

正交试验优化益骨颗粒的提取工艺^Δ

彭红英*, 江涛#, 杨滨滨, 陈雪华, 陈晓坚, 刘敏珊(广州白云山敬修堂药业股份有限公司研究所, 广州510130)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2684-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.26

摘要 目的:优化益骨颗粒的提取工艺。方法:采用L₉(3⁴)正交试验,以淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸转移率和出膏率的综合评分为评价指标,以乙醇体积分数、溶剂用量、提取次数、提取时间为考察因素,优化益骨颗粒的提取工艺并进行工艺验证。结果:优化的提取工艺为药材加10倍量60%乙醇回流提取2次,每次1h。验证试验结果表明,淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸的平均转移率分别为81.28%、48.71%、59.82%(RSD分别为1.54%、2.37%、2.52%,n=3),平均出膏率为31.48%(RSD=1.97%,n=3)。结论:优化的益骨颗粒提取工艺稳定可行、重复性好,可为后续的生产工艺研究提供依据。

关键词 益骨颗粒;正交试验;提取工艺;淫羊藿苷;龙胆苦苷;马钱苷酸

Optimization of Extraction Technology of Yigu Granule by Orthogonal Test

PENG Hongying, JIANG Tao, YANG Binbin, CHEN Xuehua, CHEN Xiaojian, LIU Minshan(Institute of Guangzhou Baiyunshan Jingxiutang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510130, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Yigu granule. METHODS: L₉(3⁴) orthogonal test was used, using comprehensive scores of transfer rate of icariin, gentiopicroside, loganic acid and yield rate as evaluation indexes, alcohol volume fraction, the amount of solvent, extraction times and extraction time as investigation factors, extraction technology of Yigu granule was optimized, and the verification test was conducted. RESULTS: The optimized extraction technology was 10-fold 60% ethanol reflux extraction for twice, 1 h once. Results of verification test showed, average transfer rates of icariin, gentiopicroside and loganic acid were 81.28% (RSD=1.54%, n=3), 48.71% (RSD=2.37%, n=3) and 59.82% (RSD=2.52%, n=3); average yield rate was 31.48% (RSD=1.97%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology for Yigu granule is stable and feasible with good reproducibility, which can provide basis for the follow-up study of production process.

KEYWORDS Yigu granule; Orthogonal test; Extraction technology; Icariin; Gentiopicroside; Loganic acid

益骨颗粒处方源于暨南大学附属第一医院治疗骨质疏松症的院内制剂益骨胶囊,全方由淫羊藿、秦艽、杜仲等药材组成,具有补骨生髓、活血止痛的功效,临床上用于肝肾不足、瘀血阻络所致骨质疏松症,症见腰膝酸软、疼痛。益骨胶囊作为医院制剂在临床用于防治骨质疏松症已近20年,对210例绝经后骨质疏松症患者进行

的为期6个月的前瞻性、随机双盲、安慰剂对照和阳性药对照的临床研究显示,益骨胶囊治疗组总有效率为95.5%,未见可能相关的毒副反应发生^[1-2]。由于原制剂益骨胶囊采用传统的药材水提工艺,导致临床服用量大、制剂易吸潮、产品质量稳定性差,制约了该产品进一步的临床推广和应用。鉴于此,需对原制剂的提取工艺

human non-small cell lung cancer[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(5):1-7.

[4] Wu H, Fan F, Liu Z, et al. Norcantharidin combined with EGFR-TKIs overcomes HGF-induced resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer cells via inhibition of Met/PI3k/Akt pathway[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76(2):307-315.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年

Δ 基金项目:广州市科技计划项目(No.2012J4300070)

* 高级工程师。研究方向:中药学。电话:020-81157716。E-mail:penghy@21cn.com

通信作者:高级工程师,硕士。研究方向:中药工艺及质量标准研究。电话:020-81157722。E-mail:jiangtao1609@163.com

版.北京:中国医药科技出版社,2015:371.

[6] 王咏,陈军,林爱华,等. NGR多肽修饰的脂质体及其抗肿瘤研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(13):2041-2045.

[7] 尹愈佳,王小双,唐洁,等.八聚精氨酸修饰的载紫杉醇脂质体的制备工艺研究[J]. *华西药学杂志*, 2012, 27(6):630-633.

[8] 黄发珍,姜晓淳,胡青,等.配体多肽GE11修饰的阿霉素靶向脂质体的制备及表征[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(17):2086-2089.

(收稿日期:2016-10-27 修回日期:2016-12-17)

(编辑:邹丽娟)

和剂型进行改进,将胶囊改为颗粒。因此,本文以相关活性成分淫羊藿苷、龙胆苦苷及马钱苷酸的转移率及出膏率为综合考察指标,采用正交试验法优化益骨颗粒的提取工艺,为今后该药的生产工艺研究提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪,包括G1311C型四元泵、G1322A型在线真空脱气机、G1329B型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1315D型二极管阵列检测器(DAD)、ChemStation型色谱工作站(美国Agilent公司);KQ-600DE型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司);XA105型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药材、药品与试剂

淫羊藿(批号:121106)、秦艽(批号:140201)、杜仲(批号:140402)均购自广州采芝林药业有限公司;淫羊藿苷对照品(批号:110737-200405,纯度:100%)、龙胆苦苷对照品(批号:110770-201013,纯度:96.9%)、马钱苷酸对照品(批号:111865-201102,纯度:93.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,乙醇为药用乙醇,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿苷、龙胆苦苷和马钱苷酸的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min,9%~11% A;5~20 min,11%~25% A;20~25 min,25%~30% A;25~35 min,30% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 以60%甲醇为溶剂制备淫羊藿苷质量浓度为102.4 μg/mL、龙胆苦苷质量浓度为502.4 μg/mL、马钱苷酸质量浓度为101.5 μg/mL的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取各提取工艺制备的益骨颗粒干膏粉约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入60%甲醇20 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率360 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用60%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按照益骨颗粒处方和提取工艺制备缺淫羊藿、秦艽的阴性样品,再按“2.1.3”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

2.1.5 专属性试验 分别精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液(60%乙醇提取样品)和阴性对照溶液各10 μL,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,在供试品溶液与混合对照品溶液色谱相应的位置上有相同的吸收峰,且阴性对照溶液无干扰,提示该测定条件具有较好的专属性,结果详见图1。

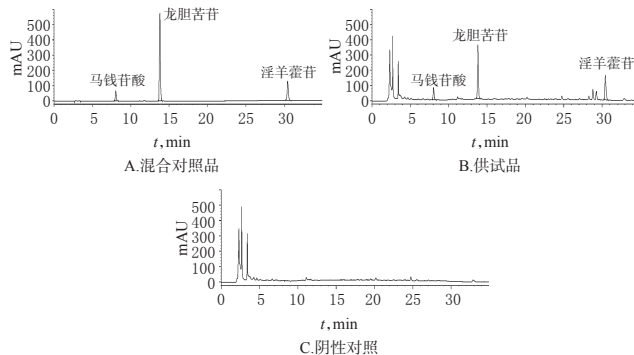


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.6 线性关系考察 精密量取“2.1.2”项下的混合对照品溶液,加60%甲醇稀释制备淫羊藿苷质量浓度分别为4.096、8.192、20.480、40.960 μg/mL,龙胆苦苷质量浓度分别为20.096、40.192、100.480、200.960 μg/mL,马钱苷酸质量浓度分别为4.060、8.120、20.300、40.600 μg/mL的混合对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定各原液及稀释液,记录峰面积。以对照品溶液质量浓度(μg/mL)为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得淫羊藿苷回归方程为 $y=13.227x+3.6280$ ($r=0.9999$)、龙胆苦苷回归方程为 $y=10.297x+1.2504$ ($r=0.9999$)、马钱苷酸回归方程为 $y=6.588x+0.2612$ ($r=0.9999$)。结果表明,淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸3种成分的检测质量浓度线性范围分别为4.096~102.4、20.096~502.4、4.060~101.5 μg/mL。

2.1.7 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液10 μL,连续进样6次,测定其峰面积。结果,3种成分峰面积的RSD均不大于0.79%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在制备后0、2、4、8、12、24、48 h进样测定,记录峰面积。结果供试品溶液自制备后48 h内3种成分峰面积基本稳定,RSD均不大于1.51%($n=7$),表明样品在48 h内的稳定性较好。

2.1.9 重复性试验 取同一批供试品6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,3种成分含量的RSD均不大于1.44%($n=6$),表明方法的重复性良好。

2.1.10 准确度试验 取同一批已知含量的供试品6份,每份取约0.25 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入混合对照品溶液适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定并计算加样回收率。结果,3种成分的平均回收率为98.49%~99.36%(RSD均不大于1.83%, $n=6$),表明方法准确度较好。

2.2 单因素试验考察

按处方比例称取淫羊藿、秦艽、杜仲等药材共230 g,在参考文献[3-7]及预试验的基础上,采用回流提取法,分别选取乙醇体积分数[0(水)、30%、50%、70%、

80%]、提取时间(1、2、3 h)、料液比(1:8、1:10、1:12、1:14)、提取次数(1、2、3次)4个单因素进行考察,考察某一因素变化对益骨颗粒中淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸3种成分转移率和出膏率的影响。各条件下提取样品分别按“2.1”项下方法测定含量,分别计算3种成分的转移率(%)和样品出膏率(%) [转移率=干膏中指标成分含量(g)/药材中指标成分含量(g)×100%,出膏率=干膏质量(g)/药材总质量(g)×100%,其中干膏制备方法同2015年版《中国药典》(四部)“醇溶性浸出物测定法”^[8]],结果见表1。

表1 单因素试验结果

Tab 1 Results of single factor tests

因素	水平	淫羊藿苷转移率, %	龙胆苦苷转移率, %	马钱苷酸转移率, %	出膏率, %
乙醇体积分数, %	0	62.47	31.24	43.62	41.26
	30	59.27	29.61	39.74	24.83
	50	73.58	42.73	51.61	27.64
	70	81.76	49.25	60.32	31.72
	80	60.86	33.93	41.69	23.50
提取时间, h	1	69.39	37.16	46.57	26.23
	2	72.93	43.41	50.88	27.40
	3	74.44	44.98	52.36	28.75
料液比, g/mL	1:8	61.42	39.80	50.25	24.33
	1:10	71.86	43.51	51.28	28.39
	1:12	73.35	44.17	51.96	29.26
	1:14	73.97	44.83	52.32	29.48
提取次数	1	63.56	30.39	41.85	21.29
	2	72.74	42.43	51.94	26.52
	3	74.28	43.61	52.48	27.67

由表1可知,当乙醇体积分数为50%~70%时,3种成分转移率均高于其他工艺组,且出膏率明显低于水提组,可在提高有效成分转移率的同时减少临床服用量。当提取时间为2 h和3 h时3种成分的转移率略高于提取1 h,但提取2 h和3 h时的3种成分转移率与出膏率均较为接近。当料液比为1:12时,3种成分的转移率均较高,与料液比为1:14时接近。在提取次数方面,提取2次已基本提取完全。因此,结合生产实际和以上试验结果,初步确定提取溶剂乙醇体积分数50%~70%、提取时间1~2 h、料液比1:8~1:12、提取次数1~3次进行正交试验。

2.3 正交试验优化提取工艺

选取乙醇体积分数(A)、提取时间(B)、料液比(C)、提取次数(D)为考察因素,每个因素各取3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,每组试验重复2次。以方中的3个主要活性成分和指标成分(即淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸)的转移率为主要评价指标(3个成分的权重比为1:1:1),而出膏率只作为提取工艺优化的一个次要评价指标。权重系数分别为淫羊藿苷转移率30%、龙胆苦苷转移率30%、马钱苷酸转移率30%、出膏率10%,即综合评分=(淫羊藿苷转移率/淫羊藿苷转移率最大值)×100×30%+(龙胆苦苷转移率/龙胆苦苷转移率最大值)×100×30%+(马钱苷酸转移率/马钱苷酸转移率最大值)×

100×30%+(出膏率/出膏率最大值)×100×10%。

按处方比例称取淫羊藿、秦艽、杜仲等药材共18份,每份230 g,按各因素与水平安排试验。各提取样品分别测定3种成分的含量、转移率和出膏率。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。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A(乙醇体积分数), %	B(提取时间), h	C(料液比), g/mL	D(提取次数)
1	50	1	1:8	1
2	60	1.5	1:10	2
3	70	2	1:12	3

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and results of orthogonal test

试验号	因素				淫羊藿苷转移率, %	龙胆苦苷转移率, %	马钱苷酸转移率, %	出膏率, %	综合评分
	A	B	C	D					
1	1	1	1	1	57.86	23.93	31.69	19.57	56.81
2	1	2	2	2	72.93	43.25	51.36	27.18	85.84
3	1	3	3	3	76.42	46.54	54.27	29.41	91.19
4	2	1	2	3	82.67	48.51	60.39	31.95	98.40
5	2	2	3	1	66.58	32.73	43.04	24.26	72.25
6	2	3	1	2	75.64	48.30	59.45	30.13	94.72
7	3	1	3	2	83.16	49.87	61.28	32.49	100.00
8	3	2	1	3	80.71	49.33	60.60	31.27	98.08
9	3	3	2	1	72.84	39.58	51.96	26.35	83.63
K_1	77.947	85.070	83.203	70.897					
K_2	88.457	85.390	89.290	93.520					
K_3	93.903	89.847	87.813	95.890					
R	15.956	4.777	6.087	24.993					

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	394.741	2	197.371	9.227	>0.05
B	42.781	2	21.391	1.000	>0.05
C	60.480	2	30.240	1.414	>0.05
D	1142.099	2	571.050	26.696	<0.05
误差	42.780	2	21.390		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

通过对综合评分进行直观分析,4个因素对综合评分的影响程度由大到小依次为提取次数(D)>乙醇体积分数(A)>料液比(C)>提取时间(B),最优工艺为 $A_3B_3C_2D_3$ 。根据方差分析结果可知,4个因素中只有D因素对综合评分有显著性影响($P<0.05$),但由于D因素中的 $K_2=93.520$ 、 $K_3=95.890$,表明提取2次与3次对试验结果影响不大。A因素中的 K_2 与 K_3 接近,且均明显大于 K_1 ;B因素中的 K_1 、 K_2 、 K_3 均比较接近。因此,结合生产实际,从节约成本方面综合考虑后,最终确定 $A_2B_1C_2D_2$ 为优化工艺,即药材加10倍量的60%乙醇回流提取2次,每次1 h。

2.4 验证试验

按处方比例称取淫羊藿、秦艽、杜仲等药材共230 g,按上述优化工艺进行提取,即加入10倍药材量的

60%乙醇回流提取2次,每次1h。平行提取3份,并按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,测定样品中淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸含量,分别计算3种成分的转移率和出膏率。结果淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸的平均转移率分别为81.28%、48.71%、59.82%(RSD分别为1.54%、2.37%、2.52%, $n=3$),平均出膏率为31.48%(RSD=1.97%, $n=3$),且优于或相近于以上单因素试验和正交试验表中的各组数据,表明优化所得益骨颗粒提取工艺稳定可行、重复性好。

3 讨论

在建立含量测定方法的前期试验中,笔者对检测波长、流动相等色谱条件进行了考察,发现淫羊藿苷在270 nm波长处有最大紫外吸收,龙胆苦苷和马钱苷酸在254 nm波长处有最大紫外吸收。综合考虑三者的最大紫外吸收波长,为提高检测灵敏度、减少供试品中其他成分色谱峰的干扰,最终选择254 nm为检测波长。在流动相的选择方面,分别考察了不同比例的甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液以及乙腈-0.1%甲酸溶液等多种不同的流动相系统,发现采用单一比例的流动相系统无法使供试品中的淫羊藿苷、龙胆苦苷及马钱苷酸得到快速、有效的分离。而当选用不同比例的乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,可使供试品中的这3种成分得到有效的分离,且主要色谱峰的理论板数、分离度及峰的对称性均较好,故最终采用梯度洗脱的方式。

原医院制剂益骨胶囊采用传统的药材水提工艺,工艺路线粗糙,部分工艺参数未有明确规定,导致临床服用量大、制剂易吸潮、产品质量稳定性差。通过提取工艺优化和剂型改进后,笔者对新、旧工艺制剂进行了引湿性考察,发现原胶囊的引湿增质量百分率为24.42%,而益骨颗粒引湿增质量百分率降为12.71%,由此可提高制剂的稳定性。

目前,采用单一考察指标优化中药提取工艺并不全面,因单一指标并不能完全代表中药制剂整体质量的优劣。因此,新剂型益骨颗粒从处方组成、药材活性成分及其含量、产品功能主治等方面考虑,以活性成分淫羊藿苷、龙胆苦苷和指标成分马钱苷酸的转移率作为处方中君药淫羊藿和臣药秦艽提取效率的考察指标,更符合中医临床用药的习惯以及整体质量控制的要求。益骨颗粒处方中以淫羊藿为君药,温补肾阳、祛风通络;秦艽通络止痛以为臣药。淫羊藿的主要活性成分为淫羊藿苷,淫羊藿苷具有促进骨生长、增强性腺功能、调节机体免疫功能等药理作用^[9-10]。方中秦艽中的主要活性成分为龙胆苦苷,龙胆苦苷具有抗炎、镇痛等药理作用^[11]。淫羊藿苷和龙胆苦苷的药理活性均与益骨颗粒补骨生

髓、活血止痛的功效密切相关。此外,2015年版《中国药典》(一部)收录的秦艽药材中以龙胆苦苷和马钱苷酸作为含量测定指标^[12]。因此,本文以淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸转移率和出膏率进行加权评分作为综合考察指标。

经上述各试验比较后发现,原制剂水提工艺3种成分的转移率分别为62.47%、31.24%、43.62%,出膏率为41.26%(见表1);优化后的提取工艺3种成分的转移率分别为81.28%、48.71%、59.82%,出膏率为31.48%。因此,优化后的提取工艺与原制剂水提工艺相比,更能达到较大限度地保留有效成分、去除杂质、减少临床服用量的目的。

综上,本试验所确定的益骨颗粒提取工艺具有操作简便、提取效率较高、稳定可行、重复性好、便于进行大生产的特点,可为后续的生产工艺研究提供依据。

参考文献

- [1] 张荣华,陈可冀,陆大祥,等.益骨胶囊治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J].中国中西医结合杂志,2004,24(8):680-684.
- [2] Zhang RH, Chen KJ, Lu DX, *et al.* A clinical study of Yigu capsule in treating postmenopausal osteoporosis[J]. *Chin J Integr Med*, 2005, 11(2):97-103.
- [3] 王欣,王婷婷,王海军,等.淫羊藿中淫羊藿苷提取工艺研究[J].中国药房,2009,20(9):670-671.
- [4] 朱裕林,陈卫东,张冬梅,等.淫羊藿醇提取与水提取工艺的比较[J].中成药,2015,37(2):435-437.
- [5] 郑莉.通痹止痛颗粒中淫羊藿的提取工艺研究[J].中国医药指南,2014,12(36):53-57.
- [6] 张兴旺,牛迎风,陶燕铎,等.秦艽中龙胆苦苷提取工艺研究[J].中药材,2009,32(4):625-627.
- [7] 郝彩琴,冷晓红,郭鸿雁,等.不同提取方法对宁夏六盘山栽培秦艽中龙胆苦苷提取率的影响[J].西北药学杂志,2013,28(1):13-15.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:202-203.
- [9] 李婍,王学美.淫羊藿苷药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(23):2727-2732.
- [10] 杨斌.淫羊藿苷药理研究概况[J].中国药房,2009,20(24):1915-1917.
- [11] 王焱,曾文雪,宋小玲,等.龙胆苦苷药学研究进展及其临床配伍应用[J].西北药学杂志,2012,27(5):502-505.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:270-271.

(收稿日期:2016-10-20 修回日期:2016-12-16)

(编辑:刘萍)