

表明,缓释微丸的外观、含量、有关物质和体外释放度与 0 d相比基本保持稳定。

3 讨论

3.1 速释微丸的溶出 将速释微丸(相当于含氧氟沙星 100 mg)灌装胶囊,采用中国药典^[5],以 900 mL经脱气的纯化水为溶出介质,转速为 50 r·min⁻¹,温度为(37 ±0.5),依法操作,进行溶出度试验,与市售氧氟沙星胶囊对比,结果见表 8。

表 8 速释微丸与市售胶囊的溶出度对比

Tab 8 Dissolution between the fast-release pellets and commercial capsules

样品	溶出度 / %			
	5 min	10 min	20 min	30 min
速释微丸	20.68	53.77	85.94	96.79
市售胶囊	18.54	49.86	83.71	95.37

根据微丸释药的叠加原则^[6],缓释微丸的释药行为是速释微丸和包衣微丸的释药行为总和,速释微丸的存在能够使缓释微丸达到在体内迅速释药,很快到达有效治疗浓度从而发挥药效的目的。从表 8可见,速释微丸与市售胶囊的释放速度相当,符合速释微丸的设计要求。

3.2 热处理对包衣微丸衣膜的影响 本实验采用聚合物水分散体包衣技术制备氧氟沙星缓释微丸。由于水分散体中聚合物是以胶态粒子形式存在,因此成膜机制与传统的有机溶剂包衣方法有显著区别。水分散体包衣成膜时必须经过膜愈合过程,使聚合物粒子相互融合才可形成连续的衣膜,膜愈合往往随包衣过程进行,但大多数水分散体包衣结束之后衣膜尚未愈合完全,通常采用包衣后进行热处理促使衣膜进一步愈合^[7]。

本实验考察了 60 条件下热处理不同时间对缓释微丸释放度的影响,结果表明随着热处理时间的延长,缓释微丸的释药速率趋于减慢,18 h后稳

定,说明衣膜愈合完全。

3.3 稳定性 本缓释微丸经过影响因素、加速试验和长期试验稳定性试验,结果表明缓释微丸在模拟市售包装的条件下,外观、含量、有关物质和释放度等指标均保持稳定,说明制备工艺可靠,质量可控。

缓释微丸是一种剂量分散型制剂,与缓释片相比则具有提高药物在胃肠道表面分布的面积进而提高生物利用度,不受食物输送节律的影响,批间差异小,工艺更加稳定等优点^[8]。本实验采用聚合物水性包衣技术,成功研制了氧氟沙星缓释微丸,水性包衣技术具有防燃防爆,操作安全,降低成本,减少污染等传统有机溶剂包衣技术所不具备的优势,近年来在国内外制药工业中的应用日益广泛。

参考文献:

- [1] 杜璇,屠锡德.氧氟沙星的临床应用进展 [J]. 江苏药学与临床研究, 2005, 13 (5): 16-19.
- [2] Mayer I, Nagy E. Evaluation of post-antibiotic effects of antipseudomonal antibiotics using an automated system [J]. APMIS, 2000, 108 (4): 261-266.
- [3] Athamna A, Athamna M, Medlej B, et al. In vitro post-antibiotic effect of fluoroquinolones, macrolides, beta-lactams, tetracyclines, vancomycin, clindamycin, linezolid, chloramphenicol, quinupristin/dalfopristin and rifampicin on Bacillus anthracis [J]. J Antimicrob Chemother, 2004, 53 (4): 609-615.
- [4] 梁超峰, 欧阳允, 陈平, 等. 润湿粘合剂对小丸制备的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31 (4): 159-161.
- [5] 中国药典. 二部 [S]. 2005: 605, 附录 22-23, 附录 73.
- [6] 卢哲, 唐星. 盐酸环丙沙星缓释微丸的研制 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14 (9): 1151-1155.
- [7] 陈挺, 陈庆华. 乙基纤维素水性包衣技术. 热处理对衣膜性质的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31 (7): 298-302.
- [8] 陈盛君. 缓释微丸制剂的研究进展 [J]. 国外医学药学分册, 2004, 31 (3): 177-182.

(收稿日期) 2007-03-20

高效液相色谱法测定翼首草中齐墩果酸和熊果酸的含量

刘小兰^{1,2}, 周剑波^{1,2}, 陶燕铎¹, 邵赞¹ (1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

[摘要] 目的: 建立用高效液相色谱法同时测定翼首草药材中齐墩果酸和熊果酸的含量。方法: 色谱柱为 Phenomenex Kyo-masil ODS-C₁₈ (5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸 (85:15); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30; 检测波长 215 nm。结果: 在上述色谱条件下翼首草中的齐墩果酸、熊果酸可完全分离, 齐墩果酸、熊果酸的含量分别为 10.6, 38.16 mg·g⁻¹。结论: 该方法操作简便快速、结果可靠、重复性好, 可为有效控制翼首草药材及其制剂的质量提供依据。

[关键词] 翼首草; 高效液相色谱法; 齐墩果酸; 熊果酸

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213 (2008) 07-0546-03

[基金项目] 中国科学院知识创新工程项目 (编号: CXYL-2002-9)。 [作者简介] 刘小兰, 女, 硕士研究生 [通讯作者] 陶燕铎, 电话: 0971-6117264, E-mail: xiaolan_80@163.com

Determination of oleanolic acid and ursolic acid in Yishoucao by HPLC

LIU Xiao-lan^{1,2}, ZHOU Jian-bo^{1,2}, TAO Yan-duo¹, SHAO Yun¹ (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Qinghai Xining 810008, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination the content of oleanolic acid and ursolic acid in Yishoucao by HPLC. **METHODS** Phenomenex Kromasil ODS-C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm); was used the mobile phase consisted of methanol-0.1% H₃PO₄ (85:15) column temperature was 30 °C; The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the UV detection wavelength was at 215 nm. **RESULTS** The content of oleanolic acid and ursolic acid in Yishoucao by HPLC were 1.06% and 3.81%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, rapid, reliable and reproducible, and can be used to control the quality of Yishoucao effectively.

KEY WORDS: Yishoucao; HPLC; oleanolic acid; ursolic acid

藏药翼首草为川续断科植物匙叶翼首花 *Pterocephalus hookeri* (C B Clarke) Hoeck 的干燥全草, 藏名又称榜孜毒鸟。其性寒味苦, 具有清热解毒, 祛风通痹的作用, 民间常用于治疗感冒发烧、痹症、痢疾、风湿性关节炎等症^[1]。翼首草不仅是《中华人民共和国卫生部药品标准(藏药)(第一册)》中单独列出的一种藏药材而且还是是一些藏药制剂如达斯玛保丸、十二味奇效汤散、二十五味余甘子丸等的组成成分之一。目前, 有关翼首草的化学成分的报道较多并指出其成分主要是三萜皂苷及其苷元齐墩果酸、熊果酸等^[2]。齐墩果酸不仅具有保肝、护胃、强心、抗心律失常、降血糖、降血脂、抗高血压的生物活性外, 还具有抗炎、抗病毒、免疫调节、抑制血小板聚集和抗过氧化等多种药理作用^[3]。熊果酸具有镇静、抗炎、抗菌、抗糖尿病、降血糖、抑制癌细胞和肿瘤细胞等作用^[4]。库进良等^[5]曾测定了翼首草根中熊果酸的含量, 但未对翼首草全草及其另一有效成分齐墩果酸做含量测定。本实验采用高效液相色谱法建立了同时测定翼首草全草药材中齐墩果酸和熊果酸含量的方法, 为进一步有效控制翼首草药材及其制剂的质量提供依据。

1 材料

Waters600E 高效液相色谱仪(二元梯度 515 泵、智能柱温箱、二极管阵列 2996 检测器、化学工作站等); 齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110709-200304, 供含量测定用); 熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110742-200415, 供含量测定用); 甲醇为色谱纯; 水为纯化水; 其余试剂均为分析纯; 翼首草全草药材采自青海省大通县, 由本实验室梅丽娟高级工程师鉴定为匙叶翼首花 *Pterocephalus hookeri* (C B Clarke) Hoeck,

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Kromasil ODS-C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸(85:15); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 215 nm。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取齐墩果酸、熊果酸对照品, 用甲醇超声溶解配成含 1.6 g·L⁻¹ 齐墩果酸、1.0 g·L⁻¹ 熊果酸的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取翼首草药材 0.5 g(过 4 号筛)置于具塞三角瓶中, 加入 25 mL 甲醇, 密塞, 称定重量。超声处理 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 mL, 定容至 10 mL 量瓶中。过 0.45 μm 微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 精密量取上述对照品混合溶液 0.04, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL 至 2 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。各取上述溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 色谱图见图 1, 记录峰面积, 以对照品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制坐标曲线。结果表明齐墩果酸在 0.032 ~ 1.6 g·L⁻¹, 熊果酸在 0.02 ~ 1.0 g·L⁻¹ 线性关系良好, 其回归方程分别为齐墩果酸: $Y = 2.984002X - 881$ ($r = 0.99996$), 熊果酸: $Y = 1983.096X - 801$ ($r = 0.99998$)。

2.5 精密度试验 分别精密吸取上述混合对照品溶液 10 μL, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 分别记录齐墩果酸、熊果酸的峰面积。计算 RSD 分别为 1.28% 和 0.96%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 按样品溶液制备方法处理同一样品 5 份, 各吸取 10 μL, 按上述色谱条件测定, 分别记录齐墩果酸、熊果酸的峰面积。计算 RSD 分别为 1.64% 和 1.35%, 实验方法的重复性良好。

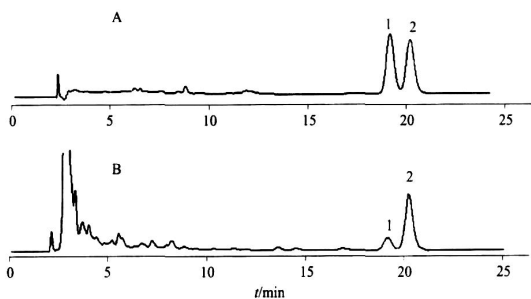


图 1 HPLC 图谱

A. 对照品; B. 样品; 1 - 齐墩果酸; 2 - 熊果酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. Reference substances; B. sample; 1 - oleanolic acid; 2 - ursolic acid

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 16 h 按上述色谱条件测定, 分别记录齐墩果酸、熊果酸的峰面积, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积稳定, 计算 RSD 分别为 1.79% 和 1.06%, 表明样品溶液至少在 16 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 称取 5 份已知含量的翼首草药材各 0.5 g, 精密称定。分别精密加入含 1.6 g·L⁻¹ 齐墩果酸、1.0 g·L⁻¹ 熊果酸的混合对照品溶液 1.0 mL。5 份样品按供试品溶液的制备方法处理, 依上述色谱条件方测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 (n=5)

Tab 1 The results of the recovery test (n=5)

化合物	序号	加入量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
齐墩果酸	1	1.600	1.582	98.87	99.02	1.18
	2	1.600	1.574	98.37		
	3	1.600	1.580	98.75		
	4	1.600	1.590	99.37		
	5	1.600	1.596	99.75		
熊果酸	1	1.000	1.002	100.20	101.02	0.98
	2	1.000	1.010	101.00		
	3	1.000	1.011	101.10		
	4	1.000	1.013	101.30		
	5	1.000	1.015	101.50		

2.9 样品含量测定 精密吸取供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定, 测得峰面积, 代入回归方程。计算翼首草药材中齐墩果酸、熊果酸的含量。测得翼首草药材中齐墩果酸、熊果酸的含量分别为 10.6, 38.16 mg·g⁻¹ (n=5)。

3 讨论

3.1 提取溶剂和方法的选择 提取齐墩果酸、熊果酸的溶剂主要有氯仿、乙醇、乙醚, 提取方法有超声法、索式提取法、回流提取法^[6-8]。本实验以 80% 的乙醇做溶剂, 用超声法、索式提取法、回流提取法对其进行了提取并做了含量测定, 结果表明超声法效果最好。同时, 我们又分别用氯仿、80% 乙醇、

95% 乙醇、乙醚、甲醇做溶剂超声提取样品, 甲醇定容后测定齐墩果酸和熊果酸的含量, 其齐墩果酸的含量分别 0.94%, 0.97%, 0.93%, 1.06%, 熊果酸的含量分别为 2.89%, 3.53%, 3.43%, 3.81%。甲醇超声提取效果最好。本着准确、简便、快速的原则, 本试验采用了甲醇超声提取法。

3.2 色谱条件的优化 齐墩果酸、熊果酸同为三萜类化合物, 互为同分异构体, 极性相近, 故要把二者很好的分开, 色谱条件尤为重要。我们考察了齐墩果酸和熊果酸在 190~400 nm 波长下的紫外吸收情况, 结果在 205 nm 处有最大吸收, 但在此处基线不稳定, 为了使基线稳定, 选择了 215 nm 做为检测波长。测定齐墩果酸、熊果酸所用的流动相有甲醇-水-冰醋酸、甲醇-四丁基溴化铵-三乙胺和甲醇-水-冰醋酸-三乙胺系统等^[5-8], 本实验通过摸索甲醇与不同浓度的磷酸溶液按一定比例混合作为流动相, 考察其分离度, 结果以甲醇-0.1% 磷酸为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 的色谱条件下样品中齐墩果酸和熊果酸能达到良好的分离; 故本试验最终确定此色谱条件。

3.3 样品测定结果 结果表明, 翼首草全草中熊果酸含量明显高于库进良等^[5]曾测定的其根中熊果酸含量。但因本实验样本偏少, 要对翼首草全草中齐墩果酸和熊果酸的含量控制做出最低限度规定, 还需进一步增加样本量。

本实验建立了翼首草药材中齐墩果酸、熊果酸的 HPLC 含量测定方法。该方法操作简便、结果可靠、重复性好, 可为控制翼首草药材及其制剂的质量提供依据。

参考文献:

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 191.
- [2] 田军, 吴凤钊, 丘明华, 等. 匙叶翼首花的化学成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12 (1): 351.
- [3] 杜瑜, 李焕德. 齐墩果酸的研究进展 [J]. 中国药房, 2006, 17 (4): 306.
- [4] 肖坤福, 郑云法, 刘成左, 等. 熊果酸的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16 (12): 1298.
- [5] 库进良, 马刚. RP-HPLC 法测定翼首草藏药材中熊果酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25 (11): 1385.
- [6] 张才华, 郭兴杰. HPLC 法同时测定白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸得含量 [J]. 沈阳大学学报, 2004, 21 (5): 358.
- [7] 赵永席, 马国营. RP-HPLC-ELSD 测定山茱萸中齐墩果酸与熊果酸得含量 [J]. 中成药, 2005, 27 (11): 1314.
- [8] 杨延英, 杨光. 常用中药中齐墩果酸和熊果酸得含量测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24 (5): 316.

[收稿日期] 2007-10-23