

九香止泻方喷雾和减压干燥品中有效成分比较

何群^{1,2}, 赵碧清^{1,2}, 滕久祥², 彭芝配^{2*}, 许江丽^{1,2}, 徐晓立^{1,2}

1. 湖南中医药大学 中药药剂学重点学科, 湖南 长沙 410208
2. 湖南中医药大学 中药现代化实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 比较喷雾干燥法与减压干燥法制得的九香止泻干浸膏粉有效成分量的差异, 为确定九香止泻浓缩液(或稠浸膏)合理的干燥方法提供依据。方法 采用 HPLC 法测定喷雾干燥与减压干燥法制成的九香止泻干浸膏粉中秦皮甲素、秦皮乙素, 采用络合滴定法测定总鞣质。结果 九香止泻方减压干燥后秦皮甲素量高于喷雾干燥, 减压干燥与喷雾干燥后秦皮乙素、总鞣质的量差异无统计学意义, 两种干燥方法皆适用。结论 综合考虑各有效成分量的差异, 减压干燥优于喷雾干燥。

关键词: 九香止泻方; 喷雾干燥; 减压干燥; 秦皮甲素; 秦皮乙素; 鞣质

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)08-1550-04

Comparison on active ingredients in spray and decompression drying extracts of Jiuxiang Zhixie Prescription

HE Qun^{1,2}, ZHAO Bi-qing^{1,2}, TENG Jiu-xiang², PENG Zhi-pei², XU Jiang-li^{1,2}, XU Xiao-li^{1,2}

1. Key Subjects of Chinese Materia Medica Pharmaceutics, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Laboratory of Chinese Meteria Medica Modernization, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Key words: Jiuxiang Zhixie Prescription; spray drying; decompression drying; aesculin; aesculetin; tannin

九香止泻方来源于湖南中医药大学著名中医内科专家滕久祥教授研制的治疗湿热泄泻的临床经验方, 由秦皮、椿皮、神曲、木香 4 味中药材组成, 具有良好的行气止痛、健脾消食之功效。药理实验表明, 该方对常见肠道致病菌大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏乙型副伤寒杆菌、痢疾杆菌、变形杆菌均有较好的抑制作用, 尤其是具有较强的抑制致泻性海洋弧菌的作用; 能显著降低腹泻指数, 具有对抗番泻叶所致小鼠急性腹泻作用; 具有显著的解痉、镇痛, 抑制正常小鼠小肠推进功能, 降低小肠推进率, 提高胃酸和胃蛋白酶活性等作用^[1-8]。多用于胸脘胀痛、泻痢后重、食积不消等症, 治疗感染性腹泻取得满意疗效。本方药材水提浓缩液采用喷雾干燥法制成的干浸膏粉疏松、色浅、美观且溶解性好, 与减压干燥法相比理化性质各有千秋, 为

确定最优、最合理的干燥工艺, 本实验比较了两种干燥工艺制成的干浸膏粉有效成分的差异。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪, Waters 2487 型紫外检测器 (Waters 公司), Breez 工作站, C-R3A 数据处理器; B-290 型实验室小型喷雾干燥机 (瑞士 Buchi 公司); DZF-6050 型真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); 岛津分析天平 AU120 (岛津国际贸易上海有限公司); SK3300H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); RE52-99 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。

秦皮、木香等 4 味中药材购于湖南省三湘中药饮片公司, 经湖南中医药大学中药鉴定教研室周日宝教授鉴定符合《中国药典》2010 年版一部项下有关规定。秦皮甲素 (批号 110740-200104) 和秦皮乙

收稿日期: 2010-11-05

基金项目: 湖南省教育厅重点项目 (05A0312)

作者简介: 何群 (1958—), 女, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为中药剂型与疗效的研究。

Tel: (0731)88458231 88458227 13974930514 E-mail: hequn88@126.com

*通讯作者 彭芝配 Tel: 18908468469 (0731)85381088 E-mail: pengzhipei805@126.com

素(批号 110741-200506)对照品(中国药品生物制品检定所);甲醇为色谱纯,水为重蒸水,乙二胺四醋酸二钠、铬黑 T 等试剂皆为分析纯。

2 方法与结果

2.1 干浸膏粉的制备

取九香止泻方药材,木香先提取挥发油^[9],残渣与秦香等 3 味药材合并水煎,浓缩至相对密度为 1.15 左右,分成 2 份,按喷雾干燥与减压干燥最优工艺条件制成干浸膏粉^[10-12],即一份在进风温度 160 °C,出风温度 90 °C,空气流量转子数 50,泵药速度 25%(相当于蠕动泵每小时输入药液量 250~300 mL),浓缩液温度 60 °C 的条件下喷雾干燥得干浸膏粉;另一份在旋转蒸发器上 80 °C 继续减压浓缩至相对密度 1.35 左右(稠浸膏),再于 70 °C 减压干燥制成干浸膏粉,简称供试品。

2.2 秦皮甲素和秦皮乙素定量分析方法的建立^[13]

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验^[14] 色谱柱为 Thermo C₁₈ ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(12:88),检测波长 334 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 °C,理论板数按秦皮乙素峰计算不低于 5 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取在 80 °C 干燥至恒定质量的秦皮甲素对照品 10.0 mg、秦皮乙素对照品 10.3 mg,各置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,摇匀,得含秦皮甲素 200 μg/mL、秦皮乙素 206 μg/mL 对照品储备液。

分别精密量取秦皮甲素、秦皮乙素对照品储备液各 0.2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,即得质量浓度分别为 4.00、4.12 μg/mL 混合对照品溶液。

2.2.3 线性关系考察 分别精密移取秦皮甲素、秦皮乙素对照品储备液 2、0.8 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。分别移取 0.1、0.6、1.0、1.6、2.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别过 0.45 μm 滤膜,分别进样 10 μL,测定峰面积积分值,以峰面积积分值为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程:秦皮甲素 $Y=2\ 145 X-227\ 4$, $r=0.999\ 8$;秦皮乙素 $Y=3\ 445 X-3\ 375$, $r=0.999\ 5$;表明秦皮甲素在 80~800 ng、秦皮乙素在 32.96~329.6 ng 线性关系良好。

2.2.4 供试品溶液的制备 取干浸膏粉末(过 3 号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,加热回流 60 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,离心,取上清液,过 0.45 μm 滤膜,备用。

2.2.5 阴性干扰的考察 按九香止泻方比例称取除去秦皮的其他药材共 1.43 g,依照九香止泻方的制备工艺和供试品溶液的制备方法制备阴性对照液,同法测定,结果见图 1。可知供试品色谱图中,在与秦皮甲素和秦皮乙素对照品相应位置上有相同色谱峰,阴性对照液无峰,可知阴性无干扰。

2.2.6 精密度试验 精密吸取减压干燥法制成的供

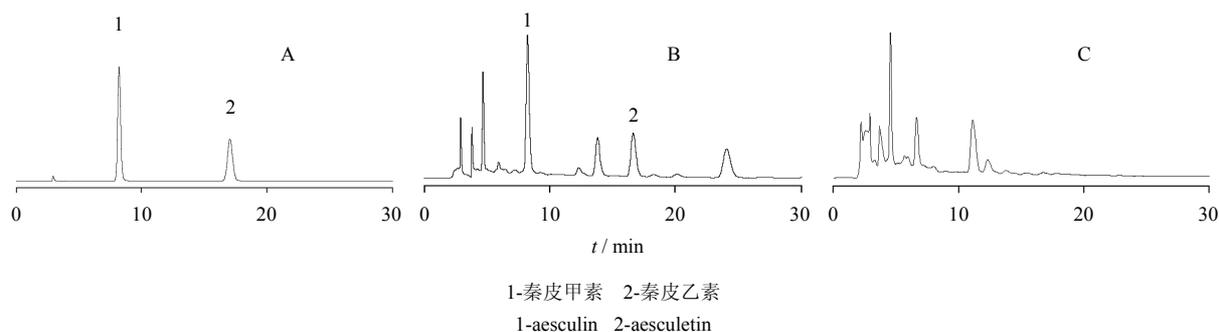


图 1 对照品(A)、九香止泻方(B)和阴性对照(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), Jiuxiang Zhixie Prescription (B), and negative control (C)

试品溶液,重复进样 5 次,每次进样 10 μL,测定峰面积积分值,计算得秦皮甲素峰面积的 RSD 为 1.84%,秦皮乙素峰面积的 RSD 为 1.37%。

2.2.7 稳定性考察 精密吸取减压干燥法制成的供试品溶液,分别在 0、4、8、12、24 h 进样 10 μL,测定峰面积积分值,计算得秦皮甲素峰面积的 RSD

为 1.60%,秦皮乙素峰面积的 RSD 为 1.14%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 重现性试验 取减压干燥法制成的干浸膏粉末(过 3 号筛)6 份,每份约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,加热回流 60 min,放冷,再称定质量,用甲

醇补足减失的质量, 摇匀, 离心, 取上清液, 过 0.45 μm 滤膜, 分别进样 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积积分值, 计算得秦皮甲素质量分数的 RSD 为 1.38%, 秦皮乙素质量分数的 RSD 为 1.46%。

2.2.9 加样回收试验 取减压干燥法制成的干浸膏粉末(过 3 号筛)(秦皮甲素 3.774 mg/mL, 秦皮乙素 1.368 mg/mL) 9 份, 每份约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 其中 3 份加入秦皮甲素 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4.5 mL、秦皮乙素 206 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1.7 mL, 3 份加入秦皮甲素 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5.5 mL、秦皮乙素 206 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2 mL, 3 份加入秦皮甲素 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6.5 mL、秦皮乙素 206 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2.5 mL, 分别精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 60 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 过 0.45 μm 滤膜, 分别进样 10 μL , 测定, 计算得秦皮甲素平均回收率为 100.1%, RSD 为 1.89%; 秦皮乙素平均回收率为 101.5%, RSD 为 2.47%。

2.3 秦皮甲素和秦皮乙素的比较

取减压干燥和喷雾干燥的样品, 制备供试品溶液, 分别进样 10 μL 测定秦皮甲素和秦皮乙素的质量浓度, 重复 3 次, 采用完全随机 t 检验, 比较两种干燥方法有效成分质量分数的差异, 结果见表 1。由秦皮甲素的测定结果可知, 减压干燥与喷雾干燥对有效成分量的影响差异有统计学意义($P < 0.05$), 减压干燥秦皮甲素质量分数高于喷雾干燥, 说明喷雾干燥进风温度高达 150 $^{\circ}\text{C}$ 以上, 使秦皮甲素分解破坏, 质量分数偏低。由秦皮乙素的测定结果可知, 减压干燥与喷雾干燥对有效成分量的影响差异无统计学意义, 说明秦皮乙素对温度不敏感, 热稳定性好, 两种工艺皆适用。综合考虑两者结果, 以减压干燥为佳。

2.4 络合滴定法测定总鞣质^[15]

2.4.1 标准溶液的配制及标定

EDTA 溶液的配制: 取乙二胺四醋酸二钠(EDTA) 19 g, 加适量的水使溶解配成 1 000 mL。

EDTA 溶液浓度的标定: 取于 800 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧至恒

定质量的基准氧化锌 0.12 g, 精密称定, 加稀盐酸 3 mL, 加水 25 mL, 加 0.025% 甲基红的乙醇溶液 1 滴, 滴加氨试液至溶液显微黄色, 加水 25 mL 与氨-氯化铵缓冲液(pH 10.0) 10 mL, 再加铬黑 T 指示剂少量, 用 EDTA 溶液滴定至溶液由紫色变为纯蓝色, 并将滴定的结果用空白试验校正。每 1 mL 乙二胺四醋酸二钠滴定液(0.05 mol/L) 相当于 4.069 mg 氧化锌。根据 EDTA 溶液的消耗量与氧化锌的取用量, 计算出 EDTA 溶液的浓度, 即得。

2.4.2 滴定方法^[16] 精密吸取 1 mol/L 醋酸锌标准溶液 20 mL 于 500 mL 量瓶中, 加 14 mL 25% 氨水, 摇匀, 使白色沉淀溶解, 将制得的供试品溶液加蒸馏水稀释至 400 mL, 于水浴上温热 [(35 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$] 30 min, 然后缓缓注入量瓶中, 并不断振摇, 加毕后继续振摇 1 min, 置原水浴中 30 min (间歇振摇数次), 冷却至室温, 用水稀释至刻度, 摇匀后干滤纸滤过, 收集澄清滤液于干燥的三角瓶中, 加 300 mL 蒸馏水, 25 mL pH 值为 10.0 的氯化铵-氢氧化钠缓冲液, 1 mL 铬黑 T 指示剂(0.5 g 溶于 10 mL 且 pH 值为 10.0 的缓冲液, 以乙醇稀释至 100 mL), 然后以 0.05 mol/L 的 EDTA-2Na 标准溶液滴定, 溶液由红色变为蓝色即为终点, 按公式计算结果:

$$\text{总鞣质} = 0.1556 \times V/W$$

V 为 1 mol/L 醋酸锌标准液用于形成络合鞣质所消耗的量;
 $V = 20 \times M_{\text{Zn}} - 25 \times M_{\text{E}} \times Q$, M_{Zn} 为醋酸锌标准溶液的质量浓度;
 M_{E} 为 EDTA-2Na 标准溶液的质量浓度;
 Q 为 EDTA-2Na 标准溶液消耗的体积;
 W 为样品质量

2.4.3 供试品溶液的制备 取九香止泻方的干浸膏粉约 0.5 g, 精密称定, 置 250 mL 量瓶中, 加水 150 mL 超声提取 30 min, 放冷, 用水稀释至刻度, 摇匀, 静置, 使固体沉淀, 滤过, 弃去 50 mL 初滤液, 精密量取续滤液 20 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.4.4 重现性试验 取九香止泻方减压干燥法制成的干浸膏粉, 平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.4.2”方法测定总鞣质的量, 计算得总鞣质质量分数的 RSD 为 0.037%。

2.4.5 稳定性试验 将减压干燥法制成的供试品溶液在 0、1、2、4、6、8、12、24 h 按“2.4.2”方法测定总鞣质的量, 计算得总鞣质质量分数的 RSD 为 0.037%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 总鞣质的测定 取两种干燥工艺制得的干浸膏粉制备成供试品溶液, 测定总鞣质的量, 重复 3

表 1 九香止泻方中秦皮甲素和秦皮乙素的测定 ($n=3$)

Table 1 Determination of esculin and aesculetin in Jiuxiang Zhixie Prescription ($n=3$)

干燥方式	秦皮甲素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	秦皮乙素/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
减压干燥	109.40 \pm 1.598	64.65 \pm 0.848
喷雾干燥	94.95 \pm 0.718	63.15 \pm 0.459

次, 比较两种干燥方法总鞣质质量分数的差异, 结果见表 2。由完全随机 t 检验结果可知, 减压干燥与喷雾干燥总鞣质的量差别无统计意义, 说明两种干燥方法对总鞣质量的影响是一致的。

表 2 九香止泻方中总鞣质的测定 ($n=3$)

Table 2 Determination of total tannins in Jiuxiang Zhixie Prescription ($n=3$)

干燥方式	总鞣质/%
减压干燥	15.55±0.185 2
喷雾干燥	15.44±0.117 2

3 讨论

采用 HPLC 测定秦皮甲素和秦皮乙素, 灵敏度高, 专属性强, 稳定性好, 重复性好, 精密度高, 回收率高, 简便、快速、准确, 可用于工艺研究。由实验结果可知, 减压干燥秦皮甲素量高于喷雾干燥, 秦皮乙素、总鞣质的量差别无统计学意义, 两种干燥方法皆适用。综合考虑各有效成分量的差异, 减压干燥优于喷雾干燥。

两种干燥工艺比较中选用秦皮甲素、秦皮乙素及总鞣质的量作为评价指标, 理由是秦皮在方中为君药, 秦皮甲素和秦皮乙素是其主要有效成分; 方中臣药椿皮, 主要药理作用为止泻、收敛, 其有效成分为鞣质, 实验表明该药材鞣质的量为全方药材鞣质量的 50%, 络合滴定法测定九香止泻方中总鞣质的量, 稳定性好, 重复性好, 简便快速, 可用于工艺研究。

减压干燥简便经济, 可操作性强, 但干燥效率相对较低, 生产周期相对较长。喷雾干燥对于中药制药行业, 其应用有着独特的作用, 简化并缩短了提取液到半成品的时间, 提高了生产效率和产品质量, 但也存在一些问题: 难于处理黏度较大的浓缩液, 损耗大、收率较低及热敏性物料在喷雾干燥时易氧化分解。

参考文献

[1] 张金慧, 彭芝配, 滕久祥, 等. 九香止泻片体外抑菌作用的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28 (6):

35-37.

[2] 彭芝配, 滕久祥, 张金慧, 等. 九香止泻片对小鼠体内抑菌作用的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(5): 32-34.

[3] 彭芝配, 张金慧, 李 为, 等. 九香止泻片对腹腔注射细菌致死量小鼠白细胞、淋巴细胞计数的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(5): 16-18.

[4] 滕久祥, 彭芝配, 尹 进, 等. 九香止泻肠溶片对急性腹泻模型小鼠腹泻指数及腹腔毛细血管通透性影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6): 34-36.

[5] 尹 进, 彭芝配, 滕久祥, 等. 九香止泻片长期口服对大鼠生理机能及相关指标的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2006, 26(6): 18-21.

[6] 彭芝配, 滕久祥, 伍参荣, 等. 九香止泻肠溶片对副溶血弧菌活性及小鼠小肠功能亢进模型的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(4): 23-25.

[7] 马 薇, 龙霖梓, 彭芝配, 等. 九香止泻片对腹泻型肠易激综合征大鼠血浆 VIP、NPY 和肠黏膜 5-HT 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(6): 29-32.

[8] 李 为, 滕久祥, 彭芝配, 等. 九香止泻肠溶片治疗湿热型急性感染性腹泻临床研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(2): 48-50.

[9] 赵碧清, 何 群, 彭芝配, 等. 九香止泻片木香挥发油提取及包合工艺研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(1): 22-25.

[10] 罗 堃, 滕久祥, 彭芝配, 等. 九香止泻素片成型工艺研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(2): 40-42.

[11] 赵碧清, 李 慧, 彭芝配, 等. 九香止泻片肠溶包衣工艺的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 43-45.

[12] 赵碧清, 何 群, 滕久祥, 等. 秦香止泻片半成品及成品吸湿性研究 [J]. 中成药, 2010, 32(5): 770-772.

[13] 赵碧清, 何 群, 滕久祥, 等. HPLC 法测定九香止泻片中秦皮甲素和秦皮乙素的含量 [J]. 中国药房, 2010, 21(7): 626-628.

[14] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[15] 刘玉明, 靳小青, 黄宝康, 等. 依地红皮肤消毒剂中鞣质的含量测定 [J]. 中国现代中药, 2006, 8(6): 24-25.

[16] 孔 琪. 五倍子鞣质的提取及抑制亚硝化反应的初步研究 [J]. 应用科技, 2005, 32(9): 62-64.