

## 微粉化增溶技术在残黄片工艺中的应用

陈红鸽<sup>1,2</sup>, 韩晋<sup>2</sup>, 袁海龙<sup>2\*</sup>, 高春生<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 中国人民解放军第 302 医院, 北京 100039)

**[摘要]** 目的: 考察微粉化残黄片的体外溶出度及退黄药效作用, 优选微粉化残黄片的超微粉粒度。方法: 以小檗碱为指标, 采用 HPLC 测定不同粉碎粒度的微粉残黄片在不同时间段的小檗碱溶出量, 计算累计溶出度, 观察溶出情况; 采用 4% ANIT 造成大鼠高黄疸模型, 按给药方案给药, 股动脉取血, 测定血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -GT) 等血清生化指标, 评价不同粉碎粒度的微粉残黄片的退黄效果。以体外溶出及退黄效果综合优选微粉化残黄片的超微粉粒度。结果: 随粉碎目数的增加, 黄连中小檗碱的累计溶出率增加, 200 目和 300 目 60 min 时累计溶出率可分别达 94.86%, 96.18%; 在退黄效果方面, 200 目残黄片可显著降低 ALT, AST 和  $\gamma$ -GT, 且作用强于 100, 150, 300 目的残黄片, 在降低 ALT 和  $\gamma$ -GT 作用上甚至优于对照药熊去氧胆酸片。综合残黄片的外观性状及生产实际, 确定最佳微粉粒度 200 目。结论: 以体外溶出及退黄效果综合优选微粉化残黄片的超微粉粒度是一种简便、可行的试验设计方法, 可推广应用。

**[关键词]** 残黄片; 超微粉碎; 溶出度; 退黄

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0014-04

**[doi]** 10.11653/syfj2013130014

**[收稿日期]** 20130123 (008)

**[基金项目]** 国家“重大新药创新”科技重大专项 (2011ZX09201-201-14, 2011ZX09201-201-35)

**[第一作者]** 陈红鸽, 硕士, 主管药师, 从事中药新型给药系统研究, Tel: 010-66933224, E-mail: gezichen@126.com

**[通讯作者]** \* 袁海龙, 博士, 主任药师, 从事中药新剂型研究, Tel: 010-66933367, E-mail: gezichen@126.com

### [参考文献]

- [1] Stonemetz D. A review of the clinical efficacy of evening primrose [J]. *Holist Nurs Pract*, 2008, 22 (3): 171.
- [2] 蒋顶云, 蒋长兴, 熊清平, 等. 皱皮木瓜中齐墩果酸的超临界 CO<sub>2</sub> 提取工艺优选 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18 (17): 20.
- [3] 李卫民, 王治平, 刘杰, 等. 超声强化超临界流体萃取对大黄总蒽醌提取效果的探究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16 (10): 20.
- [4] 王腾宇, 李振岚, 齐颖, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取月见草油的研究 [J]. *食品科技*, 2010, 35 (10): 222.
- [5] 谷满仓, 王辉, 蒋国潮, 等. 气相色谱法测定月见草籽超临界流体萃取物中有效成分的含量 [J]. *医学研究杂志*, 2009, 38 (2): 57.

- [6] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准. WS<sub>1</sub>-XG-2002 [S]. 北京: 国家食品药品监督管理局编委会, 2002: 26.
- [7] Vasquez L, Hurtado-Benavides A M, Reglero G, et al. Deacidification of olive oil by countercurrent supercritical carbon dioxide extraction: experimental and thermodynamic modeling [J]. *J Food Eng*, 2009, 90 (4): 463.
- [8] 李勇, 蒋海强, 巩丽丽, 等. 沉香种子超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物的气相色谱-质谱联用分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18 (16): 142.
- [9] Chen C R, Wang C H, Wang L Y, et al. Supercritical carbon dioxide extraction and deacidification of rice bran oil [J]. *J Supercrit Fluids*, 2008, 45 (3): 322.

[责任编辑 全燕]

# Application of Ultrafine Powder Solubilization Technology in Process of Canhuang Tablets

CHEN Hong-ge<sup>1,2</sup>, HAN Jin<sup>2</sup>, YUAN Hai-long<sup>2\*</sup>, GAO Chun-sheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Department of Pharmacy, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize particle size of ultrafine powder by investigating *in vitro* dissolution and receding jaundice effect of micronized Canhuang tablets (MCHP). **Method:** With berberine as index, release of berberine from MCHP with different crush size in different time periods was determined by HPLC, calculated cumulative dissolution, and then observed dissolution. At the same time, rats jaundice model was caused by 4% ANTI, after administered in accordance with dosing regimen, the femoral artery blood was collected for determining serum biochemical markers, such as ALT, AST, TBIL, DBIL and  $\gamma$ -GT, receding jaundice effect of MCHP with different grinding particle size was evaluated. Superfine powder particle size of MCHP was optimized by Comprehensive evaluating *in vitro* dissolution and receding jaundice effect. **Result:** With increasing of pulverized mesh, cumulative dissolution of berberine increased, cumulative dissolution of 200, 300 mesh was 94.86%, 96.18% at 60 min, respectively. For receding jaundice effect, Canhuang tablets with 200 mesh could significantly reduce ALT, AST and  $\gamma$ -GT, which was stronger than those of Canhuang tablets with 100, 150 and 300 mesh, furthermore, that of 200 mesh was superior to control drug ursodeoxycholic acid tablets in reducing ALT and  $\gamma$ -GT. Comprehensive appearance of tablets and actual production, 200 mesh was determined as optimum crush size. **Conclusion:** It was a feasible and convenient method to optimize ultrafine powder particle size of MCHP by combining *in vitro* dissolution and receding jaundice effect.

**[Key words]** Canhuang tablets; ultrafine grinding; dissolution; receding jaundice

超微粉体的比表面积较大,具有良好的溶解性、分散性、吸附性、化学反应活性<sup>[1]</sup>等优点。决明子<sup>[2]</sup>、三七<sup>[3]</sup>、黄芩<sup>[4]</sup>及葛根<sup>[5]</sup>等通过超微粉碎后体外溶出率显著增加,体内可吸收性和生物利用度亦得以提高。

本课题组前期已对基于超微粉碎技术的残黄片(军队医疗机构制剂,由黄连、青黛、白矾、郁金共4味药组成)溶出度进行了研究,证实超微粉碎技术可显著增加君药黄连中小檗碱的溶出度,且可改善粉体流动性,解决了压片成品率低的难题。在此基础上,本实验以体外溶出率及体内退黄药效作用为指标,对残黄片超微粉碎的最佳粒度进行考察,为更好地指导残黄片的生产,提高其临床疗效提供实验依据。

## 1 材料

粉碎机(济南松岳机器有限责任公司,由SYFM-8-1型振动微粉碎机、SYFM-8 II型微粉机器及QR58-3型制冷机组3个主要部分组成),1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),ZRS-6型智

能溶出仪(天津大学无线电厂)。盐酸小檗碱对照品(批号110713-200911,纯度98.14%,中国药品生物制品检定所),黄连、青黛、白矾、郁金(解放军第三〇二医院药房提供,经解放军第三〇二医院袁海龙研究员鉴定,均符合2010年版《中国药典》相关项下要求), $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT,纯度98%,Alfa Aesar公司,批号10149460),聚乙烯吡咯烷酮K30补充(PVP K30,购自北京凤礼精求商贸有限责任公司),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性Wistar大鼠,体重200~220g,由军事医学科学院动物中心,动物合格证号SCXK-(军)2007-004。

## 2 方法与结果

**2.1 微粉化残黄片的制备** 称取处方量黄连、青黛、白矾、郁金,超微粉碎,过100目筛,混匀,加适量淀粉和糖粉混匀。以10%PVP K30溶液润湿制粒。颗粒于80℃干燥,整粒,加0.3%硬脂酸镁,混匀,压片,即得。其余3种微粉化残黄片(超微粉碎,分别过150,200,300目筛)的制法同上。

## 2.2 体外溶出度考察

**2.2.1 溶出介质的选择** 模拟人体胃肠道环境, 选用 4 种不同溶出介质 [pH 1.0 盐酸溶液, pH 4.5 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 6.8 PBS, pH 7.5 PBS] 进行试验, 测定溶出度, 转速  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 分别于 5, 10, 20, 30, 45, 60 min 时取样 2 mL (并同时补加相同体积度的空白溶出介质), 立即用  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜滤过, 续滤液作为供试品溶液, 计算累积溶出率, 绘制累积溶出率-时间曲线 (图 1), 故选定 pH 1.0 盐酸溶液为溶出介质。

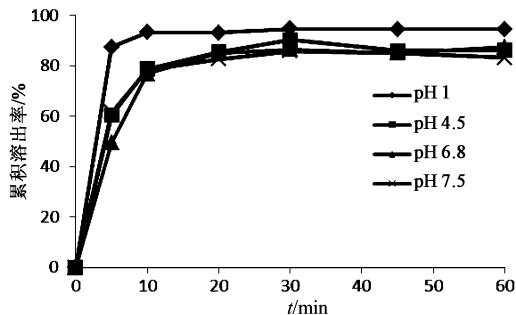


图 1 残黄片在不同溶出介质的累积溶出率-时间曲线

## 2.2.2 盐酸小檗碱的含量测定

**2.2.2.1 色谱条件** Alltima™ C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液 (50:50, 每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g, 用磷酸调节 pH 4), 检测波长 345 nm, 柱温 30 ℃。理论塔板数按盐酸小檗碱计算应不低于 5 000, 见图 2。

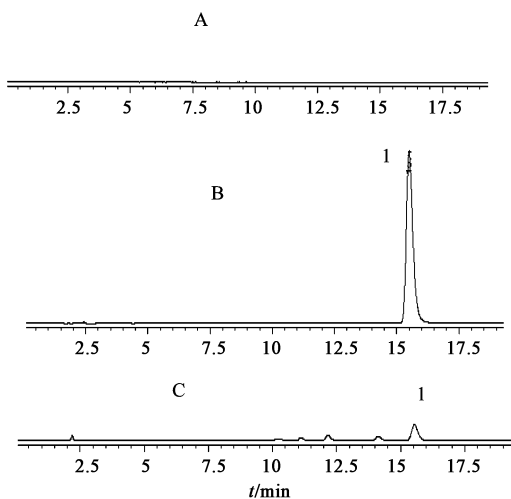


图 2 残黄片 HPLC

**2.2.2.2 对照品溶液的制备** 取盐酸小檗碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液, 即得。

**2.2.2.3 供试品溶液的制备** 取残黄片 6 片, 以 pH 1.0 盐酸溶液 900 mL 为溶出介质, 转速  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 按《中国药典》2010 年版附录 XC 第二法测定溶出度, 于 45 min 时取样 2 mL, 立即用  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2.2.4 线性关系的考察** 分别精密量取  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  小檗碱对照品贮备溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 10 μL 进样, 以峰面积积分为纵坐标, 小檗碱质量浓度为横坐标, 得回归方程  $Y = 36.854X - 0.9286 (r = 0.9999)$ , 表明小檗碱质量浓度在  $2.0 \sim 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好线性关系。

**2.2.2.5 精密度试验** 精密吸取  $8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸小檗碱对照品溶液 10 μL 进样, 按 2.2.2.1 项下色谱条件重复测定 6 次, 结果峰面积的 RSD 0.35%。

**2.2.2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8 h 测定峰面积, 结果 RSD 0.11%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

**2.2.2.7 重复性试验** 精密称取同一批样品 (自制, 批号 080609) 5 份, 按 2.2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.2.1 项下色谱条件测定, 结果峰面积的 RSD < 2%, 说明该方法重复性良好。

**2.2.2.8 回收率试验** 分别取已知含量 ( $5.26 \text{ mg}/\text{片}$ ) 的同一批样品 (批号 080609) 6 片, 分别精密加入盐酸小檗碱对照品各 5.50 mg, 按 2.2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 测定, 计算平均回收率 101.09%, RSD 2.02%。

**2.2.3 微粉粒度考察**<sup>[6]</sup> 取 100, 150, 200, 300 目药粉制成的残黄片各 6 片, 按《中国药典》2010 年版二部附录 XC 溶出度测定法第二法测定, 分别于 5, 10, 20, 30, 45, 60 min 时取样 2 mL (并同时补加相同体积的空白溶出介质), 立即用  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。分别吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL 进样分析, 测定盐酸小檗碱质量浓度, 计算其累积溶出度, 结果见图 2。说明随粉碎目数的增加, 君药黄连中小檗碱的累计溶出率随之增加, 200 目和 300 目的残黄片在 60 min 时的累积溶出率可分别达 94.86%, 96.18%。

**2.3 退黄作用研究**<sup>[7-8]</sup> Wistar 大鼠随机分为 7 组 [阳性对照组 (熊去氧胆酸片), 100 目残黄片组 (C<sub>1</sub>), 150 目残黄片组 (C<sub>2</sub>), 200 目残黄片组 (C<sub>3</sub>), 300 目残黄片组 (C<sub>4</sub>), 模型组 (M), 空白对照组 (等体积生理盐水)], 每组 8 只。各组分别灌胃给予相应药物, 残黄片组给药剂量  $0.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 熊去

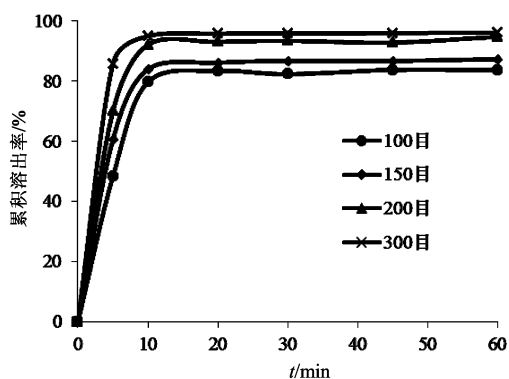


图3 不同微粉化残黄片的累积溶出率-时间曲线

表1 残黄片对胆汁淤滞性肝损伤大鼠血清学指标的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	ALT	AST	TBIL	DBIL	$\gamma$ -GT
空白	38.75 ± 12.74	132.38 ± 29.60	1.74 ± 3.83	0.16 ± 0.11	2.38 ± 1.51
M	803.13 ± 127.14 <sup>2)</sup>	622.75 ± 270.29 <sup>1)</sup>	77.78 ± 12.23 <sup>2)</sup>	68.44 ± 10.37 <sup>2)</sup>	8.50 ± 2.07 <sup>2)</sup>
阳性	886.25 ± 192.23 <sup>2)</sup>	523.75 ± 291.76	86.06 ± 14.16 <sup>2)</sup>	74.81 ± 12.26 <sup>2)</sup>	7.50 ± 3.16 <sup>2)</sup>
C <sub>1</sub>	728.75 ± 162.7 <sup>12)</sup>	756.88 ± 166.82 <sup>2)</sup>	87.78 ± 26.64 <sup>2)</sup>	74.76 ± 23.25 <sup>2)</sup>	7.04 ± 2.13 <sup>2)</sup>
C <sub>2</sub>	639.88 ± 230.67 <sup>2)</sup>	657.00 ± 308.21	92.61 ± 21.07 <sup>2)</sup>	79.63 ± 16.87 <sup>2)</sup>	5.93 ± 1.55 <sup>1,4)</sup>
C <sub>3</sub>	598.57 ± 193.67 <sup>2)</sup>	605.00 ± 279.21	83.61 ± 19.06 <sup>2)</sup>	72.63 ± 14.52 <sup>2)</sup>	4.81 ± 1.37 <sup>1,4)</sup>
C <sub>4</sub>	718.75 ± 101.58 <sup>2)</sup>	758.62 ± 221.00 <sup>2)</sup>	96.75 ± 23.62 <sup>2,3)</sup>	83.27 ± 16.56 <sup>2,3)</sup>	6.64 ± 1.37 <sup>2)</sup>

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与M组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

M组比较, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>组和阳性对照组大鼠的血清ALT, AST明显降低, 但无显著性差异;各用药组大鼠血清TBIL和DBIL均呈升高趋势;200目残黄片组大鼠血清 $\gamma$ -GT显著降低, 其余各给药组大鼠血清 $\gamma$ -GT也呈降低趋势, 但差异无显著性。说明在降低ALT, AST和 $\gamma$ -GT作用上, 200目残黄片强于100, 150, 300目的残黄片;其中在降低ALT和 $\gamma$ -GT的作用上, 残黄片优于对照药熊去氧胆酸片。故选择200目为残黄片的最佳超微粉碎粒度。

### 3 讨论

药用有效成分主要存在于细胞质和细胞核内, 细胞在完整无损的情况下, 有效成分只有通过细胞壁释放出来才能被利用。因此中药材超微粉碎在理论上有利于药物有效成分的溶出, 增加药材有效成分的提取率, 提高药物临床疗效。

基于超微粉碎技术制备的微粉化残黄片, 随粉碎目数的增加, 黄连中小檗碱的累计溶出率随之增加;在退黄研究中发现, 退黄作用并非与粉碎目数呈正相关, 粉碎目数由100目增加至200目的过程中, 退黄作用增强, 这可能是由于超微粉技术使药物能更好地分散、溶解在胃肠液里, 且与胃肠黏膜的接触面积增大, 更易被胃肠道吸收, 从而提高药物疗效, 然而从大鼠血清学指标数值上看, 200目残黄片退黄作用强于300目残黄片, 这可能是由于300目残

氧胆酸组给药剂量  $0.135 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。连续给药8 d, 且于第6 d给药1 h后, 阴性对照组灌胃等容量的橄榄油, 其余各组均按灌胃4% ANIT ( $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 复制黄疸模型, 造模的同时继续给药。至给药第8 d实验前全部动物禁食不禁水12 h。第8 d给药1 h后于腹主动脉取血, 分离血清, 同步检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -GT), 结果见表1。

由表1可知, 与阴性对照组比较, 模型对照组大鼠血清ALT, AST, TBIL, DBIL,  $\gamma$ -GT显著升高。与

黄片随着比表面积的增加, 表面能增加, 过细的粒子表面更易吸附空气和带有电荷, 影响其有效成分在胃肠道内的吸收, 降低药效。

### [参考文献]

- [1] 李春萌, 盖国胜, 何希辉, 等. 粉体技术在中药中的应用[J]. 中国粉体技术, 2004, 10(3): 48.
- [2] 李晓明, 王跌生, 闫寒, 等. 超微粉碎决明子对其大黄酮溶出量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(6): 6.
- [3] 刘产明, 杨洪元. 不同粉碎度三七体外溶出试验[J]. 中成药, 1998, 20(2): 17.
- [4] 王爱武, 耿晖, 魏巍, 等. 酒剂及超微粉碎对当归散中黄芩苷溶出效果的影响[J]. 山东中医杂志, 2001, 20(4): 237.
- [5] 苏瑞强, 何煜, 林峰, 等. 超微粉碎技术提高愈风宁心片溶出度的研究[J]. 中成药, 2002, 24(3): 167.
- [6] 李仙义, 靳世英, 靳士晓, 等. 基于超微粉碎技术的残黄片溶出度研究[J]. 解放军药理学学报, 2012, 28(6): 506.
- [7] 吕俊兰, 付珊珊, 郭静静, 等. 大黄用于治疗大鼠实验性黄疸的日服用次数初步研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3506.
- [8] 刘成, 杨宗国, 陆云飞, 等. 茯苓多糖退黄疸作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 195.

[责任编辑 全燕]