

连翘配方颗粒提取工艺研究

薛 强¹ 程永科¹ 王亚冬¹ 管立峰^{1, 2} 连运河^{1*}

1. 晨光生物科技集团邯郸有限公司中药研究院 河北邯郸 056100

2. 邯郸学院生命科学与工程学院 河北邯郸 056005

摘 要: 目的: 考察连翘配方颗粒的提取工艺, 筛选最佳工艺参数。方法: 以出膏率、指标成分转移率、特征图谱中特征峰总面积考察饮片粒度大小、加水倍量、提取次数对连翘配方颗粒提取工艺的影响; 以指标成分转移率、特征图谱中特征峰总面积考察浓缩温度和时间对浓缩结果的影响; 以物料回收率、指标成分转移率、特征图谱中特征峰总面积考察干燥温度、干燥进样密度对干燥结果的影响。结果: 连翘配方颗粒制备工艺为连翘饮片(破壳不破籽), 浸泡30min, 加水倍量分别为8倍和6倍, 回流提取2次, 时间分别为20min、15min; 70℃减压浓缩至相对密度1.05mg/mL, 进风温度为160℃喷雾干燥成粉后干法制粒。结论: 优选的连翘配方颗粒工艺稳定可行, 可为其进一步开发研究提供依据。

关键词: 连翘; 配方颗粒; 制备工艺

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 主要分布于河北、山西、陕西、河南等地, 秋季果实初熟尚带绿色时采收, 除去杂质, 蒸熟, 晒干, 称之为青翘^[1]。《本草图经》中记载连翘具有清热解毒、消肿散结、疏散风热之功效, 临床上广泛用于溃疡、疥疮等与炎症相关疾病的治疗^[2, 3]。现代研究发现连翘具有抗菌、抗氧化、舒张血管、改善认知障碍等多种药理活性, 含有苯乙醇苷类、木脂素类、C6-C2天然醇及其苷类、萜类及挥发油、黄酮类、酚酸类、甾醇及生物碱等多种化学成分, 其中连翘酯苷 A 和连翘苷含量最高, 常作为连翘药材质量标准的指标成分^[4]。

连翘配方颗粒是以青翘饮片为原料, 以水为溶剂, 经提取、浓缩、喷雾干燥后干法制粒而成, 供临床配方使用^[5]。为更好地发挥传统中药在临床中的作用, 同时发挥配方颗粒剂量准确、使用方便的优势, 本实验选取符合药典标准的连翘饮片, 考察其配方颗粒提取、浓缩、喷雾干燥的工艺参数, 为连翘配方颗粒的中试及大生产提供数据基础。

一、材料与仪器

连翘干燥果实(青翘)由邯郸市峰峰山友中药材种植农民专业合作社提供; 连翘酯苷 A、连翘苷标准品均购买于中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

Waters UPPDA ARC 超高效液相色谱仪(配有 PDA 检测器和 Empower AB104- 工作站, 美国 Waters 公司); 安捷伦 1260 Prime 超高效液相色谱仪(配有 DAD 检测器和工作站, 美国安捷伦公司); TP150 超声清洗机(北京天鹏科技公司); GWA-10 超纯水机(北京普析通用); AUW120D 电子天平(日本岛津)。

二、方法与结果

1. 提取工艺考察

(1) 评价指标测定方法

出膏率测定: 将两次提取液合并后转移至 2000mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀。精密移取 25mL 置于已干燥至恒重的称量瓶中, 水浴蒸干, 再放入烘箱 105℃ 干燥 3h, 置于干燥器冷却 30min, 迅速精密称定重量, 计算出膏率, 每组平行测定两份。

提取液中指标成分含量测定和特征图谱供试品的制备: 取上述已定容至 2000mL 的提取液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液作为供试品, 检测特征图谱和连翘苷含量。再精密移取上述溶液 1mL 至 25mL 量瓶中, 用水稀释并定容至刻度, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液作为供试品溶液, 测定连翘酯苷 A 含量。

连翘苷的含量测定和特征图谱分析条件: 安捷伦 1260 Prime 超高效液相色谱仪, Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B) 为流动相, 梯度洗脱(A: 0~18 min, 6%~48%), 检测波长为 277 nm (连翘苷的含量测定)、检测波长为 235nm (特征图谱)(211nm~400nm 全波长记录), 流动相流速为 0.2 mL/min, 柱温 25℃, 进样量 2 μL。

连翘酯苷 A 的含量测定分析条件: Waters UPPDA ARC 超高效液相色谱仪, Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 乙腈(A) - 0.4% 乙酸水溶液(B) (14: 86), 检测波长为 330 nm, 流动相流速为 0.3mL/min, 柱温 25℃, 进样量 2 μL。

(2) 不同粒度连翘饮片对提取液指标的影响

取 3 种不同粒度(不破壳不破籽、破壳不破籽、破壳破籽)的连翘饮片各 120g, 加水倍量分别为 8、6 倍,

浸泡30min后回流提取2次,提取时间为20min、15min。通过出膏率、转移率以及特征图谱中6个特征峰总面积对提取液进行评价。结果如表1所示,相对于完整的连翘,破碎后的连翘对配方颗粒的出膏率、连翘苷和连翘脂苷A的转移率、特征图谱的峰面积均有很大影响,颗粒度减小,出膏率、连翘苷和连翘脂苷A的转移率、特征图谱的峰面积均显著增大,但破壳破籽与仅破壳相比较,其出膏率、连翘苷和连翘脂苷A的转移率、特征图谱的峰面积增加幅度不显著。如图1所示,不同粒度连翘提取液的UPLC特征图谱极为相似,饮片特征图谱中的6个特征峰都实现传递。综合以上分析,连翘配方颗粒提取药材前处理方法定为破壳不破籽。

表1 不同颗粒度连翘饮片对提取液出膏率、指标成分转移率和峰面积的影响

组别	粒度状态	出膏率 %	连翘苷转移率 %	连翘脂苷A转移率 %	1-6号峰总面积 (mAu.s)
1	不破壳不破籽	10.2	24.6	19.8	8102.687
2	破壳不破籽	19.4	52.2	52.7	21409.796
3	破壳破籽	21.4	66.0	57.9	24116.479

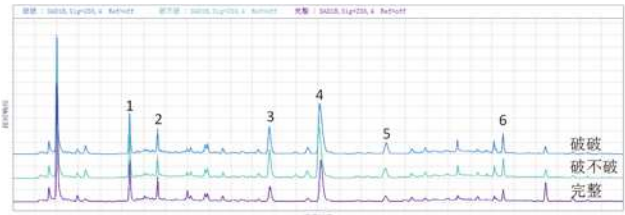


图1 不同颗粒度条件下提取液的UPLC特征图谱
(峰4:连翘脂苷A;峰6:连翘苷)

(3) 不同加水倍量对提取液指标的影响

分别取连翘饮片120g(破壳不破籽),加入不同倍量水按照2.1.2提取方法,结果如表2所示,加水量为饮片量的10倍/8倍时,提取液中指标成分含量最高,出膏率最大,指标成分的转移率最高。由图2可知,不同加水倍量提取的连翘提取液UPLC特征图谱极为相似,饮片特征图谱中的6个特征峰都实现传递,其中加水倍量为饮片量的10倍/8倍时,6个特征峰的总峰面积最大,但与8倍/6倍时峰面积差别不显著,在生产中考虑到加水倍量增大时浓缩时间延长,同时会导致连翘脂苷A的异构化和降解。因此,在连翘配方颗粒中试及大生产过程中,选择加水倍量为饮片量的8倍/6倍更为合理,不宜过大或过小。

表2 不同加水倍量条件下提取液出膏率、指标成分转移率和峰面积的影响

组别	加水倍量	出膏率 %	连翘苷转移率 %	连翘脂苷A转移率 %	1-6号峰总面积 (mAu.s)
1	6, 4	13.1	30.3	35.6	14346.701
2	8, 6	19.4	52.2	52.7	21409.796
3	10, 8	20.4	58.3	57.0	22889.155

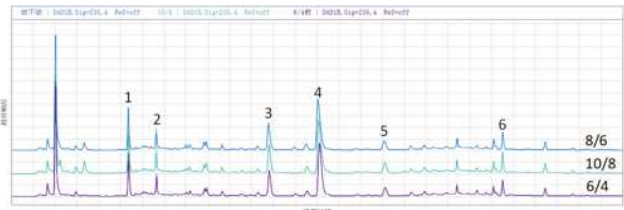


图2 不同加水倍量条件下提取液的UPLC特征图谱
(4) 提取次数对提取液指标的影响

取连翘饮片120g,浸泡30min,提取2次,加水倍量分别为8倍、6倍,第一次提取20min,取样;第二次提取15min,取样;分别测定两次提取液出膏率以及连翘苷和连翘脂苷A的含量。结果如表3所示,与提取1次相比,提取2次时,出膏率、连翘苷和连翘脂苷A的转移率、特征图谱的峰面积均显著提高,两次提取后有效成分的转移率可达53%左右,已超过标准汤剂的平均转移率,因此没有必要进行第3次提取。由图3可知,在提取1次及提取2次的连翘提取液UPLC特征图谱极为相似,6个特征峰的总峰面积在第一次提取时最大,第二次提取液总峰面积约为第一次提取的50%,故第二次提取是有必要的。由于连翘脂苷A的热稳定性较差,不宜长时间提取,因此,从能耗和药效的角度考虑,连翘配方颗粒选择提取2次更为合适。

表3 不同提取次数的出膏率和指标成分转移率

组别	加水倍量	出膏率 %	连翘苷转移率 %	连翘脂苷A转移率 %	1-6号峰总面积 (mAu.s)
第一次提取液	8	13.8	35.8	36.9	29773.582
第二次提取液	6	5.5	17.9	14.7	13317.88
总量	8, 6	19.4	52.2	52.7	21409.796

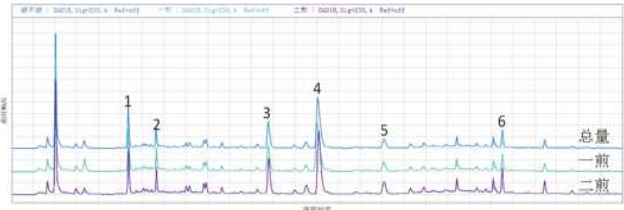


图3 不同提取次数提取液的UPLC特征图谱

2. 浓缩工艺考察

(1) 浓缩温度对指标成分和特征图谱的影响

取连翘饮片120g,分别加入8倍量、6倍量水浸泡30min后提取2次,提取时间分别为20min和15min。趁热取提取液23.0mL(相当于2g生药量)于50mL容量瓶内,将容量瓶分别置于50℃、70℃和90℃的水浴锅内,恒温处理4h后,取出,放冷,甲醇定容至刻度,0.22μm微孔滤膜滤过后测定含量。从表4中的数据可以看出,浓缩温度为50℃、70℃时,连翘苷和连翘脂苷A的转移

率均为90%以上,且随着浓缩温度的升高,连翘苷的转移率略有上升,而连翘酯苷A的转移率明显下降。推测在高温情况下,提取液中的某些成分可能转化为连翘苷,但影响很小,可不予考虑。而当浓缩温度为90℃时,连翘酯苷A的转移率迅速下降,提示指标成分连翘酯苷A受热易发生转化。由图4可见,三个不同温度条件下浓缩液的UPLC特征图谱极为相似,饮片特征图谱中的6个特征峰都实现传递,6个特征峰的峰面积及总峰面积随着浓缩温度的升高,呈现出先升高后下降的趋势,这可能与连翘酯苷A的转化有关。综合以上分析,浓缩温度不宜过高,应在高真空下采用低温减压浓缩方式,且温度不宜超过70℃。

表4 不同浓缩温度下指标成分的转移率和特征峰面积

温度 (℃)	连翘苷转移率 (%)	连翘酯苷A转移率 (%)	1-6号峰总面积 ($\mu\text{Au.s}$)
50	95.7	92.9	13419352
70	99.3	92.5	14147579
90	101.1	63.3	12543897

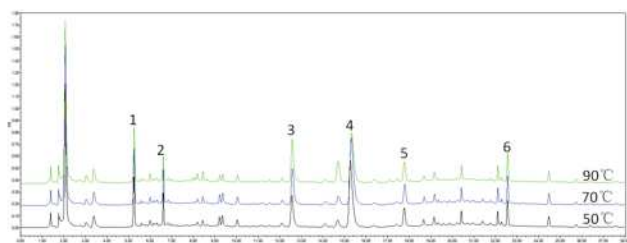


图4 不同浓缩温度的特征图谱

(2) 浓缩时间对指标成分和特征图谱的影响

取连翘饮片120g,按照2.2.1方法提取,合并两次提取液,趁热量取提取溶液23.0mL,平行取8份至50mL容量瓶内,其中2份直接加甲醇定容至刻度,其余样品均置于70℃的水浴锅内,2份加热2h,2份加热4h,2份加热6h,取出,放冷,分别加甲醇定容至刻度,测定相关指标。从表5中的数据可以看出,在浓缩温度70℃时,浓缩时间对连翘苷的转移率影响较小,而随着浓缩时间的延长,连翘酯苷A的转移率持续下降,但转移率均达87.7%以上。这可能由于连翘苷在70℃时相对稳定,而连翘酯苷A在该温度下已开始发生异构化和降解,导致转移率下降。

由图5发现,在浓缩温度70℃时,不同时间下浓缩液的UPLC特征图谱极为相似,饮片特征图谱中的6个特征峰都实现了传递,6个特征峰的峰面积及总峰面积随着浓缩时间的延长缓慢下降,这是由于6个特征峰里有3个是连翘酯苷A的异构化产物,连翘酯苷A下降时,异构化产物的峰面积则可能有所上升,故总峰面积的下降程度不及指标成分转移率的下降程度大。因此,浓缩时尽可能提高减压浓缩的真空度,以降低浓缩温度、缩短浓

缩时间,浓缩时间不超过4h。

表5 不同浓缩时间时指标成分的转移率均值

时间 (h)	连翘苷转移率 (%)	连翘酯苷A转移率 (%)	1-6号峰总面积 ($\mu\text{Au.s}$)
0	100.0	100.0	14693070
2	99.6	94.3	14514523
4	99.3	92.5	14147579
6	98.5	87.7	13882302

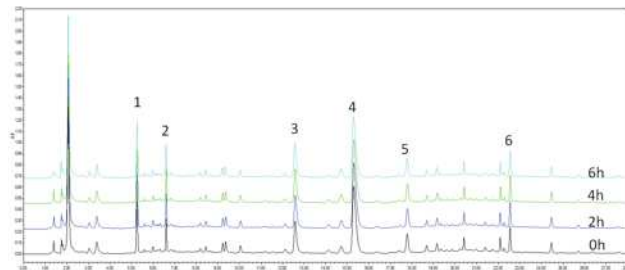


图5 不同浓缩时间的特征图谱

3. 喷雾干燥工艺考察

根据生产实际,采用喷雾干燥对连翘提取浓缩液进行干燥。在干燥过程中,重点考察喷雾干燥的进口温度和进料密度两个参数。以物料回收率,指标成分转移率、特征图谱中特征峰总面积3项指标来考察干燥温度和干燥进料密度对干燥结果的影响。此处转移率意义为:干燥粉末相对于上一步浓缩工艺所得浓缩液中的指标成分转移率。

(1) 进风温度对产品指标的影响

将同一批浓缩后的浸膏(浸膏密度1.044 g/mL)平行取出3份,每份100mL,选择不同的进口温度进行喷雾干燥,进样速度5mL/min,每次扫塔,不洗塔,计算药粉的回收率,检测干燥粉末中指标性成分的含量、指标成分转移率和特征图谱中特征峰的总面积。精密移取浓缩后的浸膏25mL,置于已干燥至恒重的称量瓶中,水浴蒸干,再放入烘箱105℃干燥3h,置于干燥器冷却30min,迅速精密称定重量,计算100mL浸膏中的固含量。物料回收率的计算公式为:回收率=收粉质量/固含量*100%。

结果如表6所示,在140~180℃范围内,喷雾干燥进口温度越高,粉体的回收率越低。而随着进口温度的上升,连翘苷的转移率有所升高,但160~180℃范围内,转移率的差别不显著。连翘酯苷A的转移率随进口温度的升高,呈现出先升高,后降低的变化趋势,这主要是由于连翘酯苷A的热稳定性较差导致的。故从有效成分的转移率角度考虑,喷雾干燥的进口温度以160℃为宜,此时,喷雾粉体的回收率较140℃略有下降。

由图6可知,不同进口温度下得到的喷雾粉末的UPLC特征图谱极为相似,饮片特征图谱中的6个特征峰都实现了传递。不同温度条件下,塔底收粉的特征峰总

峰面积随着进口温度的升高而略有增大。

表6 不同干燥进口温度的回收率、
指标成分的百分含量和转移率

不同温度 (℃)	连翘 苷 %	连翘苷 转移率 %	连翘酯 苷 A %	连翘酯苷 A 转移率 %	回收 率 (%)	总面积 (μAu.s)
140℃塔底	0.61	40.2	6.49	48.0	71.6	12055187
140℃塔壁	0.79	5.4	9.29	7.2		15297362
160℃塔底	0.76	45.4	8.78	58.6	68.0	15181756
160℃塔壁	0.81	7.7	9.13	9.7		15776361
180℃塔底	0.78	44.6	8.02	51.0	64.3	15880093
180℃塔壁	0.80	6.9	8.97	8.6		15853511

