粒径对甘草粉末中甘草酸、甘草苷的影响

张立国，闫志慧，陈　露，倪力军*
华东理工大学化学与分子工程学院，上海　200237

摘　要：目的　研究粒径对常用中药甘草粉末中活性成分（甘草酸、甘草苷）的质量分数及其体外溶出性能的影响，为甘草粉末的制备提供适宜的粒径范围。**方法**　将甘草粉碎、过筛制成 7 种不同粒径规格的样品并进行其粒度测试和扫描电镜分析，采用 TCL 法对样品进行定性鉴别；采用 HPLC 法分析样品中甘草酸、甘草苷的量及其体外溶出性能。**结果**　样品中甘草苷和甘草酸的量随粒径减小而增大。2 种成分的量在 300～900 μm、105～300 μm 及小于 105 μm 这 3 种粒径间波动比较平稳，且粒径 105～150 μm 样品有效成分有良好的体外释放度。**结论**　在甘草粉末制备过程中，将粒径控制在 105～150 μm，可使样品中活性成分甘草酸、甘草苷的量较高、稳定并有良好的体外释放性能。

关键词：甘草；甘草酸；甘草苷；粒径；体外释放
中图分类号：R282.7；284.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2013)23 - 3328 - 06
DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.013

Effect of particle size on glycyrrhizic acid and liquiritin of *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder

ZHANG Li-guo, YAN Zhi-hui, Chen Lu, NI Li-jun
School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: Objective　To study the effect of particle size on the contents and *in vitro* dissolution performances of the active ingredients (glycyrrhizic acid and liquiritin) in *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder, for the purpose of providing the appropriate particle size during the preparation of *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder. **Methods**　Seven *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder samples with different particle sizes were prepared in present work. Their micro-topography structures were characterized by particle size distribution and scanning electron microscopy (SEM). Thin-layer chromatography (TLC) was applied to qualitatively identify these samples. The contents and *in vitro* release performance of glycyrrhizic acid and liquiritin in the seven powder samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results**　The contents of glycyrrhizic acid and liquiritin increased with the decrease of particle sizes of the *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder samples. When the powder sizes were in the range of 300－900 μm, 105－300 μm or less than 105 μm, the contents of liquiritin and glycyrrhizic acid were stable. And 105－150 μm sample had good release performance *in vitro*. **Conclusion** Controlling the particle size between 105 and 150 μm during the granulation process of preparing *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder would make the contents of liquiritin and glycyrrhizic acid in *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder higher, stable and have good *in vitro* release performance.

Key words: *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma*; glycyrrhiza acid; liquiritin; particle size; HPLC; *in vitro* release

甘草 *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* 是腰痛宁胶囊、芎菊上清片（丸）等中成药制剂中的常用组方药材[1]，通过粉碎、筛分方式制粒、整粒后入药。从工艺角度而言，将药材粉末的粒径控制在一定范围内可以改善其流动性、便于后续工艺生产。因此过筛是中药胶囊、片剂、颗粒剂等制剂生产的必备工艺。由于中药材中的活性成分在药材不同组织中的量存在差异，而药材组织结构的差异会导致其颗粒学性质不完全相同[2]。如某些易碎组织在粉碎过程中易于形成小颗粒，而一些不易粉碎的组织则在

收稿日期：2013-06-17
基金项目：上海市科学技术委员会支撑计划项目（13401901100）
作者简介：张立国（1963—），男，辽宁建平人，副教授，硕士生导师，研究方向为中药、天然产物质量分析与控制。
Tel/Fax: (021)64253045　E-mail: zlgfyt@163.com
*通信作者　倪力军　Tel: (021)64253045　E-mail: nljfyt@163.com

大颗粒粉末中较多，会导致药材活性成分在不同粒径粉末中分布不均匀，使得相关中药制剂批内的均一性较差。此外，研究表明改变中药材的粒度可促进其有效成分的溶出释放、减少用药量、提高生物利用度[3]。本课题组前期研究发现不同粒径马钱子粉中有效成分（马钱子碱、士的宁）量及其体外释放均存在差异[3-4]。甘草酸和甘草苷是甘草的主要活性成分，具有镇咳、消炎、解毒、抗菌、抗肿瘤、抗病毒及调血脂和抗动脉粥样硬化等药理作用[5-9]。有研究表明超微粉碎前后甘草中甘草黄酮、甘草酸的量和体外释放存在显著差异[10-11]。本实验通过制备不同粒径范围的甘草粉末，考察粒径对甘草活性成分的量及其体外溶出性能的影响，为含甘草的中成药中的甘草入药粒径提供依据，以期提高相关中药批内质量的均一性及其生物利用度。

1 仪器与材料

Quanta TM250 环境扫描电子显微镜（美国 FEI 公司）；Mastersizer 2000 激光粒度仪（英国马尔文仪器有限公司）；LC—20AD—XR 型 UFLC（日本岛津有限公司）；FW177 型中药粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司）；SE602F 型分析天平（奥豪斯仪器有限公司）；ML104/02 电子天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）；20、100、140 目标准筛（上海宝蓝实验仪器制造有限公司）；40 目标准筛（浙江绍兴越东仪器筛具厂）；60 目标准筛（浙江上虞市肖金五金仪器厂）；200 目标准筛（南京东脉科仪有限公司）；100～1 000 μL 移液枪（德国普兰德公司）；DS—3510DTH 超声波清洗器（上海生析超声仪器有限公司）；S25 型 pH 计（上海雷磁科学仪器厂）；硅胶板（上海鑫楚实业有限公司）；ZRS—8G 溶出仪（天津市天大天发科技有限公司）。

甘草 *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* 饮片（批号 Y013-110301-1，由承德颈复康药业有限公司提供，经承德颈复康药业有限公司执业药师王春民鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎）；对照品甘草苷（批号 111610-201005）、甘草酸铵（批号 110731-201116）购于中国食品药品检定研究院；乙腈（德国默克公司）；胃蛋白酶（国药集团化学试剂有限公司），其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同粒径甘草粉末样品的制备

称取甘草饮片 7 份，每份 300 g，置于 60 ℃的干燥箱中烘干 2 h；粉碎并过筛，将 7 份样品分别制备成小于 900 μm 全粉、450～900 μm、300～450 μm、150～300 μm、105～150 μm、74～105 μm、小于 74 μm 的甘草粉末样品。

2.2 样品的扫描电镜测试

将各甘草粉末样品分别均匀地铺展于粘有导电胶的样品座表面，用电子扫描仪中测量其粒径，并用显微镜观察样品的微观组成和形貌特征。图 1 表明：小于 900 μm 全粉样品中粉末大小不一，部分表皮和木质部已被分开；150～300 μm、300～450 μm、450～900 μm 的样品中含有撕裂状的成束纤维和表面粗糙的大颗粒，这些纤维组织主要来自表皮；而 105～150 μm、74～105 μm、小于 74 μm 样品中颗粒逐步减小且球形度提高，样品颗粒较均匀，看不到明显的管状结构，颗粒表面光滑且未生成撕裂的毛边。可知小粒径样品中甘草的木质部分组织较多。

2.3 样品的粒度测试

除小于 900 μm 全粉外，使用 Mastersizer 2000 激光粒度仪（干法进样）测定 6 种不同粒径范围的甘草粉末的粒度。由表 1、图 2 可知各甘草粉末样品的粒径在一定范围内分布，且分布呈正态。

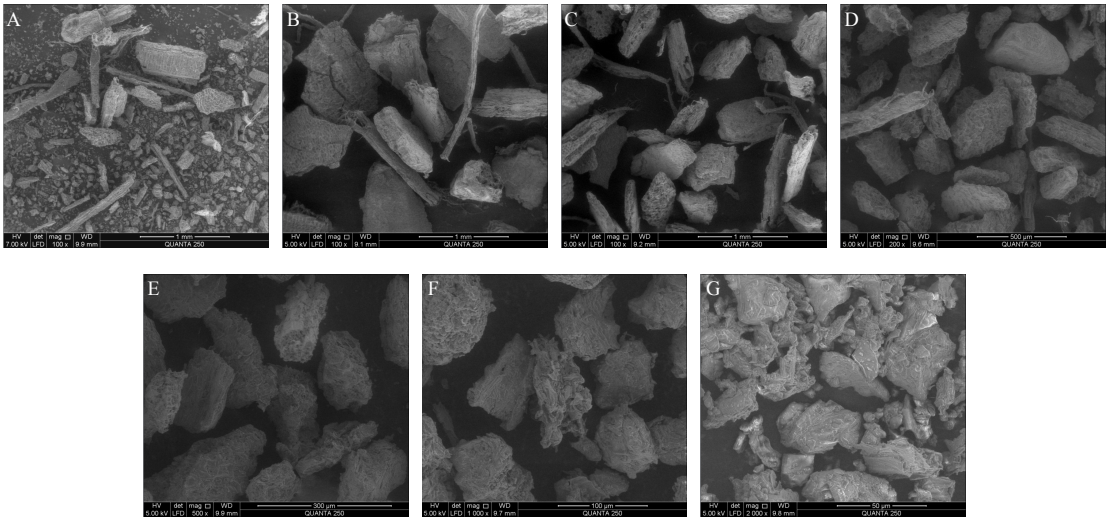
2.4 样品的定性鉴别

采用薄层色谱法对各甘草粉末样品进行定性鉴别[12]。用点样毛细管吸取对照品与供试品溶液，分别点于硅胶 G 薄层板上，以氯仿-甲酸-醋酸（8∶2∶2）为展开剂（展距 8 cm），取出晾干，喷以 5%三氯化铝乙醇溶液，再次晾干。将薄层点板放于紫外灯（254 nm）下观察，若样品中含有甘草酸和甘草苷，则在相应的位置会出现荧光斑点。图 3 表明本研究制备的不同粒径甘草粉末样品中均含有甘草酸和甘草苷，即本研究样品制备方式未改变甘草的化学组分。

2.5 各样品中甘草酸和甘草苷的测定

2.5.1 色谱条件 Inertsil ODS-SP 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为 0.05%磷酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0～20 min，32%～50%乙腈；20～28 min，32%乙腈。SPD-M20A 光电二极管阵列紫外-可见光检测器，检测波长 237 nm，体积流量 1.0 mL/min，柱温 30 ℃。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草苷对照品 10.3 mg，用 70%乙醇定容至 25 mL，摇匀，即得质量浓度为 0.412 mg/mL 的甘草苷对照品溶液；精密称取甘草酸铵对照品 7.7 mg，用 70%乙醇定容至



A-小于 900 μm 全粉 B-450～900 μm C-300～450 μm D-150～300 μm E-105～150 μm F-74～105 μm G-小于 74 μm
A-less than 900 μm (coarse powder) B-450－900 μm C-300－450 μm D-150－300 μm E-105－150 μm F-74－105 μm G-less than 74 μm

图 1 不同粒径甘草粉末的扫描电镜图

Fig. 1 SEM micrographs of *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder samples with different particle sizes

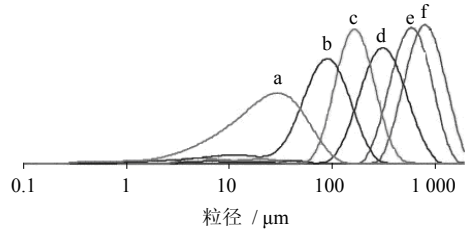
表 1 6 个甘草粉末样品的粒径测试结果

Table 1 Test results of particle size of six *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder samples

样 品	$D_{(4,3)}$ / μm	$d_{0.1}$ / μm	$d_{0.5}$ / μm	$d_{0.9}$ / μm
450～900 μm	874.062	477.946	812.540	1 367.078
300～450 μm	644.819	346.160	596.710	1 012.455
150～300 μm	346.182	159.356	313.212	589.679
105～150 μm	174.716	88.073	164.548	283.603
74～105 μm	89.262	22.719	82.531	159.985
小于 74 μm	27.870	5.421	22.641	57.852

$D_{(4,3)}$-体积平均粒径；$d_{0.1}$、$d_{0.5}$、$d_{0.9}$-纵坐标累积分布 10%、50%、90%分别所对应的粒径值

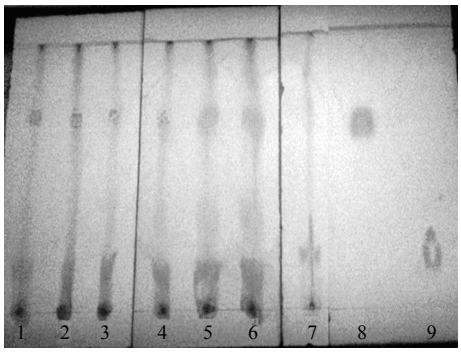
$D_{(4,3)}$-Volume average diameter; $d_{0.1}$, $d_{0.5}$, $d_{0.9}$-10%, 50%, 90% of the cumulative distribution in the vertical axis of the corresponding particle size value, respectively



a-小于 74 μm b-74～105 μm c-105～150 μm d-150～300 μm e-300～450 μm f-450～900 μm
a-less than 74 μm b-74－105 μm c-105－150 μm d-150－300 μm e-300－450 μm f-450－900 μm

图 2 6 个甘草粉末样品的粒度分布

Fig. 2 Particle size distribution of six *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder samples



1-450～900 μm 2-300～450 μm 3-150～300 μm 4-105～150 μm 5-74～105 μm 6-小于 74 μm 7-小于 900 μm 全粉 8-甘草苷对照品 9-甘草酸铵对照品
1-450－900 μm 2-300－450 μm 3-150－300 μm 4-105－150 μm 5-74－105 μm 6-less than 74 μm 7-less than 900 μm (coarse powder) 8-reference substance of liquiritin 9-reference substance of ammonium glycyrrhizinate

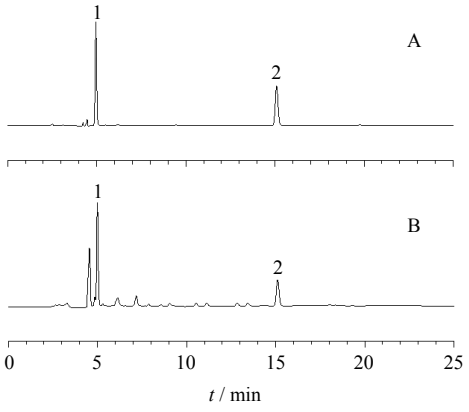
图 3 各甘草样品与对照品的 TLC 色谱图

Fig. 3 TLC of *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder with different particle sizes and reference substances

10 mL，摇匀，即得质量浓度为 0.77 mg/mL 的甘草酸铵对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 根据《中国药典》2010 年版所述方法制备供试品溶液。分别称取 7 份甘草粉末样品约 0.2 g（各 3 份），将称好的每份样品置于 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 70%乙醇 100 mL，密塞，称定质量，超声处理 30 min，放冷，用 70%乙醇补足减少的质量，摇匀后滤过，取续滤液

即得。由图 4 所示的对照品、供试品色谱图可知，供试品和对照品在上述色谱条件下色谱分离度高，峰形尖锐。其中，甘草苷的保留时间为 4.96 min，甘草酸的保留时间为 15.11 min。



1-甘草苷 2-甘草酸铵

1-liquiritin 2-ammonium glycyrrhizinate

图 4 混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

2.5.4 方法学考察 分别精密吸取“2.5.2”项中甘草苷对照品溶液 1 000 μL、甘草酸铵对照品溶液 900 μL，混合后用 70%乙醇溶液定容至 5 mL，摇匀即得含甘草苷（74.2 μg/mL）与甘草酸铵（154.0 μg/mL）的混合对照品溶液。分别进样 3、4、5、6、9、10 μL，以对照品的质量（ng）为横坐标、峰面积为纵坐标，回归计算得甘草苷的回归方程为 Y＝2 297.9 X＋24 784（r＝1.000 0）；甘草酸铵的回归方程为 Y＝550.78 X－2 830.7（r＝1.000 0）；表明甘草苷与甘草酸铵分别在 0.2～1.0 μg、0.45～2.00 μg 线性关系良好。

取上述混合对照品溶液，按照“2.5.1”项色谱条件重复进样 6 次，记录色谱峰面积，计算得甘草苷、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.77%、0.12%，表明方法的精密度良好。

以 150～300 μm 供试品溶液进行重复性、12 h 内稳定性及加样回收率考察，甘草苷、甘草酸铵重复性、12 h 稳定性及加样回收率的 RSD 分别为 0.89%与 1.5%，0.49%与 2.2%，1.13%与 1.46%；甘草酸铵与甘草苷的平均回收率分别为 100.09%与 100.00%，表明供试品溶液的重复性、12 h 内稳定性及加样回收率良好。

2.5.5 样品测定 按照“2.5.1”项下的色谱条件，用外标法计算甘草苷与甘草酸的量，结果见表 2。

表 2 不同粒径甘草粉末中甘草苷和甘草酸的测定结果 (n＝3)

Table 2 Contents of liquiritin and glycyrrhizic acid in *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* powder with different particle sizes (n＝3)

粒 径	甘草苷 / %	甘草酸 / %
小于 900 μm 全粉	1.13	2.89
450～900 μm	0.73	2.07
300～450 μm	0.76	2.18
150～300 μm	1.14	3.11
105～150 μm	1.28	3.39
74～105 μm	1.51	3.74
小于 74 μm	1.68	4.14

由表 2 可看出，除小于 900 μm 的全粉外，甘草粉末样品中甘草苷与甘草酸铵的量随着样品粒径的减小而增大，可能的原因：一是粒径变小，甘草粉末粒子比表面积增大，有助于其有效成分的溶出与提取；二是小粒径样品中含有的甘草木质部分组织较多，甘草木质部的活性成分的量大于表皮组织。从而导致甘草有效成分的量随粒径减小而增大。在 300～900 μm、105～300 μm 及小于 105 μm 粒径间，甘草酸铵与甘草苷的量波动范围比较平稳（9.0%～12.3%）。

2.6 样品在不同溶出介质中的体外释放研究

准确称取 3.0 g 甘草粉末，以人工胃液或者人工肠液为溶出介质，体积为 900 mL，采用浆法（转速 100 r/min，温度 37.0 ℃）测定溶出度。当甘草粉末完全浸入溶出介质时开始计时，分别在 0、5、10、15、20、40、45、60、80、100、120 min 时取样 2 mL，并及时补充 2 mL 溶出介质。按照“2.5.1”项方法测定各取出样品中的甘草苷、甘草酸的量。每个样品进行 3 次平行溶出实验，取平均值作为累计释放率并计算其在每个时间点下的 RSD。

累计释放率＝取样点目标物的量 / 投样量中目标物的量

由图 5-A 可以看出，无论是在人工肠液还是人工胃液，甘草苷在 20 min 就已释放达到平衡浓度，各粒径甘草苷的最大累积释放率有所不同并且均大于 100%。也有文献报道马钱子粉末样品中马钱子碱在人工胃液 20 min 后的累积释放率大于 100%[4]。这些现象说明《中国药典》2010 年版测试方法[1]未能将这些样品中的活性成分完全浸出，以致一定时间后人工胃（肠）中甘草苷、马钱子碱这类活性成分的释放总量高于《中国药典》2010 年版方法测得

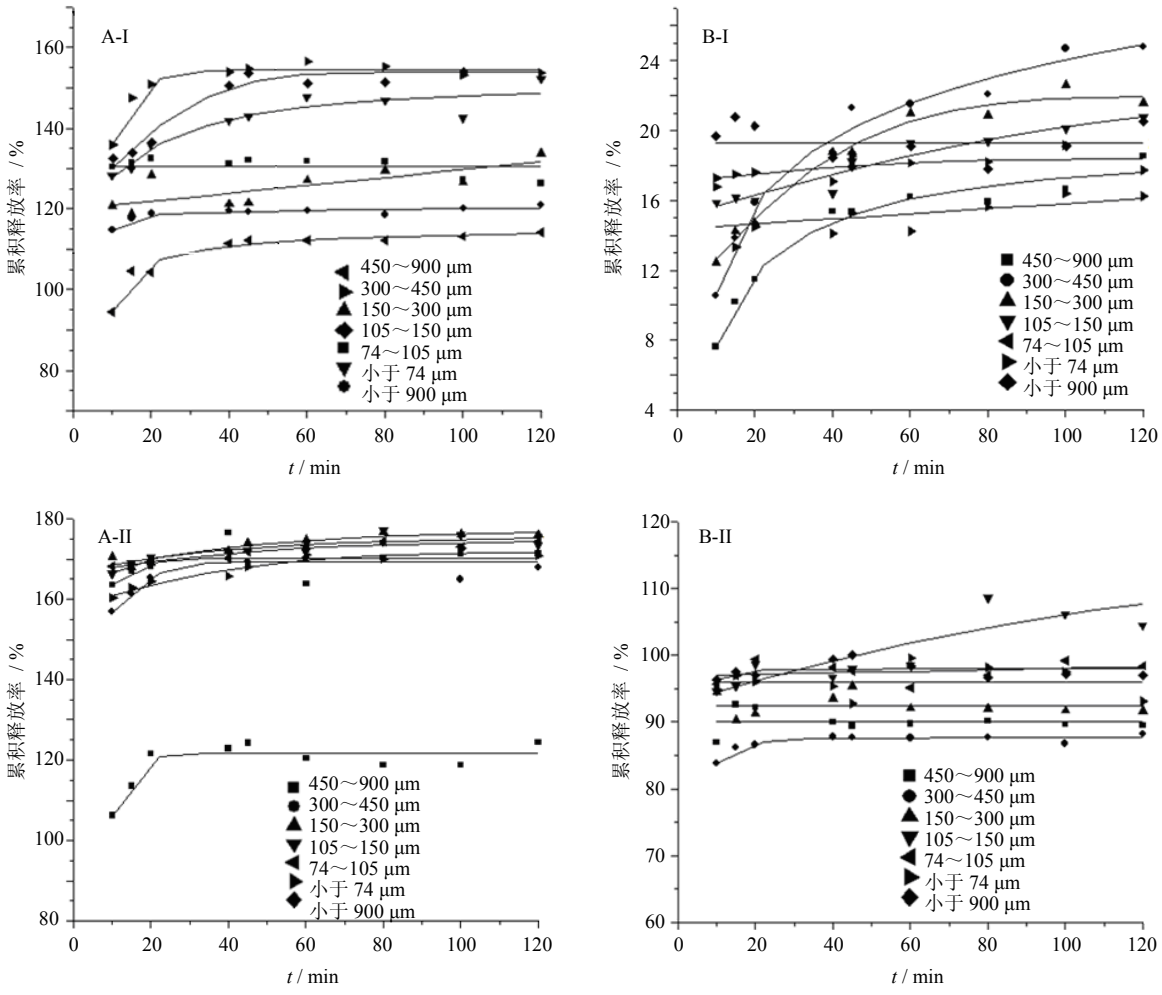


图 5 甘草苷 (A) 和甘草酸 (B) 在人工胃液 (I) 和人工肠液 (II) 中的累积释放率

Fig. 5 Cumulative release rates of liquiritin (A) and glycyrrhizic acid (B) in artificial gastric juice (I) and artificial intestinal juice (II)

的药粉中的量。由图 5-B 可知，甘草酸的累积释放率变化平缓，虽然图中某些实验点波动较大，但每个时间下累积释放率的 RSD 均小于 5%，在 HPLC 的测量误差范围之内。图 5-B-I 显示甘草酸在 60 min 后溶出基本趋于平缓，但仍会缓慢溶出，可推知人工胃液这种酸性介质抑制了甘草酸的溶出，导致甘草酸的最大累积释放率均小于 30%。图 5-B-II 与图 5-B-I 相比可明显看出甘草酸在人工肠液的释放效果优于人工胃液，说明其碱性介质有利于甘草酸的释放。

从图 5 可知，2 种成分的体外释放速率与粒径的关系无规律性，这与文献报道一致[11]。74～105 μm 和小于 900 μm 的全粉样品的甘草苷与甘草酸累积释放率在整个溶出过程中变化较小且在后期基本趋于水平。虽然小于 105 μm 粒径的样品中甘草苷与甘草酸的量很高，但大部分时间点下其体外累计释放率接近或低于 105～150 μm 样品的值。综合 2 种活性成分在甘草粉末中质量分数的稳定性、体外释放特点及实际中药整粒和造粒过程对粉末流动性的要求，选取 105～150 μm 粒径较为适宜。

3 讨论

甘草粉末样品中的纤维组织、颗粒的分散性与粒子表面的光滑性随粒径的减小而提高；各样品的粒径分布均符合正态分布且具有代表性。

甘草粉碎粒径与其有效成分的量有显著负相关，但甘草样品粒径与溶出性能无显著正相关与负相关性。

在 300～900 μm、105～300 μm 及小于 105 μm 这 3 个粒径区间，本实验所制备的甘草粉末中甘草酸和甘草苷量的波动为 10%左右，可以满足制剂工

艺的误差要求。

目前，中药的超微粉碎仍处于研究阶段，尚未大规模工业化。本实验通过考察粒径对甘草活性成分含量及体外溶出性能的影响，表明以 105～150 μm 作为甘草粉末造粒与整粒的粒径区间，不仅可以使样品中甘草酸、甘草苷保持较高且稳定的质量分数，并具有较好的体外释放性能，可为腰痛宁胶囊等中成药中甘草的入药粒径提供依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 倪力军, 盖 群, 陈 露, 等. 不同粒径马钱子粉中马钱子碱、士的宁的含量分析与比较 [J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2012, 38(2): 195-199.

[3] 宋 英, 谈 静, 胡 原. 中药微粉技术的发展与展望 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(8): 89-91.

[4] 盖 群. 腰痛宁胶囊中马钱子粉的制备方式对其质量和体外溶出性质的影响 [D]. 上海: 华东理工大学, 2012.

[5] 马 靖, 符乃阳, 李玉梅, 等. 甘草提取物体外选择性诱导几种人肿瘤细胞凋亡 [J]. 癌症, 2001, 20(8): 806-811.

[6] 李铁民, 梁再赋. 甘草提取物及其衍生物的抗病毒研究现状 [J]. 中草药, 1994, 25(12): 655-658.

[7] Cirillo G, Curcio M, Parisi O I, *et al*. Molecularly imprinted polymers for the selective extraction of glycyrrhizic acid from liquorice roots [J]. *Food Chem*, 2011, 125(3): 1058-1063.

[8] Isbrucker R A, Burdock G A. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006, 46(3): 167-192.

[9] 黄群荣, 马 哲. 甘草酸的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 384-387.

[10] 刘 莉, 吴柳萍, 刘 强. 甘草不同粒径粉末的粉体特性和体外溶出实验研究 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(5): 1079-1081.

[11] 何 昱, 钟 涛, 陈 龙, 等. 不同粒度甘草超微粉甘草酸溶出情况的比较 [J]. 中成药, 2011, 33(1): 171-173.

[12] 刘 斌, 倪 建. 中药有效部位及成分提取工艺和检测方法 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.