

不同厂家复方丹参片物质组溶出度研究

严婷¹, 黄方威¹, 王金钱², 罗晓健^{1,3}, 范玫玫^{1,3}, 王跃生^{1,3,4*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 中国中医科学院, 北京 100700

3. 江西中医学院 中药固体制剂制造技术国家工程中心, 江西 南昌 330006

4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘要: 目的 建立测定复方丹参片三组物质组(多指标物质组、指纹物质组、有效部位物质组)溶出度检测方法,并考察不同厂家复方丹参片物质组溶出度的情况。方法 按照《中国药典》2010年版二部附录XC溶出度测定第三法,以200 mL水为溶出介质进行溶出实验,并采用高效液相及紫外分别检测三组物质组的体外溶出度,绘制累积溶出曲线,且对各曲线进行相似因子的比较。结果 测定结果显示在60 min内除物质组一中丹参酮II_A的溶出仅为23.41%外,其他物质组均能溶出95%以上,且不同厂家复方丹参片物质组溶出曲线相似因子 f_2 值大多小于50。结论 复方丹参片三组物质组的溶出度总体呈良好的相关性,故可作为质量检测的标准之一。不同厂家复方丹参片物质组的溶出度存在显著性差异,这可能是由于各厂家生产工艺不尽相同所致,因此建议中成药的质量控制应增加主成分或适宜物质组的溶出度检测。

关键词: 复方丹参片; 溶出度; 物质组

中图分类号: R944.4

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)06-0442-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.06.010

Study on dissolution of multi-components in Compound Danshen Tablets from different manufacturers

YAN Ting¹, HUANG Fang-wei¹, WANG Jin-qian², LUO Xiao-jian^{1,3}, FAN Mei-mei^{1,3}, WANG Yue-sheng^{1,3,4}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China

3. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

4. Institute of Chinese Materia Medica China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To establish the methods for determining the dissolution of three material groups (multi-index material group, fingerprint substance group, and effective parts group) of Compound Danshen Tablets (CDT), and study the dissolution condition of CDT from different manufacturers. **Methods** According to the appendix XC of *Chinese Pharmacopoeia 2010*, 200 mL water was used as dissolution medium. HPLC and UV were used to detect the *in vitro* dissolution in the three groups of substances, respectively, cumulative dissolution curves were drawn and similar factors of the curves were compared. **Results** In addition to the first group of tanshinone II_A, the dissolution was only 23.41%, dissolution in the other groups were all over 95% within 60 min. Furthermore, the similarity factor (f_2) values of the dissolution profile from different manufacturers were mostly less than 50. **Conclusion** The dissolution in the three groups of substances totally shows the good correlation, so it can be used as a criterion for quality testing. The material group dissolution of CDT from different manufacturers has significant differences, which may be due to the different production process, so the dissolution testing of main components or appropriate groups of substances should be included in the quality control of Chinese patent medicine.

Key words: Compound Danshen Tablets; dissolution; groups of substances

复方丹参片是临床上常用的中成药制剂,由丹参、三七、冰片3味中药组成,用于活血化瘀、理气止痛。丹参在我国医疗上应用历史悠久,功效甚广。传统医学记载,丹参性寒、味苦,归心经、心

收稿日期: 2013-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(H2804)

作者简介: 严婷(1989—),女,在读硕士,研究方向为药物制剂。Tel: 15079195687 Fax: (0791)87119610 E-mail: 745689184@qq.com

*通信作者 王跃生 Tel: 13501075828 E-mail: Wylw915@126.com

包经,专走血分。丹参能通血脉,功擅活血化瘀,故俗称“一味丹参抵四物”^[1]。该制剂为《中国药典》2010年版收载品种,标准中未收载溶出度检查项,且有关复方丹参片质量控制的研究多针对指标成分丹参素、原儿茶醛、丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸B、三七皂苷等单个或多个成分的溶出度测定,而未见对不同物质组溶出度测定的研究。为了有效的控制药品质量,本实验采用高效液相色谱法及紫外-可见分光光度法,测定5个厂家同类产品的体外溶出度,并进行比较,为改进生产工艺、评价产品的内在质量提供依据,并提供了复方丹参片物质组溶出度的检测方法。

溶出度是评价固体制剂生物利用度的体外方法,是考察制剂内在质量指标之一。但由于中药复方制剂的复杂特殊性,本课题组将复方丹参制剂物质组初步定为3组^[2-8]。物质组一:多指标成分物质组,选取亲水性相差较大的3个成分(丹参素、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A)作为研究对象,通过考察3个成分的整体溶出行为预测复方丹参制剂的溶出行为;物质组二:指纹图谱物质组,通过对尽可能多的可检测成分的体外溶出行为的研究,来表示复方丹参制剂的溶出行为;物质组三:有效部位物质组,对一个大类成分的溶出行为研究,来表示复方丹参制剂的溶出行为。

1 仪器与试药

1.1 试药

复方丹参片(A厂,批号100904;B厂,批号110201;C厂,批号101218;D厂,批号100707;E厂,批号10A003);丹参素钠、丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110855-200901、111562-201212、110769-201012);甲醇(分析纯、色谱纯);纯乙腈(色谱纯);氯仿(分析纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂);乙酸乙酯(色谱纯);磷酸(分析纯);重蒸水。

1.2 仪器

SHIMADZU SCL—10AVP 高效液相色谱仪(SPD—M10AVP 紫外检测器、SIL—10ADVP 自动进样器、CTO—10ASVP 柱温箱);色谱柱 Hypersil ODS2(柱号:E2214424;4.6 mm×250 mm,5 μm;批号:11015);RCZ—8A 智能药物溶出仪(天津精密仪器厂);BSZ100S—型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 丹参素色谱条件 流动相为乙腈-0.026%磷酸水(7:93);检测波长280 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温25℃;进样量20 μL。

2.1.2 丹酚酸B色谱条件^[3] 流动相为乙腈-甲醇-甲酸-水(10:30:1:59);检测波长286 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温25℃;进样量20 μL。

2.1.3 丹参酮Ⅱ_A色谱条件^[3] 流动相为甲醇-水(73:27);检测波长270 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温25℃;进样量20 μL。

2.1.4 复方丹参片指纹图谱色谱条件 流动相A为0.026%磷酸水,B为乙腈;梯度洗脱:0~40 min,98%~54% A;检测波长203 nm;体积流量1.0 mL/min;柱温25℃;进样量20 μL。

2.1.5 紫外检测条件 在200~400 nm波长扫描,选取278、284、291 nm波长处的吸光度,作为有效部位物质组标准浓度的吸光度值。

2.2 溶液配制

2.2.1 丹参素对照品溶液制备 取丹参素钠对照品适量,精密称定,加75%甲醇制成82 μg/mL的溶液,即得。

2.2.2 丹酚酸B对照品溶液制备 取丹酚酸B对照品适量,精密称定,加水制成35 μg/mL的溶液,即得。

2.2.3 丹参酮Ⅱ_A对照品溶液制备 取丹参酮Ⅱ_A对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇制成74 μg/mL的溶液,即得。

2.2.4 复方丹参片含测用供试品溶液制备 取复方丹参片10片,去包衣膜,精密称定,研细,取0.15 g,精密称定,置50 mL量瓶中,加70%甲醇溶液适量,超声处理30 min,放冷,加70%甲醇至刻度,摇匀离心,取上清液即得。

2.2.5 复方丹参片物质组标准储备液制备^[2] 取复方丹参片1片,去包衣膜,精密称定,取蒸馏水20 mL,加入研钵,将片剂水研法研匀,再以180 mL蒸馏水,将片剂混悬液分次洗入溶出杯中(标记液面高度),在37℃、75 r/min转速下,以浆法装置搅拌10 h,以蒸馏水补至原液面高度,取样5 000 r/min离心15 min,上清液以0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,即得复方丹参片物质组标准储备液,并以单位1表示复方丹参片物质组标准谱浓度。

2.3 复方丹参片溶出度试验

取复方丹参片1片(约0.32 g/片)精密称定,

按照《中国药典》2010年版二部附录XC溶出度测定第三法,以200 mL水为溶出介质进行溶出试验。转速75 r/min,温度37℃,于10、15、20、30、40、60 min分别取样2次,取样后及时补充相应量溶出介质。第一次取样2 mL用0.45 μm微孔滤膜过滤,作供试液I,用于检测丹参素、丹酚酸B及物质组二、三;第二次取4 mL,过0.45 μm微孔滤膜于10 mL EP管中,用2 mL氯仿萃取4次,合并萃取液,氮吹干,用1 mL甲醇复容作供试液II,按1项下各指标成分色谱条件进行液相检测,每次进样量20 μL,用于检测丹参酮II_A。

2.4 方法学考察

2.4.1 物质组一方法学考察

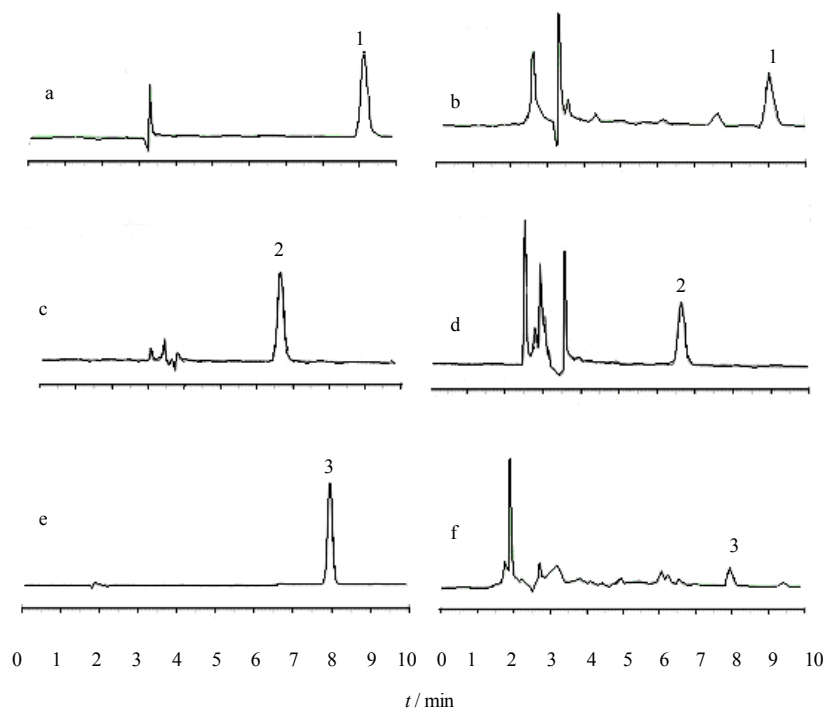
1) 线性关系考察 取“2.2”项下各对照品溶液1、2、5、8、10、15 mL分别置20 mL量瓶中,用溶出介质(蒸馏水)稀释至刻度,混匀后过0.45 μm滤膜,取续滤液按“2.1”项下各指标成分色谱条件进行检测。以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得丹参素回归方程 $Y=654.32X+1.7714$, $r=0.9994$;丹酚酸B回归方程 $Y=423.11X-9.476$, $r=0.9996$;丹参酮II_A回归方程 $Y=1037.41X-4.311$, $r=0.9998$ 。结果表明,

丹参素、丹酚酸B、丹参酮II_A分别在4.12~61.80、1.75~26.25、3.71~55.65 μg/mL与峰面积线性关系良好。色谱图见图1。

2) 精密度实验 取“2.2”项下已配制好的各对照品溶液适量置自动进样器中,按“2.1”项下各指标成分色谱条件分别重复进样检测6次,计算各指标成分6次进样峰面积RSD值。结果各指标成分峰面积的RSD分别为丹参素1.8%、丹酚酸B1.2%、丹参酮II_A2.0%,提示仪器精密度良好。

3) 稳定性实验 取“2.3”项下已配制好的各溶出度供试品溶液(40 min取样)室温下密封保存,于0、2、4、8、16 h取样,按“2.1”项下各指标成分色谱条件进样测定,计算各指标成分在各时间点进样峰面积RSD值。结果各指标成分在各时间点峰面积RSD均低于3.0%,提示样品溶液16 h内稳定性良好。

4) 重复性实验 按“2.3”项下溶出度供试品溶液(40 min取样)制备方法及样品处理方法重复制备6份样品置自动进样器中,按“2.1”项下各指标成分色谱条件进样检测,计算各指标成分在各时间点进样峰面积RSD值。结果各指标成分峰面积RSD值低于2.5%,提示该方法的重复性良好。



1-丹酚酸B, 2-丹参素, 3-丹参酮II_A; a、c、e-对照品, b、d、f-供试品
1- salviatic acid B 2- danshensu 3- tanshinone II_A a, c, e- reference substances b, d, f- samples

图1 复方丹参片多指标成分物质组液相图谱

Fig. 1 Liquid chromatograms of multi-index components in groups of substances of CDT

2.4.2 物质组二方法学考察

1) 物质组标准溶液液相检测 取“2.2.5”项下复方丹参片物质组标准储备液,按“2.1.4”项下复方丹参片指纹图谱物质组色谱条件进行液相检测,记录各所选峰峰面积为复方丹参片物质组中各所选成分浓度为1的检测峰面积。标准图谱峰见图2。

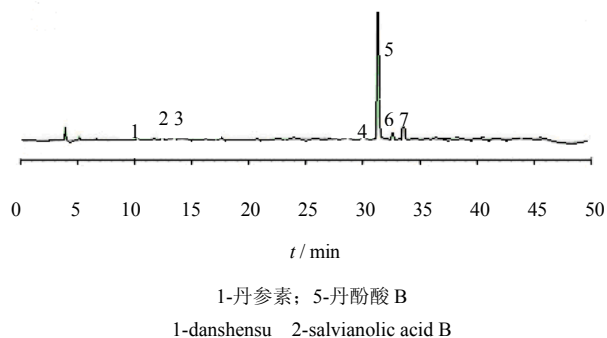


图2 复方丹参片指纹图谱物质组液相图谱

Fig. 2 Liquid chromatogram in groups of substances of CDT fingerprint

2) 线性关系考察 分别精密移取复方丹参片物质组标准储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mL 至 10 mL 量瓶,以蒸馏水稀释定容,摇匀即得到不同浓度的复方丹参片供试液。以蒸馏水为空白对照,按照“2.1.4”项下复方丹参片色谱条件检测,以浓度为横坐标,各所选峰峰面积为纵坐标进行线性回归得 $Y=574.62X-2.9734$,相关系数 $r=0.9993$,结果表明相对浓度在 0.1~1 线性良好,可用于计算。

3) 精密度实验 取“2.2.5”项下配制好的复方丹参片物质组标准溶液置自动进样器中,按“2.1.4”项下色谱条件重复检测 6 次,记录各选定峰峰面积及峰面积之和,计算 6 次测定的各峰峰面积及峰面积之和 RSD 值均低于 3.0%,提示仪器精密度良好,可用于检测。

4) 稳定性实验 取“2.2.5”项下配制好的复方丹参片物质组标准溶液,室温下密封保存,于 0、2、4、8、16 h 取样,按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,计算各时间点各所选峰峰面积 RSD 值。结果各所选峰在各时间点峰面积 RSD 均低于 3.0%,提示样品溶液 16 h 内稳定性良好。

2.4.3 物质组三方法学考察

1) 物质组标准储备液浓度测定^[9] 取“2.2.5”项下复方丹参片物质组标准储备液,在 200~400 nm 波长范围内扫描,选取 278、284、291 nm 波

处的吸光度,作为有效部位物质组标准浓度的吸光度值。

2) 线性关系考察 分别精密移取复方丹参片物质组标准储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mL 至 10 mL 量瓶,以蒸馏水稀释定容,摇匀即得到不同浓度的复方丹参片供试液。以蒸馏水为空白对照,按照“2.1.5”项下复方丹参片检测,以相对浓度为横坐标,各所选波长处的吸光度为纵坐标进行线性回归,结果表明相对浓度在 0.1~1 线性良好,可用于计算。

3) 精密度实验 取“2.2.5”项下配制好的复方丹参片物质组标准溶液,按“2.1.5”项下紫外分光光度法检测 6 次,记录各选定波长处吸光度值,计算得 6 次测定的各选定波长处吸光度 RSD 值均低于 3.0%,提示仪器精密度良好,可用于检测。

4) 稳定性实验 取“2.2.5”项下配制好的复方丹参片物质组标准溶液,室温下密封保存,于 0、2、4、8、16 h 取样,按“2.1.5”项下方法测定,计算各时间点各所选波长吸光度 RSD 值。结果各检测时间各所波长吸光度 RSD 均低于 3.0%,提示样品溶液 16 h 内稳定性良好。

2.5 溶出实验结果

2.5.1 复方丹参片物质组一溶出试验结果 取“2.3”项下制备的复方丹参片溶出度供试品溶液,依据“2.1”项下各色谱条件进样检测。以复方丹参片含测用供试品溶液中各成分含量测定结果为 100% 溶出,计算各成分在各时间点的累积溶出率,并以各指标成分在各时间点累积溶出率的平均值表示复方丹参片多指标成分物质组在该时间点的累积溶出率,绘制溶出曲线,见图 3。

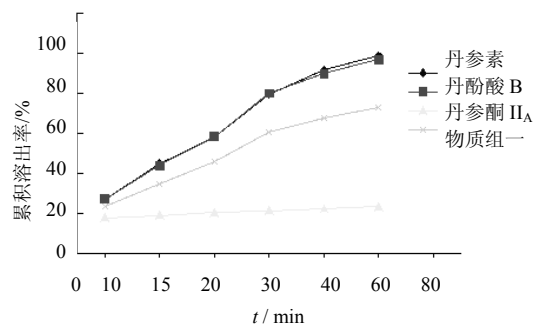


图3 复方丹参片多指标成分物质组体外溶出曲线图

Fig. 3 *In vitro* dissolution curve of multi-index components in groups of substances of CDT

2.5.2 复方丹参片物质组二溶出试验及结果 取“2.3”项下制备的复方丹参片溶出度供试品溶液,

按“2.1.4”项下色谱条件进行液相检测。每次进样量 20 μL , 记录色谱峰, 以复方丹参片储备液中各所选峰峰面积总和作为物质组二 100%溶出的峰面积, 计算相对累积溶出率, 绘制溶出曲线, 见图 4。

2.5.3 复方丹参片物质组三溶出试验及结果 取“2.3”项下制备的复方丹参片溶出度供试品溶液, 按“2.1.5”项下方法进行紫外检测。以复方丹参片储备液为 100%累积溶出率, 计算相对累积溶出率, 绘制溶出曲线, 见图 5。

2.6 5个厂家的复方丹参片物质组体外溶出结果

多指标成分物质组溶出结果见图 6。指纹图谱物质组溶出结果见图 7。有效部位物质组溶出结果见图 8。

2.7 不同厂家样品溶出曲线相似因子拟合

为更精确地分析不同溶出曲线间是否存在差异, 采取相似因子法分析各溶出曲线。相似因子法由 Moore 和 Flanner 首先提出, 并被 FDA 推荐为比较两条溶出曲线的首选方法, 相似因子 f_2 的数学表达式为:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

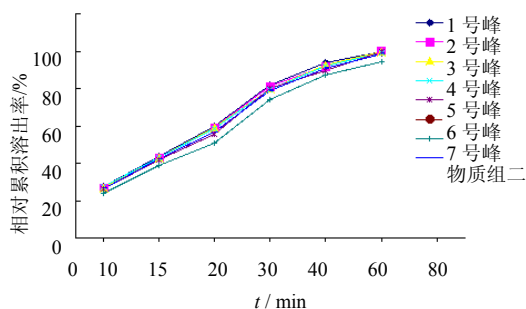


图 4 复方丹参片指纹图谱物质组水中溶出曲线图

Fig. 4 Dissolution curve in groups of substances in water of CDT fingerprint

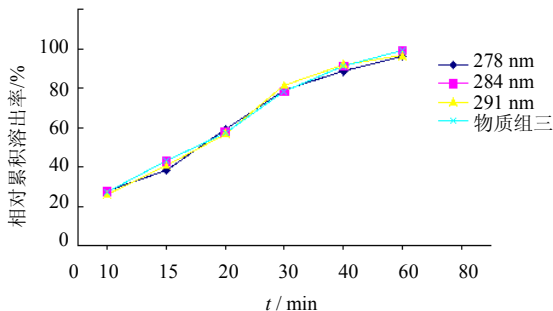


图 5 复方丹参片有效部位物质组水中溶出曲线图

Fig. 5 Dissolution curves of active fractions in groups of substances in water of CDT fingerprint

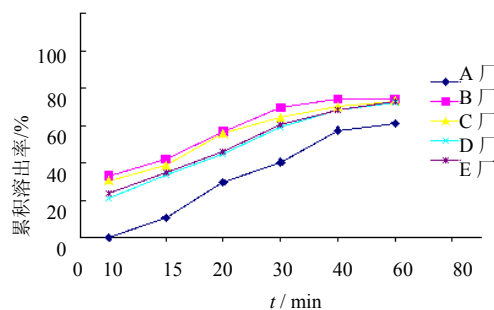


图 6 各厂复方丹参片多指标成分物质组溶出曲线图

Fig. 6 Dissolution curves of multi-index components in groups of substances of CDT from different manufacturers

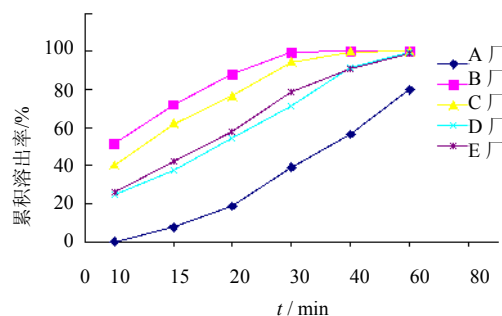


图 7 各厂复方丹参片指纹图谱物质组溶出曲线图

Fig. 7 Dissolution curves in groups of substances of CDT fingerprint from different manufacturers

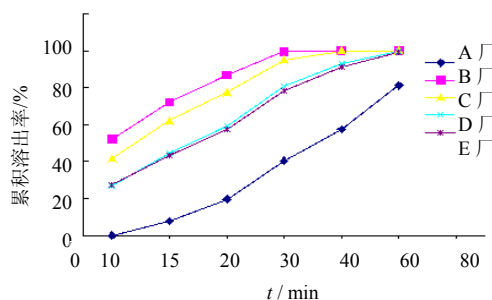


图 8 各厂复方丹参片有效部位物质组溶出曲线图

Fig. 8 Dissolution curves of active fractions in groups of substances in CDT from different manufacturers

f_2 : 相似因子; R_i : t 时间参比制剂累积溶出率; T_i : t 时间受试制剂累积释药率; n : 取点数目。

f_2 值愈接近 100, 相似程度就愈高, 愈接近 0, 相似度愈低。一般认为, 当 f_2 值在 50~100 时, 认为两制剂体外溶出行为无显著性差异。结果见表 1~3。

3 结论与讨论

本文提出 3 种复方丹参片物质组检测评价方法, 方法学考察证明 3 种物质组检测方法准确可靠, 可用于复方丹参片物质组溶出度的测定。结果显示

表1 不同厂家复方丹参片物质组一溶出曲线相似因子拟合结果

Table 1 Fitting results of dissolution curve similarity factors in first group of CDT from different manufacturers

$R_t/\%$	$T_t/\%$				
	A厂	B厂	C厂	D厂	E厂
A厂	100	29.1	31.7	38.2	36.5
B厂	29.1	100	72.5	51.5	54.7
C厂	31.7	72.5	100	58.8	63.2
D厂	38.2	51.5	58.8	100	87.5
E厂	36.5	54.7	63.2	87.5	100

表2 不同厂家复方丹参片物质组二溶出曲线相似因子拟合结果

Table 2 Fitting results of dissolution curve similarity factors in second group of CDT from different manufacturers

$R_t/\%$	$T_t/\%$				
	A厂	B厂	C厂	D厂	E厂
A厂	100	21.4	16.5	26.0	24.2
B厂	13.4	100	54.2	29.8	32.5
C厂	16.5	54.2	100	37.5	41.8
D厂	26.0	29.8	37.5	100	70.0
E厂	24.2	32.5	41.8	70.0	100

表3 不同厂家复方丹参片物质组三溶出曲线相似因子拟合结果

Table 3 Fitting results of dissolution curve similarity factors in third group of CDT from different manufacturers

$R_t/\%$	$T_t/\%$				
	A厂	B厂	C厂	D厂	E厂
A厂	100	13.6	16.5	23.4	24.5
B厂	13.6	100	56.6	34.3	33.1
C厂	16.5	56.6	100	43.3	41.4
D厂	23.5	34.2	43.3	100	85.9
E厂	24.4	33.1	41.4	85.9	100

在复方丹参片多指标成分物质组出现异步溶出(丹参酮II_A的累积溶出仅为23.41%外,其他物质组均能溶出95%以上),其他物质组体外溶出行为表现出较好的一致性。与以多指标成分物质组评价复方丹参制剂体外溶出行为相比,指纹图谱物质组中各成分在整体上表现出了更好的一致性。其原因或许在于,以指纹图谱为基础评价复方丹参制剂体外溶

出行为的指纹图谱物质组所选峰为溶出液中可测成分,并无类似多指标成分物质组中丹参酮II_A这类脂溶性成分,使得物质组中各成分的溶出均受控于药物整体的崩解/溶解而表现出较好的一致性。

本文对五个厂家的复方丹参片3组物质组的溶出度进行了测定,由表1~3拟合结果可知,不同厂家之间物质组一相似度大于50的占不同厂家样品相互拟合组数的68%,物质组二、三均为36%,其中物质组一相似度大于50的组数较大的原因跟物质组一中所选取的指标成分丹参酮有关,由于丹参酮溶出均较低导致物质组一整体数据差距较小从而导致相似度较大,因此通过对物质组一中单一成分的溶出结果进行相似度拟合除丹参酮拟合组数大于50%,其他均在40%以下。说明在所考察的市售复方丹参片样品中不同厂家之间的各物质组溶出曲线均存在很大差异。中药制剂生产多为传统工艺,过程复杂,质量控制标准不够完善,均可能造成产品质量参差不齐。因此有必要增加溶出度检查项目作为质量评价和控制的标准,以确保药品质量和临床疗效的稳定。而物质组用于评价中药制剂的溶出度结果相似度较高且稳定,具有较高可行性,因此对中成药的质量控制可增加相关物质组溶出度的检测。

参考文献

- [1] 张丽丽,解红梅.丹参片溶出度测定研究[J].中国中医药远程教育,2010,8(10):191.
- [2] 凌 昶,张继稳,陈立兵,等.应用中药物质组释放动力学理论研究银翘解毒丸的缓释动力学及其同步性[J].药学学报,2008,43(11):1140-1146.
- [3] 中国药典[S].2010.
- [4] 杨 敏,陈 昕,王秋蓉,等.复方丹参片质量评价方法研究[J].世界科学技术:中药现代化,2010,12(1):107-113.
- [5] 严玉平,同利琪,郭 聪,等.复方丹参片指纹图谱及含量测定研究[J].中成药,2009,31(8):1149-1151.
- [6] 何三民,楼璐璐,葛卫红,等.马钱子散物质组体外释放度评价[J].中华中医药学刊,2011,29(6):1277-1279.
- [7] 郭 桢,凌 昶,张继稳,等.龙胆泻肝丸物质组释放动力学特征研究[J].中草药,2010,41(11):1806-1808.
- [8] 楼云雁,石婷婷,陈立兵,等.复方草珊瑚含片物质组释放动力学特征研究[J].中华中医药学刊,2011,29(6):1287-1289.
- [9] 崔红彬.复方丹参片溶出度测定研究[J].中外健康文摘,2008,5(3):83-84.