

- 441-443.
- [3] Gao X L, Sun D J, Cheng L Y, *et al.* Study on phase distribution and release *in vitro* of harmine emulsion for intravenous injection [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 22 (2): 111-115.
- [4] Sun D J, Wang C H, Kou Y H. A research on pulse-released capsule of harmine hydrochloride [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2003, 26 (2): 103-105.
- [5] Li Y, Sun D J, Yang Y X, *et al.* Study of harmine hydrochloride gelatin microspheres for hepatic arterial embolization on preparation [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2003, 26 (2): 109-112.
- [6] Lala S, Pramanick S, Mukhopadhyay S, *et al.* Harmine: evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery systems [J]. *Drug Target*, 2004, 12 (3): 165-175.
- [7] Mayer L D, Madden T D, Bally M B, *et al.* pH Gradient-mediated drug entrapment in liposomes [A]. Gregoriadis G. *Liposome Technology* [M]. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- [8] *Merk Index* [S]. 13 th. 2001.
- [9] Deng Y H, Wang S N, Wu Q, *et al.* Preparation of berberine hydrochloride liposomes by active loading method [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2004, 39 (1): 40-42.

知母微粉的溶出及活性研究

张陆军¹, 王伟¹, 邢东明¹, 盖国胜², 苏慧¹, 何希辉³, 杜力军¹

(1. 清华大学 生物科学与技术系, 北京 100084; 2. 清华大学 材料系, 北京 100084;
3. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要:目的 观察知母微粉体外成分溶出以及体内活性,对微细化工艺在中药中的应用进行评价。方法 采用 HPLC 法定量芒果苷,比较知母微粉和知母粉中芒果苷溶出速度及不同时间点溶出百分率;采用小鼠悬尾和强迫游泳试验,测定最大耐受量,观察知母微粉与知母提取物体内活性和安全性。结果 体外溶出时,知母微粉中芒果苷的溶出速度较知母粉明显加快,在不同时间点芒果苷的溶出百分率亦有所提高;以相同治疗剂量给药时,知母微粉与知母提取物表现出相当的作用,知母微粉最大给药剂量为 20 g/kg。结论 知母制成微粉后能在一定程度上改善体外成分的溶出和体内活性。

关键词:知母;微细化工艺;溶出度

中图分类号:R286.02; R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)05-0676-04

Dissolution and effect of *Anemarrhena asphodeloides* micropowder prepared by super fine crushing technique

ZHANG Lu-jun¹, WANG Wei¹, XING Dong-ming¹, GAI Guo-sheng²,
SU Hui¹, HE Xi-hui³, DU Li-jun¹

(1. Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Department of Materials, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: Objective To investigate the ingredients dissolution and bioactivities of *Anemarrhena asphodeloides* micropowder prepared by super fine crushing technique. **Methods** The dissolution of the marker ingredient—mangiferin of the micropowder was compared with that of the normally processed powder by HPLC for mangiferin; the anti-depression effect of the micropowder and *A. asphodeloides* extract was investigated in tail suspension test and forced-swimming test. Meanwhile, toxicities were evaluated by the determination of the maximum tolerated dose (MTD). **Results** The dissolution velocity of mangiferin in the micropowder was more obviously improved than that in the common powder and the dissolution percentages at different intervals had been increased slightly. The micropowder showed as much anti-depression effect as that of the *A. asphodeloides* extract when administered at the same dosage, while they both resulted in relatively obvious toxicity reactions (MTD is 20 kg/g). **Conclusion** Super fine crushing technique can help to improve the ingredients dissolution rate and bioactivities of *A. asphodeloides* micropowder without bringing about additional toxicity.

Key words: *Anemarrhena asphodeloides* Bunge; super fine crushing technique; dissolution

收稿日期:2004-08-05

基金项目:清华大学基础研究资金资助项目(JC2001050)

作者简介:张陆军(1977—),男,安徽肥西人,博士研究生,主要从事药理学、心脑血管药理学研究以及中药新产品的研发。

Tel: (010) 62796270 Fax: (010) 62773630 E-mail: zhanglujuns@163.com

近年来,随着微细化工艺在新材料、精细化工、生物等多方面的广泛应用,有人提出了“微米中药”的概念^[1],为微细化工艺在中药中的应用揭开序幕。中药(包括中药材、中药提取物、中药制剂)经超微粉碎后有利于有效成分的溶出,进而提高其生物利用度。知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 的根茎,具有清热泻火、生津润燥等功效^[2]。知母还具有抗肿瘤、抗衰老等作用^[3]。本实验通过比较微细化工艺制备的知母药材微粉与普通制备的知母粉成分的体外溶出以及微粉与提取物的体内活性,观察知母的微米化对成分的溶出、活性和安全性的影响。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪,包括 600 泵,7725 进样器,2487 双波长吸收检测器,Chromstation 2000 色谱工作站;ZRS-8C 型智能药物溶出仪(天津大学无线电厂);透析袋(相对分子质量 8 000~12 000)。

知母药材购自北京同仁堂,批号:020928;知母微粉,粒径小于 33 μm(过 1 250 目筛),批号:020331,由清华大学材料系提供;知母粉,粒径小于 355 μm(过 50 目筛),本室自制;知母提取物由知母普通粉提取而成,含生药 5 g/g,深圳市中医院提供,批号:20000120;芒果苷对照品,法国 GENAY 公司产品,质量分数 99%,批号:02092401;盐酸阿米替林片(每片 25 mg),湖南洞庭药业股份有限公司,批号:020214;甲醇、冰醋酸(分析纯)。

雄性昆明种小鼠,体重(20±2)g,购自中国预防科学院微生物学流行病学研究所,合格证号:第 038 号。

2 方法与结果

2.1 知母微粉颗粒直径的分布:采用显微标尺随机测定 300 个粉粒的粒径(粒径为最长径和最短径的均值),统计粒径在各个粒径范围内出现的频率和累积百分量,结果见表 1。

表 1 颗粒粒径的分布

Table 1 Distribution of micropowder diameter

区间	粒径范围/μm	个数	频率/%	累积/%
A	0~3	6	2	2
B	3~5	63	21	23
C	5~10	183	61	84
D	10~15	33	11	95
E	15~20	12	4	99
F	20~40	3	1	100

2.2 HPLC 法测定芒果苷

2.2.1 色谱条件^[4]:色谱柱:Kromasil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm);流动相:甲醇-5%冰醋酸(20:80);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:320 nm;柱温:室温。在此条件下,芒果苷的保留时间约为 8 min,与其他组分分离良好。见图 1。

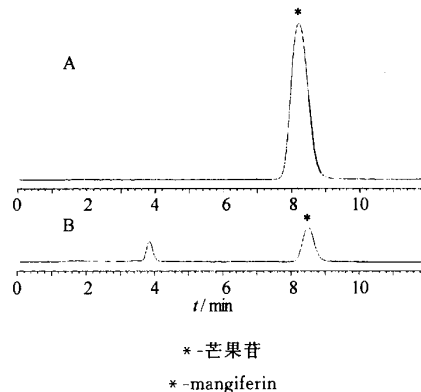


图 1 芒果苷对照品(A)和知母微粉(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mangiferin reference substance (A) and micro-powder of *A. asphodeloides* (B)

2.2.2 标准曲线的制备:精密称取芒果苷对照品适量,用甲醇溶解,得到 375 μg/mL 溶液,作为贮存液。取贮存液适量,分别加水稀释成 7.5、15、30、45、60、75、150 μg/mL 的溶液,进样 5 μL 进行测定。以峰面积对质量浓度进行回归,并计算得标准曲线 $Y=7.6418 \times 10^6 X - 2376.1$, $r=0.9998$ 。表明芒果苷在 7.5~150 μg/mL 与峰面积线性关系良好。以信噪比约 3:1 计,最低检测质量浓度为 0.03 μg/mL。

2.3 知母粉中芒果苷的测定:精密称取知母粉 0.4564 g,置 250 mL 量瓶中,加水适量,50 °C 超声提取 2 h,加水至刻度。取续滤液 5 μL 进样,测定,计算得芒果苷的质量分数为 2.217%。

2.4 体外溶出试验:分别采用浆法和转篮法,观察知母微粉、知母粉中芒果苷直接溶出和加透析袋屏障时的溶出情况。测定芒果苷的质量浓度,并计算溶出百分率和溶出速度。实验数据用 Excel 软件处理,两样本均数比较采用 *t* 检验。

2.4.1 直接溶出:分别精密称取微粉和粗粉约 1 g,直接投入溶出仪中,按《中华人民共和国药典》2000 年版(附录)溶出度测定方法(浆法),以 500 mL 水为溶剂,转速 50 r/min,温度 37 °C,分别于 5、10、15、30、45、60 min 进样 2 mL,用孔径为 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液进样 5 μL,测定芒果苷的质量浓度,计算各个时间点的芒果苷溶出百分率和溶出速度,

结果见图 2。

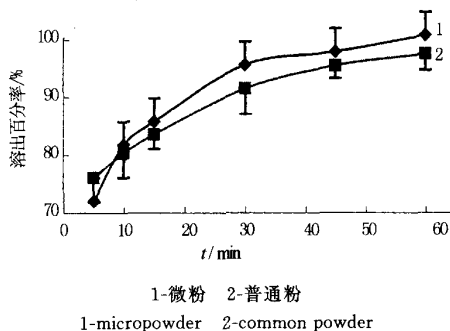


图 2 知母微粉和知母粉直接溶出曲线

Fig. 2 Curves of direct dissolution of micropowder and common powder of *A. asphodeloides*

2.4.2 加透析袋屏障溶出:分别精密称取微粉和粗粉约 1 g,置于透析袋中,每袋中滴加 2 mL 水润湿药粉,扎紧袋口,投入转篮中,按《中华人民共和国药典》2000 年版(附录)溶出度测定方法(转篮法),以 500 mL 水为溶剂,转速 100 r/min,温度 37 ℃,分别于 2、4、6、8、10、12、14、16 h 取样 2 mL,滤过,取续滤液进样 5 μL,测定芒果苷的质量浓度,计算各个时间点的芒果苷溶出百分率和溶出速度。结果见图 3。

2.5 芒果苷溶出速度的比较:将各样品溶出百分率对时间进行回归,比较回归方程:Y=aX+b 中斜率 a 值(反映溶出速度)。直接溶出时,微粉和粗粉的 a 值分别为 0.508 2±0.105 3 和 0.408 6±0.105 3、R² 值分别为 0.893 9±0.067 3 和 0.828 6±0.083 7,两者相比,差异显著(P<0.05, n=6)。加透析袋屏障溶出时,知母微粉的溶出斜率 a 值为

3.719 2±0.554 5,明显高于知母粉 3.142 4±0.772 8, R² 值分别为 0.980 3±0.015 8 和 0.967 2±0.012 6 (P<0.05, n=6)。

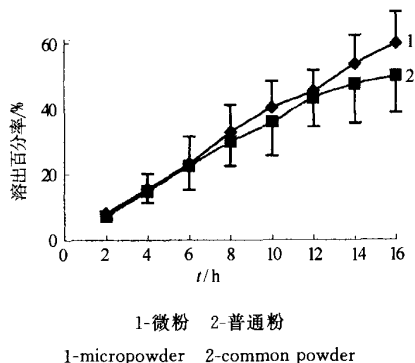


图 3 知母微粉和知母粉加透析袋时溶出曲线

Fig. 1 Curves of dialytic membrane-enveloped dissolution of micropowder and common powder of *A. asphodeloides*

2.6 药效和毒性试验:观察小鼠抗抑郁(悬尾和强迫游泳实验)和测定最大给药剂量,比较短母微粉和提取物体内的活性。实验数据用 Excel 软件处理,两样本均数比较采用 t 检验。

2.6.1 悬尾和强迫游泳实验^[5]:取雄性昆明种小鼠 36 只,随机分成 6 组,分别为蒸馏水组、阿米替林组、知母提取物大剂量组、知母提取物小剂量组、知母微粉大剂量组、知母微粉小剂量组。连续 ig 给药 7 d,前 4 d 进行悬尾和游泳刺激,于第 5 天开始给药后 1 h 做悬尾和游泳试验,观察并记录 4 min 内小鼠不动时间,结果见表 2。

表 2 微粉对小鼠悬尾和强迫游泳的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of micropowder on tail suspension and forced-swimming in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

药 物	剂量/ (g·kg ⁻¹)	第 5 天		第 6 天		第 7 天	
		悬尾/s	游泳/s	悬尾/s	游泳/s	悬尾/s	游泳/s
蒸馏水	-	102.07±56.95	109.26±51.61	117.46±34.07	124.12±61.67	120.50±34.31	103.27±24.82
阿米替林	0.02	30.21±37.03*	21.76±14.47**	22.85±16.11**	34.80±17.79**	18.56±9.93**	47.68±16.02**
知母提取物	2.0	68.11±36.56	95.61±37.46	45.94±30.82	89.17±27.48	48.22±23.83**	61.90±29.94*
	1.0	110.88±38.66	74.34±28.02	89.16±43.41	67.91±35.65	92.74±30.23	70.66±22.38*
知母微粉	2.0	63.25±36.40	99.27±29.97	30.85±14.79**	70.85±43.09	39.37±17.19**	40.76±26.88**
	1.0	77.63±41.76	83.19±40.86	46.02±42.89**#	85.24±28.05	57.25±49.21**#	85.74±21.99

与蒸馏水组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与提取物(1.0 g/kg)组比较: #P<0.05

*P<0.05 **P<0.01 vs H₂O group; #P<0.05 vs extract group (1.0 g/kg)

2.6.2 最大给药剂量测定:取小鼠 40 只,雌雄各半,随机分成 2 组。禁食 4 h 后,以最大的药物浓度,按 0.4 mL/10 g 连续 ig 给药 2 次,每次间隔 1 h,给药后连续观察 7 d 内小鼠的进食、外观、行为活动及大小便变化。结果显示小鼠按最大给药剂量 20 g/kg ig 知母提取物或微粉后,均无异常毒性反应,观察期内无死亡发生,两者体重亦无明显差异。

3 讨论

药物的结构是产生物活性的基础,药物的存在方式在很大程度上也决定了其在体内的过程,进而影响其活性^[6]。药物所表现的生物活性是药物的自身结构(内因)和其在体内的状态(外因)相互作用的结果。微细化工艺正是通过改变药物的体内状态这一外因来影响药物活性的。

实验中观察了微细化工艺制备的知母微粉与普通知母粉中芒果苷直接溶出和加透析袋屏障时的溶出情况。直接溶出时,微粉中芒果苷在各个时间点的溶出百分率均有很大提高,30、45、60 min 时趋势更加明显;加透析袋屏障溶出时其溶出百分率亦有提高,但无统计学意义,可能因为数据的标准差较大所致。尽管如此,无论是直接溶出还是加透析袋屏障溶出,知母微粉的溶出速度明显高于知母粉,差异具有显著性($P < 0.05$)。表明总体上知母微粉的体外溶出速度要快于知母粉。

知母能够调整动物脑内 M 受体的数量并对神经递质有一定的影响^[3]。在预试验的基础上选择了悬尾和强迫游泳试验来评价知母的活性。知母微粉与知母提取物分别以 2.0、1.0 g/kg 给药时均能显著地缩短小鼠不动时间,表现了明显的抗抑郁作用。虽然知母提取物中活性成分富集的程度明显高于微粉,但以相同的剂量给药时,知母微粉和知母提取物表现出相当的活性,表明知母制成微粉后成分的溶出速度和溶出量得到了明显的提高,从而提高了生物利用度。提示以知母微粉给药时可以减少用量。知母微粉的最大给药剂量为 20 g/kg,与同剂量知母粉相比均无明显毒性,提示微细化工艺没有增加知母的毒性。

实验中采用直接溶出(浆法)和加透析袋屏障溶出(转篮法)模拟了药物成分的溶出情况,衡量知母微粉和知母粉中成分的溶出,为微细化技术在药物

中的应用与评价提供一种新的指标和方法。微米级的粉碎会破坏药材绝大部分的细胞壁和细胞膜,可使细胞内的成分不经过细胞壁(膜)而直接溶出,从而使成分溶解的更快更完全。直接溶出试验考察的是药粉颗粒大小对成分溶出的影响,加屏障溶出试验主要是考察细胞壁对成分溶出的影响。实验中使用加透析袋屏障进行溶出时,知母粉中芒果苷的溶出时间明显延长,这也证实了细胞壁(膜)的破坏对胞内成分溶出的意义。当然,这只是初步尝试,使用透析袋屏障溶出作为体外溶出的一种评价方法,尚需更多数据积累和进一步研究。

References:

[1] Lu F E, Ruan J L, Zhong J P, et al. Discussion on micro-technology in traditional Chinese medicine [J]. *World Sci Tech - Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术—中药现代化), 2001, 3 (1): 12-16.
 [2] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
 [3] Hu Y E, Yi L Y, He L M, et al. The mechanism of the regulatory action of Zhimu on brain-receptors in aged mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1994 (2): 10-13.
 [4] Chen W S, Li L, Qiao C Z. Quantification of mangiferin and neomangiferin in Zhimu from different ares [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25 (2): 87-88.
 [5] Zhang J T. *Modern Experimental Methods in Pharmacy* (现代药理实验技术) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Press, 1998.
 [6] Gai G S. *Super Fine and Classification Technology* (超微粉碎分级技术) [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2003.

星点设计-效应面法优化水飞蓟素滴丸的制备工艺

陈 伟¹, 夏 红², 吴 伟^{2*}

(1. 上海市药品和医疗器械审评中心, 上海 200021; 2. 复旦大学药学院, 上海 200032)

摘要:目的 采用固体分散技术将水飞蓟素制成滴丸,以增加其溶出速度,提高生物利用度。以星点设计-效应面优化法对制备工艺进行优化,筛选最佳处方。方法 以 Poloxamer 188 的用量及药物的质量分数为考察因素,崩散时间以及一定时间的溶出度为指标,采用多元线性回归及二次和三次多项式拟合建立指标与考察因素之间的数学关系,根据最佳数学模型描绘效应面,再根据效应面优选最佳条件。结果 三次多项式是描述指标与因素之间的最佳模型, $r=0.998$ 。最佳处方滴丸的崩散时间及溶出度的理论预测值与实测值偏差较小,模型具有良好的预测性。60 min 溶出度为普通片剂的 19 倍。结论 水飞蓟素制成滴丸后溶出速度显著提高,星点设计-效应面优化法可以很好地应用于处方筛选。

关键词:水飞蓟素;滴丸;固体分散体;星点设计;效应面优化法

中图分类号:R283.6; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)05-0679-05

收稿日期:2004-08-16

作者简介:陈 伟(1972—),男,江苏启东人,主管药师,在读硕士研究生,研究方向为中药质量控制和标准化。

* 通讯作者 Tel: (021) 54237833 Fax: (021) 64170921 E-mail: wuwei@shmu.edu.cn