

· 工艺与制剂 ·

五灵脂低温超微粉碎特性考察

王小平^{1,3}, 韩丽^{1*}, 任桂林¹, 柯刚², 张定堃¹, 黄攀¹, 杨明^{1,2}

- (1. 成都中医药大学, 中药资源系统研究与开发利用重点实验室, 成都 611137;
2. 江西中医学院, 现代中药制剂教育部重点实验, 南昌 330004;
3. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000)

[摘要] **目的:** 研究五灵脂的粉体学性质, 探讨其粉体学性质与体外溶出行为的相关性。 **方法:** 采用振动式低温超微粉碎机对五灵脂进行粉碎, 每3 min 取样, 检测样品粒径、比表面积、孔隙率; 以总黄酮含量为指标, 考察五灵脂粉体的体外溶出速率, 并分析其粉体学性质与体外溶出行为的相关性。 **结果:** 随着粉碎时间的增加, 粒径逐渐减小, 比表面积及体外溶出速率逐渐增加; 粉末粒径与体外溶出速率具有良好相关性。五灵脂粉碎时间选择21 min, 粒径以 $d_{0.9}$ 约100 μm 为宜。 **结论:** 五灵脂低温超微粉碎后粒子形态及结构均匀, 溶出速率快, 有助于后续制剂工艺及质量控制的评价。

[关键词] 粒径; 比表面积; 孔隙率; 吸附-脱附等温线; 溶出速率; 五灵脂; 粉体学特性

[中图分类号] R283.2; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000026.html>

[网络出版时间] 2014-02-07 15:07

Investigation of Cryogenic Pulverization Properties of Faeces Trogopterori

WANG Xiao-ping^{1,3}, HAN Li^{1*}, REN Gui-lin¹, KE Gang²,
ZHANG Ding-kun¹, HUANG Pan¹, YANG Ming^{1,2}

- (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of System Research and Development of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China; 2. Jiangxi University of TCM, Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Nanchang 330004, China;
3. Jiangxi Traditional Chinese Medical College, Fuzhou 344000, China)

[Abstract] **Objective:** To study powder properties of Faeces Trogopterori and investigate relativity between powder properties and *in vitro* dissolution behavior. **Method:** Faeces Trogopterori was crushed by vibration type low temperature ultrafine pulverizer, sampling every 3 min, particle size, specific surface area and porosity of samples were detected; With the content of total flavonoids as index, *in vitro* dissolution rate of Faeces Trogopterori powder was investigated, relativity between powder properties and *in vitro* dissolution behavior was analyzed. **Result:** With increasing grinding time, particle size decreased, specific surface area and *in vitro* dissolution rate increased; Powder size and *in vitro* dissolution rate had a good correlation. Grinding time of Faeces Trogopterori selected 21 min, but particle size of $d_{0.9}$ should choose was about 100 μm . **Conclusion:** After low-temperature ultrafine ground of Faeces Trogopterori, particle morphology and structure was uniform with high dissolution rate, which was helpful for subsequent evaluation of preparation process and quality control.

[收稿日期] 20130809(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274098)

[第一作者] 王小平, 在读博士, 从事中药制剂新技术、新剂型研究, Tel:028-61800127, 18970408858, E-mail: jxrcwxp@163.com

[通讯作者] * 韩丽, 教授, 硕士生导师, 从事中药制剂研究, Tel:028-61800127, E-mail: hanliyx@163.com

[Key words] particle size; specific surface area; porosity; adsorption-desorption isotherms; dissolution rate; Faeces Trogopteroni; powder properties

五灵脂又名药本、寒号虫粪、灵脂等,具有活血止痛、化瘀止血的功效,常用于治疗胸痛、痛经、产后血瘀疼痛、虫蛇咬伤等症^[1-3],主要成分包括黄酮类、酚酸类、三萜类和核苷类等化合物^[4-6],其中黄酮类成分与该药味主要功效——活血化瘀具有相关性^[7]。五灵脂中含有大量纤维,普通粉碎难度大,难以获得粒子形态及结构均匀的粉体,影响制剂后续的混合、成型工序及体外溶出行为,难以保证临床疗效。本实验采用振动式低温超微粉碎方式对五灵脂进行粉碎,研究其粉体学性质,同时以总黄酮含量为指标,考察五灵脂粉体的体外溶出速率,探讨粉体学性质与体外溶出行为的相关性。

1 材料

SYFM-8 II 型振动式药物超微粉碎机(济南倍力粉技术工程有限公司),BD-02A 型高速多功能粉碎机(上海冰都电器有限公司),Mastersizer 2000 型激光粒度仪(马尔文公司),TriStar3000 型全自动比表面积及孔隙率测定仪(美国麦克公司),DZF-6050 型真空干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司),AB265-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FST-III-10 型精密型超纯水机(上海富诗特),TU-1901 型紫外-可见分光光度计(北京普析),ZRS-8L 型智能溶出实验仪(天津市盛鑫通达科技有限公司)。醋五灵脂饮片(四川科伦天然药物有限公司,经成都中医药大学中药炮制教研室许润春副教授鉴定为鼯鼠科动物复齿鼯鼠 *Trogopterus xanthipes* Milne-Edwards 的干燥粪便),山奈酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110861-200808,纯度 98%),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备 将五灵脂饮片置于 60 ℃ 烘箱中真空干燥 3 h,利用高速多功能粉碎机粉碎至全部过四号筛,过五号筛 ≤ 60%,经 60 ℃ 真空干燥至含水率 < 4%,得五灵脂初始粉末。称取该粉末 800 g,运用振动式药物超微粉碎机于 -10 ℃ 粉碎,每隔 3 min 取样,直至 25 min 全部取出,置干燥器中密封保存。

2.2 粒径的测定 称取样品 10 份,每份约 3 g,置于表面皿中,真空干燥 4 h,利用激光粒度仪测定各样品的粒子体积累积分布图中 90% 处粒径值($d_{0.9}$),以 $d_{0.9}$ 为纵坐标,粉碎时间为横坐标,得回归

方程 $Y = 0.3577X^2 - 19.966X + 364.84$ ($r = 0.9978$, $P < 0.001$)。结果表明五灵脂在粉碎过程中存在快速变化区-缓慢变化区-粉碎平衡区-逆粉碎区,在 0 ~ 21 min 内 $d_{0.9}$ 由 360 μm 迅速减小至 100 μm,为粉碎的快速变化区,表明大块物料被快速粉碎成碎物料并伴有细胞壁破碎过程;21 ~ 24 min 内 $d_{0.9}$ 仅由 100 μm 减小至 92 μm,为缓慢变化区,药物呈研细状态;由方程推算在 27.91 min 时粒径达最小值 86.23 μm,而后粒子聚集,粒径增加,进入逆粉碎区。

2.3 比表面积及孔隙率的测定 称取五灵脂初始粉末和粉碎 9, 15, 21, 25 min 粉末,分别置于称量瓶中,减压干燥除去大部分水分,将待测粉体样品装有一段封闭的试管状样品管内,用普通氮气吹至样品恒重,测定各样品的比表面积与孔隙率,结果见表 1, 2 和图 1。

表 1 五灵脂比表面积的测定 $m^2 \cdot g^{-1}$

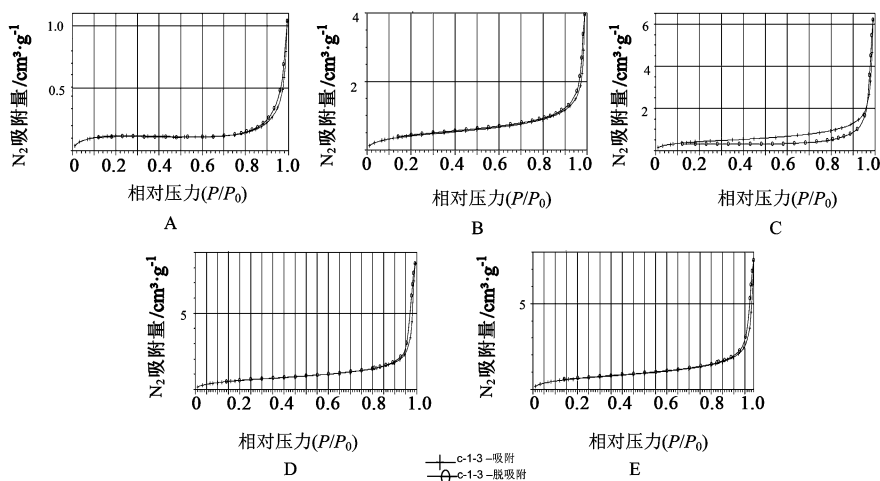
| 样品 | BET | t-Plot | BJH 累积 | BJH 累积 |
|-----------|---------|---------|-------------------------|-------------------------|
| | 比表面积 | 外部表面积 | 吸附表面积 (17 ~ 3 000 Å) | 脱附表面积 (17 ~ 3 000 Å) |
| 初始粉末 | 0.434 5 | 0.302 5 | 0.171 7 | 0.162 0 |
| 粉碎 9 min | 1.601 6 | 1.951 6 | 1.574 2 | 1.615 4 |
| 粉碎 15 min | 1.638 7 | 1.849 6 | 1.565 5 | 0.808 2 |
| 粉碎 21 min | 2.325 6 | 2.966 8 | 2.451 4 | 2.459 9 |
| 粉碎 25 min | 2.501 0 | 3.138 4 | 2.567 4 | 2.619 3 |

表 2 五灵脂孔体积的测定 $cm^3 \cdot g^{-1}$

| 样品 | 单点吸附 | t-Plot | BJH 累积 | BJH 累积 |
|-----------|-----------|------------|-------------------------|-------------------------|
| | 总孔体积 | 微孔体积 | 吸附孔体积 (17 ~ 3 000 Å) | 解吸孔体积 (17 ~ 3 000 Å) |
| 初始粉末 | 0.001 604 | 0.000 049 | 0.001 508 | 0.001 516 |
| 粉碎 9 min | 0.006 115 | -0.000 227 | 0.006 202 | 0.006 208 |
| 粉碎 15 min | 0.009 587 | -0.000 155 | 0.009 658 | 0.009 497 |
| 粉碎 21 min | 0.012 775 | -0.000 398 | 0.012 871 | 0.012 860 |
| 粉碎 25 min | 0.011 619 | -0.000 402 | 0.011 734 | 0.011 729 |

由表 1, 2 可知,随着粉碎时间的增加,粒径变小,比表面积及孔隙率增加。相对于原粉,粉碎 25 min 五灵脂粉末比表面积约为原粉的 6 倍,孔隙率为原粉的 7 倍多。粉碎时间由 15 min 增至 21 min 时,比表面积迅速增加,当继续增加粉碎时间至 25 min 时,比表面积增加缓慢,与五灵脂粉碎后粒径变化规律相一致。

由图 1 可知,5 种样品的吸附-脱附等温线均属于 IV 型^[8],高压部分曲线陡然增加,表明样品中均



A. 初始粉末; B. 粉碎 9 min; C. 粉碎 15 min; D. 粉碎 21 min; E. 粉碎 25 min

图 1 五灵脂样品吸附-脱附等温线

存在大孔。A, B, D, E 图中吸附-脱附曲线形状相似且基本闭合,说明样品孔形状和尺寸比较均匀,4 个样品的孔结构具有相似性^[9]。中压部分吸附脱附等温线重合,根据 Kelvin 方程可知孔半径很小,不会出现毛细管凝聚现象。C 图存在明显的滞后曲线,表明此时孔结构存在明显的狭窄裂隙孔,可能是粉碎 15 min 时五灵脂正处于细胞壁破裂阶段。A ~ D 图中粉体对 N₂ 吸附量依次增加,而 N₂ 吸附量又与粉体比表面积相关,与上述比表面积依次增大相吻合。E 图中 N₂ 吸附量略低于 D 图,可能是随着粉碎时间延长,粉体粒径不断减小,在比表面积增加的同时,由于粗细粉体的相互吸附而致孔隙率略有下降。

2.4 总黄酮的含量测定

2.4.1 对照品溶液的配制 精密称取于 105 °C 干燥 1 h 的山奈酚对照品 15.04 mg,置 100 mL 量瓶中,加无水乙醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4.2 供试品溶液的配制 称取五灵脂适量,粉碎过四号筛,精确称取粉末 0.2 g,置烧瓶中,加入无水乙醇 100 mL,称定质量,回流提取 2 h,称定质量,加无水乙醇补足失重,摇匀,滤过,取续滤液 0.5 mL,加无水乙醇定容至 5 mL 量瓶中,即得。

2.4.3 检测波长 选择分别量取对照品溶液、供试品溶液适量,加适量无水乙醇稀释,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,于 200 ~ 400 nm 进行全波长扫描,结果二者均在 268 nm 处有最大吸收。

2.4.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液备用。分别精密吸取上述续滤液适量,加无水乙醇稀释成

0.150, 0.301, 0.451, 0.602, 0.902, 1.203, 1.504 mg·L⁻¹ 的系列溶液,以无水乙醇作参比溶剂,于 268 nm 处测定吸光度(A),以样品质量浓度(C)对 A 进行回归,得回归方程 $A = 0.5907C + 0.0043$ ($r = 0.9994$),线性范围 0.150 ~ 1.504 mg·L⁻¹。

2.4.5 精密度试验 量取供试品溶液适量,加无水乙醇适量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液按 2.4.4 项下方法连续测定 6 次,结果 A 的 RSD 0.32%。

2.4.6 稳定性试验 取 2.4.5 项下续滤液,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 10 h 按 2.4.4 项下方法测定,计算 A 的 RSD 1.48%,表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.4.7 重复性试验 精密称取五灵脂粉末 6 份,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.4 项下方法测定,结果样品中总黄酮平均提取量以山奈酚计 0.724 mg·g⁻¹,RSD 2.18%。

2.4.8 加样回收率试验 分别精密称取已知总黄酮含量的五灵脂粉末 6 份,每份 0.1 g,各加入山奈酚对照品溶液 500 μL,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.4 项下方法测定,计算平均回收率,结果见表 3。

表 3 五灵脂中总黄酮含量测定的加样回收率试验

| No. | 称样量 /g | 样品中质量/mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|-----|---------|----------|---------|--------|--------|--------|
| 1 | 0.100 2 | 0.072 5 | 0.148 3 | 100.74 | 99.72 | 1.80 |
| 2 | 0.102 9 | 0.074 5 | 0.150 8 | 101.46 | | |
| 3 | 0.100 6 | 0.072 8 | 0.146 4 | 97.83 | | |
| 4 | 0.100 5 | 0.072 8 | 0.148 1 | 100.18 | | |
| 5 | 0.100 9 | 0.073 1 | 0.146 1 | 97.14 | | |
| 6 | 0.100 4 | 0.072 7 | 0.148 6 | 100.94 | | |

2.5 溶出度试验 选取五灵脂药材初始粉末及粉碎 3, 6, 9, 12, 15, 21, 25 min 粉末进行溶出试验。按 2010 年版《中国药典》二部附录中溶出度测定法第三法测定, 转速 $(50 \pm 1) \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 水浴温度 $(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$, 溶出介质为蒸馏水 100 mL。精密称取各样品 0.4 g, 分别置于溶出仪中进行溶出, 于 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240 min 时各取样 1 mL, 同时补充等体积同温度的溶出介质。样品溶液经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液 0.5 mL, 加无水乙醇 4.5 mL 稀释, 摇匀, 按 2.4.4 项下方法测定, 计算药物浓度, 以五灵脂中总黄酮提取量 $0.724 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 为 100%, 计算累积溶出率, 结果见图 2。

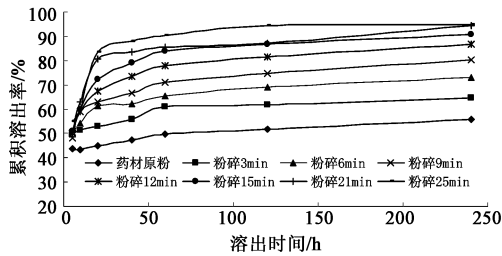


图 2 五灵脂粉末体外溶出曲线

将图 2 中累积溶出率按威布尔分布模型进行数据处理, 以 $\ln[1 - F(t)]^{-1}$ 为纵坐标, $\ln t$ 为横坐标进行直线回归, 计算各样品溶出参数 t_{50} (溶出 50% 的时间) 和 t_d (溶出 63.2% 的时间), 结果见表 4。

由图 2 和表 4 可知, 随着溶出时间延长, 五灵脂粉末中总黄酮的累积溶出率逐渐增加, 其中粉碎 15, 21, 25 min 的粉末在 240 min 时累积溶出率均 > 90%, 溶出程度相近。根据回归方程的斜率大小可知, 随粉碎时间的延长, 五灵脂粉末中总黄酮的溶出速度呈增加趋势。 t_{50} , t_d 值表明粉碎 21, 25 min 的粉末溶出速度较为接近。

2.6 粉末粒径与溶出速度相关性 根据 Noyse-Whitney 方程, 药物的溶出速度与粒径成正比关系。以药物溶出的平均速度为纵坐标, 各粉碎取样时间点的 $d_{0.9}$ 为横坐标, 得各样品回归方程, 结果见表 5, 表明五灵脂粉末粒径与溶出速度间线性回归关系具有统计学意义, 即药物粉末粒径越小, 溶出速度越快。提示当五灵脂药材以原粉入药时, 须粉碎成 $d_{0.9}$ 约 $100 \text{ } \mu\text{m}$ 的粉末, 以提高药物溶出与吸收速度, 增强药效。

3 讨论

药物只有在胃肠道中溶解形成溶液才能通过胃肠黏膜壁吸收入血进而发生治疗作用, 对中药散剂、丸剂等固体制剂而言, 药材溶出过程即为吸收的限

表 4 五灵脂粉末溶出参数

| 样品 | 回归方程 | r | t_{50} /min | t_d /min |
|-----------|-------------------------------|---------|------------------|---------------|
| 初始粉末 | $Y = 0.095 3X - 0.761 9^{2)}$ | 0.961 5 | 63.37 | 2 955.11 |
| 粉碎 3 min | $Y = 0.114 9X - 0.588 0^{2)}$ | 0.977 1 | 6.87 | 166.44 |
| 粉碎 6 min | $Y = 0.162 6X - 0.609 8^{2)}$ | 0.988 3 | 4.47 | 42.45 |
| 粉碎 9 min | $Y = 0.215 7X - 0.688 8^{2)}$ | 0.986 0 | 4.46 | 24.33 |
| 粉碎 12 min | $Y = 0.269 7X - 0.741 6^{2)}$ | 0.993 6 | 4.02 | 15.62 |
| 粉碎 15 min | $Y = 0.315 9X - 0.778 8^{2)}$ | 0.985 5 | 3.69 | 11.76 |
| 粉碎 21 min | $Y = 0.330 6X - 0.725 7^{2)}$ | 0.959 9 | 2.96 | 8.97 |
| 粉碎 25 min | $Y = 0.365 3X - 0.731 5^{1)}$ | 0.950 8 | 2.72 | 7.40 |

注: 经回归方程方差分析¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

表 5 五灵脂粉末粒径与溶出速度的回归方程分析

| 取样点/min | 回归方程 | r |
|---------|--------------------------------|---------|
| 5 | $Y = -0.005 3X + 11.052^{1)}$ | 0.828 3 |
| 10 | $Y = -0.006 6X + 6.863 7^{2)}$ | 0.923 6 |
| 20 | $Y = -0.006 6X + 4.648 3^{3)}$ | 0.980 6 |
| 40 | $Y = -0.003 5X + 2.471 1^{3)}$ | 0.994 1 |
| 60 | $Y = -0.002 3X + 1.704^{3)}$ | 0.991 2 |
| 120 | $Y = -0.001 2X + 0.883 4^{3)}$ | 0.989 4 |
| 240 | $Y = -0.000 6X + 0.459 4^{3)}$ | 0.992 6 |

注: 经回归方程方差分析, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

速步骤。根据 Noyse-Whitney 方程可知, 粒径大小是影响以中药原粉入药的固体制剂溶出速度的最重要因素之一, 故加强影响药物粒径大小的粉碎工艺研究对提升传统中药固体制剂的质量及临床疗效具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 唐旭刚, 黄文权. 五灵脂药理及临床应用概述[J]. 中国中医急症, 2008, 17(1): 101.
- [2] 牛维彬, 刘峥, 张邦启. 五灵脂质量标准的制定[J]. 医药导报, 2013, 32(1): 88.
- [3] 王岚, 李春, 杨连菊, 等. 野生与家养五灵脂药效学比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 268.
- [4] 焦玉, 王荣荣, 史超, 等. HPLC 法同时测定中药五灵脂中 3 种成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(7): 574.
- [5] 崔晓娟, 贺娟娜, 赵玉华, 等. 五灵脂药材中 3 种成分的薄层色谱鉴别[J]. 中国药业, 2011, 20(18): 68.
- [6] 李捷. HPLC 法测定五灵脂中 3 种成分的含量[J]. 现代中医药, 2010, 30(3): 86.
- [7] 陈月开, 陈少松, 王美素, 等. 五灵脂中黄酮类成分研究[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2005, 28(1): 98.
- [8] 陈金妹, 谈萍, 王建永. 气体吸附法表征多孔材料的比表面积及孔结构[J]. 粉末冶金工业, 2011, 21(2): 45.
- [9] 秦春风, 韩丽, 张定堃, 等. 微粉硅胶研磨改性对白芷提取物性质的影响[J]. 中国药师, 2013, 16(1): 9.

[责任编辑 全燕]