

通脉散瘀凝胶提取物平衡溶解度及表观油水分配系数的测定

刘晓燕 马海玲 张咏梅 余 晖 巫静华

(张家港市中医医院江苏省企业研究生工作站, 张家港, 215600)

摘要 目的:测定通脉散瘀凝胶提取物及指标成分在不同溶剂中的平衡溶解度及不同 pH 下的表观油水分配系数,探索通脉散瘀凝胶提取物的溶解性能。方法:采用沉淀法测定提取物的溶解度,以指标成分法测定提取物在不同溶剂中的平衡溶解度以及在正辛醇/水和正辛醇/缓冲液中的表观油水分配系数。结果:37 ℃时提取物在乙醇中的平衡溶解度较大,在缓冲液中呈先减小后增大趋势;以指标成分来看,丹酚酸 B 和丹参素在 pH 缓冲液中溶解度先减小后增大,丹参酮Ⅱ_A和隐丹参酮在 pH 9 时平衡溶解度达到最大;丹酚酸 B 和丹参素的油水分配系数随 pH 增大而减小,丹参酮Ⅱ_A和隐丹参酮在 pH 8 时 lgP 达到最大。结论:通脉散瘀提取物在醇类中的溶解度较大,可考虑在处方中加入适量乙醇提高溶解度;pH 影响提取物的油水分配系数,可通过调节 pH 值来促进其经皮吸收。

关键词 平衡溶解度;表观油水分配系数;通脉散瘀提取物

The Determination of Equilibrium Solubility and Apparent Oil-water Partition Coefficient on Tongmaisanyu Extract

Liu Xiaoyan, Ma Hailing, Zhang Yongmei, Yu Hui, Wu Jinghua

(Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang 215600, China)

Abstract Objective: To determine Tongmaisanyu gel extract and index components in different solvents' equilibrium solubility and apparent partition coefficient in different pH to explore the solvent performance of Tongmaisanyu extract. **Methods:** Taking the precipitation method for the determination of the solubility of the extract and equilibrium solubility of index components in different solvents as well as partition coefficient in n-octanol / water and n-octanol / buffer. **Results:** The equilibrium solubility of the extract in ethanol was higher at 37 ℃, and it decreased first and then increased in buffer; the solubility of salvianolic acid B and danshensu in pH buffer decreased first and then increased, and the equilibrium solubility of tanshinone II_A and cryptotanshinone was the highest at pH 9; the oil-water partition coefficient of salvianolic acid B and danshensu decreased with the increase of pH, and the lgP of tanshinone II_A and cryptotanshinone reached the maximum at pH 8. **Conclusion:** Tongmaisanyu extract dissolves greater in alcohols, so adding an appropriate amount of ethanol in the formulation to increase the solubility may be favorable. And pH can affect the partition coefficient, so for percutaneous absorption may be promoted by adjusting the pH values.

Key Words Equilibrium; Oil-water partition coefficient; Tongmaisanyu extract

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.10.048

通脉散瘀凝胶处方来自临床经验方,由丹参、红花、川芎等 6 味药组成。具有通脉止痛、活血消肿等功效。我们在中医药理论指导下,采用现代科技手段将其制成服用携带方便、质量可控、药理作用明确、临床疗效确切的外用凝胶剂。处方提取物中丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮、丹酚酸 B、丹参素是君药中发挥疗效的主要药效成分^[1-2],本实验以 4 个指标成分的平衡溶解度和表观油水分配系数综合评价提取物的溶解性能及理化性质,以期通脉散瘀凝胶经皮给药新剂型提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters2695 高效液相色谱仪, Wa-

ters2998 紫外检测器,Empower 色谱工作站;色谱柱为 Waters XBridge 柱;AG135 型电子天平(瑞士梅特勒公司);FA1104N 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);AS20500A 超声清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);TDZ4-WS 台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);DKZ-2 型电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司);PHS-3 型 pH 计(上海仪电科学股份有限公司)

1.2 试剂 丹参酮Ⅱ_A(批号:110766-201520)、隐丹参酮(批号:110852-200806)、丹酚酸 B(批号:111562-201313)、丹参素(批号:110855-201412),均购自中国食品药品检定研究院;磷酸(南京化学试剂

有限公司);氢氧化钠(汕头市西陇化工厂有限公司);正辛醇(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);通脉散瘀提取物(由张家港市中医医院提供,批号:20150907);甲醇(色谱纯,山东禹王试剂有限公司)、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),水为双蒸水,乙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿均为分析纯

2 方法与结果

2.1 丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮、丹酚酸 B、丹参素含量测定方法的建立^[3-6]

2.1.1 色谱条件 Waters XBridge 色谱柱,流动相为乙腈-0.1%磷酸,梯度洗脱:0~8 min,8%~18% A;8~15 min,18%~21% A;15~20 min,21%~30% A;20~25 min,30%~40% A;25~45 min,40%~75% A;45~60 min,75% A,体积流量为 1 mL/min,进样 10 μL,柱温 30 ℃,检测波长 280 nm。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮、丹酚酸 B、丹参素对照品适量,加 75% 甲醇制成每 1 mL 含丹参酮Ⅱ_A 0.05 mg、隐丹参酮 0.053 mg、丹酚酸 B 0.066 mg、丹参素 0.064 mg 的混标溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取提取物 0.1 g,置 10 mL 容量瓶中,加 75% 甲醇超声溶解,定容至刻度,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.1.4 阴性供试品溶液的制备 制备缺丹参的通脉散瘀提取物,精密称取 0.1 g,置 10 mL 容量瓶中,加 75% 甲醇超声溶解,定容至刻度,过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.1.5 标准曲线的绘制 精密吸取混合对照品适量,加 75% 甲醇稀释制成系列对照品溶液。分别进样 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定。以进样量为横坐标(X),以相应峰面积为纵坐标(Y),进行回归处理,得回归方程,结果见表 1。

表 1 标准曲线与线性范围

化合物	线性范围(μg)	线性方程	r
丹参素	0.128~0.64	Y=45 924X+374.8	0.999 5
丹酚酸 B	0.132~0.66	Y=81 090X+6 910.2	0.999 8
丹参酮Ⅱ _A	0.1~0.5	Y=99 738X-10 542	0.999 8
隐丹参酮	0.106~0.53	Y=195 794X-16 467	0.999 8

2.1.6 专属性考察 精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL,按照 2.1.1 项下色谱方法测定。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上有相同保留时间的色谱峰,阴性对照无干扰。

2.2 平衡溶解度的测定^[7-8]

2.2.1 重量法 取通脉散瘀提取物约 1 g,精密称定,置于西林瓶中,加入 10 mL 不同溶剂,始终保持有固体物存在,塞上塞子,放入恒温水浴振荡器中振荡 24 h,温度保持 37 ℃,使其达到充分溶解。将西林瓶中的药液连同残留的固体药物一同转移至已经恒定质量的离心管中,4000 r/min 离心 10 min,倾出上清液,底部残渣连同离心管在 70 ℃ 烘干至恒重,称定重量,计算提取物在不同溶剂中的平衡溶解度。平衡溶解度=(*m*_{加入量}-*m*_{未溶解量})/*V*_{溶剂体积}。选择的溶剂有水、甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、正辛醇、三氯甲烷,pH 分别为 3.11、3.94、4.99、6.71、7.46、8.02、8.95、10.18 的缓冲液。提取物在水及有机溶剂中的溶解度见图 1,在缓冲液中的溶解度见图 2。由图 1 可知提取物在乙醇中的平衡溶解度较好,水和丙酮中次之;在缓冲液中随 pH 值增加平衡溶解度呈现先减小后增大的趋势。

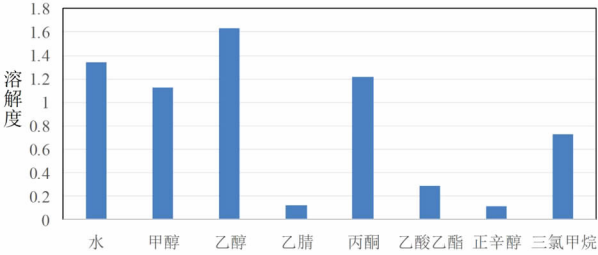


图 1 提取物在 37 ℃ 不同溶剂中的平衡溶解度

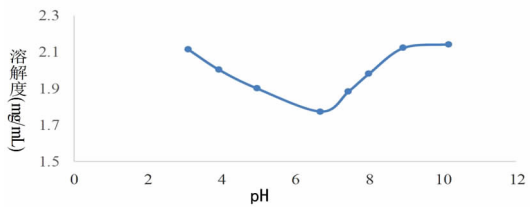


图 2 提取物在 37 ℃ 不同 pH 缓冲液中的平衡溶解度

2.2.2 指标成分法^[9-10] 取 2.2.1 项下所得上清液 5 mL 至 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释摇匀定容至刻度。12 000 r/min 离心,上清液照 2.1.1 项下色谱方法进行测定,计算丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮、丹酚酸 B、丹参素在不同溶剂中的平衡溶解度。4 个指标成分在有机溶剂中的溶解度见表 1,在不同缓冲液中的平衡溶解度见图 3,图 4。结果显示,37 ℃ 时丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮、丹酚酸 B 及丹参素在甲醇中的溶解度最大;在缓冲体系中丹酚酸 B 及丹参素的溶解度受 pH 影响较大,丹参酮Ⅱ_A 及隐丹参酮的溶解度变化较小。

2.3 表观油水分配系数的测定^[11-12] 称取通脉散瘀提取物适量,至 10 mL 容量瓶中,分别加入被正辛醇饱和的水和不同 pH 值的 PBS 缓冲液超声 30 min,使其充分溶解,用相同溶剂定容至刻度,保证一

直有固体药物存在,使其呈饱和状态,静止后离心(5 000 r/min,10 min),取上清液 2 mL,氮气吹干,加 75% 甲醇 5 mL,涡旋 5 min,离心(5 000 r/min,10 min)取上清液过 0.45 μm 滤膜,测定其中指标成分的浓度为 C0,再取上清液 5 mL 至具塞锥形瓶中,分别加入 5 mL 被水饱和过的正辛醇溶液,塞上塞子,放入恒温水浴振荡器中,温度保持在 37 ℃,振摇 24 h,静止后取上层油相 2 mL,氮气吹干,加 75% 甲醇 5 mL,涡旋 5 min,离心(5 000 r/min,10 min)取上清液过 0.45 μm 滤膜,测定其中指标成分的浓度为 C1。按照公式计算表观油水分配系数(P),计算公式如下: $P = C_1 V_1 / (C_0 V_0 - C_1 V_1)$,结果见图 5、图 6。丹酚酸 B 和丹参素的油水分配系数在 pH 值 8 以后趋于平缓,而丹参酮Ⅱ_A 和隐丹参酮的油水分

表 2 丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮、丹酚酸 B、丹参素在 37 ℃ 不同有机溶剂中的溶解度

溶剂	丹参素/ (μg/mL)	丹酚酸 B/ (μg/mL)	丹参酮Ⅱ _A / (μg/mL)	隐丹参酮/ (μg/mL)
甲醇	160.406	230.348	18.571	31.859
乙醇	27.611	15.811	7.922	12.761
乙腈	4.425	7.188	6.212	10.231
丙酮	8.898	10.836	6.516	10.948
乙酸乙酯	5.734	6.213	5.528	9.346
正辛醇	4.637	9.174	5.823	8.222
三氯甲烷	27.769	87.825	7.829	12.765

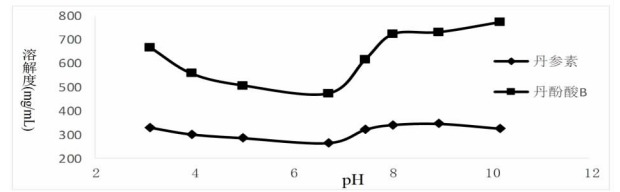


图 3 丹酚酸 B 和丹参素在不同 pH 缓冲液中的平衡溶解度

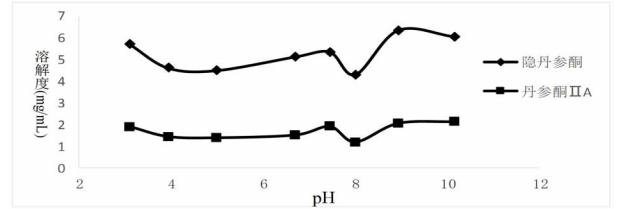


图 4 丹参酮Ⅱ_A 和隐丹参酮在不同 pH 缓冲液中的平衡溶解度

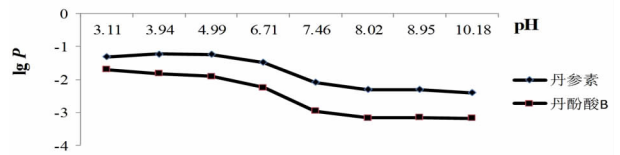


图 5 丹酚酸 B 和丹参素在 37 ℃ 下不同 pH 的缓冲液中的 lgP 值

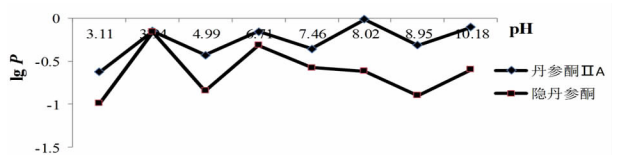


图 6 丹参酮Ⅱ_A 和隐丹参酮在 37 ℃ 下不同 pH 的缓冲液中的 lgP 值

3 讨论

中药提取物含多个及多种性质不同的化合物,这些化合物之间存在增溶、助溶、竞争性抑制等相互作用,因此中药提取物的溶解过程极其复杂。溶解是吸收的前提,药物的溶解度是影响药物吸收分布的重要因素之一。表观油水分配系数是影响药物经皮吸收的重要因素,是药物传递系统中的重要参数^[13]。本实验结合重量法和摇瓶法,同时测定了通脉散瘀提取物及指标成分的平衡溶解度及表观油水分配系数,能较好地反映提取物的溶解性能。

采用重量法考察提取物在不同溶剂及不同 pH 缓冲液中的平衡溶解度,由图 1 可以看出,提取物在乙醇和水中的溶解度较大,表明提取物在极性溶剂中溶解较好,提示在设计凝胶处方时适当加入乙醇可提高其溶解度。图 2 表明提取物在 pH 3.11~6.71 范围内溶解度逐渐减小,而在 pH 6.71~10.18 范围内溶解度逐渐增加,说明 pH 对药物溶解度有较大影响,在剂型设计中应考虑 pH 值不同给药物溶解度带来的影响。

提取物中丹参素和丹酚酸 B 在不同 pH 缓冲液中的溶解度均呈现随 pH 值增加先减小后增大的趋势。丹参素是 β-3,4-二羟基苯乳酸,丹酚酸 B 是由 3 分子丹参素与 1 分子咖啡酸缩合而成,二者均是多酚基化合物。在酸性条件下,丹参素和丹酚酸 B 均以原型存在,其水溶性较好,溶解度较高,在中性环境下溶解度较低。有文献报道^[14] 称丹参素在 pH6.8 的缓冲液体系中可能分解为其他物质,具体原因待进一步探讨。随着 pH 值增加,二者溶解度逐渐增大。有文献指出,丹酚酸类成分在碱性环境下不稳定,易分解及转化,与本实验结果有出入,原因可能是组方中的其他化学成分对丹酚酸类成分起到了稳定作用,下一步需进行全面仔细的组方分析,这同时也从另一方面反映了通脉散瘀组方的合理性。丹参素和丹酚酸 B 的水溶性良好,这也导致其脂溶性较弱。由图 5 可以看出,在由正辛醇和缓冲液组成的油水分配系统中,二者的 lgP 值均较低,范围为 -3.5 < lgP < -1,这给透皮带来了一定难度,需在凝胶处方中加入如氮酮等较好的促渗剂。提取

物中丹参酮Ⅱ_A和隐丹参酮在不同 pH 缓冲液中的溶解度均较小,由图 4 可以看出,二者在酸性条件下溶解度趋势较为平稳,在 pH 值接近于 8 时降低,当 pH > 9 时溶解度又逐渐上升呈平稳趋势,而二者的油水分配系数则呈锯齿状变化。丹参酮Ⅱ_A和隐丹参酮单体化合物脂溶性较强,但由本实验结果图 6 可以看出,二者的 lgP 值在 -1 到 0 之间,而文献报道^[15]药物吸收的最佳范围是 -1 < lgP2,说明通脉散瘀处方中丹参酮Ⅱ_A和隐丹参酮的渗透性与单体化合物比较有较大改变,能够透过脂质膜进入全身发挥药效,具体原因仍待分析。

由平衡溶解度及表观油水分配系数测定结果可知,通脉散瘀提取物及指标成分的平衡溶解度和表观油水分配系数受 pH 值影响较大,部分指标的渗透性较差,故在处方设计时应注意调节 pH 值及添加合适的吸收促进剂,以提高通脉散瘀处方的透皮吸收效果。

参考文献

- [1]徐兰,何双凤,孙勇兵,等. 杏香兔耳风提取物基本理化性质研究[J]. 中成药,2012,34(6):1061-1067.
- [2]乔建卫,裴广庆,刘向东,等. 黄芩总黄酮溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(24):2026-2031.
- [3]黄海英,于定荣,王春国,等. 斯皮诺素表观油水分配系数的测定[J]. 药物分析杂志,2014,34(3):497-502.
- [4]朱美玲,刘洋,曹燕飞,等. 葛根芩连片主要活性成分的溶解度及

油水分配系数的测定[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2014,16(12):2686-2692.

- [5]胡昌勤,潘瑞雪. 溶出度试验评价/预测固体口服制剂生物等效性的研究进展[J]. 中国新药杂志,2014,23(1):44-50.
- [6]张洪超,李伟,马晓慧,等. 丹参水溶性成分间相互转化及相互作用研究进展[J]. 医学综述,2014,20(9):1647-1652.
- [7]吴玉强,王志萍,熊万娜,等. 秋水仙碱油水分配系数和平衡溶解度的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):64-67.
- [8]李慧芳,张冬,曲文君,等. 4 种黄酮类中药有效成分 BCS 分类及吸收机制的初步研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(7):1198-1202.
- [9]李俊生,吕佳佳,王兴慧,等. 黄芩总黄酮及其单体的溶解性及体外经皮渗透性能研究[J]. 中草药,2014,45(2):200-205.
- [10]朱慧,耿婷,张丽,等. 荆芥内酯平衡溶解度和油水分配系数的测定[J]. 中国中药杂志,2010,35(23):3144-3148.
- [11]任玉芳,毕仁杰,项峰. 注射用丹参多酚酸盐与其他药物配伍禁忌分析[J]. 中国医药,2016,11(3):427-430.
- [12]范雪亮. 丹参多酚酸盐药理及临床应用[J]. 中国医药,2012,7(10):1343-1344.
- [13]王景雁,兰颐,林红梅,等. 薄荷醇对不同 logP 值中药有效成分经皮吸收的促透研究[J]. 中国新药杂志,2016,25(2):202-205.
- [14]彭九嫚,柴尧,潘旻,等. 丹参中酚酸类成分在不同工艺条件下转化关系[J]. 2016,22(5):67-72.
- [15]郁丹红,贾晓斌. 相似性分析用于丹参二萜醌组分平衡溶解度和油水分配系数的研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(12):1860-1867.

(2016-07-20 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 2465 页)

- [4]傅静娟,刘志辉,罗会盛,等. 凝胶膏剂的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2011,20(14):12-13.
- [5]马维娜,谷福根. 药用凝胶剂的研究进展[J]. 实用药物与临床,2014,17(12):1624-1628.
- [6]刘淑萍. 巴布剂的研究进展及临床应用[J]. 现代预防医学,2010,37(16):3188-3189.
- [7]张萍,付强,任永申,等. 近五年中药巴布剂的研究进展[J]. 中国现代中药,2007,9(1):30-35.
- [8]宋艳丽. 盐酸青藤碱醇质体与脂质体水凝胶膏剂制备与体外透皮行为[D]. 西安:西北大学,2014:38.
- [9]吴俊洪. 痛经舒凝胶膏剂的研制[D]. 广州:广州中医药大学,

2014:45-46.

- [10]梁劲康,黎婉婉,胡巧红,等. 三子巴布剂基质配方优化与体外释放特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(17):18-23.
- [11]胡燕,罗斌,李云龙. 一种新型巴布剂基质配方的优选[J]. 2014,20(6):33-35.
- [12]罗云,熊志伟,梁新丽,等. 重楼总皂苷巴布剂的基质处方优化及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):5-9.
- [13]周艳,黄志辉,区展龙,等. 跌打祛风膏基质处方的优化研究[J]. 中药材,2016,39(4):846-849.
- [14]林欣媛,储晓琴,桂双英. 正交试验法优选复方青风藤巴布剂的基质处方[J]. 中草药,2017,48(16):3347-3352.

(2016-10-27 收稿 责任编辑:张文婷)