

正交试验优化杠板归的蜜炙工艺

沈 伟^{1*},路立峰²,李赫宇³(1.山东中医药高等专科学校科研处,山东 烟台 264199;2.山东药品食品职业学院中药系,山东 威海 264210;3.天津市益倍建生物技术有限公司,天津 300457)

中图分类号 R285.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3561-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.32

摘 要 目的:优化杠板归的蜜炙工艺。方法:以有效成分槲皮素和水溶性浸出物的含量为综合评价指标,选取蜂蜜用量、闷润时间、烘制温度及烘制时间为考察因素,采用L₉(3⁴)正交试验优化杠板归的蜜炙工艺并进行验证试验。结果:最优蜜炙工艺条件为取杠板归药材加蜂蜜30%,闷润120 min,70℃温度下烘制50 min。验证试验中制备的3批炙杠板归的槲皮素含量均大于0.05%,水溶性浸出物含量均大于25%(RSD均<2.5%,n=3)。结论:优化的炮制工艺稳定、可行,为规范杠板归饮片的蜜炙操作与成品质量控制提供了一定的参考依据。
关键词 杠板归;蜜炙工艺;正交试验;槲皮素;水溶性浸出物

Optimization of Processing Technology of Honey-fired *Polygonum perfoliatum* by Orthogonal Test

SHEN Wei¹, LU Lifeng², LI Heyu³(1.Dept. of Scientific Research, Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Shandong Yantai 264199, China; 2.Dept. of Traditional Chinese Medicine, Shandong Drug and Food Vocational College, Shandong Weihai 264210, China; 3.Tianjin Ubasichealth Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the processing technology of honey-fired *Polygonum perfoliatum*. METHODS: The processing method of honey-fired *P. perfoliatum* was optimized by L₉(3⁴) orthogonal test with the contents of effective component quercetin and water-soluble extract as comprehensive evaluation index, with the amount of honey, moistening time, baking temperature and baking time as investigating factors. RESULTS: The optimal processing technology was as follows as 30% honey, moistening for 120 min, baking for 50 min at 70℃. In verification test, the content of quercetin in 3 batches of honey-fired *P. perfoliatum* was higher than 0.05%, and the content of water-soluble extract was higher than 25% (RSD<2.5%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized processing technology is stable and practical, and can provide reference for standardizing the processing technology and quality control of honey-fired *P. perfoliatum*.

KEYWORDS *Polygonum perfoliatum*; Processing technology of honey-fired; Orthogonal test; Quercetin; Water-soluble extract

函数表达式,从而获得最优因素组合和响应值;而且当试验因素具有较多水平时,可有效减少试验次数,并可以考虑到各水平的非试验值的影响,如在本研究得出的最优工艺中制冷温度为7.3℃。响应面法具有试验次数少、试验周期短、精密度高、预测性能好等特点,目前在制药领域多用于中药提取^[12-14],而在药物剂型研究、特别是滴丸研究方面并不常见,故本研究也为该方法在滴丸剂型方面的应用提供重要参考。

参考文献

[1] 张娇.布洛芬的临床研究进展[J].中国药业,2010,19(5):63.
[2] 路长飞,田月洁,谢彦军,等.布洛芬口服制剂致不良反应/事件监测数据分析[J].药学研究,2013,32(10):618.
[3] 路长飞,马晶,田月洁,等.布洛芬口服制剂致视觉异常不良反应/不良事件64例分析[J].中国药房,2013,24(40):3822.
[4] 翁蓓,张岩.中药滴丸剂的研究进展[J].天津药学,2013,25(2):50.
[5] 耿东升,兰建国,陈明.光纤药物溶出仪实时测定布洛芬片溶出度的研究[J].西北药学杂志,2009,24(5):394.

[6] 祝侠丽,贾永艳,黄海英,等.正交设计法优化布洛芬缓释骨架片的处方工艺[J].中国药房,2014,25(9):830.
[7] 彭婷婷,王卫华.高效液相色谱法测定布洛芬片中布洛芬的含量[J].齐齐哈尔医学院学报,2011,32(17):2820.
[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,2015:375、11-12、121-122.
[9] 张艳,李永哲.响应面法及其在药学领域中的应用[J].吉林化工学院学报,2012,29(7):20.
[10] 李莉,张赛,何强,等.响应面法在试验设计与优化中的应用[J].实验室研究与探索,2015,34(8):41.
[11] 谢沐风.如何科学、客观地制订溶出度试验质量标准[J].中国医药工业杂志,2012,43(3):A23.
[12] 李晓斌,陈振斌,杨旸,等.响应面分析法优化槐叶中黄酮类化合物的提取工艺[J].中国药房,2015,26(7):960.
[13] 刘水英,李新生,党娅,等.响应面法优化紫山药花青苷提取工艺及其抗氧化活性[J].食品科学,2015,35(22):85.
[14] 陈丹妮,秦昆明,陈林伟,等.响应面法优化五倍子总鞣质的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(14):20.

* 讲师,硕士。研究方向:中药化学、中药炮制学。电话:0535-5136962。E-mail:shenweitem@163.com

(收稿日期:2015-11-26 修回日期:2016-07-19)
(编辑:刘明伟)

杠板归,收载于2015年版《中国药典》(一部)中,又名扛板归、犁尖草、蛇牙草、贯叶蓼、河白草、刺蓼、蛇倒退等,系蓼科植物杠板归 *Polygonum perfoliatum* L.的干燥地上部分,味酸,性微寒,归肺、膀胱经,具有清热解毒、利水消肿、止咳的功能,主治咽喉肿痛、肺热咳嗽、小儿顿咳、水肿尿少、湿热泻痢、湿疹、疖肿、蛇虫咬伤等^[1],主要含有黄酮类、蒽醌类、苯丙素类、萜类、酰胺类和其他类化合物^[2-3]。现代药理实验结果表明,杠板归具有抗炎、祛痰止咳、抗菌、保肝、抗疱疹病毒、抗肿瘤等活性作用^[4-6],其在全国各地均有分布,民间常用单味杠板归蜜炙品或复方制剂治疗咽喉肿痛、肺热咳嗽、小儿顿咳(百日咳)等症,效果显著^[7-8]。目前应用最多的饮片为生品杠板归和蜜炙杠板归,明代陈嘉谟在《本草蒙筌》有“蜜制甘缓难化,增益元阳”的论述,意即蜜炙后能增强药物的润肺祛痰、止咳平喘、补中益气之功。但蜜炙杠板归的工艺尚不规范,《中国药典》、全国及各省中药炮制规范均未规定杠板归的炮制工艺及技术参数,各地饮片质量差异较大。本试验在传统蜜炙操作的基础上,以杠板归有效成分槲皮素和水溶性浸出物的含量为综合评价指标,采用正交试验法,对蜂蜜用量、闷润时间、烘制温度及烘制时间4个因素进行考察,优化其恒温干燥条件下的蜜炙工艺,为炙杠板归的炮制与饮片的质量控制提供科学依据与参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010AHT 高效液相色谱仪、LC Solution 色谱工作站、恒温柱箱、自动进样器、紫外检测器(日本岛津公司);R200D 十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

杠板归饮片(亳州市滕王药业有限责任公司,批号:2014-0816,经山东中医药高等专科学校中药鉴定教研室张钦德教授鉴定为蓼科植物杠板归的干燥地上部分);槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100081-200907,纯度: >98%);蜂蜜(北京百花蜂业科技发展股份公司,批号:20140603,食用级);甲醇为色谱纯;磷酸、乙醇为分析纯;水为双蒸水并经 0.45 μm 水系滤膜过滤。

2 方法与结果

2.1 炼蜜的制备

取蜂蜜适量,先用中火加热至微沸,再用文火加热,使温度达 116~118 $^{\circ}\text{C}$,至满锅起鱼眼泡、手捻有黏性、两指间尚无长白丝出现,即可^[9]。

2.2 蜜炙杠板归的制备

取炼蜜适量,加入至净杠板归饮片中拌匀,闷润适当时间,单层平铺于不锈钢托盘上,置于恒温干燥箱中适当温度下烘至一定时间,取出,放凉,即得。

2.3 槲皮素含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$;流动相为甲醇-0.4%磷酸(50:50),流速为 1.0 ml/min;检测波长为 360 nm;进样量为 10 μl ;理论板数按槲皮素峰计应不低于 4 000。在上述色谱条件下,取“2.3.2”“2.3.3”项下对照品溶液、供试品溶液和空白溶液进样分析,结果表明槲皮素与其他组分分离良好,详见图1。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品(120 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 4 h)适量,用甲醇溶解并定容至 5 ml 量瓶中。精密吸取上述溶液 1.25 ml 用甲醇定容至 100 ml 量瓶中,得 12.506 mg/L 的对

照品溶液。

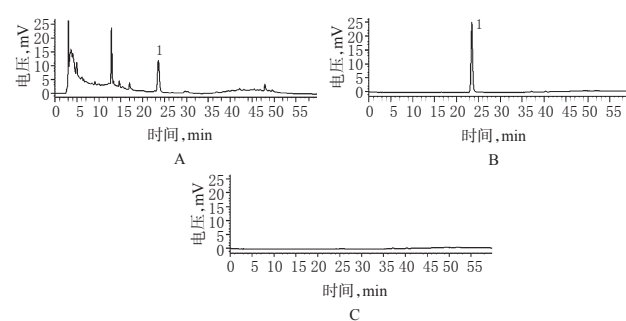


图1 高效液相色谱图

A. 供试品溶液; B. 对照品溶液; C. 空白溶液

Fig 1 HPLC chromatograms

A. test samples solution; B. control solution; C. blank solution

2.3.3 供试品溶液和空白溶液的制备 取1号正交试验样品,粉碎,过三号筛;取约 1.0 g,精密称定,置于 250 ml 烧瓶中,精密加入 70%乙醇 80 ml,称质量;置于 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热回流 3 h,放冷,再称质量,用 70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过;减压回收溶剂,浸膏用甲醇定容至 25 ml 量瓶中,超声 10 min 溶解,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,取续滤液,即得。除不加入样品外,其余操作同上制备空白溶液。

2.3.4 线性关系及定量限考察 分别精密量取对照品溶液 0.5、1、2、3、4、5 ml 置于 5 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。进样测定,以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标,得槲皮素回归方程为 $y = 2.6 \times 10^6 x - 4.7 \times 10^3$ ($R^2 = 0.9999$)。结果表明,槲皮素检测质量浓度线性范围为 1.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$,定量限为 0.125 $\mu\text{g/ml}$ (信噪比为 10)。

2.3.5 精密度试验 精密量取槲皮素对照品溶液 10 μl ,分别连续进样 6 次,进行测定。结果显示,槲皮素峰面积的 RSD 为 0.15% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 精密量取 1 号正交试验供试品溶液 10 μl ,分别于 0、2、4、6、12、24 h 进样分析。结果显示,供试品溶液中槲皮素峰面积的 RSD 为 0.27% ($n=6$),表明样品至少在 24 h 内基本稳定。

2.3.7 重复性试验 取同一条杠板归饮片粉末(1号正交试验样品)6份,每份 1.0 g,精密称定,测定并计算槲皮素含量,结果 RSD 为 0.24% ($n=6$),表明方法重复性好。

2.3.8 回收率试验 取已知含量的同一条杠板归饮片粉末(1号正交试验样品)6份,每份 0.5 g,精密称定,各分别精密加入适量槲皮素对照品,混合均匀,依法提取,测定回收率。结果显示,槲皮素平均回收率为 100.43% (RSD=1.34%, $n=6$),表明该方法准确度好。

2.4 水溶性浸出物含量测定

按照 2015 年版《中国药典》(四部)水溶性浸出物测定法(热浸法)^[10]测定。称取炙杠板归粉末约 4 g,加水 80 ml 进行试验。

2.5 综合评分标准

以综合加权评分法对蜜炙杠板归饮片质量进行评价,有效成分槲皮素含量、水溶性浸出物含量的加权系数分别设为 0.7、0.3,槲皮素含量得分=槲皮素含量 $\times$ 70/9 个样品中槲皮素最高含量;水溶性浸出物含量得分=水溶性浸出物含量 $\times$ 30/9 个样品中水溶性浸出物最高含量;综合评分=槲皮素含量得分+水溶性浸出物含量得分。

2.6 正交设计优化杠板归蜜炙工艺

在预试验基础上,以炼蜜用量(与药材的质量百分比,A)、闷润时间(B)、烘制温度(C)、烘制时间(D)为考察因素,称取净选后的杠板归饮片9份,每份100 g,按 $L_9(3^4)$ 正交试验设计加入相应量炼蜜,拌匀,置于密闭容器中闷润不同时间后,单层平铺于不锈钢托盘上,转移至烘箱中,分别在规定的烘制温度下烘制一定时间,取出,晾凉。测定槲皮素及水溶性浸出物含量并计算综合评分。每次试验平行做3次($n=3$)。因素与水平见表1;正交试验设计与结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

水平	因素			
	A(蜂蜜用量),%	B(闷润时间),min	C(烘制温度),℃	D(烘制时间),min
1	20	60	50	30
2	30	90	60	40
3	40	120	70	50

表2 正交试验设计与结果

序号	因素				指标		
	A	B	C	D	槲皮素含量, %	水溶性浸出物含量, %	综合评分
1	1	1	1	1	0.030 5	19.01	46.36
2	1	2	2	2	0.041 8	38.22	73.09
3	1	3	3	3	0.067 9	20.15	85.82
4	2	1	2	3	0.058 7	27.19	81.86
5	2	2	3	1	0.050 7	26.15	72.79
6	2	3	1	2	0.046 1	24.90	67.07
7	3	1	3	2	0.048 3	29.01	72.56
8	3	2	1	3	0.026 6	33.06	53.37
9	3	3	2	1	0.036 9	26.13	58.55
k_1	68.423	66.927	55.600	59.233			
k_2	73.907	66.417	71.167	70.907			
k_3	61.493	70.480	77.057	73.683			
R	12.414	4.063	21.457	14.450			

表3 方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	均方差	F	P
A	232.183	2	116.091 5	7.898	>0.05
B	29.397	2	14.698 5	1.000	
C	737.402	2	368.701 0	25.084	<0.05
D	352.779	2	176.389 5	12.001	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$
Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$
由极差R可知,4个因素对综合评分影响顺序为C>D>A>B;因素A: $k_2>k_1>k_3$,因素B: $k_3>k_1>k_2$,因素C: $k_3>k_2>k_1$,因素D: $k_3>k_2>k_1$,可得杠板归最优蜜炙工艺为A₂B₃C₃D₃。

由方差分析可知,以因素B为误差项进行方差分析,结果显示因素C(烘制温度)对试验结果有显著性影响,因素A和因素D无显著性影响。

综合直观分析和方差分析结果确定,恒温干燥条件下蜜炙杠板归的最优工艺为A₂B₃C₃D₃,即加炼蜜30%,再加入净杠板归饮片,拌匀、闷润120 min,置于70℃温度下恒温烘制50 min,取出,晾凉,即得。

2.7 验证试验

取净杠板归3份,每份100 g,按优化的蜜炙工艺进行验证试验,分别测定槲皮素和水溶性浸出物含量。结果制备的3批炙杠板归槲皮素含量均大于0.05%,水溶性浸出物含量均大于25%,RSD均小于2.5%,表明本试验确定的恒温干燥条件下蜜炙杠板归的工艺科学、稳定、合理、可行,结果见表4。

3 讨论

表4 验证试验结果
Tab 4 Results of verification test

样品号	槲皮素含量, %	水溶性浸出物含量, %
1	0.052 3	29.25
2	0.050 7	28.74
3	0.053 8	30.26
RSD, %	2.4	2.10

传统蜜炙工艺多为炼蜜拌炒法,但炒制温度较难控制,温度过高则易造成饮片出现焦糊现象,温度过低则易导致饮片含水量过高、容易发霉、不便贮藏。本试验采用恒温干燥条件下的蜜炙工艺,相比传统法优点主要有三点:一是受热均匀,制得的饮片颜色鲜艳,有光泽,较酥脆,无焦糊现象;二是由于烘制时间较长,既能使饮片充分吸收辅料炼蜜,确保药物与炼蜜疗效协同增强,同时也能促使水分蒸发,使炮制饮片含水量适宜,易于贮藏保管;三是操作简便,温度易于控制,而且卫生清洁,降低了环境污染,可用于大批量杠板归饮片的蜜炙加工操作,并能保证成品质量。

槲皮素是一种黄酮类化合物,具有抗炎、抗过敏、抗氧化、抗病毒等多方面生物活性。最新研究发现槲皮素可抑制人肺腺癌NCI-H1395细胞增殖^[11],是杠板归的主要有效成分。《中国药典》中对杠板归的质量控制亦采用槲皮素为指标成分。本试验采用综合评分法,综合了杠板归的有效成分槲皮素含量和水溶性浸出物含量两个指标,可以比较客观、综合地反映各个因素对炙杠板归饮片质量的影响。

本试验通过正交设计,考察了蜂蜜用量、闷润时间、烘制温度及烘制时间等因素对蜜炙杠板归效果的影响,优化了恒温干燥条件下杠板归的蜜炙工艺,为规范杠板归饮片的蜜炙操作与成品质量控制提供了一定的参考依据,同时对于该中药饮片生产企业的批量生产加工亦具有较高的借鉴价值。

参考文献

[1] 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,2015:166.
[2] 马青云,黄圣卓,李红芳,等.杠板归中化学成分生防活性研究[J].湖北农业科学,2013,52(21):5 245.
[3] 成焕波,刘新桥,陈科力.杠板归乙酸乙酯部位化学成分研究[J].中药材,2012,35(7):1 088.
[4] 邢煜君,王海燕,王俊霞,等.杠板归抗氧化作用及抑制α-葡萄糖苷酶活性[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):189.
[5] 张可锋,杜正彩,高雅,等.杠板归抗二甲亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的作用及其机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16):242.
[6] 张长城,黄鹤飞,周志勇,等.杠板归提取物抗单纯疱疹病毒-I型的药理作用研究[J].时珍国医国药,2010,21(11):2 835.
[7] 项秀荷.自拟杠百方治疗百日咳221例[J].湖北中医杂志,2000,22(1):36.
[8] 罗荣泉.加味苇茎汤治疗咳嗽变异型哮喘52例[J].新中医,2007,39(8):70.
[9] 刘波.中药炮制技术[M].北京:人民卫生出版社,2014:176.
[10] 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.
[11] 李林,王迪进,万轲,等.槲皮素对人肺腺癌NCI-H1395细胞凋亡的影响[J].中国药房,2015,26(34):4 786.

(收稿日期:2016-02-23 修回日期:2016-04-14)
(编辑:刘 萍)