

· 中药工业 ·

4种中药微细粉体显微特征及细胞破壁率的测定[△]宋忠兴^{1,2*}, 赵鹏¹, 唐志书^{2,3}, 白宏博^{2,3}, 李铂^{2,3}, 严邑萍⁴

(1. 陕西兴盛德药业有限责任公司, 陕西 铜川 727031;

2. 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西 咸阳 712083;

3. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 4. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 测定丹参、黄芩、苦参和秦艽4种常用中药微细粉体的细胞破壁率, 比较其与常规细粉的显微特征差异。方法: 采用细胞计数法, 以木栓细胞、薄壁细胞作为计数指标, 考察微细粉体技术对4种中药细胞破壁率的影响; 同时采用显微观察法比较常规细粉与微粉体的细胞结构及后含物形态变化。结果: 4种中药微细粉体的细胞破壁均在95%以上, 且细胞多已破碎, 偶见完整细胞和导管等碎片。结论: 微细粉体技术对丹参、黄芩、苦参、秦艽4种中药具有良好的细胞破壁效果。

[关键词] 中药; 破壁微粉; 细胞破壁率

Study on Microscopic Feature and Wall-broken Rate of Four Kinds of Traditional Chinese Medicine Micro-fine Powders

SONG Zhongxing^{1,2*}, ZHAO Peng¹, TANG Zhishu^{2,3}, BAI Hongbo^{2,3}, LI Bo^{2,3}, YAN Yiping⁴

(1. Shaanxi Xingshengde Pharmaceutical Co. Ltd., Tongchuan 727031, China;

2. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Xianyang 712083, China;

3. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

4. The Affiliated Hospital of Shaanxi TCM University, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the wall-broken rates of four kinds of traditional Chinese medicine (TCM) micro-fine powders, including Radix Salviae Miltiorrhizae, Radix Seutellariae, Radix Sophorae Flavescentis and Radix Gentianae Macrophyllae. Moreover, the microscopic feature differences between micro-fine powders and conventional powders were compared. **Methods:** The cell counting method was applied to evaluate the effect of micro-fine grinding technology on the wall-broken rate with the number of intact cork cell and parenchyma cell as the index. Meanwhile, the cell structure and ergastic substances were compared between micro-fine powders and conventional powders by microscopic observation method. **Results:** The wall-broken rates of four kinds of TCM micro-fine powders were over 95%. The cell wall was almost broken and the intact cell and vessel fragment were occasional. **Conclusion:** Micro-fine grinding technology has a good effect on the wall-broken rates of four kinds of TCM micro-fine powders, including Radix Salviae Miltiorrhizae, Radix Seutellariae, Radix Sophorae Flavescentis and Radix Gentianae Macrophyllae.

[Keywords] Traditional Chinese medicine; micro-fine powder; wall-broken rate

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.2.018

中药材以植物药为主, 约占85%以上。对于具有完整细胞结构的植物药而言, 有效成分分布于细胞内, 细胞壁是其溶出的主要屏障^[1]。而中药破壁饮片是指在遵循中医药用药理论的前提下, 将传统中

药饮片采用微细粉体破壁技术进行细胞级粉碎, 制成具有较小粒径的微细粉体(D90 < 45 μm, 破壁率 > 95%), 再经现代制剂技术制成干燥颗粒状的一种新型中药饮片^[2]。其核心就是采用以生物细胞破

[△] [基金项目] 陕西省科技统筹创新计划项目(2015KTZDSF02-05-02); 陕西省科技资源开放共享项目(2015FWPT-01); 陕西省重点科技创新团队(2012KTC-20)

* [通信作者] 宋忠兴, 副主任药师, 总工程师, 研究方向: 新药研究与产业化开发; E-mail: szx74816@sina.com

壁为目的的微细粉体技术破坏中药饮片组织的细胞壁,可以解决传统中药饮片物质基础因其部位、组织、细胞的不同而带来的不均匀性问题。其可大幅提高中药饮片有效成分的利用率,降低资源消耗,改变中药饮片煎煮的服用方式,保留传统中药饮片的基本特征^[3-5]。在破壁饮片制备过程中,药材微细粉体是其中间产品或终端产品的主要形式,对其进行破壁率测定,从微观、理化特性表征等方面建立综合评价技术体系,方可形成科学、稳定的破壁饮片制备工艺和质量控制方法^[6-7]。作者通过观察比较丹参、黄芩、苦参和秦艽4种中药的常规细粉和微细粉体的显微特征,利用细胞计数法分别测定其超微粉的细胞破壁率,考察超微粉碎技术对中药细胞破壁率的影响。

1 试药与仪器

1.1 试药

丹参、黄芩、苦参和秦艽购自陕西兴盛德药业有限责任公司,符合《中华人民共和国药典》2015年版一部相关规定;水合氯醛及甘油均为分析纯(上海山浦化工有限公司)。

1.2 仪器

XDW-2.1型振动式细胞级超微粉碎机(济南达微机械有限公司);FW-1000D型高速万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限公司);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);BX53型正置荧光生物显微镜(Olympus, Japan, 包含DP73型CCD图像采集和计算机图像分析系统)。

1.3 样品制备

细粉制备:取丹参、黄芩、苦参和秦艽4种饮片,均干燥至水分约为6%,分别粉碎成细粉(100目),即得常规细粉,备用。

微细粉制备:将上述4种常规细粉分别采用细胞级超微粉碎机粉碎约20 min,收集过300目的微细粉,备用。

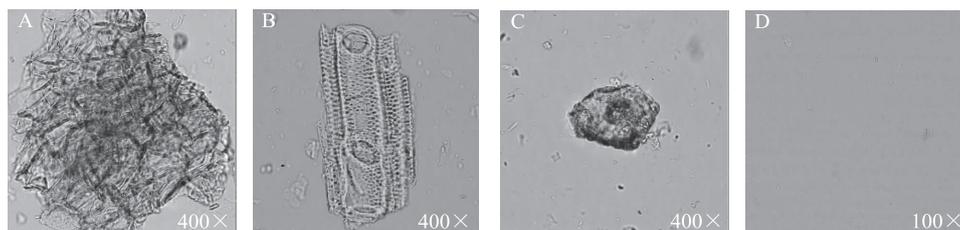
2 方法与结果

2.1 药材细粉显微特征、细胞计数及标准曲线绘制

参照郭旭东等^[5]的方法并略作修改,按表1精密称取不同质量的细粉(80目),分别置于10 mL容量瓶中,加水合氯醛5 mL,超声处理5 min,使药材粉末分散均匀,定容至刻度。用微量移液器吸取30 μ L药液,装片,以混悬液布满载玻片且无气泡为宜,并分别置于BX53型生物显微镜下观察(400 \times)。

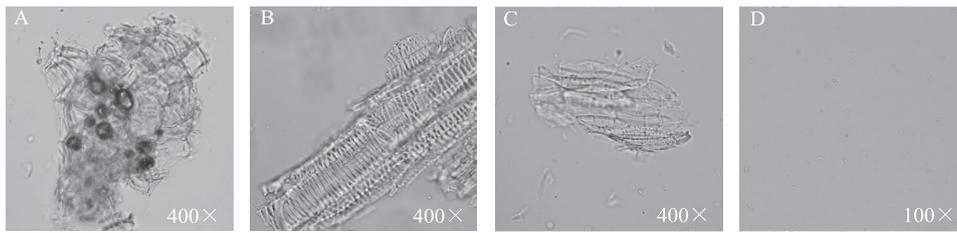
从不同药材常规细粉显微特征图中可见完整木栓细胞、薄壁细胞,各种类型导管、纤维及细胞后含物等。丹参细粉木栓细胞壁厚,含棕色物质;石细胞呈类长方形或不规则形,内含棕黄色物;具缘纹孔导管和螺纹导管多见,见图1。黄芩粉末中木栓细胞壁厚,含棕黄色物质;石细胞呈不规则多角形,韧皮纤维壁厚,多呈梭形且具孔沟,见图2。苦参细粉木栓细胞壁厚,呈不规则多边形;另有螺纹导管和环纹导管,偶见草酸钙方晶,见图3。秦艽细粉中薄壁细胞多见,呈类长方形至不规则形,多含草酸钙针晶;另有环纹导管和螺纹导管等,偶见内皮层细胞,见图4。

根据显微特征观察结果,分别以丹参、黄芩、苦参细粉中完整木栓细胞和秦艽细粉中薄壁细胞为计数指标,以显微镜下一个视野为一个计数单位,每个浓度药液取8个计数单位,计数结果见表1。以完整细胞个数的平均值为纵坐标,以药材细粉称样量为横坐标,绘制标准曲线。结果表明,不同药材在所取浓度范围内表现出较好的线性关系,可用作显微特征计数,故取曲线中部药液浓度为最适浓度进行计数,见表2。



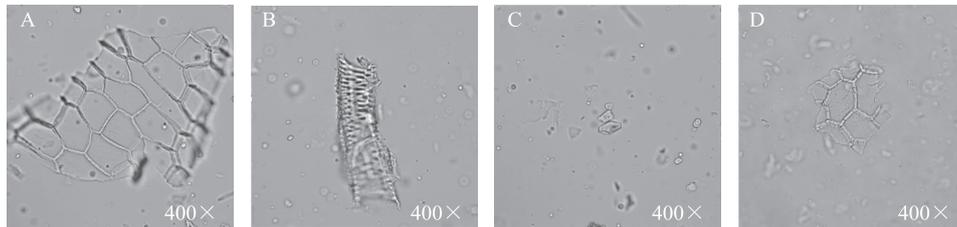
注: A. 木栓细胞(细粉); B. 导管(细粉); C. 石细胞(细粉); D. 微细粉。

图1 丹参粉末显微特征图



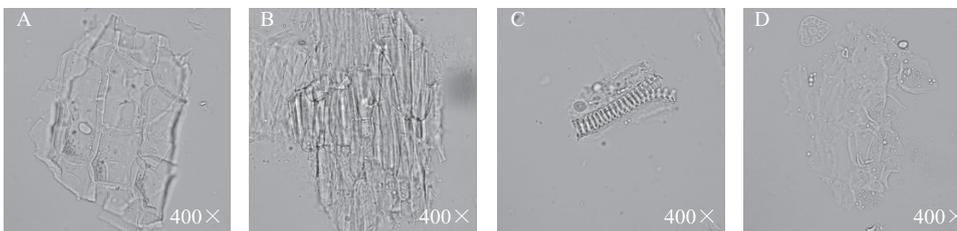
注: A. 木栓细胞(细粉); B. 导管(细粉); C. 韧皮纤维(细粉); D. 超微粉。

图2 黄芩粉末显微特征图



注: A. 木栓细胞(细粉); B. 导管(细粉); C. 草酸钙方晶(细粉); D. 木栓细胞(超微粉)。

图3 苦参粉末显微特征图



注: A. 薄壁细胞(细粉); B. 薄壁细胞(细粉); C. 导管(细粉); D. 薄壁细胞(超微粉)。

图4 秦艽粉末显微特征图

表1 不同称样量细粉中完整细胞个数(n=8)

药材名称	称样量及细胞个数					
丹参	W/g	0.064 1	0.122 5	0.183 2	0.246 2	0.301 2
	N	6.375	7.5	9.25	11.25	12.5
黄芩	W/g	0.037 6	0.069 2	0.125 6	0.182	0.249 6
	N	12.75	13.625	16.125	16.5	20
苦参	W/g	0.124 2	0.184	0.245	0.307 7	0.365
	N	7.125	10.375	11.875	14.875	16.625
秦艽	W/g	0.124 6	0.185 3	0.247	0.305 4	0.359 4
	N	3.125	6.625	6.5	9.125	10.125

注: W. 药材细粉称样量; N. 完整细胞个数。

表2 不同细粉标准曲线和最适浓度

药材名称	标准曲线	r	最适浓度/mg·mL ⁻¹
丹参	Y=26.788X+4.461	0.994 2	18.32
黄芩	Y=32.555 X+11.477	0.959 8	12.56
苦参	Y=38.836 X+2.6532	0.988 3	24.5
秦艽	Y=27.994 X+0.26	0.920 1	24.7

2.2 微细粉体显微特征及细胞破壁率的测定

显微观察结果表明,丹参、黄芩微细粉体中未见完整木栓细胞,偶见导管及纤维等残片。苦参、秦艽微细粉体中偶见完整木栓细胞和薄壁细胞。根据2.1的结果,分别以最适浓度精密称取不同药材细粉和微细粉,置于10 mL容量瓶中,装片方法同2.1;分别置于显微镜下观察25个视野,根据不同药材两种粉末中完整细胞个数、样品质量、混悬液体积等指标计算显微特征个数^[8]:

$$\text{粉末显微特征个数} = (XV)/(V'W)$$

其中, X为盖玻片下粉末中完整细胞的特征数, V为粉末混悬液总体积(mL), V'为盖玻片下粉末混悬液体积(mL), W为粉末重量(mg)。

依照以下公式计算微细粉体细胞破壁率^[9]: $Y = (A - B)/A \times 100\%$ 。上式中, Y为细胞破壁率, A为常规细粉显微特征个数, B为超微粉显微特征个数。由表3各参数分别计算4种细粉和微细粉的

表3 不同粉体显微特征个数计算相关参数($n=25$)

药材名称	粉末类型	W/mg	V/mL	V'/mL	X
丹参	FPa	183.2	10	0.03	7.08
	UFPb	187.6			0.00
黄芩	FP	125.6	10	0.03	13.44
	UFP	122.7			0.00
苦参	FP	245.0	10	0.03	9.68
	UFP	244.1			0.24
秦艽	FP	247.0	10	0.03	5.28
	UFP	244.6			0.24

注: FP. fine powder, 常规细粉; UFP. ultra-fine powder, 微细粉。

显微特征个数, 最终得到各微细粉的细胞破壁率。计算结果表明, 丹参、黄芩微细粉的细胞破壁率可达100%; 苦参、秦艽微细粉的细胞破壁率分别为97.51%和95.41%。

3 讨论

本文研究结果表明, 微细粉体技术对丹参、黄芩、苦参、秦艽4种中药具有良好的细胞破壁效果。丹参、黄芩微细粉体的细胞破壁率均达到100%, 显微特征仅见细胞和导管等碎片, 说明这两种药材的超微粉可达细胞级粉碎水平, 大部分细胞的细胞壁完全被打破, 有利于有效成分的溶出和药效的发挥, 可为制剂工艺研究和临床用药提供理论依据。苦参、秦艽微细粉体细胞破壁率亦可达95%以上, 说明超微粉碎技术对不同中药破壁率的影响有所差异, 取决于中药的种类、物理特性等。本文通过观察比较丹参、黄芩、苦参和秦艽4种药细粉及微细粉体的显微特征, 并以木栓细胞和薄壁细胞作为计数指标, 考察超微粉碎对细胞破壁率的影响, 不同中药细胞破壁率在95.41%~100%, 该方法稳定、方便可行。

中药的有效成分是动植物生命过程中产生的次生代谢产物, 大多分布在细胞内。不同的药用部位、组织、细胞其成分的种类、数量有所差异, 部位不同甚至表现出不同的功能。中药采用传统的煎煮方法, 因为致密的组织结构, 有效成分从细胞壁内浸出利用率只有10~30%。研究表明, 丹参超微粉中

丹酚酸B的溶出速率明显高于其细粉^[10]。同时发现, 三七粉粒度大小对主要成分含量影响明显, 与普通粉碎相比, 三七经超微粉碎2h后, 其超微粉中三七总皂苷含量达8.3%, 高于普通粉碎药材^[11]。吴小明等^[12]研究发现, 三七经超微粉碎后, 3种皂苷的溶出速度快于常规细粉, 8min内可达总溶出量的90%。因此, 本研究后续将对不同药材常规细粉和微细粉体中有效成分含量、溶出速率、体内吸收等差异作进一步研究, 为制剂过程中超微粉的应用提供参考。

参考文献

- [1] 化玮, 刘洋, 艾国, 等. 3种中药最细粉的制备及理化性质考察[J]. 中草药, 2013, 44(23): 3296-3302.
- [2] 邓雯, 谢果, 杨泽锐, 等. 中药破壁饮片安全性研究进展及思考[J]. 中国现代中药, 2015, 17(12): 1340-1344.
- [3] 成金乐, 赖智填, 彭丽华. 中药破壁饮片研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(2): 254-261.
- [4] 贾岩. 破壁饮片或实现颠覆性创新[N]. 医药经济报, 2015-12-07(7).
- [5] 郭旭东, 郭宇廷, 刁其玉, 等. 超微粉碎技术在中草药上的应用[J]. 中国现代中药, 2011, 13(9): 41-44.
- [6] 吴娜, 杨诗龙, 严丹, 等. 粉末中药鉴别方法的研究进展与思考实践[J]. 中草药, 2015, 46(10): 1413-1419.
- [7] 李德成, 刘庆燕. 超微粉碎技术在中药制剂中广泛应用的优越性[J]. 世界中医药, 2011, 6(45): 454-455.
- [8] 姜清华, 翟延君, 王荣祥. 羚羊清肺丸中羚羊角的显微定量研究[J]. 中药材, 2004, 21(2): 90-91.
- [9] 蔡萍, 匡建军, 蔡光先, 等. 白术微粉细胞破壁率的测定[J]. 湖南中医杂志, 2010, 26(5): 120-121.
- [10] 张海英, 聂继红. 丹参超微粉和细粉中丹酚酸B的溶出度研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(9): 4054-4056.
- [11] 王艳萍, 刘宇灵, 杨立新, 等. 超微粉碎技术对三七药材粉碎效果及有效成分含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 34(8): 1430-1434.
- [12] 吴小明, 梁少瑜, 程文胜, 等. 三七普通细粉与超微粉中三七皂苷R1、人参皂苷Rb1及人参皂苷Rg1体外溶出行为的比较研究[J]. 中草药, 2013, 44(24): 3489-3492.

(收稿日期 2016-03-25)