

当归破壁粉制备工艺优化及物理指纹图谱评价研究

罗 铮^{1,2,3,4,5}, 邓 雯^{2,3}, 张前亮^{2,3}, 成金乐^{2,3*}

1. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 广东 广州 510006
2. 中山市中智药业集团有限公司, 广东 中山 528437
3. 国家中医药管理局中药破壁饮片技术与应用重点研究室, 广东 中山 528437
4. 岭南中药资源教育部重点实验室(广州中医药大学), 广东 广州 510006
5. 国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州 510006

摘要: 目的 优选当归破壁粉的制备工艺, 并进行质量评价。方法 建立当归中 5 种活性成分阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯和丁烯基苯酐的 HPLC 测定方法; 采用 Box-Behnken 响应面设计法对粉碎时间、粉碎温度和投料量进行考察, 以当归破壁粉的粒径分布 (D_{90} , 累计粒度分布数达到 90% 时所对应的粒径) 和 5 种活性成分含量值作为响应值来构建响应面模型, 在 $D_{90} < 45 \mu\text{m}$ 前提下, 对 5 种活性成分含量做最大值求算, 确定最优的当归破壁粉制备工艺参数; 以 D_{90} 、不均匀系数、粒径分布宽度、松装密度、振实密度、颗粒间孔隙度、卡尔指数、比表面积、孔体积、豪斯纳比、休止角、干燥失重和吸湿性 13 个物理指标构建当归破壁粉的物理指纹图谱, 评价最优工艺制备的 3 批当归破壁粉的相似度。

结果 5 种活性成分 HPLC 测定方法的精密度、重复性和稳定性等方法学考察结果符合指导原则要求。Box-Behnken 响应面优选的工艺参数为粉碎时间 35 min、粉碎温度 -10°C 、投料量 580 g。最优工艺制备的 3 批当归破壁粉 5 种活性成分含量和响应面拟合结果之间的 RSD 值均小于 3%, 物理指纹图谱相似度均在 0.994 以上。**结论** Box-Behnken 优选的当归破壁粉制备工艺方法在保留活性成分尤其是挥发性成分含量方面具有明显优势, 物理指纹图谱作为评价中药粉体物理属性质量一致性的工具有较好的实际效果, 两者结合应用有助于实现更高的中药破壁粉生产质量控制水平。

关键词: 当归; 破壁粉; 物理指纹图谱; 质量评价; 阿魏酸; 洋川芎内酯 I; 阿魏酸松柏酯; 藁本内酯; 丁烯基苯酐; Box-Behnken 响应面设计; HPLC; 粒径分布; 松装密度; 振实密度; 颗粒间孔隙度; 卡尔指数; 比表面积; 孔体积; 豪斯纳比; 休止角; 干燥失重; 吸湿性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24-5980-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.010

Optimization of preparation process and evaluation of physical fingerprint of *Angelicae Sinensis Radix* cellwall broken powder

LUO Zheng^{1,2,3,4,5}, DENG Wen^{2,3}, ZHANG Qian-liang^{2,3}, CHENG Jin-le^{2,3}

1. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China
2. Zhongshan Zhongzhi Pharmaceutical Group, Zhongshan 528437, China
3. Key Laboratory of Technologies and Applications of Ultrafine Granular Powder of Herbal Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528437, China
4. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Guangzhou 510006, China
5. Joint Laboratory of National Engineering Research Center for the Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicines, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To optimize the preparation process of *Angelicae Sinensis Radix* cellwall broken powder (ASR CBP) and evaluate the physical quality of powder. **Methods** A HPLC method was established for the determination of five active constituents

收稿日期: 2019-08-31

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2018B0202072008); 广东省中药破壁饮片工程实验室 (粤发改创新函 [2018] 3149 号); 中山市协同创新中心项目 (2016C1014)

作者简介: 罗 铮 (1995—), 男, 在读硕士, 研究方向为创新中药研究与开发。Tel: (0760)85311966 E-mail: 157886831@qq.com

***通信作者** 成金乐, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为创新中药研究与开发。Tel: (0760)85311966 E-mail: gdcjl9@126.com

(ferulic acid, senkyunolide I, coniferyl ferulate, ligustilide and *n*-butylidenephthalide) of ASR. The Box-Behnken response surface design method was used. The pulverization time, pulverization temperature and sampling capacity in the pulverization process were investigated. The particle size distribution (D_{90}) of the broken wall powder of ASR and the five active ingredients content were used as the response value to construct the response surface model. Under the premise of $D_{90} < 45 \mu\text{m}$, the maximum value of the five active ingredients was calculated to optimize the superfine grinding process parameters. A total of 13 physical indicators of D_{90} , coefficient of nonuniformity, particle size distribution width, bulk density, tap density, interparticle porosity, Karl index, specific surface area, pore volume, Hausner ratio, angle of repose, loss on drying and hygroscopicity were used to establish the physical fingerprint of ASR CBP. The similarity evaluation method was used to evaluate the similarity of different batches of ASR CBP. **Results** The methodological results of the HPLC method for the determination of the five active ingredients were in accordance with the guidelines. Results of response surface method showed the optimized preparing parameters of ASR CBP technology as follows: 35 min of pulverization time, -10°C of pulverization temperature, and 580 g of sampling capacity. The RSD values between the content and the response surface fitting results of five active ingredients of three batches of cellwall broken powder prepared by the optimal process were all less than 3%. The similarity of the three batches of the optimal process of ASR CBP was above 99.4%. **Conclusion** Box-Behnken optimized preparation method of ASR CBP has obvious advantages in retaining the content of active ingredients, especially volatile components. Physical fingerprinting has good practical effects as a tool to evaluate the consistency of physical properties of Chinese material medica powder. The combination of applications helps to achieve a higher quality control level of Chinese medicine cellwall broken powder production.

Key words: *Angelicae Sinensis Radix*; cellwall broken powder; physical fingerprint; quality evaluation; ferulic acid; senkyunolide I; coniferyl ferulate; ligustilide; *n*-butylidenephthalide; Box-Behnken response surface design; HPLC; particle size distribution; bulk density; tap density; interparticle porosity; Karl index; specific surface area; pore volume; Hausner ratio; angle of repose; loss on drying; hygroscopicity

当归始载于《神农本草经》，列为中品，来源于伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根，有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效^[1]。挥发油类是当归的主要活性成分，主要含有藁本内酯、阿魏酸松柏酯、洋川芎内酯 I、丁烯基苯酐等^[2-4]，这类挥发性成分不稳定，在光照、高温等条件下极易发生异构和分解，不同成分之间也极易相互转化^[5-6]。近年来，随着超微粉碎技术的发展，中药超微粉的相关研究也不断深入，相关研究表明，超微粉碎工艺会对中药超微粉中的活性成分产生影响^[7-8]，如 -10°C 的低温粉碎则可避免羌活挥发油总量的损失^[9]；不同粉碎细度的当归粉其阿魏酸含量也存在差异^[10]。超微粉碎工艺是否会对当归挥发性成分产生影响，不同工艺的影响规律以及如何能尽可能减少超微粉碎工艺对挥发性成分的损失，这些问题亟待探究和解决。

当归破壁粉是微米级粉体，具有复杂多样的粉体学性质。目前，多数粉碎工艺优化的研究多集中在粉体的粒径分布、相关活性成分含量、溶出度等方面^[11-13]，对粉末的均一性、堆积性、可压缩性、流动性和稳定性等物理属性关注较少。这些粉体学性质会直接影响后续的制粒或者压片工艺^[14]，因此需要寻找一种综合表征粉末粉体性质的方法，对中

药超微粉的粉体学性质进行评价和控制，以消除物理属性波动对最终产品质量的影响。

综上所述，本研究以当归为研究对象，使用低温振动粉碎机（设备可调参数为粉碎温度、粉碎时间）制备当归破壁粉。为满足当归破壁饮片制备工艺需求及中药破壁饮片的内涵^[15]，即满足当归破壁饮片制药中间体当归破壁粉的 D_{90} （累计粒度分布数达到 90%时所对应的粒径） $< 45 \mu\text{m}$ 的前提，优选出最佳当归破壁粉制备工艺参数；借鉴化学指纹图谱以及 SeDeM 专家系统^[16]的概念，建立当归破壁粉物理指纹图谱^[17-18]。以活性成分含量和物理指纹图谱对最优工艺制备的当归破壁粉质量属性进行综合表征，全面验证该粉碎工艺的稳定性及可行性，为进一步控制和提升当归破壁粉的质量奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CW5-7.5QA 低温振动粉碎机，烟台慧宝设备制造有限公司；M150 型中药磨粉机，金华市旋风药材机械厂；KQ-700DE 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；TopSizer 激光粒度分析仪，珠海欧美克仪器有限公司；U3000 高效液相色谱仪，Thermo Fisher 公司；Waters 2695/2988 液相色谱仪，美国 Waters 公司；Agilent 1200 RRLLC 液相色谱仪，

美国 Agilent 公司; MS105 电子天平、ME204 电子天平, Mettler Toledo 公司; MF-50 型快速水分测定仪, AND 公司; KMF-720 型环境试验箱, BINDER; BT-1000 粉体综合特性测试仪, 丹东市百特仪器有限公司; 3H-2000PS2 型比表面积及孔径分析仪, 贝士德仪器科技有限公司。

1.2 材料

对照品阿魏酸, 批号 110773-201614, 质量分数 99.0%, 50 mg, 购自中国食品药品检定研究院; 对照品洋川芎内酯 I, 批号 MUST-18053105, 质量分数 99.43%, 20 mg, 购自成都曼斯特生物科技有限公司; 对照品阿魏酸松柏酯 (批号 DST180315-016, 质量分数 98.94%, 20 mg)、藁本内酯 (批号 DST190315, 质量分数 98.93%, 100 mg)、丁烯基苯酐 (批号 DST180717-005, 质量分数 $\geq 99\%$, 50 mg) 均购自成都德斯特生物技术有限公司; 甲醇、甲酸, 分析纯, 广州化学试剂厂; 磷酸, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 四氢呋喃、乙腈, 色谱纯, 4 L, Oceanpak 公司。当归药材购自甘肃岷县顺兴和中药材有限公司, 经中智药业集团有限公司贾世清中药师鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, 由中智药业集团有限公司进行炮制加工成当归饮片。

2 方法与结果

2.1 当归破壁粉的制备

取同一批次当归饮片 (批号 20181101), 低温烘干 ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$) 至水分约为 5%, 使用中药磨粉机进行粗粉碎, 得到当归粗粉 (粒度分布为 $D_{90}=403.256\text{ }\mu\text{m}$), 将粗粉进行分装, 用铝箔袋真空包装, 放入冰箱冷冻室 ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) 保存; 按照 Box-Behnken 响应面的实验设计, 将当归粗粉用低温振动粉碎机进行超微粉碎, 得到 17 批当归破壁粉, 将第 1 批 (PG20190429) 当归破壁粉用于含量测定方法建立, 破壁粉的包装、储存条件同上。

2.2 当归 5 种活性成分含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Capcell Pak C_{18} MG III 柱 ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液 (A) - 含 10% 四氢呋喃的乙腈溶液 (B), 梯度洗脱程序为 0~15 min, 85%~70% A; 15~29 min, 70%~44% A; 29~32 min, 44% A; 32~35 min, 44%~38% A; 35~43 min, 38%~35% A; 43~48 min, 35%~85% A; 48~58 min, 85% A; 体积流量为 1.2 mL/min; 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μL ; 检测波长 29~31 min

为 350 nm, 其余时间为 270 nm。按阿魏酸峰计算理论塔板数不低于 40 000。色谱图见图 1。

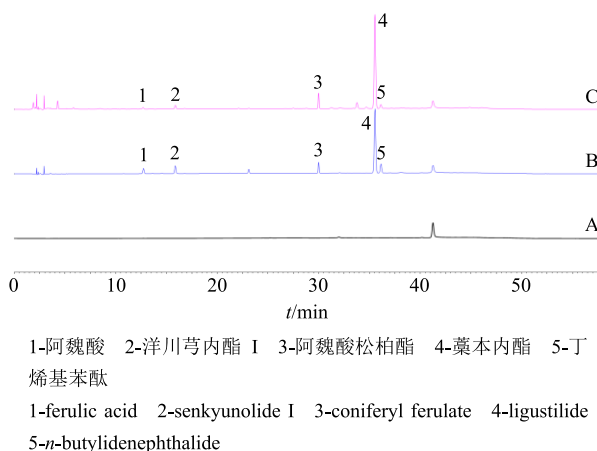


图 1 溶剂空白 (A)、混合对照品 (B) 和当归破壁粉样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of solvent blank (A), mixed reference (B), and ASR CBP (C)

2.2.2 混合对照品溶液的配制 分别精密称取阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯、丁烯基苯酐对照品适量, 加入甲酸-甲醇 (5:95) 溶液配制成 98.4、45.5、219.3、1 340.0、79.9 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品母液, 避光, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。精密吸取 1 mL 对照品母液于 10 mL 棕色量瓶中, 定容, 即得。

2.2.3 供试品溶液制备 取当归饮片按“2.1”项下方法制备当归破壁粉, 精密称定各批次当归破壁粉 1.0 g, 加入甲酸-甲醇 (5:95) 溶液 50 mL, 称定质量, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超声提取 (560 W, 40 kHz) 45 min, 放冷, 补足减失的质量, 过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯、丁烯基苯酐混合对照品母液 0.2、0.5、0.8、1.0、2.0、5.0、10.0 mL 分别置于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲酸-甲醇 (5:95) 溶液稀释至刻度, 摇匀, 共得到 7 个系列质量浓度的混合对照品溶液。按“2.2.1”项色谱条件进行分析, 以混合对照品各成分的峰面积为因变量 (Y), 混合对照品各成分的质量为自变量 (X) 进行线性回归, 得回归方程分别为阿魏酸 $Y=24.237 X+0.085 5$, $r=0.999 6$, 线性范围 19.7~983.7 ng; 洋川芎内酯 I $Y=71.527 X+0.029 6$, $r=0.999 8$, 线性范围 9.1~455.4 ng; 阿魏酸松柏酯 $Y=19.302 X+0.030 6$, $r=1.000 0$, 线性范围 43.9~2 193.0 ng; 藁本内酯 $Y=24.656 X+1.050 2$, $r=0.999 8$, 线性

范围 268.0~13 400.0 ng; 丁烯基苯酐 $Y=52.428X+0.1212$, $r=0.9997$, 线性范围 16.0~799.1 ng。

2.2.5 精密度试验

(1) 方法精密度试验: 取同一批(批号 PG20190429)当归破壁粉制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 结果阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯、丁烯基苯酐峰面积的 RSD 值分别为 0.26%、0.46%、0.12%、0.16%、0.18%, 表明该方法精密度良好。

(2) 中间精密度试验: 取同一批(批号 PG20190429)当归破壁粉制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别在 Waters 2695/2988 液相色谱仪、Agilent 1200 RRLC 液相色谱仪、Thermo U3000 液相色谱仪进样, 不同仪器测得阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯、丁烯基苯酐峰面积的 RSD 值分别为 2.22%、1.03%、2.32%、1.12%、2.28%, 表明该方法中间精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批(批号 PG20190429)当归破壁粉, 按“2.2.3”项下平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定 6 份样品中各成分的峰面积, 计算质量分数。6 份平行样品中阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯、丁烯基苯酐质量分数的 RSD 值分别为 0.35%、0.31%、0.39%、0.69%、0.48%, 表明该方法的重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一批(批号 PG20190429)当归破壁粉制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯、丁烯基苯酐的峰面积, 结果 5 种成分在 6 个时间点峰面积的 RSD 值分别为 1.74%、1.94%、1.10%、1.04%、1.12%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量同批次(批号 PG20190429)当归破壁粉样品 0.5 g 共 6 份, 加入“2.2.2”项下的混合对照品母液 0.2 mL, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 计算加样回收率, 结果阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯、丁烯基苯酐的平均加样回收率为 102.45%、100.93%、101.28%、100.32%、100.32%, RSD 值分别为 1.00%、0.89%、1.38%、1.47%、0.94%, 结果表明方法准确度良好。

2.3 当归破壁粉粉碎工艺优化

2.3.1 Box-Behnken 响应面优化 结合低温振动粉

碎机可调参数范围和前期的单因素实验结果, 筛选出对当归粉超微粉碎工艺影响较大的 3 个因素为粉碎时间(A)、粉碎温度(B)、投料量(C), 因素水平及 6 个考察指标 D_{90} (Y_1) 及阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯和丁烯基苯酐质量分数 ($Y_2 \sim Y_6$) 如表 1 所示。

2.3.2 粒径测定 采用湿法测定当归破壁粉的粒径分布, 取当归破壁粉 0.25 g, 加超纯水 80 mL, 超声 10 min (560 W, 40 kHz), 使当归破壁粉分散均匀, 采用激光粒度仪测定当归破壁粉的粒径分布(循环水泵转速 2 000 r/min, 遮光比设置为 8%), 结果见表 1。

2.3.3 含量测定 根据响应面实验设计参数制得 17 批当归破壁粉, 采用“2.2.3”项下供试品溶液的制备方法, “2.2.1”项下色谱条件, 测定 17 批当归破壁粉中 5 种活性成分含量, 结果见表 1。

2.3.4 响应面结果分析 根据表 1 的结果, 发现 D_{90} 最小样品(3 号实验)的藁本内酯含量(8.305 3 mg/g)显著低于其他实验样品, D_{90} 最大样品(11 号实验)的藁本内酯含量最高(10.561 3 mg/g), 可能原因 3 号样品投料量少, 且经过长时间的振动粉碎, 使当归挥发油的主要成分藁本内酯含量显著降低, 提示当归这一品种的破壁粉粒径不宜过细。

用 Design-Expert 8.0.6 软件对 6 个响应值进行分析, 各响应值的拟合方程及 P 值分别为 $Y_1=42.65-34.61A+2.00B+21.54C-1.48AB-13.72AC+0.21BC+21.84A^2-0.32B^2+3.87C^2$, $P<0.001$; $Y_2=0.1891+0.0028A+0.0049B-0.0005C+0.0029AB+0.0011AC+0.0042BC-0.0041A^2-0.0010B^2+0.0022C^2$, $P=0.0206$; $Y_3=0.1272+0.0094A-0.0034B-0.0081C-0.0028AB-0.0073AC+0.0027BC+0.0023A^2-0.0007B^2+0.0042C^2$, $P=0.0001$; $Y_4=1.6038-0.0388A+0.0123B+0.0433C-0.0186AB+0.0324AC+0.0016BC+0.0031A^2+0.0161B^2-0.0077C^2$, $P=0.0222$; $Y_5=10.0579-0.3953A+0.0702B+0.5133C-0.0610AB+0.3076AC-0.0730BC-0.0010A^2+0.0865B^2-0.3160C^2$, $P=0.0014$; $Y_6=0.1973+0.0211A-0.0032B-0.0180C-0.0035AB-0.0207AC+0.0026BC+0.0040A^2-0.0043B^2+0.0104C^2$, $P=0.0003$ 。

从 D_{90} 、阿魏酸、洋川芎内酯 I、阿魏酸松柏酯、藁本内酯和丁烯基苯酐响应值的方差分析可以看

表 1 当归破壁粉碎工艺 Box-Behnken 响应面试验设计的因素水平及结果

Table 1 Factor level and result of Box-Behnken response surface test design of ASR CBP

序号	A/min	B/°C	C/g	$Y_1/\mu\text{m}$	$Y_2/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_3/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_4/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_5/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_6/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
1	20 (0)	-10 (-1)	600 (+1)	60.404	0.179 7	0.124 4	1.623 7	10.220 0	0.189 4
2	35 (+1)	-10	400 (0)	31.851	0.181 3	0.142 5	1.596 8	9.935 5	0.218 7
3	35	5 (0)	200 (-1)	20.386	0.186 6	0.161 6	1.452 0	8.305 3	0.279 3
4	20	5	400	43.086	0.186 5	0.125 6	1.609 5	10.138 3	0.198 7
5	20	5	400	45.191	0.189 9	0.128 5	1.593 3	9.984 7	0.197 6
6	20	5	400	44.926	0.189 1	0.128 0	1.594 0	10.125 7	0.199 4
7	5 (-1)	5	200	65.404	0.187 2	0.124 5	1.615 4	10.002 8	0.185 1
8	5	-10	400	94.873	0.177 3	0.122 1	1.616 2	10.312 5	0.180 2
9	20	5	400	41.472	0.186 7	0.126 6	1.604 4	10.040 9	0.193 1
10	5	20 (+1)	400	99.468	0.180 9	0.120 6	1.686 4	10.473 2	0.182 2
11	5	5	600	143.773	0.185 6	0.120 3	1.681 8	10.561 3	0.185 5
12	35	5	600	43.871	0.189 2	0.128 4	1.647 8	10.094 1	0.197 0
13	20	-10	200	25.618	0.190 7	0.143 6	1.584 6	9.194 5	0.225 7
14	20	20	200	31.577	0.192 5	0.131 5	1.597 6	9.582 8	0.212 4
15	20	5	400	38.598	0.193 2	0.127 1	1.617 8	9.999 8	0.197 8
16	35	20	400	30.514	0.196 5	0.129 8	1.592 8	9.852 2	0.206 9
17	20	20	600	67.219	0.198 3	0.123 0	1.642 9	10.316 3	0.186 5

出,在表 1 各因素的水平范围内,粉碎时间对粒径分布 D_{90} ($P<0.000\ 1$)、阿魏酸 ($P=0.038\ 8$)、洋川芎内酯 I ($P<0.000\ 1$)、阿魏酸松柏酯 ($P=0.005\ 6$)、藁本内酯 ($P=0.000\ 6$) 和丁烯基苯酐 ($P<0.000\ 1$) 的含量均有显著影响;粉碎温度对阿魏酸 ($P=0.003\ 1$) 和洋川芎内酯 I ($P=0.007\ 2$) 的含量有显著影响,对粒径分布 D_{90} ($P=0.307\ 1$)、阿魏酸松柏酯 ($P=0.307\ 1$)、藁本内酯 ($P=0.331\ 8$) 和丁烯基苯酐 ($P=0.207\ 9$) 的影响无统计学意义;投料量除对阿魏酸 ($P=0.641\ 4$) 含量无显著影响外,对其他的指标的响应值均有显著性影响。各响

应指标和因素的三维响应面图见图 2。

由图 2 分析可知,粉碎温度一定时,当归破壁粉的粒径分布 D_{90} 随着粉碎时间的增大,投料量的减少而减少。在固定投料量时,增加粉碎时间,升高粉碎温度,阿魏酸的含量会随之升高;增加粉碎时间和降低粉碎温度可以使洋川芎内酯 I 的含量升高。在粉碎温度一定时,减少粉碎时间和增加投料量可以提高阿魏酸松柏酯和藁本内酯的含量,但丁烯基苯酐和阿魏酸松柏酯则与之相反,增加粉碎时间和减少投料量可以增加其含量。

本研究目的是尽量减少破壁粉碎工艺对当归活

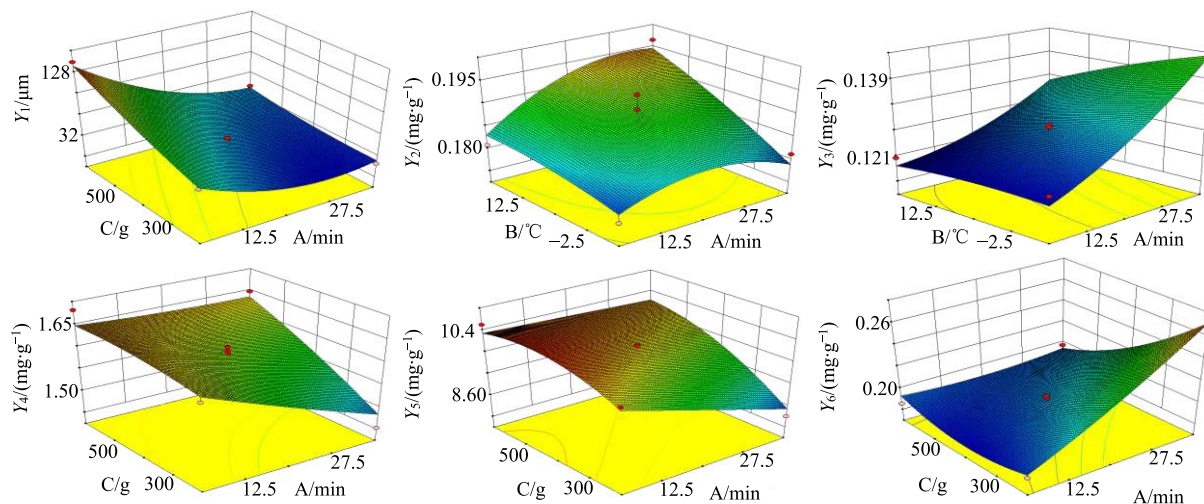


图 2 各响应值响应面曲面分析图

Fig. 2 Response surface plots of six response factors

性成分的影响,即优选出活性成分含量最高的当归破壁粉制备工艺。为满足破壁粉的基本要求 ($D_{90} < 45 \mu\text{m}$),在求算最优参数时,将当归破壁粉的粒径分布 D_{90} 限定为 $30 \sim 40 \mu\text{m}$,5 种活性成分含量作最大值求算,由于藁本内酯是当归挥发油的主要成分,占比 60.07%^[19],将其权重定为 5 星,其他成分为 1 星,求解的最优参数为粉碎时间 35 min,粉碎温度 $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$,投料量为 582.42 g (D_{90} 及 5 种活性成分的含量预测结果见表 2)。结合实际,将最优参数定为粉碎时间 35 min,粉碎温度 $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$,投料量为 580 g。

表 2 模型拟合结果与实际结果

Table 2 Model fitting results and actual results

样品	D_{90}	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
		阿魏酸	洋川芎内酯 I	阿魏酸松柏酯	藁本内酯	丁烯基苯酞
验证样品 1	43.046	0.176 5	0.130 6	1.591 1	10.149 1	0.203 2
验证样品 2	43.141	0.177 2	0.130 2	1.604 9	10.215 5	0.207 5
验证样品 3	41.996	0.177 6	0.130 0	1.597 4	10.162 0	0.208 0
预测结果	39.192	0.177 4	0.131 4	1.651 7	10.291 2	0.195 9
RSD/%	4.40	0.27	0.46	1.71	0.63	2.75

2.4 当归破壁粉物理指纹图谱

2.4.1 当归破壁粉物理指标的表征方法

(1) 不均匀系数 (Cu) 和粒径分布宽度 (Span): 用于表征粉体颗粒的均一性,按“2.3.2”项下方法测定不同工艺破壁粉的 D_{90} 、 D_{60} 、 D_{50} 、 D_{10} ,不均匀系数 (Cu) 和粒径分布宽度 (Span) 的计算公式分别为 $\text{Cu} = D_{60}/D_{10}$, $\text{Span} = (D_{90} - D_{10})/D_{50}$ ^[20]。

(2) 松装密度 (ρ_b): 先称量密度容器 (100 mL) 质量 (m_0),通过粉末综合特性测定仪的振动筛加料,直至密度容器装满破壁粉,取出,用刮板将多余粉料刮出,称定质量 (m_1), ρ_b 公式为 $\rho_b = (m_1 - m_0)/100$ 。

(3) 振实密度 (ρ_t): 将上述的密度容器上端连接塑料管,继续加料至充满塑料管,盖上胶塞,经 6 min 上下振动后取出密度容器,刮去多余粉料,称定质量 (m_2), ρ_t 公式为 $\rho_t = (m_2 - m_0)/100$ 。

(4) 颗粒间孔隙度 (I_e): 用于表征颗粒之间的空隙大小^[20],由 ρ_b 和 ρ_t 计算而得, I_e 公式为 $I_e = (\rho_t - \rho_b)/(\rho_t \times \rho_b)$ 。

(5) 卡尔指数 (CI): 用于表征粉末的可压缩趋势^[21],CI 公式为 $\text{CI} = (\rho_t - \rho_b)/\rho_t \times 100$ 。

(6) 比表面积 (S) 和孔体积 (V_g): 取适量待测粉体于测量管中,于 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 脱气 8 h,用全自动比表面积及孔径分析仪测定样品的 S 和 V_g 。

2.3.5 验证试验 取同一批当归饮片,平行 3 份,采用“2.3.4”项下最优工艺制备当归破壁粉样品,在通过“2.3.2”项和“2.3.3”项方法对制备的当归破壁粉进行粒径测定和含量测定,与响应面模型拟合的粒径分布和含量结果进行比对,结果见表 2,除粒径分布 D_{90} 的 RSD 值小于 5% 外,其余指标 RSD 值均小于 3%,表明经该试验模型准确,预测性良好。3 批验证试验样品的 D_{90} 和 5 种活性成分含量的 RSD 值均小于 3%,说明这 3 批验证试验样品的活性成分含量及粒径分布具有良好的一致性。

(7) 豪斯纳比 (IH): 与粉体的流动性有关^[22],计算公式为 $\text{IH} = \rho_t/\rho_b$ 。

(8) 休止角 (α): 用于表征粉末流动性的重要参数,使用粉体综合特性测试仪直接测定。

(9) 干燥失重 (HR): 称取约 2.5 g 当归破壁粉置于快速水分测定仪上, $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热,直至读数不再变化,记录数据 (HR 值是快速水分测定直接给出的)。

(10) 最大吸湿量 (H): 取干燥具塞玻璃称量瓶,置于恒温恒湿箱中,在温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 (80 ± 2) % 中恒湿 24 h 后精密称定质量 (m_a)。取待测当归破壁粉适量平铺于上述的玻璃称量瓶中,厚度约为 1 mm,精密称定质量 (m_b)。将称量瓶敞口,与瓶盖同置于恒温恒湿箱中 24 h,称定质量 (m_c),最大吸湿量的计算公式为 $H = (m_c - m_b)/(m_b - m_a)$ 。

2.4.2 当归破壁粉物理指纹谱指标转化 根据当归破壁粉的物理属性,将其粉体学性质归纳为均一性、堆积性、可压缩性、流动性和稳定性这 5 个一级指标。其中均一性用 D_{90} 、Cu 和 Span 来表征,表示粉末粒径大小及分布的均匀程度;堆积性用 ρ_b 和 ρ_t 表征颗粒的堆积能力和松软状态;可压缩性用 I_e 、CI、S 和 V_g 表征,表示粉末的压缩成形的能力;流动性用 α 和 IH 表征;稳定性用 HR 和 H 表征,它

们影响粉末的润滑性能和所成制剂的稳定性。通过以上 13 个二级指标构建当归破壁粉的物理指纹图谱, 由于各个指标的量纲及数量级差异较大, 将各 2 级指标的实测值通过公式转化为 0~10, 各物理性质指标的可能数值范围和转换方法参考相关文献方法^[17,23-24], 具体转换方法见表 3。

2.4.3 当归破壁粉物理指纹图谱构建及相似度评价 分别按“2.4.1”项下方法测定了最优工艺制备的 3 批当归破壁粉, 将 3 批当归破壁粉测定值按公式转化, 采用 Origin 9 作图软件将当归破壁粉物理指纹图谱 13 个指标的转化值绘制成雷达图, 见图 3, 基于当归破壁粉的物理指纹图谱的转化值, 运用皮尔逊相关系数法比较不同批次破壁粉的相似度, 相似度值越接近 1, 表明 2 批破壁粉的物理性质越相近。2 号和 11 号实验之间的相似度仅为 0.263, 表明不同工艺制备出当归破壁粉的粉体学性质差异较大。验证 1、2 号之间的相似度为 0.997, 验证 1、3 号之间的相似度为 0.994、验证 2、3 号之间的相似度为 0.998, 说明 3 批验证试验的当归破壁粉粉体学性质接近, 其物理性质具有良好的质量一致性。

综上所述, 3 批最优工艺制备的当归破壁粉的化学性质及物理性质具有良好的质量一致性, 说明优选的当归破壁粉碎工艺稳定、可行。

表 3 二级指标范围及转换方式

Table 3 Secondary indicator range and conversion method

一级指标	二级指标	单位	数值范围	转化公式
均一性	D_{90}	μm	0~150	$10-x/15$
	Cu	—	10~1	x
	Span	—	4~1	$(40-10x)/3$
堆积性	ρ_b	$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0~1	$10x$
	ρ_t	$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0~1	$10x$
可压性	I_e	—	0~2	$10x/2$
	CI	%	0~60	$x/6$
	S	$\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$	0~2	$5x$
	V_g	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$	0~0.01	$1000x$
流动性	α	°	0~60	$10-x/6$
	IH	—	3~1	$(30-10x)/2$
稳定性	HR	%	0~10	$10-x$
	H	%	0~30	$10-x/3$

3 讨论

藁本内酯是当归挥发油的主要成分, 其结构为苯酞类, 3 位上有活泼的丁烯基, 在室温条件下就极易发生脱氢、氧化、水解等异构反应, 其异构化的产物多样, 丁烯基苯酞就是其中之一^[25]; 阿魏酸松柏酯也是当归挥发油的活性成分, 易水解成阿魏酸^[26]。上述结果发现, 当归破壁粉 D_{90} 为 $143.773\ \mu\text{m}$

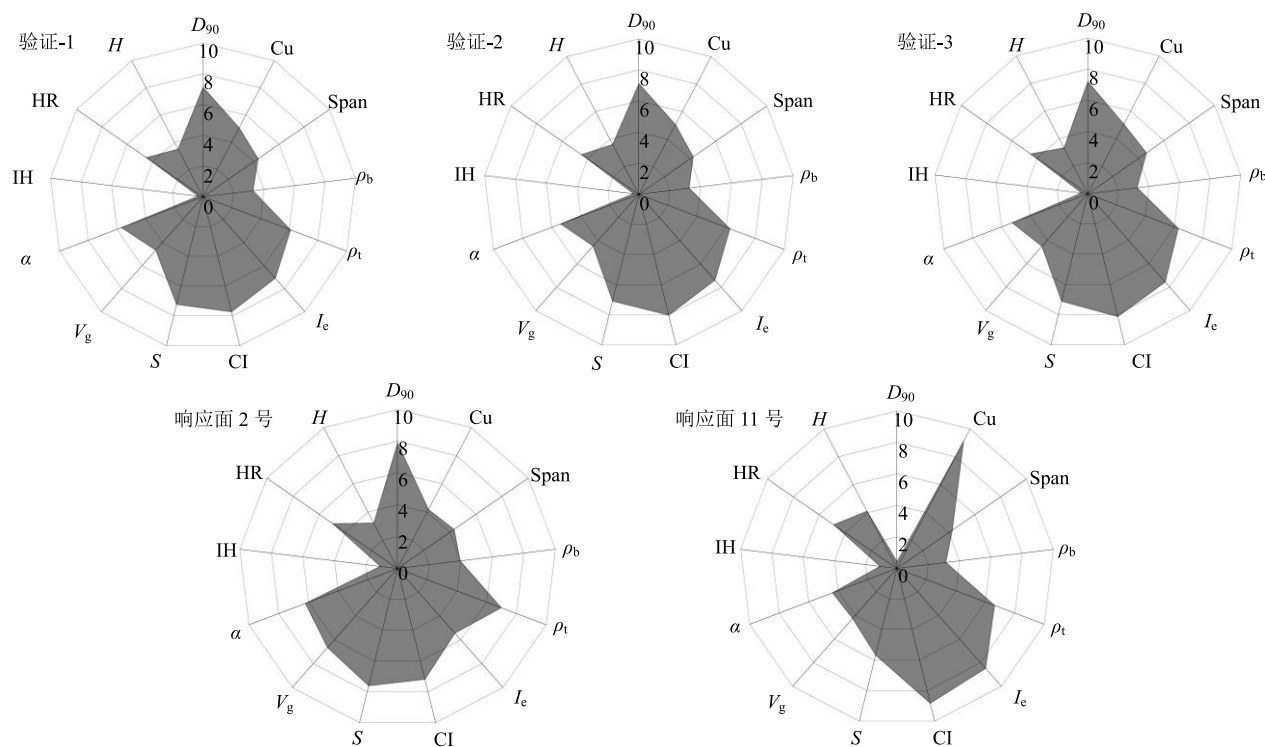


图 3 不同批次当归破壁粉物理指纹图谱

Fig. 3 Physical fingerprint of different batches of ASR CBP

时, 藁本内酯和阿魏酸松柏酯质量分数分别为 10.561 3、1.681 8 mg/g, 丁烯基苯酞和阿魏酸质量分数分别为 0.185 5、0.185 6 mg/g; 当归破壁粉 D_{90} 为 20.386 μm 时, 藁本内酯和阿魏酸松柏酯质量分数分别为 8.305 3、1.452 0 mg/g, 丁烯基苯酞和阿魏酸质量分数分别为 0.279 3、0.186 6 mg/g。说明随着当归粉碎细度变小, 当归破壁粉中藁本内酯含量降低、丁烯基苯酞含量升高; 阿魏酸松柏酯的含量降低, 阿魏酸含量略有升高, 可能的原因是超微粉碎会促进这些不稳定结构向其他成分的转化。

当归破壁粉作为当归破壁饮片的前体, 其自身的质量属性会直接影响到后续的制粒工艺的选择以及成品质量的优劣, 仅在化学层面对其进行质量控制还不够全面, 如本实验的 2 号样品和 11 号样品之间活性成分含量相近, 但物理指纹图谱相似度仅为 0.263 (图 3), 差异极大, 两者经相同制粒工艺制备的颗粒其物理属性很有可能存在较大差异。因此, 综合化学和物理属性指标的分析 and 评价, 是更为全面可靠的质量控制方式。物理指纹图谱作为评价中药粉体物理属性质量一致性的工具有较好的实际效果, 也为中药粉体的综合表征、评价以及固体制剂的开发提供了新思路。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 南京: 江苏人民出版社, 2011.
- [2] 李 曦, 张丽宏, 王晓晓, 等. 当归化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(6): 1023-1028.
- [3] 陈 健, 张 越, 王洪兰, 等. 当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量研究 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4942-4949.
- [4] Fang L, Xiao X F, Liu C X, *et al.* Recent advance in studies on *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(1): 12-25.
- [5] 赵 一, 何晓强, 席 佳, 等. 当归挥发油中 Z-藁本内酯的分离纯化及其制剂的稳定性 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(5): 533-535.
- [6] 康超超, 王学成, 伍振峰, 等. 当归原生粉乙醇灭菌工艺优化及其品质比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1341-1347.
- [7] 孔馨逸, 刘妍如, 唐志书, 等. 响应面法优选葛根超微粉的制备工艺及活性成分测定研究 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 2993-3000.
- [8] 王姗姗, 施崇精, 刘小妹, 等. 基于有效成分的溶出性与粉末分散性构建通脉大生片的粉末分散体 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3017-3025.
- [9] 项 瑞, 王玉蓉, 杨连威, 等. 超微粉碎过程温度对羌活有效成分影响的考察 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(2): 123-126.
- [10] 高明菊, 马 妮, 冯光泉, 等. 当归粉制备工艺研究及最优粉碎粒径筛选 [J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3555-3557.
- [11] 向孙敏, 杨安东, 朱 宁, 等. Box-Behnken 响应面法优选川芎超微粉碎工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 15-18.
- [12] 李跃辉, 王 银, 何 杰, 等. Box-Behnken 效应面法优选斑蝥超微粉碎工艺 [J]. 中药材, 2016, 39(12): 2811-2814.
- [13] 闫 丹, 江敏瑜, 张传辉, 等. 基于多成分测定的血竭三七接骨膏中粉体粒径与溶出度的相关性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4432-4439.
- [14] 李远辉, 伍振峰, 李延年, 等. 基于粉体学性质分析浸膏干燥工艺与中药配方颗粒制粒质量的相关性 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1930-1935.
- [15] 成金乐, 赖智填, 陈炜璇, 等. 中药破壁饮片——传统中药饮片的传承和创新 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(9): 1546-1552.
- [16] Gu M, Sun H, Dai C. SeDeM expert system: A review and new perspectives [J]. *J Pharm Biopharm Res*, 2019, 1(1): 36-47.
- [17] 张 毅, 徐 冰, 孙 飞, 等. 中药提取物粉末物理指纹谱研究及应用 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(12): 2221-2227.
- [18] 王永洁, 陈 桢, 邓莉莉, 等. 基于质量源于设计理念的红花颗粒制备工艺及物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4123-4130.
- [19] 王圣鑫, 沈 晓, 孟英姣, 等. HS-SPME-GC-MS 联用对当归各药用部位挥发油成分的分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(5): 433-438.
- [20] 李延年, 伍振峰, 尚 悦, 等. 基于浸膏物理指纹谱评价不同干燥方式对浸膏粉体性质的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2372-2377.
- [21] Wan S L, Yang R, Zhang H, *et al.* Application of the SeDeM expert system in studies for direct compression suitability on mixture of *Rhodiola* extract and an excipient [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 20(3): 105-114.
- [22] Dai S Y, Xu B, Shi G L, *et al.* SeDeM expert system for directly compressed tablet formulation: A review and new perspectives [J]. *Powder Technol*, 2019, 342: 517-527.
- [23] 李鹏程, 刘 涛, 张文文, 等. 基于 QbD 理念的黄槐片制备工艺及物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1576-1582.
- [24] 崔向龙, 徐 冰, 张 毅, 等. 质量源于设计在银杏叶片制粒工艺中的应用 (I): 颗粒粉体学性质综合评价 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(6): 1037-1042.
- [25] 李 慧, 王一涛. 藁本内酯稳定性的影响因素及稳定化措施 [J]. 江西中医学院学报, 2003, 15(1): 56-57.
- [26] 史雪霞, 李 运. UPLC 法同时测定硫磺熏蒸前后当归中 7 种活性成分的含量 [J]. 中国药房, 2018, 29(17): 2389-2393.