

- 康复, 2009, 13(8):1481-1485
- [6] 李保国, 华泽钊, 刘占杰. 高压静电场制备微胶囊的研究[J]. 上海理工大学学报, 2000, 22(3): 189-193.
- [7] 赵国玺. 表面活性剂物理化学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1991: 13-18.
- [8] 刘群, 薛伟明, 于炜婷, 等. 海藻酸钠-壳聚糖微胶囊膜强度的研究[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(7):1417-1420.
- [9] 薛伟明, 于炜婷, 刘袖洞, 等. 载细胞海藻酸钠/壳聚糖微胶囊的化学破囊方法研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(7): 1342-1346.
- [10] 贾伟, 高文远. 药物控释新剂型[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 324.
- [收稿日期]2010-06-22

高效液相色谱法同时测定大鼠在体肠循环液中非诺贝特和非诺贝酸的含量

黄琴琴, 李学明, 王永禄, 孙小虎, 陈卫 (南京工业大学药学院, 江苏 南京 211816)

[摘要] 目的: 建立同时测定大鼠在体肠循环液中非诺贝特和非诺贝酸的方法。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为甲醇-水(80:20), pH 3.0, 柱温为室温, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 286 nm。结果: 非诺贝特、非诺贝酸分别在 0.25~124.68 mg·L⁻¹、0.01~5.05 mg·L⁻¹ 范围内与峰面积呈良好线性关系, *r* 分别为 0.999 和 0.999 9。其平均回收率分别为 98.83%、101.13%, RSD 均小于 4%。结论: 该法操作简便、结果准确、灵敏度高, 可同时测定大鼠在体肠循环液中非诺贝特和非诺贝酸的含量。

[关键词] 非诺贝特; 非诺贝酸; 在体肠循环; 高效液相色谱法

[中图分类号] R927.2; R945 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)17-1429-04

Simultaneous determination of fenofibrate and fenofibric acid in the solution of *in situ* intestinal loop by HPLC

HUANG Qin-qin, LI Xue-ming, WANG Yong-lu, SUN Xiao-hu, CHEN Wei (School of Pharmaceutical sciences, Nanjing University of Technology, Jiangsu Nanjing 211816, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To determine the concentrations of fenofibrate and fenofibric acid simultaneously in the solution of *in situ* intestinal loop by HPLC. **METHODS** An HPLC method was established with a Kromasil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-water (80:20). Detection was performed at 286 nm, and the column oven was maintained at room temperature. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** Determinations of fenofibrate and fenofibric acid indicated good linearity range of 0.25 to 124.68 mg·L⁻¹, and 0.01 to 5.05 mg·L⁻¹, respectively. Linear coefficients (*r*) was 0.999 and 0.999 9, respectively. The average recoveries were 98.83%, and 101.13%, and both RSDs was less than 4%. **CONCLUSION** This method is simple, sensitive and accurate, and used to simultaneously determine the concentrations of fenofibrate and fenofibric acid in the solution of *in situ* intestinal loop.

KEY WORDS: fenofibrate; fenofibric acid; intestinal loop; HPLC

大鼠在体肠循环实验能避免胃内容物排出和消化管固有运动的影响^[1], 并在动物保持完整的血循环、神经系统和代谢功能的情况下获得动力学数据^[2], 是研究药物肠吸收的重要实验方法。非诺贝特属苯氧芳酸类降血脂药, 是一种含有酯键结构的前体药, 吸收入体内后经酯酶水解为活性代谢物非诺贝酸^[3]。在研究非诺贝特肠吸收的过程中, 我们发现随着吸收时间的延长, 肠道中部分非诺贝特水解为非诺贝酸。关于非诺贝特和非诺贝酸的单独检

测方法已有较多文献记载, 但是未见有在同一样品中同时检测两者的报道。本实验建立了 HPLC 法, 同时检测大鼠在体肠循环液中非诺贝特和非诺贝酸的含量, 以期了解非诺贝特在肠道内的转化过程和吸收机制。

1 材料

Shimadzu CBM-10A 泵, SPD-20A 紫外检测器(日本岛津公司)。非诺贝特及其对照品、非诺贝酸对照品(徐州恩华药业); 水为注射用水; 甲醇为色谱

[基金项目] 江苏省高校自然科学研究面上项目(编号: 10KJB350002) [作者简介] 黄琴琴, 女, 硕士, 电话: 13852289167, E-mail: huangqin-qin328@163.com [通讯作者] 李学明, 副教授, 电话: 025-58139399, E-mail: xuemingli@njut.edu.cn

纯;其他试剂为分析纯。SD 大鼠,♂♀各半,体质量 250~300 g,由中国药科大学动物室提供,动物合格证号:SCXK(苏)2002-0018。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:室温;检测波长:286 nm;流动相:甲醇-水(80:20),用磷酸调节至 pH 3.0;流速:1.0 mL·min⁻¹。

2.2 肠吸收实验方法 大鼠实验前禁食 24 h,称重后,腹腔注射浓度为 8%的乌拉坦溶液(0.01 mL·g⁻¹)麻醉固定。沿腹中线打开腹腔(约 2.5 cm),结扎胆管,于实验肠段两端各切一小口,在上端小口处插入直径为 0.3 cm 的玻璃管,并用线扎紧。用注射器将 37℃的生理盐水缓缓注入肠管,洗去肠管内容物至净。然后在实验肠管下端小口处插入玻璃管,并用线扎紧。将肠管两端的玻璃管与蠕动泵的胶管连接,形成回路,开动蠕动泵。供试液以 5 mL·min⁻¹流速循环 10 min 后,将流速调节为 2.5 mL·min⁻¹,立即自供试液锥形瓶中取样 5 mL,作为测定零时刻药物浓度和酚红浓度的样品,同时向锥形瓶中补加酚红液 5 mL,其后每隔 30 min 亦按同法取样并补加酚红 K-R 液,循环 4 h 后,中止实验。样品经离心过滤后分别测定非诺贝特、非诺贝酸的浓度。

2.3 溶液的配制

2.3.1 Krebs-Ringer 试液(K-R 试液, pH 7.4) 称取氯化钠 7.8 g、氯化钾 0.35 g、无水氯化钙 0.37 g、碳酸氢钠 1.37 g、磷酸二氢钠 0.32 g、无水氯化镁 0.02 g、葡萄糖 1.4 g,加注射用水溶解定容至 1 L。

2.3.2 阴性对照液 称取“2.3.1”项中各物质,然后加入乙醇 50 mL 及聚山梨酯 80 溶液(10%体积比)50 mL,加注射用水溶解定容至 1 L 即得。

2.3.3 空白肠循环液 照“2.2”项方法,将阴性对照液循环 4 h,中止实验,即得。

2.3.4 非诺贝特乙醇溶液 精密称取非诺贝特对照品 49.87 mg,加无水乙醇溶解定容至 100 mL。

2.3.5 非诺贝特对照液 精密吸取“2.3.4”项中的非诺贝特乙醇溶液 20 mL,加入聚山梨酯 80 溶液(10%体积比)5 mL,用阴性对照液稀释定容至 100 mL。

2.3.6 非诺贝酸对照液 于 100 mL 量瓶中加入非诺贝酸对照品 1.03 mg,用阴性对照液溶解定容至刻度即得。

2.3.7 非诺贝特和非诺贝酸混合对照液 精密量取 0.498 7 mg·mL⁻¹非诺贝特乙醇溶液 50 mL,再精密

加入聚山梨酯 80 溶液(10%体积比)5 mL、非诺贝酸对照品 1.01 mg,用阴性对照液稀释定容至 100 mL。

2.3.8 非诺贝特和非诺贝酸混合对照品系列标准工作液 分别精密量取“2.3.7”项中混合对照液 0.01, 0.1, 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 5 mL 至 10 mL 量瓶中,用阴性对照液稀释定容至刻度,作为混合对照品系列标准工作溶液,非诺贝特浓度范围:0.25~124.68 mg·L⁻¹,非诺贝酸浓度范围:0.01~5.05 mg·L⁻¹。

2.3.9 供试液 精密量取 0.506 2 mg·mL⁻¹非诺贝特乙醇溶液 20 mL,加入聚山梨酯 80 溶液(10%体积比)5 mL、酚红 2.97 mg,用 K-R 试液稀释定容至 100 mL,即为供试液。

2.3.10 肠循环样品液 将“2.3.9”项中的供试液按“2.2”项方法循环 4 h 后中止,即得所需样品液。

2.3.11 酚红 K-R 液 精密称取酚红 3.03 mg,加无水乙醇 5 mL 及聚山梨酯 80 溶液(10%体积比)5 mL,最后用 K-R 液溶解定容至 100 mL。

2.4 专属性考察 分别取阴性对照液、非诺贝特对照液、非诺贝酸对照液、非诺贝特和非诺贝酸混合对照液、空白肠循环液、肠循环样品液进样,在“2.1”项条件下分离测定,色谱图见图 1。结果可见非诺贝酸、非诺贝特的保留时间分别为 5.3, 12.8 min。肠循环样品液中 2 种物质的保留时间与对照品的一致。供试液中其他成分在色谱条件下不干扰测定。

2.5 线性关系的考察 分别取混合对照品系列标准工作液,在“2.1”项条件下,进样 20 μL,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,作线性回归。非诺贝特的回归方程为:Y=63 218C-2 844(r=0.999),即非诺贝特在 0.25~124.68 mg·L⁻¹之间呈良好的线性关系;非诺贝酸的回归方程为:Y=90 819C-501.25(r=0.999 9),即非诺贝酸在 0.01~5.05 mg·L⁻¹之间呈良好的线性关系。

2.6 最低检测限考察 取低浓度的对照液逐步稀释,进样测定至样品峰为基线噪音的 3 倍,得非诺贝特及非诺贝酸的最低检测浓度为 0.01 mg·L⁻¹、1.01 μg·L⁻¹。

2.7 精密度的测定 日内精密度:分别吸取低、中、高 3 个不同浓度的混合对照液,在“2.1”项条件下,进样 20 μL,记录色谱图,测定峰面积,结果非诺贝特和非诺贝酸的平均 RSD 分别为 0.35%, 0.86%。

日间精密度:分别在 1, 2, 3, 4, 5 d 吸取低、中、高 3 个不同浓度的混合对照液,在“2.1”项条件下,进样 20 μL,重复进样 5 次,记录色谱图,测定峰面积,结果非诺贝特和非诺贝酸的平均 RSD 分别为:

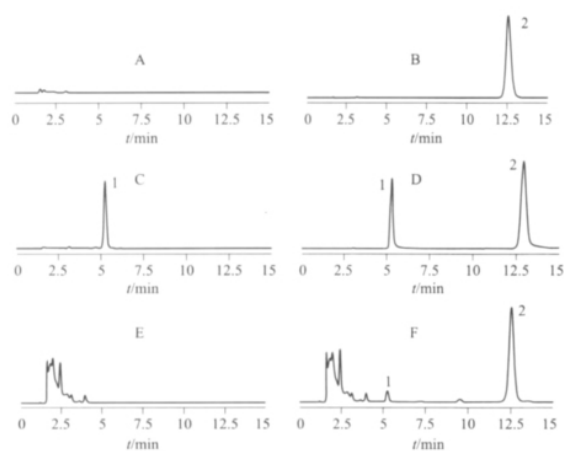


图 1 非诺贝特、非诺贝酸 HPLC 测定色谱图
A. 阴性对照液; B. 非诺贝特对照液; C. 非诺贝酸对照液; D. 混合对照液; E. 空白肠循环液; F. 肠循环样品液; 1-非诺贝酸; 2-非诺贝特
Fig 1 HPLC chromatogram for fenofibrate and fenofibric acid
A. negative sample; B. fenofibrate standard sample; C. fenofibric acid standard sample; D. reference sample with fenofibrate and fenofibric acid; E. Blank circumfusion solution; F. circumfusion sample; 1- fenofibric acid; 2- fenofibrate

0.13%, 0.42%。

实验结果表明,非诺贝特和非诺贝酸的日内和日间精密度均良好。

2.8 回收率的测定 取不同体积的混合对照品溶液,置 10 mL 量瓶中,用阴性对照液稀释定容,得到低、中、高 3 个浓度的供试品溶液,进样 20 μ L,重复进样 5 次,在“2.1”项条件下分离测定。计算回收率,结果非诺贝特和非诺贝酸的平均回收率分别为 98.83%, 101.13%, RSD 分别为 1.95%, 3.38%,表明该法适合用于非诺贝特及非诺贝酸的含量测定。

2.9 稳定性考察 于 100 mL 量瓶中加入 0.506 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 非诺贝特乙醇溶液 20 mL、聚山梨酯 80 溶液(10%体积比) 5 mL、非诺贝酸 1.01 mg,用 KR 试液稀释定容至刻度。将混合液置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 4 h,按“2.1”项方法测定,以药物剩余百分比表示药物稳定性,结果非诺贝特及非诺贝酸的剩余百分比分别是 98.24%、99.97%, RSD 分别为 1.35% ($n=5$)、0.51% ($n=5$),可见 K-R 试液中两种物质的稳定性良好。

2.10 样品的测定 将供试液按“2.2”项方法循环并取样, $1\times 10^4 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液适量,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样,记录色谱图,用回归方程计算肠循环液中非诺贝特和非诺贝酸的浓度。结果见表 1。

表 1 大鼠各肠段不同时间点肠循环液中非诺贝酸和非诺贝特的浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Tab 1 The concentrations of fenofibric acid and fenofibrate in the solution of *in situ* intestinal loop($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

| 时间 /h | 非诺贝酸/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | | 非诺贝特/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | |
|-------|-------------------------------------|------|------|------|-------------------------------------|--------|--------|-------|
| | 十二指肠 | 空肠 | 回肠 | 结肠 | 十二指肠 | 空肠 | 回肠 | 结肠 |
| 0 | | | | | 103.94 | 104.99 | 106.74 | 96.02 |
| 0.5 | | | | | 102.04 | 99.51 | 96.85 | 87.15 |
| 1 | 0.04 | | 0.71 | | 90.04 | 85.66 | 89.85 | 80.08 |
| 1.5 | 0.47 | 0.75 | 0.93 | 0.03 | 62.78 | 64.72 | 68.65 | 63.49 |
| 2 | 0.70 | 0.84 | 1.51 | 0.04 | 52.38 | 62.05 | 57.21 | 59.09 |
| 2.5 | 0.81 | 0.91 | 1.91 | 0.13 | 47.08 | 47.13 | 47.15 | 45.53 |
| 3 | 1.00 | 1.05 | 1.87 | 0.13 | 40.46 | 42.37 | 39.96 | 39.96 |
| 3.5 | 1.23 | 1.15 | 2.13 | 0.22 | 36.67 | 37.21 | 34.00 | 34.62 |
| 4 | 1.37 | 1.21 | 2.19 | 0.33 | 30.78 | 33.47 | 26.90 | 31.05 |

实验发现,非诺贝特在整个肠段有较好的吸收,其水解产物非诺贝酸的含量具有回肠 > 十二指肠 \approx 空肠 > 结肠的差异性,推测非诺贝特可能受到了小肠中消化酶及肠道菌群酶的水解作用^[4],且此水解酶在结肠中的含量明显低于其他肠段。以上结果提示非诺贝特适合制成控缓释制剂,但制剂过程中还需考虑不同肠段中各类酶的影响。

3 讨论

大鼠在体循环只限于溶解性较好、能够以水溶液状态给药的药物。因非诺贝特水溶性差,故选用了增溶的方法。即先用乙醇溶解,使非诺贝特呈分子分散状态后再加入增溶剂聚山梨酯 80 溶液(10% 体积比),再以 K-R 试液稀释定容。以上步骤不能颠倒,尤其非诺贝特应先超声至完全溶解,否则增溶将失败。因溶液中含有聚山梨酯 80,故配制过程中不宜剧烈震荡,避免产生泡沫。由于肠道水分吸收可导致循环液体积变化,故采用不易被吸收的酚红的浓度来计算循环液的体积,测定方法为常用的紫外分光光度法,以此对药物浓度进行校正。

本实验在参考非诺贝特^[5]及非诺贝酸^[6]各自色谱条件基础上,筛选比较了甲醇-水(70:30, 76:24, 80:20, 85:15)4 种不同配比的流动相。结果发现,以 80:20(pH 3.0)的甲醇-水为流动相时,被测物分离最好,分析时间较短,故选其作为流动相。

参考文献:

[1] 沈凯,王景田. 药物肠吸收实验方法研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(12): 988-990.
[2] 陈颖,平其能,郭健新,等. 大鼠在体肠回流法研究环孢素纳米脂质体的吸收行为[J]. 中国新药与临床杂志, 2003, 22(6): 331-334.
[3] Hanafy A, Spahn-Langguth H, Vergnault G, et al. Pharmacokinetic evaluation of oral fenofibrate nanosuspensions and SLN in comparison to conventional suspensions of micronized drug [J]. Adv Drug Delivery Rev, 2007, 59(6): 419-426.
[4] 梁文权,李高,刘建平. 生物药剂学与药物动力学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 136.

- [5] 李小燕. 反相高效液相色谱法测定非诺贝特片的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24 (4): 251-252. 贝酸的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志, 2000, 20 (4): 231-233.
- [6] 范国荣, 林梅, 张正行, 等. 人血浆中非诺贝特活性代谢物非诺 [收稿日期] 2010-11-11

多指标正交试验优化葛泽清肝胶囊的提取工艺

张倩¹, 刘志宏², 周欣², 张晶², 宋洪涛² (1. 福建医科大学药学院, 福建 福州 350004; 2. 南京军区福州总医院药学科, 福建 福州 350025)

[摘要] 目的: 优选葛泽清肝胶囊的提取工艺。方法: 采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验, 以葛花苷、23-乙酰泽泻醇 B、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 和熊果酸的提取率及浸膏得率为考察指标, 选择乙醇浓度、溶剂用量、提取时间和浸泡时间作为考察因素, 每个因素各取 3 个水平, 在此基础上, 再进行提取次数考察。结果: 采用 70% 乙醇浸泡 1 h, 热回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 溶剂用量第一次为 12 倍量, 第二次为 10 倍量, 葛花苷、23-乙酰泽泻醇 B、丹酚酸 B 和熊果酸的提取率均达到 83% 以上, 丹参酮 II_A 的提取率在 74% 以上。结论: 优选的提取工艺对各指标性成分的提取率均较高, 可增加各处方药材的利用率。

[关键词] 葛花苷; 23-乙酰泽泻醇 B; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A; 熊果酸; 多指标同时测定; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R943 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)17-1432-05

Optimization for extraction technology of Geze Qinggan capsules by orthogonal experimental design with multi-indexes

ZHANG Qian¹, LIU Zhi-hong², ZHOU Xin², ZHANG Jing², SONG Hong-tao² (1. School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fujian Fuzhou 350004, China; 2. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command, Fujian Fuzhou 350025, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To optimize the extraction technology of Geze Qinggan capsules. **METHODS** The extraction rate of kakkalide, 23-acetyl alisol B, salvianolic acid B, tanshinone II_A, ursolic acid and the extract yield was used as the analysis indexes. The extraction technology was optimized through $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design by selecting alcohol concentration, solvent volume, extraction time and soak time as factors. The number of extraction times was investigated basing on the above experiment. **RESULTS** The optimized extraction technology was as follows: soak for 1 h and extract twice with 70% of ethanol for 1.5 h each time, the volume of solvent was 12 times as much as the amount of crude drug for the first time and 10 times for the second time. The extraction rate of kakkalide, 23-acetyl alisol B, salvianolic acid B and ursolic acid was more than 83%, the extraction rate of tanshinone II_A was above 74%. **CONCLUSION** The extraction technology showed higher efficiency for each indicated component and could increase the availability of crude drugs in the prescription.

KEY WORDS: kakkalide; 23-acetyl alisol B; salvianolic acid B; tanshinone II_A; ursolic acid; multi-indexes simultaneous determination; orthogonal experimental design; extraction technology

葛泽清肝汤为我院治疗酒精性脂肪肝的临床验方, 由葛花、泽泻、丹参、山楂等 6 味中药组成, 具有消酒积、舒肝郁、化淤利湿的功效。方中葛花为君药, 主要活性成分为异黄酮类化合物, 其指标性成分为葛花苷^[1]; 泽泻为臣药, 主要活性成分为三萜类化合物, 其指标性成分为 23-乙酰泽泻醇 B^[2]; 丹参为佐药, 主要活性成分为酚酸类和醌类化合物, 其指标性成分为丹酚酸 B 和丹参酮 II_A^[3,4]; 山楂亦为佐药, 其指标性成分为熊果酸^[5]。为将传统汤剂改制成适合现代临床使用的口服胶囊剂, 本实验采用多

指标同时测定的方法, 以复方中多种有效成分的提取率为指标, 选用正交试验对提取工艺条件进行了优选。

1 材料

Agilent1200 型快速液相色谱仪(G1316A 型二极管阵列检测器, 二元泵, 自动进样, Chemstation 色谱工作站, 美国安捷伦)。

葛花苷对照品(自制, 批号 09122822, 纯度 > 98%), 23-乙酰泽泻醇 B 对照品(上海同田生物技术有限公司, 批号 09122822, 纯度 > 99%), 丹酚酸 B

[作者简介] 张倩, 女, 讲师, 硕士, 电话: 13850153200, E-mail: sohoto@sohu.com [通讯作者] 宋洪涛, 男, 主任药师, 博士, 博士生导师, 电话: 0591-22859459, E-mail: sohoto@vip.sohu.com