

正交试验优选复方莪术散的提取工艺及其颗粒制备工艺研究

王 平¹, 曹保利², 李隽华², 吕沅珊², 刘俊红², 李可同²

(1. 天津中医药大学, 天津, 300100; 2. 天津市南开医院, 天津, 300100)

[摘要] 目的: 优选复方莪术散颗粒的最佳提取与颗粒制备工艺, 为该复方的开发利用提供试验依据。方法: 采用正交试验法对复方莪术散进行提取, 以淫羊藿苷的含量和收率综合评价为指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对醇的用量、提取的时间和提取次数进行考察, 优选复方莪术散的醇提取工艺, 再以浸膏为原料, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计考察稀释剂(可溶性淀粉)的比例及粘合剂(乙醇)的浓度和干燥温度, 制备复方莪术散颗粒。结果: 复方莪术散提取最佳工艺为 $A_2B_2C_1D_1$, 即处方药材加 60% 浓度的 10 倍剂量的乙醇, 提取 2 次, 每次 1.5 h 为最优。最佳制备工艺为 $A_3B_2C_2$, 即干浸膏: 淀粉的比例为 1: 2.5, 并以 90% 乙醇为湿润剂, 采用湿法制粒的方法, 干燥温度为 60℃, 所制得颗粒剂经检查符合相关要求。结论: 本试验所得复方莪术散颗粒剂的提取与制备工艺合理、可行, 为该复方的开发利用提供了试验依据。

[关键词] 复方莪术散; 提取工艺; 颗粒制备; 正交试验

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.03.064

Optimization of extraction and granule preparation processes of compound Ezhu powder based on the orthogonal test

WANG Ping¹, CAO Baoli², LI Dihua², LYU Yuanshan², LIU Junhong², LI Ketong²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300100, China;

2. Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] Objective: To investigate the optimization of extraction and granule preparation processes of compound Ezhu powder, and to provide an experimental basis for the development and utilization of this compound prescription. Methods: The orthogonal test was used for the extraction of compound Ezhu powder. With the content and yield of icariin as evaluation indices, the $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to evaluate the amount of ethanol, extraction

第一作者: 王平, 女, 2016 级硕士研究生, 研究方向: 中西医结合临床(妇产科方向)

通讯作者: 曹保利, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 子宫内膜异位症及不孕症的临床研究, E-mail: xiaomh66@sina.com

[5] 黄湛镡, 高志良. 肝衰竭的三重打击及治疗策略[J]. 内科急危重症杂志, 2014, 20(3): 154-156.

[6] You S, Rong Y, Zhu B, et al. Changing etiology of liver failure in 3, 916 patients from northern China: a 10-year survey[J]. Hepatol Int, 2013; 7(2): 714-720.

[7] Zheng YB, Huang ZL, Wu ZB, et al. Dynamic changes of clinical features that predict the prognosis of acute-on-chronic hepatitis B liver failure: a retrospective cohort study[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(12): 1658-1664.

[8] 谢渭芬, 陈岳祥, 施斌, 等. 临床肝脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 234-242.

[9] Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, et al. T cell subsets and their signature Cytokines in autoimmune and inflammatory disease[J]. Cytokine, 2015, 74(1): 5-17.

[10] 周永华, 杨莹莹, 范小琳, 等. Th17/Treg 免疫失衡在血吸虫病肝纤维化中的作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(1): 89-92.

[11] 沈敏, 林明强, 冯奇桃, 等. HBV 相关慢加亚急性肝衰竭患者中 Th17 细胞、Treg 细胞的变化及其与肝功能和 HBV-DNA 载量间的研究[J]. 海南医学, 2016, 27(5): 692-696.

[12] Inoue M, Shinohara M. Cutting edge: Role of osteopontin and integrin α_v in T cell-mediated anti-inflammatory responses in endotoxemia[J]. J Immunol, 2015, 194(12): 5595-5598.

[13] Okeke EB, Okwor I, Uzonna JE. Regulatory T cells restrain CD4⁺ T cells from causing unregulated immune activation and hypersensitivity to lipopolysaccharide challenge[J]. Immunol, 2014, 193(2): 655-662.

[14] 李红, 曹姗姗, 赵亚楠, 等. 肠源性内毒素血症对慢性乙型肝炎患者调节性 T 淋巴细胞/辅助性 T 淋巴细胞 17 的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(10): 1878-1882.

[15] Ni S, Li S, Yang N, et al. Bacterial translocation aggravates cl-4 induced liver cirrhosis by regulating CD4⁺ T cells in rats[J]. Sci Rep, 2017(7): 40516.

(收稿日期: 2018-08-09)

time, and times of extraction and determine the optimal ethanol extraction process of compound Ezhu powder. With the extract as raw material, the $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to evaluate the proportion of the diluent (soluble starch), the concentration of the glue (ethanol), and drying temperature for the preparation of compound Ezhu granules. Results: The optimal extraction process of compound Ezhu powder was $A_2B_2C_1D_1$ and performed in the following steps: the prescribed medicinal material was mixed with 60% ethanol (10 times), and extraction was carried out twice, with 1.5 hours for each extraction. The optimal preparation process was $A_3B_2C_2$, i. e., a dry extract/starch ratio of 1:2.5, the wetting agent of 90% ethanol, the method of wet granulation, and a drying temperature of 60°C, and the granules obtained met related requirements. Conclusion: The extraction and preparation processes of compound Ezhu powder obtained by this experiment are reasonable and feasible and provide an experimental basis for the development and utilization of this compound prescription.

[Key words] compound Ezhu powder; extraction process; granule preparation; orthogonal test

复方莪术散 (compound zedoray rhizome, CZR) 是天津市南开医院妇科曹保利教授经过数十年的临床研究所得, 用于防治子宫内膜异位症及其手术后复发, 该方由淫羊藿 25g、三棱 15g、莪术 15g、黄芪 25g、延胡索 10g 组成。可补肾活血、软坚散结、行气止痛。实验研究表明, 复方莪术散对子宫内膜异位症大鼠模型的治疗作用与其可抑制 SDF-1、CXCR4 的表达有一定关系^[1]。临床研究表明, 该药物对子宫内膜异位症及预防子宫内膜异位症术后复发疗效良好^[2-3]。

中药复方颗粒剂是以符合炮制规范的中药饮片配制的中药方剂为原料, 经过现代化的提取、浓缩、干燥、制粒等工序精制而成的中药产品系列, 它既保持了原中药经典方剂的药性、药效, 又具有不需要煎煮、直接冲服、使用方便、服用量少、作用迅速、易携带保存的特点; 既保持了汤剂吸收快、显效迅速等优点, 又克服了汤剂服用前需临时煎煮、费时耗能、易变质等不足^[4]。中药颗粒剂通过添加不同的辅料, 达到提高药物稳定性, 掩盖某些中药的不良气味 (如苦味、腥味等) 和缓释控制的目的, 以提高患者服药依从性, 减少服药次数, 提高药物针对性和靶向性^[5]。

本实验采用正交试验设计法对复方莪术散进行提取, 以淫羊藿苷的含量和干浸膏率为综合考核指标, 优选出最佳提取条件; 再采取浓缩、干燥、粉碎得细粉, 以细粉为原料采用正交试验设计法对复方莪术散颗粒剂制备工艺进行优化, 按照颗粒剂的质量检查方法进行复方莪术散颗粒剂的质量检查, 确定复方莪术散颗粒剂提取与制备工艺, 为该复方的开发利用提供了实验依据。现将实验结果报告如下。

1 仪器与试药

SSI 高效制备液相色谱仪 (美国科学系统公司), JA3003 电子天平 (上海菁海仪器有限公司)。淫羊藿苷 (中国生物制品检定所, 批号: 110737-201415), 淫羊藿、三棱、莪术、黄芪、延胡索 (安国市普天和中药饮片有限公司), 乙腈为色谱纯, 水为去离子水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿苷含量测定

2.1.1 淫羊藿苷色谱条件 流动相: 乙腈 (A) - 水 (B) 进行梯度洗脱 (0 ~ 25min, 24% ~ 24% A; 25 ~ 30min, 24% ~ 30% A; 30 ~ 40min, 30% ~ 32% A; 40 ~ 45min, 32% ~ 33% A; 45 ~ 50min, 33% ~ 60% A; 50 ~ 55min, 60% ~ 60% A; 55 ~

60min, 60% ~ 80% A), 流速 1.0ml/min, 柱温 30°C, 检测波长 278nm, 进样量 10μl。

2.1.2 提取液制备 按处方用量称取复方莪术散的各药材, 按正交设计进行提取, 过滤, 合并滤液, 称量体积, 备用。

2.1.3 对照品溶液制备 取淫羊藿苷对照品适量, 加甲醇溶解, 制成每 1ml 含淫羊藿苷 0.104mg 对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.1.4 供试品溶液制备 精密量取按“2.1.2”制得的提取液, 过 0.45μm 的微孔滤膜, 即可。

2.1.5 标准曲线的绘制 取“2.1.3”项下对照品溶液, 分别进样 20、16、12、8、4、2、1、0.5μl, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 以对照品的质量为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标进行线性回归, 结果淫羊藿苷的回归方程为 $Y = 1664170X + 14369.9$ ($R = 0.9996$), 线性范围为 0.052 ~ 2.08μg, 线性关系良好。

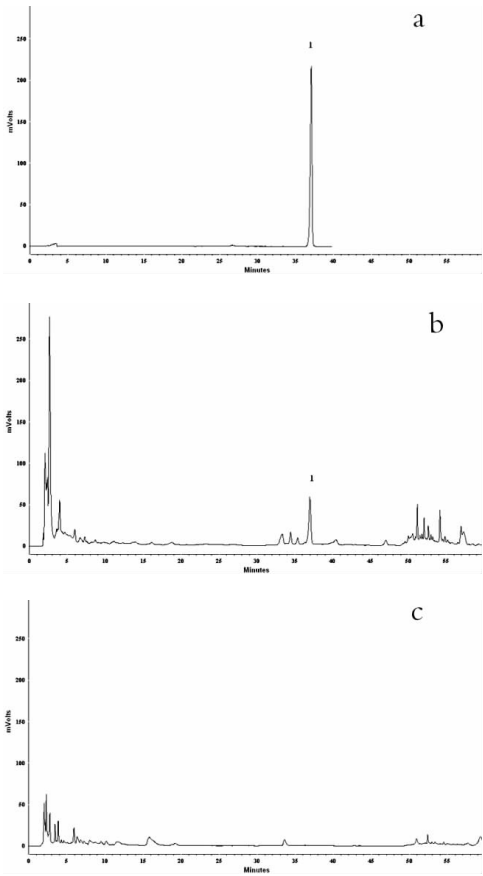
2.1.6 精密度试验 取“2.1.3”项下对照品溶液 10 μl, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 连续进样 5 次, 测得淫羊藿苷峰面积 RSD 为 1.8%。表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取“2.1.2”项下提取液样品, 按照“2.1.4”项下方法制备 6 份提取液, 按照“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积计算淫羊藿苷成分含量, RSD 为 2.0%。表明试验重复性良好。

2.1.8 样品测定 按照“2.1.1”项下色谱条件, 测定供试品溶液中淫羊藿苷的含量, 计算提取液中指标成分的含量, 色谱图见图 1。

2.2 干浸膏率测定 精密量取“2.1.2”制得的提取液 20ml, 置于干燥至恒温的蒸发皿中, 水浴挥干, 于 105°C 烤箱干燥 3h, 移至干燥器中, 冷却 30min, 迅速精密称定其重量, 按公式计算干膏率。干膏率 (%) = $100 \times \text{干膏重量} / \text{药材重量} \times 5 \times 100\%$ 。

2.3 正交试验优化复方莪术散的工艺提取 根据前期试验结果, 按处方量称取各药材, 选择提取次数 (A)、提取时间 (B)、溶剂用量 (C)、乙醇浓度 (D) 为考察因素, 以淫羊藿苷含量和干浸膏率为综合指标进行考察, 综合指标 = 淫羊藿苷得率 / 淫羊藿苷得率最大值 + 浸膏得率 / 浸膏得率最大值。试验因素水平设计见表 1, 正交试验结果见表 2, 方差分析见表 3。



注:a—标准品;b—样品;c—空白。

图 1 色谱图

直观分析和方差分析结果表明:以综合指标考虑,各因素对提取工艺的影响程度依次为 C>B>A>D;方差分析结果显示,提取次数、提取时间、溶剂用量均有显著性差异($P<0.05$),乙醇浓度因素影响不显著。确定各因素的最佳提取条件为 A₂B₂C₁D₁,即提取 2 次,提取时间为 1.5h,10 倍剂量,60%的乙醇。

2.4 复方莪术散的颗粒剂制备工艺研究

2.4.1 浸膏原料的制备 根据最佳提取条件对复方莪术散进行提取、滤过、滤液减压浓缩至浸膏、干燥、粉成细粉,备用。

2.4.2 处方筛选

2.4.2.1 正交设计 通过 L₉(3⁴)正交试验设计对淀粉用量的比例为(A)、乙醇(润湿剂)浓度(B)和干燥温度(C)3 个对制粒成型工艺影响较大的因素为考察因素。每个因素选择 3 个水平,得到不同配方的颗粒剂,以颗粒粒度合格率为指标选择最佳辅料配比(见表 4)。以颗粒的合格率为指标,将比例(A,复方莪术散干浸膏:淀粉)、乙醇浓度(B)、干燥温度(C)、空白(D)。按照 L₉(3⁴)正交设计进行试验的结果(见表 5)。综合以上因素,确定最佳处方为 A₃B₂C₂。即:复方莪术散干浸膏与淀粉用量比例为 1:2.5,乙醇浓度为 90%,干燥温度为 60℃。

表 1 因素水平(1)

水平	A(次)	B(h)	C(倍)	D(%)
1	1	1	10	60
2	2	1.5	15	70
3	3	2	20	80

表 2 正交试验结果(1)

序号	A	B	C	D	淫羊藿苷含量 (mg/L)	干浸膏得率 (%)	综合 指标
1	1	1	1	1	3.213	24.523	1.407
2	1	2	2	2	3.061	28.400	1.481
3	1	3	3	3	2.647	32.615	1.505
4	2	1	2	3	3.002	32.738	1.589
5	2	2	3	1	4.052	34.800	1.883
6	2	3	1	2	4.009	35.876	1.903
7	3	1	3	2	3.248	31.261	1.603
8	3	2	1	3	4.437	26.984	1.752
9	3	3	2	1	3.290	24.369	1.4200
I	8.921	9.463	11.659	10.555			
II	11.063	11.55	9.353	10.318			
III	10.975	9.946	9.94	10.086	106.4955		
I/3	2.9737	3.1543	3.8863	3.5183			
II/3	3.6877	3.85	3.1177	3.4393			
III/3	3.6583	3.3153	3.3157	3.362			
R	0.714	0.6957	0.7686	0.1563			

表 3 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性差异
A	0.9794	2	0.4897	26.6141	*
B	0.7958	2	0.3979	21.625	*
C	0.9557	2	0.4779	25.9728	*
D	0.0367	2	0.0184		
* F(2,2)0.05 = 19 * * F(2,2)0.01 = 99					

表 4 因素水平(2)

水平	A	B/%	C/C
1	1:0.5	85	55
2	1:1.5	90	60
3	1:2.5	95	65

表 5 正交试验结果(2)

序号	A	B	C	D	颗粒合格率(%)
1	1	1	1	1	80
2	1	2	2	2	88
3	1	3	3	3	75
4	2	1	2	3	85
5	2	2	3	1	81
6	2	3	1	2	87
7	3	1	3	2	88
8	3	2	1	3	79
9	3	3	2	1	85
K1	44.47	72.34	75.71	77.04	
K2	74.60	77.57	75.97	73.57	
K3	106.57	74.87	74.01	72.84	
R	62.10	4.33	1.97	4.20	

2.4.2.2 制备 将“2.4.1”项下复方莪术散细粉按正交设计进行软材制备,过筛制粒,干燥。

2.4.3 质量检查方法

2.4.3.1 粒度检查 除另外规定,按照粒度和力度分布测定法检查,将所得的复方莪术散颗粒分别过一号筛(200 μm)和五号筛(180 μm)网进行测定,要求不能通过一号筛和能通过五号筛的总和不得超过供试量的15%。实验重复3次。

2.4.3.2 干燥失重检查 分别取得复方莪术散颗粒剂4组,按照干燥失重测定法测定,105℃干燥箱中干燥至恒温,要求减失的质量不超过2.0%。

2.4.3.3 水分检查 取3组复方莪术散颗粒剂10g分别置于真空干燥箱中,按照水分测定法测定,加热至100℃,10min后称取重量,减失不得超过6.0%。

2.4.3.4 溶化性检查 分别取复方莪术散颗粒剂10g,加入200ml热水,5min后观察现象,需全部融化或者轻微浑浊不得有异物。

2.4.4 验证试验

2.4.4.1 提取验证结果 为进一步验证所筛选出的提取工艺条件,称取复方莪术散处方量药物3份,分别按照“2.1.2”项下方法制备,称定干膏率并测定淫羊藿苷的含量。结果显示,淫羊藿苷含量为4.188mg/g, RSD=2.350% (n=3);干膏率为35.979%, RSD=2.767% (n=3);均高于表2中的平均值(3.4399mg/g和30.1740%)。表明工艺可行。

2.4.4.2 验证结果 根据正交试验结果,按照以下处方制备复方莪术散颗粒剂:复方莪术散浸膏:淀粉=1:2.5,取复方莪术散浸膏粉17g,加入25g淀粉,加入适量的90%乙醇混匀制成软材(握之成团,轻压即散),过20目筛制粒,60℃温度进行干燥,过筛制粒。制得颗粒剂成型率高,基本符合生产标准。

2.4.5 质量检查结果 粒度检查结果为粒度优选粒度为88%、88%、85%,均大于规定的标准,符合粒度检查的标准;干燥失重部分每组所选的复方莪术散颗粒剂质量为2g,经干燥失重后,损失质量均小于2.0%,符合标准;经水分测定法得质量分别为9.83、9.79、9.88,所得水分量分别为2.0%、2.1%、1.1%,均小于标准6.0%,符合标准;溶化性检查结果发现A、B组颗粒剂全部溶化且没有任何异物,C组基本全部溶解且没有任何异物,符合颗粒剂质量检查标准中溶化性检查标准,故符合标准。

3 讨论

复方莪术散具有补肾活血、软坚散结、行气止痛之功效,已经在临床上应用10年余,治疗子宫内膜异位症收到良好的疗效。为了方便患者服用,考虑在汤剂的基础上进行二次开发——将其制备为颗粒剂。颗粒剂与其他剂型相比较的优点是:与中药片剂相比溶解释放迅速,吸收利用良好,避免了中药片剂生产中出现的松片、裂片、粘冲、变色花斑等问题;与糖浆剂相比具有体积小、药容量大、节约包装

材料、运输贮藏携带方便、不易发霉染菌等特点^[6],且降低了保存费用和耗损,患者也乐于使用^[7]。复方莪术散有效成分大部分为醇溶性成分,故选用醇作溶媒进行提取,并采用正交设计优化其提取工艺。由于本组方中未有不良气味的中药材,故考虑在制粒过程中不添加任何矫味剂,且为满足糖尿病等特殊患者的需求,扩大使用范围,将其剂型定为无蔗糖型颗粒剂。

本试验研究结果显示,复方莪术散的最佳醇提取工艺为:60%浓度的10倍剂量的乙醇,提取2次,每次1.5h为最优。提取液浓缩烘干为细粉,加入可溶性的淀粉,混匀,烘干,打粉,加入适量的90%乙醇制软材,过目筛制粒,于60℃烘干,整粒,即得复方莪术散颗粒。本次试验通过醇提取法提取复方莪术散药物有效活性物质,通过正交试验优化辅料配比,最终获得试验结果。复方莪术散颗粒剂较适合生产要求,质量检查方法方便且易于操作、产品合格率高。

参考文献

- [1] 张敏,宋殿荣,曹保利,等. 复方莪术散对大鼠子宫内膜异位症基质细胞衍生因子-1及其受体表达的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志,2016,22(1):38-41.
- [2] 曹颖,李继坤,曹保利. 复方莪术散治疗子宫内膜异位症疗效观察[J]. 山东大学学报:医学版,2014,52(S1):156-165.
- [3] 陈桂玲,曹保利,刘笑梅. 复方莪术散预防子宫内膜异位症术后复发疗效观察及对TNF的影响[J]. 四川中医,2014,32(9):57-60.
- [4] 王辰雯. 桃红四物颗粒剂制备工艺优化及其质量控制的研究[D]. 合肥:安徽中医药大学,2013.
- [5] 蔡海林,李涛,柏连阳. 超临界流体CO₂萃取白花前胡中的香豆素类成分[J]. 贵州农业科学,2010,38(5):202-204.
- [6] 郭用庄. 中药颗粒剂的优点及与其他中药剂型的比较[J]. 国际医药卫生导报,1998(12):32-33.
- [7] 陶晶. 浅谈中草药制成颗粒剂的优点[J]. 中国现代药物应用,2009,3(17):183-184. (收稿日期:2018-08-07)

甲亢患者的春季调理

玫瑰花佛手茶 制法:玫瑰花2~3朵、佛手片3g、带壳桂圆干(使用时压破)2~3枚、红枣3~5枚、枸杞5g、绿茶2g、冰糖20g。放入盖碗茶或其他带盖茶杯内,沸水冲沏,加盖焖泡3~5min饮用,随饮随续水,至味淡为止。玫瑰花佛手茶有生津止渴、养阴补血、疏肝解郁的功效。适用于甲亢精神郁闷、性情烦躁、胸胁脘腹胀满者的春夏季保养。

复方夏枯草膏 制法:夏枯草100g,沙参、麦冬、玄参、生地黄各30g。洗净,加水煎汁50ml,加白蜜100ml,炼膏。每次服用20ml,3次/d,20d为1个疗程。复方夏枯草膏有养阴清热、化痰散结的功效。适用于甲亢甲状腺肿大患者。(http://paper.cntcm.com.cn/html/content/2018-04/27/content_598565.htm)