

表 3-3 四味抗癆丸给药恢复期对大鼠血清生化指标和电解质指标的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

剂量/ (g · kg ⁻¹ · d ⁻¹)		AST/(U/L)	ALT/(U/L)	CK/(U/L)	BUN/ (mmol/L)	ALP/ (g/L)	CHO/ (mmol/L)	TG/ (mmol/L)	GLU/ (mmol/L)	TBI/ (mmol/L)
雌性	NS	183.6 ± 33.4	46.5 ± 11.8	835.4 ± 338.7	31.7 ± 3.4	45.8 ± 15.9	1.7 ± 0.3	0.6 ± 0.1	7.1 ± 1.4	7.5 ± 1.2
	1.0	220.6 ± 39.5	53.1 ± 12.7	798.8 ± 230.8	22.0 ± 13.2	51.4 ± 14.6	1.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1	7.5 ± 0.5	6.8 ± 1.0
	2.0	217.4 ± 35.0	54.4 ± 7.0	922.5 ± 532.2	30.4 ± 4.1	41.4 ± 5.8	2.1 ± 0.3	0.6 ± 0.1	7.2 ± 1.0	7.4 ± 2.2
	3.0	209.5 ± 37.8	61.4 ± 17.3	1075.7 ± 219.9	29.0 ± 4.2	50.1 ± 11.0	1.8 ± 0.3	0.6 ± 0.0	6.1 ± 0.9	7.6 ± 1.5
雄性	NS	180.2 ± 25.1	48.1 ± 4.9	824.8 ± 267.2	31.0 ± 14.1	72.0 ± 14.2	1.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	6.6 ± 1.4	5.8 ± 0.4
	1.0	195.6 ± 26.2	40.2 ± 5.4*	915.3 ± 144.7	24.7 ± 6.0	53.5 ± 6.3*	1.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	6.3 ± 1.0	6.9 ± 1.0
	2.0	213.0 ± 27.6	54.5 ± 4.2	957.4 ± 365.6	24.5 ± 1.9	66.9 ± 7.8	1.6 ± 0.1	1.0 ± 1.0	7.5 ± 0.9	6.9 ± 2.3
	3.0	204.6 ± 19.5*	48.4 ± 10.2	832.5 ± 398.4	24.1 ± 3.9	68.4 ± 19.9	1.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	6.7 ± 1.3	8.3 ± 1.6**

剂量/ (g · kg ⁻¹ · d ⁻¹)		ALB/ (μmol/L)	CRE/ (μmol/L)	TP/(g/L)	K/(mmol/L)	Na/(mmol/L)	Cl/(mmol/L)	Ca/(mmol/L)	pH
雌性	NS	42.9 ± 3.1	58.4 ± 6.8	76.2 ± 6.0	5.1 ± 0.4	146.7 ± 1.5	104.7 ± 1.3	1.22 ± 0.07	7.95 ± 0.04
	1.0	43.9 ± 2.4	62.4 ± 10.1	72.1 ± 5.4	5.1 ± 0.2	145.5 ± 1.1	104.0 ± 1.3	1.22 ± 0.04	7.90 ± 0.03
	2.0	45.9 ± 3.1	67.2 ± 11.2	78.6 ± 3.1	5.0 ± 0.5	145.1 ± 1.7	103.9 ± 0.2	1.26 ± 0.01	7.91 ± 0.02
	3.0	45.6 ± 2.0	68.4 ± 13.0	78.1 ± 6.4	5.2 ± 0.4	146.0 ± 0.9	104.4 ± 0.9	1.22 ± 0.02	7.93 ± 0.03
雄性	NS	38.2 ± 1.2	52.4 ± 7.6	74.0 ± 4.4	5.1 ± 0.3	148.3 ± 2.1	103.0 ± 3.1	1.23 ± 0.02	7.86 ± 0.03
	1.0	38.0 ± 1.7	45.8 ± 8.4	68.6 ± 1.2	5.0 ± 0.2	145.7 ± 1.5	101.7 ± 1.2	1.24 ± 0.01	7.89 ± 0.04
	2.0	39.1 ± 1.3	61.9 ± 10.4	72.1 ± 3.9	5.2 ± 0.3	146.4 ± 1.3	105.1 ± 0.7	1.22 ± 0.02	7.90 ± 0.03
	3.0	43.1 ± 2.8**	72.1 ± 5.7	58.7 ± 11.0	5.3 ± 0.3	146.7 ± 2.5	102.9 ± 1.3	1.21 ± 0.02	7.89 ± 0.02

注: 雌性给药组与雌性对照组比较 $P > 0.05$; 雄性给药组与雄性对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

显著性差异,血常规、凝血、血生化、电解质指标虽有极个别有统计学意义,但均在正常范围。实验结果证明四味抗癆丸对大鼠无明显蓄积毒副作用,拟用日剂量及疗程在临床应用上是安全的。

参考文献:

- [1] [Z]GPT3-4 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[S]. 北京: 人民卫生出版社 2005: 1-16.
- [2] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社,

1993: 112-119.

- [3] 徐叔云,卞如濂,陈 修,等. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社 2002: 227-231.
- [4] 李建荣,黄芳华. 中药新药长期毒性试验设计及常见问题分析[J]. 中国新药杂志 2004, 13(9): 769-772.
- [5] 袁伯俊. 新药非临床安全性研究的实验设计和实施[J]. 中国新药杂志 2004, 13(9): 773-775.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社 2010: 74-75.

荆感胶囊中胡薄荷酮的溶出度研究

张 丽¹, 钱丽华¹, 单鸣秋¹, 江 春², 李 萍², 丁安伟¹

(1. 南京中医药大学 江苏 南京 210046; 2. 四川升和制药有限公司 四川 成都 610041)

摘要: 目的 考察荆感胶囊中胡薄荷酮的溶出行为。方法 采用 HPLC 法,色谱条件为色谱柱 汉邦 Megres3 C_{18} 柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm);流动相 CH_3OH-H_2O (90:10);检测波长 252 nm;体积流量 1 mL/min;筛选出溶出度测定条件;计算并绘制胡薄荷酮的累积溶出曲线。结果 溶出度测定条件为采用浆法,转速 100 r/min,以 0.3% SDS 溶液 900 mL 为溶出介质。荆感胶囊中胡薄荷酮的溶出量 45 min 达到 70% 以上。结论 荆感胶囊中胡薄荷酮溶出度良好。

关键词: 荆感胶囊; 胡薄荷酮; 溶出度

中图分类号: R927.11

文献标志码: B

文章编号: 1001-4528(2011)08-1426-04

收稿日期: 2010-11-01

基金项目: 国家“十一五”重大新药创制资助项目(2009ZX09103-339)

作者简介: 张 丽(1971—),女,副教授,博士,从事中药炮制与质量控制。Tel(025) 85811519, E-mail: zhangli@njutcm.edu.cn

荆感胶囊为以传统解表药荆芥(*Schizonepeta tenuifolia* Briq.)穗的挥发油为原料制成的胶囊剂,具有疏风散寒、发汗解表的功效,用于风寒感冒的治疗,临床效果较好。但因该制剂原料荆芥穗挥发油为水中难溶成分,因此为评价荆感胶囊的溶出情况,本实验以荆芥穗挥发油中主要成分胡薄荷酮^[1]为指标,考察了荆感胶囊的体外溶出度。

1 仪器与试药

1.1 仪器 RCZ-8A 智能药物溶出仪(天津大学仪器厂), Anke TGL-46B 微量离心机(上海安亭科学仪器厂),日本岛津 LC-40AD 型高效液相色谱仪, Sartorius BP211D 电子天平(精确到 0.01 mg)。

1.2 试药 (+)-胡薄荷酮对照品(含量测定用,购自 Sigma-Aldrich 公司,批号 376388-4G,11121CE),十二烷基硫酸钠(SDS,供溶出介质配制用,中国药品生物制品检定所),甲醇(色谱纯,江苏汉邦有限公司,批号 91656),荆感胶囊(四川升和制药有限公司,批号 20071201、20071202、20071203)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:汉邦 Megres3 C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相: MeOH-H₂O = 90:10;柱温:30℃;检测波长:252 nm;体积流量:1 mL/min;进样量:10 μL。理论板数按胡薄荷酮峰计算应不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的配制 精密称取胡薄荷酮对照品 53.92 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 2.157 mg/mL 的胡薄荷酮对照品母液。

2.3 供试品溶液的配制 使用转篮法,按照《中国药典》2010 版(二部)附录 XC 溶出度测定法项下操作^[2],分别量取经脱气处理的 0.3% SDS 溶液 900 mL,置各溶出杯内,加温,待温度恒定在(37 ± 0.5)℃后,分别取 3 批胶囊各 12 粒,每次 6 粒,投入 6 个干燥的转篮内,转速 100 r/min 平稳后,将转篮降入溶出杯中,自供试品接触溶出介质起,立即计时;于 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min、45 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h,分别吸取溶出液 1 mL,立即经 15 000 r/min 高速离心 3 min,即得溶出曲线测定供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备 精密量取胡薄荷酮对照品母液 1 mL,置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加 0.3% SDS 溶液稀释至刻度,摇匀,即得 0.043 14 mg/mL 的胡薄荷酮对照品溶液。再采用逐级稀释法制得质量浓度为 0.021 57、0.010 79、0.005 393、0.002 696 mg/mL 系列对照品溶液。精密吸取上述 5 份对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,依法测定,记录色谱图。以胡薄荷酮峰面积值的平均值为纵坐标(Y),胡薄荷酮对照品溶液质量浓度(mg/mL)为横坐标(X),进行线性回归,得胡薄荷酮的回归方程为 $Y = 5.3314 \times 10^7 X + 3181$ ($r = 0.99998$)。结果表明胡薄荷酮进样量在 0.026 96 ~ 0.431 4 μg 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 以质量浓度为 0.021 57 mg/mL 的胡薄荷酮对照品溶液为试验对象,连续进样 6 次,依法测定,计算胡薄荷酮峰面积值的 RSD 为 1.77%,表明本方法精密度良好。

2.6 阴性对照试验 取不含荆芥穗挥发油的阴性制剂依法制备阴性对照溶液,精密吸取阴性对照溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,依法测定,结果表明阴性制剂对胡薄荷酮峰无影响,见图 1。

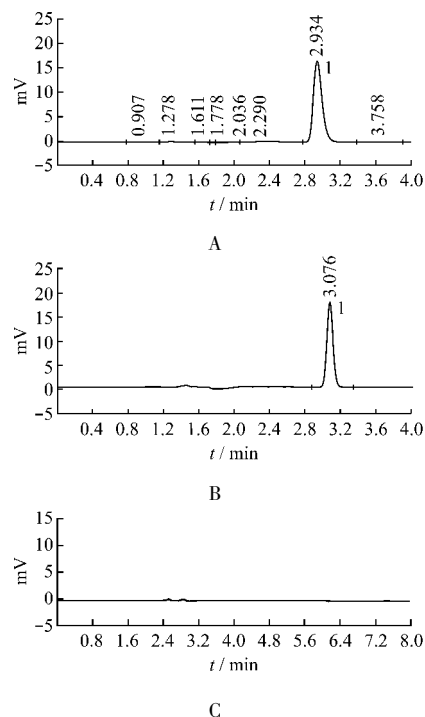


图1 荆感胶囊溶出度 HPLC 图

A. 胡薄荷酮对照品 B. 荆感胶囊 C. 阴性制剂 1. 胡薄荷酮

2.7 稳定性试验 以批号为 20071201 的荆感胶囊的溶出度实验中第 1 份供试品溶液为考察对象,分别于 0、1、2、4、6、8 h 进样,依法测定,计算胡薄荷酮峰面积值的 RSD 为 1.21%,结果表明供试品溶液中胡薄荷酮在 8 h 内稳定。

2.8 回收率试验 精密称取胡薄荷酮对照品 193.8 mg,置 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得胡薄荷酮质量浓度为 38.76 mg/mL 的回收率试验用对照品溶液。分别取阴性制剂 9 粒,每 3 粒为一组,取下胶囊帽,每组分别精密加入回收率试验用对照品溶液 0.2 mL、0.4 mL、0.5 mL,盖好胶囊帽,将胶囊至溶出仪中,依法测定 45 min 时胡薄荷酮的量,计算回收率。结果见表 1。

表1 回收率试验结果

加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
7.752	7.402	95.50		
7.752	7.538	97.25		
7.752	7.642	98.59		
15.50	15.01	96.85		
15.50	15.05	97.12	97.17	1.52
15.50	15.21	98.13		
19.38	19.32	99.69		
19.38	18.67	96.32		
19.38	18.42	95.05		

2.9 溶出曲线的绘制 取 3 批制剂,依法制备溶出曲线测定用供试品溶液,进样 10 μL 测定。计算各批制剂的溶出曲

线 结果见图 2 表 2。

溶出量(%) =

$$\frac{C_n \times [V_2 - (n-1) \times V_1] + (C_{n-1} + \dots + C_2 + C_1) \times V_1}{L} \times 100\%$$

C_n 为各时间点取出后的样品浓度; L 为制剂标示量; V_1 为各时间点固定取样体积; V_2 为溶出介质体积。

由溶出曲线可知 3 批制剂在 30 min 溶出量均可达 90% 以上,且在 90 min 内溶出量平稳,同时参考溶出度的常规取样时间确定方法,确定本制剂溶出度取样时间点为 45 min。

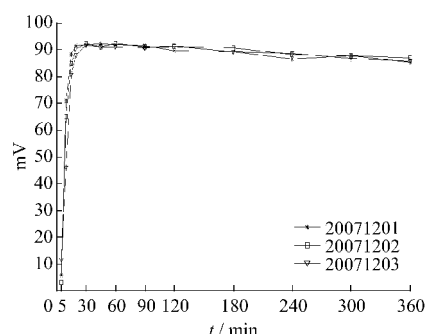


图 2 3 批荆感胶囊累积溶出曲线

表 2

3 批荆感胶囊样品不同时间的平均累积溶出率/%

批号	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	300 min	360 min
20071201	5.605	70.94	88.24	91.73	91.98	92.18	92.14	91.65	89.78	89.36	86.71	87.93	85.43
20071202	2.92	65.15	84.98	90.33	92.43	91.29	92.40	91.31	91.40	90.85	88.39	87.97	87.12
20071203	11.43	45.88	80.68	88.20	91.81	91.24	91.31	90.75	91.43	89.4	88.79	86.97	85.83

2.10 溶出度测定 取批号为 20071201、20071202、20071203 的荆感胶囊各 6 份,取 45 min 溶出溶液作为样品液。每份溶液进样 1 次,依法测定,记录色谱图。以胡薄荷酮峰面积平均值按标准曲线法计算含量。结果见表 3。

表 3 荆感胶囊 45 min 胡薄荷酮的溶出量测定结果 ($n=6$)

批号	平均溶出量/%	RSD/%
20071201	95.18	3.08
20071202	94.19	1.56
20071203	94.61	2.48

3 讨论

根据测定结果,荆感胶囊 3 批制剂在 45 min 的溶出量均达 90% 以上,符合溶出度的要求,因此暂定溶出量限度为 70%。

荆感胶囊 3 批制剂的溶出曲线均在 120 min 后呈缓慢下降趋势,分析其原因为胡薄荷酮具有一定的挥发性,在实验条件下的敞开体系中缓慢挥发所致。

本实验的测定方法首先考虑采用化学药溶出度检查中常用的紫外光谱法进行。但紫外光谱测定结果表明,空胶囊壳及辅料 β -环糊精在 252 nm 波长处有吸收,所占比例约为 8%,较大,因此无法采用紫外光谱法进行,故改用高效液相色谱法。并对高效液相色谱法的测定条件进行了优化,从而最终确定本方法为荆感胶囊溶出度检查方法。

供试品溶液自溶出仪中取出后,为了防止颗粒继续溶出和排除其后测定的干扰,需经过过滤或离心方能进行测定。但是过滤需确保滤膜吸附饱和后再取续滤液,可能需要较大的初滤液。因此考虑到取样方便和迅速的要求,本方法采用高速离心的方法制备供试品溶液。

溶出方法的选择方面,本实验比较了溶出方法中第一法转篮法与第二法浆法,实验结果表明转篮法的溶出程度优于浆法,同时考虑荆感胶囊为易漂浮制剂,在建立溶出度测定方法时宜选择篮法,因此确定本溶出度检查采用第一法转篮法。

溶出介质的选择中,考虑到荆感胶囊原料药荆芥穗挥发油为难溶成分,且制剂经 β -环糊精包结,因此溶出介质首先考虑比较水、人工胃液及表面活性剂的影响。因表面活性剂的种类对溶出度有较大影响,考虑到中检所有溶出度试验用级别的十二烷基硫酸钠(SDS),因此表面活性剂选择 SDS。实验结果表明,在人工胃液中胡薄荷酮峰面积最小,分析原因可能为制剂在人工胃液中破坏较多,在水中及 SDS 溶液中较大。因此溶出介质拟考虑采用 SDS 溶液^[3]。为确定合适的溶出介质,对荆芥穗挥发油在不同 pH 值溶出介质中的稳定性进行了研究,选择 pH 值分别为 1.2、4.0、4.5、6.8 和水。考虑到荆芥穗挥发油为水难溶性成分,因此在各 pH 值缓冲液中加入 0.3% SDS。实验结果表明,荆芥穗挥发油在 0.3% SDS 的水中及 pH6.8 缓冲液中较稳定,但 pH6.8 的 SDS 溶液虽然置 37 °C 水浴中溶液澄清,在室温下却有较多结晶,取样后即析出结晶,操作过程中需保持温度在 37 °C,难度较大,因此最后选定溶出介质为 SDS 水溶液。以 0.01% 质量分数为起点,配制 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%、0.35%、0.40%、0.45%、0.50%、0.55% 等一系列不同质量分数的 SDS 溶液,考察荆感胶囊的溶出情况。实验结果表明,当 SDS 溶液浓度大于等于 0.3% 时,荆感胶囊即具有较稳定的溶出量,且胡薄荷酮 0.3% SDS 水溶液中的溶解度是 1.1 mg/mL,按照荆感胶囊标准“每粒胶囊含荆芥穗挥发油以胡薄荷酮计不得低于 10 mg 计”,在 900 mL 溶剂中,其胡薄荷酮溶出质量浓度约为 0.011 mg/mL,因此胡薄荷酮在 0.3% SDS 水溶液中的溶解度约为溶出度实验中浓度的 100 倍,符合漏槽条件。同时增加 SDS 溶液浓度,制剂的溶出量增加较小,按照表面活性剂浓度宜低的原则,因此 SDS 溶液浓度确定为 0.3%。

转篮法和浆法的溶出体积通常应在 500 ~ 1 000 mL,目前多采用 900 mL,因此本实验选择溶出介质为 900 mL。

本实验采用直接测定成分含量的方法计算每批制剂百分之百溶出量值^[4]。

参考文献:

- [1] 张丽, 丁安伟, 施月芹. 荆芥穗挥发油中薄荷酮、胡薄荷酮的含量测定[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(1): 45-47.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版二部[S]. 北

京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 85-87.

- [3] 刘玉红, 易进海, 黄志芳, 等. 五仁醇分散片的制备工艺研究及体外溶出度试验[J]. 中成药, 2009, 31(6): 860-863.
[4] 程荷珍, 王桂红, 王萍. 六味地黄丸(浓缩丸)溶出度的测定[J]. 中成药, 2001, 23(5): 380-381.

超临界 CO₂ 萃取白花蛇舌草中三萜类成分的工艺研究

陆慧^{1,2}, 贾晓斌^{1,2*}, 施峰², 陈彦², 谭晓斌²

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局名方适宜剂型重点研究室, 江苏 南京 210028)

摘要: 目的 探讨超临界 CO₂ 流体萃取白花蛇舌草中三萜类成分的可行性。方法 以齐墩果酸量、总三萜量及固形物量为考察指标, 采用正交试验优化超临界 CO₂ 流体萃取白花蛇舌草三萜类成分的工艺条件。同时采用 MTT 法测定不同提取工艺的白花蛇舌草提取物对 A549 细胞增殖的影响。结果 超临界 CO₂ 流体萃取白花蛇舌草三萜类成分的最佳工艺条件为萃取压力 15 MPa, 萃取温度 40 ℃, 夹带剂(95%乙醇)用量为 2.0 mL/g, 萃取时间 1.5 h。超临界萃取物能有效抑制 A549 细胞的增殖。结论 超临界 CO₂ 流体可有效萃取白花蛇舌草中三萜类成分。

关键词: 白花蛇舌草; 超临界萃取; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2011)08-1429-04

白花蛇舌草为茜草科耳草属植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草, 近年来大量研究表明白花蛇舌草能辅助治疗多种恶性肿瘤如肝癌、胃癌、宫颈癌、肺癌等^[1], 是具有开发前景的一味中药。白花蛇舌草抗肿瘤的活性成分主要有黄酮类化合物、甾醇类化合物、三萜类化合物和多糖^[2-3]。熊果酸和齐墩果酸是其中已知的主要活性物质, 两者均能明显抑制 PGCL₃ 人肺癌细胞增殖, 五环三萜类化合物可通过降低癌细胞黏附能力、趋化运动能力和组织蛋白酶 B 的分泌而发挥抗侵袭的作用, 其抗侵袭机制不是对侵袭某一环节的阻断, 而是对侵袭各个基本环节都有抑制作用^[4-5]。谢艳等^[6]以熊果酸的含量考察了白花蛇舌草醇回流提取的工艺参数, 发现 60%~95% 的乙醇溶液中 90% 及以上的乙醇溶液提取的熊果酸量高, 需要提取 2 次, 每次 1.5 h, 乙醇量为药材的 10 倍量, 有机溶剂用量较多, 因此本实验采用 95% 乙醇提取三萜类化合物。超临界 CO₂ 流体萃取具有萃取时间短、萃取次数少、绿色无污染等优点, 具有很好的发展前景。本实验对超临界 CO₂ 萃取法提取白花蛇舌草三萜类成分进行了细致、科学的研究, 探索超临界 CO₂ 萃取白花蛇舌草的可行性。

1 材料

HA221-40(50)-25 型超临界萃取装置(江苏南通华安超

临界萃取有限公司); Waters 高效液相色谱仪, 717 自动进样系统, 2996 检测器, Empower 工作站; AB135-S 型分析天平(1/10 万, METTLER TOLEOR 公司); UV-28 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); LABCONCO Class II 生物安全柜(美国); HERA Cell 150 CO₂ 培养箱(美国热电集团); COIC XDS-4B 相差倒置显微镜(重庆光电仪器总公司); 酶标仪(美国热电集团); 香草醛(汕头市光华化学厂); 高氯酸(中国上海金鹿化工有限公司); 胰蛋白酶溶液(GIBCO 公司); 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 二甲基亚砜(分析纯, 南京化学试剂有限公司); 顺铂(DDP, 江苏恒瑞制药有限公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, SunShine 公司); RPMI-1640 培养基(GIBCO 公司); 96 孔培养板(Greiner Bio-One 公司); 熊果酸、齐墩果酸对照品(均购于中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110742-200516、110709-200304); 白花蛇舌草(购于安徽亳州滕王药业有限公司, 批号为 20060815, 经南京中医药大学药学院吴德康教授鉴定为正品); 甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯; 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

细胞株: 人肺癌细胞株 A549, 购于南京凯基生物科技发展有限公司, 并在本室长期传代培养。

2 方法

收稿日期: 2011-01-12

基金项目: 江苏省中医药领军人才基金(2006)

作者简介: 陆慧(1986—), 女, 在读硕士生, 研究方向: 中药新型给药系统。E-mail: huilu1986@126.com

* 通信作者: 贾晓斌(1966—), 男, 博士生导师, 研究方向: 中药物质基础及新剂型开发。E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com