

不同干燥工艺对板蓝根水提物中有效成分的影响

罗云^{1,2,3}, 金城¹, 鄢丹¹, 王强⁴, 肖小河^{1*}

1. 解放军 302 医院 全军中药研究所, 北京 100039

2. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

4. 海军总医院 药剂科, 北京 100037

摘要: 目的 从化学成分质量分数变化的角度, 考察不同干燥方式和条件对板蓝根水提物质量的影响, 为建立制剂工艺有无质的改变的早期快速检测方法体系提供依据。方法 板蓝根水提液分别采用冷冻干燥、减压干燥、常压干燥、喷雾干燥 4 种不同方式进行干燥, 测定并比较各干燥样品中的苯甲酸、水杨酸、腺苷和多糖的质量分数。结果 不同干燥方式样品中苯甲酸、水杨酸、腺苷和多糖的质量分数存在较大差异, 以冷冻干燥样品各项成分质量分数最高, 喷雾干燥次之, 90 °C 常压干燥样品最低。在实验范围内, 板蓝根水提物在冷冻干燥、喷雾干燥条件下比较稳定, 60 °C 以上常压或减压干燥条件下不稳定。结论 板蓝根制剂的干燥工艺从冷冻干燥、喷雾干燥转变成 60 °C 以上减压干燥或常压干燥时, 须注意其生产工艺是否存在质的改变。干燥方式和条件的改变对板蓝根水提物质量的影响不容忽视, 指标性化学成分测定可作为不同干燥工艺对板蓝根水提物是否产生质的改变的早期快速评价方法。

关键词: 板蓝根; 干燥方式; 水杨酸; 苯甲酸; 腺苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)08-1532-05

Effect of different drying methods on active components in water extracts from *Isatidis Radix*

LUO Yun^{1,2,3}, JIN Cheng¹, YAN Dan¹, WANG Qiang⁴, XIAO Xiao-he¹

1. PLA Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

4. Department of Pharmacy, Navy General Hospital, Beijing 100037, China

Abstract: Objective From the viewpoint of chemical composition, the effect of different drying methods and conditions on the quality of water extracts from *Isatidis Radix* was investigated. Evidence was provided for the establishment of early and rapid detection system of the quality change of traditional Chinese medicine preparation. **Methods** Water extracts from *Isatidis Radix* were dried by freeze drying, vacuum drying, drying under normal pressure, and spray drying, respectively. The contents of salicylic acid, benzoic acid, adenosine, and polysaccharose in samples by different drying methods were determined and compared with each other. **Results** The contents of salicylic acid, benzoic acid, adenosine, and polysaccharose in samples by different drying methods were obviously different. Those in samples prepared by freeze drying were the highest, those by spray drying were the second highest, and those by drying under normal pressure at 90 °C were the lowest. Water extracts from *Isatidis Radix* prepared by freeze drying and spray drying were stable, while those prepared by vacuum drying and drying under normal pressure at the temperature over 60 °C were not stable. It was indicated that quality change might happen when the drying method transferred from freeze drying/spray drying to vacuum drying or drying under normal pressure at the temperature over 60 °C. **Conclusion** The effect of different drying methods and conditions on the quality of water extracts from *Isatidis Radix* should not be ignored. Determination of the index chemical composition can be an

收稿日期: 2010-11-08

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目 (30625042); 国家自然科学基金资助项目 (30600824)

作者简介: 罗云 (1981—), 四川资阳人, 中药学博士, 主要研究方向为中药制剂及质量评价与控制。

Tel: (010)66933324 13576034765 E-mail: luoyunn@163.com

*通讯作者 肖小河 Tel: (010)66933322 Fax: (010)63879915 E-mail: pharmacy302@126.com

early and rapid detection method to evaluate the quality change of traditional Chinese medicine preparation.

Key words: *Isatidis Radix*; drying method; salicylic acid; benzoic acid; adenosine

中药制剂工艺有无质的改变是长期困扰药品审评和研发人员的技术难题。中药制剂过程中提取溶剂和工艺路线的改变^[1], 因为涉及到中药制剂的物质基础, 一般被视为有“质的改变”; 而浓缩、干燥和成型等工艺对中药制剂的质量和药效的影响往往被忽略, 或者囿于没有灵敏、快速的检测手段而难有所为。临床疗效是评价中药制剂工艺有无实质性改变的最高也是最终的指标和方法, 动物药理实验也是有效的检测手段之一^[2-4]。但是二者均周期长、费用高, 且干扰因素较多, 同时往往缺少快速、灵敏的检测指标和方法, 因此, 无论是临床疗效评价, 还是常规动物药理实验, 都不适合作为评价中药制剂工艺有无实质性改变的快速检测手段。近年来, 本课题组应用常规理化分析、热分析、化学成分定量测定、化学指纹图谱、生物效价检测等方法, 综合评价了中药制剂工艺改变的程度和性质, 建立了一套基于常规理化性质分析一定量测定—化学指纹图谱—生物效价检测序贯分析的中药制剂工艺有无实质性改变的快速检测方法体系, 并在大黄、板蓝根等中药制剂中示范应用, 为保证中药产品安全有效、稳定可控提供了新的技术支持^[5]。

本实验以疗效确切、药效物质基础不明确的板蓝根为代表, 首先从指标性化学成分质量分数差异的角度, 研究不同干燥方式和条件对板蓝根水提物质量的影响, 为综合评价板蓝根制剂工艺有无质的改变, 建立其早期快速检测方法体系提供依据。

1 仪器与材料

Yamato Pulvis Basic Unit Model GB—21 喷雾干燥机 (日本大和科学株式会社), LGJ—18 型冷冻干燥机 (北京四环科学仪器厂), ZK—82B 型真空干燥箱 (上海市实验仪器总厂), SFG—02.500 型电热恒温鼓风干燥箱 (北京金紫光科技发展有限公司), Agilent 1100 HPLC/DAD (美国 Agilent 公司), HP 8452A 型紫外可见分光光度计 (美国 HP 公司), KQ—500B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), AL204 分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司), Milli-Q 超纯水纯化系统 (Millipore 公司)。

苯甲酸 (批号 100419-200301)、水杨酸 (批号 110845-9501)、腺苷 (批号 879-200202) 均购自中国药品生物制品检定所; 甲醇、乙腈为色谱纯; 实

验用水为 Milli-Q 超纯水; 其他试剂均为分析纯。

板蓝根药材 (批号 20060301) 购于河北安国祁新中药颗粒饮片有限公司, 经解放军 302 医院全军中药研究所肖小河研究员鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 板蓝根水提液的制备

称取板蓝根药材适量, 适当粉碎, 加 10 倍量水回流提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至 1 g/mL (按生药计), 即得板蓝根水提液, 置 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.2 不同干燥方式样品的制备

根据生产实际, 考察浸膏相对密度、干燥时间、干燥温度、真空度等主要因素对板蓝根水提液分别以冷冻干燥、减压烘干、常压烘干和喷雾干燥 4 种干燥方式的影响。每种干燥方法各制备 10 批样品, 研细, 密封, 置干燥器中保存备用。

2.3 指标成分的测定

2.3.1 水杨酸、苯甲酸的测定^[6]

色谱条件: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (25 : 75), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为室温, 检测波长 230 nm, 进样体积 10 μL。色谱图见图 1。

对照品溶液的制备: 精密称取水杨酸对照品 10.7 mg、苯甲酸对照品 10.4 mg 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 混匀, 取 50 mL 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 混匀, 即得。

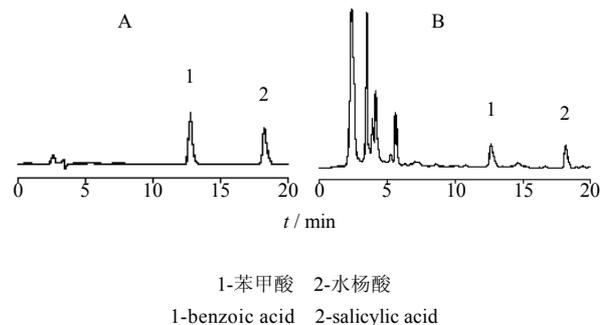


图 1 混合对照品 (A) 和板蓝根水提物 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and water extracts from *Isatidis Radix* (B)

取不同干燥工艺的样品各约 1.0 g, 精密称定, 加甲醇 50 mL, 称定质量, 超声 30 min, 放冷, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进样 10 μL , 测定峰面积, 以外标一点法计算样品中水杨酸、苯甲酸的量。

2.3.2 多糖的测定 采用 UV-VIS 法测定^[6]。

对照品溶液的制备: 精密称取于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒定质量的无水葡萄糖 30.2 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加水溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

多糖测定: 取不同干燥工艺的样品各约 10 mg, 精密称定, 加水 200 mL 使溶解, 精密量取 2 mL 置具塞试管中, 分别加入 4% 苯酚溶液 1 mL, 混匀, 迅速加入浓硫酸 7.0 mL, 摇匀, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 30 min, 取出, 置冰水浴 5 min, 取出, 以相应试剂为空白, 在波长 490 nm 处测定吸光度值, 以葡萄糖为对照, 计算多糖的量。

2.3.3 腺苷的测定^[6]

色谱条件: 色谱柱为 Kromasil C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为磷酸盐缓冲液 (pH 6.5, 0.01 mol/L 磷酸二氢钠 68.5 mL 与 0.01 mol/L 磷酸氢二钠 31.5 mL 混合)-甲醇 (17:3), 检测波长 260 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为室温, 进样体积 10 μL 。色谱图见图 2。

对照品溶液的制备: 精密称取腺苷对照品 10.0 mg, 加 90% 甲醇 10 mL 使溶解, 取 1 mL 至 10 mL 量瓶, 加 90% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

取不同干燥工艺的样品各约 2.0 g, 精密称定, 加 90% 甲醇 25 mL, 超声 30 min, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 滤膜滤过, 进样 10 μL , 测

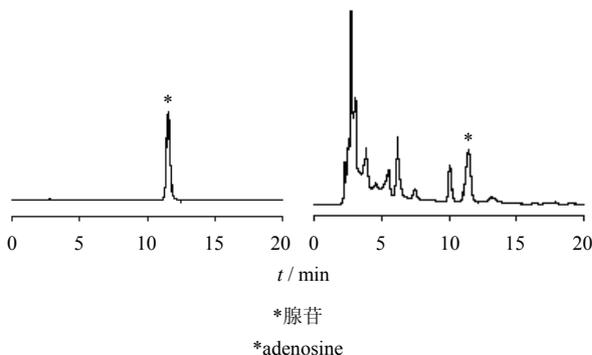


图 2 腺苷对照品 (A) 和板蓝根水提物 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of adenosine reference substance (A) and water extracts from *Isatidis Radix* (B)

定峰面积, 以外标一点法计算样品中腺苷的量。

2.3.4 测定结果 水杨酸的回归方程为 $Y=1\ 967.7 X-1.4$ ($r=0.999\ 9$), 表明水杨酸在 0.134~1.07 μg 线性关系良好; 苯甲酸的回归方程为 $Y=4\ 212.2 X-10.3$ ($r=0.999\ 9$), 表明苯甲酸在 0.13~1.04 μg 线性关系良好; 葡萄糖的回归方程为 $Y=60.45 X+0.02$ ($r=0.997\ 4$), 表明葡萄糖在 2.416~12.08 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好; 腺苷的回归方程为 $Y=3\ 329.7 X-16.2$ ($r=0.999\ 9$), 表明腺苷在 0.25~2.0 μg 线性关系良好。方法学考察均符合要求。不同干燥工艺的样品中水杨酸、苯甲酸、多糖、腺苷的测定结果见表 1。

从各成分测定结果可知: 冷冻干燥和喷雾干燥所得样品的 4 种化学成分量较高, 且相对稳定; 减压干燥和常压干燥所得样品, 随着干燥温度的升高, 4 种化学成分质量分数均有下降的趋势, 90 $^{\circ}\text{C}$ 常压干燥样品质量分数最低。

2.4 数据分析

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS V8.0 统计软件对数据进行处理, 采用 One-way ANOVA 法进行多组间比较; 以板蓝根水提物中苯甲酸、水杨酸、腺苷和多糖质量分数为指标, 采用组平均 (Average Distance Between Clusters) 法对所测 21 个样品进行聚类分析。

2.4.1 方差分析结果 冷冻干燥样品 4 种化学成分质量分数与板蓝根水提液没有差别; 喷雾干燥样品 4 种化学成分质量分数较板蓝根水提液略有下降, 但没有显著差别; 减压干燥和常压干燥样品 4 种化学成分质量分数较板蓝根水提液明显下降, 60 $^{\circ}\text{C}$ 以上减压干燥和常压干燥 4 种化学成分质量分数与板蓝根水提液相比, 具有显著差别 ($P < 0.05$ 、0.01)。提示当板蓝根制剂的干燥工艺从冷冻干燥、喷雾干燥转变成 60 $^{\circ}\text{C}$ 以上减压干燥和常压干燥时, 其化学成分的质量分数可能存在影响板蓝根药效的变化, 须注意其生产工艺是否存在质的改变, 需对新干燥工艺产品进行药效方面的验证。

2.4.2 聚类分析结果 不同干燥方式和条件下板蓝根水提物样品聚类分析结果见图 3。

根据图 3, 当分组闭值取聚合系数 $\lambda=1.65$ 时 (图中虚线所示), 21 个不同干燥方式和条件下板蓝根水提物样品可以分成 5 组。

A 组: 包括 1、4、5、2、3、17、19、18、20、21, 即板蓝根水提液, 全部冷冻干燥和喷雾干燥样

表 1 不同干燥方式的工艺参数和样品测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Preparation parameters and assaying results of samples prepared by different drying methods ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

干燥方式	编号	相对密度	干燥时间/ h	干燥温度/ °C	真空度/ MPa	水杨酸/%	苯甲酸/%	多糖/%	腺苷/%
板蓝根水提液	1	1.05	—	—	—	0.275±0.013	0.401±0.015	50.2±0.6	0.145±0.011
冷冻干燥	2	1.05	48/4 ^a	-45	<0.000 1	0.279±0.012	0.406±0.012	51.4±0.7	0.144±0.014
	3	1.05	48/6 ^a	-45	<0.000 1	0.277±0.014	0.405±0.014	50.9±1.0	0.146±0.014
	4	1.05	36/8 ^a	-45	<0.000 1	0.273±0.011	0.401±0.013	50.8±1.2	0.141±0.017
	5	1.05	24/10 ^a	-45	<0.000 1	0.268±0.009	0.395±0.013	50.5±1.0	0.142±0.018
	6	1.05	48	50	0.02	0.271±0.016	0.358±0.015	49.8±0.5	0.134±0.011
减压干燥	7	1.05	36	50	0.03	0.265±0.018	0.347±0.014	49.3±0.7	0.138±0.016
	8	1.05	24	60	0.04	0.259±0.009*	0.335±0.017*	48.8±0.8	0.131±0.012
	9	1.05	36	60	0.04	0.257±0.005*	0.317±0.019*	47.2±1.3	0.130±0.006*
	10	1.05	18	70	0.03	0.256±0.008**	0.305±0.010**	44.9±1.6**	0.122±0.013**
	11	1.05	24	70	0.02	0.250±0.006**	0.324±0.011**	45.5±1.8**	0.121±0.005**
	12	1.05	60	50	0.10	0.258±0.014	0.345±0.013	48.3±0.4	0.125±0.015
	13	1.05	48	60	0.10	0.247±0.015*	0.339±0.014*	46.8±0.6	0.119±0.016
	14	1.05	36	70	0.10	0.231±0.015**	0.334±0.016*	47.4±0.9	0.118±0.015
	15	1.05	24	80	0.10	0.225±0.017**	0.324±0.009*	45.9±1.3*	0.106±0.012*
	16	1.05	18	90	0.10	0.208±0.019**	0.293±0.008**	45.5±1.7*	0.097±0.013*
喷雾干燥	17	1.05	—	180/90 ^b	0.20 ^c	0.267±0.013	0.385±0.014	49.4±0.4	0.139±0.014
	18	1.10	—	180/90 ^b	0.20 ^c	0.261±0.008	0.388±0.016	49.8±0.6	0.144±0.016
	19	1.10	—	170/85 ^b	0.20 ^c	0.265±0.009	0.387±0.013	49.3±0.5	0.143±0.011
	20	1.15	—	180/85 ^b	0.20 ^c	0.254±0.011	0.374±0.011	48.9±0.6	0.141±0.009
	21	1.15	—	180/95 ^b	0.20 ^c	0.251±0.014	0.378±0.015	50.3±0.4	0.138±0.013

a-干燥时间/预冻时间 b-进/出风温度 c-风压; 与板蓝根水提液比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

a-time of drying/freezing b-temperature of inlet/outlet c-wind pressure; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs water extract from *Isatis Radix*

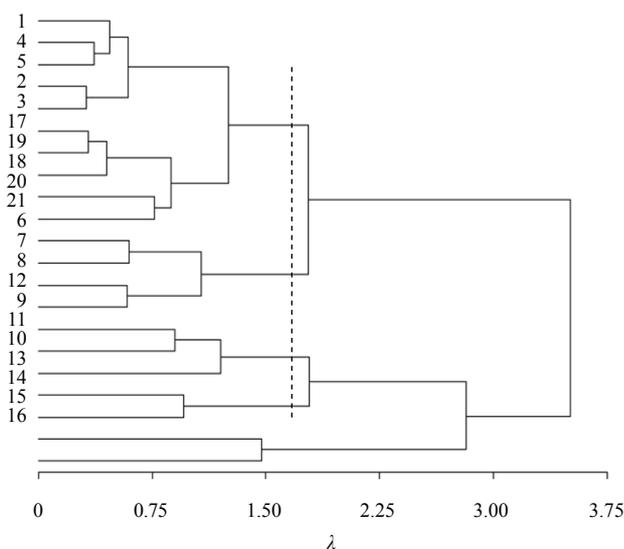


图 3 不同干燥方式样品的聚类分析图
Fig. 3 Cluster analysis of samples by different drying methods

品。当 $\lambda = 0.75$ 时, 全部冷冻干燥样品与未经干燥处理的 1 号样品首先聚为一小类, 可能是因为冷冻干燥是在较低温度下进行, 对样品中所测 4 种化学成分破坏都较小, 化学成分的质量分数与板蓝根水提液最为接近。当 $\lambda = 1.50$ 时, 全部喷雾干燥样品与冷冻干燥样品聚为一类, 可能是因为喷雾干燥过程温度虽高, 但样品受热时间短, 对样品化学成分破坏较小。尽管冷冻干燥与喷雾干燥条件相差很大, 但对样品化学成分破坏均较小, 具有一定的相似性。

B 组: 包括 6、7、8、12, 即 50 °C 减压干燥 36、48 h, 60 °C 减压干燥 24 h, 50 °C 常压干燥 60 h。提示干燥温度低于 60 °C 条件下, 虽然干燥方式不同, 但板蓝根水提物中 4 种化学成分质量分数变化差异不明显, 板蓝根水提物在 60 °C 以下干燥基本稳定。当 $\lambda = 1.85$ 时, B 组首先与 A 组聚为一类, 提示 60 °C 以下减压或常压干燥板蓝根水提物中 4

种化学成分质量分数与冷冻干燥和喷雾干燥差异不明显。

C 组: 包括 9、11、10, 即 60 °C 减压干燥 36 h, 70 °C 减压干燥 18、24 h。这一组均是减压干燥样品, 可能是因为减压干燥在真空条件下进行, 降低了空气中氧气量和相对湿度, 同时缩短了板蓝根水提物干燥时间, 化学成分发生变化的可能性降低。C 组与 B 组在聚类树上的距离较远, 提示虽同为减压干燥, 但干燥条件的改变, 板蓝根水提物化学成分也存在较明显的差异。

D 组: 包括 13、14, 即 60 °C 常压干燥 48 h, 70 °C 常压干燥 36 h。D 组与 C 组在聚类树上的距离较远, 提示在干燥温度相同的情况下, 不同干燥方式存在较明显的差异。

E 组: 包括 15、16, 即 80 °C 常压干燥 24 h, 90 °C 常压干燥 18 h。E 组与 D 组在聚类树上的距离较远, 提示虽同为常压干燥, 但干燥时间和温度的改变, 板蓝根水提物化学成分也存在较明显差异。

3 讨论

中药制剂浓缩干燥和成型过程不只是纯物理的蒸发、蒸馏或物料之间的简单混合, 还存在氧化、还原、水解、聚合、异构化等一系列复杂的化学变化^[7], 其中涉及到药物各成分间的相互作用、药物与辅料的相互作用、物料物理稳定性、化学稳定性与生物学稳定性的改变等, 不仅使中药制剂外观性状和内在质量发生不同程度的改变, 更进一步影响到其临床疗效^[8-9]。本研究采用方差分析和聚类分析, 结果表明, 不同干燥方式样品中苯甲酸、水杨酸、腺苷和多糖的质量分数存在较大差异, 以冷冻干燥样品各项成分质量分数最高, 喷雾干燥次之, 90 °C 常压干燥样品质量分数最低。提示干燥方式和条件的改变对板蓝根水提物质量的影响不容忽视, 板蓝根制剂的干燥工艺从冷冻干燥、喷雾干燥转变成 60 °C 以上减压干燥或常压干燥时, 须注意其生产工艺是否存在质的改变。

指标性化学成分定量测定可作为评价中药板蓝根水提物不同干燥工艺有无质的改变早期快速检测方法。但由于中药成分的复杂性及化学检测手段的局限性, 不可能对所有的化学成分进行分析; 同时浓缩干燥和成型工艺的改变, 有时虽不明显影响有效成分或指标性成分量的变化, 但却会产生显著的物理或物化性质的改变, 而这些物理或物化性质改

变不仅影响产品的外观性状, 更重要地影响其崩解、溶出和吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 等体内行为, 进而影响其生物利用度及临床疗效。

与常规药理实验和临床疗效评价方法相比, 生物效价检测方法具快速、灵敏、准确、量效关系较明确等优点。将生物效价检测方法引入中药质量控制和评价体系, 不仅可以评价药效, 甚至可以考察不良反应; 尤其对成分复杂、药效物质基础不明确的中药, 在采用化学成分定量测定难以控制和评价其质量时, 生物效价检测法更凸显其优越性^[10-11]。因此, 笔者将采用包括物化性质分析、化学指纹图谱、生物效价检测在内的其他方法对不同干燥方式和条件所得板蓝根水提物进行综合分析, 为评价中药板蓝根制剂工艺有无质的改变提供一套基于常规理化性质分析一定量测定—化学指纹图谱—生物效价检测序贯分析的早期快速检测方法体系, 相关研究正在进一步进行。

参考文献

- [1] 董娟娥, 龚明贵, 梁宗锁, 等. 干燥方法和提取温度对板蓝根、大青叶有效成分的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 111-114.
- [2] 谢秀琼. 对中药制剂工艺研究评价指标的浅见 [J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(4): 197-198.
- [3] 袁海龙, 肖小河. 基于 PD-PK 的中药日服次数合理性评价模式商榷 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 417-419.
- [4] 卢美娇. 基层医院开展中药临床药效评价的思路 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1913-1914.
- [5] 王强, 罗云, 金城, 等. 干燥方式和条件对大黄水提液蒽醌和鞣质成分含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(8): 893-896.
- [6] 罗云. 中药制剂工艺有无实质性改变的早期快速检测 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
- [7] 苏子仁, 陈建南. 中药制剂工艺过程的物理化学变化研究 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(11): 671-674.
- [8] 富志军, 林以宁, 亢俊伟. 浓缩、精制及干燥对复方丹参提取液中水溶性成分的影响 [J]. 安徽中医学院学报, 2003, 22(2): 52-54.
- [9] 卢鹏伟, 杨晨华, 何颖, 等. 浓缩六味地黄丸两种不同干燥方法的比较 [J]. 河南大学学报, 2002, 21(4): 21-23.
- [10] 肖小河, 金城, 赵中振, 等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1377-1381.
- [11] 王伽伯, 李会芳, 肖小河, 等. 生物检定方法控制中药质量的思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(6): 36-39.