

中图分类号: R94 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)22-0073-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.22.016



通络颗粒制备工艺优选*

王云静, 张雪盈, 贾雨熹, 刘诗怡, 刘 嵩, 陈亚军[△]

(武汉科技大学医学院, 湖北 武汉 430065)

摘要:目的 优选通络颗粒制备工艺。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法测定葛根素含量。以加水倍数、提取时间、提取次数为考察因素,以葛根素含量、浸膏得率的综合评分为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选样品的提取工艺;常压压缩,考察 $(65 \pm 5)^\circ\text{C}$ 温度下浸膏密度以考察浓缩工艺;通过改变辅料种类及与浸膏的用量比考察成型工艺;并验证。结果 优选的提取工艺为,按处方量称取各味药材,提取2次(分别加8倍及6倍量水),每次1h;浓缩工艺为,浓缩滤液至密度为 $1.25 \sim 1.32 \text{ g/mL}$;成型工艺为,按辅料:浸膏=2:1(m/m)加入辅料糊精制粒、干燥、整粒。验证试验结果表明,优化后的制备工艺稳定可行。结论 优化后的制备工艺可为通络颗粒的工业化生产提供参考。

关键词:通络颗粒;制备工艺;优化;质量标准

Optimization of Preparation Process for Tongluo Granules

WANG Yunjing, ZHANG Xueying, JIA Yuxi, LIU Shiyi, LIU Song, CHEN Yajun

(School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, China 430065)

Abstract: Objective To optimize the preparation process of Tongluo Granules. **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the content of puerarin. The extraction process was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test, with the water addition amount, extraction time and extraction frequency as the investigation factors, and with the comprehensive score of puerarin content and extract yield as the evaluation indicator. The atmospheric compression was adopted, the density of the extract at a temperature of $(65 \pm 5)^\circ\text{C}$ was calculated to investigate the concentration process. The type of excipients and the ratio of their dosage to the concentrated solution dosage were changed to investigate the molding process. The verification test was carried out. **Results** The optimal extraction process was to weigh each medicinal herb based on the prescription amount and extract twice (adding eight times and six times the amount of water respectively), each time for 1 h. The concentration process was to concentrate the filtrate to a density of $1.25 - 1.32 \text{ g/mL}$. The molding process was to add excipient dextrin at a ratio of 2 : 1 (m / m) to the extract for granulation, followed by drying and grain-size stabilization. The verification test showed that the optimal preparation process was stable and feasible. **Conclusion** The optimal preparation process can provide a reference for the industrial production of Tongluo Granules.

Key words: Tongluo Granules; preparation process; optimization; quality standard

颈椎病发病率逐年升高,且年轻化趋势明显^[1]。西医主要采用非甾体类抗炎药治疗,起效快,但易损伤肝肾及胃肠黏膜,且多用于急性颈椎疼痛,对一般的颈椎

不适效果有限^[2]。中医认为,颈椎病病在筋骨,病因多为积劳伤颈,损及肝肾,外邪侵犯,气滞血瘀^[3]。中医常以针灸联合中药的方式放松颈部肌肉及改善血液循环^[4]。

*基金项目:湖北省自然科学基金[2022CFB249]。

第一作者:王云静,女,在读硕士研究生,研究方向为药物制剂及质量标准,(电子信箱)1677430488@qq.com。

[△]通信作者:陈亚军,男,博士,副教授,研究方向为药物制剂及质量标准,(电子信箱)409345310@qq.com。

33(6):803-811.

- [9] 冯禹壮,鞠艳娟,肖春萍,等. 不同产地加工方式对北苍术中主要挥发油成分含量的影响[J]. 时珍国医国药,2023,34(3):601-605.
- [10] 熊耀坤,周叶婷,柳鑫梁,等. GC-MS结合主成分分析比较广藿香干燥前后挥发油化学成分差异[J]. 中医药导报,2019,25(3):83-86.
- [11] 左邀勋,刘积光,高玉梅,等. 丁香不同部位挥发油的GC-MS成分分析和抗氧化活性比较[J]. 食品研究与开发,2022,43(8):146-151.
- [12] 梁颖,陶勇,张小红,等. 八角茴香不同部位挥发油化学

成分GC-MS分析[J]. 中药材,2010,33(7):1102-1105.

- [13] 李皓翔,钱正明,范卫锋,等. 绿色快速冬虫夏草核苷类成分含量分析[J]. 中药材,2021,44(11):2647-2650.
- [14] 蒋寒林,黄衡宇,王元忠. 三种方法提取长叶轮叶草果实挥发油成分GC-MS分析[J]. 中药材,2019,42(2):334-338.
- [15] 刘晓芬,张颖,胡明勋,等. 川芎挥发性成分的水蒸气蒸馏提取与顶空进样GC-MS分析[J]. 中国民族民间医药,2020,29(1):44-47.
- [16] 高雅,李友明,罗燕,等. 右旋龙脑的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床,2021,36(7):1537-1540.

(收稿日期:2023-12-04;修回日期:2024-07-13)

通络颗粒为湖北省内某医院的临床验方,由《医林改错》中名方补阳还五汤加减化裁而来^[5],由葛根、黄芪、白芍、川芎、红花、桃仁、防风、天麻、丹参、白芷等10味药材组方,有益气活血、祛风除湿、舒经通络等功效,治疗气虚血瘀所致颈椎病疗效较好。临床中药方常以汤剂形式给药,不易携带,患者用药依从性差^[6]。中药颗粒剂由汤剂演化而来,不仅保留了汤剂吸收迅速、起效快的优点,还解决了其煎煮不便、服用量大、易霉变的缺点^[7]。在此,依据《中国药典》等相关要求,初步优化通络颗粒的制备工艺,以为该制剂的研发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

GE 2005-2型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司,精度为0.1 mg);LC-10ATVP型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);HH-2型孔恒温水浴锅(常州国宇仪器制造有限公司);UV3型系列三用紫外线分析仪(北京赛百奥科技有限公司);KX-2013QT型超声仪(北京科玺世纪科技有限公司);TGF-9075A型电热恒温鼓风干燥箱(上海喆图科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110752-202217,含量 $\geq 96.8\%$);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水;药材黄芪(批号210101)、葛根(批号211101)、白芍(批号211001)、川芎(批号210601)、红花(批号220301)、燧桃仁(批号210601)、防风(批号220401)、天麻(批号220401)、丹参(批号211201)、白芷(批号220101),均购自湖北道地药材科技有限公司;其余药材及饮片经武汉科技大学刘嵩教授鉴定均符合《中国药典》标准。

2 方法与结果

2.1 葛根素含量测定

2.1.1 色谱条件

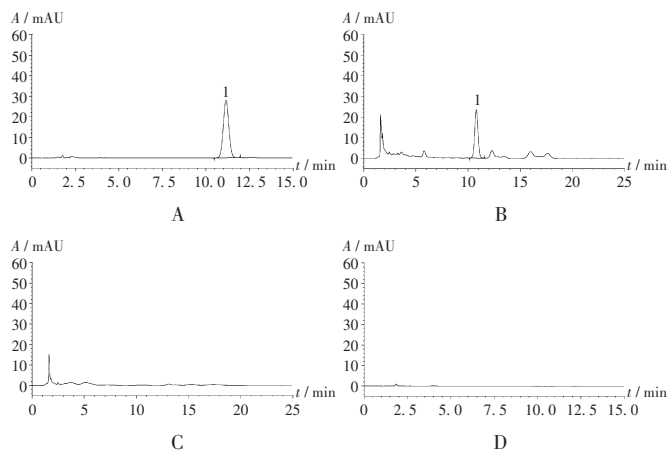
色谱柱: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-水(25:75, V/V);流速: 1.0 mL/min;检测波长: 250 nm;柱温: 30 °C;进样量: 10 μL。

2.1.2 溶液制备

取葛根素对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成20 μg/mL的对照品溶液。取样品约0.1 g,精密称定,置50 mL容量瓶中,用50%甲醇定容,超声(功率300 W,频率42 kHz)30 min,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按通络颗粒处方及工艺制备不含葛根的阴性样品,同供试品溶液制备方法,制备阴性对照品溶液。以甲醇为空白溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:取2.1.2项下4种溶液、按2.1.1项下



1. 葛根素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液 D. 空白溶液

图1 高效液相色谱图

1. Puerarin

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

D. Blank solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

色谱条件进样测定,记录色谱。结果供试品溶液与对照品溶液色谱在相应位置色谱峰处,阴性对照无干扰,表明该方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察:同2.1.2项下方法制备葛根素质量浓度为40 μg/mL的对照品溶液。取适量,分别加50%甲醇稀释至质量浓度分别为2,4,10,20,30,40 μg/mL,按2.1.1项下色谱条件进样测定,以葛根素质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 32\ 118X + 2\ 025.4$, $r = 0.999$ ($n = 6$)。结果表明,葛根素质量浓度在2~40 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密密度试验:取供试品溶液适量,共6份,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.03% ($n = 6$),表明方法精密密度良好。

稳定性试验:取同一批供试品溶液适量,分别于室温放置0,1,2,4,8,12,24 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.81% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品,按2.1.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.03% ($n = 6$),表明方法重复性较好。

加样回收试验:取已知含量的样品6份,精密加入葛根素对照品,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样,记录峰面积,计算加样回收率。结果见表1。

2.1.4 样品含量测定

取3批样品各适量,按2.1.2项下方法制备供试品

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品名称	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
zqd-1	0.3849	0.4000	0.7760	97.78	97.68	0.36
zqd-2	0.3920	0.4000	0.7844	98.10		
zqd-3	0.3842	0.4000	0.7728	97.15		
zqd-4	0.3912	0.4000	0.7810	97.45		
zqd-5	0.3889	0.4000	0.7794	97.62		
zqd-6	0.3983	0.4000	0.7903	98.00		

溶液,再按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算葛根素含量。结果3批样品中葛根素含量分别为8.08,8.05,7.91 mg/g,平均8.01 mg/g。

2.2 制备工艺研究

2.2.1 提取工艺

正交试验:分别以加水倍数(A)、提取时间(B, h)、提取次数(C)为考察因素,葛根素含量、浸膏得率的综合评分为评价指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验表,确定提取工艺。浸膏得率 = 干膏总质量 / 生药总质量 $\times 100\%$; 综合评分 = (葛根素含量 / 葛根素含量最大值 $\times 0.667$ + 浸膏得率 / 浸膏得率最大值 $\times 0.333$) $\times 100$ 。因素与水平见表2,正交试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。可见3个因素对综合评分的影响强度依次为 $A > C > B$,且仅A、C因素对试验结果有显著影响($P < 0.05$),结合综合评分和生产实际需要,初步确定提取条件为 $A_2B_1C_2$ 。由于药材有一定吸水性,初次加水时需多加2倍量水,最终确定优化的提取条件为药材提取2次(第一次加8倍量水,第二次加6倍量水),每次提取1 h。

表2 因素与水平

Tab. 2 Factors and their levels

水平	A(倍)	B(h)	C(次)
1	4	1	1
2	6	2	2
3	8	3	3

验证试验:称取处方量饮片,共3份,按优化后的提取工艺进行验证。结果3批验证试验数据与优选的提取工艺结果相近,稳定性较高,重复性良好。详见表5。

2.2.2 浓缩工艺

考虑到实际制备过程的可操作性,本研究中采用常压浓缩。按处方量称取饮片,根据优化后工艺进行提取,滤过,浓缩至一定体积,在 $(65 \pm 5)^\circ\text{C}$ 下,测定浸膏质量,计算其密度,考察浓缩液性状,确定最佳浓缩密度。结果当浓缩液的密度为1.25~1.32 g/mL时,浓缩状态为稠膏状,流动性适宜,易于收集,便于后续制粒。详见表6。

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	因素			葛根素含量 (mg/g)	浸膏得率 (%)	综合评分 (分)
	A	B	C			
1	1	1	1	6.67	20.12	71.48
2	1	2	2	7.53	24.59	83.19
3	1	3	3	6.58	23.01	74.73
4	2	1	2	9.96	24.99	100.00
5	2	2	3	8.45	23.08	87.34
6	2	3	1	8.51	20.58	84.41
7	3	1	3	8.09	23.14	85.01
8	3	2	1	7.62	20.05	77.75
9	3	3	2	8.01	24.92	86.85
K_1	76.47	85.50	77.88			
K_2	90.59	82.76	90.01			
K_3	83.20	82.00	82.36			
R	14.12	3.50	12.13			

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the analysis of variance

因素	离差平方和	n	方差	F值	P值
修正模型	545.311	6	90.885	17.301	0.056
截距	62626.731	1	62626.731	11921.761	0.000
A	299.127	2	149.564	28.471	0.034
B	20.322	2	10.161	1.934	0.341
C	225.862	2	112.931	21.498	0.044
误差	10.506	2	5.253		
总计	63182.548	9			
修正后总计	555.817	8			

表5 提取工艺验证试验结果($n = 3$)

Tab. 5 Results of the verification test of extraction process
($n = 3$)

试验号	浸膏得率			葛根素含量		
	实测值(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)	实测值(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
1	24.53			9.84		
2	24.87	24.52	1.47	9.96	9.80	1.81
3	24.15			9.61		

表6 最佳浓缩密度考察结果

Tab. 6 Result of density investigation in the concentration process

体积(mL)	密度(g/mL)	性状	体积(mL)	密度(g/mL)	性状
120	1.06	溶液,流动性好	30	1.25	稠膏,流动性较好
90	1.11	溶液,流动性好	20	1.32	稠膏,流动性较好
50	1.18	稀稠,流动性好	10	1.43	浓稠,流动性差

2.2.3 成型工艺研究

辅料种类:取上述浸膏,分别与蔗糖、乳糖、玉米淀粉、糊精混匀,辅料与浸膏比例为2:1(m/m),制粒,以软材性状、制粒过程难易、颗粒溶化性及口感为考察指

标,确定辅料种类。结果以蔗糖和乳糖为辅料时颗粒口感较好,但软材黏性大,对后续的制粒过程影响较大;以玉米淀粉为辅料时颗粒口感一般,制粒过程较顺利,但溶解后有明显白色沉淀;以糊精为辅料时颗粒口感一般,制粒过程顺利,溶化性符合2020年版《中国药典》标准。详见表7。综合评价,选择糊精为辅料进行制粒。

表7 辅料种类筛选结果

Tab. 7 Result of selection for excipient types

试验号	辅料	软材性状	制粒过程	溶化性	口感
1	蔗糖	黏性强	不易制粒	全部溶化	++++
2	乳糖	黏性强	不易制粒	全部溶化	+++
3	玉米淀粉	黏性弱	可制粒	有沉淀	++
4	糊精	黏性适宜	易制粒	全部溶化	++

辅料用量:上述浸膏,分别与不同比例的糊精混合,制粒,以软材性状、制粒过程难易、颗粒溶化性及成品口感为考察指标,确定辅料用量。结果当辅料与浸膏质量比为1:1时软材黏性强,为3:1时反之,均不可制粒;为2:1和2.5:1时,软材黏性合适,颗粒不松散,且口感相似。综合成本考虑,优选2:1(m/m)作为成型工艺的辅料添加量。详见表8。

表8 辅料用量考察结果

Tab. 8 Result of excipient dosage

试验号	辅料与浸膏比例(m:m)	软材性状	制粒过程	溶化性	口感
1	1:1	黏性强	不可制粒		
2	2:1	黏性适宜	易制粒	全部溶化	++
3	2.5:1	黏性略弱	可制粒	全部溶化	++
4	3:1	黏性弱	不可制粒		

2.2.4 验证试验

根据优化后的提取工艺和成型工艺,分别在3批通络颗粒成品中取样,以成型率、堆密度、休止角、水分、溶化性、葛根素含量为考察指标,验证制备工艺的稳定性及可行性。结果3批样品各指标均符合常规标准(见表9)。证明优化后的制备工艺稳定可行。

表9 提取工艺和成型工艺验证试验结果

Tab. 9 Results of the verification test of extraction process and molding process

批号	成型率 (%)	堆密度 (g/mL)	休止角 (°)	水分 (%)	溶化性	葛根素含量 (mg/g)
TLKL-1	73.43	0.63	31.8	4.5	全部溶化	7.91
TLKL-2	75.29	0.62	30.9	4.7	全部溶化	7.97
TLKL-3	76.87	0.63	31.5	4.3	全部溶化	8.29

3 讨论

3.1 待测成分与检测方法选择

通络颗粒方中黄芪、葛根、白芍益元气、通经络、缓急止痛,为君药;川芎、桃仁、红花,行瘀血、通经络,为

臣药;防风、丹参、天麻,祛风通络,共为佐药;白芷辛温,祛风散寒燥湿止痛,调和诸药,为使药。诸药联用,有益气活血、祛风除湿、舒经通络之效,主要治疗气虚血瘀致的颈椎病。现代药理学研究发现,葛根的有效成分为葛根总黄酮和葛根素,有增加氧供应、提高局部微血流量的作用^[8-9]。黄芪含有大量黄酮类化合物,可降低细胞凋亡率、升高抗炎细胞因子水平^[10-11]。白芍有效成分为白芍总苷、 β -谷甾醇、丹皮酚,具有消炎止痛、调节免疫、减轻组织水肿压迫的作用^[12]。

黄芪含量指标成分为黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷,其中黄芪甲苷用到蒸发光散射检测器,对仪器要求较高;毛蕊异黄酮葡萄糖苷采用梯度洗脱,会造成基线不稳定,测定结果不准确^[13]。白芍的含量指标成分为芍药苷,根据2020年版《中国药典》,芍药苷峰与相邻峰的分度度较小,分离效果欠佳。葛根为方中君药,其有效成分葛根素对药效起关键性作用^[14],故本研究选择葛根素含量为考察指标之一,并在《中国药典》中葛根素含量测定方法基础上,结合文献^[15]对优化了色谱条件(选择甲醇-水为流动相,250 nm为检测波长)。

3.2 工艺优化

本研究中采用多指标综合评分法,选择葛根素含量及浸膏得率的综合评分为参考指标,综合药效和产率得出葛根素含量及浸膏得率的相对重要性(葛根素含量>浸膏得率)^[16],并进行权重系数赋值,计算得综合评分。再结合预试验和正交试验,确定3个关键因素对综合评分的影响,进而确定各因素的水平对提取工艺的影响,优选提取工艺。

预试验中,课题组测定了该处方中饮片的吸水率。结果0~60 min内,饮片吸水率呈逐渐升高趋势,60 min后增长缓慢,饮片吸水基本达到饱和,此时饮片吸水率为157.95%,即吸水倍数为1.58倍。因此,结合正交试验结果,将提取工艺的初次加水倍数确定为8倍。

制粒是通络颗粒制备工艺的重要组成部分。研究在小试过程采用挤出制粒的方法,即将辅料糊精置于容器内,加入流动相良好的浸膏,混合均匀。但要注意,此过程浸膏应保持一定的温度(因为温度下降的同时,稠膏的流动性也会降低),如有需要,可适量添加乙醇以调整软材湿度,提高颗粒成型率。然后将搅拌后的软材制成“手握成团,轻捏即散”的状态,再通过筛网挤压,即得大小均匀的颗粒。颗粒干燥后,将颗粒先后通过一号筛和五号筛,进行整粒,最后得到大小均匀,颜色一致的成品。

3.3 方法评价

本研究中优化了通络颗粒的制备工艺,验证试验证明该制备工艺重复性好,可为工业化生产提供参考。