



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102028698 A

(43) 申请公布日 2011.04.27

(21) 申请号 201010563761.X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010.11.29

A61K 31/56(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(66) 本国优先权数据

200910310778.1 2009.12.02 CN

(71) 申请人 山东省中医药研究院

地址 250014 山东省济南市历下区燕子山西
路7号

(72) 发明人 孙立立 孙敬勇 杨书斌 施祖荣
仲英 戴衍朋 夏红旻

(74) 专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务
所有限公司 37108

代理人 宋永丽

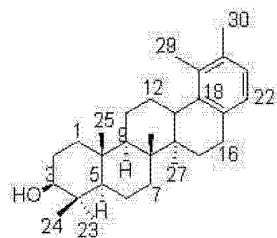
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种治疗结肠癌的药物及其制备方法

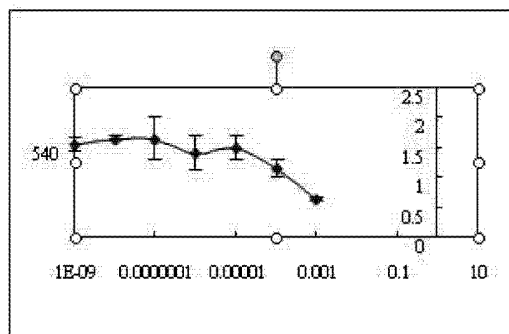
(57) 摘要

本发明公开了一种治疗结肠癌的药物及其制备方法,包括药物有效成份为:3β-羟基-28-去甲乌索-17,19,21-三烯和药用辅料制成的药剂,按重量百分比计药物有效成份为1%-90%、药用辅料为10%-99%,药物有效成份的结构式为:

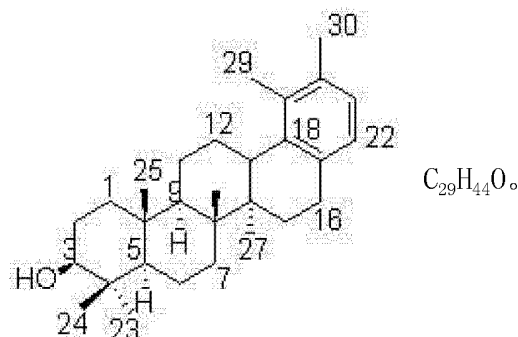


C₂₉H₄₄O。其制备方法包括

以下步骤:①取地榆炭粉碎后为药物原料加入甲醇或乙醇重复提取,过滤得到流浸膏;②将步骤①中流浸膏用水分散,氯仿萃取,将萃取液回收溶剂得浸膏;③将步骤②的浸膏抽滤所得固体重结晶得到化合物药物有效成份;④按重量比取药物有效成份,其余为药用辅助料制成药剂。本发明主要治疗结肠癌未转移症状,无毒副作用,配合手术后的化疗期使用从而减轻患者痛苦。



1. 一种治疗结肠癌的药物, 包括药物有效成份为: 3β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯和药用辅料制成的药剂, 按重量百分比计药物有效成份为 1%-90%、药用辅料为 10%-99%, 3β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯的结构式为:



2. 根据权利要求 1 所述的一种治疗结肠癌的药物, 其特征在于: 所述药剂剂型为片剂, 片剂的药物有效成份为 20%-70%、药用辅料为 30%-80%。

3. 根据权利要求 1 所述的一种治疗结肠癌的药物, 其特征在于: 所述药剂剂型为胶囊, 胶囊的药物有效成份为 20%-90%、药用辅料为 10%-80%。

4. 根据权利要求 1 所述的一种治疗结肠癌的药物, 其特征在于: 所述药剂剂型为水针剂或冻干粉剂, 药物有效成份为 1%-5%、药用辅料为 95%-99%。

5. 根据权利要求 1 所述的一种治疗结肠癌的药物, 其特征在于: 所述药剂剂型为散剂或颗粒剂, 药物有效成份 10%-20%、药用辅料为 80%-90%。

6. 本发明的一种治疗结肠癌的药物制备方法, 包括以下步骤:

①取地榆炭粉碎后为药物原料, 加入原料十倍量的甲醇或乙醇, 或含水醇类, 常温或加热至 60°C - 90°C , 提取 1—24 小时, 重复提取 1—3 次, 过滤, 滤液在常压或减压下浓缩得到流浸膏;

②将步骤①中流浸膏用 5-10 倍重量水分散, 以加水量 1/3 体积氯仿萃取, 可重复萃取 5-8 次, 将萃取液常压或减压回收溶剂, 得浸膏;

③将步骤②的浸膏进行硅胶柱层析分离, 采用石油醚-丙酮系统梯度洗脱, 通过薄层层析将 95:5 洗脱部分合并, 抽滤所得固体重结晶得到化合物 3β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯;

④按重量百分比取 3β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 1%-90%、药用辅料 10%-99%, 按照药剂的常规制备方法制成药剂。

一种治疗结肠癌的药物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及药品,是一种治疗结肠癌的药物及其制备方法。

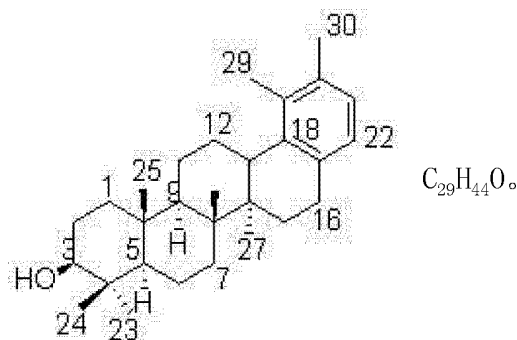
背景技术

[0002] 据报道的统计数据表明,结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,发病率逐年以 2% 左右递长率增加,同时治疗结肠癌的药物也在不断推向市场。西药常用药物主要有:氟尿嘧啶、丝裂霉素、亚硝酸脲及呋喃氟尿嘧啶等,中药常用药主要有消癌平片、珍香胶囊、西黄丸、抗癌平丸、华蟾素口服液、复方斑蝥胶囊等。临床表明,有些西药虽然疗效较好,但对胃肠粘膜有较强的刺激作用,并对肝肾有较大损伤,特别是长期服用对患者自身免疫力的损害也较大;中药的副作用虽然少了很多,但是,疗效欠佳;无论是治疗结肠癌未转移症、还是结肠癌多发转移症,其临床效果甚微,所以,手术治疗为患者的主要选择,但是,手术后的化疗期一般均联合使用治疗结肠癌的西药,因此,给患者带来较大痛苦。

发明内容

[0003] 本发明的目的是,提供一种治疗结肠癌的药物及其制备方法,主要治疗结肠癌未转移症状,无毒副作用,配合手术后的化疗期使用,从而减轻患者痛苦。

[0004] 本发明为实现上述目的,通过以下技术方案实现:一种治疗结肠癌的药物,包括药物有效成份为:3β-羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯和药用辅料制成的药剂,按重量百分比计药物有效成份为 1%-90%、药用辅料为 10%-99%,3β-羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯的结构式为:



[0005] 所述药剂剂型为片剂,片剂的药物有效成份为 20%-70%、药用辅料为 30%-80%。

[0006] 所述药剂剂型为胶囊,胶囊的药物有效成份为 20%-90%、药用辅料为 10%-80%。

[0007] 所述药剂剂型为水针剂或冻干粉剂,药物有效成份为 1%-5%、药用辅料为 95%-99%。

[0008] 所述药剂剂型为散剂或颗粒剂,药物有效成份 10%-20%、药用辅料为 80%-90%。

[0009] 本发明的一种治疗结肠癌的药物制备方法,包括以下步骤:

①取地榆炭粉碎后为药物原料,加入原料十倍量的甲醇或乙醇,或含水醇类,常温或加热至 60℃-90℃,提取 1—24 小时,重复提取 1—3 次,过滤,滤液在常压或减压下浓缩得到流浸膏;

②将步骤①中流浸膏用 5-10 倍重量水分散,以加水量 1/3 体积氯仿萃取,可重复萃取 5-8 次,将萃取液常压或减压回收溶剂,得浸膏;

③将步骤②的浸膏进行硅胶柱层析分离,采用石油醚-丙酮系统梯度洗脱,通过薄层层析将 95:5 洗脱部分合并,抽滤所得固体重结晶得到化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯;

④按重量百分比取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 1%-90%、药用辅料 10%-99%,按照药剂的常规制备方法制成药剂。

[0010] 本发明药物有效成份的结构式,以高分辨快原子轰击质谱给出准分子离子峰 m/z 为 407.3315 $[M-H]^-$ ($C_{29}H_{43}O$, 计算值:407.3308),确定其分子式为 $C_{29}H_{43}O$ 。无畸变极化转移增强谱(DEPT 谱)显示分子中含有 7 个 CH_3 , 8 个 CH_2 , 6 个 CH 和 8 个季 C。核磁共振-氢谱(1H -NMR 谱)显示 7 个甲基单峰信号 δ 0.94(H-25), 0.95(H-27), 1.03(H-26), 1.08(H-24), 1.26(H-23), 2.21(H-30), 2.23(H-29), 2 个烯氢双峰信号 δ 6.94(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-22)和 δ 7.01(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-21)以及 1 个连氧的氢信号 δ 3.49(1H, m, H-3)。核磁共振-碳谱(^{13}C -NMR)显示 6 个芳香碳特征信号 δ 126.3(C-22), 127.0(C-21), 134.8(C-20), 135.9(C-19), 136.0(C-17), 140.0(C-18)以及 1 个连氧碳信号 δ 78.1(C-3), 推测该化合物可能为 28 位羧酸缺失的且 F 环芳香化的乌苏烷型化合物。化合物的 HMBC 谱和 HSQC 谱显示 H-29 与 C-18、C-19, H-30 与 C-20、C-21, H-16 与 C-17、C-22 分别有远程相关。综合化合物的 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT 谱、异核多重键相关谱(HMBC 谱)、异核多量子相干谱(HMQC 谱)使化合物的 C、H 归属得以确认,故确定该化合物为 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯为新化合物,命名为地榆皂苷元 Z(Sanguisorbigenin Z)

本发明药物有效成份来源于地榆炭,地榆炭有较好的凝血止血作用、敛疮作用。申请人对地榆炭做了大量研究,在地榆炭中分离得到了 22 个单体化合物,其中有 5 个新化合物。其中的地榆皂苷元 Z,即:3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯,是在地榆制炭过程中产生的。在制炭程度适当的饮片中能够检出,可以较好地指示地榆炭的炮制程度,由于具有良好的专属性,可以作为控制地榆炭质量的重要指标。

[0011] 更重要的是申请人发现地榆炭中的 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯对结肠肿瘤细胞有显著的抑制其生长的作用,并且还能抑制结肠肿瘤新生血管的形成,从而为治疗结肠癌未转移症状提供了极好的基础。

[0012] 实验表明,3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯具有显著的药理作用。

[0013] 1、抗肿瘤

本发明药物的有效成份为乌苏烷型五环三萜化合物,熊果酸(乌苏酸)是该类化合物的代表性成分。熊果酸为一广谱的抗肿瘤化合物,在体外对多种肿瘤细胞有毒性作用。熊果酸不但能抑制结肠肿瘤细胞生长,而且还能抑制结肠肿瘤新生血管的形成。

[0014] 1.1 材料

人结肠癌细胞系 HT29 (HTB-38, 购自:美国标准菌种收藏所,美国马里兰州罗克维尔市)置于 RPMI-1640 (Hyclone, 美国犹他州洛根市)培养液中进行培养,培养液中含有 10% 小牛血清 (Hyclone, 美国犹他州洛根市)及抗生素 (100 单位/毫升青霉素,及 100 毫克/毫升链霉素) (Hyclone, 美国犹他州洛根市)。细胞在 37 $^{\circ}C$, 5% 二氧化碳培养箱中进行孵育。

[0015] 受试样品为 3β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯, 临用时以二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解, 加培养液稀释至所需浓度, 使 DMSO 终浓度为 1%。

[0016] 1. 2. 实验方法

取处于指数生长期的 HT-29 细胞, 应用 0. 25% 胰酶和 3 毫摩尔 / 升乙二胺四乙酸混合消化液进行消化, 调整细胞浓度为每毫升 1×10^4 , 按每孔 0. 1 毫升接种于 96 孔细胞培养板中。无血清 RPMI-1640 同步化后 24 小时, 细胞继续在不同药物作用浓度下培养 48 小时, 每浓度组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。培养后进行噻唑兰(MTT) 比色(MTT 5 毫克 / 毫升, 37 摄氏度, 4 小时) 并绘制药物浓度与 540 纳米吸光度之间的关系曲线。细胞存活率(%) = 实验组吸光度 / 正常组吸光度 $\times 100\%$

1. 3. 实验结果

实验结果

浓度	吸光度			平均值	标准差	生存率	抑制率
0.001	0.569	0.771	0.55	0.63	0.122479	35.10%	64.90%
0.0001	1.282	0.998	1.198	1.159333	0.145895	64.60%	35.40%
0.00001	1.687	1.498	1.293	1.492667	0.197054	83.17%	16.83%
0.000001	1.663	1.434	1.102	1.399667	0.282072	77.99%	22.01%
1E-07	2.064	1.469	1.406	1.646333	0.363079	91.73%	8.27%
1E-08	1.626	1.678	1.414	1.572667	0.139848	87.63%	12.37%
1E-09	1.437	1.306	1.92	1.554333	0.32338	86.61%	13.39%
0	2.012	1.832	1.54	1.794667	0.238204	-	-

由图 1 可知, 本发明药物有效成份对人结肠癌细胞 HT29 的生长具有较强的抑制作用, 并且显示一定的剂量依赖关系, 在最高剂量 (20 微克 / 毫升) 时, 对细胞的抑制作用最强, 达到 64. 90%。

[0017] 本发明所述药物经动物实验表明对结肠症具有极显著的治疗作用;

本发明药物对结肠癌细胞 HT29 荷瘤小鼠的治疗作用动物实验如下:

1、实验材料:

人结肠癌细胞系 HT29 (HTB-38, 购自: 美国标准菌种收藏所, 美国马里兰州罗克韦尔市)。ICR 小鼠, 雌性, 体重 20 ± 2 克 (山东大学动物中心, 实验动物许可号 SCXK 鲁 20030004); 小鼠白介素-2、肿瘤坏死因子- α 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒均购自晶美生物工程有限公司。

[0018] 受试药物 3β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯注射液, 生理盐水稀释至所需浓度。

[0019] 2、实验方法:

将人结肠癌细胞株接种于正常小鼠腹腔内, 让其大量繁殖, 7 天后抽取腹水 (无血性), 用灭菌生理盐水稀释成细胞浓度为 5×10^6 个 / 毫升的接种液, 于小鼠腹背侧部皮下注射含 5×10^6 癌细胞的悬液 0. 5 毫升, 成瘤后用组织块套管针法皮下移植为实体瘤。

[0020] 将结肠癌皮下移植的小鼠随机分为 5 组, 各组于移植后第 6 天开始给药, 阳性组为环磷酰胺, 空白组和模型组为生理盐水, 每天给药 1 次, 共用 7 天后停药。末次给药 24 小时后摘眼球取血, 收集血液, 取血清 -20°C 备用。临用前平衡至室温, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作, 测定细胞因子白介素-2、肿瘤坏死因子- α 的水平; 颈椎脱臼处

死小鼠，剥取瘤块、胸腺，计算抑瘤率、胸腺指数。

[0021] 抑瘤率 = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 × 100%

胸腺指数 = 胸腺重量 / 体重 × 10

组别	剂量 (毫克/千克)	瘤重 (克)	抑瘤率	体重 (克)	胸腺指数 (毫克/克)
空白组	生理盐水	-	-	29.1 ± 4.2*	27.4 ± 6.9
模型组	生理盐水	0.648 ± 0.174	-	23.0 ± 7.9#	24.8 ± 3.9
阳性组	20	0.342 ± 0.110 **	47.18%	18.7 ± 4.4** ##	12.2 ± 5.1***##
高剂量组	10	0.382 ± 0.153 **	41.06%	26.9 ± 5.0	25.2 ± 7.7
中剂量组	5	0.438 ± 0.158 *	32.46%	26.2 ± 6.7	26.3 ± 8.5
低剂量组	2	0.557 ± 0.150	14.02%	25.0 ± 6.8	24.8 ± 6.8

与模型组相比 *P<0.05 **P<0.01 与正常组相比 :#P<0.05 ##P<0.01

受试本发明药物可抑制小鼠移植性肿瘤的生长，高、中剂量组抑瘤率分别为 47.18%、41.06%，与模型组相比 P<0.01 或 P<0.05；阳性对照环磷酰胺可明显抑制小鼠肿瘤的生长，但小鼠体重明显偏小，胸腺指数明显偏低，本发明药物各剂量组不会降低小鼠体重和胸腺指数，本发明药物对正常机体影响较小，无明显毒副作用。

组别	剂量 (毫克/千克)	细胞因子 (皮克/毫升)	
		白介素-2	肿瘤坏死因子 -α
正常组	生理盐水	8.97 ± 1.81	13.35 ± 3.09
模型组	生理盐水	4.09 ± 1.65##	6.26 ± 1.58##
阳性组	20	3.27 ± 1.16##	5.74 ± 1.68##
高剂量组	10	6.02 ± 1.87**	8.75 ± 1.82*
中剂量组	5	7.19 ± 2.11*	7.45 ± 2.77*
低剂量组	2	5.88 ± 1.82	6.83 ± 3.12

[0022] 与模型组相比 :*P<0.05 **P<0.01 与正常组相比 :#P<0.05 ##P<0.01

模型组和阳性组荷瘤小鼠细胞因子水平明显降低，与正常对照组比较，P<0.01，本发明药物高、中剂量组小鼠细胞因子明显升高，与模型组比较，P<0.01 或 0.05，从而调节淋巴细胞的生长分化、激活巨噬细胞，在抗肿瘤免疫中起着重要的调节作用。

[0023] 动物实验表明，本发明药物具有极好的结肠癌肿瘤抑制作用，不会明显降低小鼠

胸腺指数 ;还可升高小鼠细胞因子白介素 -2、肿瘤坏死因子 - α 水平,从而可通过调节荷瘤小鼠的免疫功能而发挥抗肿瘤的作用。

[0024] 实验表明由于本发明药物对治疗结肠癌有显著的效果,因此,患者可以在结肠癌治疗中使用本发明所述的各种药物剂型。本发明药物还可以替代手术后的化疗期联合使用的西药,从而彻底消除西药的毒副作用。

附图说明

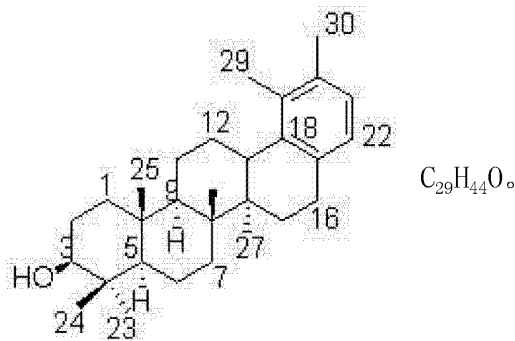
[0025] 图 1 为本发明药物有效成份对人结肠癌细胞 HT29 的抑制作用 ;

图 2 为本发明所述的地榆皂苷元 Z 的含量采用高效液相色谱法测定方法中使用的对照品和供试品高效液相色谱图谱 ;图中 :A- 对照品 ;B- 供试品 ;1- 地榆皂苷元 Z。

具体实施方式

实施例

[0026] 本发明一种治疗结肠癌的药物由药物有效成份及药用辅料制成药剂,药物有效成份的结构式为 : 3β -羟基 -28- 去甲乌索 -17, 19, 21- 三烯 (3β -hydroxy-28-norurs-17, 19, 21-trien)



[0027] 按重量百分比计药物有效成份为 1%-90%、药用辅料为 10%-99%,本发明药物可以制成各种剂型,如 :注射剂 :水针剂、冻干粉剂,片剂、胶囊、颗粒剂、散剂或口服液。

[0028] 所述药剂剂型为片剂,片剂的药物有效成份为 20%-70%、药用辅料为 30%-80%。

[0029] 所述药剂剂型为胶囊,胶囊的药物有效成份为 20%-90%、药用辅料为 10%-80%。

[0030] 所述药剂剂型为水针剂或冻干粉剂,药物有效成份为 1%-5%、药用辅料为 95%-99%。

[0031] 所述药剂剂型为散剂或颗粒剂,药物有效成份 10%-20%、药用辅料为 80%-90%。

[0032] 本发明药物的制备方法是先采用地榆炭提取药物有效成份,然后按照常规制药方法制备成所需药剂,包括以下步骤 :

①取地榆炭粉碎后为药物原料,加入原料十倍量的甲醇或乙醇,或含水醇类,常温或加热至 $32^{\circ}C - 38^{\circ}C$,提取 1—24 小时,重复提取 1—3 次,过滤,滤液在常压或减压下浓缩得到流浸膏 ;

②将步骤①中流浸膏用三倍重量的水分散,以氯仿 1/3 体积萃取,可重复萃取 5 至 8 次,将萃取液常压或减压回收溶剂,得浸膏 ;

③将步骤②的浸膏进行柱层析分离,采用石油醚 - 丙酮系统梯度洗脱,通过薄层

层析将 95:5 洗脱部分合并,抽滤所得固体重结晶得到化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯;

④按重量百分比取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 1%-90%、药用辅料 10%-99%,按照药剂的常规制备方法制成药剂。

[0033] 举例说明几种剂型:

一、水针剂:

1. 含药物有效成分 1%,其余为辅料

1000 毫升

3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 10 克,吐温 80 10 毫升,氯化钠 8 克。

[0034] 取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 10 克,加吐温 80 10 毫升,注射用水 250 毫升,加热溶解,滤过,加 10% 碳酸钠调酸碱度至 7.0-7.5,加入氯化钠,加注射用水至 1000 毫升,G₃ 垂熔漏斗(玻璃)滤过,分装,灌封,100 摄氏度流通蒸汽灭菌 30 分钟,分装于 1 毫升安瓿瓶中,每支含有含 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 10 毫克。

[0035] 2. 含药物有效成分 2.5%,其余为辅料

3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 25 克,吐温 80 10 毫升,氯化钠 8 克。

[0036] 取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 25 克,加吐温 80 10 毫升,注射用水 250 毫升,加热溶解,滤过,加 10% 碳酸钠调酸碱度至 7.0-7.5,加入氯化钠,加注射用水至 1000 毫升,G₃ 垂熔漏斗(玻璃)滤过,分装,灌封,100 摄氏度流通蒸汽灭菌 30 分钟,分装于 1 毫升安瓿瓶中,每支含有含 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 25 毫克。

[0037] 3. 含药物有效成分 5%,其余为辅料

3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 50 克,吐温 80 10 毫升,氯化钠 8 克。

[0038] 取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 50 克,加吐温 80 10 毫升,注射用水 250 毫升,加热溶解,滤过,加 10% 碳酸钠调酸碱度至 7.0-7.5,加入氯化钠,加注射用水至 1000 毫升,G₃ 垂熔漏斗(玻璃)滤过,分装,灌封,100 摄氏度流通蒸汽灭菌 30 分钟,分装于 1 毫升安瓿瓶中,每支含有含 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 50 毫克。

[0039] 二、胶囊剂:

1、含药物有效成分 20%,其余为辅料

1000 粒

3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 40 克,微晶纤维素 80 克,淀粉 80 克,微粉硅胶 2 克。

[0040] 取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 40 克,研细,过四号筛,与微晶纤维素、淀粉混匀,加 10% 淀粉浆,拌匀,过 2 号筛制粒,干燥,过 3 号筛整粒。取微粉硅胶,过四号筛加至上述颗粒中,混合均匀,填充胶囊。每粒重 0.2 克,含 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 40 毫克。

[0041] 2、含药物有效成分 50%,其余为辅料

1000 粒

3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 100 克,预胶化淀粉 100 克,微粉硅胶 2 克,聚维酮 K30 乙醇溶液适量。

[0042] 取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 100 克,研细,过四号筛,与预胶化

淀粉混合均匀,喷加聚维酮 K30 乙醇溶液制成软材,过 2 号筛制粒,干燥,过 3 号筛整粒。取微粉硅胶,过四号筛加至上述颗粒中,混合均匀,填充胶囊。每粒重 0.2 克,含 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 100 毫克。

[0043] 3、含药物有效成分 70%,其余为辅料

1000 粒

3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 140 克,预胶化淀粉 60 克,微粉硅胶 2 克,聚维酮 K30 乙醇溶液适量。

[0044] 取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 140 克,研细,过四号筛,与预胶化淀粉混合均匀,喷加聚维酮 K30 乙醇溶液制成软材,过 2 号筛制粒,干燥,过 3 号筛整粒。取微粉硅胶,过四号筛加至上述颗粒中,混合均匀,填充胶囊。每粒重 0.2 克,含 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 140 毫克。

[0045] 4、含药物有效成分 90%,其余为辅料

1000 粒

3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 180 克,预胶化淀粉 20 克,微粉硅胶 2 克,聚维酮 K30 乙醇溶液适量。

[0046] 取 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 180 克,研细,过四号筛,与预胶化淀粉混合均匀,喷加聚维酮 K30 乙醇溶液制成软材,过 2 号筛制粒,干燥,过 3 号筛整粒。取微粉硅胶,过四号筛加至上述颗粒中,混合均匀,填充胶囊。每粒重 0.2 克,含 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 180 毫克。

[0047] 三、片剂:

1、含药物有效成分 20%、辅料 80%

1000 片

化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 40 克,可压性淀粉 20 克,微晶纤维素 135 克,微粉硅胶 5 克,硬脂酸镁 1 克。

[0048] 化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯、可压性淀粉、微晶纤维素、微粉硅胶和硬脂酸镁置混合容器中,混合均匀,过 40 目筛 2~3 次,将全粉末直接压片,每片重 0.2 克,含化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 40 毫克。

[0049] 2、含药物有效成分 50%、辅料 50%:

1000 片

化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 100 克,可压性淀粉 20 克,微晶纤维素 75 克,微粉硅胶 5 克,硬脂酸镁 1 克。

[0050] 化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯、可压性淀粉、微晶纤维素、微粉硅胶和硬脂酸镁置混合容器中,混合均匀,过 40 目筛 2~3 次,将全粉末直接压片,每片重 0.2 克,含化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 100 毫克。

[0051] 3、含药物有效成分 70%、辅料 30%:

1000 片

化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯 140 克,可压性淀粉 20 克,微晶纤维素 20 克,微粉硅胶 5g,硬脂酸镁 1 克。

[0052] 化合物 3 β -羟基-28-去甲乌索-17, 19, 21-三烯、可压性淀粉、微晶纤维素、微粉

硅胶和硬脂酸镁置混合容器中,混合均匀,过40目筛2~3次,将全粉末直接压片,每片重0.2克,含化合物3 β -羟基-28-去甲乌索-17,19,21-三烯140毫克。

[0053] 本发明所述的地榆皂苷元Z的含量可以采用高效液相色谱法测定方法

本发明所述的地榆皂苷元Z的含量可以采用高效液相色谱法测定,其测定方法包括如下步骤:

1、地榆炭样品的制备:取净地榆片500g,片厚4mm,置电热控温炒药机内,于260℃炒制不同时间,制备成不同炮制程度的地榆炭,炮制工艺参数及外观性状见下表1;

表1 地榆炭炮制条件及饮品颜色

样品	加热时间/分钟	颜色		炮制程度
		表面	断面	
1#	7	黄褐色	浅黄褐色	轻
2#	8	深黄褐色	黄褐色	轻
3#	9	褐色	黄褐色	稍轻
4#	10	深褐色	深黄褐色	稍轻
5#	11	焦黑色	棕褐色	适当
6#	12	深黑色	棕黑色	稍过
7#	15	炭黑色	焦黑色	重

取上述地榆生品及各炮制品,粉碎,使过40目筛,于80℃烘2小时,备用;

2、对照品溶液的制备:取地榆皂苷元Z对照品五氧化二磷适量进行干燥,精密称定,加甲醇制成每1mL含68 μ g的溶液;

3、供试品溶液制备:取自制5#地榆炭样品粉末约1.0g,精密称定,精密加入甲醇50mL,超声处理30min,滤过,精密吸取续滤液25mL,蒸干,加水溶解,用乙酸乙酯提取5次,每次10mL,合并乙酸乙酯提取液,回收溶剂,残渣用甲醇溶解并转移至5mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,滤液用0.45 μ m微孔滤膜滤过,作为供试品溶液;

4、在上述色谱条件下分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液10 μ L注入液相色谱仪测定;

结果表明,对照品峰与其他峰均可达到基线分离,且保留时间适中;供试品色谱峰保留时间和峰形与对照品一致;因此该分析条件可行;对照品和供试品高效液相色谱图见2;

5、线性关系考察 精密吸取对照品溶液2,4,6,8,10 μ L,分别注入液相色谱仪,测定峰面积,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标作出校正曲线, $y = 6090.2x - 35428$,相关系数 $r = 0.9997$;

结果表明,地榆皂苷元Z在136~680ng范围内,进样体积与峰面积值呈良好的线性关系;

6、检测限和定量限 取地榆皂苷元Z对照品溶液,将溶液逐渐稀释,精密吸取对照品稀释液10 μ L,注入液相色谱仪,测定;

结果表明,地榆皂苷元Z的检测限为1.66ng ($S/N \geq 3$),定量限为8.30ng ($S/N \geq 10$);

7、精密度试验 精密吸取对照品溶液和5#地榆炭供试品溶液各10 μ L,分别注入液相

色谱仪,各测定 6 次,峰面积 RSD 分别为 0.47 和 0.68% (n=6),表明仪器精密度良好;

8、重复性试验 取 5# 地榆炭样品粉末 6 份,每份 1.0g,精密称定,按照步骤 3 的方法分别制备供试品溶液进行测定,测得地榆皂苷元 Z 含量为 0.0571%,RSD 为 2.77%,表明方法重复性良好。

[0054] 9、稳定性试验 精密吸取 5# 地榆炭供试品溶液 10 μ L,分别在 0、2、4、6、8、12、24h 进行测定,测得地榆皂苷元 Z 在 24h 内峰面积 RSD 为 1.24%;

表明该样品至少在 24h 内稳定;

10、加样回收率试验 精密称取一定量 5# 地榆炭样品,地榆皂苷元 Z 含量 0.0571% 6 份,精密加入一定量对照品,按照步骤 3 方法分别制备供试品溶液进行测定,结果地榆皂苷元 Z 平均回收率为 99.3%,RSD=1.17%;说明测定方法测定结果准确;回收率试验结果见表 2;

表 2 回收率试验结果

样品重量/克	含量/毫克	加入量/毫克	测得量/毫克	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
0.5034	0.287	0.272	0.562	101.0%	99.3%	1.17%
0.5015	0.286	0.272	0.554	98.4%		
0.5000	0.286	0.272	0.552	97.9%		
0.4999	0.285	0.272	0.558	100.2%		
0.5194	0.297	0.272	0.566	98.9%		
0.4999	0.285	0.272	0.555	99.1%		

11、样品含量测定 取地榆生品及不同炮制程度地榆炭样品各 1.0g,精密称定,按照步骤 3 的操作,制成各供试样品,精密吸取各供试品溶液各 10 μ L,分别注入液相色谱仪测定,计算各样品中地榆皂苷元 Z 的含量;测定结果见表 3;

表 3 不同炮制程度地榆炭中地榆皂苷元 Z 含量测定结果

样品	含量/%	平均含量/%
1#	0, 0	0
2#	0, 0	0
3#	0.0089%, 0.0087%	0.0088%
4#	0.0310%, 0.0314%	0.0312%
5#	0.0577%, 0.0578%	0.0578%
6#	0.0519%, 0.0518%	0.0519%
7#	0, 0	0

由表 3 结果可知,11min 之前,随着炒制时间的延长,该成分含量逐渐增加,至 11min 含量最高;之后随着时间延长,含量逐渐降低,至 15min 时,含量为零。

[0055] 积极效果:

用上述方法测量地榆皂苷元 Z 的含量,其测定结果表明,制炭程度对该成分有较显著的影响,其产生与加热炒制的程度有密切的关系,同时发现地榆中皂苷类等大极性成分制炭后含量降低是地榆生品中的地榆皂苷经过脱糖、脱羟基等反应得到的;

地榆皂苷元 Z 在地榆生品以及炒制程度较轻或过重的饮片中均检测不到,该成分含量最高时,地榆炭外观达到最佳,与传统要求相符,因此,该成分可以作为指标较好地指示地

榆炭的炮制程度,并具有良好的专属性。

[0056] 其结果可为完善地榆炭饮片质量标准、优化炮制工艺提供良好的数据支持和科学依据。

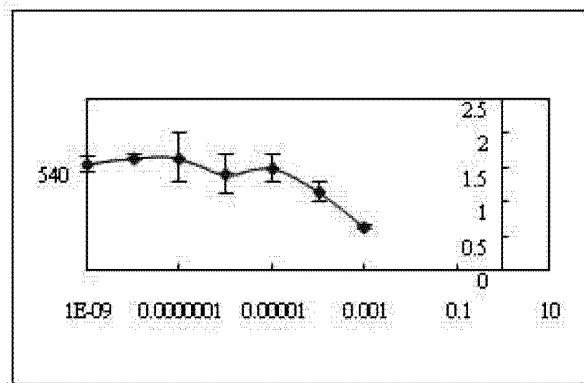


图 1

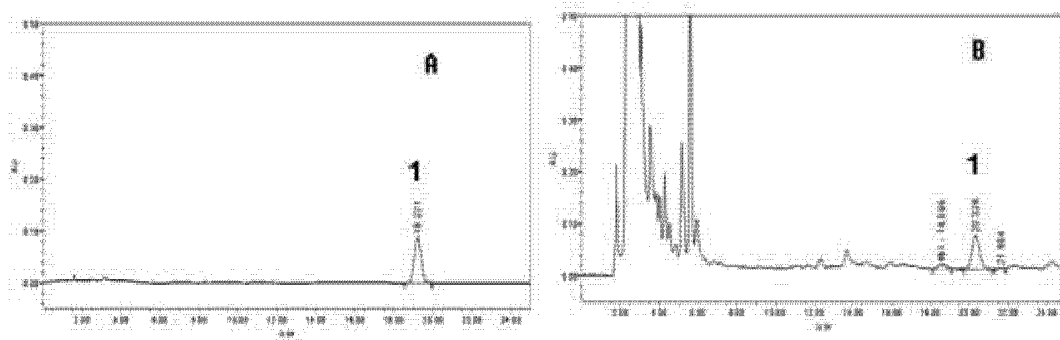


图 2