

3.1 检测波长的选择:经二极管阵列检测器分析,丹皮酚分别在 238、274 nm 处有吸收峰,而马钱苷仅在 238 nm 处有吸收峰,且在该波长下,两成分均有较大吸收,因此,选择波长 238 nm 测定本品中马钱苷、丹皮酚。

3.2 流动相的选择:《中国药典》2005 年版一部中六味地黄丸有关马钱苷的测定以含有四氢呋喃为流动相^[3],而四氢呋喃对反相色谱系统的柱塞密封圈有一定的腐蚀性,故本实验对马钱苷的色谱条件进行了系统的研究,发现其在以甲醇-水为流动相中可达到很好的分离,且可与丹皮酚在同一的流动相体系中测定,最后实现了二者的同时测定。

3.3 提取条件的筛选:本实验考察了超声和回流两

种提取方法,结果表明两种提取方法相当,因超声提取相对操作简单、方便,故确定以超声处理为本实验的提取方式。马钱苷为水溶性成分,而丹皮酚为脂溶性成分,进一步试验,考察不同提取溶剂(100%、80%、50%、30% 甲醇),发现二者在 50% 甲醇的条件下提取率最高,所以选择 50% 甲醇作为提取溶剂。在此基础上,比较了不同的超声时间(10、15、30、45 min),结果表明超声时间对二者的提取率影响不大,可选择超声 15 min 提取马钱苷和丹皮酚。

参考文献:

- [1] 冯燕芹,王振中. HPLC 测定六味地黄丸(浓缩)中熊果酸的含量[J]. 中草药,1999,30(3):191-192.
- [2] 刘德军. 六味地黄丸现代研究与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2005.

女贞子多糖除蛋白工艺的研究

万 琴¹, 萧 伟^{2*}, 王振中², 尚 强²

(1. 南京中医药大学,江苏 南京 210046; 2. 江苏康缘药业股份有限公司,江苏 连云港 222001)

摘要:目的 筛选女贞子多糖除蛋白的最佳工艺。方法 以除蛋白率和多糖损失率为指标,比较了 3 种不同的除蛋白方法(Sevag 法、三氯乙酸法和三氯乙酸-Sevag 法)的效果,并用正交试验优选出最佳工艺。结果 女贞子多糖除蛋白的最佳工艺为以 1 倍量 10% 三氯乙酸溶液除蛋白 1 次,静置 2 h,离心。结论 优选出的除蛋白方法效果较好,为女贞子多糖的制备工艺的进一步研究提供了参考。

关键词:女贞子;多糖;除蛋白;正交试验

中图分类号:R284.2;R286.01

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)03-0407-04

女贞子为木犀科常绿乔木女贞 *Ligustrum lucidum* Ait 的干燥成熟果实,始载于《神农本草经》,是一味常用中药材,具有扶正固本、补益肝肾、清热明目的功效,临床主要用于强腰膝、乌须发,治疗阴虚内热、头昏耳鸣等症。现代药理研究表明^[1-3],女贞子多糖具有显著的免疫增强和抗氧化、抗衰老作用。有化学研究表明,女贞子多糖(polysaccharide from *Ligustrum lucidum* Ait., PLLA)主要由鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖及岩藻糖 4 种糖组成^[4]。近年来,对女贞子的研究主要集中在其脂溶性成分如齐墩果酸、熊果酸等,而女贞子多糖的研究较少。由于粗多糖的水提液在醇沉的过程中蛋白质会一起沉淀下来,影响后续的分离纯化研究,因此确定除蛋白效率高且多糖损失率小的除蛋白方法是很关键

的环节^[5]。本实验以多糖损失率和蛋白质清除率为指标,针对女贞子多糖选用了 Sevag 法、三氯乙酸法(TCA 法)、三氯乙酸-Sevag 法 3 种不同的除蛋白方法,并采用正交试验法优选了三氯乙酸法除蛋白的工艺,旨在筛选简单、可行的女贞子多糖除蛋白方法,为其他植物多糖的除蛋白工艺研究提供一定的参考。

1 实验材料

女贞子购于安徽亳州药材市场,经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主管药师鉴定。

UV2550—PC 紫外可见分光光度计;TDL—5—A 型离心机;BP—211D 型电子天平;牛血清白蛋白、考马斯亮蓝 G-250(国药集团化学试剂有限公司);D-无水葡萄糖(中国药品生物制品检定所,批号为 110833-200503);氯仿、正丁醇、三氯乙酸、苯

收稿日期:2009-07-03

作者简介:万 琴(1985—),女,湖北荆州人,硕士,南京中医药大学药剂学专业研究生,从事中药制剂的研究与开发。

Tel:(0518)85521930 E-mail:wanqingood@gmail.com

*通讯作者 萧 伟 E-mail:xw@kanion.com

酚、浓硫酸均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 女贞子粗多糖的提取:取女贞子粗粉 4 kg,加 10 倍体积的乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,药渣挥干乙醇后,加 15 倍量的水提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至药液相对密度为 1.05 (20~25),加乙醇至体积分数为 80%,静置 12 h,离心,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚反复洗涤数次,抽滤,真空干燥后得到女贞子粗多糖约 240 g。

2.2 多糖和蛋白质的测定:多糖测定采用改良的苯酚-硫酸法^[6];蛋白质测定采用考马斯亮蓝 G-250 比色法^[7]。

2.2.1 糖标准曲线的制备:称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 14.74 mg 置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,制成质量浓度为 147.4 μg/mL 储备液。精密吸取储备液 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL 分别置于具塞试管中,各加蒸馏水使总体积为 1.0 mL,再分别加 6% 苯酚试液 1.0 mL,摇匀,迅速滴加浓硫酸 5.0 mL,摇匀后置沸水浴中加热 15 min,冰水中 15 min,再室温放置 30 min,取出;另以蒸馏水 1.0 mL 加苯酚和硫酸,同上操作作为空白对照,于 490 nm 波长处测定吸光度,以吸光度(A)为横坐标,葡萄糖质量浓度(C)为纵坐标,进行回归处理,得回归方程为 $C = 0.01058A + 0.00228$, $r = 0.99992$,表明葡萄糖在 0~132.66 μg/mL 具有良好的线性关系。

2.2.2 样品中葡萄糖量的测定:精密量取样品溶液 1 mL,自标准曲线的制备项下“再分别加 6% 苯酚试液 1.0 mL”起测定其吸光度值,平行 3 次。

2.2.3 蛋白质标准曲线的制备:称取牛血清白蛋白 15.14 mg,置 10 mL 量瓶中,加水溶解后稀释至刻度制成质量浓度为 151.4 μg/mL 贮备液。分别吸取贮备液 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL,加水稀释至 1 mL,向各管中加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,混合均匀后以蒸馏水为空白,5 min 后在 595 nm 波长处测定吸光度值。以吸光度(A)为横坐标,牛血清白蛋白质量浓度(C)为纵坐标,得回归方程为: $C = 0.00323A - 0.03726$,相关系数 $r = 0.99937$,表明牛血清白蛋白在 0~136.26 μg/mL 呈良好的线性关系。

2.2.4 样品中蛋白质的测定:精密量取样品溶液 1 mL,加入考马斯亮蓝贮备液 5 mL,振摇,以 1 mL 水为空白,5 min 后在 595 nm 波长处测定吸光度值,平行 3 次。

2.3 指标的确定:采用蛋白质清除率和多糖损失率

作为指标进行考察。

蛋白质清除率 = $\frac{\text{脱蛋白前蛋白质的量} - \text{脱蛋白后蛋白质的量}}{\text{脱蛋白前蛋白质的量}} \times 100\%$

多糖损失率 = $\frac{\text{脱蛋白前多糖的量} - \text{脱蛋白后多糖的量}}{\text{脱蛋白前多糖的量}} \times 100\%$

2.4 女贞子多糖除蛋白工艺

2.4.1 女贞子粗多糖溶液的配制:取 2.1 项下制得的女贞子粗多糖 20 g,加 200 mL 水超声溶解,配制 3 份质量浓度为 10% 的女贞子粗多糖水溶液。

2.4.2 Sevag 法:按照女贞子粗多糖水溶液、氯仿、正丁醇的体积比为 16:4:1 加入氯仿与正丁醇,手摇 20 min 后于分液漏斗中静置 2 h,离心取上清液,浓缩至相对密度为 1.05 (20~25),加入乙醇至体积分数达 80%,静置 12 h,离心得沉淀物,依次用适量无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,抽滤,干燥后得女贞子多糖,测定多糖和蛋白质,结果见图 1。

2.4.3 三氯乙酸法:配制 3%、5%、7%、10%、15%、20% 质量浓度的三氯乙酸溶液,分别与女贞子粗多糖水溶液等体积混合,充分搅匀,4 静置 2 h,离心,上清液用 1 mol/L NaOH 溶液中和至 pH 中性,浓缩至相对密度为 1.05 (20~25),加入乙醇至体积分数达 80%,静置 12 h,离心得沉淀物,依次用适量无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,抽滤,干燥后得女贞子粗多糖,测定多糖和蛋白质,结果见图 1。

2.4.4 三氯乙酸-Sevag 法:按照女贞子粗多糖水溶液、10% 三氯乙酸、Sevag 试剂[氯仿-正丁醇(4:4:1)]的体积比为 4:4:1 加入 10% 三氯乙酸和 Sevag 试剂,手摇 20 min 后于分液漏斗中 4 静置 2 h,离心,上清液用 1 mol/L NaOH 溶液中和至 pH 中性,浓缩至相对密度为 1.05 (20~25),加入乙醇至体积分数达 80%,静置 12 h,离心得沉淀物,依次用适量无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,抽滤,干燥后得女贞子粗多糖,测定多糖和蛋白质,结果见图 1。

2.4.5 结果比较:由图 1 可知,女贞子多糖采用 Sevag 法除蛋白,反复处理 4 次可以使多糖损失相对较少,而蛋白质的清除率较高,6 次除蛋白总的清除率为 34.57%,而多糖的损失率达到了 39.19%。除蛋白的主要效果在前 4 次,蛋白质清除率达到了 30.36%;TCA 法除蛋白,蛋白质的清除率和多糖损失率随着三氯乙酸浓度的升高而升高,但是多糖损失率的增长幅度比较大。如 3% 三氯乙酸溶液的蛋白清除率达到了 75.23%,而多糖损失率只有 6.21%。三氯乙酸浓度越高,多糖的降解率就越大,损失也越多。综合各种因素考虑,10% 的三氯乙酸

除蛋白效果较为理想;三氯乙酸-Sevag 法第一次蛋白质的清除率为 50.24%,多糖损失率为 9.31%。总体上比较,该法的蛋白质清除率介于 Sevag 法和三氯乙酸法之间,且以第 3 次效果比较好。

由上述数据可以得出,3 种除蛋白的方法各有利弊。在除蛋白的过程中,氯仿和正丁醇使蛋白质变性形成凝胶物,部分多糖物质也会随之沉淀,造成多糖的损失;此外,Sevag 法也很难除清少量与多糖结合很牢或被多糖包裹的蛋白质。因此经典的 Sevag 法虽然温和且在避免多糖的降解方面有较好的效果,但该方法效率低,需要消耗大量的有机试剂,对于蛋白质量较高的女贞子多糖来说并不是较好的除蛋白方法。三氯乙酸法除蛋白效率较高,但是由于三氯乙酸的酸性较强,容易导致多糖的降解,因此控制好三氯乙酸的浓度尤为重要。综合上述结果,在兼顾多糖损失率和蛋白质清除率的情况下,本实验选用三氯乙酸法用于去除女贞子粗多糖中的蛋白质,并进一步设计正交试验来优化其除蛋白的工艺。

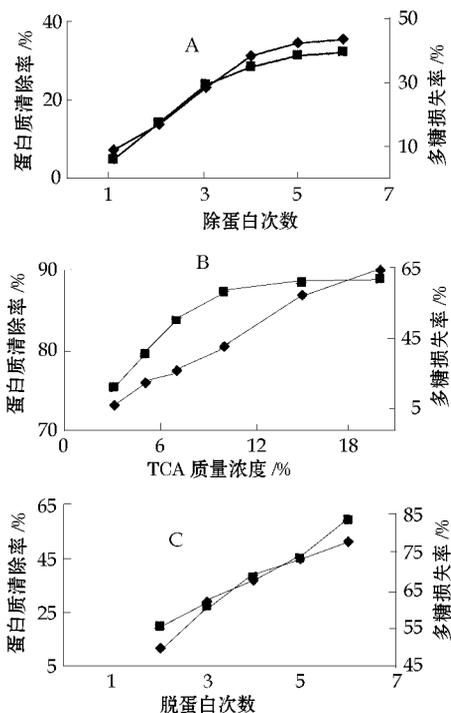


图 1 Sevag 法(A)、TCA 法(B)和 TCA-Sevag 法(C)除蛋白的效果

Fig 1 Results of removing protein by Sevag method (A), trichloroacetic acid (TCA) method (B), and combination of TCA with Sevag method (C)

2.5 三氯乙酸法除蛋白工艺优化

2.5.1 正交试验设计:根据文献资料及预实验结果,选取 10%三氯乙酸的用量、除蛋白次数、静置时间为考察因素,每个因素选择 3 个考察水平,进行

$L_9(3)^4$ 正交试验,以多糖量和蛋白质清除率优选三氯乙酸除蛋白的工艺,因素水平见表 1。

表 1 因素与水平

水平	因素		
	A 三氯乙酸用量/倍	B 除蛋白次数/次	C 静置时间/h
1	1	1	2
2	2	2	4
3	3	3	6

2.5.2 试验结果:准确称取 9 份女贞子粗多糖各 20 g 于具塞试管,加入 200 mL 水,充分振摇使溶解,按照正交试验安排进行女贞子粗多糖除蛋白、醇沉、减压干燥、精密称定,测定各实验多糖粗品中多糖和蛋白质,以综合评分(综合评分 = 多糖质量分数 $\times 50\%$ + 蛋白质清除率 $\times 50\%$)为指标,试验安排及试验结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 $L_9(3)^4$ 正交试验及试验结果

试验号	A	B	C	D	多糖量 / %	蛋白质清除率 / %	综合评分 / %
1	1	1	2	1	38.23	82.81	60.52
2	1	2	4	2	30.59	77.31	53.95
3	1	3	6	3	25.71	80.50	51.85
4	2	1	4	3	21.10	76.04	48.57
5	2	2	6	2	17.15	76.23	46.69
6	2	3	2	1	16.99	69.97	43.48
7	3	1	6	2	14.65	80.03	47.34
8	3	2	2	3	12.99	73.95	43.47
9	3	3	4	1	10.98	70.44	40.71
K_1	55.44	52.14	49.16	49.31			
K_2	46.25	48.04	47.74	48.26			
K_3	43.84	45.35	48.63	47.96			
R	11.60	6.80	1.41	1.34			

表 3 方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值 ($\alpha = 0.05$)	显著性
A	224.869	2	75.132	19.000	$P < 0.05$
B	70.295	2	23.486	19.000	$P < 0.05$
C	3.059	2	1.022	19.000	
误差	2.330	2			

3 种因素对女贞子粗多糖除蛋白的主次顺序依次为三氯乙酸用量、除蛋白次数、放置时间。在兼顾多糖质量分数和蛋白质清除率的情况下,选取各影响因素的最优水平组合为 $A_1B_1C_1$,即以 1 倍量的三氯乙酸除蛋白 1 次,静置 2 h,离心为女贞子粗多糖除蛋白的优选工艺。

3 讨论

多糖主要以两种形式存在,一是纯糖链,另一种是糖链与肽链结合,形成的糖肽或糖蛋白。多糖常

用的除蛋白方法如 Sevag 法、三氯乙酸法、酶法等并不能彻底去除蛋白质,只能部分除去游离的蛋白质,这些方法在不同程度上都会造成多糖-蛋白复合物的损失,还可能影响到多糖的得率或活性。本实验通过比较筛选出了女贞子多糖除蛋白的优选工艺为:以 1 倍量的 10% 三氯乙酸溶液除蛋白 1 次,静置 2 h 后离心。该方法是否影响到女贞子多糖的结构及活性,还有待于进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] 李 璘,丁安伟,孟 丽. 女贞子多糖的免疫调节作用研究[J]. 中药药理与临床,2001,17(2):11-12.
- [2] 张振明,蔡曦光,葛 斌,等. 女贞子多糖的抗氧化活性研究[J]. 中国药师,2005,8(6):489-491.
- [3] 张振明,葛 斌,许爱霞. 女贞子多糖的抗衰老作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2006,20(2):108-111.
- [4] Wang Q J, Yu H, Zong J, et al. Determination of the composition of Chinese *Ligustrum lucidum* polysaccharide by capillary zone electrophoresis with amperometric detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31: 473-480.
- [5] 中国科学院上海药物所. 中草药有效成分的提取与分离[M]. 北京:化学工业出版社,1983.
- [6] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [7] 王文平,郭祀远,李 琳. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发,2008,29(1):115-117.

莲必治注射液中细菌内毒素检查法的研究

陈宜鸿,白 林

(解放军总医院医学保障部,北京 100853)

摘要:目的 建立莲必治注射液细菌内毒素检查(BET)方法。方法 参照《中国药典》2005年版细菌内毒素检测方法及其指导原则中干扰试验的基本原理和检测方法。结果 莲必治注射液稀释 25 倍(2 mg/mL),采用灵敏度 0.125 EU/mL 的鲎试剂经干扰实验无增强、抑制作用。结论 实验具有准确性、可靠性,细菌内毒素检查法适用于检测莲必治注射液中的内毒素。

关键词:莲必治注射液;鲎试剂;细菌内毒素检查

中图分类号:R284.2 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2010)03-0410-02

莲必治注射液具有清热解毒、抗菌消炎的功效,用于细菌性痢疾、肺炎、急性扁桃体炎等。细菌内毒素检测法,具有灵敏,快速,简便易行等诸多优点^[1,2],因此本实验探讨了采用细菌内毒素检查法检测莲必治注射液中细菌内毒素的可行性。

1 材料与仪器

细菌内毒素工作标准品(10 EU/支,厦门鲎试剂厂,批号 050301);鲎试剂(灵敏度 0.125 EU/mL,厦门市鲎试剂实验厂有限责任公司,批号 051138;灵敏度 0.125 EU/mL,湛江安度斯生物有限责任公司,批号 0503070);细菌内毒素检查用水(BET水,2 mL/支,湛江博康海洋生物有限公司,内毒素 < 0.005 EU/mL,批号 050804);莲必治注射液(2 mL 0.1 g,无锡山禾药业股份有限公司,批号 050302、050517、050912)。

超净工作台(四达净化技术研究所);电热恒温水浴锅(上海沪南科学仪器联营厂);旋涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂(TAL)灵敏度()复核试验:按《中国药典》2005年版附录细菌内毒素检查法复核试验用 TAL 的灵敏度,2 批 TAL 灵敏度复核结果显示。均在 0.5 ~ 2.0,均符合《中国药典》规定,可用于细菌内毒素检查,并以其标示值为灵敏度^[1]。

2.2 供试品细菌内毒素限值(L)的确定

2.2.1 按人用最大剂量确定:《中国药典》2005年版规定注射剂的致热阈值(K)为 5.0 EU/(kg·h),根据临床用法,人一次应用最大剂量(M)为 600 mg/(60 kg·h),则其细菌内毒素理论限值(L)为:

$$L = K/M = 5.0 / (600 \times 60) = 0.5 \text{ EU/mg}.$$

2.2.2 按静脉滴注用药细菌内毒素总限量确定:根据本品临床用法,成人一次 500 ~ 600 mg,溶于 250 mL 0.9%氯化钠注射液中,静脉滴注,按 600 mg 莲必治注射液与 250 mL 0.9%氯化钠注射液(细菌内毒素限值 L_{NaCl} 为 0.5 EU/mL)静脉滴注作为 1 h 的最大剂量计算,混合药液的细菌内毒素总限量应小于或等于《中国药典》规定的 K 值(5.0 EU/kg·h),即

$$(600 \text{ mg} \times L + 250 \text{ mL} \times L_{\text{NaCl}}) / (60 \text{ kg} \cdot \text{h}) \leq K, \text{ 计}$$