

夏枯草配方颗粒制备及质量测定研究

郭牡丹¹, 张恩¹, 喻欢欢¹, 范鹏珏², 郑一敏³, 胥秀英^{3*}, 徐豆豆^{1*}

¹重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆

²重庆郑博生物科技有限公司, 重庆

³重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆

收稿日期: 2022年9月15日; 录用日期: 2022年9月29日; 发布日期: 2022年11月11日

摘要

目的: 筛选夏枯草配方颗粒制备工艺及进行颗粒剂中齐墩果酸含量测定研究。方法: 采用正交实验优化方法筛选出最佳颗粒剂制备工艺, HPLC法测定颗粒剂中齐墩果酸的含量, 同时对制成的九批夏枯草颗粒进行微生物限度检查。结果: 筛选出了夏枯草配方颗粒的最佳制备工艺。齐墩果酸在0.8 μg~3.2 μg范围内呈良好线性关系, 线性方程为 $y = 577891x - 826.9$, 相关系数 $r = 0.9998$, 平均回收率100.25%, RSD 1.5%。九批夏枯草颗粒的微生物限度检查结果均符合药典颗粒剂项下微生物限度相关规定。结论: 该工艺稳定可控操作简便, 可为夏枯草配方颗粒制备及质量研究提供实验依据。

关键词

夏枯草, 齐墩果酸, 颗粒剂, 正交实验, 微生物限度检查

Study on Preparation and Quality of *Prunella vulgaris* Formula

Mudan Guo¹, En Zhang¹, Huanhuan Yu¹, Pengjue Fan², Yiming Zheng³, Xiuying Xu^{3*}, Doudou Xu^{1*}

¹Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing

²Chongqing Zhengbo Biotech Ltd., Chongqing

³School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing

Received: Sep. 15th, 2022; accepted: Sep. 29th, 2022; published: Nov. 11th, 2022

Abstract

Objective: To screen the preparation technology of *Prunella vulgaris* formula granules and determine the quality of the granules.

文章引用: 郭牡丹, 张恩, 喻欢欢, 范鹏珏, 郑一敏, 胥秀英, 徐豆豆. 夏枯草配方颗粒制备及质量测定研究[J]. 药物化学, 2022, 10(4): 336-343. DOI: 10.12677/hjmce.2022.104035

mine the content of oleanolic acid in the granules. Methods: Orthogonal experiment was used to optimize the preparation process of the granules. The content of oleanolic acid in the granules was determined by HPLC, and the microbial limit of nine batches of *Prunella vulgaris* granules was examined. Results: The best preparation technology of *Prunella vulgaris* formula granules was screened out. Oleanolic acid showed a good linear relationship in the range of 0.8 μg ~3.2 μg . The linear equation is $y = 577891x - 826.9$, the correlation coefficient is $r = 0.9998$, the average recovery is 100.25%, RSD 1.5%. The microbial limit test results of nine batches of *Prunella vulgaris* granules were in line with the relevant provisions of the pharmacopoeia on microbial limit of granules. Conclusion: The process is stable, controllable and simple, which can provide experimental basis for the preparation and quality study of *Prunella vulgaris* formula granules.

Keywords

Prunella vulgaris, Oleanolic Acid, Granules, Orthogonal Experiment, Microbial Limits Check

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

夏枯草(*Prunella vulgaris* L.)隶属于唇形科(Labiatae)野芝麻亚科(Lamioideae)夏枯草属(*Prunella*), 夏枯草药用部位为干燥果穗, 也常全草入药, 是中医临床常用的一味中药[1]。夏枯草具有多种药理作用(降血糖, 降血压, 降血脂, 抗菌抗病毒, 抗突变, 抗肿瘤, 抗炎及对免疫系统) [2] [3] [4] [5] [6]。夏枯草的化学成分主要是齐墩果酸、熊果酸和迷迭香酸等多种有机酸[7], 其中齐墩果酸属于五环三萜类化合物, 药理作用广泛, 不仅具有护肝、消炎抑菌和解肝毒作用, 而且有增强机体免疫力的作用[8]。

中药配方颗粒, 原名为颗粒型饮片, 又称免煎中药。可直接用于处方调配, 是汤剂现代化的一种形式。具有剂量小, 速效及携带、贮存、服用方便等特点。在中药颗粒剂制备工艺的研究中, 药物和辅料的性质、药材的提取、纯化、制粒方法等对制剂的成型性和稳定性至关重要。近年来对夏枯草中有效成分的分离纯化及含量测定的文献较多[9] [10] [11] [12], 鲜有夏枯草颗粒制备及其质量研究的报道。本实验以夏枯草配方颗粒合格率为指标, 通过正交优化实验进行了夏枯草配方颗粒处方筛选及颗粒剂中齐墩果酸的含量测定研究。

2. 材料

试药与仪器

夏枯草(重庆市中药材市场), 齐墩果酸标准品(纯度 $\geq 98\%$, 购于成都格利普生物技术有限公司); 糊精, 淀粉, 乙醇为药用级; 磷酸为市售分析纯, 甲醇为市售色谱纯。

LC-20AD 高效液相色谱仪(岛津), METTLER AE200S 万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), WXH 微型涡旋混合器(上海跃进医疗器械厂), 移液枪(10~100 μL , 200~1000 μL) (DRAGON LAB), 超纯水系统 Milli-Q (millipore S.A.S 67120 Molsheim-France facility)等。

3. 方法与结果

3.1. 夏枯草提取物的制备

称取夏枯草 100 g, 置于 2000 mL 单口圆底烧瓶里, 再加入 8 倍质量的 95%乙醇, 经过 1 小时回流

提取后, 过滤并收集滤液, 转移到 2000 mL 单口圆底烧瓶中; 再次加入 8 倍量的 95% 乙醇回流提取 1 h, 重复 3 次, 收集合并三次提取液, 得到褐色澄清液体。通过减压浓缩, 获得夏枯草提取物浸膏, 其特征为褐色的黏稠状膏体, 备用。

3.2. 颗粒剂的制备

将夏枯草提取物浸膏置于 60℃ 的烘箱中干燥, 得到红棕色浸膏粉备用; 取出相应的辅料与浸膏粉过 5 号筛混匀, 加入相应浓度的乙醇润湿剂制成软材, 通过 14 目筛挤出, 湿颗粒在相应温度下恒温干燥 1 h, 10 目筛整粒, 得到干燥的夏枯草颗粒。

3.3. 评价指标

考察指标是夏枯草颗粒的成型率, 即: 通过 1 号筛与未过 5 号筛的颗粒重占颗粒总重的百分比, 按下式计算成型率(%)。

$$\text{成型率}(\%) = \frac{\text{通过1号筛的颗粒重量} + \text{未过5号筛的颗粒重量}}{\text{颗粒总重量}} \times 100\%$$

3.4. 正交试验设计

以辅料配比(糊精/可溶性淀粉)、浸膏粉与辅料配比、润湿剂的浓度、干燥温度为影响因素, 采用正交试验设计 $L_9(3^4)$, 筛选出夏枯草颗粒制剂的最佳工艺。正交试验因素水平设计及试验结果示于表 1 与表 2。

Table 1. Design of each factor

表 1. 因素水平设计

| 水平 | 因素 | | | |
|----|--------|------------|-----------|-----------|
| | A 辅料配比 | B 浸膏粉与辅料配比 | C 乙醇浓度(%) | D 干燥温度(℃) |
| 1 | 1:1 | 2:1 | 70 | 55 |
| 2 | 1:2 | 1:1 | 75 | 60 |
| 3 | 1:4 | 1:2 | 80 | 65 |

取夏枯草提取物根据表 2 加入辅料, 混合, 加入润湿剂, 搅拌, 制软材, 制粒, 干燥。计算颗粒合格率和选择最佳制粒工艺, 结果示于表 2。

Table 2. Orthogonal experiment design and results

表 2. 正交实验设计与结果

| 试验号 | 因素 | | | | 指标 颗粒合格率(%) |
|------|----|---|---|---|----------------|
| | A | B | C | D | |
| 试验 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 69 |
| 试验 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 71 |
| 试验 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 83 |
| 试验 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 69 |
| 试验 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 91 |
| 试验 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 65 |
| 试验 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 86 |
| 试验 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 75 |

Continued

| | | | | | |
|------|------|------|------|------|----|
| 试验 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 71 |
| K1 | 74.3 | 74.7 | 69.7 | 77.0 | |
| K2 | 75.0 | 79.0 | 70.3 | 74.0 | |
| K3 | 77.3 | 73.0 | 86.7 | 75.7 | |
| 极差 R | 3.0 | 6.0 | 17.0 | 3.0 | |

根据综合评分结果,影响成型效果的各种因素为: $C > B > A = D$,与直观分析相结合, $A_3 > A_2 > A_1$,选择 A_3 , $B_2 > B_1 > B_3$,选择 B_2 ; $C_3 > C_2 > C_1$,选择 C_3 ; $D_1 > D_3 > D_2$ 所以,最佳工艺参数为 $A_3B_2C_3D_1$ 。结合方差分析(表 3),乙醇浓度对于夏枯草配方颗粒制剂的可成形性具有显著性的影响,而辅料(糊精/可溶性淀粉)配比和浸膏粉与辅料配比,这两个因素对于颗粒制剂的成型性影响不显著。由此可得,制备夏枯草配方颗粒的最优成型工艺为辅料(糊精/可溶性淀粉)配比为 1:4,浸膏粉与辅料配比为 1:1,乙醇浓度为 80%,干燥温度为 55℃。

Table 3. The result of ANOVA

表 3. 方差分析结果

| 因素 | 偏差平方和 | 自由度 | F 值 | F 临界值 | P 显著性 |
|----|---------|-----|---------|--------|-------|
| A | 14.889 | 2 | 7.444 | 1.098 | >0.05 |
| B | 57.556 | 2 | 28.778 | 4.246 | >0.05 |
| C | 556.222 | 2 | 278.111 | 41.033 | <0.05 |
| 误差 | 13.556 | 2 | - | - | - |

3.5. 正交设计验证试验

按夏枯草浸膏粉与辅料(糊精:可溶性淀粉 = 1:4) = 1:1,加入润湿剂乙醇浓度为 80%,恒温干燥的温度为 55℃,根据“3.2”的制备方式制备 3 批供试品,测定颗粒成型率,结果表明该工艺稳定(表 4)。

Table 4. Results of experimental validation

表 4. 验证实验结果

| 编号 | 颗粒合格率(%) |
|----|----------|
| 1 | 85 |
| 2 | 87 |
| 3 | 87 |

3.6. 夏枯草配方颗粒中齐墩果酸质量分数测定研究

3.6.1. 色谱条件

色谱柱: Boston C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 甲醇-0.1%磷酸水溶液(86:14)等度洗脱; 流速:1.2 mL/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 室温。

3.6.2. 对照品溶液的制备

精密称取一定量的齐墩果酸对照品,加入甲醇溶液溶解稀释制成浓度为 0.2 mg/mL 的溶液,备用。

3.6.3. 供试品溶液的制备

取夏枯草配方颗粒适量,研磨成细粉,称取 50 mg,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,

通过超声波溶解，摇匀，制得 5 mg/mL 的溶液，冷至室温，用甲醇补定容至刻度，混匀，滤过，取续滤液，备用。

3.6.4. 专属性实验

取“3.6.2”项下的对照品溶液，“3.6.3”项下的供试品溶液，按“3.6.1”项下的色谱条件测定，记录色谱图，结果见图 1。

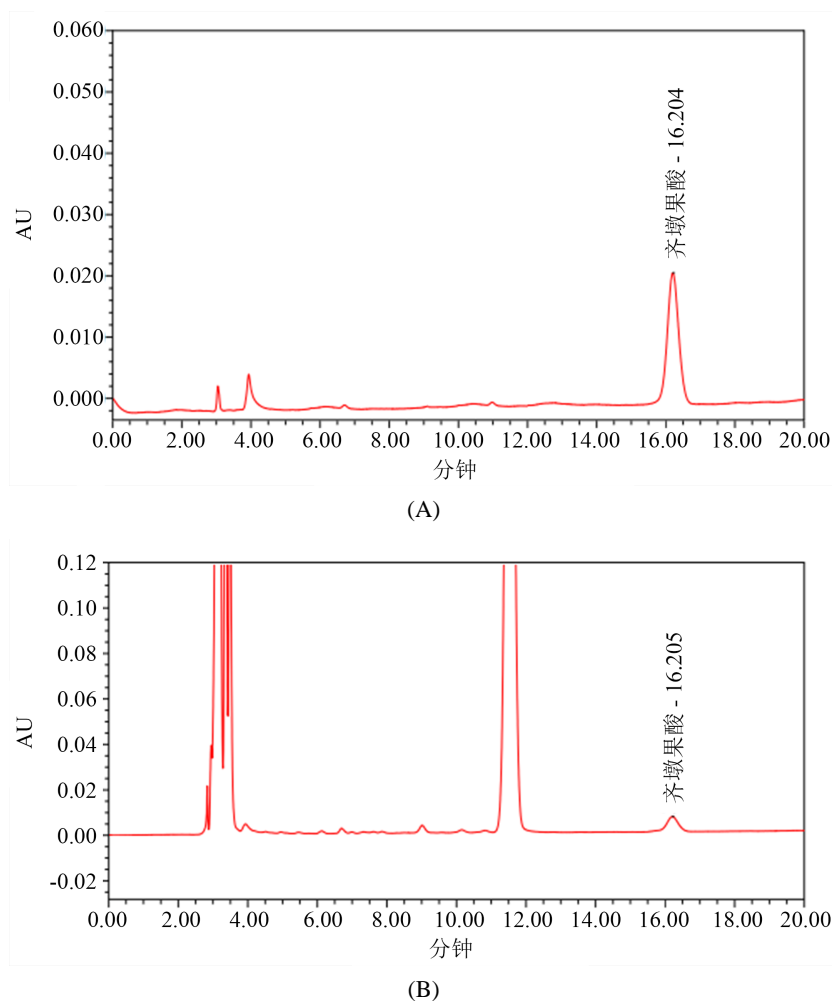


Figure 1. The HPLC diagram of the control products and the test products (A. Nut acid control; B. Test product)

图 1. 对照品、供试品 HPLC 图(A、齐墩果酸对照品；B、供试品)

3.6.5. 线性关系考察

表精密吸取“3.6.2”项下对照品溶液 4 μL ，6 μL ，8 μL ，10 μL ，12 μL ，根据“3.6.1”项下的色谱条件测定。以齐墩果酸的进样量(x, μg)为横坐标，以峰面积(y)为纵坐标，进行线性回归，得线性范围为 0.8 μg ~3.2 μg ，回归方程 $y = 577891x - 826.9$ ，相关系数 $r = 0.9998$ 。

3.6.6. 精密度试验

取“3.6.2”项下适量的对照品溶液，根据“3.6.1”项下色谱条件顺次进样 6 次测定。齐墩果酸峰面积的 RSD 为 0.53%，结果表明仪器的精密度较好。

3.6.7. 稳定性试验

取同一份供试品溶液,按“3.6.1”项下色谱条件测定,分别于0,3,6,9,12 h后进样测定齐墩果酸峰面积,其相对标准偏差RSD为1.7%,表明样品溶液在12 h内稳定。

3.6.8. 重复性试验

取样品6份,按“3.6.3”项下方法制备供试品溶液,再根据“3.6.1”项下色谱条件测定。齐墩果酸含量RSD为1.6%,符合药典要求。

3.6.9. 回收率

精密称取3份已知含量的样品,按“3.6.3”项下方法制备供试品溶液,按照药典规定分别加入一定量(80%、100%、120%)齐墩果酸的标准品,然后根据“3.6.1”项下色谱条件测定,计算样品的回收率为1.5%,结果见表5(n=3)。

Table 5. Results of the recovery rate experiment

表 5. 回收率实验结果

| 编号 | 样品质量(μg) | 标准品加入量(μg) | 测得量(μg) | 加样回收率(%) | 平均加样回收率(%) | RSD (%) |
|----|-----------------------|-------------------------|----------------------|----------|------------|---------|
| 1 | 0.471 | 0.589 | 1.064 | 100.68 | | |
| 2 | 0.471 | 0.589 | 1.075 | 102.55 | | |
| 3 | 0.471 | 0.589 | 1.058 | 99.66 | | |
| 4 | 0.598 | 0.598 | 1.193 | 99.50 | | |
| 5 | 0.598 | 0.598 | 1.195 | 99.83 | 100.25 | 1.5 |
| 6 | 0.598 | 0.598 | 1.212 | 102.68 | | |
| 7 | 0.601 | 0.721 | 1.308 | 98.06 | | |
| 8 | 0.601 | 0.721 | 1.321 | 99.86 | | |
| 9 | 0.601 | 0.721 | 1.318 | 99.45 | | |

3.6.10. 样品含量测定

精密称取9批次夏枯草配方颗粒适量,供试品溶液制备同“3.6.3”项下所述方法,在“3.6.1”项下的色谱条件进样测定并计算其含量(表6),结果表明采用该方法制备的夏枯草颗粒齐墩果酸质量分数是稳定的。

Table 6. Sample content determination results (n = 9)

表 6. 样品含量测定结果(n = 9)

| 批号 | 含量(g/kg) |
|----------|----------|
| 202205-1 | 0.589 |
| 202205-2 | 0.586 |
| 202205-3 | 0.575 |
| 202205-4 | 0.574 |
| 202206-1 | 0.580 |
| 202206-2 | 0.588 |
| 202206-3 | 0.577 |
| 202206-4 | 0.581 |
| 202206-5 | 0.579 |

4. 微生物限度检查

验证上述投料生产的 9 批夏枯草配方颗粒(批号为 202205-1~4、202206-1~5), 参照 2020 版《中国药典》四部颗粒剂项下相关规定, 进行本品初步的质量研究, 结果表明, 该生产工艺重现性好, 制备的夏枯草颗粒稳定可控, 符合药典颗粒剂项下微生物限度相关规定(表 7)。

Table 7. Results of microbial limits of *Prunella vulgaris* formula granules

表 7. 夏枯草配方颗粒微生物限度检查结果

| 批号 | 需氧菌(cfu/mL) | 霉菌(cfu/mL) | 酵母菌(cfu/mL) | 大肠埃希菌(cfu/mL) | 结论 |
|----------|-------------|-------------|-------------|---------------|------|
| 202205-1 | 12 | 5 | 2 | 未检出 | 符合规定 |
| 202205-2 | 10 | 6 | 5 | 未检出 | 符合规定 |
| 202205-3 | 12 | 7 | 4 | 未检出 | 符合规定 |
| 202205-4 | 15 | 5 | 3 | 未检出 | 符合规定 |
| 202206-1 | 15 | 3 | 3 | 未检出 | 符合规定 |
| 202206-2 | 10 | 2 | 4 | 未检出 | 符合规定 |
| 202206-3 | 20 | 4 | 6 | 未检出 | 符合规定 |
| 202206-4 | 13 | 1 | 7 | 未检出 | 符合规定 |
| 202206-5 | 16 | 2 | 4 | 未检出 | 符合规定 |
| 标准规定 | $\leq 10^3$ | $\leq 10^2$ | $\leq 10^2$ | 不得检出 | / |

5. 结果

本试验是通过乙醇回流得到夏枯草提取物, 并对夏枯草配方颗粒的制备工艺进行了正交优化实验, 筛选出夏枯草配方颗粒的最优制备工艺为: 辅料配比(糊精/可溶性淀粉)为 1:4, 浸膏粉与辅料配比为 1:1, 乙醇浓度为 80%, 干燥温度为 55℃。采用 HPLC 法对夏枯草颗粒剂中齐墩果酸进行含量方法学研究及样品含量测定, 结果表明, 该方法精密性、稳定性和重复性良好, 其 RSD 分别为 0.53%、1.7%和 1.6%, 平均回收率为 100.25%。结果表明该工艺重现性好, 制备的夏枯草配方颗粒稳定可控, 可以为夏枯草制剂开发提供一定的思路。

6. 讨论

本项目通过正交实验优化方法筛选出了夏枯草配方颗粒最佳制备工艺, 进行了药品微生物限度检查, 其结果符合药典颗粒剂项下微生物限度相关规定, 但是夏枯草本身具有抗菌药理作用[13], 后续试验可设置夏枯草颗粒不同浓度梯度来进行夏枯草颗粒的微生物限度检查。药品微生物限度是药品质量控制的重要指标之一, 中药制剂由于药材的来源复杂且生产流程较长, 尤其容易受到微生物的污染, 更应引起高度重视。

合适的辅料是颗粒剂制粒工艺的关键步骤, 经预试验发现, 单一辅料或制粒困难或无法制得理想的颗粒, 因此本实验选用混合辅料。夏枯草气微香、味甘、微苦, 为工业化生产、市场推广考虑, 辅料中可加入矫味剂, 增加其口感。

本研究对夏枯草配方颗粒最佳制备工艺和质量控制进行了初步探索, 为夏枯草颗粒剂开发奠定了基础。若要工业化生产, 需要进行进一步的药理毒理学研究、全面的质量标准制定以及制备工艺的深入研究。

基金项目

重庆市科委重点项目(CSTC2014zkjccxyyBX0034);

重庆市博士后研究项目特别资助;

重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxm)。

参考文献

- [1] 杨慧珍, 李映, 葛喜珍. 夏至草, 益母草及夏枯草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2021, 35(2): 85-92.
- [2] 王艳杰, 郝嘉平, 代巧妹, 等. 中药夏枯草药理作用及其分子机制研究进展[J]. 中医药导报, 2022(2): 118-122.
- [3] 孙成. 夏枯草的药理作用和研究进展[J]. 中医临床研究, 2017(26): 146-148.
- [4] 杨益, 郭纯, 蔺晓源, 等. 基于网络药理学研究夏枯草主要化学成分的抗肿瘤作用机制[J]. 肿瘤药学, 2020, 10(6): 675-680.
- [5] 冯春来, 袁颖, 张海生, 等. 夏枯草抗肿瘤分子协同作用网络分析[J]. 中成药, 2016, 38(9): 2003-2012.
- [6] 严东, 谢文剑, 李春, 等. 夏枯草化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 49-54.
- [7] 杨贞妮, 熊书, 罗娇, 等. 齐墩果酸及其衍生物抗乳腺癌作用机制的研究进展[J]. 医学综述, 2022, 28(15): 6.
- [8] 杨德泉, 徐玉辉, 覃爱桃, 等. 高效液相色谱法测定复方桐叶烧伤油中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 药品评价, 2021, 18(24): 1497-1501.
- [9] 齐红, 李敏, 张秋红. 高效液相色谱法测定皱皮木瓜饮片中齐墩果酸和熊果酸[J]. 化学分析计量, 2021, 30(5): 13-16.
- [10] 佟潇禹, 薛蓓, 刘振东, 等. 刺五加果中齐墩果酸, 熊果酸的提取工艺优化[J]. 生物技术, 2020(5): 481-488+510.
- [11] 闫庆梓, 柏玉冰, 唐洁, 等. 夏枯草中齐墩果酸和熊果酸的含量测定方法研究[J]. 中南药学, 2017, 15(8): 1028-1031.
- [12] 李瑶芳, 刘明颖, 邓双炳, 等. HPLC 法测定不同产地山香圆叶中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 江西中医药大学学报, 2022(3): 73-76.
- [13] Bai, Y., Xia, B., Xie, W., *et al.* (2016) Phytochemistry and Pharmacological Activities of the Genus *Prunella*. *Food Chemistry*, **204**, 483-496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.047>