

不同粒径天麻粉中有效成分的体外溶出度比较

刘帆¹, 陈亭亭¹, 陈艳¹, 巩仔鹏¹, 刘智², 王爱民^{1*}

- (1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 药学院, 贵阳 550004;
2. 贵州医科大学 附属医院, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**研究不同粒径天麻粉末中有效成分(天麻素,对羟基苯甲醇,巴利森苷A,巴利森苷B,巴利森苷C)的体外溶出行为差异,为天麻超微粉的应用提供实验依据。**方法:**采用桨法对天麻粉末在不同溶出介质(水、人工胃液、人工肠液)中溶出度进行测定,利用HPLC测定不同粒径天麻粉中上述5种有效成分的溶出度,流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,柱温40℃,检测波长220nm。**结果:**在水中、人工肠液介质中,天麻细粉、极细粉中5种有效成分的溶出速率较天麻3种超微粉低;在人工胃液中,天麻超微粉中天麻素和对羟基苯甲醇的溶出速率较其他粉体高,但天麻超微粉中巴利森苷A的溶出速率较其他粉体低。**结论:**适度的微粉化能促进天麻粉末中有效成分的溶出,并不是越细越好,有效成分的溶出行为还受溶出介质的影响,可为天麻粉末临床应用时选择最佳粒径提供实验依据。

[关键词] 天麻;超微粉;有效成分;体外溶出度;天麻素;对羟基苯甲醇;巴利森苷类

[中图分类号] R22;R24;R28;C37;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0124-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190305

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.1029.032.html>

[网络出版时间] 2018-11-16 14:41

Comparison of *in Vitro* Dissolution of Active Ingredients in Gastrodiae Rhizoma Powder with Different Particle Size

LIU Fan¹, CHEN Ting-ting¹, CHEN Yan¹, GONG Zi-peng¹, LIU Zhi², WANG Ai-min^{1*}

- (1. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;
2. The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To compare *in vitro* dissolution behaviors of active ingredients (gastrodin, parishin A, *p*-hydroxybenzyl alcohol, parishin B and parishin C) in Gastrodiae Rhizoma powder with different particle size. **Method:** *In vitro* dissolution of Gastrodiae Rhizoma powder in different dissolution media (water, artificial gastric juice and artificial intestinal juice) were detected by stirring paddle method. Dissolution of these five components in Gastrodiae Rhizoma powder with different particle size was determined by HPLC, mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution for gradient elution, column temperature was set at 40℃ and detection wavelength was 220 nm. **Result:** In water and artificial intestinal juice, the dissolution rates of five

[收稿日期] 20180820(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560646);贵州省科技厅人才团队项目(黔科合平台人才[2016]5613/5677);贵阳市科研创新团队项目(筑科合同[2017]30-29号)

[第一作者] 刘帆,在读硕士,从事中药新药研发及其质量控制研究,E-mail:2695495569@qq.com

[通信作者] *王爱民,教授,从事中药新药研发、药物质量控制及有效物质基础研究,Tel:0851-86908468,E-mail:gywam100@163.com

active components in three kinds of *Gastrodiae Rhizoma* ultrafine powders were higher than that of the fine powder and the finest powder; in artificial gastric juice, the dissolution rates of gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol in *Gastrodiae Rhizoma* ultrafine powders were higher than that of the other powders, and the dissolution rate of parishin A in *Gastrodiae Rhizoma* ultrafine powders was lower than that of the other powders. **Conclusion:** An appropriate degree of superfine grinding can promote the dissolution of active ingredients in *Gastrodiae Rhizoma*, but not as fine as possible. The dissolution medium has an obvious influence on the dissolution behaviors of active components, which provides a reference for screening optical particle size of *Gastrodiae Rhizoma* powder in clinical application.

[Key words] *Gastrodiae Rhizoma*; ultrafine powder; active ingredients; *in vitro* dissolution; gastrodin; *p*-hydroxybenzyl alcohol; parishins

天麻是兰科植物天麻的干燥块茎,又名赤箭、定风草、合离草、独摇兰,是我国四大名贵药材之一,主产于我国贵州、云南、湖北等地。在我国有两千多年的药用历史,最早记载于《神农本草经》^[1-3]。临床上主要用来治疗小儿惊风、破伤风、风湿等^[4]。

超微粉碎技术是一种将各种固体物质粉碎成直径 < 10 μm 粉体的工业技术,已被广泛应用于冶金、食品、医药、化妆品、航天航空等领域^[5-6]。同时,该技术也逐渐被应用于中医药领域,可提高中药有效成分的溶出率和生物利用度、增加药物吸收率等^[7-8]。目前天麻主要以粉末入药,关于天麻粉入药粒径大小的研究较少,且研究大多集中在天麻素和对羟基苯甲醇的溶出率上,尚无对天麻中其他有效成分溶出情况的研究。例如赵唯君等^[9]采用 HPLC 测定了某市售天麻破壁饮片、天麻细粉、天麻超微粉及 2 种不同工艺的天麻微粉颗粒中天麻素及对羟基苯甲醇的总溶出量,考察这 2 个成分总溶出量的差异,结果显示天麻破壁饮片、天麻细粉、天麻超微粉和天麻微粉颗粒的溶出曲线相似,且在 15 min 时破壁饮片及颗粒的累积溶出率高于超微粉;杨芝芳等^[10]利用 HPLC 测定了不同粒径天麻粉在体外模拟人工肠液和胃液环境中天麻素溶出率的差异,结果表明与普通粉相比,天麻超微粉中天麻素的累积溶出率较快。本实验采用浆法对天麻粉在不同溶出介质(水、人工胃液、人工肠液)中溶出度进行测定,利用 HPLC 测定不同粒径天麻粉中天麻素,对羟基苯甲醇,巴利森苷 A,巴利森苷 B,巴利森苷 C 的溶出度,比较不同粒径天麻粉在不同溶出介质中这 5 种有效成分的体外溶出特点,为天麻超微粉的临床应用提供实验依据。

1 材料

RC806 型智能溶出度仪(天津市天大天发科技有限公司), UltiMate3000 型高效液相色谱仪(美国

戴安公司), EL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], SC082767 型超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司), BT-2001 型激光粒度分析仪(丹东百特仪器有限公司)。

天麻药材(采购于贵州德江,经贵州医科大学生药教研室龙庆德副教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎), 天麻素(北京百灵威化学技术有限公司,批号 62499-27-8,纯度 100%); 对羟基苯甲醇(批号 623-05-2,纯度 99%), 巴利森苷 A(批号 62499-28-9,纯度 98%), 巴利森苷 B(批号 174972-79-3,纯度 98%) 和巴利森苷 C(批号 174972-80-6,纯度 96%) 对照品均购于成都明睿科技有限公司; 人工肠液(称取磷酸二氢钾 6.8 g,加水 500 mL 使溶解,用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调节 pH 6.8;另取胰酶 10 g,加水溶解后将两液混合,加水稀释至 1 L) 和人工胃液(精密量取稀盐酸 16.4 mL,加水 800 mL 使溶解,加入胃蛋白酶 10 g,溶解后摇匀,加水定容至 1 L) 均为实验室自制,水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 天麻粉末的制备 天麻药材经贵州广济堂药业有限公司粉碎成 5 种不同粒径的天麻粉,分别编号为天麻细粉,天麻极细粉,超微粉 I,超微粉 II 和超微粉 III,取以上天麻粉经激光粒度分析仪测定其粒径,见表 1。

2.2 指标成分的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 称取对羟基苯甲醇 12.56 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得对羟基苯甲醇储备液。分别精密称取天麻素 7.12 mg,巴利森苷 A 8.43 mg,巴利森苷 B 8.19 mg 和巴利森苷 C 6.85 mg,置同一 10 mL 量瓶中,精密加入对羟基苯甲醇储备液 2 mL,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得混合对照品储备液。

表 1 天麻粉末的粒径分布与测定 ($n=3$)

Table 1 Determination and distribution of particle size of Gastrodiae Rhizoma powders ($n=3$)

样品	粒径分布/ μm		
	D_{10}	D_{50}	D_{90}
细粉	10.31	54.33	145.90
极细粉	3.85	18.44	52.24
超微粉 I	3.61	16.75	47.22
超微粉 II	3.16	13.44	36.85
超微粉 III	2.50	11.10	28.99

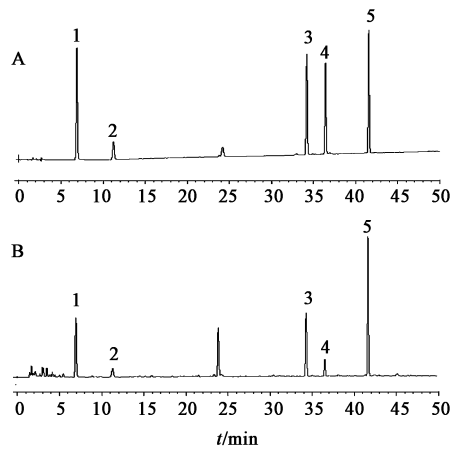
注: D_{10} ·累计粒度分布率达 10% 时所对应的粒径; D_{50} ·累计粒度分布率达 50% 时所对应的粒径; D_{90} ·累计粒度分布率达 90% 时所对应的粒径。

2.2.2 供试品溶液的制备 取上述天麻粉末约 0.5 g, 精密称定, 精密加入 50% 乙醇 25 mL, 称定质量, 加热回流提取 3 h, 冷却至室温, 称定质量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10 mL, 置于玻璃蒸发皿中, 挥至近干, 残渣加水使溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 离心 ($1 \text{ 万 r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液, 即得。

2.2.3 色谱条件 Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 4 \mu\text{m}$), 流动相乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0~8 min, 2% A; 8~21 min, 2%~8% A; 21~30 min, 8%~12% A; 30~47 min, 12%~22% A; 47~53 min, 22%~90% A; 53~57 min, 90% A; 57~58 min, 90%~2% A; 58~65 min, 2% A), 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $10 \mu\text{L}$, 检测波长 220 nm。在这个条件下, 5 种被测化合物与其他色谱峰分离完全, 且保留时间和相应的对照品一致, 见图 1。

2.2.4 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得混合对照品 1; 精密量取该混合对照品 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得混合对照品 2, 依次等比稀释, 得系列混合对照品溶液, 分别精密吸取上述系列混合对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 按 2.2.3 项下色谱条件进样分析, 以对照品质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归, 结果见表 2。

2.2.5 精密度试验 取天麻超微粉 I 供试品溶液适量, 按 2.2.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算天麻素, 对羟基苯甲醇, 巴利森苷 A, 巴利森苷 B, 巴利森苷 C 峰面积的 RSD 分别为 0.2%, 0.5%, 0.1%, 0.1%, 0.1%, 表明仪器的精密度良好。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 天麻素; 2. 对羟基苯甲醇; 3. 巴利森苷 B; 4. 巴利森苷 C; 5. 巴利森苷 A

图 1 天麻超微粉 I 的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Gastrodiae Rhizoma ultrafine powder I

表 2 天麻中各指标成分含量测定的线性关系考察

Table 2 Investigation of linear relationship of determination of five ingredients in Gastrodiae Rhizoma

成分	回归方程	r	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
天麻素	$Y = 299.32X + 0.0068$	0.9999	4.45~71.2
对羟基苯甲醇	$Y = 437.17X - 0.0014$	0.9999	0.62~9.95
巴利森苷 A	$Y = 247.47X - 0.2000$	0.9999	5.16~82.6
巴利森苷 B	$Y = 236.26X - 0.1226$	0.9995	5.02~80.3
巴利森苷 C	$Y = 239.63X - 0.1211$	0.9996	4.11~65.8

2.2.6 重复性试验 取天麻超微粉 I 共 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件测定, 计算天麻素, 对羟基苯甲醇, 巴利森苷 A, 巴利森苷 B, 巴利森苷 C 平均质量分数分别为 0.67%, 0.085%, 1.62%, 0.92%, 0.21%, RSD 分别为 0.9%, 1.0%, 0.9%, 0.9%, 0.9%, 表明该方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取天麻超微粉 I 适量, 精密称定, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.2.3 项下色谱条件测定, 计算天麻素, 对羟基苯甲醇, 巴利森苷 A, 巴利森苷 B, 巴利森苷 C 峰面积的 RSD 分别为 0.2%, 0.3%, 0.1%, 0.1%, 0.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取天麻超微粉 I 样品 9 份, 每份 0.25 g, 每 3 份为 1 组, 按低、中、高质量浓度精密加入天麻素 (0.86, 1.70, 2.53 mg),

对羟基苯甲醇 (0.12, 0.25, 0.32 mg), 巴利森苷 A (2, 4, 6 mg), 巴利森苷 B (1.24, 2.45, 3.48 mg), 巴利森苷 C (0.28, 0.56, 0.80 mg) 的对照品溶液适量, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件测定, 计算加样回收率。结果天麻素, 对羟基苯甲醇, 巴利森苷 A, 巴利森苷 B, 巴利森苷 C 的平均加样回收率分别为 101.2%, 97.12%, 99.48%, 98.24%, 96.30%, RSD 分别为 0.5%, 2.0%, 0.3%, 2.7%, 0.2%。

2.2.9 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与各供试品溶液, 按 2.2.3 项下色谱条件测定, 见表 3。结果表明天麻超微粉碎后对其主要成分的含量并没有影响。

表 3 天麻药材中指标成分的质量分数 ($n=2$)

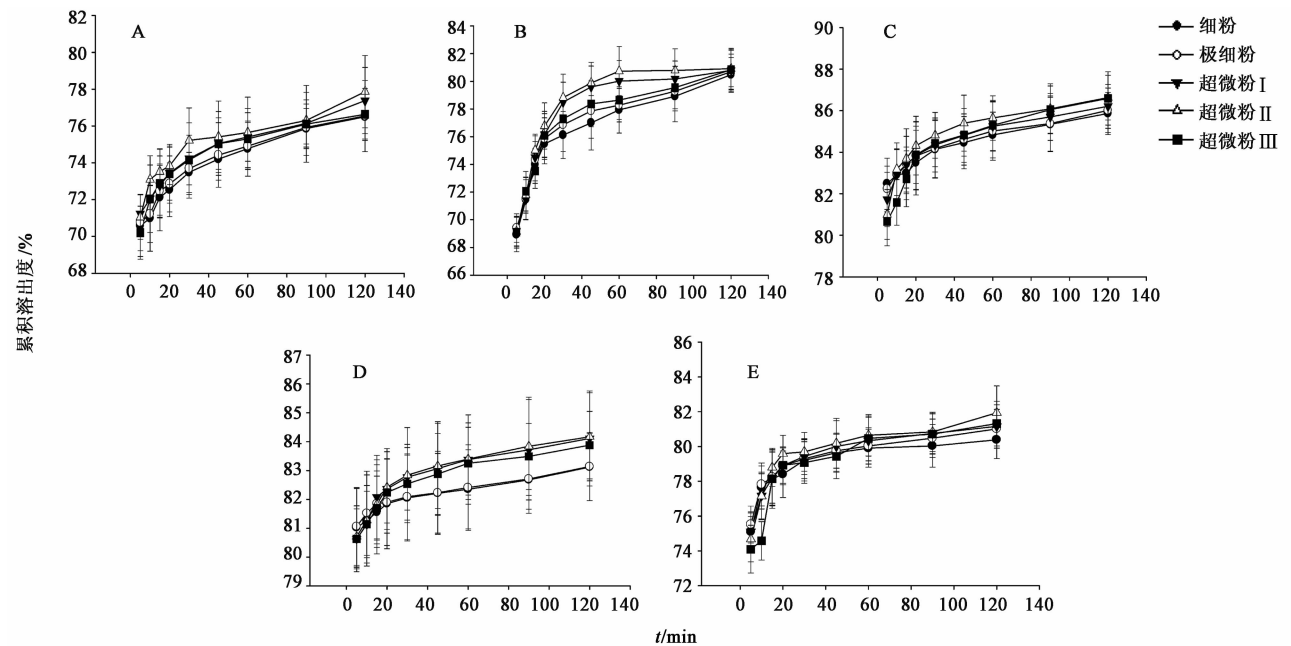
Table 3 Contents of five ingredients in Gastrodiae Rhizoma ($n=2$) %

样品	天麻素	对羟基苯甲醇	巴利森苷 A	巴利森苷 B	巴利森苷 C
细粉	0.65	0.083	1.59	0.89	0.21
极细粉	0.66	0.084	1.62	0.90	0.21
超微粉 I	0.67	0.085	1.62	0.92	0.21
超微粉 II	0.67	0.087	1.66	0.93	0.21
超微粉 III	0.68	0.088	1.68	0.94	0.22

2.3 不同溶出介质下指标成分溶出度的比较 分别取 2.1 项下不同粒径的天麻粉末约 2 g, 精密称定, 投入溶出度仪中, 按 2015 年版《中国药典》(四部) 通则 0931 溶出度与释放度测定法中的浆法进行测定, 分别以已超声脱气的水、人工胃液、人工肠液 900 mL 为溶出介质, 转速 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 $(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$, 分别于 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min 取样 5 mL, 同时向溶出杯中补充相同温度和相同体积的溶出介质, 取出样品溶液用 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液按 2.2.3 项下色谱条件测定, 计算各时间点的累积溶出度, 以累积溶出度为纵坐标, 时间为横坐标, 绘制溶出曲线, 见图 2~4。结果发现从总体来看, 天麻超微粉中这 5 种成分溶出量、溶出速率均较天麻普通粉的好; 从溶出量来看, 在水、人工肠液中天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷类化合物的累积溶出度没有明显差异; 从溶出速率来看, 超微粉 II 中 5 种成分的溶出速率较快。从溶出介质来看, 天麻素、对羟基苯甲醇的累积溶出度排序为人工胃液 > 人工肠液 > 水, 巴利森苷类化合物的累积溶出度排序为人工肠液 > 水, 但这 5 种有效成分在人工胃液中却无规律可循。

3 讨论

根据天麻中有效成分的理化性质, 供试品溶液



A. 天麻素; B. 对羟基苯甲醇; C. 巴利森苷 A; D. 巴利森苷 B; E. 巴利森苷 C (图 3, 4 同)

图 2 不同天麻粉末中 5 种指标成分在水中的体外溶出曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 *In vitro* dissolution curves of five active components from Gastrodiae Rhizoma powders in water ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制备时分别选择了甲醇, 乙醇, 50% 甲醇, 50% 乙醇

和 30% 乙醇为提取溶剂, 采用加热回流法进行

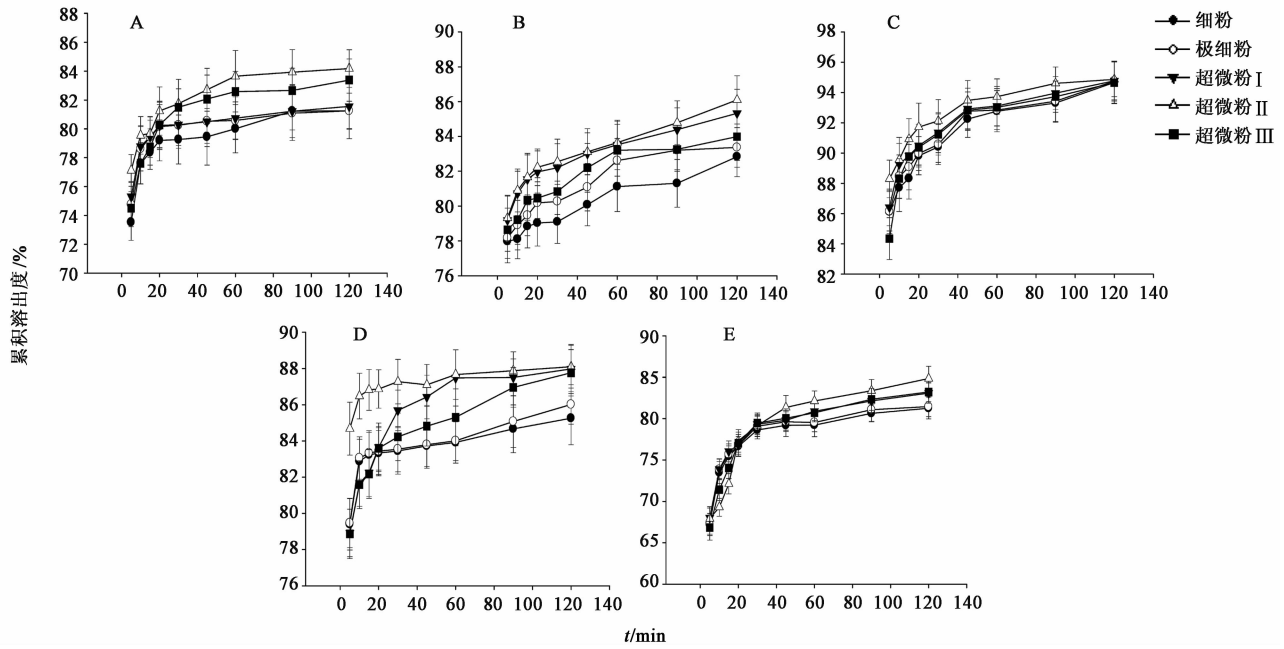


图 3 不同天麻粉末中 5 种指标成分在人工肠液中体外溶出曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 *In vitro* dissolution curves of five active components from Gastrodiae Rhizoma powders in artificial intestinal juice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

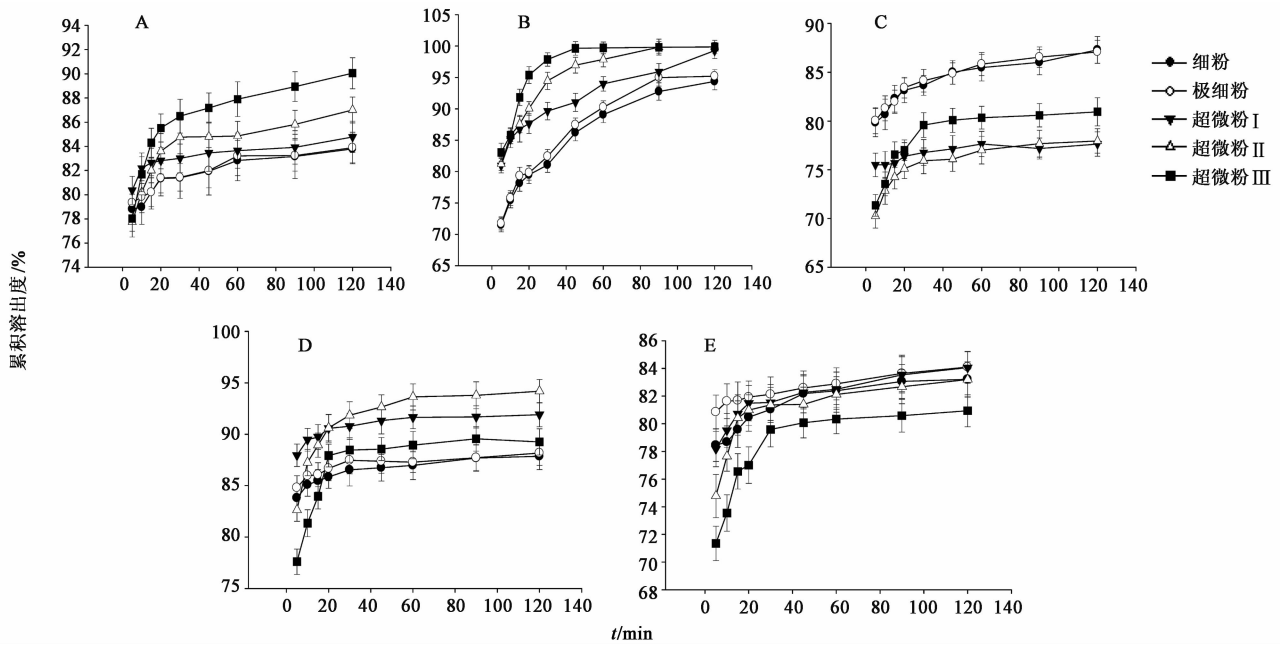


图 4 不同天麻粉末中 5 种指标成分在人工胃液中体外溶出曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 *In vitro* dissolution curves of five active components from Gastrodiae Rhizoma powders in artificial gastric juice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

提取,以天麻素,对羟基苯甲醇,巴利森苷 A,巴利森苷 B 和巴利森苷 C 为指标成分,结果表示选择 50% 乙醇作为提取溶剂时效果最佳;另外,还考察了回流提取时间(2,3,4,5 h),结果显示回流提取 3 h 后,天麻中这 5 种成分提取较为完全,综合考虑,选择提取时间 3 h。

天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷类是天麻主要

活性成分,其溶出率、溶出量的多少会直接影响天麻药材药效的发挥。本实验同时测定了天麻中的 5 种有效成分(天麻素,对羟基苯甲醇,巴利森苷 A,巴利森苷 B,巴利森苷 C)在水、人工胃液、人工肠液的溶出度,比较了不同粒径天麻粉末中这 5 种有效成分在不同溶出介质的溶出行为,结果显示天麻超微粉中这 5 种有效成分的溶出量、溶出速率均好于天麻

普通粉,其中超微粉Ⅲ的粒径最小,理论上其溶出速率较快,实测出来其溶出速率较超微粉Ⅱ稍慢,这与大部分超微粉溶出的研究结果不太一致^[11-12]。原因可能是其粒径减小了,药材表面积急剧增大,使表面能增加,药物粉体对极性成分的吸附能力增大,从而不易溶出^[13-15];也有可能是由于天麻超微粉Ⅲ粒径小,在溶出介质中易结团成块,从而阻碍了其有效成分的溶出。这也说明了中药在超微粉碎过程中并不是越细越好,应该根据药材的性质,对中药材超微粉碎要适度。

本实验比较了不同粒径天麻粉在水、人工肠液、人工胃液中的体外溶出行为,其中在水、人工肠液中,天麻超微粉5种有效成分的相对累积溶出度总是大于天麻普通粉,而在人工胃液中却无规律可循,这可能是受酸性条件的影响,因为天麻中巴利森苷类化合物在酸性条件下很容易分解成天麻素^[16]。本实验比较了不同粒径天麻粉末中5种有效成分在不同溶出介质的溶出行为,较目前关于天麻粉末有效成分溶出行为的研究报道更加全面,但体内实际情况较为复杂,体外溶出度并不能完全代表体内的溶出情况,下一步将研究不同粒径天麻粉末中这5种有效成分的体内溶出情况。

[参考文献]

[1] 谭碧君,孔海文,陶钧. 天麻色谱学分类与品质评价[J]. 化学与生物工程,2012,19(5):85-90.
[2] 黎光富,李刚凤,史荣荣. 天麻多糖化学成分与药理作用研究综述[J]. 现代农业科技,2016(7):289-292.
[3] 杨超,吕紫媛,伍端云. 天麻的化学成分与药理机制研究进展[J]. 中国现代医生,2012,50(17):27-31.
[4] 陶云海. 天麻药理研究新进展[J]. 中国中药杂志,2008,23(1):108-110.

[5] 罗刚,陈立庭,周晶. 超微粉碎技术在中药研究中的应用[J]. 现代药物与临床,2011,26(2):108-112.
[6] 张红刚,汪妮,李顺祥,等. 超微粉碎技术对中药有效成分提取效果影响研究[J]. 广州化工,2013,41(16):63-64.
[7] 陆付耳,阮金兰,余达经,等. 论试微米中药[J]. 世界科学技术—中药现代化,2001,3(1):12-15.
[8] 李凤生. 超细粉体技术[M]. 北京:国防工业出版社,2000:373.
[9] 赵唯君,刘荫贞,刘冲,等. 天麻粉末粒度分布和有效成分溶出曲线研究[J]. 亚太传统医药,2017,13(9):19-22.
[10] 杨芝芳,胡明勋,邓薇,等. 天麻超微粉粒度对天麻素溶出率及抗惊厥作用的影响[J]. 中成药,2016,38(12):2700-2702.
[11] 邱新建,贺凤成,张则平,等. 五味子超微粉的含量及溶出度测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):58-61.
[12] 史国富,张璐. 黄芩超微粉与普通粉溶出度比较[J]. 山西中医学院学报,2011,12(2):34-35.
[13] 刘珈羽,郭换,肖佳雯,等. 不同粒径白及粉的粉体学性质及体外溶出度比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3):25-29.
[14] 梁兆昌,诸洪标,肖琳,等. 杜仲超微粉理化特性及体外溶出性能研究[J]. 中草药,2015,46(11):1609-1611.
[15] ZHAO X Y, DU F L, ZHU Q J, et al. Effect of superfine pulverzation on properties of *Astragalus membranaceus* powder[J]. Powder Technol,2010,203(3):620-625.
[16] 田紫平,肖慧,冯舒涵,等. 天麻有效成分巴利森苷的降解规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(23):18-21.

[责任编辑 刘德文]