技术方法 文章编号:0253-3626(2009)04-0447-05

紫外光谱法测定齐墩果酸缓释滴丸药物含量及体外释放度

李必波,赵 领,张雪梅,钟晓东,梁艳,余 瑜
(重庆医科大学药学院药物化学与生物材料研究室 重庆高校药物工程研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立紫外光谱法测定齐墩果酸缓释滴丸药物含量及体外释放度。方法:采用尤尼柯 UV-2102PCS 型紫外可见分光光度计,在 207 nm 波长处,测定齐墩果酸缓释滴丸的药物含量及体外释放度。结果:含量测定时,齐墩果酸在 20 ~ 80 μg/ml 范围内,线性关系良好 r =0.999 5(n=7),回收率在 98% ~ 102%之间,RSD<1%(n=3);释放度测定时,齐墩果酸在 10 ~ 70 μg/ml 范围内,线性关系良好 r =0.999 7(n=7),回收率在 98% ~ 102%之间,RSD≤1%(n=3)。结论:该测定方法简便、快速,结果准确可靠、重现性好,可作为该制剂的质量控制方法。

【关键词】齐墩果酸;缓释滴丸;含量测定;释放度
【中国图书分类法分类号】R944.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-08

UV determination of content of sustained-release dropping pills of oleanolic acid and its dissolution rate

LI Bi-bo, et al
(*Department of Pharmaco-chemistry and Biomaterial, Chongqing Engineering Research Center of Drug, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish UV method for the determination of content of sustained-release dropping pills of oleanolic acid and its dissolution rate. *Methods*: In 207 nm wavelength, the content of sustained-release dropping pills of oleanolic acid and its dissolution rate were determinated by unico UV-2102PCS. *Results* : During the determination of the content, the calibration curves was linear in the concentration range of 20 ~ 80 μg/ml, r= 0.9995(n=7), The recovery rate was 98.0% ~ 102%, RSD<1%(n=3); during determining the dissolution rate , linearity was good within the concentration range of 10 ~ 70 μg/ml, r= 0.9997(n=7). The recovery rate was 98.0% ~ 102%, RSD≤1%(n=3). *Conclusion*: The method is simple and rapid, and the results is accurate, reliable, and reproducible. It can be used to control the quality of sustained-release dropping pills of oleanolic acid with satisfactory results.

【Key word】Oleanohe acid ; Sustained-release dropping pills; Determination

齐墩果酸(Oleanolic acid, OA)是一种五环三萜类化合物,广泛分布于青叶胆、女贞子等药用植物中,是治疗急性黄疸型肝炎和慢性肝炎比较理想的药物[1],除此之外,国外研究表明其还具有治疗胃溃疡[2]、消炎[3]、抗癌[4]、抗 HIV 病毒[5]的作用。但由于其溶解度小(4.61 μg/ml),造成现有制剂的生物利用度低,服用片数及次数多。本文拟将其制成缓释滴丸,以增加药物溶解度和控制药物释放[6],期望减少服用剂量和次数,提高患者的顺应性,扩大其在临床上的应用。

通常,对制剂中药物含量测定及体外溶出度的首选方法是紫外光谱法或高效液相色谱法[7]。由于 2005 版中国药典尚未收录齐墩果酸及其制剂,因此,对齐墩果酸制剂中药物的含量测定及溶出度测定方法没有统一的标准,目前可用的方法有紫外分光光度法[8]、旋光法[9]、高效液相色谱法[10]、高效液相色谱-质谱联用法[11]。比较这几种方法,紫外分光光度法操作相对简便、快捷,本文拟建立紫外分光光度法对齐墩果酸缓释滴丸中药物的含量及释放度进行测定,并检验该方法的可靠性。

1 材 料

1.1 试剂

齐墩果酸原料(批号 20011220,陕西慧科植物开发有限公司,纯度≥98.0%);齐墩果酸标准品(批号:110709-200505,中

作者介绍:李必波(1985-),男,硕士,
研究方向:生物制药与生物医用材料。
通信作者:余 瑜,男,教授,E-mail:yuyu3519@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772595)。

国药品生物制品检定所）；PEG6000（批号：20061006，国药试剂有限公司分析纯）；泊洛沙姆 188（F68）（德国 BASF 公司馈赠药用级）；硬脂酸（批号：20080314，重庆川东化工（集团）有限公司 分析纯）；十二烷基硫酸钠（SLS，批号：20080124 成都科龙试剂有限公司分析纯）；二甲基硅油（批号：20061124，常州宏业有机硅有限责任公司，化学纯）；甲醇（批号：20080428，江苏汉邦科技有限公司色谱纯）；双蒸水（自制）。

1.2 仪器

滴丸试验机（自建）；电子分析天平（瑞士梅特勒公司）；ZRS-4 智能溶出仪（天津大学无线电厂）；UV-2102PCS 型紫外可见分光光度计（上海尤尼柯仪器有限公司）。

2 方法与结果

2.1 齐墩果酸缓释滴丸的制备

本文以聚乙二醇、泊洛沙姆作速释材料，硬脂酸作缓释材料，通过熔融法制备齐墩果酸缓释滴丸，即按照（3:1:1、2:1.5:1.5、1:1:1W/W）的三种不同处方比例分别称取 PEG6000、F68、硬脂酸等辅料研匀，加热融化，将齐墩果酸粉末（占总量的 5%）分别加至已融化的基质中，充分搅拌均匀，倒入滴丸装置漏斗中，迅速滴入冷却的二甲基硅油中，成型后取出，用滤纸吸去表面的二甲基硅油，室温下自然干燥后即得三批不同辅料比例的滴丸，并按上述辅料比例同法制备三批空白滴丸。

2.2 UV 法测定齐墩果酸缓释滴丸中主药含量的建立

2.2.1 溶液的配制

①齐墩果酸标准品溶液的制备

精密称取在五氧化二磷中干燥 12 h 后的齐墩果酸标准品适量，加甲醇溶解后并稀释成 1 ml 中含 1.0 mg 的溶液作为储备液备用；取储备液适量，加甲醇稀释成 1 ml 含齐墩果酸 0.1 mg 的溶液作为标准品溶液。

②空白滴丸溶液的制备

按处方量（3:1:1）称取除齐墩果酸外的其余基质（聚乙二醇、泊洛沙姆、硬脂酸）共 5 g，制备空白滴丸；精密称取空白滴丸细粉 23.8 mg 加甲醇溶解后定容到 25 ml，作为阴性样品溶液。

③载药滴丸溶液的制备

按处方量精密称取齐墩果酸（占 5%）及称取除齐墩果酸外的其余基质（聚乙二醇：泊洛沙姆：硬脂酸 =3:1:1）共 5 g，制备载药滴丸；精密称取载药滴丸细粉 25.0 mg（理论上相当于齐墩果酸 1.25 mg）加甲醇溶解后定容到 25 ml，作为样品溶液 A。

④空白滴丸 + 齐墩果酸标准品溶液的制备

精密称取空白滴丸细粉 23.8 mg 加适量甲醇溶解后，加入齐墩果酸标准品溶液 12.5 ml（相当于齐墩果酸 1.25 mg），再用甲醇定容到 25 ml，作为样品溶液 B。

2.2.2 测定波长的选择 取标准品溶液、阴性样品溶液及样品溶液 A、B，于 200 ~ 400 nm 范围内扫描，结果见图 1~5。由图可知，齐墩果酸在 207 nm 处有最大吸收，且辅料对药物测定无干扰。

2.2.3 标准曲线的制备 精密量取齐墩果酸对照品储备液（1.0 mg/ml）0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 ml 分别置 10 ml 容量瓶中，分别加甲醇稀释至刻度，摇匀，制成 20.0 μg/ml、30.0 μg/ml、40.0 μg/ml、50.0 μg/ml、60.0 μg/mL、70.0 μg/ml、80.0 μg/ml 的标准溶液。以甲醇为空白，于 207 nm 波长处测定吸光度 A。以浓度 C（μg/ml）对 A207 nm 进行线性回归，求得到标准曲线为：$A = 0.0083C + 0.0819$，$r = 0.9995$（$n = 7$），线性范围为：20.0 ~ 80.0 μg/ml。

2.2.4 回收率 分别取对照品储备液（1.0 mg/ml）0.4、0.5、0.6 mL 于小烧杯中，加入不同辅料配比量的空白滴丸溶液（19.0 mg/ml）0.5 ml，再用甲醇定容于 10 ml 容量量瓶中，同时并行操作 3 份；取同种辅料配比的空白滴丸溶液 0.5 ml，用甲醇定容于 10 ml 容量量瓶中，作为阴性对照品，于 207 nm 波长处测定吸光度 A。

2.2.5 精密度 选择低、中、高（40.0、50.0、60.0 μg/ml）3 种浓度，以甲醇为空白于 207 nm 波长处测定吸光度 A，测定日内精密度（1 d 内测 5 次）；连续 5 d 测定日间精密度，所得结果见表 2。

2.2.6 齐墩果酸缓释滴丸中药物含量的测定

①供试品溶液的制备

取齐墩果酸滴丸 10 粒捣碎，精密称取 0.050 0 g 于 50 ml 容量瓶中，加入适量甲醇振摇，使药物与辅料溶解，用甲醇定容后摇匀，溶液作供试品溶液。

取空白滴丸 10 粒捣碎，精密称取 0.047 5 g 于 50 ml 容量瓶中，加入适量甲醇振摇，使辅料溶解，用甲醇定容后摇匀，溶液作阴性样品溶液。

②样品含量测定

以阴性样品溶液为空白，于 207 nm 波长处测定供试品溶

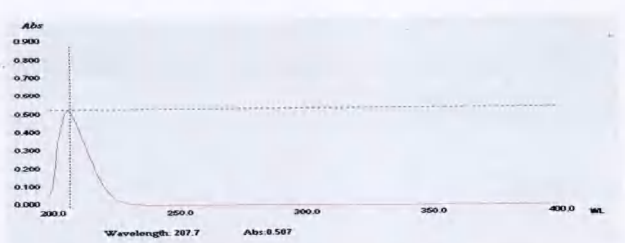


图 1 齐墩果酸标准品溶液（50 μg/ml）紫外扫描图

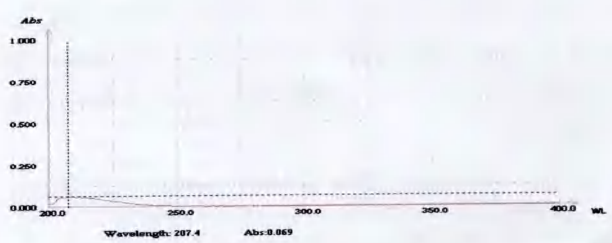


图 2 以甲醇为溶剂-空白滴丸溶液（聚乙二醇 286 μg/ml、泊洛沙姆 95 μg/ml、硬脂酸 95 μg/ml）紫外扫描图

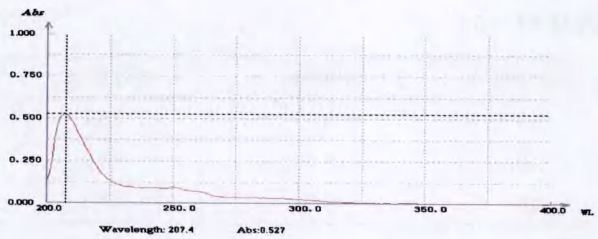


图 3 以甲醇为溶剂-载药滴丸溶液(理论上)齐墩果酸 50 μg/ml)紫外扫描图

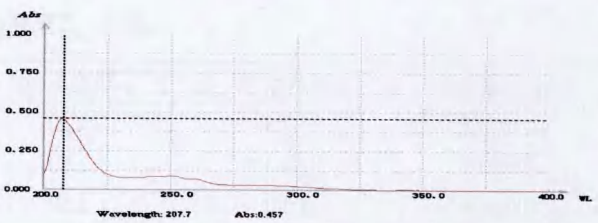


图 4 以空白滴丸为阴性对照——载药滴丸溶液(理论上)齐墩果酸 50 μg/ml)紫外扫描图

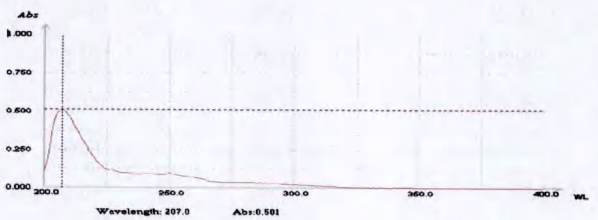


图 5 以空白滴丸为阴性对照-空白滴丸+齐墩果酸标准品溶液(齐墩果酸 50 μg/ml)紫外扫描图

液吸光度 A,并以标准曲线法求得供试品溶液的药物浓度,结果见表 3。齐墩果酸缓释滴丸药物含量 = 丸重 × 5% 载药率。

2.3 UV 法测定齐墩果酸缓释滴丸中药物溶出度的建立

2.3.1 释放介质的选择 释放度试验表明齐墩果酸在蒸馏水、0.9%盐酸溶液中释放几乎为零,在 0.5%及 0.75%十二烷基硫酸钠水溶液中释放不完全,因此,实验中采用 1%十二烷基硫酸钠水溶液作为释放介质。

2.3.2 标准曲线的制备 精密量取齐墩果酸标准品储备液(1.0 mg/mL) 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 ml 分别置 10 ml 容量瓶中,分别加入甲醇 0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3 ml,再加入 1 %十二烷基硫酸钠至刻度,摇匀,制成 10.0 μg/ml、20.0 μg/ml、30.0 μg /ml、40.0 μg/ml、50.0 μg/ml、70.0 μg/ml 的标准溶液。精密量取 1 ml 甲醇于 10 ml 容量瓶中,加入 1 %十二烷基硫酸钠至刻度,摇匀,以此溶液为空白于 207 nm 波长处测定吸光度 A。以浓度 C(μg/ml)对 A207 nm 进行线性回归,得到标准曲线为:A = 0.009 5 C + 0.003 7,r=0.999 7 (n=7),线性范围为:10.0 ~ 70.0 μg/ml。

2.3.3 回收率 分别取对照品储备液(1.0 mg/ml)0.1、0.2、0.4 mL 于小烧杯中, 加入不同辅料配比量的空白滴丸溶液(19.0 mg/mL)0.5ml,分别加入甲醇 0.4、0.3、0.1 ml,后,再用 1%十二烷基硫酸钠溶液定容于 10 ml 容量瓶中,同时并行操作 3 份,以同种辅料配比空白滴丸溶液 0.5 ml,加入甲醇 0.5 ml,再用 1 %十二烷基硫酸钠溶液定容于 10 ml 容量瓶中,作为阴性对照品,于 207 nm 波长处测定吸光度 A,结果见表 4。

2.3.4 精密度 选择低、中、高(10.0、20.0、40.0 μg/ml)3 种浓度,于 207 nm 波长处测定吸光度 A,测定日内精密度(1 d 天内测 5 次);连续 5 d 测定日间精密度,所得结果见表 5。

2.3.5 体外释放度试验 取滴丸 12 粒,于 6 个小杯内,每小

表 1 含量测定回收率试验(n=3)

辅料比(PEG6000:F68:硬脂酸)	加入药物浓度(μg/ml)	实测平均浓度(μg/ml)	RSD(%)	回收率(%)
3:1:1	40.0	39.37	0.60	98.4
	50.0	49.37	0.64	98.7
	60.0	58.97	0.86	98.3
2:1.5:1.5	40.0	39.65	0.53	99.1
	50.0	50.09	0.67	100.2
	60.0	61.38	0.42	102.3
1:1:1	40.0	39.29	0.89	98.2
	50.0	49.09	0.61	98.2
	60.0	59.01	0.47	98.3

表 2 含量测定精密度试验(n=5)

	理论浓度(μg/ml)	日内精密度 RSD(%)	日间精密度 RSD(%)
齐墩果酸	40.0	0.72	0.96
	50.0	0.51	1.17
	60.0	0.50	0.87

表 3 三批样品含量测定结果(n=3)

样品批号	辅料比例	理论含量	实测含量	RSD(%)	载药率(%)
080917	3:1:1	2.50	2.13	0.2	85.1
080918	2:1.5:1.5	2.50	2.10	0.3	83.9
080919	1:1:1	2.50	2.18	0.2	87.5

表 4 溶出度测定回收率试验(n=3)

辅料比(PEG6000:F68:硬脂酸)	加入药物浓度(μg/ml)	实测平均浓度(μg/ml)	RSD(%)	回收率(%)
3:1:1	10.0	9.93	0.36	99.3
	20.0	20.24	0.85	101.2
	40.0	39.89	0.35	99.7
2:1.5:1.5	10.0	10.24	1.01	102.4
	20.0	20.35	0.35	101.7
	40.0	40.14	0.46	100.3
1:1:1	10.0	10.17	0.78	101.7
	20.0	20.07	0.61	100.3
	40.0	40.45	0.30	101.1

表 5 溶出度测定精密度试验(n=5)

	理论浓度(μg/ml)	日内精密度 RSD(%)	日间精密度 RSD(%)
齐墩果酸	10.0	0.29	0.62
	20.0	0.30	0.57
	40.0	0.34	0.76

杯放 2 粒,每个小杯内装有 100 ml 1%十二烷基硫酸钠溶液,采用第三法即小杯法,转速为 100 r/min,温度(37±0.5)℃ 进行试验。在 1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h 后,取样 5 ml,装入具塞试管待测,随即补充同温度空白介质 5 ml;以相同辅料配比的空白滴丸照上述方法作溶出度试验,所取溶液作阴性样品溶液。在 207 nm 波长处,以阴性样品溶液为空白消除干扰,测得样品溶液的吸光度后,代入释放度标准曲线方程,计算药物的累积释放百分率,结果见图 6。

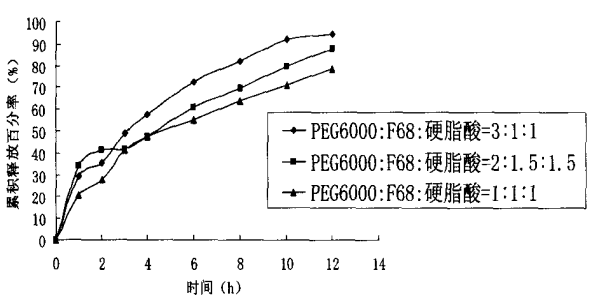


图 6 三批样品溶出度测定结果

3 讨 论

缓释滴丸是基于缓控释固体分散体技术[12,13]并制成滴丸的形式,具有增加药物溶解度和控制药物释放的特点。对制剂的质量控制,选择合适的检测方法是关键,既要准确、可靠,又要方便、快捷。紫外光谱法广泛用于制剂及原料药[14]的质量检测,在 200~400 nm 范围内有吸收的化合物,只要能消除溶剂及辅料的干扰,均可作为首选。

参照文献[10,15,16]报道,齐墩果酸溶液的最大吸收波长在 203~220 nm 之间,差异较大,故本实验拟确定齐墩果酸溶液的最大吸收波长。由图 1、3、4、5 可知齐墩果酸的最大吸收波长为 207 nm,且不受辅料的干扰。由空白滴丸紫外扫描图(图 2)可知,辅料在 205 nm 左右有最大吸收,与齐墩果酸最大吸收波长(207 nm)极为接近;但通过对比图 2、3、4,可见辅料与齐墩果酸的最大吸收峰有叠加,且通过以阴性样

品为空白，测定齐墩果酸滴丸中药物含量时，可完全消除辅料对滴丸中药物含量测定的干扰。由图 5 可知，在空白滴丸中加入定量的齐墩果酸，回收率在 98%~102%之间。因此，本文拟建立紫外光谱法测定齐墩果酸缓释滴丸中的药物含量，而不首选将药物与辅料分离后再测定的高效液相色谱法，因为前者较后者简便、快捷；邓世星[8]等用紫外光谱法测定齐墩果酸片剂中药物含量时，需将药物提取出以后再进行测定，其分析操作繁琐，而本研究建立的分析方法能更快速、准确地测定滴丸中齐墩果酸的含量。

在预实验的基础上，本文初步拟在PEG6000:F68:硬脂酸为 3:1:1、2:1.5:1.5、1:1:1 的三种不同比例中筛选出最佳处方，为了考察处方筛选时，不同辅料配比可能对药物测定的影响，我们分别测定了 3 种辅料配比的回收率，结果发现，不同辅料配比的药物回收率均在 98%~102%之间，说明辅料配比对药物测定影响不大。任凌燕[17]等曾选用齐墩果酸为对照品，以分光光度法来测定茅莓总皂苷的含量，证实其化学性质稳定、紫外吸收重现性好。然而，由于齐墩果酸的紫外最大吸收波长短（207 nm）、吸收弱（50.0 μg/ml，A=0.507），而甲醇的紫外截止波长为 205 nm，因此，我们使用的甲醇为色谱纯，以消除溶剂的干扰。

按照中国药典 2005 年版附录滴丸释放度测定的规定，即取滴丸 6 粒，分别于 6 个小杯内，每个小杯内装有最低 100 ml 溶出介质，采用第三法即小杯法进行试验。但因为本研究制备的每粒滴丸含 OA 2.5 mg 左右，释放介质最少需 100 ml，即释放度测定时，介质中 OA 的最大浓度在 25.0 μg/ml 以下，而本研究方法的最低检测限为 10.0 μg/ml，为了监测滴丸的整个释放行为，对滴丸释放度的测定时需在每小杯中放 2 粒滴丸，这样介质中 OA 的最大浓度为 50.0 μg/ml 左右，有利于测定。考虑到在溶出度测定时，溶出介质非常重要，据文献报道[18]，齐墩果酸在 0.5 %十二烷基硫酸钠溶液中的溶解度为 132.8 μg/ml，符合漏槽条件，因此，我们首先选择 0.5 %十二烷基硫酸钠溶液为溶出介质，发现标准曲线线性良好，但回收率偏低，为了解决这一问题，我们将十二烷基硫酸钠浓度提高到 1%[19]，所得标准曲线线性良好，回收率试验中，药物与辅料完全溶解，溶液澄清；即使药物浓度升到 70 μg/ml，加入的空白辅料配比为 1:1:1 时，回收率也在 98%~102%之间。

由本实验可知，紫外光谱法用于齐墩果酸缓释滴丸的含量及体外溶出度测定，具有简便、快速，结果准确可靠、重现性好的特点，因此，该方法可作为制剂的质量控制方法。

参 考 文 献

[1] 王德仁.齐墩果酸研究新进展[J].天津药学，2003，15(3)：56-58.

[2] Jaime A，Rodríguez L A，Guillermo S H. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rat[J]. Pharmaco. Res，2003，48(3)：291-294.

[3] Singh G B. Sing S，Bani S，et al.Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice[J]. J. Pharm. Pharmacol，1992，44(5)：456-458.

[4] Hsu H Y，Yang J J，Lin C C. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice[J]. Cancer Lett，1997，111(1-2)：7-13.

[5] Kashiwada Y，Wang H K，Nagao T，et al. Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid，Pomolic Acid，and Structurally Related Triterpenoids[J]. J. Nat. Prod.，1998，61(9)：1090-1095.

[6] 唐春发.水飞蓟素缓释滴丸的研制及其体外释放特性[J].中国药师，2005，8(4)：273-277.

[7] 刘文英.药物分析[M].第 5 版.北京：人民卫生出版社，2003.382.

[8] 邓世星，孙志勇，周 卿，等.紫外光谱法测定齐墩果酸含量[J].遵义医学院学报，2003，26(6)：556-557.

[9] 肖巧清，李玉兰.旋光法测定齐墩果酸片的含量[J]. 天津药学，2002，14(3)：80-81.

[10] 徐成坤，唐 芳，冯 裕.HPLC 测定齐墩果酸滴丸中齐墩果酸的含量[J].中南药学，2005，3(2)：80-81.

[11] 莫斌斌，王 峰，向大雄，等.高效液相色谱-质谱法测定齐墩果酸固体分散物的溶出度研究[J]. 中国新药与临床杂志，2005，24(4)：290-293.

[12] 胡道德，裴元英，毛丹卓.固体分散技术在缓控释制剂中的应用[J]. 中国医药工业杂志，2002，33(5)：252-255.

[13] Chen D，Tsay R，lin H，et al.Stabilization and sustained-release effect of misoprostol with methacrylate copolymer[J]. Int. J. Pharm，2000，203(2)：141-148.

[14] 李春莉，王莎莉，王亚平，等.紫外分光光度法测定青蒿素的含量[J]. 重庆医科大学学报，2007，32(4)：413-415.

[15] 邹盛勤.高效液相色谱-光电二极管阵列检测器法测定齐墩果酸原料及片剂中齐墩果酸的含量[J]. 时珍国医国药，2006，17(3)：357-358.

[16] 王忠壮，陈 琰，宋洪杰，等.太白惚木中齐墩果酸的含量测定[J].第二军医大学学报，2000，21(5)：473-475.

[17] 任凌燕，李惠芝，王继生，等.茅莓总皂苷的含量测定[J].重庆医科大学学报，2005，30(2)：854-856.

[18] 阮氏越秋，赵浩如.齐墩果酸固体分散体的制备及体外溶出度测定[J].中国药科大学学报，2003，34(3)：236-239.

[19] 中华人民共和国药典委员会.中国药典(二部)[S].2005.1-7.

（责任编辑：冉明会）