

丹参酮冻干乳剂的制备及其稳定性

王秀丽¹, 王华强², 廖艳¹, 王文平¹, 高伟^{3*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 江西省乐平市人民医院, 江西 乐平 333300;
3. 首都医科大学, 北京 100069)

[摘要] **目的:**比较丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂的稳定性。**方法:**通过长期留样试验和影响因素试验,对丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂的外观、丹参酮 II_A 的含量以及冻干乳剂的复溶情况进行了考察。**结果:**丹参酮乳剂在 25 °C 长期留样试验和热循环试验中,系统稳定性明显降低;在 4, 25 °C 的长期留样试验和高温、强光试验中,丹参酮 II_A 含量均不同程度降低。丹参酮冻干乳剂在所有长期留样试验和影响因素试验中,均表现出良好的系统稳定性;在 25 °C 的长期留样试验和高温、强光试验中,丹参酮 II_A 含量均不同程度降低,但降低程度明显低于同等条件下的丹参酮乳剂。**结论:**在提高乳剂系统和丹参酮 II_A 成分的稳定性 2 方面,丹参酮冻干乳剂均明显优于丹参酮乳剂。

[关键词] 丹参酮; 冻干乳剂; 稳定性

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0054-04

Preparation and Stability of Tanshinone Freeze-dried Emulsion

WANG Xiu-li¹, WANG Hua-qiang², LIAO Yan¹, WANG Wen-ping¹, GAO Wei^{3*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Leping People's Hospital of Jiangxi Province, Leping 333300, China;

3. Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** Comparative study on stability of tanshinone emulsion and tanshinone freeze-dried emulsion. **Method:** Appearance of tanshinone emulsion and tanshinone freeze-dried emulsion and the content of tanshinone and reconstitution of freeze-dried emulsion were investigated by influential factors test and long-term sample test. **Result:** System stability of tanshinone emulsion had significantly reduced in 25 °C long-term sample test and thermal cycling test; The content of tanshinone II_A was reduced to varying degrees in 4, 25 °C long-term sample test and high temperature and light test. System stability of tanshinone freeze-dried emulsion showed good in long-term sample test and influential factors test; The content of tanshinone II_A was reduced to varying degrees in 25 °C long-term sample test and high temperature and light test, but reduced degree was lower than that of tanshinone emulsion in the same conditions. **Conclusion:** Tanshinone freeze-dried emulsion showed significantly better than tanshinone emulsion in improving stability of emulsion system and tanshinone II_A.

[Key words] tanshinone; freeze-dried emulsion; stability

[收稿日期] 2011-09-16

[基金项目] 北京市优秀人才培养项目 (2011D005018000002); 北京中医药大学中青年教师自主选题项目 (2009JYBzz-JS099)

[通讯作者] * 王秀丽, 副研究员, 博士, 从事中药复方及新药研发, Tel: 010-84738658, E-mail: lhwangxiuli@163.com; * 高伟, 副教授, 博士, 从事分子生物学, Tel: 010-83911671, E-mail: weigao79@yahoo.com.cn

丹参的脂溶性有效成分群-丹参酮类, 具有抗氧化、扩张冠状动脉、增加心肌血流量、抗炎、抗菌、改善记忆力障碍、抗肿瘤等多种活性作用^[1-3]。丹参酮 II_A 是其中代表成分, 在 2010 年版《中国药典》中, 丹参酮 II_A 的含量是丹参药材的质量控制指标, 本实验以丹参酮 II_A 为指标成分进行检测。由于丹参酮 II_A 溶解度低, 对光、热、氧、湿等因素均不稳定^[4-5], 影响了其普通制剂的生物利用度^[6]和稳定性, 限制了其在临床的应用。本文将丹参酮制备为

乳剂,以增加其溶解度,进而将其制备为冻干乳剂,以增加其稳定性,并比较其普通乳剂和冻干乳剂的稳定性,一定程度上证明了制备丹参酮冻干乳剂的合理性。

1 材料

丹参酮 II_A 对照品(供含量测定用,中国药品生物制品检定所,批号 110766-200416),丹参酮提取物(自提取,丹参酮 II_A 含量 53.5%),注射用甘油(浙江遂昌甘油厂),中链脂肪酸酯(MCT,法国 Gattefosse SAS 公司),注射用大豆磷脂(上海太伟药业有限公司),PEG 6000(陶氏公司),甘露醇(ROQUETTE, France),麦芽糖(国药集团化学试剂有限公司),其他试剂均为分析纯。

Flex-C5 型高压乳匀机(加拿大 AVESTIN),FA25 型分散乳化机(上海洽姆仪器科技有限公司),ZS90 型激光粒径测定仪(英国 Malvern),MODUL YOD-230 型冷冻干燥机(美国热电公司),Varian series ProStar 高效液相色谱仪(美国),BP211D 型电子天平(德国 Sartorius),R-114 型旋转蒸发仪(瑞士 Büchi Rotavapor),D40-2F 型电动搅拌机(杭州仪表电机厂),Cary100 型紫外分光光度计(瓦里安),Beckman X-22R 型高速冷冻离心机(美国贝克曼公司)。

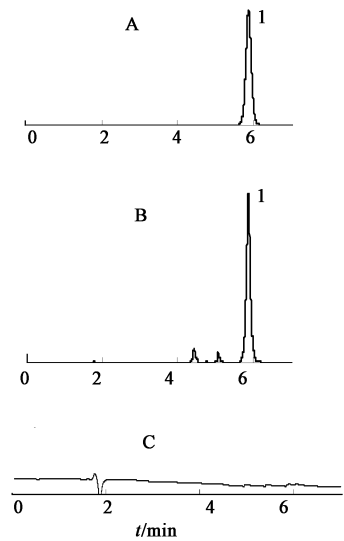
2 方法与结果

2.1 丹参酮乳剂及丹参酮冻干乳剂的制备 将大豆磷脂 4 g,丹参酮提取物 90 mg 加至 10 mL 中链脂肪酸中;PEG 6000 1 g,甘油 2.25 g 溶于注射用水 90 mL 中,并且调 pH 5,于 80 °C 混合后立即用分散乳化器分散乳化(8 000 r·min⁻¹) 60 s,再经高压乳匀机匀化 7 次,既得丹参酮乳剂。将丹参酮乳剂以 2 mL 的剂量分装于西林瓶中,每瓶加入甘露醇 125 mg,麦芽糖 125 mg,溶解后于 -45 °C 预冻 3 h,置于冷冻干燥机中制备丹参酮冻干乳剂。整个过程避光操作。

2.2 丹参酮 II_A 的含量测定

2.2.1 色谱条件 shim-pack vp-ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相水-乙腈(80:20),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 272 nm,进样量 20 μL。见图 1。

2.2.2 标准曲线的制备 精密称取经 P₂O₅ 减压干燥 24 h 的丹参酮 II_A 对照品适量,置 10 mL 棕色量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,摇匀,即得丹参酮 II_A 质量浓度为 1.22 g·L⁻¹ 的对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 5



A. 对照品; B. 供试品; C. 空白对照; 1. 丹参酮 II_A

图 1 丹参酮冻干乳剂 HPLC

mL,加乙腈稀释定容至 10 mL 棕色量瓶中,制成 12.20, 24.40, 61.00, 122.00, 183.00, 244.00, 610.00 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。对照品溶液按上述色谱条件分别测定峰面积,以峰面积对其所含的丹参酮 II_A 质量进行线性回归,得回归方程 $Y = 5.0 \times 10^4 X + 1.9 \times 10^4$ ($r = 0.9998$),丹参酮 II_A 在 12.20 ~ 610.00 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.2.3 溶液制备 供试丹参酮乳剂或空白乳剂适量,精密称定,加入 8 倍量乙腈,振摇,乳剂快速呈透明液体,显示破乳成功。破乳后溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,分别作为供试品溶液和空白乳剂溶液。

2.2.4 回收率试验 按照处方精密称取丹参酮提取物及冻干乳剂辅料,分别加入准确吸取的对照品溶液 12.20, 122.00, 610.00 mg·L⁻¹ 各 5 份,按 2.2.3 方法制成加样回收供试品溶液,按 2.2.1 色谱条件进样 HPLC 测定,经计算得低、中、高 3 个质量浓度的空白加样回收率分别为 98.21%, 99.33%, 100.87%,说明该方法具有较高的准确性。

2.2.5 精密度试验 准确吸取低、中、高(12.20, 122.00, 610.00 mg·L⁻¹) 3 种质量浓度的对照品溶液,在同一天不同时间测定 5 次,连续 5 d。计算低、中、高浓度的日内精密度分别为 3.59%, 2.68%, 1.23%, 日间精密度分别为 4.77%, 2.61%, 1.52%, RSD 均 < 5%,说明日内、日间精密度均较高。

2.2.6 重复性试验 取同一批的丹参酮冻干乳剂 6 份,按上述供试品溶液的制备方法处理。分别吸取供试品溶液 20 μL 进样测定,记录峰面积。结果

表 1 丹参酮冻干乳剂加样回收率试验

样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收 /%	平均值 /%	RSD /%
0.047	0.061	0.105	97.22	98.21	3.20
0.048	0.061	0.113	103.67		
0.049	0.061	0.108	99.18		
0.051	0.061	0.107	95.54		
0.052	0.061	0.109	96.46		
0.969	1.220	2.208	100.87	99.33	1.02
0.953	1.220	2.163	99.54		
0.971	1.220	2.179	99.45		
0.966	1.220	2.152	98.44		
0.959	1.220	2.143	98.35		
4.823	3.050	7.981	101.37	100.87	1.01
4.818	3.050	7.802	99.16		
4.827	3.050	7.997	101.52		
4.831	3.050	7.938	100.72		
4.813	3.050	7.987	101.58		

丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 1.97% ,表明重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液,室温下放置 0,4,8,12,16,24 h,分别吸取 20 μL 进样,记录峰面积。结果丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 1.69% ,表明供试品溶液室温放置 24 h 稳定性良好。

2.3 乳剂中丹参酮 II_A 含量测定 分别取丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂,丹参酮冻干乳剂加入原体积量注射用水,振摇复溶为丹参酮乳剂,均精确量取丹参酮乳剂 0.1 mL 后加入 0.8 mL 乙腈,振摇,乳剂快速呈橙红色透明液体,破乳成功。破乳后溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,弃去最初 10 滴滤液,续滤液按照 2.2 方法测定质量浓度,无药乳剂同法处理做空白,代入标准曲线方程计算丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂中丹参酮 II_A 含量。

2.4 丹参酮微乳的稳定性

2.4.1 长期试验 丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂于 4,25 ℃ 下放置 6 个月,分别于 0,3,6 月取样进行外观、含量和包封率的测定,见表 2。

2.4.2 高温试验 分别取包装好的丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂,置恒温恒湿箱中,设定为温度 60 ℃ ,放置 10 d,于 0,5,10 d 取样检测,见表 3。

表 2 丹参酮乳剂及冻干乳剂(复溶后)长期稳定性试验

放置温度/℃	放置时间/月	外观		丹参酮总量/mg	
		乳剂	冻干乳剂	乳剂	冻干乳剂
4	0	橙红色、均匀	橙红色、均匀	48.21	48.21
	3	橙红色、均匀	橙红色、均匀	46.78	48.25
25	6	挂壁,振摇后恢复均匀	橙红色、均匀	44.51	47.82
	3	挂壁,振摇后恢复均匀	橙红色、均匀	42.03	46.58
	6	有分层、析油现象	橙红色、均匀	36.77	45.01

表 3 丹参酮乳剂及冻干乳剂影响因素试验

试验项目	放置时间	外观		丹参酮总量/mg	
		乳剂	冻干乳剂	乳剂	冻干乳剂
高温	0 天	橙红色、均匀	橙红色、均匀	48.21	48.21
	5 天	橙红色、均匀	橙红色、均匀	45.38	47.05
	10 天	橙红色、均匀	橙红色、均匀	42.41	46.13
高湿	5 天	橙红色、均匀	橙红色、均匀	48.13	48.29
	10 天	橙红色、均匀	橙红色、均匀	48.40	48.23
强光	5 天	砖红色、均匀	砖红色、均匀	44.39	45.58
	10 天	砖红色、均匀	砖红色、均匀	40.04	42.27
热循环	1 次	橙红色、均匀	橙红色、均匀	47.51	47.89
	2 次	挂壁,振摇恢复均匀	橙红色、均匀	47.03	48.02
	3 次	挂壁,振摇恢复均匀	橙红色、均匀	46.01	47.61

2.4.3 高湿试验 分别取包装好的丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂,置恒温恒湿箱中,设定为温度 25 ℃、相对湿度 90%,放置 10 d,于第 0,5,10 d 取样检测,见表 3。

2.4.4 强光照射试验 分别取包装好的丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂,置强光稳定试验箱中,设定为光照度(4 500 ± 500)lx,放置 10 d,于第 0,5,10 d 取样检测,见表 3。

2.4.5 循环试验 分别取包装好的丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂,以 -10 ℃ 条件下冷冻 48 h,40 ℃ 条件下放置 48 h 为 1 个循环,共循环 3 次,每完成 1 个循环各自取样检测,见表 3。

稳定性试验结果如表 2,3 所示,检测结果中的含量,均为每 100 mL 乳剂中丹参酮 II_A 含量。为减小误差,所用丹参酮乳剂和丹参酮冻干乳剂为同一批次样品,每 100 mL 乳剂中丹参酮 II_A 投料量为 48.21 mg。结果显示,对于丹参酮乳剂,高温试验和强光试验引起丹参酮 II_A 含量降低,但乳剂的系统稳定性未受影响;高湿试验对丹参酮 II_A 含量和乳剂的系统稳定性均无影响;热循环试验对丹参酮 II_A 含量没有明显影响,但乳剂的系统稳定性降低。对于丹参酮冻干乳剂,各因素均未影响乳剂的系统稳定性,高温试验和强光试验中丹参酮 II_A 含量降低,但两者降低幅度均小于丹参酮乳剂。

3 讨论

长期稳定性试验结果表明,丹参酮乳剂在长期储存后,乳剂的系统稳定性和丹参酮 II_A 含量均下降,且 25 ℃ 条件下比 4 ℃ 条件下更加明显;而丹参酮冻干乳剂则非常稳定,在 4,25 ℃ 条件下均系统稳定性好,丹参酮 II_A 含量没有明显变化。结果表明丹参酮 II_A 适合贮存于较低温度,建议在 4 ℃ 冰箱内保存。

由于丹参酮 II_A 对光、热、氧、湿均不稳定,进行了影响因素试验。常用的影响因素试验以高温、高湿、强光试验为主,本文还进行了热循环试验,依据美国 FDA 于 1998 年 6 月发表的稳定性指导原则草案,模拟药品在运输与使用过程中可能碰到的温度条件下循环,考察上市包装药品的稳定性。

丹参酮 II_A 对光、热、氧、湿等因素不稳定,所以出现了含量降低的现象,但丹参酮冻干乳剂的降低幅度小于丹参酮乳剂,且本文中所有丹参酮冻干乳剂复溶的过程均迅速均匀,说明丹参酮冻干乳剂的给药形式切实可行,不仅有利于保持系统稳定性,也有助于减少成分损失。其中高湿试验因为西林瓶加盖橡胶盖后,呈现不可透过性包装,对内容物无影响;强光试验影响明显,提示产品应以棕色瓶避光保存,并且所有操作过程均在暗室中避光进行。

将丹参酮乳剂进一步制备成丹参酮冻干乳剂,有利于提高系统稳定性,同时有助于提高药品成分的稳定性,便于储存和运输。目前我国干乳剂的研究还很少^[7-8],相信未来干乳剂将会在中医药应用领域发挥更大的作用。

[参考文献]

- [1] 蔡丽萍,习志刚,杨红. 丹参酮的药理作用和临床研究进展[J]. 广东药学院学报,2008,24(3):321.
- [2] NIU Xi-Lin, ICHIMORI KOHJI, YANG Xia, et al. Tanshinone II_A inhibits low density lipoprotein oxidation *in vitro* [J]. Free Radic Res, 2000,33(3):305.
- [3] Maki T, Kawahra Y, Tanonaka K, et al. Effects of tanshinone VI on the hypertrophy of cardiac myocytes and fibrosis of cardiac fibroblasts of neonatal rats[J]. Planta Med,2002,68(12):1103.
- [4] 林恒标,林恒宽. 丹参酮 II_A 的稳定性研究[J]. 中医研究,2005,18(8):16.
- [5] 苏子仁,刘中秋,同华,等. 丹参酮醇提液在浓缩干燥工艺过程中的化学成分变化研究(1)-丹参酮 II_A 湿热降解机理探讨[J]. 中成药研究,1997,19(11):5.
- [6] 甘发平,韩铮,栾连军,等. 高效液相色谱法测定小鼠血浆和脑中的丹参酮 II_A 及药代动力学研究[J]. 分析化学,2008,36(12):1677.
- [7] 王鸿,杨纲,梁文权. 盐酸布比卡因冻干乳剂的制备[J]. 海峡药学,2004,16(4):21.
- [8] 邓意辉,雷杰杰,郑少辉,等. 前列地尔冻干乳剂及其制备方法:中国,1562041A[P]. 2005-01-12.

[责任编辑 仝燕]