

参术益肠丸普通粉体和超微粉体溶出行为比较研究

祁 俊, 刘亮镜*, 江玲丽

芜湖市中医医院 制剂室, 安徽 芜湖 241000

摘要: 目的 比较参术益肠丸细粉和超微粉中主要活性成分葛根素、芍药苷和甘草苷溶出情况, 为其生产工艺优化提供实验依据。方法 采用高效液相色谱法分别对参术益肠丸中主要活性成分在不同溶出介质中相对累积溶出率进行定量研究。色谱条件: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (11:89); 体积流量 1.5 mL/min; 检测波长 230 nm; 进样量 10 μL。结果 细粉中葛根素和甘草苷在水和人工胃液中相对累积溶出率大于超微粉, 而细粉中芍药苷在水和人工胃液中相对累积溶出率小于超微粉。人工肠液中超微粉和细粉的溶出行为相似。结论 适度的微粉化能促进参术益肠丸有效成分的溶出, 其溶出行为还受到不同溶出介质的影响, 超微粉碎技术应用于参术益肠丸还需进一步研究。

关键词: 参术益肠丸; 葛根素; 芍药苷; 甘草苷; 超微粉碎技术; 溶出度; 人工胃液; 人工肠液; 高效液相色谱法

中图分类号: R283.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)16-3333-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.012

Comparative study on basic chemical dissolubility of Shenzhu Yichang Pills fine and ultrafine powders

QI Jun, LIU Liang-jing, JIANG Ling-li

Department of Pharmacy, Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, China

Abstract: Objective To compare the differences in the dissolution behavior of puerarin, paeoniflorin, and liquiritin between ultrafine powder and fine powder of Shenzhu Yichang Pills to provide experimental evidence for optimize the production technology. **Methods** The relative cumulative dissolution rates of powders of Shenzhu Yichang Pills in different dissolution mediums were quantitatively studied by HPLC column of Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase of CH₃CN-0.1% H₃PO₄ (11:89), flow rate of 1.5 mL/min, detection wavelength of 230 nm, and the volume of injection was 10 μL. **Results** The relative cumulative dissolution rates of puerarin and liquiritin in distilled water and artificial gastric fluid for fine powder were bigger than that for ultrafine powder, but the relative cumulative dissolution rates of paeoniflorin in distilled water and artificial gastric fluid for fine powder were smaller than that for ultrafine powder. The dissolution behavior of fine powder was similar to that of ultrafine powder in artificial intestinal fluid. **Conclusion** An appropriate degree of ultrafine grinding can promote the dissolution of active ingredients of Shenzhu Yichang Pills, and the dissolution is influenced by the dissolution medium. Further research is needed to the application of ultrafine grinding technology for Shenzhu Yichang Pills.

key words: Shenzhu Yichang Pills; puerarin; paeoniflorin; liquiritin; ultrafine grinding technology; dissolution rate; artificial gastric fluid; artificial intestinal fluid; HPLC

中药丸剂由药材细粉与适宜的辅料制成, 其有效成分的释放与药材细粉的破壁率和表面积有关。参术益肠丸主要由白术、炒白芍、党参等多味药材组成, 具有健脾益肠、化湿止泻功效。该方作为医院的协定方应用 20 多年, 疗效显著^[1], 为进一步将该方开发成中药新药, 需对其有效成分溶出进行研

究, 以便为今后申报新药奠定技术基础。为此, 本实验建立了高效液相色谱 (HPLC) 法测定参术益肠丸中葛根素、芍药苷和甘草苷 3 种有效成分的量, 对同批普通细粉和超微粉所制丸中 3 种成分在超纯水、人工胃液和人工肠液中的溶出情况进行比较, 为超微粉在丸剂中的应用提供实验依据。

收稿日期: 2017-07-25

基金项目: 芜湖市科技惠民项目 (2014hm31); 安徽省中医药科研课题 (2016zy41)

作者简介: 祁 俊 (1966—), 男, 本科, 副主任药师, 研究方向为中药制剂分析。Tel: 13955313339 E-mail: whszyyyqj@163.com

*通信作者 刘亮镜, 硕士, 研究方向为中药化学及制剂分析。Tel: 13696561963 E-mail: liulj1@126.com

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent1200 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); Mettler Toledo XP205 电子天平、Mettler AE240 电子天平 (瑞士梅特勒托利多公司); UPS-11-10T 优普系列超纯水器 (成都优普净化科技有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); WKSJ-120 粉碎机 (山东省青州市精诚医药装备制造有限公司); WZM-15A 中药制丸机 (河南周口制药机械厂); QYF-260 气流粉碎机组 (江苏省昆山市超微粉碎机厂); BT-9300H 激光粒度分布仪 (丹东市百特仪器有限公司)。RCZ-8M 溶出试验仪 (天津市天大天发科技有限公司)。

1.2 试药

对照品葛根素 (批号 110752-201313)、甘草苷 (批号 111610-201106)、芍药苷 (批号 110736-201337) 均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均大于 98%。参术益肠丸 (自制普通细粉, 批号为 160501、160601、160701); 参术益肠丸组成药材从亳州市中药饮片厂购得, 其中白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. (批号 20151201)、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall. (批号 20150901)、党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. (批号 20151101) 经南京中医药大学潘扬教授鉴定均为正品药材。药用糊精 (批号 160418, 安徽山河药用辅料股份有限公司); 胃蛋白酶 (批号 20151201, 酶活力 $\geq 3\ 000\ \text{U/g}$)、胰蛋白酶 (批号 20151201, 酶活力 $\geq 1\ 000\ \text{U/g}$) 购于

上海展云化工有限公司, 甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯; 乙醇为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 参术益肠丸中葛根素、芍药苷和甘草苷测定

2.1.1 对照品储备液及混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量, 加甲醇制成 $64.13\ \mu\text{g/mL}$ 葛根素对照品储备液、 $364.0\ \mu\text{g/mL}$ 芍药苷对照品储备液和 $336.2\ \mu\text{g/mL}$ 甘草苷对照品储备液。精密量取葛根素对照品储备液 $1\ \text{mL}$ 、芍药苷对照品储备液 $2.5\ \text{mL}$ 、甘草苷对照品储备液 $0.5\ \text{mL}$ 至 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 加甲醇定容, 制成含葛根素 $6.413\ \mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 $91\ \mu\text{g/mL}$ 和甘草苷 $16.81\ \mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取参术益肠丸, 研细、混匀, 取约 $3.0\ \text{g}$, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 $100\ \text{mL}$, 密塞, 称定质量, 超声 ($300\ \text{W}$, $40\ \text{kHz}$) 提取 $30\ \text{min}$, 放冷, 再称定, 用 70%乙醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 按处方中药味 (普通细粉) 的比例制成缺葛根、炒白芍和甘草的阴性对照样品 $200\ \text{g}$, 按“2.1.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.1.4 色谱条件 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 ($150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (11:89); 体积流量 $1.5\ \text{mL/min}$; 检测波长 $230\ \text{nm}$; 柱温 $30\ ^\circ\text{C}$; 进样量 $10\ \mu\text{L}$ 。

在上述色谱条件下, 参术益肠丸中葛根素、芍药苷和甘草苷 3 个成分分离良好, 理论塔板数以各成分计均大于 $4\ 000$, 分离度大于 1.5, 见图 1。

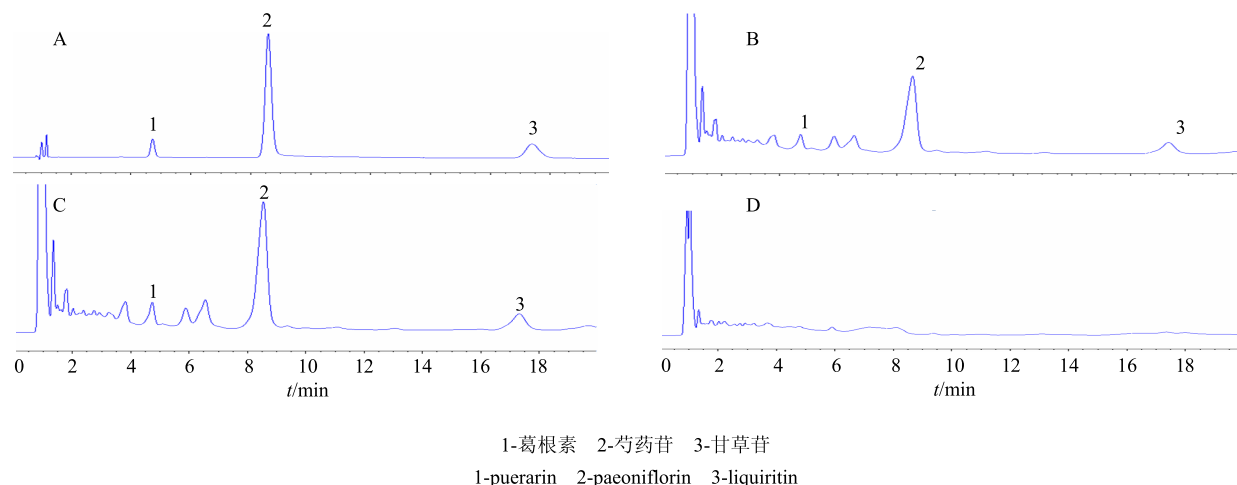


图 1 混合对照品 (A)、普通细粉样品 (B)、超微粉样品 (C)、阴性对照样品 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of mixture reference substance (A), fine powder sample (B), ultrafine powder sample (C), and negative sample (D)

2.1.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1、3、5、7、10、15 μL ，分别注入液相色谱仪，测定峰面积。结果以峰面积为纵坐标 (Y)，进样量为横坐标 (X)，绘制标准曲线。得到各对照品的标准曲线及线性范围见表 1，各标准曲线在线性范围内线性关系良好。

表 1 参术益肠丸中 3 种成分线性关系考察结果

Table 1 Standard curve of three components in Shenzhu Yichang Pills

指标成分	线性方程	r	线性范围/ ng
葛根素	$Y=1\,366\,X+8.549$	0.999 9	6.41~96.20
芍药苷	$Y=1\,286\,X+20.46$	0.999 9	91.00~1\,365.00
甘草苷	$Y=1\,609\,X+7.849$	0.999 9	16.81~252.20

2.1.6 检测限、定量限考察 制备含葛根素 64.13 ng/mL 、芍药苷 910.0 ng/mL 和甘草苷 168.1 ng/mL 的混合对照品溶液，并稀释成一系列质量浓度的溶液，分别精密吸取混合对照品溶液 10 μL ，进样测定，以 3 倍信噪比为检测限，以 10 倍信噪比为定量限。结果葛根素、芍药苷和甘草苷的定量限分别为 0.641 3、0.910 0、1.681 ng ，检测限分别为 0.192 4、0.273 3、0.504 4 ng 。

2.1.7 精密度试验 分别精密吸取混合对照品溶液 5 μL ，连续进样 5 次，考察方法的精密度，结果葛根素、芍药苷和甘草苷峰面积 RSD 分别为 1.2%、0.2%和 1.5%，表明仪器精密度良好。

2.1.8 重复性试验 取批号为 160501 的参术益肠丸样品，按“2.1.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液，进样测定 3 个成分的峰面积，计算其质量分数。结果样品中葛根素、芍药苷和甘草苷平均质量分数分别为 0.125、1.511、0.239 mg/g ，RSD 分别为 1.3%、1.4%和 0.4%，表明方法的重复性好。

2.1.9 稳定性试验 取批号为 160501 的参术益肠丸样品的供试品溶液，分别于 0、4、8、12、18、24 h 进样分析，测定 3 个成分的峰面积，结果葛根素、芍药苷和甘草苷峰面积 RSD 分别为 1.2%、0.6%和 1.7%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已测定的参术益肠丸样品 (批号 160501) 1.5 g，共 6 份，分别加入葛根素、芍药苷和甘草苷对照品储备液 0.5、12.5、2.5 mL ，按照按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定。结果葛根素、芍药苷和甘草苷平均回收率分别为 101.4%、102.4%和 100.8%，RSD 分别为

1.8%、0.8%和 1.3%。

2.1.11 样品测定 将“2.1.2”项下制备的 3 批供试品溶液按“2.1.4”项下色谱条件进行测定，分别用外标法计算 3 个批次中葛根素、芍药苷和甘草苷的质量分数，结果见表 2。

表 2 样品中 3 种成分测定结果

Table 2 Results of three components in samples

批号	质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$		
	葛根素	芍药苷	甘草苷
160601	0.134	1.511	0.274
160701	0.130	1.510	0.308
160501	0.132	1.533	0.245

2.2 超微粉及细粉制参术益肠丸中 3 种成分质量分数的比较

按生产处方取参术益肠丸原料药材一批，混合，常规粉碎，过 5 号筛，得到药材细粉。将上述细粉等分 2 份，其中一份经气流粉碎机粉碎成粒径 D_{50} 为 30 μm 左右的超微粉体^[1]，另一份为普通细粉，普通细粉和超微粉 2 份原料分别按照相同的生产工艺制成丸剂。分别按“2.1.2”项下制备供试品溶液，按“2.1.4”项下色谱条件进行测定，用外标法计算 2 种粉体制丸剂中葛根素、芍药苷和甘草苷的量，普通细粉制丸中葛根素、芍药苷和甘草苷的质量分数分别为 0.132、1.533、0.245 mg/g 。超微粉制丸中葛根素、芍药苷和甘草苷的检出质量分数分别为 0.181、2.048、0.310 mg/g 。葛根素、芍药苷和甘草苷在超微粉制丸中的检出量比普通细粉分别高了 37.1%、33.6%、26.5%。

2.3 不同溶出介质下累积溶出率比较

2.3.1 供试品溶液制备 分别取同批原料药材粉碎，分别制备成细粉制参术益肠丸和超微粉制参术益肠丸各约 30 g，精密称定，投入溶出仪中，按照《中国药典》2015 年版四部溶出度桨法测定法^[2]，以超声脱气的 900 mL 超纯水为溶出介质，转速 100 r/min ，温度为 $(37.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$ ，分别于 5、15、30、45、60 min 各取样 2 mL ，滤过，取续滤液过 0.45 μm 滤膜，得到以超纯水为溶出介质的供试品溶液，供测定，同时向杯中补充相同温度和体积的超纯水。同样方法，按照《中国药典》2015 年版四部崩解时限检查法项下附注制备人工胃液和人工肠液^[2]，溶出实验步骤同超纯水，分别得到以人工胃液和人工肠液为溶出介质的供试品溶液。

2.3.2 测定结果 取所制备的供试品溶液,按照“2.1.4”项色谱条件测定,根据线性方程计算葛根素、芍药苷和甘草苷累积溶出量,分别以所测得的葛根素、芍药苷和甘草苷的最大值对应的累积溶出量作为 100%,其他累积溶出量与之相比,得到样品在各溶出介质中葛根素、芍药苷和甘草苷的相对累积溶出率,以相对累积溶出率为纵坐标,时间为横坐标作图,绘制相对累积溶出率变化曲线,见图 2。

葛根素、芍药苷和甘草苷的相对累积溶出率曲线显示,粉体粒度对于参术益肠丸不同成分的溶出

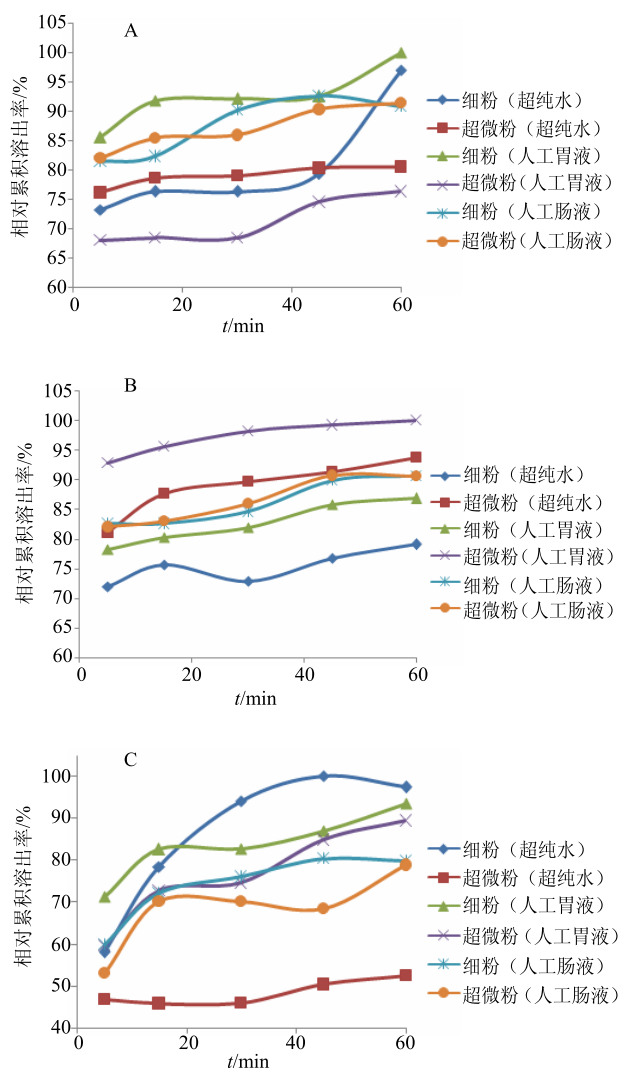


图 2 参术益肠丸细粉和超微粉中葛根素 (A)、芍药苷 (B) 和甘草苷 (C) 在超纯水、人工胃液和人工肠液溶出介质中的相对累积溶出率

Fig. 2 Relative cumulative dissolution rates of Shen-zhu Yichang Pills ultrafine and fine powders for puerarin (A), paeoniflorin (B), and liquiritin (C) in distilled water, artificial gastric fluid, and artificial intestinal fluid

行为影响可存在明显差异,葛根素和甘草苷在不同溶出介质中细粉的溶出率稍大于超微粉的溶出率,而芍药苷在不同介质中超微粉的溶出率明显大于细粉。对于同一成分在不同溶出介质中的溶出结果显示,葛根素在人工胃液中超微粉和细粉的溶出差异最大,而甘草苷在超纯水中超微粉和细粉的溶出差异最大,芍药苷在超纯水和人工胃液中超微粉和细粉差异均较大。而三者共同点是在人工肠液中超微粉和细粉的溶出行为相似,粒度对其影响较小。

3 讨论

3.1 供试品制备方法的选择

查阅《中国药典》2015 年版一部中葛根、白芍和甘草的定量测定样品制备方法^[3],三者提取溶剂均为乙醇,只是浓度存在差异,考虑工艺中其他辅料的溶解以及对色谱峰的影响,选择较优的 70%乙醇为提取溶剂。葛根提取方法为加热回流提取,白芍和甘草均为超声提取,通过实验比较以及回收率试验证明,超声处理 30 min 的方法能完全提取所测成分,故采用此方法为供试品制备的方法。

3.2 色谱条件的选择

在流动相的选择上,查阅了相关文献报道^[4-7],乙腈-磷酸溶液系统应用较多,通过实验发现效果良好,并且简单方便。色谱柱考察了 250 mm 的 Agilent C₁₈ 柱,洗脱后显示峰形较宽,改为 150 mm 柱,同时增加体积流量为 1.5 mL/min,结果峰形较好,分离时间较短,20 min 内能对该 3 种成分进行完全洗脱。检测波长的选择,通过紫外扫描葛根素、芍药苷和甘草苷的最大吸收,葛根素在 250 nm 有最大吸收,芍药苷在 230 nm 有最大吸收和甘草苷在 230 nm 和 275 nm 最大吸收相同,综合考虑设定 230 nm 为该方法的测定波长。

3.3 不同溶出介质的溶出考察

复方中药成分复杂,在人体内吸收时存在各成分间的相互作用,为探究参术益肠丸方普通细粉和超微粉在人体内外的溶出情况,本实验按照《中国药典》2015 年版四部溶出度测定法第二法,模拟体内环境,以人工胃液和人工肠液为溶出介质,测定葛根素、芍药苷和甘草苷在体内的溶出情况,并同在体外超纯水中的溶出比较。综合实验结果,超微粉中芍药苷的溶出优于细粉,而葛根素和甘草苷的溶出不如细粉,在人工肠液中超微粉和细粉的溶出行为差异很小。这与褚洪标等^[8-10]

研究的杜仲、黄柏和厚朴等中药材超微粉和普通细粉在蒸馏水、人工胃液和人工肠液中的溶出差异结果相似,杜仲和厚朴超微粉在蒸馏水和人工胃液中的溶出优于普通细粉,而在人工肠液中溶出则不规则;相反黄柏超微粉在人工肠液中溶出较大,在蒸馏水和人工胃液中溶出一定时间后累计溶出度并不优于普通粉体。由此可以看出,超微粉的溶出不是简单的增加,而不同的粒径和不同的成分都会影响溶出度,为超微粉在中药制剂中的应用提供一定的参考。

3.4 研究的意义及思考

HPLC 法同时测定葛根素、芍药苷和甘草苷有过文献报道^[5-6],但色谱分析均采用梯度洗脱,本实验采用提高体积流量等度洗脱的方式实现对这3种成分的分离,效果良好。粉碎是丸剂制备中关键步骤,超微粉碎应用于参术益肠丸的生产,可使丸剂的表面光滑,色泽均匀一致,有效成分葛根素、芍药苷和甘草苷的量平均比同批细粉制丸高出26%以上,有利于提高产品质量和疗效。但通过模拟体内环境进行溶出实验发现,只有芍药苷在超微粉中溶出大于细粉的溶出,葛根素和甘草苷在超微粉的溶出反而小于细粉,可能与粉碎的粒径大小相关,文献报道药材有效成分的溶出并不是随着粒径减小而无限增加^[11],而是存在一个临界粒径,不仅每味药材的临界粒径不同,并且每种成分的临界粒径也存在差异,才导致同一粒度不同成分溶出度的差异。

优选最佳的成分比例才是制剂质量控制的目标,需要配合药理毒理实验进一步研究。

参考文献

- [1] 刘亮镜,祁俊,朱和平,等. 参术益肠超微粉体粒度分布和显微特征比较 [J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(4): 62-64.
- [2] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 刘杨,袁勇,陈卫东,等. HPLC 同时测定复方降糖提取物中4种有效成分的含量 [J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2016, 34(4): 463-467.
- [5] 闫涛,周慧. HPLC 法同时测定心脑血管片中11种成分 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1531-1534.
- [6] 吴江瑞,齐广才,崔生飞,等. HPLC 法同时测定肠胃宁胶囊中6种有效成分的含量 [J]. 中药材, 2015, 38(11): 2414-2417.
- [7] 姜晖,王绍志,张熙洁,等. HPLC 法同时测定利脑心胶囊中6种成分的含量 [J]. 中国药房, 2015, 26(3): 374-376.
- [8] 梁兆昌,褚洪标,肖琳,等. 杜仲超微粉体理化特性及体外溶出性能研究 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1609-1613.
- [9] 褚洪标,张洋萍,肖琳,等. 厚朴不同粒径粉体溶出行为比较研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12): 2220-2227.
- [10] 褚洪标,汪小英,张燕军,等. 黄柏不同粒径粉体显微特征及溶出性能研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(9): 1620-1625.
- [11] 张晶,王秀全,王德清,等. 超微粉碎对人参中皂苷测定量的影响 [J]. 食品科学, 2009, 30(18): 96-97.