

HPLC 法测定草乌甲素贴释放度*

张伟¹, 张玲², 杨兆祥¹

(1. 昆明制药集团股份有限公司药物研究院, 云南昆明 650100; 2. 云南盟生药业有限公司, 云南昆明 650217)

【摘要】目的: 建立草乌甲素贴的释放度测定方法, 为评价和控制药品质量提供方法。方法: 采用小杯碟法以纯化水为溶出介质, 温度控制在 $(32 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转桨转速为 $50\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 用高效液相色谱法测定草乌甲素, 色谱柱为 luna C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 三乙胺水溶液 (用磷酸调节 pH 值至 3.1 ± 0.1) - 乙腈 (60:40); 流速: $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 260nm; 柱温 25°C 。结果: 本法线性范围为 $4.95 \sim 59.4\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r=0.9999$; 平均回收率为 98.3%, RSD% 为 0.50% ($n=9$), 对不同批次草乌甲素贴释放度进行测定, 释放度参数差异无显著性意义 ($P<0.05$)。结论: 本方法具有灵敏、准确、快速的优点, 适用于草乌甲素贴的质量控制。

【关键词】草乌甲素贴; 释放度; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2010)03-0021-04

草乌甲素 (Bulyaconitine A) 是从长喙乌头 (*Aconitum georgei* Comber) 或滇西乌头 (*Aconitum bulleyanum* Diels.) 等中提取分离到的一种强效镇痛、消炎药。草乌甲素的相对镇痛强度分别为吗啡的 15.3 ~ 65.5 倍和阿司匹林的 1208 ~ 7195 倍, 镇痛起效时间比吗啡慢, 但作用持续时间比吗啡长, 连续用药不产生成瘾性^[1]。临床上主要用于骨关节炎、风湿及类风湿性关节炎中红、肿、热、痛的对症治疗, 腰及四肢的扭伤、挫伤, 落枕, 肩周炎, 癌症疼痛, 手术后镇痛等。开发的草乌甲素贴为局部给药全身发挥作用的药物, 可避免口服给药肝脏的首过效应以及肌肉注射的疼痛反应, 大大增加了患者用药顺应性和治疗的靶向性。为了考察该产品的质量, 以草乌甲素为释放度指标, 建立了测定草乌甲素贴的高效液相色谱方法, 为该药品质量标准的制定和制剂处方的筛选及工艺的优化提供了可靠的依据。

1 仪器与试剂

美国 Agilent1100 高效液相色谱仪, 包括 G1331A 四元梯度泵, G1322A 真空脱气机, G1329A 自动进样器, G1314 紫外检测器, G1329A 柱温箱, Agilent1100 化学工作站; ZRS-8 型智能

药物溶出仪 (天津大学无线电厂), 包括释放度试验用网碟 (昆明制药集团股份有限公司自制); 草乌甲素对照品 (昆明制药集团股份有限公司精制并标化, 批号: 20011001, HPLC 含量大于 99.5%); 草乌甲素贴 (10cm², 含草乌甲素 4mg, 昆明制药集团股份有限公司, 批号: 031229、031230、031231)。乙腈为色谱级, 其他试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱: luna C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5 μm); 流动相: 0.2% 三乙胺水溶液 (用磷酸调节 pH 值至 3.1 ± 0.1) - 乙腈 (60:40); 流速: $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 260nm; 柱温 25°C , 进样量 20 μL , 理论板数按草乌甲素峰计算应不低于 3 000。

3 方法与结果

3.1 溶液的制备

3.1.1 对照品溶液

精密称取经五氧化二磷减压干燥 5h 的草乌甲素对照品 15mg, 用少量 0.01mol/L 盐酸溶液溶解后, 再用水稀释制成每 1mL 中含 15 μg 的溶液。

3.1.2 供试品溶液

取本品 1 片, 固定于两层碟片中央, 后置于溶

* 收稿日期: 2009-09-17 修回日期: 2009-12-13

作者简介: 张伟 (1973~), 男, 云南昆明人, 高级工程师, 从事药物分析和新药研发工作。

出杯中,按照“3.3.1”项下释放度测定方法取液后,过滤,取续滤液作为样品溶液。

3.1.3 空白辅料溶液

取不含草乌甲素的空白辅料贴,按照“3.3.1”项下释放度测定方法取液后,过滤,取续滤液作为空白辅料溶液。

3.2 释放度测定的方法学试验

3.2.1 线性关系考察

取草乌甲素对照品适量,加流动相溶解并稀释制成每 1mL 含 0.2mg 的溶液,作为贮备液;分别精密量取贮备液 2.5、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0mL 于 100mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,得稀释液。分别精密量取上述溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积积分值 y 为纵坐标,进样浓度 x (μ g $\cdot$ mL $^{-1}$) 为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程为

$$y = 33.669x - 5.86, r = 0.99995 (n = 7)$$

结果表明,草乌甲素的进样量在 4.95 ~ 59.4 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 范围内有良好的线性关系。

3.2.2 专属性试验

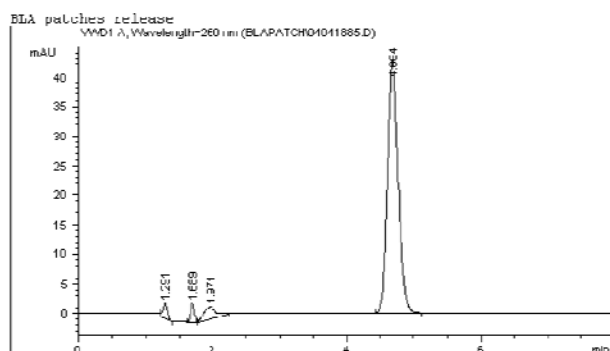
取草乌甲素对照品、草乌甲素贴释放 24h 的溶液、空白辅料释放 24h 的溶液,按照上述色谱条件进样 20 μ L,记录 HPLC 色谱图,见图 1。结果表明,辅料对草乌甲素的测定无干扰。

3.2.3 加样回收率试验

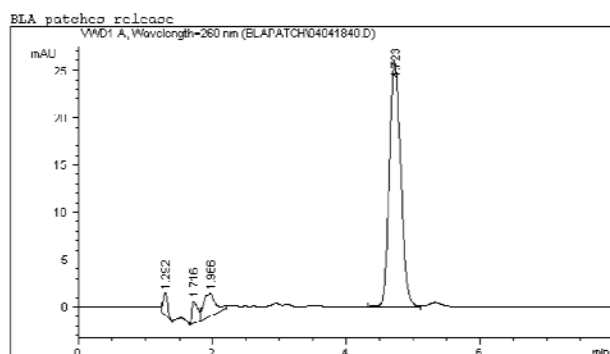
取经五氧化二磷减压干燥 5h 的草乌甲素对照品适量,精密称定,加 0.1mol/L 的盐酸 10mL 溶解后用水稀释制成 1mg/mL 的溶液,作为对照品贮备液;另取不含草乌甲素的控释贴(即空白贴)9 片,照释放度测定法(中国药典二部附录 XD 第三法,小杯法),用空白贴固定于网碟上,分别于第 1~3 贴,4~6 贴,7~9 贴中加入 2.0、3.2、4.0mL 对照品贮备液,照释放度检查法项下操作,于第 3h 时间点取样。利用 HPLC 外标法在 260nm 波长处测定,计算草乌甲素的回收率,结果低、中、高 3 种浓度的回收率分别为 98.50%、98.22%、98.25%,RSD 分别为 0.51%、0.49%、0.68% ($n=3$),结果表明方法的回收率良好。

3.2.4 重复性试验

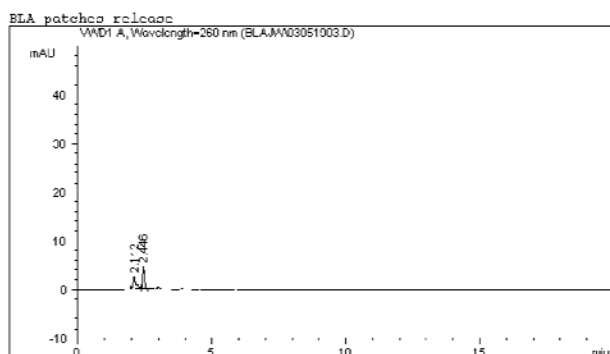
取批号为 031231 的草乌甲素贴 6 片,按“供试品溶液的制备方法”项下的方法测定释放度,求得 RSD 为 ($n=6$),结果表明方法的重复性良好。



A. 对照品



B. 释放 24h 的样品



C. 空白辅料

图 1 HPLC 色谱图

3.2.5 精密度试验

精密吸取溶出时间为 12h 时的样品溶液 20 μ L,反复进样 6 次,结果峰面积的 RSD 为 0.72%。

3.2.6 稳定性试验

取溶出时间为 12h 时的样品溶液适量,分别于 0、1、2、4、8、12、24h 内进样 20 μ L,记录色谱图。峰面积的 RSD% 为 0.82%,表明在 24h 内测定溶液稳定。

3.3 释放度曲线的绘制

3.3.1 释放度曲线的绘制

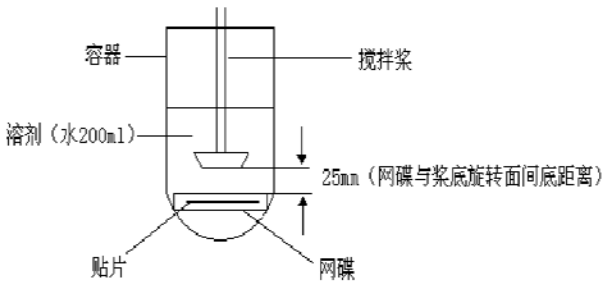
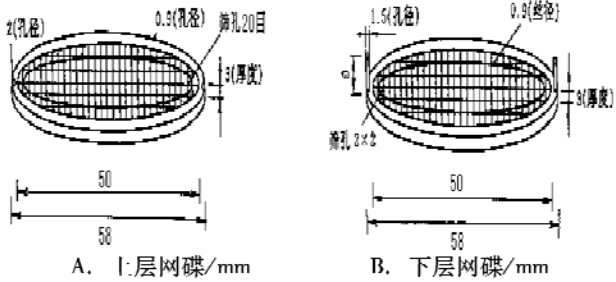
采用小杯法桨碟法^[2]测定(图 2)。将 200mL 经脱气处理的蒸馏水加入溶出杯中,加温使溶剂温

度保持在 $(32 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 将草乌甲素贴固定于两层碟片的中央, 释放面向上, 再将网碟置于烧杯下部, 转速调至 $50\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 随机取样品 6 片, 分别固定在 6 个碟片中央, 并将贴片与浆底旋转面平行, 两者相距 $(25 \pm 2)\text{mm}$, 开始搅拌并于 1, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48h 取样 5mL, 取样位置在介质液面与桨叶上端之间正中 (离杯壁不得少于 1cm), 精密吸取 5mL 溶液, 用微孔滤膜滤过, 取滤液作为样品溶液。照“3.1.1”项下方法配制对照品溶液, 分别取样样品溶液与对照品溶液照“3.2.1”测定, 以峰面积计算累积释放度百分率。取已知含量的草乌甲素贴 3 批, 按照上述方法测定, 计算平均释放度, 见表 1。

表 1 草乌甲素贴的释放曲线
($\bar{x} \pm s$) / %, $n=6$

批号	031229	031230	031231
1h	15.4 ± 0.6	16.0 ± 1.6	18.2 ± 1.0
3h	26.1 ± 1.1	26.9 ± 2.2	29.9 ± 1.2
6h	37.2 ± 1.1	37.8 ± 2.7	42.4 ± 1.3
9h	46.0 ± 2.4	46.3 ± 3.4	51.6 ± 1.0
12h	53.3 ± 1.5	53.0 ± 3.3	59.1 ± 1.3
24h	74.8 ± 1.5	75.9 ± 5.1	83.9 ± 1.5
30h	85.3 ± 2.8	83.0 ± 5.6	93.8 ± 1.8
36h	91.4 ± 2.4	91.0 ± 6.5	100.2 ± 1.7
48h	97.9 ± 4.5	99.5 ± 6.4	107.1 ± 3.0

以样品不同时间的平均累积释放度为纵坐标, 以时间为横坐标, 绘制释放度曲线。样后, 随即补充相同温度、相同容积的释放介质。按照上述规定的色谱条件测定, 分别计算出每贴在不同时间的释放量。释放度曲线见图 3。



C. 浆碟装置示意图
图 2 释放度测定装置图

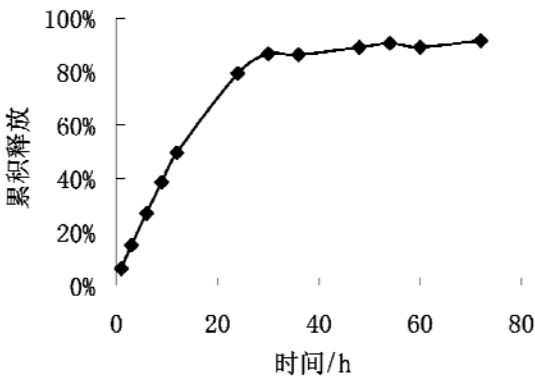


图 3 031231 批草乌甲素贴平均释放度曲线

表 2 中的释放度数据分别以一级速率方程、Higuchi 方程和 Weibull 方程进行拟合, 拟合参数见表 2。

表 2 草乌甲素贴释放曲线的拟合参数

批号	031229	031230	031231
一级速率方程	r	0.9991	0.9991
	s	0.0148	0.0141
Higuchi 方程	r	0.9963	0.9977
	s	0.0258	0.0202
Weibull 方程	r	0.9994	0.9998
	s	0.0133	0.0076

注: 表中 r 为回归系数, s 为标准差。

从表 2 中可见, 本品的释放曲线与 Weibull 曲线最为接近, 一级速率曲线次之, Higuchi 方程的拟合度相对较差。虽然 Weibull 方程的拟合的相关系数最好, 但 Weibull 方程一般给出的是释放 50%

或 63.2% 所需的时间,而这两个参数并不足以描述释放曲线自始至终的释药特征,故本研究采用一级速率方程拟合贴剂的释药速率常数,拟合结果见表 3。

表 3 三批样品释药速率常数拟合结果

批号	031229		031230		031231	
贴号	K/h ⁻¹	r	K/h ⁻¹	r	K/h ⁻¹	r
1	0.0466	0.9978	0.0428	0.9991	0.0510	0.9992
2	0.0535	0.9993	0.0427	0.9990	0.0513	0.9990
3	0.0529	0.9980	0.0469	0.9991	0.0488	0.9993
4	0.0431	0.9987	0.0388	0.9983	0.0480	0.9992
5	0.0451	0.9989	0.0519	0.9995	0.0422	0.9995
6	0.0470	0.9991	0.0393	0.9982	0.0504	0.9992
平均	0.0480		0.0437		0.0486	

注:表中 K 为释药速率常数。

拟合结果表明,3 批拟合曲线的相关系数都很好,说明以一级速率方程拟合本品体外释药曲线是可行的。对上述 3 批贴剂的释药速率常数经方差统计,结果表明其释药速率常数间的差异无统计学意义($P>0.05$),表明本品制剂工艺有好的重现性,同时也说明本释放度检查方法是合理可行的。

4 讨论

4.1 释放度试验条件的选择

4.1.1 释放介质和温度的选择

纯化水的 pH 值与人体皮肤最为接近,草乌甲素具有水溶性;人体皮肤温度约为 32℃,所以选择测定温度(32±0.5)℃。

4.1.2 转速与溶出方法的选择

试验桨法所选用的溶出杯为小杯,若选用转速过快,药物释放速度过快,不能模拟控释贴在体表的释放,此外,草乌甲素贴每贴给药 3d,释放时间较长,所以本试验选用的转速为 50r/min。

4.1.3 溶出介质体积的选择

分别采用现在建立的方法(小杯法)和中国药典的方法(大杯法)^[3],对草乌甲素贴(批号 031231)的释放度进行检查。小杯法的介质用量为 200mL,大杯法为 700mL,其它操作均一致。两种方法测得的释放曲线基本重叠,各时间点的释放数据

均不存在统计学差异($P>0.05$)。见图 4。

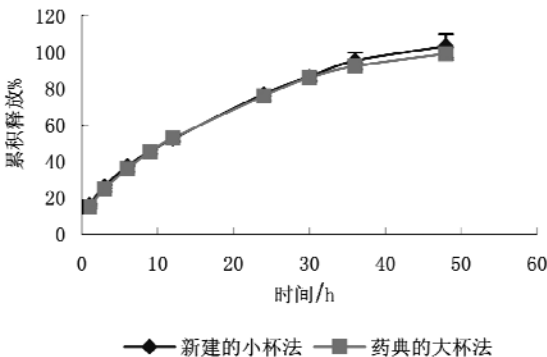


图 4 药典方法与本研究方法的比较

4.2 释放度控制时间点和释放度范围的确定

根据控释制剂的释放度需至少用 5 个时间点加以控制的要求^[2],因此现在选定 1h 考察贴剂的初始释药情况,12h 为释放 50% 所对应的时间点,30h 为释放大于 75% 对应的时间点。另根据释放曲线的形状,加入 3,9 和 24h,分别对应于释药 15%~35%,30%~55% 和 60%~90%。这 6 个时间点是释药曲线上具有代表意义的时间点,故通过控制这 6 个时间点的释放度,即可控制本品的体外释药特征。

在研究过程中曾按照确定的处方和工艺制备了 3 批贴剂样品(批号分别为 0031229、031230、031231),并进行了释放度检查。统计这 3 批样品的释放度数据发现,其在 1h 的释放度范围为 13.59%~20.35%;3h 为 23.06%~31.83%;9h 为 41.48%~53.27%;12h 为 47.95%~61.55%;24h 为 68.24%~86.35%;30h 为 74.89%~96.32%。故暂定本品每贴在 1h,3h,9h,12h,24h 和 30h 的释放量应分别相应为标示量的 8%~25%,15%~35%,30%~55%,35%~65%,60%~90% 和 75% 以上。

[参考文献]

[1]唐希灿.镇痛抗炎新药滇西啉拉碱甲[J].新药与临床,1986,5(2):120.
[2]国家药典委员会.中华人民共和国药典,Vol II(二部)[M].北京:化学工业出版社,2005:74-75.
[3]刘嫩霞.小杯法测定透皮贴剂释放度——为《中国药典》中透皮贴剂释放度方法的商榷[J].药学进展,2002,26(5):310-311.

(编辑:岳胜难)
(英文摘要见 29 页)

- 酸的分离鉴定 [J]. 科学通报, 1988, 7: 518-522.
- [14] 刘为忠, 沈云修, 李维莉, 等. 一株产生萘醌类化合物真菌的化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2003, 34 (2): 111-113.
- [15] 陈永宽, 李 聪, 台 红, 等. 痂囊腔菌素 A 的生物合成和光化学反应研究 [J]. 波谱学杂志, 2003, 20 (2): 167-172.
- [16] 沈云修, 荣先国, 高宗华. 竹黄的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27 (9): 674-676.
- [17] Tadashi Kish, Satoshi Tahara, Naoki Taniguchi, et al. New Perylenequinones from *Shiraia bambusicola* [J]. *Planta Med.* 1991, 57: 376-379.
- [18] 叶婕颖, 张庆芝, 饶高雄. 傣药芽鲁哈咪卖的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40 (6): 850-852.
- [19] Chen Wei-shin, Chen Yuan-teng, Wan Xiang-yi, et al. Die Struktur des Hypocrellins und seines Photooxydationsproduktes Peroxyhypocrellin [J]. *Liebigs Ann Chem.* 1981: 1880-1885.

(编辑: 左媛媛)

Studies on Chemical Constituents of *Hypocrella bambusae*, an Ethno-remedy in Yunnan

ZHENG Li-xiong^{1,2}, ZHANG Hui-ying^{2,3}, LI Jun², RAO Gao-xiong^{1,2}

(1. Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500; 2. Kunming Zhenhua Pharmaceutical Co. LTD, Kunming Yunnan 650034; 3. Qujing Medical College, Qujing Yunnan 655000)

[ABSTRACT] Twelve compounds were isolated from the *Hypocrella bambusae*, an ethno-remedy in Yunnan, and their structures were determined by spectroscopic analysis as Elsinochrome A (1), Hypocrellin A (2), Hypocrellin B (3), Hypocrellin C (4), 1, 8-Dihydroxy anthraquinone (5), d-Mannitol (6), Allantoin (7), Stearic acid (8), Ergosterol (9), Ergosterol peroxide (10), α -Monopalmitin (11), Palmitic acid (12), respectively. Among them, compounds 1, 3, 5, 10-11 were isolated from the ethno-remedy *Hypocrella bambusae* for the first time.

[KEY WORDS] *hypocrella bambusa*; ethno-remedy; yunnan; chemical constituents

(上接第24页)

HPLC Determination of Release of Bulleyaconitine A Controlled Release Patches

ZHANG Wei¹, ZHANG Ling², YANG Zhao-xiang¹

(1. Institute for Drug Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming Yunnan 650100, China; 2. Yunnan Mengsheng Pharmaceutical Ltd., Kunming Yunnan 650217, China)

[ABSTRACT] Objective: To establish an HPLC method for the release of bulleyaconitine A controlled release patches, and provide method for the evaluation and controlling of medicine quality. Method: 6 patches were placed separately into small solution vessels filled with release medium of pure water, the temperature was maintained at $32^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, paddles method was used at rotary speed of $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. The separation on the chromatography column of lunaC₁₈ (250mm $\times$ 4.6mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% triethylamine (adjusted to pH = 3.1 ± 0.1 with phosphoric acid) (40:60) as mobile phase at the flow-rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The detective wave-length was 260 nm. The column temperature was 25°C . Result: The calibration curve was linear in the range of $0.099 \mu\text{g} \sim 1.188 \mu\text{g}$, $r = 1.0000$. The release of patches produced in different batches had no significantly difference after detection. Conclusion: The method is sensitive, accurately and quickly for the quality control of bulleyaconitine A controlled release patches.

[KEY WORDS] bulleyaconitine A controlled release patches; release; HPLC