

复方贝母散超微粉体、细粉的化学性质与药效学对比

乐大勇¹, 王琼¹, 张隽², 吴清^{1*}, 王玉蓉¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 济宁市食品药品监督管理局, 山东 济宁 272000)

[摘要] 目的: 比较复方贝母散细粉和超微粉的化学性质和药效学。方法: 通过水溶性和醇溶性浸出物含量测定、TLC 鉴别和药物有效成分含量测定, 探讨平贝母、麻黄、甘草细粉和超微粉的化学性质变化。以小鼠咳嗽潜伏期和咳嗽次数为指标, 采用小鼠氨水引咳试验比较超微粉和细粉的止咳效果。结果: 化学性质研究表明超微粉中主要化学成分的性质和含量均未发生明显变化。复方贝母散超微粉形式对氨水引起的小鼠咳嗽有显著抑制作用, 与等剂量复方贝母散细粉形式相比, 作用更明显。结论: 与细粉相比, 超微粉主要化学成分未出现明显变化, 但药效增加 > 2 倍, 可减少服用剂量, 为超微粉碎技术在中药复方中推广应用提供实验依据。

[关键词] 复方贝母散; 超微粉碎技术; 化学成分; 药效学

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0039-05

Comparative of Chemical Properties and Pharmacodynamics Between Fine Powder and Ultra-Fine Powder of Compound Beimu Powder

YUE Da-yong¹, WANG Qiong¹, ZHANG Juan², WU Qing^{1*}, WANG Yu-rong¹

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Jining Food and Drug Administration, Jining 272000, China)

[Abstract] **Objective:** To compare chemical properties and pharmacodynamics between fine powder and ultra-fine powder of compound Beimu powder. **Method:** Change of chemical properties from fine powder and ultra-fine powder of *Fritillaria ussuriensis*, *Ephedra sinica* and *Glycyrrhiza uralensis* were investigated by determining the content of water-soluble and alcohol-soluble extract and active ingredients, thin layer chromatography (TLC) was used to identify these compounds. With cough latency and cough times of mice as indexes, antitussive effect of fine and ultra-fine powder was compared by ammonia induced cough in mice test. **Result:** Studies on chemical properties showed nature and content of main chemical composition from ultra-fine powder were not changed significantly. There was significantly inhibited of ultra-fine powder on mice cough which was caused by ammonia, it was more obvious by compared isodose fine powder of compound Beimu powder. **Conclusion:** Compared with fine powder, there was no obvious change of main chemical composition, but therapeutic effect improved 2 times, it could be reduce the dose of compound Beimu powder, results from this test would provide references for use of ultra-fine grinding technology in traditional Chinese medicine compound.

[Key words] compound Beimu powder; ultra-fine grinding technology; chemical composition; pharmacodynamics

超微粉碎技术既保留了中药传统饮片的优点, 性质, 提高药物疗效的重要途径之一^[1]。之前对单又节省药材、质量可控、方便卫生, 是改善中药粉体 味药材的超微粉研究较多, 关于复方超微粉的研究

[收稿日期] 20111223(003)

[基金项目] 中医药行业科研专项(200807054); 国家高技术研究发展 863 计划项目(2009AA043201); 中药制药过程新技术国家重点实验室开放基金项目(SKL2010Z0304); 北京中医药大学复方中药制药研究创新团队(2011-CXTD-13)

[通讯作者] * 吴清, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-60214943, E-mail: qwu@vip.sina.com

较少,但近几年有所增多,如庞宗然等^[2]研究发现善人丹超微粉可明显改善 T2DM 大鼠糖代谢,易延逵等^[3]发现超微粉田七痛经胶囊的止痛效果要显著优于普通粉田七痛经胶囊。

本试验选取复方贝母散为模型药物。其收载于《部颁标准第 3 册》,功善清热化痰、止咳平喘。用于治疗肺热咳嗽、喘息。方中药物包括平贝母、麻黄、甘草、炒苦杏仁、炙百部、化橘红、石膏和硼砂,其中既有植物药,又有矿物药,用药部位有鳞茎、根、全草、种子、果实、矿物等,质地涵盖粉性、纤维性、含油高、含糖高等,同时以散剂为研究切入点,符合超微粉直接进入药特点,使研究更加简单直接。

1 材料

RT-34 型静音研磨粉碎机(北京环亚天元机械技术有限公司),单筒式 FM 型实验用振动磨新乡第一振动机械厂有限公司,RZQ-8C 型溶出度仪天大天发科技有限公司,1100 型高效液相色谱仪(美国 Aglient),BT-9300H 型激光粒度分布仪(丹东市百特仪器有限公司),MVS-1 型涡旋混合器(北京金北德工贸有限公司),UV-2000 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),PHS-25C 型数字酸度计(上海鹏顺科学仪器有限公司),402AI 型超声雾化器(上海庞驰医疗器械科技发展有限公司)。

平贝母(产地四川,批号 080401),麻黄(产地甘肃,批号 080101),炒苦杏仁(产地四川,批号 080401),蜜炙百部(产地安徽,批号 080401),硼砂(产地山东,批号 080401),石膏(产地山东,批号 080401),化橘红(产地河北,批号 080501),以上药材均购自河北安国以岭中药饮片有限公司;甘草(北京同仁堂中药饮片有限公司,产地内蒙古,批号 701132015),经北京中医药大学刘春生教授鉴定,试验所用药材均符合《中国药典》2010 年版一部项下的有关要求。复方甘草口服溶液(北京海德润制药有限公司,批号 080105),薄层板(青岛海洋化工厂分厂),甲醇、乙腈为色谱纯,水为自制高纯水,其余试剂均为分析纯。盐酸为内麻黄碱、甘草酸及贝母素甲对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 0714-9903,110731-20064,110750-200608)。

CR(CD-1)系小白鼠,雄性,体重(20~25)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 0125599。

2 方法与结果

2.1 药物超微粉的制备

2.1.1 原料的预处理

由于复方贝母散中药物性

质差异大(表 1),其中有不能直接初粉碎的药物,需进行适当预处理。蜜炙百部采用干燥箱 50℃ 干燥 3 h,炒苦杏仁采用适量平贝母细粉和石膏细粉作为包覆剂,分散炒苦杏仁的油脂。

表 1 复方贝母散各药物超微粉的制备

药物	粉碎难易度	细胞直径 / μm	最佳粉碎时间/min	比表面积 / $\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$	D_{95} / μm
平贝母	易粉碎	45~66	60	435.88	8.39
麻黄	难粉碎	12~20	60	799.67	5.32
甘草	难粉碎	13~23	60	969.10	4.37
化橘红	易粉碎	12~13	60	1 171.11	13.39
炒苦杏仁	易粉碎,但黏壁严重	18~88	60	1 005.7	5.04
蜜炙百部	难粉碎	22~35	40	1141.08	4.97
石膏	易粉碎	-	3~5(s)	832.43	5.59
硼砂	易粉碎	-	3~5(s)	1 200.56	4.0

2.1.2 初粉碎及筛分 将 RT 静音粉碎机置于水平的台面上,选择 10 目筛板,开动电机,将待粉碎药物饮片连续从进料口投入。当药物完全从筛板通过后,停机,将粗粉用 80 目筛筛分。将渣头重复以上粉碎工作,直至药物基本都通过 80 目筛。

将适量 80 目药物粉末置于研磨粉碎机振动磨中,即得各药物超微粉。于一定时间取少许样品,检测粒径分布和比表面积,计算细胞破壁率。

2.1.3 粒径的测定 取样品适量加一定量无水乙醇分散,用滴管移取少量置装有无水乙醇的比色皿中,测定粒径分布及比表面积。测定粉体 D_{95} (粉体 >95% 的粒径),与药物细胞直径比较,推算细胞破壁率情况。

通过以上试验确定复方贝母散中各药物最佳粉碎时间,结果见表 1。测得的 D_{95} 与药物细胞直径比较,可知细胞破壁率 >95%。

2.2 药物超微粉和细粉的化学性质比较

2.2.1 浸出物含量测定

2.2.1.1 水溶性浸出物测定^[4] 平贝母细粉和超微粉按照《中国药典》2010 年版水溶性浸出物测定法项下冷浸法(附录 X A)测定。麻黄和甘草细粉和超微粉按照《中国药典》2010 年版水溶性浸出物测定法项下热浸法(附录 X A)测定。

2.2.1.2 醇溶性浸出物测定^[4] 平贝母细粉和超微粉按照《中国药典》2010 年版醇溶性浸出物测定法项下冷浸法(附录 X A)测定。麻黄和甘草细粉和超微粉按照《中国药典》2010 年版醇溶性浸出物测定法项下热浸法(附录 X A)测定。结果见表 2。

表2 复方贝母散中各药物细粉和超微粉的水溶性和醇溶性浸出物含量测定($n=3$)

组别	药物	平均浸出物 质量分数/%	细粉- 超微粉
水溶性浸出物	平贝母细粉	12.91	1.09:1
	平贝母超微粉	12.37	
	麻黄细粉	25.31	0.94:1
	麻黄超微粉	25.96	
	甘草细粉	42.49	1.09:1
	甘草超微粉	39.14	
醇溶性浸出物	平贝母细粉	1.63	1.41:1
	平贝母超微粉	1.16	
	麻黄细粉	20.32	1.02:1
	麻黄超微粉	19.91	
	甘草细粉	15.51	1.02:1
	甘草超微粉	15.19	

由表2结果可知,与细粉相比,除麻黄超微粉醇溶性浸出物含量显著降低外,其余水、醇溶性浸出物含量均仅略有降低。

2.2.2 薄层色谱鉴别

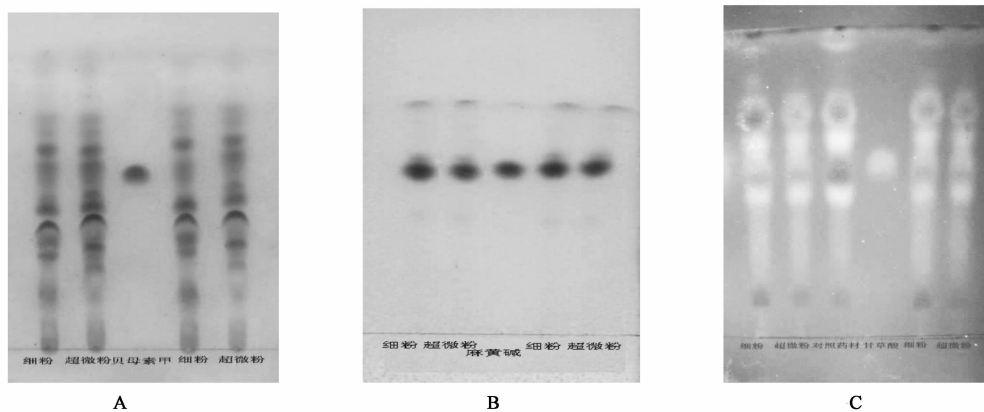
2.2.2.1 贝母素甲 取本品粉末10 g,加浓氨试液10 mL,三氯甲烷30 mL,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇0.5 mL使溶解,作为供试品溶液。超微粉同法制得相应供试品溶液。另取贝母素甲对照品,加甲醇制成 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液。按《中国药典》2010年版一部附录VI B薄层色谱法进行试验,分别吸取供试品溶液和对照品溶液12,12,5 μL ,点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液(6:1:0.5)为展开剂,展开,取

出,晾干,依次喷以稀碘化铋甲试液和5%亚硝酸钠试液。

2.2.2.2 盐酸麻黄碱 称取麻黄细粉1 g,置于100 mL具塞锥形瓶中,加浓氨试液数滴,加三氯甲烷10 mL,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇2 mL充分振摇,滤过,滤液作为供试品溶液1。超微粉同法制得相应供试品溶液2。另取盐酸麻黄碱对照品,加甲醇制成 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录VI B)进行试验,吸取上述3种溶液各5 μL ,点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(20:5:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以茚三酮试液,于105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰。

2.2.2.3 甘草酸铵 取本品粉末1 g,加乙醚40 mL,加热回流1 h,滤过,药渣加甲醇30 mL,加热回流1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加水40 mL使溶解,用正丁醇提取3次,每次20 mL,合并正丁醇液,用水洗涤3次,蒸干,残渣加甲醇5 mL使溶解,作为供试品溶液。另取甘草对照药材1 g同法制成对照药材溶液。再取甘草酸铵对照品,加甲醇制成 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录IV B)进行试验,吸取上述3种溶液各1~2 μL ,点于同一用1%氢氧化钠溶液制备的硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,于105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰,置紫外光灯下于365 nm检视。

平贝母、麻黄、甘草细粉和超微粉的显色斑点无差异,结果见图1。



A. 平贝母; B. 麻黄; C. 甘草

图1 复方贝母散中各药物细粉和超微粉 TLC

2.2.3 定量比较

2.2.3.1 总生物碱含量测定^[5-6] 样品供试液的制

备 精密称取样品粉末0.5 g,用10%氨水1 mL湿润,密塞30 min,加入乙醚-三氯甲烷-95%乙醇(25:

8:2.5)混合溶剂 20 mL,置于 37 °C 恒温水浴振荡提取 24 h,振动频率为 120 次/min,滤过,用混合溶剂 15 mL 分 3 次洗涤残渣和滤纸,合并滤液于蒸发皿中,挥干,精密加入 pH 1.0 HCl 水溶液 5 mL 溶解残渣,备用。

对照品溶液制备 精密称取贝母素甲对照品 2.49 mg 至 25 mL 量瓶中,加入 pH 1.0 盐酸溶液定容,备用。

标准曲线绘制 分别精密吸取对照品溶液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL 置分液漏斗中,加入溴甲酚绿试液 5 mL,三氯甲烷 6 mL,剧烈振摇,静置 30 min,分取三氯甲烷层置预先放有 0.20 g 无水硫酸钠的西林瓶中,密闭摇匀,取上清液,于 413 nm 处测定吸光度(A)。同法制成空白对照,测定 A,以 A 为纵坐标,贝母素甲含量为横坐标,得标准曲线 $A = 39.974C - 0.0487$ ($R^2 = 0.9987$),线性范围 0.0066 ~ 0.023 g·L⁻¹。

样品测定 精密称取平贝母细粉和超微粉各 0.5 g,每组平行操作 2 份,按样品供试液制备项下方法操作,制备供试品溶液,测定供试品溶液中盐酸麻黄碱的含量。结果细粉、超微粉含量基本相当(0.171%, 0.170%)。

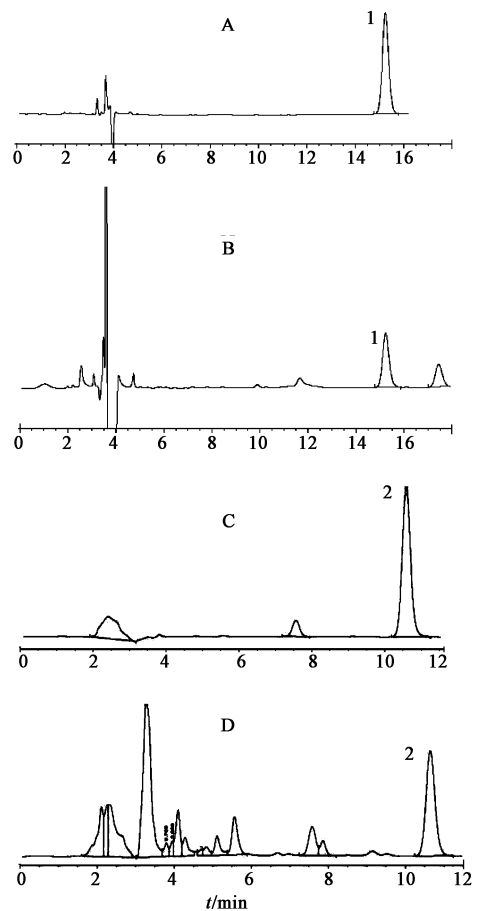
2.2.3.2 麻黄碱含量测定 Alltima HP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(含 0.1% 三乙胺)(3:97),检测波长 207 nm,柱温室温。

样品供试液制备 精密称取样品粉末约 0.2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声处理 45 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 1 mL,置中性氧化铝柱上(100 ~ 200 目,1.5 g,内径 1 cm),用 50% 甲醇洗脱,收集洗脱液约 9 mL,置 10 mL 量瓶中,加磷酸 1 滴,用 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

对照品溶液制备 精密称取麻黄碱对照品 3.55 mg,置 10 mL 量瓶中,用 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀。精密吸取 0.5 mL 至 5 mL 量瓶中,用 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,备用。

标准曲线制作 精密吸取盐酸麻黄碱对照品溶液 2, 4, 8, 10, 14, 16 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定,以进样量为横坐标、峰面积为纵坐标,得标准曲线 $Y = 2.237X - 6.464$ ($R^2 = 0.9999$),线性范围 0.071 ~ 0.568 μg。

样品测定 精密称取麻黄细粉和超微粉各 0.2 g,每组平行操作 2 份,按供试品试液制备项下方法制备供试品溶液。按标准曲线制作项下方法测定供试品溶液中盐酸麻黄碱含量,色谱图见图 2。结果表明细粉为超微粉的 1.02 倍(1.49/1.46),即两者含量基本相当。



A. 麻黄碱对照品; B. 麻黄供试品; C. 甘草酸对照品; D. 甘草样品; 1. 麻黄碱; 2. 甘草酸

图 2 麻黄、甘草细粉和超微粉 HPLC

2.2.3.3 甘草酸含量测定 色谱条件 Alltima HP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(40:60),检测波长 250 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温室温。

样品供试液制备 取样品粉末约 0.3 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加流动相约 45 mL,超声处理 30 min,取出,放冷,加流动相至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

对照品溶液制备 精密称取甘草酸铵对照品 2.86 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声处理使溶解,取出,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

标准曲线制作 精密吸取甘草酸铵对照品溶液 2, 6, 8, 10, 14, 18 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱

条件测定,以进样量为横坐标、峰面积值为纵坐标,计算回归方程 $Y = 615.44X + 5.770$ ($R^2 = 0.9996$),线性范围为 $0.2288 \sim 2.0592 \mu\text{g}$ 。

样品测定 精密称取甘草细粉和超微粉各 0.3 g ,每组平行操作 2 份,按上述样品供试液制备项下方法操作,制备供试品溶液。按标准曲线制作项下方法测定供试品溶液中甘草酸的含量,见图 2。结果细粉、超微粉含量基本相当(2.30%,2.25%)。

2.3 药效学比较^[7] 采用氨水引咳法。取小白鼠 60 只,随机分成 6 组,正常对照组(给予等容积水)、复方甘草口服溶液(阳性对照组)、复方贝母传统散 [$0.6857 \text{ g}(\text{mL}) \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$]、复方贝母超微散低 [$0.3429 \text{ g}(\text{mL}) \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$]、中 [$0.6857 \text{ g}(\text{mL}) \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$]、高 [$1.3714 \text{ g}(\text{mL}) \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$] 3 个剂量组。动物每天灌胃给药 1 次,连续 4 d。最后 1 次给药后 60 min,将动物置于超声雾化器内,将 25% (25% ~ 28%) 氨水以恒压力匀速喷入一定时间(约 5 s),观察 2 min 内的潜伏期及咳嗽(咳嗽标准:小鼠腹肌收缩、同时张大嘴、时有时无咳嗽声)次数。采用 SAS 8.2 软件包,用 t 检验法进行组间比较。结果见表 3。

表 3 复方贝母散各形式的止咳作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	给药剂量 / $\text{g}(\text{mL}) \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	潜伏期/s	咳嗽数/次
空白对照	-	13.7 ± 2.5	60.8 ± 10.7
复方甘草口服液	3.428 6	$22.3 \pm 3.2^{1)}$	$48.9 \pm 5.3^{1)}$
传统散剂	0.685 7	$22.7 \pm 3.9^{1)}$	$43.9 \pm 11.6^{1)}$
超微散剂	0.342 9	$27.9 \pm 4.6^{1,2)}$	$31.2 \pm 6.9^{1,3)}$
	0.685 7	$35.0 \pm 9.2^{1,3)}$	$23.6 \pm 5.6^{1,3)}$
	1.371 4	$28.9 \pm 10.0^{1,3)}$	$26.3 \pm 11.2^{1,3)}$

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.01$;与传统散剂组比²⁾ $P < 0.05$;与传统散剂组比³⁾ $P < 0.01$ 。

结果显示,复方贝母传统散剂和超微散剂对小

鼠化学刺激引起的咳嗽均有明显地抑制作用;超微散的止咳效果明显强于传统散,且超微散剂量减半后,其止咳效果亦明显强于传统散。

3 讨论

在化学性质方面,药材经超微粉碎后,与细粉相比较,其主要成分的种类和有效成分的含量变化不大,有利于维持药材的原有功效。

药效学实验结果表明,在同等剂量下,复方贝母散超微粉药效作用优于细粉,证明在中医临床上使用超微饮片可减少用药量,对节约有限的中药资源具有重要意义。但从化学成分角度考虑,暂时无法佐证复方超微粉药效比细粉强的结论,有待于进一步从动物体内吸收角度进行考察。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 庞宗然,赵玉堂,李静华,等. 菩人丹超微粉对肥胖型 2 型糖尿病大鼠糖代谢相关指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):107.
- [3] 易延逵,张璐,刘莉,等. 超微粉与普通粉田七痛经胶囊比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):34.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010:附录 XA.
- [5] 夏德豪,程显隆,肖新月,等. 平贝母中总生物碱含量测定方法学研究[J]. 中国药事,2007,21(9):756.
- [6] 张爱武,王丽杰,钱丽丽. 平贝母中总生物碱含量的测定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2007,19(6):62.
- [7] 邹冬良. 咳安颗粒的药效学实验[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(3):311.

[责任编辑 全燕]