 0.202 3X + 0.296 7$ ($R^2 = 0.999 2$), 线性范围为 1.45 ~ 93.00 μg · mL⁻¹; 丹参酮 II_A 回归方程为 $Y = 0.445 6X + 0.527 2$ ($R^2 = 0.999 4$), 线性范围 1.29 ~ 82.50 μg · mL⁻¹; 隐丹参酮回归方程为 $Y = 0.131 8X + 0.000 2$ ($R^2 = 1.000$), 线性范围 0.90 ~ 57.50 μg · mL⁻¹, 方法精密度和回收率均良好, 随着溶出液中 SDS 浓度的增加, 3 种脂溶性成分溶出度逐渐增加, 溶出液 pH 值及溶出仪转速对 3 种成分的体外溶出均无显著影响。结论 所建立的 HPLC 方法能准确、灵敏地同时检测丹参 3 种脂溶性成分, SDS 的加入能促进丹参 3 种脂溶性成分的溶出, 溶出液的 pH 值和溶出仪转速对 3 种成分的体外溶出无影响。

关键词 丹参脂溶性成分; 色谱法, 高效液相; 溶出, 体外

中图分类号 R282.71; R927.2

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2019)01-0079-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.01.018

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Determination of Lipophilic Components in Extracts of Salvia Miltiorrhiza and Investigation of Its Dissolution Behavior *In Vitro*

GAO Xiurong, XU Xiaohong, YANG Hengbo, ZHANG Xu, LI Wang, WANG Shao (School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT **Objective** To establish a method of simultaneous determination of tanshinone I, tanshinone II_A and cryptotanshinone, three liposoluble constituents of Salvia miltiorrhiza and investigate its dissolution behavior *in vitro*. **Methods** An HPLC gradient elution method and Agilent HC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used in this study the mobile phase was acetonitrile-water(0.1% acetate acid). Contents of the three liposoluble components were determined simultaneously. And the effects on the three liposoluble components of the SDS concentration, the pH value and the rotation speed of dissolution apparatus were investigated. **Results** The corresponding linear equation for tanshinone I was $Y = 0.202 3X + 0.296 7$ ($R^2 = 0.999 2$), the linear range was 1.45~93.00 μg · mL⁻¹; the corresponding linear equation for tanshinone II_A was $Y = 0.445 6X + 0.527 2$ ($R^2 = 0.999 4$), the linear range was 1.29~82.50 μg · mL⁻¹; the corresponding linear equation for cryptotanshinone was $Y = 0.131 8X + 0.000 2$ ($R^2 = 1.000$), the linear range was 0.90~57.50 μg · mL⁻¹. The method had well accuracy and recovery rate, with the increase of SDS concentration in the solution, the dissolution rate three liposoluble components increased gradually. There was no significant effect on the dissolution of the three components *in vitro* by the pH value of the solution and the rotating speed of the dissolution apparatus. **Conclusion** The established HPLC methods can detect three liposoluble components of Salvia miltiorrhiza accurately and sensitively. The addition of SDS can promote the dissolution of three liposoluble components of Salvia miltiorrhiza. The pH value of the dissolution solution and the rotational speed of dissolution apparatus had no effects on the dissolution of the three components *in vitro*.

KEY WORDS Lipophilic components of *Danshen*; Chromatography, high performance liquid; Dissolution, *in vitro*

丹参(*Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhiza*)为唇型科植物丹参的干燥根及根茎, 作为活血化瘀药有悠久的临床应用历史, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦的功效^[1]。大量研究证实, 丹参主要含有脂溶性和水溶性两大类成分, 隐丹参酮、丹参酮 I 及丹参酮 II_A 为脂溶性成分, 是丹参中含量最高也是最具代表性的主要成分, 丹参药材中丹参酮 II_A 含量较高, 为 0.1% ~ 0.9%, 因而丹参酮 II_A 曾经一直作为丹参有效成分的

质量控制指标, 在《中华人民共和国药典》2015 年版中也以丹参酮 II_A 为丹参药材和丹参注射液的定性定量控制标准^[2-3]。

目前, 以脂溶性有效成分为主入药的丹参口服制剂品种有复方丹参滴丸、丹参酮片、丹参酮胶囊、丹参酮油、丹参舒心胶囊、丹参舒心片和精制冠心病片等^[4]。体外溶出行为是口服制剂处方工艺筛选的重要指标, 也是有效控制制剂质量的重要指标。而丹参脂溶性成

分的低水溶性是影响口服固体制剂溶出度的一个重要因素,从而影响丹参口服生物利用度^[5-8],笔者以丹参酮 I、丹参酮 II A 及隐丹参酮为指标成分,建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定丹参提取物中丹参酮 I、丹参酮 II A 及隐丹参酮含量的方法,考察了丹参脂溶性成分的体外溶出行为,筛选其体外溶出条件,以期对丹参脂溶性成分口服制剂的研究开发提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 戴安高效液相色谱仪(美国,Dionex UltiMate3000,包括四元高压液相泵、自动进样器、紫外检测器);色谱软件(戴安液相层析仪软件 Chromeleon 7.1);电子天平(德国 Sartorius,型号:BS 224S,感量:0.01 mg);离心机(上海安亭科学仪器厂,型号:TGL-16G);超声清洗器(天津市奥特赛斯仪器有限公司,型号:AS5150BD);纯水仪(优普超纯科技公司,型号:UPT);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司,型号:DHG-9013A);溶出仪(天津市国铭医药设备有限公司,型号:RC-6)。

1.2 试剂 丹参酮 I 对照品(中国食品药品检定研究院,含量:99.0%,批号:110867-201607);丹参酮 II A 对照品(中国食品药品检定研究院,含量:99.0%,批号:110766-201520);隐丹参酮对照品(中国食品药品检定研究院,含量:99.0%,批号:110852-200806);丹参提取物(陕西慈缘生物技术有限公司,批号:20140401,20140402,20140413);十二烷基硫酸钠(SDS,成都市科龙化工试剂厂,分析纯);磷酸二氢钾(成都市科龙化工试剂厂,分析纯);甲醇(迪马公司,色谱纯);乙腈(迪马公司,色谱纯);无水甲酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯);其他试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Agilent HC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱;流动相:A(0.1%甲酸),B(乙腈),采用梯度洗脱,洗脱顺序为:0~30 min,5%→55% B; >30~40 min,55%→75% B; >40~50 min,75% B; >50~

55 min,75%→5% B;流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 286 nm;柱温 30℃;进样体积 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的各对照品适量于 5 mL 棕色量瓶,甲醇定容,得到贮备液备用。取各储备液适量于 25 mL 量瓶,甲醇定容得到各对照品的混合标准溶液,其中各对照品浓度分别为丹参酮 I 93.00 μg·mL⁻¹,丹参酮 II A 82.50 μg·mL⁻¹,隐丹参酮 57.50 μg·mL⁻¹,冷藏、避光备用。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取一定量丹参提取物至 10 mL 量瓶内,加入一定量甲醇,超声使其完全溶解,10 000 r·min⁻¹(*r*=8.0 cm)离心 5 min 以除去不溶物,甲醇定容后,上清液经孔径 0.22 μm 微孔滤膜滤过后进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性考察 按“2.1”项色谱条件,分别取空白甲醇溶液、对照品溶液和供试品溶液,记录色谱图(图 1),丹参酮 I、丹参酮 II A 和隐丹参酮保留时间分别约为 39,40 和 46 min,丹参酮 I 和丹参酮 II A 分离度为 1.2,隐丹参酮分离度大于 1.5。可见,空白溶液对各成分无干扰,各成分与杂质峰分离度较好。

2.4.2 线性关系考察 取“2.2”项配制的混合标准溶液,用甲醇依次稀释,得以下混合标准品的标准曲线溶液:丹参酮 I 标准曲线浓度为 93.00,46.50,23.25,11.63,5.81,2.91,1.45 μg·mL⁻¹,丹参酮 II A 标准曲线浓度为 82.50,41.25,20.63,10.31,5.16,2.58,1.29 μg·mL⁻¹,隐丹参酮标准曲线浓度为 57.50,28.75,14.38,7.19,3.59,1.80,0.90 μg·mL⁻¹。按“2.1”项色谱条件进样 20 μL,以色谱峰面积(*Y*)对药物浓度(*X*)进行线性回归,绘制标准曲线。

丹参酮 I 回归方程为 $Y=0.202\ 3X+0.296\ 7$ ($R^2=0.999\ 2$),线性范围 1.45~93.00 μg·mL⁻¹;丹参酮 II A 回归方程为 $Y=0.445\ 6X+0.527\ 2$ ($R^2=0.999\ 4$),线性范围 1.29~82.50 μg·mL⁻¹;隐丹参酮回归方程为 $Y=0.131\ 8X+0.000\ 2$ ($R^2=1.000$),线性范围 0.90~57.50 μg·mL⁻¹。结果表明各标准品在考察浓度范围内线性关系良好。

2.4.3 精密度实验 取高、中、低浓度混合对照品溶液,其中丹参酮 I 高、中、低浓度分别为 46.50,11.63,2.91 μg·mL⁻¹,丹参酮 II A 高、中、低浓度分别为 41.25,10.31,2.58 μg·mL⁻¹,隐丹参酮高、中、低浓度分别为 28.75,7.19,1.80 μg·mL⁻¹,在上述色谱条件下,连续进样 5 次,记录峰面积,分别计算峰面积的 RSD。结果丹参酮 I 高、中、低浓度的峰积 RSD 分别为 0.36%,

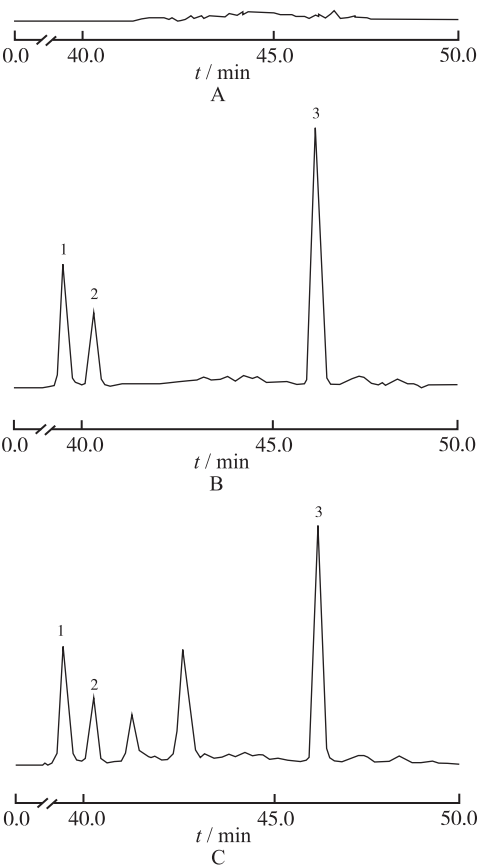
收稿日期 2017-10-19 修回日期 2018-01-08

基金项目 *四川省学术技术带头人后备人选培养基金资助项目

作者简介 高秀容(1978-),女,四川成都人,副教授,硕士生导师,博士,主要从事药物新剂型设计及药物动力学研究。ORCID: 0000-0003-1391-2028。电话:028-62739501, E-mail: gaomuxouzi@126.com。

通信作者 许小红(1974-),男,甘肃泾川人,教授,硕士生导师,博士,主要从事药物新剂型研究。电话:(0)13881965490, E-mail: xoxoho@163.com。

0.54%,0.55%;丹参酮ⅡA 高中低浓度的峰面积 RSD 分别为 0.50%,0.14%,0.32%;隐丹参酮高中低浓度的峰面积 RSD 分别为 0.66%,0.28%,0.45%;说明各成分精密度良好。



A.空白甲醇溶液;B.对照品溶液;C.供试品溶液;1.丹参酮Ⅰ;2.丹参酮ⅡA;3.隐丹参酮

图 1 3 种溶液的 HPLC 图谱

A.methanol solution;B.reference solution ;C.sample solution;
1.tanshinone I ;2 tanshinon II A;3.cryptotanshinone

Fig.1 HPLC chromatograms of three kinds of solution

2.4.4 稳定性实验 取两种浓度混合对照品溶液,其中丹参酮Ⅰ高、低浓度分别为 46.50,2.91 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,丹参酮ⅡA 高、低浓度分别为 41.25,2.58 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,隐丹参酮高、低浓度分别为 28.75,1.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,将该混合对照品溶液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中,于 0,2,4,6,8,12,24,36 h 取样,在上述色谱条件下进样,记录峰面积。结果丹参酮Ⅰ高、低浓度 RSD 分别为 1.15%,1.02%;丹参酮ⅡA 高、低浓度 RSD 分别为 1.01%,0.66%;隐丹参酮高、低浓度 RSD 分别为 0.65%,1.16%,可见,各成分在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 36 h 稳定。

2.4.5 加样回收率实验 取已知含量的提取物,精密称

定 27 份,分成 9 组,每组 3 份。分别加入高、中、低浓度的混合对照品溶液,其中丹参酮Ⅰ高、中、低浓度分别为 46.50,11.63,2.91 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,丹参酮ⅡA 高、中、低浓度分别为 41.25,10.31,2.58 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,隐丹参酮高、中、低浓度分别为 28.75,7.19,1.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按“2.3”项下方法处理,在上述色谱条件下测定。结果丹参酮Ⅰ高、中、低浓度平均加样回收率为 (99.85 \pm 0.034)% ($n=3$),丹参酮ⅡA 高、中、低浓度平均加样回收率为 (100.35 \pm 0.019)% ($n=3$),隐丹参酮高、中、低浓度平均加样回收率为 (100.74 \pm 0.026)% ($n=3$),符合要求。

2.5 丹参提取物中各成分含量测定 取 3 个批号丹参提取物,每个批号分别按“2.3”项下方法平行制备 3 个样品,进行含量测定,在上述色谱条件下测定,记录色谱峰面积,按外标法计算各成分的含量,结果见表 1。

表 1 丹参提取物中各成分含量测定结果
Tab.1 Determination results of each component in the extract of Salvia miltiorrhiza

| 提取物批号 | 丹参酮Ⅰ | 丹参酮ⅡA | 隐丹参酮 |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 20140401 | 0.332 \pm 0.054 | 0.954 \pm 0.068 | 0.544 \pm 0.010 |
| 20140402 | 0.345 \pm 0.033 | 0.886 \pm 0.074 | 0.532 \pm 0.021 |
| 20140413 | 0.310 \pm 0.012 | 0.827 \pm 0.051 | 0.478 \pm 0.038 |

2.6 提取物中各成分体外溶出行为考察 溶出条件:由于丹参脂溶性成分均为水难溶性成分,故选择《中华人民共和国药典》收载的第三法(小杯法)进行溶出实验。释放介质体积为 250 mL,为纯水或不同 pH 值缓冲液,溶出温度为 (37.0 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$,取样时间点为 0,2,4,6,8,10,12 h,每次吸取溶出液 3 mL,取出后及时补加新鲜空白溶出介质 3 mL,溶出液以孔径 0.45 μm 滤膜过滤,续滤液用 HPLC 法进行测定。

2.6.1 SDS 对丹参提取物成分溶出行为的影响 对于水溶性较差的药物,可在释放介质中加入表面活性剂促进药物溶出^[5],故本实验考察了 0.0%,0.3%,0.5%,0.7%和 0.9% SDS 对丹参脂溶性成分丹参酮Ⅰ、丹参酮ⅡA 和隐丹参酮溶出行为的影响。释放介质为 pH 值 6.8 磷酸盐缓冲液,转速 75 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,实验结果见图 2~4。

由图 2~4 可知,当溶出液中不加入 SDS 时(即 SDS 浓度 0.0%),溶出液中未能检测上述 3 种成分;随着溶出液中 SDS 浓度增加,3 种脂溶性成分溶出度逐渐增加,可见 SDS 对上述 3 种成分溶出行为有显著影响。由于一般要求溶出介质中 SDS 浓度<0.5%,故在后续实验中选择 SDS 浓度为 0.5%继续进行考察。

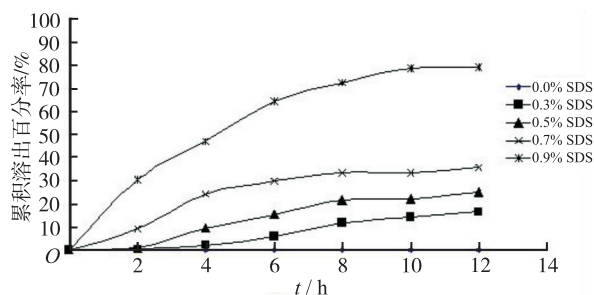


图2 不同浓度 SDS 对丹参酮 I 溶出行为的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of SDS on the dissolution behavior of tanshinone I

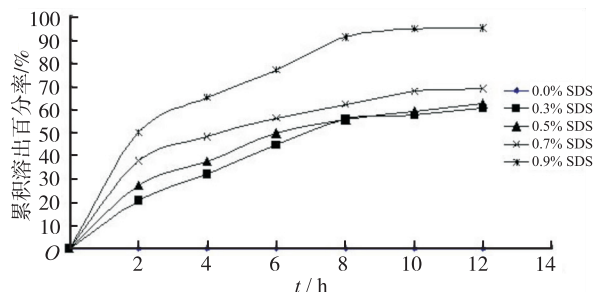


图3 不同浓度 SDS 对丹参酮 II A 溶出行为的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of SDS on the dissolution behavior of tanshinon II A

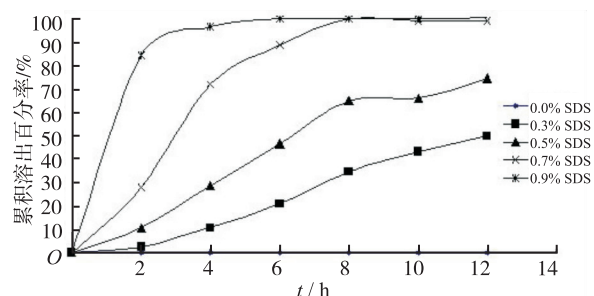


图4 不同浓度 SDS 对隐丹参酮溶出行为的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of SDS on the dissolution behavior of cryptotanshinone

2.6.2 不同 pH 值对丹参提取物溶出行为的影响 考察丹参酮 I、丹参酮 II A 和隐丹参酮在纯化水、pH 值 4.0、pH 值 6.8 和 pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液中的溶出行为。释放介质 SDS 浓度为 0.5%、转速 $75 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时实验结果见图 5~7。

由图 5~7 可知,溶出介质的 pH 值对丹参酮 I、丹参酮 II A 和隐丹参酮的溶出行为无显著影响,美国食品药品监督管理局(FDA)规定,以 pH 值 6.8 与人体肠液相似,此 pH 值更符合药物经口服后的体内环境^[9],故在后续实验中采用 pH 值 6.8 磷酸盐缓冲液为溶出介质。

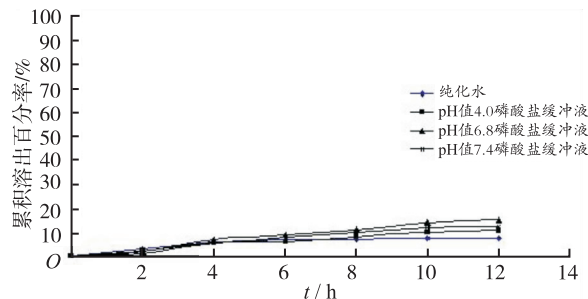


图5 不同 pH 值溶出液对丹参酮 I 溶出行为的影响

Fig.5 Effect of different pH solution on the dissolution behavior of tanshinone I

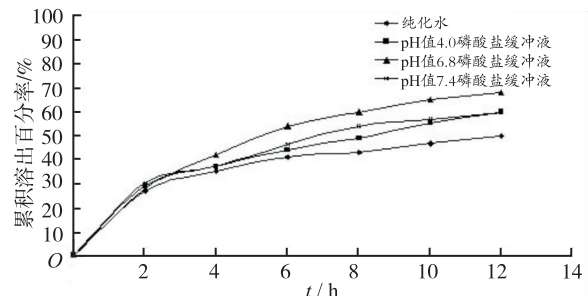


图6 不同 pH 值溶出液对丹参酮 II A 溶出行为的影响

Fig.6 Effect of different pH solution on the dissolution behavior of tanshinon II A

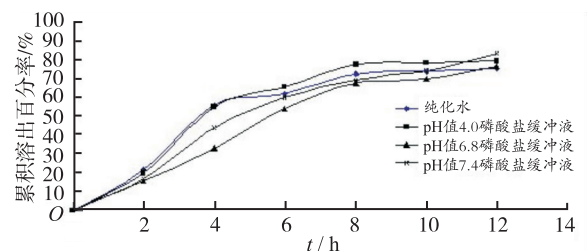


图7 不同 pH 值溶出液对隐丹参酮溶出行为的影响

Fig.7 Effect of different pH solution on the dissolution behavior of cryptotanshinone

2.6.3 转速的影响 由于丹参脂溶性成分均为水难溶性成分,本实验采用提高溶出仪转速的方法提高其溶出度,分别考察 3 种成分在 $50, 75$ 和 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下的溶出行为,结果见图 8~10。

由图 8~10 可知,溶出仪转速对丹参酮 I、丹参酮 II A 和隐丹参酮的溶出行为无显著影响,说明这 3 种成分的溶出特性受释放介质流动状态影响较小。

3 讨论

由于丹参 3 种脂溶性成分结构相似,尤其是隐丹参酮和丹参酮,所以 HPLC 很难将二者达到基线分离,

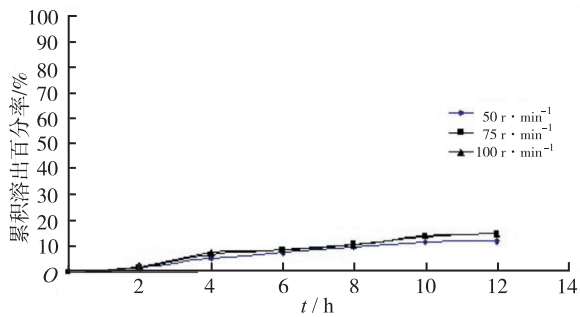


图 8 不同转速对丹参酮 I 溶出行为的影响

Fig. 8 Effect of different rotational speed on the dissolution behavior of tanshinone I

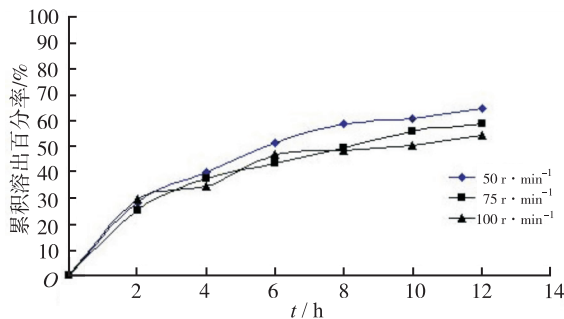


图 9 不同转速对丹参酮 II A 溶出行为的影响

Fig. 9 Effect of different rotational speed on the dissolution behavior of tanshinone II A

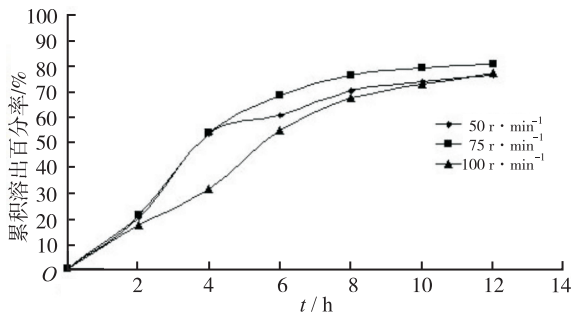


图 10 不同转速对隐丹参酮溶出行为的影响

Fig. 10 Effect of different rotational speed on the dissolution behavior of cryptotanshinone

所以本实验采用梯度洗脱的方法,最终分离度良好,成功对三者进行分析。

由于丹参脂溶性成分均为水难溶性成分,在溶出介质中浓度较低,故选择《中华人民共和国药典》2015 年版收载的第三法——小杯法进行溶出实验,实验结果显示,该方法适宜作为丹参脂溶性成分溶出行为的研究。

在实验中,曾考察除 SDS 之外的其他表面活性剂对丹参 3 种脂溶性成分的溶出行为的影响,如聚山梨酯-80,结果显示聚山梨酯-80 对 3 种成分溶出行为无影响(数据未列出),最终筛选出 SDS 为作为溶出介质。

本实验以丹参酮 I、丹参酮 II A 及隐丹参酮为丹参脂溶性成分的指标成分,成功建立了 HPLC 方法同时测定丹参提取物中丹参酮 I、丹参酮 II A 及隐丹参酮含量,考察了丹参脂溶性成分的体外溶出行为,筛选其体外溶出条件,为丹参脂溶性成分口服制剂的研究开发提供研究基础。

参考文献

- [1] 王本祥.现代中药药理学[M].天津:天津科学技术出版社,1996:880-887.
- [2] 郭增军.丹参提取物中有效成分的质量控制及药动学研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2008:7-8.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:76-77.
- [4] 张涛,张娟红,徐丽婷.中药丹参类制剂临床研究及应用进展[J].实用药物与临床,2015,18(3):330-334.
- [5] 叶雯,王永禄,李学明.生物药剂学分类系统在难溶性药物处方设计中的应用[J].中国医院药学杂志,2013,33(7):568-570.
- [6] 赵学友.响应面法优化川丹参总黄酮提取工艺及其体外抗氧化活性评价[J].中国现代应用药学,2017,34(5):686-691.
- [7] 张晓景,王英瑛,李俊.多波长 HPLC 梯度洗脱法同时测定眠安宁合剂中 7 个有效成分含量[J].中国现代应用药学,2015,32(2):194-198.
- [8] 章靓,严国鸿,江川,等.反向分子对接方法预测丹参酮 II B 抗血小板潜在作用靶标[J].中国现代应用药学,2017,34(2):221-224.
- [9] 张继稳.缓控释制剂药物动力学[M].北京:科学出版社,2009:54-55.