

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.010

淫羊藿配方颗粒制备工艺优化及一致性评价*

郭冬¹, 薛佩芸², 穆庆丽¹, 乔园¹, 陈萍^{1,2,Δ}, 曹雅静³

(1. 陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046;
3. 陕西省中医医院, 陕西 西安 717300)

摘要:目的 探讨淫羊藿配方颗粒制备工艺的优化及一致性评价。方法 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以出膏率、淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷含量为评价指标, 考察浸泡时间、加水量、提取时间、提取次数对提取工艺的影响, 筛选最佳提取工艺。饮片经最佳工艺提取后, 减压浓缩、喷雾干燥、干法制粒制备配方颗粒。通过特征成分的含量测定比较饮片-中间体-配方颗粒间量值传递的相关性。结果 最佳提取工艺为浸泡 0.5 h, 加 12 倍量水, 煎煮 3 次, 每次煎煮 1.5 h。结论 淫羊藿水煎提取工艺稳定, 重复性好。淫羊藿饮片-中间体-配方颗粒中淫羊藿苷含量呈量值传递关系, 一致性较好, 可为生产提供参考。

关键词:淫羊藿; 配方颗粒; 正交试验; 优化工艺; 含量测定; 量值传递

中图分类号: R932; TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0038-04

Optimization and Consistency Evaluation of Preparation Process of Yinyanghuo Dispensing Granules

GUO Dong¹, XUE Peiyun², MU Qingli¹, QIAO Yuan¹, CHEN Ping^{1,2}, CAO Yajing³

(1. Shaanxi Province Chinese Medicine Research Institute, Xi'an, Shaanxi, China 710003; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, China 712046; 3. Shaanxi Provincial Chinese Medicine Hospital, Xi'an, Shaanxi, China 717300)

Abstract: Objective To investigate the optimization and consistency evaluation of the preparation process of Yinyanghuo Dispensing Granules. **Methods** Orthogonal test $L_9(3^4)$ was used to evaluate the effects of soaking time, icariin on the extraction process, the amount of water added, the extraction time and the number of extractions. After the herbal was extracted by the best process, the formula particles were prepared by vacuum concentration, spray drying, and dry granulation. The correlation of the amount transfer between the decoction piece-extract solution-fluid extract-dispensing granules was compared by the content of the characteristic components. **Results** The best extraction process was to soak for 0.5 h, add 12 times the amount of water, and 3 times of decoction for 1.5 h each time. **Conclusion** The decoction extraction process of *Epimedium brevicornu* is stable and reproducible. The content of icariin in decoction piece-extract solution-fluid extract-dispensing granules shows a quantitative transfer relationship, which has good consistency and provided basis for production.

Key words: *Epimedium brevicornu*; dispensing granules; orthogonal test; optimization process; content determination; amount transfer

淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 为小檗科多年生直立草本植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、巫山淫羊藿或朝鲜淫羊藿的地上部分^[1-3], 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效, 主治阳痿早泄、腰酸腿痛、四肢麻木、半身不遂、神经衰弱、健忘、耳鸣、目眩等症^[4-5]。现代药理学研究表明, 淫羊藿对阳痿、遗精、骨质疏松、手足麻木拘挛、更年期高血压、心脑血管疾病及提高机

体免疫力、抗肿瘤、抗衰老等疗效显著。目前, 已分离出多种成分, 主要为异戊烯基黄酮类, 一般认为 8-异戊烯基黄酮及其苷类为主要活性成分, 其中淫羊藿苷为特征成分, 具有促进神经突触生长、抵抗神经元损伤、改善骨代谢、抗炎、抗氧化应激、抗抑郁和抗肿瘤等活性^[6-8]。本研究中探讨了淫羊藿配方颗粒制备工艺的优化及一致性评价, 旨在为生产提供参考。现报道如下。

*基金项目: 陕西省创新能力支撑计划项目[2018PT-29]。

第一作者: 郭冬, 女, 大学本科, 研究员, 研究方向为中药药剂学, (电子信箱)787422146@qq.com。

Δ通信作者: 陈萍, 女, 大学本科, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为中药质量评价与新药开发, (电子信箱)cp3049033@163.com。

- 模型大鼠的保护作用[J]. 中国药业, 2019, 28(10): 19-22.
- [9] 徐新, 高伟伟, 吕莉, 等. 小鼠颅脑创伤模型的构建及运动功能评估[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(1): 252-255.
- [10] 刘孝玲. 高龄脑梗死患者天丹通络胶囊联合丹红注射液治疗 33 例[J]. 世界中医药, 2012, 7(6): 510-511.
- [11] 邹文孝, 米忠友. 天丹通络胶囊治疗中风后遗症 40 例[J]. 中国药业, 2012, 21(16): 104.
- [12] ZHANG ZW, JIANG JJ, LUAN MC, et al. Nogo-A antibody treatment enhances neuron recovery after sciatic nerve transection in rats[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(8): 1780-1786.
- [13] INEICHEN BV, KAPITZA S, BLEUL C, et al. Nogo-A antibodies enhance axonal repair and remyelination in neuro-inflammatory and demyelinating pathology[J]. Acta Neuropathol, 2017, 134(3): 423-440.
- [14] LEBLANC R, HOUSSIN A, PEYRUCHAUD O. Platelets, autotaxin and lysophosphatidic acid signaling: win-win factors for cancer metastasis. Platelets and ATX/LPA track in metastasis[J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(15): 3100-3110.

(收稿日期: 2019-11-29)

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(包括自动进样器,四元泵,柱温箱,vwd 检测器,美国 Agilent 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 1 500 W,频率为 40 kHz);BT25S 型电子天平,BS210S 型电子天平(精度为十万分之一,赛多利斯科学仪器<北京>有限公司);CP2102 型电子天平(精度为万分之一,奥豪斯仪器<常州>有限公司);ZLG 型中药浸膏专用离心喷雾干燥机(浙江钱江伟岸干燥设备有限公司,功率为 63 kW);GZL100-25L 型干法制粒机(石家庄科源机械设备有限公司,功率为 7.5 kW);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);水为纯净水;甲醇、乙醇等试剂均为分析纯(天津市富宇精细化工有限公司)。

1.2 试药

淫羊藿苷对照品(批号为 110737-201516,供含量测定用,中国食品药品检定研究院);淫羊藿饮片(陕西兴盛德中药饮片有限公司,批号分别为 20180301,20180310,20180510),经陕西省中医药研究院中药研究所炮制鉴定室主任杨智峰研究员鉴定为正品;淫羊藿配方颗粒(陕西必康制药集团控股有限公司,批号分别为 20180915,20180916,20180917)。

2 方法与结果

2.1 提取工艺优化^[9-12]

2.1.1 单因素考察

浸泡时间考察:精密称取淫羊藿饮片(批号为 20180301)50 g,共 3 份,依次加水 800 mL,搅匀,浸泡,分别于 20,40,60,80,100 min 时滤出药液,读取体积,直至体积不再减少则停止观察。结果显示,浸泡 60 min 后,药液体积基本不再增加,计算吸水倍数为 0.2,故加水量不得低于 10 倍量。详见表 1。

表 1 淫羊藿浸泡时间单因素考察结果(mL)

序号	滤液体积				
	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min
1	675	660	642	640	640
2	676	662	640	640	639
3	675	660	640	641	639
$\bar{x}$	675	661	640	640	639

吸水倍数=(加水体积-倾出药液体积)/加水体积

淫羊藿吸水倍数=(800-640)/800=0.2

煎煮时间:取淫羊藿饮片 21 份,每份 50 g,依次加水 650 mL,精密称定,依次加热回流 15,30,45,60,75,90,120 min,每个时间点平行试验 3 次,煎煮液滤过,冰箱静置 24 h 后,离心,量取上清液 100 mL,置已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105℃烘至恒重,即可。结果提取

90 min 后,干膏基本无明显变化。

2.1.2 正交试验

煎煮工艺条件优选:影响水煎煮的主要因素通常有浸泡时间、煎煮时间、加水量、煎煮次数及粒度,考虑大生产通常以饮片投料,因此重点考察浸泡时间(因素 A)、加水量(因素 B)、煎煮时间(因素 C)、煎煮次数(因素 D)4 个因素,详见表 2。

表 2 正交试验因素水平

水平	因素 A(h)	因素 B(倍)	因素 C(h)	因素 D(次)
1	0	10	1.0	1
2	0.5	12	1.5	2
3	1.0	14	2.0	3

正交设计及结果:以 $L_9(3^4)$ 表安排试验,以淫羊藿总黄酮、淫羊藿苷为考察指标,结合干浸膏得率进行方差分析,以 P 值判断影响因素的差异性,得煎煮最佳工艺。

2.1.3 干膏率测定

精密量取各煎煮液 100 mL,分别置已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,残渣于 105℃干燥 3 h,取出,置干燥器中放置 30 min,称定质量,计算出膏率(%)。 $Y(\%) = (m_1 / 100 \times V) / m_2 \times 100\%$ (m_1 为干浸膏质量, V 为样品溶液体积, m_2 为饮片质量)。

2.1.4 方差分析

依据表 3 正交试验安排和试验数据,以干膏率(%)占 50%、淫羊藿总黄酮(UV 法,%)及淫羊藿苷量(HPLC 法,mg)各占 25% 为基数,计算综合值,以综合值进行方差分析,结果见表 4。可见,各因素作用主次为因素 D>因素 C>因素 A>因素 B;方差分析结果显示,D 因素有显著性差异($P<0.05$),C 因素次之,因素

表 3 正交试验设计和数据分析

序号	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D	干膏率 (%)	淫羊藿总黄酮 (UV 法,%)	淫羊藿苷含量 (HPLC 法,mg)	综合值
1	1	1	1	1	8.38	2.50	0.17	0.40
2	1	2	2	2	15.12	4.90	0.43	0.84
3	1	3	3	3	18.38	6.04	0.54	1.04
4	2	1	2	3	16.81	5.57	0.52	0.98
5	2	2	3	1	8.77	3.51	0.25	0.52
6	2	3	1	2	15.58	4.82	0.35	0.77
7	3	1	3	2	13.45	4.25	0.35	0.72
8	3	2	1	3	15.12	4.85	0.37	0.79
9	3	3	2	1	10.66	3.27	0.22	0.51
S_1	2.28	2.10	1.96	1.43				
S_2	2.27	2.15	2.33	2.33				
S_3	2.02	2.32	2.28	2.81				
S_4	0.014 467	0.008 867	0.026 867	0.327 2				

注:综合值=(淫羊藿苷量/最大淫羊藿苷量)×0.5+(干膏率/最大干膏率)×0.25+(总黄酮量/最大总黄酮量)×0.25。

表4 方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F值	F临界值	P
A	0.014 466 667	2	0.007 233	1.631 579	
B	0.008 866 667	2	0.004 433		
C	0.026 866 667	2	0.013 433	3.030 075	
D	0.327 2	2	0.163 6	36.902 26	<0.05

A和因素B无显著性差异($P > 0.05$)。综合考虑,确定最佳工艺为 $A_2B_2C_2D_3$,即浸泡0.5 h,加12倍量水,煎煮3次,每次煎煮1.5 h。

2.1.5 验证试验

精密称取淫羊藿饮片50 g,精密称定,共3份,按最佳工艺进行验证试验。结果淫羊藿总黄酮、淫羊藿苷及干膏率均大于或接近于正交试验表中的最高值,且重复性好,工艺相对稳定、合理。详见表5。

表5 验证试验结果

样品	药材量(g)	干膏率(%)	淫羊藿总黄酮(UV法,%)	淫羊藿苷(HPLC法,mg)
1	50	17.938	5.5	0.75
2	50	16.262	5.6	0.75
3	50	18.352	5.4	0.79
$\bar{X}$		17.532	5.5	0.76

2.2 淫羊藿苷含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Diamondsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(28:72, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:270 nm;柱温:30℃。理论板数按淫羊藿苷峰计应不低于1500。

2.2.2 溶液制备

取对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含无水淫羊藿苷270.8 μg的溶液,作为对照品溶液。精密量取表3中1~9号水煎液各5 mL,置25 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm滤膜滤过,作为供试品溶液。精密吸取5 mL蒸馏水,置25 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm滤膜滤过,作为阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取2.2.2项下3种溶液各

10 μL,按拟订色谱条件测定。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置处有吸收,阴性对照无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:分别精密量取淫羊藿苷对照品液0.1,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL,置5 mL容量瓶中,加甲醇制成每1 mL含淫羊藿苷质量浓度为5.416,27.08,54.16,81.24,108.32,135.40,162.48 μg/mL的溶液,按拟订色谱条件进样测定,重复2次。以淫羊藿苷峰面积平均值(Y)为纵坐标、质量浓度(X, μg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得淫羊藿苷线性回归方程 $Y = 21.602\ 75X - 1.193\ 23$, $R^2 = 0.999\ 95$ ($n = 7$)。结果表明,淫羊藿苷质量浓度在2.708~162.48 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2.2项下对照品溶液与供试品溶液各10 μL,分别重复进样6次。结果的RSD分别为0.55%和0.60% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取饮片(批号为20180301)适量,精密称定,依法制备供试品溶液,精密吸取10 μL,分别于0,1,2,4,8,12,20 h时测定峰面积。结果的RSD为3.24% ($n = 7$),表明供试品溶液在20 h内稳定性良好。

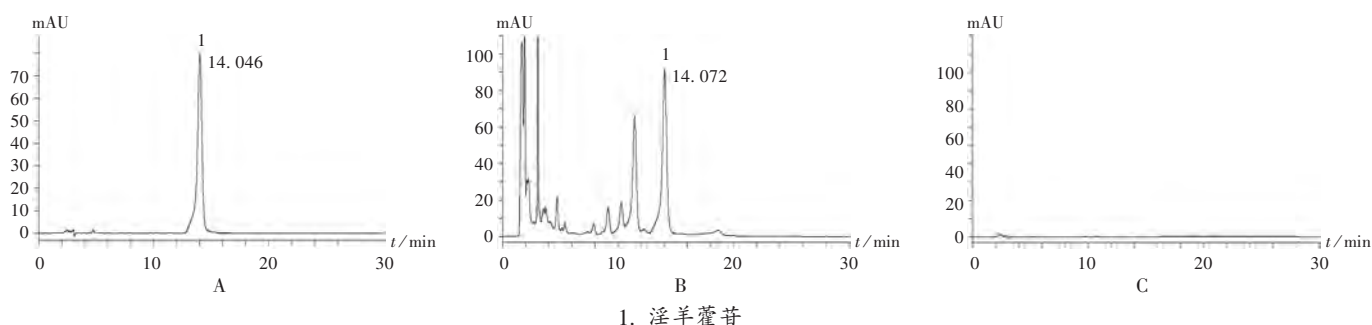
重复性试验:取饮片(批号为20180301)6份,每份50 g,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果的RSD为5.01% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:分别精密量取重复性试验项下6份样品溶液各1 mL,置5 mL容量瓶中,加入适量淫羊藿苷对照品溶液,以甲醇定容至刻度,按拟订色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表6。

2.3 淫羊藿总黄酮含量测定

溶液制备:取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含10.832 μg的溶液,即得对照品溶液。精密量取表3中1~9号水煎液1 mL,置100 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得供试品溶液。

测定法:分别取供试品溶液和对照品溶液,以相应试剂为空白,按2015年版《中国药典》通则0401紫外-可见分光光度法,于270 nm波长处测定吸光度,并计算。



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

表6 淫羊藿苷加样回收试验结果($n=6$)

称样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
50.01	260.09	129.984	387.33	97.89	99.12	3.47
50.00	260.09	129.984	384.87	96.00		
49.98	260.09	129.984	387.24	97.82		
50.00	130.045	216.64	358.30	105.36		
50.01	130.045	216.64	348.24	100.72		
50.02	130.045	216.64	340.00	96.91		

结果见表3。

2.3 配方颗粒制备及中试数据^[13]

取3批饮片(批号分别为20180301, 20180310, 20180510)各80.0 kg, 以上述最佳工艺进行提取(浸泡0.5 h, 加12倍量水, 煎煮3次, 每次1.5 h, 滤过, 合并3次滤液, 于60℃减压浓缩至相对密度约为1.24 g/mL, 取适量糊精, 以75%乙醇为黏合剂, 采用湿法制粒, 干燥得颗粒30.3 kg, 共3批(批号分别为20180915, 20180916, 20180917)。试验结果见表7。

表7 3批样品中试数据结果

批号	投料(kg)	提取液(L)	流浸膏(kg)	糊精(kg)	配方颗粒(kg)
20180915	80	211.0	19.1	7.9	10.1
20180916	80	210.5	18.9	7.5	9.8
20180917	80	210.7	20.0	7.6	10.4

2.4 淫羊藿苷量值传递

精密称取饮片0.5 g, 按2015年版《中国药典(一部)》淫羊藿饮片含量测定项下供试品溶液制备方法制备饮片供试品溶液。精密量取3批中试提取液各20 mL, 按2.2.2项下方法制备供试品溶液。精密称取3批中试流浸膏各0.2 g, 加入10 mL热水, 超声处理30 min, 依法制备流浸膏供试品溶液。精密称取3批中试配方颗粒各0.2 g, 加热水10 mL, 超声处理30 min, 依法制备配方颗粒供试品溶液。分别取以上供试品溶液, 按2.2项下方法测定淫羊藿苷含量。结果见表8。可见, 由饮片到配方颗粒成品, 淫羊藿苷总转移率达40%, 由饮

表8 淫羊藿苷→中间体→配方颗粒指标成分量值传递结果(%)

项目		淫羊藿苷含量		
		20180915	20180916	20180917
饮片	含量	0.97	0.97	0.97
	转移率	70.10	69.07	69.07
流浸膏	含量	0.48	0.37	0.39
	转移率	70.58	55.22	58.21
配方颗粒	含量	0.43	0.32	0.35
	转移率	89.03	86.48	89.74
	总转移率	44.33	32.99	36.08

注: 中间体包括提取液和流浸膏。量值传递过程转移率为饮片→提取液→流浸膏→配方颗粒; 总转移率为饮片→配方颗粒。

片→提取液淫羊藿苷转移率降低约30%, 在煎煮过程中, 损失一定量的淫羊藿苷, 但在制备工艺全过程中, 淫羊藿苷含量较稳定。可见, 淫羊藿饮片-提取液-流浸膏-配方颗粒间特征性成分的量值传递一致性较好。

3 讨论

参考2015年版《中国药典(一部)》淫羊藿的评价指标, 并分析饮片-提取液-流浸膏-配方颗粒间的量值传递, 确定以淫羊藿苷作为配方颗粒质控指标。本试验中对淀粉、糊精2种辅料的流动性及成型性, 结果表明, 糊精比淀粉流动性、成型性好, 不易吸湿, 故选择糊精作为辅料。通过多次配伍考察干粉与糊精的比例, 最终确定干粉-糊精(1:1)制粒, 效果更佳。将传统的中药汤剂制备成中药配方颗粒后, 由于剂型发生改变, 可能影响有效成分的量值传递。本研究中考察了饮片-提取液-流浸膏-配方颗粒配方成型等工艺淫羊藿苷的含量传递变化, 求证各工艺过程中特征成分的含量及转移率, 评价配方颗粒制备工艺的均一性, 为配方颗粒替代传统汤剂的研究提供了思路。

参考文献:

- [1] 吴文辉, 胡麟, 冯健, 等. 淫羊藿炮制前后对正常和肾虚小鼠肾上腺VC水平的影响[J]. 中成药, 2014, 36(11): 2397-2399.
- [2] 李三红, 王翠娣. 淫羊藿炮制工艺研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版)2005, 21(3): 194.
- [3] 朱粉霞, 赵永刚, 贾晓斌, 等. 淫羊藿炮制前后UPLC-PDA-MS的指纹图谱研究[J]. 化学学报, 2012, 70(5): 635-642.
- [4] 李时珍. 本草纲目(校点本)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1981: 750.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 306.
- [6] 王静, 李建平, 张跃文, 等. 淫羊藿药理学研究进展[J]. 中国现代医生, 2009, 47(21): 49.
- [7] 贾敏鸽, 周金云, 孙文基. 陕西产淫羊藿资源分布与化学成分研究概况[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 2087-2091.
- [8] 刘凯杰, 李超. 淫羊藿药理研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学, 2014, 43(2): 183-186.
- [9] 冯硕. 决明子中橙黄决明素的提取、分离及纯化工艺探讨[J]. 当代化工研究, 2018(11): 170-171.
- [10] 陆赛卫, 袁华. 正交试验法优选决明子的提取工艺[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2010, 32(2): 105-108.
- [11] 王莹, 王青, 张伟东, 等. 多指标正交试验法优选决明子蒽醌类成分的提取方法[J]. 中成药, 2012, 34(9): 1684-1688.
- [12] 张立明, 权洪峰, 郑传莉, 等. 正交设计优化决明子中蒽醌提取工艺研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(1): 93-95.
- [13] 李梦杰. 山蜡梅、决明子、荷叶三种中药配方颗粒的制备工艺及质量标准研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2016.

(收稿日期: 2019-10-18; 二次修回日期: 2020-01-15)