

· 药剂与工艺 ·

舒血宁片中总黄酮的共振散射光谱分析

邹节明¹,袁伟恩²,蒋治良^{2*},王力生¹,潘宏程^{2*}

(1. 桂林三金药业股份有限公司,广西 桂林 541004 2. 广西师范大学 资源与环境学系,广西 桂林 541004)

摘要:目的 建立舒血宁片中总黄酮共振散射光谱分析方法,探讨共振散射光增强的原因。方法 采用共振散射光谱法研究 BSA-Mo(VI)-槲皮素(Qu)体系。结果 BSA-Mo(VI)-Qu体系在 470 nm和 525 nm产生共振散射峰,Qu浓度在 0~2.4 mg/L与 470 nm处的共振散射光强度成线性关系,检测限为 0.3 mg/L。结论 该方法简便灵敏,可用于舒血宁片中总黄酮的测定。[BSA-Mo(VI)-Qu]_n缔合微粒和界面的形成是导致体系共振散射增强的根本原因。

关键词:舒血宁片;槲皮素;总黄酮;共振散射光谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-0987-04

Analysis of total flavone in Shuxuening Tablet by resonance scattering spectrum

ZOU Jie-ming¹, YUAN Wei-en², JIANG Zhi-liang², WANG Li-sheng¹, PAN Hong-cheng²

(1. Guilin Sanjin Pharmaceutical Limited Company, Guilin 541004, China; 2. Department of Resource and Environment Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract Object To develop a resonance scattering spectral(RSS) method for the determination of total flavone in Shuxuening Tablet, and study the cause of RSS enhancement. **Methods** The BSA-Mo(VI)-quercetin(Qu) system was investigated by RSS method. **Results** There were two resonance scattering peaks at 470 and 525 nm. The Qu concentration in the range of 0~2.4 mg/L is linear to the resonance scattering intensity $I_{470\text{ nm}}$, with a detection limit of 0.3 mg/L. **Conclusion** This method is simple, sensitive and suitable for the determination of total flavone in Shuxuening Tablet. The spectral results demonstrate that the formation of [BSA-Mo-Qu]_n associated particle and the interface between the particle solid phase and water phase results to its enhanced RSS.

Key words Shuxuening Tablet; quercetin(Qu); total flavone; resonance scattering spectrum(RSS)

舒血宁片为银杏叶提取物制剂,主要成分是银杏总黄酮苷和银杏黄酮内酯,具有活血化瘀、通脉舒络之功效。临床多用于动脉硬化及高血压病所致的冠状动脉供血不全、心绞痛、心肌梗死、脑血管痉挛以及动脉血管不良所引起的疾患。药理作用表明,总黄酮苷的含量是评价舒血宁片质量的重要指标。因此,建立黄酮分析方法具有重要意义。黄酮化合物的测定主要有高效液相色谱法^[1,2]、荧光法^[3]、分光光度法^[4]等。共振散射光谱(RSS)作为一种简便灵敏的光谱新技术已用于痕量无机和有机分析及纳米微粒特性等研究,均获得了较好效果^[5-8]。尚未见基于形成超微粒测定总黄酮的共振散射法报道。本实验采用共振散射光谱、荧光光谱研究了该缔合微粒体系,建立了测定舒血宁片中总黄酮的共振散射光谱

分析方法。

1 材料与方法

1.1 仪器: RF-540型荧光分光光度计(日本岛津); RTG-756型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试剂: 1.00×10^{-3} mol/L槲皮素(quercetin, Qu,中国药品生物制品检定所提供,纯度大于99%); 5.0×10^{-3} mol/L钼酸钠[Na₂MoO₄, Mo(VI)], 1.0 mg/L牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA,上海丽珠东风生物技术有限公司);舒血宁片由桂林漓江制药有限公司提供。

1.3 实验方法:在 10 mL比色管中,依次加入 1 mL pH4.0 HAc-NaAc缓冲溶液,0.20 mL 5.0×10^{-3} mol/L Mo(VI)和 0.1 mL 1 mg/mL BSA及一

* 收稿日期: 2003-03-04

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(014403)

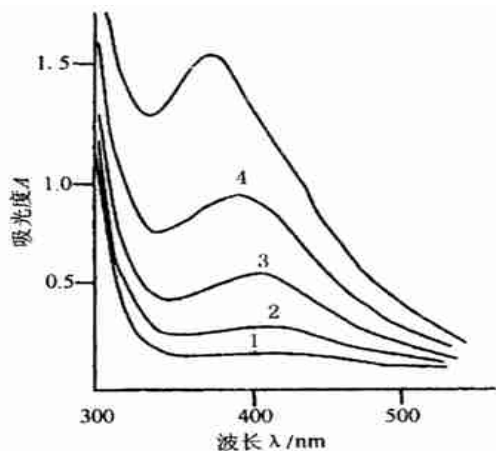
作者简介: 邹节明(1943-),男,教授,博士生导师,长期从事中药制剂创新研究与产品开发工作。

* 通讯作者 E-mail: zljia@gl.gx.cninfo.net

定量的 1.00×10^{-3} mol/L 槲皮素溶液,用二次蒸馏水稀释至 5 mL,摇匀,反应 10 min 用紫外可见分光光度计记录其吸收光谱。采用荧光分光光度计在激发波长 λ_{ex} 等于发射波长 λ_{em} (即 $\lambda_{ex} - \lambda_{em} = \Delta\lambda = 0$) 条件下同步扫描获其共振散射光谱。在 $\lambda_{ex} = \lambda_{em} = 470$ nm 条件下,测量在 470 nm 处共振散射光强度 ($I_{470\text{ nm}}$);不加槲皮素,作空白,测量其共振散射光强度 ($I_{470\text{ nm}})_b$,计算 $\Delta I_{470\text{ nm}} = I_{470\text{ nm}} - (I_{470\text{ nm}})_b$ 在 $\lambda_{ex} = 296$ nm 条件下,扫描发射光谱获得发射(或荧光)光谱

2 结果

2.1 体系的吸收光谱 (AS): BSA 是无色生物大分子,其吸收峰在 296 nm。Qu 和 Mo (VI) 在紫外均有吸收。BSA-Mo (VI) 体系在可见光区的吸收较弱,而 BSA-Mo (VI)-Qu 体系在可见光区的吸收增强,随着 Qu 浓度的增加,吸收峰发生蓝移 (图 1)。这与 BSA-Mo (VI)-Qu 缔合微粒形成有关。



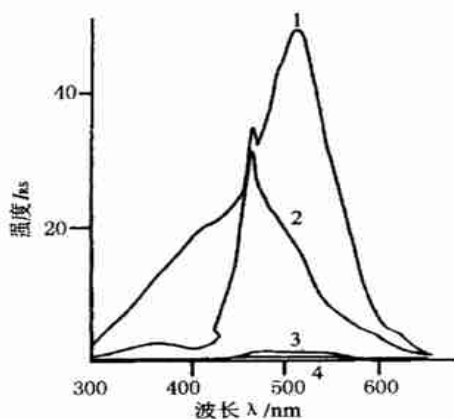
1-2 0×10^{-4} mol/L Mo (VI) - 2 0×10^{-2} mg/mL BSA
2-1-1.5 10^{-6} mol/L Qu 3-1-3 10^{-6} mol/L Qu
4-1-6 10^{-6} mol/L Qu 5-1-1.2 10^{-5} mol/L Qu

图 1 BSA-Mo (VI)-Qu 粒子的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of BSA-Mo (VI)-Qu

2.2 体系的共振散射光谱: 见图 2 BSA 体系、Qu-Mo (VI) 体系在 470 nm 处的共振散射峰非常弱。当 BSA 与 Qu-Mo (VI) 共存时,共振散射光谱大大增强。根据无机纳米微粒共振散射光谱特性可知^[6],该体系中有 $[BSA-Mo (VI)-Qu]_n$ 缔合微粒和固液界面形成。当槲皮素浓度增大到一定程度,其最强共振散射峰 470 nm 变为 525 nm,体系颜色由黄色变为红棕色。这与缔合微粒界面光学特性及光源有关^[9]。

2.3 体系的发射光谱: 当 $\lambda_{ex} = 296$ nm 时,BSA 在 350 nm 处有一较强的荧光峰,而在 296 nm 处的瑞利散射峰较弱 (图 3-1)。Qu 对 BSA 的荧光及 Mo

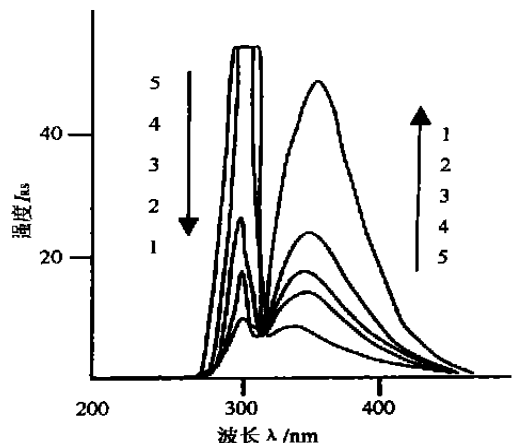


1-8 10^{-5} mol/L Qu-2 0×10^{-4} mg/L Mo (VI)
2-2 0×10^{-4} mol/L Mo (VI)-2 10^{-2} mg/L BSA
3-2-8 10^{-5} mol/L Qu 4-2-8 10^{-4} mol/L Qu

图 2 BSA-Mo (VI)-Qu 的共振散射光谱

Fig. 1 RSS of BSA-Mo (VI)-Qu system

(VI) 对 BSA 的荧光有一定猝灭作用 (图 3-2, 3-3), 但不及 Mo (VI)-Qu 络合物对 BSA 的荧光猝灭强 (图 3-4, 3-4); 且 Qu-BSA 和 Mo (VI)-BSA 体系在 296 nm 处的瑞利散射峰均不及 Mo (VI)-Qu-BSA 体系的强。



1-2 0×10^{-2} mol/mL BSA 2-2 0×10^{-6} mol/L Qu-2 0×10^{-2} mg/mL BSA 3-2 0×10^{-4} mol/L Mo (VI)-2 0×10^{-2} mg/mL BSA 4-1 0×10^{-6} mol/L Qu-2 0×10^{-4} mg/L Mo (VI)-2 0×10^{-2} mg/mL BSA 5-2 0×10^{-5} mol/L Qu-2 0×10^{-4} mg/L Mo (VI)-2 0×10^{-2} mg/mL BSA

图 3 BSA-Mo (VI)-Qu 体系的发射光谱 ($\lambda_{ex} = 296$ nm)

Fig. 3 Emission spectra of BSA-Mo (VI)-Qu ($\lambda_{ex} = 296$ nm)

2.4 测定条件选择: pH 值的影响结果表明,在 pH 4.0~4.4 HAc-NaAc 缓冲溶液中,Qu 体系的共振散射光谱较强且稳定,空白值较小。当 pH 值大于 BSA 的等电点 (pH 7.4) 后,牛血清白蛋白和槲皮素均带负电而不能缔合,导致 RRS 降低。故本实验选

取 pH 4.0 HAc-NaAc缓冲溶液。钼酸钠的用量的影响见图 4 体系的共振散射光谱强度随着钼酸钠浓度增大而增强。本实验选取 2.0×10^{-4} mol/L 钼酸钠。从图 4 中可以看出,随着 BSA 浓度增大,缔合微粒增多,共振散射光强度 $I_{470\text{ nm}}$ 增大。当 BSA 浓度大于 2.0×10^{-2} mg/mL 时,其 $I_{470\text{ nm}}$ 不是随着 BSA 浓度的增大而增大,而是随着 BSA 浓度的增大而降低(图 5),体系的稳定性增强,及体系在 410 nm 处的吸光度 $A_{410\text{ nm}}$ 降低。这与缔合微粒的形成及 BSA 的性质有关。在此实验条件下,BSA 表现出阳离子表面活性剂的特性,BSA 可在缔合微粒表面聚集,增加其亲水性,体系稳定性增加,使得水相-固相界面不能分辨或消失,共振散射降低,而 Mo(VI)-Qu-BSA 有色缔合物分子被大量包裹在微粒体内,故吸光度值降低。本实验选择 2.0×10^{-2} mg/mL BSA

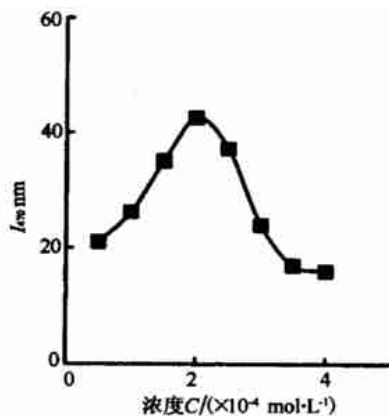


图 4 钼酸钠用量对共振散射光强度的影响
Fig. 4 Effect of Na_2MoO_4 concentration on $I_{470\text{ nm}}$

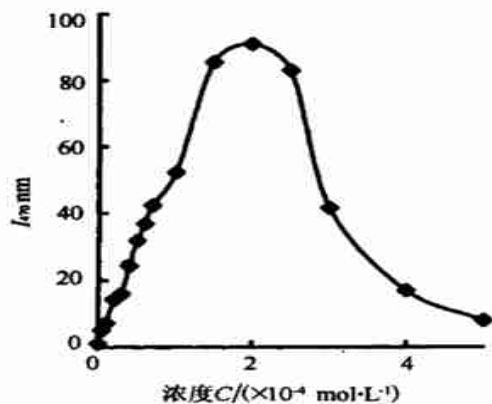


图 5 牛血清白蛋白用量对共振散射光强度的影响
Fig. 5 Effect of BSA concentration on $I_{470\text{ nm}}$

2.5 线性关系考察:在 pH 4.0 HAc-NaAc- 2.0×10^{-4} mol/L 钼酸钠- 2.0×10^{-2} mol/mL BSA 最佳条件下,测定不同浓度的槲皮素的 $\Delta I_{470\text{ nm}}$,以 $\Delta I_{470\text{ nm}}$ 对槲皮素浓度作图并绘制曲线,得线性方程

为 $Y = 94.89X + 2.747$, $r = 0.9901$ 线性范围为 0- 2.4 mg/L 。检测限为 0.3 mg/L 。

2.6 精密度试验:对 1.0, 2.0 mg/L Qu 分别平行测定 5 次,得其共振散射光强度 RSD 分别为 0.8%, 1.2%。

2.7 回收率试验:精密移取舒血宁片(批号为 f)乙醇提取液 1, 1, 2, 3, 3 mL 于 10 mL 比色管中,分别加入槲皮素对照品 0.5, 0.5, 1, 1, 2 mL,按以上方法测定 $I_{470\text{ nm}}$,得其平均回收率为 102.4%, RSD 为 0.56%。

表 1 舒血宁片中总黄酮测定结果 ($n = 5$)

Table 1 Total flavone in Shuxueying Tablet ($n = 5$)

批 号	含量 $I_{470\text{ nm}}^{\text{g}} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	共振散射光谱法	UV 法
F	0.91	0.81
Z	1.02	0.86

3 讨论

在小分子无机纳米微粒体系中,以荧光物质作探针,根据荧光猝灭与否可判断体系中是否有缔合纳米微粒和固液界面形成^[10]。Mo(VI)-Qu-BSA 体系有较多缔合微粒和固液界面形成。在 pH 4.0 HAc-NaAc 缓冲溶液中,BSA 氨基酸残基呈阳离子,槲皮素可以与 Mo(VI)结合形成的阴离子^[11],二者主要通过静电引力形成疏水性的 BSA-Mo(VI)-Qu 缔合分子,该缔合分子间存在较强的疏水作用和分子间作用力和氢键,可自发聚集形成缔合微粒和固液界面,导致散射光增强。BSA-Mo(VI)-Qu 通过分子间作用力和疏水作用力形成缔合微粒或超分子,缔合微粒把 BSA 的残基(213-Trp, 134-Trp)包裹在其体内,隔绝了荧光基团与激发光子的作用,即导致荧光猝灭。

References

- [1] Qian Z Y, Fu J, Hu M. HPLC method for the determination of ginkgo flavone [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1996, 27(4): 253-255.
- [2] Chi J D, He X F, Liu A R. HPLC method for the determination of six flavone contents in ginkgo leaf [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1997, 32(8): 625-628.
- [3] Deng S H, Chen M D. Fluorescence method for the determination of flavone compounds [J]. *Chem World* (化学世界), 1999, 40(7): 375-379.
- [4] Zhang J T, Yao B L, Lu X L. UV spectrophotometric determination of total flavone in the extraction of ginkgo leaf [J]. *J Wuhan Chem Eng Coll* (武汉化工学院学报), 1998(3): 26-28.
- [5] Pastemack R F, Collings P J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation [J]. *Science*, 1995, 269: 935.
- [6] Liu S P, Jiang Z L. Absorption and rayleigh scattering and resonance scattering spectra of $[\text{HgX}_2]_n$ [J]. *Sci Sin (B)*,

2002, 32: 615.

- [7] Huang C Z, Li Y F, Hu X L. Principle of resonance light-scattering and its application to biochemical analysis [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 1998, 26(12): 1508-1514.
- [8] Zou J M, Jiang Z L, Wang L S. Resonance scattering spectral on determination of berberine [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2003, 31(3): 315.
- [9] Jiang Z L, Liu S P. Resonance scattering spectral study of

CdS nanoparticles [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2003, 31(3): 315-317.

- [10] Jiang Z L, Liu S P, Jiang H L. On the fluorescence quenching and resonance scattering behaviour of $(Au_4-RDB)_n$ association nanoparticle system [J]. *Chin J Appl Chem* (应用化学), 2002, 19(12): 1133-1136.
- [11] Li Y. *The Life and Health* (生命与健康) [M]. Beijing: Science Press, 1998.

灯盏花素缓释微丸制备工艺与处方优化的研究

陈大为, 张彦青, 邹艳霜, 李淑斌, 赵秀丽*
(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 考察灯盏花素缓释微丸的制备工艺和最优处方, 并对释药机制进行探讨。方法 利用挤出滚圆法制备骨架型微丸, 采用单因素考察和正交设计筛选最优处方, 通过方程拟合探讨释药机制。结果 所得微丸的制备工艺简单, 微丸大小均匀, 载药量大且药物含量均匀, 能达到缓释 12 h 的试验设计要求; 释药机制以药物扩散为主, 兼有骨架溶蚀。结论 利用挤出滚圆法制备灯盏花素缓释微丸方法简单, 适于工业化生产。

关键词: 灯盏花素; 缓释微丸; 制备工艺; 处方优化; 挤出滚圆法; 释药机制

中图分类号: R286.02; R283.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-0990-04

Preparation and formulation optimization of Breviscapin Sustained-release Pellets

CHEN Da-wei, ZHANG Yan-qing, ZOU Yan-shuang, LI Shu-bin, ZHAO Xiu-li
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Object To investigate the preparation technique and optimal formulation of Breviscapin Sustained-release Pellets (BSP) and the release mechanism of breviscapin from the pellets. **Methods** BSP was prepared by extrusion-spheronization method. Based on the studies of influential factors, optimal formulation modified to release drug over 12 h was obtained by the orthogonal design. And release mechanism of breviscapin from BSP was established by equation fitting. **Results** Prepared BSP has such advantages as simple technique, uniformity in diameters and high loading with even contents. They can release drug for 12 h. And the release of breviscapin could be mainly controlled by diffusion associated with slight erosion. **Conclusion** Extrusion-spheronization method is simple for the preparation of BSP, and useful for the large-scale production.

Key words breviscapin; sustained-release pellet; preparation technology; formulation optimization; extrusion-spheronization method; release mechanism

灯盏花素是由灯盏细辛中提取的黄酮类成分, 主要为灯盏花甲素和灯盏花乙素, 其中灯盏花乙素含量占 95% 以上。临床证明, 灯盏花素可以增加脑血流量、降低脑血管阻力、提高血脑屏障的通透性以及对抗由二磷酸腺苷引起的血小板凝集作用等^[1]。

缓释微丸能增加药物与胃肠道的接触面积, 提高生物利用度; 受消化道输送食物节律的影响小, 在体内的吸收具有良好的重现性; 且可减少给药次数, 提高病人顺应性, 尤其是那些需要长期服药的心脑

血管病人。因此制备灯盏花素缓释微丸具有重要的治疗意义和广阔的市场前景。

挤出滚圆技术是目前国际上较为广泛应用的制丸方法之一, 生产效率高, 劳动强度小, 能适合工业化生产的需要^[2]。本实验以挤出滚圆法制备了以乙基纤维素和硬脂酸等疏水性材料为骨架的缓释微丸。在单因素考察的基础上, 采用正交试验优化处方, 并对微丸的体外释放动力学及其释药机制进行了探讨。

* 收稿日期: 2003-03-25

作者简介: 陈大为 (1959-), 男, 辽宁省海城市人, 沈阳药科大学药学院院长, 药剂学教授, 博士生导师, 主要从事口服固体新剂型的研究
Tel (024) 23843771-3687 E-mail: cdw2002yd@sina.com