doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2019.11.07

玉屏风散与超微粉中毛蕊异黄酮葡萄糖苷体外溶出率的研究

马　霞[1,3],周延州[1],郭振环[1],赵　丽[1],刘永录[1*],王　林[2],张国祖[3]

(1.河南牧业经济学院,郑州 450046;2.河南省康星生物科技有限公司,河南焦作 454950;
3.河南省康星药业股份有限公司,郑州 451464)

[收稿日期] 2019 - 07 - 06　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 - 1280 (2019) 11 - 0038 - 05　[中图分类号] S859.3

[摘　要]　建立了玉屏风超微粉中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱检测方法,采用浆法测定了玉屏风超微粉和玉屏风散剂在人工胃液中的溶出率,绘制累积溶出率曲线。结果表明,玉屏风超微粉和散剂散剂的累积溶出率在 5 min 时迅速达到 73% 以上。超微粉和散剂的最快溶出时间段分别为 0 ~ 2 h 和 0 ~ 6 h,最后都在 16 h 达到溶出平衡,最高累积溶出率分别为 80.36% 和 77.51%。玉屏风超微粉中毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶出速度快,达峰时间短,峰浓度高于散剂。

[关键词]　玉屏风超微粉;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;含量;检测方法;溶出率

基金项目: 河南牧业经济学院"中兽药生药学"重点培育学科项目(HUAHF4100003);河南牧业经济学院科研创新团队项目(2018KYTD18)

作者简介: 马　霞,博士,副教授,从事中兽药制剂及药理学方向研究。

通讯作者: 刘永录。E - mail:yonglu2005@163.com

[3]　中国药科大学.中药辞海(第一卷)[M].北京:中国医药科技出版社,1993:1365.
China Pharmaceutical University. Traditional Chinese medicine (Volume I)[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1993:1365.

[4]　孙文基.天然药物成分提取分离与制备[M].北京:中国医药科技出版社,1999:183.
Sun W J. Separation and preparation of natural drug ingredients [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 1999:183.

[5]　王　珊,黄　怡,曹　蕾,等. 甘草中甘草酸的提取及测定方法简述[J]. 化工科技,2010,18(1):76 - 80.
Wang shan, Huang yi, Cao lei. Extraction and Determination of Glycyrrhizic Acid in Glycyrrhiza uralensis [J]. Science & Technology In Chemical Industry, 2010,18(1):76 - 80.

[6]　徐树云,王海宁. HPLC 测定甘草提取物中甘草酸的含量[J]. 安徽农业科学,2008,36(24):10297 - 10300.
Xu shu yun, Wang hai ning. Determination of glycyrrhizic acid in liquorice extract by HPLC [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2008, 36(24):10297 - 10300.

[7]　中国兽药典委员会.《中华人民共和国兽药典》2015 年版二部[S].
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Peopie's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia volume Ⅱ 2015 edition[S].

(编　辑:侯向辉)

Study on the Dissolution Rate of Hairy Isoflavone Glucoside in Yupingfeng San and Ultra – micropowder

MA Xia[1,3], ZHOU Yan – zhou[1], GUO Zhen – huan[1], ZHAO Li[1], LIU Yong – lu[1*], WANG Lin[2], ZHANG Guo – zu[3]

(1. *Henan University of Animal Husbandry and Economy*, *Zhengzhou* 450046, *China*;
2. *Henan Kangxing Biotechnological Co.*, *Ltd*, *Jiaozuo*, *Henan* 454950, *China*;
3. *Henan Province Health Star Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Zhengzhou* 451464, *China*)

Corresponding author: *LIU Yong – lu*, *E – mail*: *yonglu*2005@163. *com*

Abstract: This research establish the determination method of hairy isoflavone glucoside content in Yupingfeng ultra – micropowder by HPLC. The dissolution rates of Yupingfeng ultra – micropowder and common powder were detected by pulp method, and the curve of cumulative dissolution rate was charted. The results showed that the cumulative dissolution rate of Yupingfeng ultra – micropowder and powder were over 73% in 5 min. The fastest dissolution time were 0~2 h and 0~6 h, and they both achieve dissolution equilibrium in 16 h, the most cumulative dissolution rate were 80.36% and 77.51%. The dissolution rate of calycosin – 7 – glucoside in Yupingfeng ultra – micropowder was quicker, it had shorter peak time, and the peak concentration was higher than powder.

Key words: Yupingfeng ultra – micropowde; hairy isoflavone glucoside; content; determination; dissolution rate

玉屏风散是元代医学家危亦林所创的名方,主要由黄芪、白术(炒)、防风以 3∶1∶1 的比例制成,该药具有益气固表,滋阴清热的功效,兽医临床上常用于提高畜禽生长性能,增强机体非特异性免疫力[1-3]。超微粉碎可以将植物的细胞壁破碎,增加有效成分溶出,提高生物利用度,从而降低用药成本,达到最好的用药效果[4-5]。玉屏风超微粉就是将玉屏风散通过超微粉碎技术得到的新剂型。

为考察玉屏风散经过超微粉碎后有效成分的溶出情况,实验以黄芪中有效成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷为标示成分进行研究。首先建立玉屏风超微粉中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量检测方法,为达到模拟动物机体胃环境的目的,试验选用人工胃液为溶出介质,采用浆法测定玉屏风超微粉和散剂中标示成分的溶出率,从而为玉屏风超微粉的临床用药提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　仪器和试剂

高效液相色谱仪(型号 P230,大连伊力特公司,配制紫外检测器);药物溶出仪(型号 RCZ – 1A,上海黄海药检仪器有限公司);万分之一电子天平(型号 AUW220D1,岛津国际贸易有限公司);超声波清洗器(型号 KQ5200B,昆山市超声仪器有限公司)

毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(含量 97.9% 中国食品药品检定研究院,批号 11920 – 201102);玉屏风散(批号 20180403)、玉屏风超微粉(批号为 20180403 的玉屏风散超微粉碎,按企业内控标准采用激光粒度分析仪检测小于 48 μm 的粒度百分比为 95%)均由河南省康星药业股份有限公司研发中心制备提供;纯化水(Minipore 纯水器制备),甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾、盐酸等为分析纯,均购自天津市四友精细化学品有限公司。

1.2　HPLC 检测毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量

1.2.1　色谱条件　色谱柱:Hypersil ODS2 C18 (4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈 – 0.2% 甲酸(35∶65);柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min,进样量 10 μL,检测波长为 260 nm。理论板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计算应不低于 3000。

1.2.2　对照品溶液的配制[6]　精密称取毛蕊异黄

酮葡萄糖苷对照品适量,放入容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,得到浓度为 50 μg/mL 的对照品溶液。

1.2.3　标准曲线的制备　分别吸取 2、5、10、15、20 μL对照品溶液注入液相色谱仪,记录峰面积,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得到标准曲线。

1.2.4　样品的制备及检测[6]　分别取玉屏风超微粉和玉屏风散各 2 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加甲醇 100 mL,称定重量,加热回流 4 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密取续滤液 25 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜过滤,注入高效液相色谱仪,计算玉屏风超微粉和玉屏风散中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量。

1.2.5　专属性试验　依据处方中的比例,制备缺黄芪的阴性样品,按样品的制备方法制备阴性溶液,注入高效液相色谱仪,与对照品溶液、样品溶液图谱进行对比,考察方法的专属性。

1.2.6　精密度和重复性的考察　分别精密吸取对照品 10 μL,连续进样 6 次,记录峰面积,计算相对标准偏差(*RSD*),考察系统精密度。同一批次样品重复进样 6 次,记录峰面积,计算相对标准偏差(*RSD*),考察方法重复性。

1.3　毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶出率测定

1.3.1　人工胃液的配制[7]　取稀盐酸 16.4 mL,加水 800 mL 与胃蛋白酶 10 g,摇匀后,加水稀释至 1000 mL,即得,检测 pH 值为 1.8。

1.3.2　桨法测药物溶出度　调整溶出仪参数,使溶出仪桨叶底部距溶出杯的内底部 25 mm,加入人工胃液 500 mL,开启温度控制。待人工胃液温度恒定到 37℃时,分别取玉屏风超微粉和玉屏风散各 15 g 加入溶出仪中,以 50 r/min 转速启动溶出仪,并开始计时。于加入药物后 0.083、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、16、24、30 h,分别取样品溶液 1 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜过滤,注入高效液相色谱仪检测。每次取样后补充 1 mL 同温度人工胃液至溶出仪中。计算各时间点毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶出的总量,以总含量为参比,计算各时间点的累积溶出百分率,绘制溶出曲线。

2　结果与分析

2.1　毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量检测方法的建立　毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品、不含黄芪阴性样品、玉屏风超微粉的液相色谱图分别见图 1 ~ 图 3。从色谱图看出,毛蕊异黄酮葡萄糖苷出峰时间在约 10 min 位置,阴性样品无杂质峰干扰,分离度良好,说明该方法特异性较好。标准曲线方程为 $y = 1023.3x + 11.317$,线性系数 r 为 0.9996,说明毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 0.1 ~ 1 μg 含量范围内线性关系良好。精密度试验的 *RSD* 为 0.86%,说明该方法精密度良好。重复性试验的 *RSD* 为 1.57%,说明方法的重复性较好,满足含量测定要求。

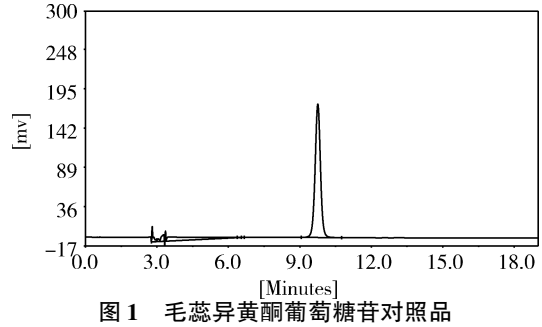

图 1　毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品

Fig 1　The reference substance of Hairy Isoflavone Glucoside

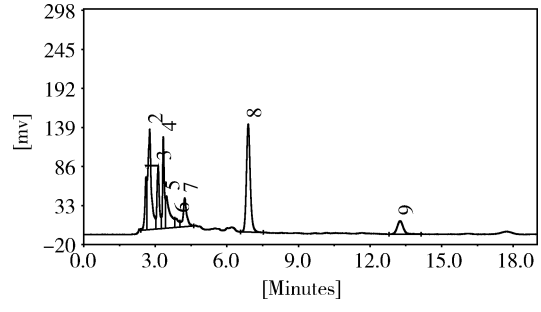

图 2　不含黄芪的阴性样品

Fig 2　Negative samples without *Astragalus*

2.2　玉屏风超微粉和玉屏风散含量检测结果　经高效液相色谱仪检测,同批次的玉屏风超微粉和玉屏风散的含量分别是 0.256 和 0.248 mg/g,超微粉中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量比散剂含量提高 3%,说明,药物经超微粉碎后,有效成分溶出更多。

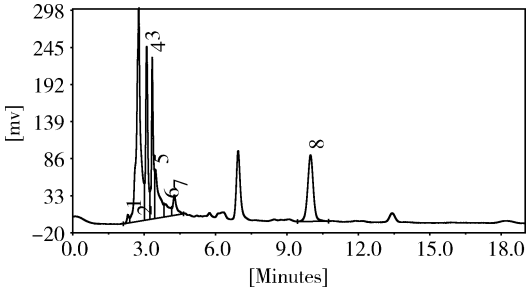

图 3　玉屏风超微粉样品

Fig 3　The sample of Yupingfeng Utra – micropowder

2.3　玉屏风超微粉和玉屏风散溶出率比较　分别检测各时间点人工胃液中药物浓度,计算累积溶出率,结果见图 4。图 4 可看出,将药物加入溶出仪中后,超微粉和散剂的毛蕊异黄酮葡萄糖苷累积溶出率在 5 min 时差别不明显散剂。超微粉的最快溶出时间段在 0 ~ 2 h,溶出速度明显高于散剂,2 h 后累积溶出率缓慢增加,最后在 16 h 达到平衡,累积溶出率为 80.36%。散剂的最快溶出时间段在 0 ~ 6 h,6 h 后累积溶出率缓慢增加,最后也在 16 h 达到平衡,累积溶出率为 77.51%。

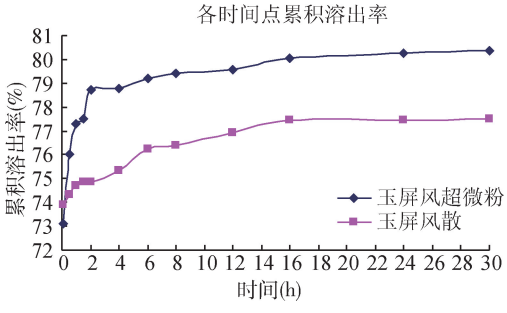

图 4　两种剂型的累积溶出率曲线图

Fig 4　The cumulative dissolution rate curve graph of two dosage forms

3　讨论与结论

3.1　检测方法的建立　试验建立了玉屏风散中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱检测方法,其色谱条件为流动相:乙腈 – 0.2% 甲酸(35∶65),避开了中华人民共和国兽药典(二部)[6] 中的梯度洗脱方法,简单方便,操作性强。而且该方法特异性较好,无黄芪阴性样品无杂质峰干扰,样品峰分离度良好,毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 0.1 ~ 1 μg 含量范围内线性关系良好。方法的精密度、重复性较好,满足含量测定要求,可用于玉屏风散或玉屏风超微粉的质量控制或相关含量研究。

3.2　玉屏风超微粉和玉屏风散含量检测　玉屏风超微粉与散剂相比,毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量提高了 3%,可能是细胞壁在粉碎过程中被破坏,有效成分无需穿透细胞壁即可释放,释放速度和释放量得到提高,能维持药材原有的药效。

3.3　玉屏风超微粉和玉屏风散溶出率检测　目前已有不少关于超微粉药物溶出率的研究报道,但大多都是选用水为溶出介质进行试验[8-9]。本实验选用人工胃液作为介质,更加接近机体真实状态,更能反应药物真实溶出情况。试验结果发现玉屏风超微粉和玉屏风散中毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶出率在 5 min 均能达到 73%,说明超微粉和散剂在人工胃液中溶出均较好,利于提高生物利用度,但超微粉的溶出率在 5 min 时并不明显高于散剂,可能是因为药材经超微粉碎后,颗粒在一定程度上比表面积增大,导致分散性和流动性变差,从而在溶剂中更容易聚集,造成药粉与溶媒接触的比表面积下降,不利于成分的溶出。

经超微粉碎后,粉体粒径变小、分布均匀、比表面积显著增大、孔隙率增加、溶解性提高、亲和力上升,有利于其药效成分溶出[10]。试验也发现玉屏风超微粉在 2 h 时毛蕊异黄酮葡萄糖苷累积溶出率接近平衡,散剂则在 6 h 累积溶出率接近平衡,且超微粉累积溶出率也高于散剂,说明药物进入机体后超微粉比散剂溶出速率高,达峰时间缩短。

散剂散剂中药材粉碎成超微粉后,大多数有效成分如多糖类、皂苷类和黄酮类会溶出速率增加[10],也有少部分有效成分如生物碱等会溶出减慢,这与溶出介质,活性成分理化性质,溶解度等紧密相关[12]。因此超微粉应用时,应根据具体用药情况,制定合理生产和应用方案,才能更好发挥中兽药超微粉的优势。

参考文献：

[1] 黄 熠. 玉屏风散和抗菌肽对肉鸡生产性能的影响[D]. 广州：华南农业大学硕士学位论文. 2016.
Huang Y. Effects of Yupingsan and antibacterial peptide on the performance of broilers[D]. Guangzhou：Master's Degree Thesis of South China Agricultural University. 2016.

[2] 张倩倩,刘天强,李彤彤,等. 玉屏风散对鱼类非特异性免疫和免疫相关基因表达的影响[J]. 水生生物学报. 2015,(06)：1076－1084.
Zhang Q Q, Li T Q, Li T T, *et al*. The effects of jade screen power on the non－specific immune respone and the expression of the relat[J]. Acta Hydrobiologica Sinica. 2015,(06)：1076－1084.

[3] 车淑芬,廖智慧,吕昌洪,等. 玉屏风散对奶牛产奶量及体细胞数的影响[J]. 中国动物保健. 2014,(11)：14－15.
Che S F, Liao Z H, Lv C H, *et al*. The influence on milk production of cow and number of somatic cells of Yupingfeng Powder[J]. China Animal Health. 2014,(11)：14－15.

[4] 金尔光,陈 洁,何 斌,等. 中草药超微粉在畜禽生产中的应用研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(9)：60－64.
Jin E G, Chen J, He J, *et al*. Research advances in herbal superfine powder on animal production[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(9)：60－64.

[5] 印遇龙,孔祥峰,尹富贵, 等. 中草药超微粉对断奶仔猪氨基酸消化吸收的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2008,(20)：307－311.
Yin Y L, Kong X F, Yin F G, *et al*. Effect of Chinese herbal ultra－fine powder as a dietary additive on digestion and absorption of Amin[J]. Natural Product Research and Development, 2008,(20)：307－311.

[6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(二部),2015 年版[S].
National Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia(2 part). 2015.

[7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(一部),2015 年版[S].
National Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia(1 part). 2015.

[8] 梁秀清, 沈 晓, 李子鸿, 等. 山楂消脂胶囊超微粉与细粉的体外溶出度比较[J]. 今日药学,2018,(1)：43－46.
Liang X Q, Shen X, Li Z H, *et al*. Comparison of *in vitro* dissolution of rhein from ultrafine powder and fine powder of shanzhaxiaozhi[J]. Pharmacy Today,2018,(1)：43－46.

[9] 谢斯莹. 天麻超微粉体外溶出度比较[J]. 信息化建设, 2015,(6)：78－79.
Xie S X. Comparison of dissolution rate of Gastrodia elata ultrafine powder in vitro[J]. Information Construction, 2015,(6)：78－79.

[10] 覃 军, 陈艳红, 罗明超, 等. 浙贝母超微粉、粗粉和饮片中 3 种生物碱体外溶出度的比较[J]. 中成药, 2017,39(06),1232－1235.
Qin J, Chen Y H, Luo M C, *et al*. Comparison of *in vitro* dissolution rates of three constituents in superfine powder, coarse powder[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2017,39(06),1232－1235.

[11] 张国祖, 王 林, 于 瑞, 等. 不同条件对扶正解毒散及其超微粉有效成分溶出影响的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013,(6)：148－150.
Zhang G Z, Wang L, Yu R, *et al*. Effects of different conditions on the dissolution of effective components in fuzheng jiedu powder and Its ultrafine powder[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2013,(6)：148－150.

[12] 蔡 璐, 梁少瑜, 戴开金, 等. 人参超微粉与细粉的体外溶出度比较[J]. 南方医科大学学报, 2013 (10)：1547－1550.
Cai L, Liang S X, Dai K J, *et al*. Comparison of dissolution properties between Ginseng Micropowder and common powder[J]. Journal of Southern Medical University, 2013 (10)：1547－1550.

(编 辑:陈 希)