

2.4.3 酶-Sevag 法:精确配制 0.02 g/mL 的多糖溶液,酶法水解后高温灭活,离心,上清液再采用 Sevag 法,重复多次,直到无变性蛋白产生为止。结果见图 2。

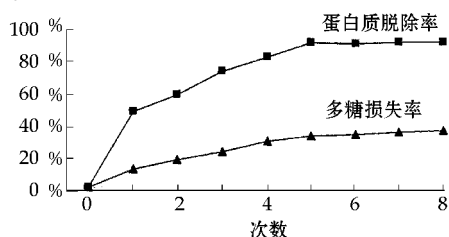


图 2 酶法-Sevag 法除蛋白

Fig 2 Using enzyme-Sevag method to remove protein

经过 5 次萃取后蛋白的脱除率与多糖损失率分别为 84.50%、29.35%,随着萃取次数的增加两相指标变化不大,蛋白质几乎全部除去。

3 讨论

3 种除蛋白方法都能在一定程度上脱除金银花多糖中的蛋白质。除蛋白目的在于为金银花多糖分离纯化与理化性质研究提供实验依据,故在兼顾多糖损失的同时尽可能除去其中的蛋白质。从表 4 获知,采用 Sevag 法脱蛋白,蛋白质的脱除率最高,但同时多糖损失率也最高;采用酶法脱蛋白,蛋白的脱除率最低;酶-Sevag 法脱蛋白,蛋白质的脱除率与 Sevag 法接近,但多糖损失率仅为 Sevag 法的 1/2。

酶-Sevag 法是利用木瓜蛋白酶来酶解蛋白,使其成为相对分子质量较小多肽或者更为彻底的氨基

表 4 3 种脱蛋白方法结果比较

Table 4 Comparison of three kinds of method for protein removal

除蛋白方法	多糖损失率/ %	蛋白质脱除率/ %
Sevag 法	56.57	85.72
酶法	31.22	73.28
酶-Sevag 法	29.35	84.50

酸,再进行醇沉,则大分子的多糖绝大多数得到沉淀,而相对分子质量较小的多肽和氨基酸大部分保留在溶液中,再结合 Sevag 法经过 5 次萃取后多糖中蛋白质的脱除率达到 84.50%,由于萃取次数与单纯的 Sevag 法相比大大减少,多糖损失率仅为 29.35%,进而证明酶-Sevag 法是金银花多糖脱蛋白可行的方法。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] Kwak W J, Hart C K, Chang H W, et al. Loniceroside C, antiinflammatory saponin from *Lonicera japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51(3): 333-335.
- [3] 毕跃峰,田野,裴姗姗,等. 金银花中裂环环醚萜苷类化学成分研究[J]. *中草药*, 2008, 39(1): 18-21.
- [4] 王琦. 金银花的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2008.
- [5] 邓庆华. 用正交试验法优化金银花多糖提取工艺[D]. 长春:东北师范大学, 2008.
- [6] 司梁宏,谈恒山. 苯酚-硫酸显色法测定枸杞益肾胶囊中多糖含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(6): 836-837.
- [7] 张维杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1987.
- [8] 李建武,陈丽荣,袁明秀. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社, 1994.
- [9] 史德芳,韩淑琴. 仙人掌多糖提取过程中三种脱蛋白方法的比较研究[J]. *现代食品科学*, 2006, 22(4): 93-95.

降脂灵分散片溶出度的研究

楼超群¹,戴德雄²,朱莹^{2*}

(1. 湖州市安吉县中医院,浙江 湖州 313300; 2. 浙江维康药业有限公司,浙江 丽水 323000)

摘要:目的 建立降脂灵分散片溶出度的测定方法。方法 以水作为溶出介质,采用桨法,100 r/min,以高效液相色谱法测定累积溶出率,绘制降脂灵分散片的累积溶出曲线,并进行样品的溶出度测定。结果 二苯乙烯苷在 0.057 2~0.572 μg 时进样量与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$);对 3 批降脂灵分散片进行溶出度测定,二苯乙烯苷 15 min 的溶出量均达 70%以上。结论 所用方法具有灵敏、准确、快速的优点,适用于降脂灵分散片的质量控制。

关键词:降脂灵分散片;二苯乙烯苷;溶出度;高效液相色谱

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2010)04-0586-02

降脂灵分散片处方来源于部颁标准降脂灵片(WS3-B-3260-98),由何首乌、枸杞子、黄精、山楂、

决明子 5 味中药组成,以何首乌为主药,可用于肝肾阴虚,头晕,目昏,须发早白,高血脂等症。该制剂中

主药何首乌中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷(简称为二苯乙烯苷)为活性成分,因此本实验对降脂灵分散片的溶出度测定方法进行了考察,以便控制质量。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪;ZRS-8G 智能溶出仪。降脂灵分散片(批号 20081201,20081202,20081203),由浙江维康药业有限公司提供。二苯乙烯苷对照品(批号 110844-200404)由中国药品生物制品检定所提供。乙腈为色谱纯,水为双蒸水(自制)。其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱;乙腈-水(18:82) 为流动相;检测波长:320 nm;体积流量:1.0 mL/min;柱温:35℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备:取二苯乙烯苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 20 mg/mL 的溶液,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备:取本品 6 片,以脱气的水 100 mL 为溶出介质,温度控制在 37 ± 0.5℃,转速 100 r/min,供试品进入释放池瞬间开始计时,在规定取样点吸取溶液适量,立即滤过,续滤液高速离心后,取上清液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备:处方比例称取除何首乌以外的材料制成阴性样品,按供试品溶液的制备方法制备空白对照溶液。

2.3 专属性考察:按上述色谱条件分别对样品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液进行分析,结果无干扰。

2.4 线性关系的考察:分别精密吸取二苯乙烯苷对照品溶液 2、6、10、14、20 μL 注入高效液相色谱仪,测定峰面积。以峰面积值为纵坐标,进样量为横坐标作标准曲线,得回归方程为 $Y = 2 \times 10^6 X - 5477.2$, $r = 0.9994$ 。结果表明二苯乙烯苷进样量在 0.057 2~0.572 μg 与峰面积呈现良好的线性关系。

2.5 精密度试验:取二苯乙烯苷对照品溶液,连续进样 6 次,测定二苯乙烯苷峰面积,计算得其 RSD 为 0.954%。

2.6 重现性试验:平行取样品(批号 20081202) 6 份,进行测定,计算二苯乙烯苷的质量分数,结果 RSD 为 1.91%。

2.7 稳定性试验:分别将供试品溶液于室温下放置 0、2、4、6、8 h 后,测定,计算得二苯乙烯苷峰面积的 RSD 为 1.12%。表明样品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.8 回收率试验:取本品(批 20081202) 10 片,精密

称重,研细,取约 0.25 g 共 6 份,精密称定,分别加入 0.068 7 mg/mL 二苯乙烯苷对照品溶液 8.0、10.0、12.0 mL,依法制备供试品溶液,测定,计算,结果平均回收率 98.56%,RSD 为 0.856%。

2.9 溶出度的测定

2.9.1 溶出介质及体积的选择^[1]:因二苯乙烯苷量有限,为保证检出量在限度范围内,选择《中国药典》2005 年版溶出度第三法即小杯法(溶液体积为 100 mL,桨板法,转速为 100 r/min),介质为水。

2.9.2 溶出度测定方法的确定:取本品 6 片,以脱气的水 100 mL 为溶出介质,温度控制在 37 ± 0.5℃,转速 100 r/min,供试品进入释放池瞬间开始计时,分别在 0、3、5、8、15、20、30、45 min 时取样 2 mL(同时补充等体积相同温度的溶出介质),用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液作为供试品溶液。取供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,测定二苯乙烯苷,计算相对累积溶出率。

2.9.3 溶出曲线的制备:每批 6 片,按照以上条件操作,分别在 0、3、5、10、15、20、30、45 min 时取样 2 mL(同时补充等体积相同温度的溶出介质),立即滤过,续滤液高速离心后,取上清液进样,记录色谱图,测定二苯乙烯苷相对累积溶出率。结果表明,降脂灵分散片溶出曲线基本一致,二苯乙烯苷溶出率在 15 min 后均大于 70%,30 min 后基本溶出(平均大于 95%)。结果见图 1。

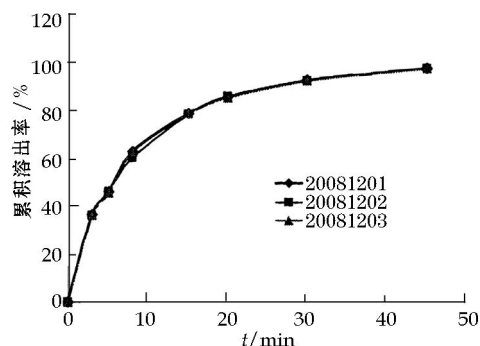


图 1 降脂灵分散片的溶出曲线

Fig. 1 Dissolution curve of Jiangzhiling dispersible tablets

2.10 与市售降脂灵片溶出度的比较:参照《中国药典》2005 年版溶出度第三法即小杯法(溶液体积为 100 mL,桨板法,溶出介质为水,转速为 100 r/min),分别于 1、3、5、10、15、30、45 min 取 2 mL 的溶液,并立即补 2 mL 的原溶剂,过滤,即得。分别进样 20 μL,记录色谱图,结果见图 2。结果表明,降脂灵分散片中二苯乙烯苷的溶出远远快于市售降脂灵片。

(下转第 626 页)

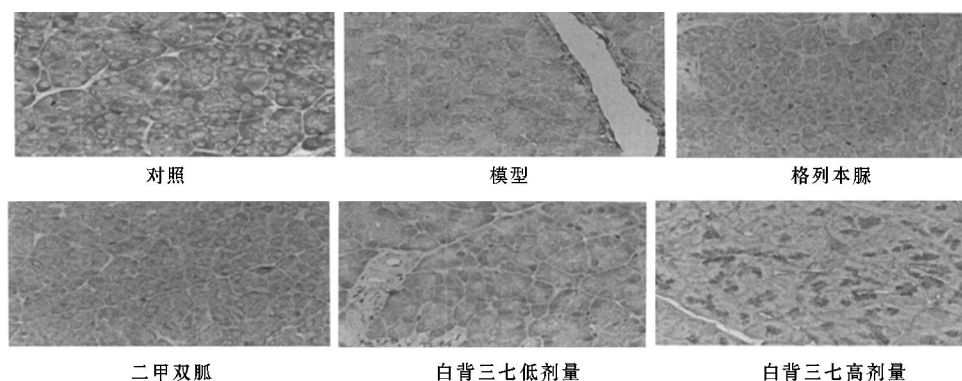


图 2 T2DM 大鼠胰岛免疫组化染色结果

Fig. 2 Immunohistochemistry results of langerhans islands in T2DM rats

力下降,故糖尿病时机体氧化应激水平明显升高,氧自由基产生增多并与 NO 结合,形成有害的 ONOO⁻,引起血管内皮细胞等多方面损害^[10]。成细华等^[11]针对糖代谢及抗氧化应激方面,研究了左归复方对转基因 2 型糖尿病小鼠的干预治疗作用。根据实验结果推测,白背三七水提取物对 T2DM 的作用机制可能与其能改善糖和脂质代谢,增强机体对活性氧的清除能力,减轻氧自由基对胰岛 β 细胞损害有关。胰岛 β 细胞 HE 染色和免疫组化形态学观察的结果也表明,白背三七水提取物组的 β 细胞和胞质内分泌颗粒相对较多,着色较深,且在外分泌部腺泡细胞间可见到单个免疫反应阳性细胞,提示白背三七水提取物除了对胰岛 β 细胞有一定的保护作用,还可能促使胰岛 β 细胞的修复与增生。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典 [M]. 上册. 上海:上海人民出版社, 1977.
- [2] 冼寒梅, 周蓉, 刘雯, 等. 白子菜不同药用部位挥发油的含量测定及其气相色谱-质谱联用分析 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 858-859.
- [3] 胡勇, 李维林, 林厚文, 等. 白背三七地上部分降血糖作

用研究 [J]. 西南林学院学报, 2007, 27(1): 55-58.

- [4] 王津江, 陈磊, 宋洪涛, 等. 白背三七总黄酮的提取工艺研究 [J]. 中国药师, 2009, 12(2): 146-149.
- [5] 洪丽莉, 许冠荪, 申国明, 等. SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(6): 379-381.
- [6] 周迎生, 高妍, 李斌, 等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3): 154-159.
- [7] Talpur N, Echard B, Ingram C, et al. Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study [J]. Diabetes Obes Metab, 2005, 7(2): 193-199.
- [8] Antonio C, Roberta A, Roberto D R, et al. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients [J]. Circulation, 2005, 111: 2518-2524.
- [9] Onozato M I, Tojo A, Goto A, et al. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effect of ACEI and ARB [J]. Kidney Int, 2002, 61(1): 186-195.
- [10] Meigs J B, Hu F B, Rifai N, et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus [J]. JAMA, 2004, 291(16): 1978-1984.
- [11] 成细华, 喻荣, 吴勇军, 等. 左归复方对 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠糖代谢及抗氧化应激的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1675-1679.

(上接第 587 页)

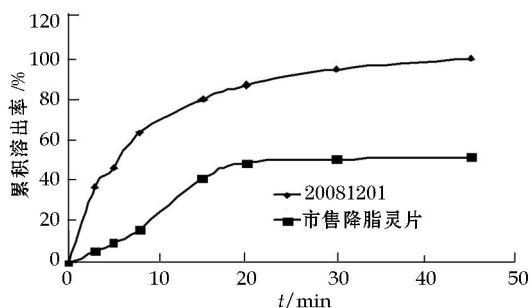


图 2 样品和降脂灵片的溶出度比较

Fig. 2 Comparison of dissolution between sample and Jiangzhiling Tablets

3 讨论

降脂灵分散片以制何首乌中二苯乙炔苷为有效成分。分散片的特征是遇水可迅速崩解形成均匀的混悬液,综合了片剂和液体制剂的优点,大剂量服用方便、吸收快、生物利用度高。但崩解并不等于溶出,所以对降脂灵分散片的溶出度进行了研究,并将其加入质量标准中,从而更好地控制降脂灵分散片的溶出情况。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 二部. 附录 C73-74. 2005.