

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01371

两种制备方法的桃花止泻冲剂的生物热动力学比较研究

赵艳玲*, 孔维军, 肖小河, 山丽梅

解放军第302医院药剂科, 全军中药研究所, 北京 100039

[摘要] **目的:**对两种制备方法的桃花止泻冲剂进行生物热动力学比较研究,以评价其生物活性差异。**方法:**制备桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂,采用微量热法测定大肠杆菌在桃花止泻冲剂粗粉制剂和微粉制剂的水溶液作用下的生物热谱曲线,获得相应的生物热动力学参数,评价桃花止泻冲剂粗粉制剂和微粉制剂的生物活性差异。**结果:**随着桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂水溶液浓度的增大,大肠杆菌生长代谢的生长速率常数和最大产热功率值均减小,最高峰的出峰时间和生长抑制率均增大,表明细菌的生长受到抑制,且抑菌作用随着药物浓度的增大而增强。粗粉制剂的半抑制浓度值为35.9 mg/ml,而微粉制剂的半抑制浓度值为31.4 mg/ml。综合分析二者水溶液作用下大肠杆菌的生长代谢曲线和生物热动力学参数可知,桃花止泻冲剂微粉制剂的抑菌作用强于粗粉制剂。**结论:**微量热法可用于分析桃花止泻冲剂粗粉制剂和微粉制剂的生物活性差异,超微粉碎能增强桃花止泻冲剂的抑菌作用。

[关键词] 桃花止泻冲剂;微粉制剂;超微粉碎;微量热法;生物活性

[中图分类号] R 283.62 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1371-04

Biothermo-kinetic comparative study on *Taohua* anti-diarrhea decoction prepared by two different ways

ZHAO Yan-ling*, KONG Wei-jun, XIAO Xiao-he, SHAN Li-mei

PLA Institute of Chinese Materia Medica, Department of Pharmacy, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

[ABSTRACT] **Objective:** To compare the bioactivities of *Taohua* anti-diarrhea granula prepared by two different methods based on biothermo-kinetics study. **Methods:** The coarse and fine powder preparations of *Taohua* decoction were prepared. Microcalorimetry was used to obtain the metabolic curves and biothermo-kinetic parameters of *Escherichia coli* (*E. coli*) growth after treated by the two preparations to evaluate their bioactivities. **Results:** The values of growth rate constant k and maximum heat-out power P_m declined with the concentration increase of the 2 preparations; meanwhile, the values of peak time of the highest peak t_m and growth inhibitory ratio I increased with the concentration increase of the two preparations. The results showed that the growth of *E. coli* was inhibited and the inhibitory effect was strengthened with the concentration increase of the two preparations. The IC_{50} was 35.9 mg/ml for the coarse powder preparation and 31.4 mg/ml for the fine powder preparation. Aggregate analysis of the metabolic curves and biothermo-kinetic parameters of *E. coli* indicated that the fine powder preparation of *Taohua* decoction had stronger inhibitory action against *E. coli* growth than the traditional coarse powder preparation. **Conclusion:** Microcalorimetry can be used to examine the bioactivity differences of the fine and coarse preparations of *Taohua* decoction. Superfine comminution may increase the inhibitory action of *Taohua* decoction.

[KEY WORDS] *Taohua* anti-diarrhea granula; fine powder preparation; superfine comminution; microcalorimetry; bioactivity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1371-1374]

桃花止泻冲剂出自《伤寒论》,由赤石脂、干姜、粳米三味药物组成,具有温中祛寒、涩肠止痢的功效,是治疗泄泻的经方,以冲剂的形式广泛应用于临床,具有广泛的药效作用^[1-3]。但冲剂存在煎药麻烦、剂量大、携带不便、不易保存等缺点。因此,本研

究尝试利用现代中药超微粉碎技术,将桃花止泻冲剂的粗粉制剂超微粉碎制备了桃花止泻冲剂的微粉制剂,并采用生物热力学的理论和方法——微量热法^[4-7],通过考察桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂水溶液对大肠杆菌^[8-9]生长代谢的影响,以评价

[收稿日期] 2008-05-27 **[接受日期]** 2008-07-19

[基金项目] 军队十五科研基金(01Q136);军队十一五科研基金(06MA360)。Supported by "10th Five-Year Plan" Foundation for Science Research(01Q136) and "11th Five-Year Plan" Foundation for Science Research(06MA360)。

[作者简介] 赵艳玲,副研究员。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:010-66933324, E-mail:zhao2855@263.net

二者的药性差异及超微粉碎技术对桃花止泻冲剂生物活性的影响,为开发桃花止泻冲剂新型中药制剂奠定基础。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 瑞典 Thermometric 公司产的 TAM Air Isothermal Calorimeter,该热活性检测仪配置 Pico TC-80 数据采集和分析软件^[10]。

大肠杆菌 (*Escherichia coli* CMCC B44103),由中国药品生物制品检定所提供。培养基:LB 液体培养基,取 NaCl 10 g,酵母膏 5 g,蛋白胨 10 g,溶解于 1 000 ml 去离子水中,调 pH 7.0~7.2 后分装。121℃ 高压蒸气灭菌 30 min,冷却后置 -4℃ 冰箱备用。

桃花止泻冲剂的粗粉制剂由全军中药研究所提供,批号 070712,制法为:300 g 粳米、赤石脂 240 g,加水煎煮浓缩过滤至 1 000 ml,加入 90 g 干姜粉混匀,90℃ 烘干,粉碎后过 100 目筛,即得。

桃花止泻冲剂的微粉制剂由北京环亚天元机械技术有限公司加工,批号 070816,制备流程同桃花止泻冲剂的粗粉制剂,粉碎后过 2 000 目筛,即得。

样品配制:溶剂为无菌水,配制相当于生药 200 mg/ml 的桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂混悬液。

1.2 细菌生长热谱图的测定 采用安瓿法^[11]。在无菌条件下,向参比池各 20 ml 安瓿瓶内分别加入 5 ml 已灭菌去离子水作为参比;反应池各安瓿瓶中精确加入 5 ml 培养基,接种大肠杆菌混悬液,接种量为 1×10^6 个/ml,之后迅速加入不同体积的桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂混悬液,使各安瓿瓶内药液终浓度分别为:0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 和 32.0 mg/ml,加盖瓶塞,密封,放入微量热仪中跟踪记录大肠杆菌生长代谢的热谱曲线(P-t 曲线),实验时系统控温于 37℃。

2 结果

2.1 大肠杆菌正常生长代谢热谱曲线和生长速率常数 在 37℃ 时,安瓿法测定了大肠杆菌正常生长代谢热谱曲线,并考察了方法重现性和仪器的稳定性,见图 1。大肠杆菌的生长曲线共分为 4 个期:迟缓期(AB 段)、停滞期(BC 段)、指数生长期(CD 段)和衰亡期(DE 段)。在细菌的指数生长期中,有:

$$P_t = P_0 \exp(kt) \text{ 或 } \ln P_t = \ln P_0 + kt \quad (1)$$

P_0 、 P_t 分别是细菌在指数生长的起始点和 t 时热功率。将热谱曲线上指数生长期的 P_t 、 t 值带入

(1)式中,用计算机进行线性拟合得到大肠杆菌生长速率常数 k 。 $k = (0.001\ 055 \pm 0.000\ 08) \text{ min}^{-1}$,相关系数 r 均大于 0.996 5,可见本实验方法有良好的重现性,而且仪器的稳定性良好。

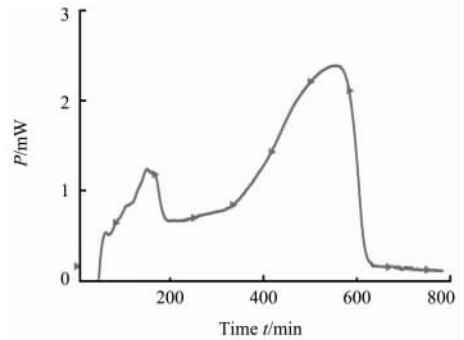


图 1 37℃ 时大肠杆菌正常生长代谢的热谱曲线
Fig 1 Power-time curve of *E. coli* growth at 37℃

2.2 桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂水溶液作用下大肠杆菌生长代谢的热谱曲线 在 37℃,测定了在桃花止泻冲剂粗粉制剂和微粉制剂水溶液作用下大肠杆菌的生长代谢热谱曲线,见图 2。

从热谱曲线可以看出,桃花止泻冲剂粗粉制剂和微粉制剂水溶液对大肠杆菌的生长代谢具有不同程度的抑制作用,在浓度 0~32.0 mg/ml 范围内,相对于空白对照组,随着药物浓度的增大,热谱曲线最高峰的峰值降低,出峰时间滞后,并有较好的趋向性。而对于相同浓度的 2 种制剂,微粉制剂作用下大肠杆菌代谢曲线的峰高降低程度更大、更明显,出峰时间更长,表明微粉制剂的抑菌作用更强。

2.3 细菌生长抑制率 I 和半抑制率浓度 IC₅₀ 细菌生长抑制率(I)定义为:

$$I = [(k_0 - k_c) / k_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中, k_0 为空白对照组细菌的生长速率常数, k_c 为浓度为 c 试药组细菌的生长速率常数。IC₅₀ 即为抑制率为 50% 时的药物浓度,IC₅₀ 可用来衡量细菌对药物的敏感性,IC₅₀ 越小,表明细菌对药物越敏感,即抑菌作用越强。大肠杆菌在桃花止泻冲剂粗粉制剂和微粉制剂水溶液作用下的生长速率常数 k 、最大发热功率 P_m 、最高峰出峰时间 t_m 、总产热量 Q_t 和不同浓度的桃花止泻冲剂粗粉制剂和微粉制剂水溶液对大肠杆菌的生长抑制率 I 及 IC₅₀ 见表 1。

表 1 数据显示,随着桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂水溶液浓度的增大,大肠杆菌生长代谢的 k 和 P_m 值均减小, t_m 和 I 值均增大,表明细菌的生长受到抑制,抑菌作用随着药物浓度的增大而增强。从同一浓度桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂作

用下大肠杆菌的热动力学参数和总体趋势来看, k 、 P_m 值: 微粉制剂 < 粗粉制剂, 而 t_m 值: 微粉制剂 > 粗

粉制剂, 表明 2 种制剂抑菌作用强度为: 微粉制剂 > 粗粉制剂。IC₅₀ 值的大小进一步证明了这一结论。

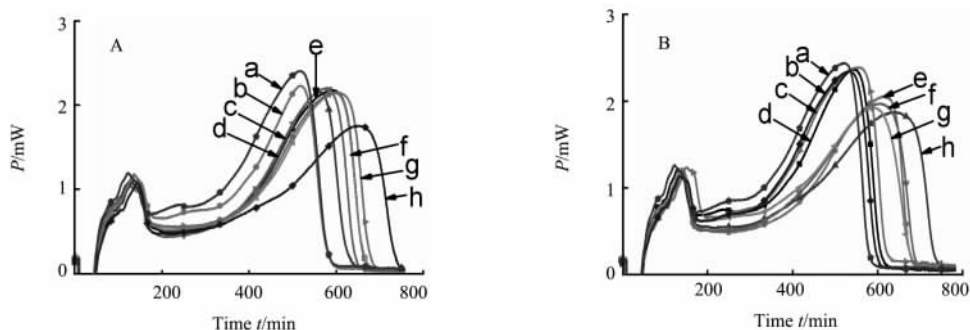


图 2 桃花止泻冲剂粗粉制剂(A)及微粉制剂(B)作用下大肠杆菌生长代谢的热谱曲线(37℃)

Fig 2 Power-time curves of *E. coli* growth affected by coarse powder preparation (A) and fine powder preparation (B) of *Taohua* decoction

a:0 mg/ml; b:0.5 mg/ml; c:1.0 mg/ml; d:2.0 mg/ml; e:4.0 mg/ml; f:8.0 mg/ml; g:16.0 mg/ml; h:32.0 mg/ml

表 1 大肠杆菌在桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂作用下的热动力学参数

Tab 1 Thermo-kinetic parameters of *E. coli* growth at 37℃ affected by coarse and fine powder preparations of *Taohua* decoction

Drug	C $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	t_m t/min	k f/min ⁻¹	P_m P/mW	Q_t W/J	I/%	IC ₅₀ $\rho_B / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
Control	0	519.0	0.010 59	2.544	24.6	0	
Coarse powder preparation	0.5	525.7	0.010 29	2.599	14.6	2.8	35.9
	1.0	542.6	0.010 02	2.326	18.6	5.4	
	2.0	538.1	0.009 74	2.236	21.6	8.0	
	4.0	602.3	0.009 50	2.192	21.5	10.3	
	8.0	592.3	0.009 45	2.178	25.4	10.8	
	16.0	575.7	0.008 86	1.865	25.3	16.4	
	32.0	620.7	0.005 93	1.594	26.6	44.0	
Fine powder preparation	0.5	522.0	0.008 75	2.468	17.2	17.4	31.4
	1.0	545.0	0.008 61	2.232	18.5	18.7	
	2.0	562.3	0.008 51	2.188	21.2	19.6	
	4.0	579.0	0.008 50	2.152	23.0	19.7	
	8.0	600.7	0.007 11	1.923	24.5	32.9	
	16.0	610.7	0.006 83	1.744	23.9	35.5	
	32.0	660.7	0.005 17	1.526	25.2	51.2	

2.4 生长速率常数 k 与药物浓度 C 的关系 以大肠杆菌指数生长期的生长速率常数 k 对桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂水溶液的浓度 C 进行线性拟合, 得到大肠杆菌在桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂不同药液浓度作用下的 k - C 曲线(图 3A)。

桃花止泻冲剂的粗粉制剂对大肠杆菌的 k - C 曲线: $k = -1.25 \times 10^{-4} C + 1.03 \times 10^{-2}$, $r = -0.974 2$; 桃花止泻冲剂的微粉制剂对大肠杆菌的 k - C 曲线: $k = -1.13 \times 10^{-4} C + 8.7 \times 10^{-3}$, $r = -0.974 0$ 。

2.5 最大发热功率 P_m 与药物浓度 C 的关系 大肠杆菌在桃花止泻冲剂粗粉制剂和微粉制剂不同浓度水溶液作用下, 指数生长期的最大发热功率 P_m 与药物浓度 C 的关系见图 3B。

桃花止泻冲剂粗粉制剂作用于大肠杆菌的 P_m - C 曲线: $P_m = -2.64 \times 10^{-2} C + 2.38$, $r = -0.933 0$; 桃花止泻冲剂微粉制剂作用于大肠杆菌的 P_m - C 曲线: $P_m = -2.60 \times 10^{-4} C + 2.27$, $r = -0.929 0$ 。

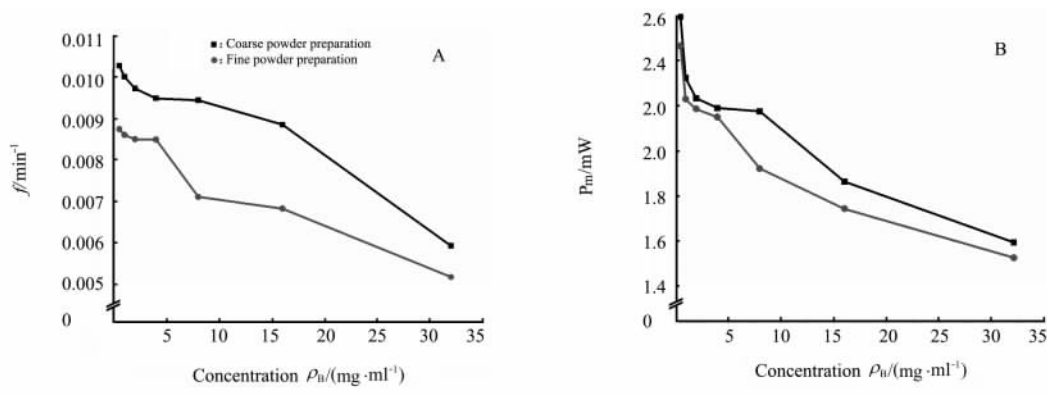


图3 桃花止泻冲剂的粗粉制剂和微粉制剂作用于大肠杆菌的 k -C 曲线(A)和 P_m -C 曲线(B)

Fig 3 The k -C plot (A) and P_m -C plot (B) of *E. coli* growth affected by coarse and fine powder preparations of Taohua decoction

3 讨论

对中药材及制剂进行细胞级粉碎,是采用目前世界先进的超微粉碎技术对传统中药进行现代化变革的一个大胆尝试。传统粉碎工艺(150 ~ 200 目)得到的药材粉末的中心粒径一般为 75 μm 左右,超微粉碎技术(1 500 ~ 2 500 目)能将中药材的中心粒径降低到 5 ~ 10 μm 以下,植物药材的细胞破壁率 $\geq 95\%$ 。这种新技术的采用,不仅适合于各种不同质地的药材,还可使其中的有效成分充分暴露出来,而不需再通过以往的透壁(膜)释放,从而使药物发挥作用更加迅速、完全,提高了中药体外溶出度、改善了中药生物体内吸收率,大大提高了中药的生物利用度和治疗效果。因此,该技术在中药生产中已显露出特有的优势,是值得推广和广泛应用的新型中药及制剂的粉碎技术^[12-15]。

由图 3A 和 3B 可以看出,大肠杆菌在同一浓度的桃花止泻冲剂的微粉制剂作用下的 k 和 P_m 值及 k -C 和 P_m -C 曲线的斜率明显低于桃花止泻冲剂的粗粉制剂,而且桃花止泻冲剂的微粉制剂作用于大肠杆菌的 IC_{50} (31.4 mg/ml) 明显小于桃花止泻冲剂粗粉制剂的 IC_{50} (35.9 mg/ml)。此研究结果表明,对桃花止泻冲剂的粗粉制剂进行超微粉碎,能明显提高其抑菌作用的效果,有降低药材用量和提高临床疗效的优势,充分体现中医特色,使桃花止泻冲剂成为稳定的新型中药制剂,从而克服传统汤剂的用药量多及煎药、服用、携带等不便的缺点,让冲剂这种传统的剂型发挥更大更好的疗效。

[参考文献]

[1] 山丽梅,赵艳玲,肖小河,蔡光明,贺承山. 桃花止泻冲剂的药理学研究[J]. 中药材,2003,26:420-422.

[2] 赵艳玲,山丽梅,肖小河,袁海龙,蔡光明,贺承山. 桃花止泻颗粒的药理学研究[J]. 解放军药学报,2003,19:439-441.

[3] 山丽梅,赵艳玲,刘军,肖小河,蔡光明,贺承山. 桃花汤的现代研究及临床应用[J]. 中国新医药,2003,2:44-46.

[4] Kong W, Zhao Y, Shan L, Xiao X, Guo W. Thermochemical studies on the quantity-antibacterial effect relationship of four organic acids from *Radix isatidis* on *E. coli* growth[J]. Biol Pharm Bull,2008,31:1301-1305.

[5] Kong W, Zhao Y, Shan L, Xiao X, Guo W. Microcalorimetric studies of the action on four organic acids in *Radix isatidis* on the growth of microorganisms[J]. Chin J Biotechnol,2008,24:646-650.

[6] Xiaoyan L, Yi L, Peng L, Songsheng Q, Ziniu Y. Microcalorimetric investigation on the growth model and the protein yield of *Bacillus thuringiensis* [J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59:267-274.

[7] Yang Y, Zhu J, Liu Y, Shen P, Qu S. Microcalorimetry is a sensitive method for studying the effect of nucleotide mutation on promoter activity [J]. J Biochem Biophys Methods, 2005, 62: 183-189.

[8] Ruming Z, Yi L, Zhixiong X, Ping S, Songsheng Q. A microcalorimetric method for studying the biological effects of La^{3+} on *Escherichia coli* [J]. J Biochem Biophys Methods, 2000, 46(1-2):1-9.

[9] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,肖小河,郭伟英. 基于微量热法的板蓝根提取方法和活性部位挑选[J]. 化学学报, 2008, 66: 1111-1116.

[10] Wadso I. Microcalorimetric techniques for characterization of living cellular systems-Will there be any important practical application [J]. Thermochim Acta, 1995, 31:337-350.

[11] 沈雪松,刘义,周传佩,汤厚宽,赵儒铭,屈松生. 微生物代谢的热化学研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版),2000,46:429-432.

[12] 王玉秀,王玉璧. 超微粉碎技术在中药中的应用[J]. 中国新医药,2004,3:67-68.

[13] 刘卫红. 桃花汤微粉制剂与煎剂的药理学对比研究[J]. 河南中医,2005,25:21-23.

[14] 汪涛,孙亮,梁蓉梅,宓鹤鸣. 中药超微粉碎的研究进展与应用前景[J]. 药学实践杂志,2007,25:129-133.

[15] 吴以岭,李涛,李妍,李家康,胡国恒,谷春华,等. 超微粉碎工艺通心络胶囊治疗中风病的临床研究[J]. 中国中药杂志, 2007,32:1928-1931.