

金樱子蜜炙工艺优选及其质量控制

金晨¹, 翟兴英^{1,2}, 黄媛媛¹, 刘文琴¹, 张凌^{1*}

(1. 江西中医药大学药学院, 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:** 优选金樱子蜜炙工艺, 建立蜜炙金樱子乙酸乙酯部位的指纹图谱, 为该药材的炮制工艺标准化和质量控制提供参考。**方法:** 以总多糖、总黄酮和浸出物含量的综合评分为指标, 采用 $U_7(7^6)$ 均匀设计考察加蜜量、炒制温度、炒制时间和稀释用水量对金樱子蜜炙工艺的影响。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004B 版软件进行指纹图谱分析, 流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~20 min, 5%~9% A; 20~30 min, 9%~15% A; 30~35 min, 15%~17% A; 35~60 min, 17%~27% A; 60~75 min, 27%~30% A; 75~90 min, 30%~40% A), 检测波长 360 nm。**结果:** 最佳蜜炙工艺为加药材量 20% 炼蜜, 用水稀释炼蜜使稀释用水/炼蜜量 0.4, 炒制温度 180 °C, 炒制时间 6 min。10 批次蜜炙金樱子乙酸乙酯部位指纹图谱共标定出 7 个共有峰, 各批次样品的指纹图谱相似度均 > 0.80。**结论:** 采用多指标综合加权评分法优选的金樱子蜜炙工艺稳定可行, 建立的指纹图谱研究方法简单、准确、重复性好, 可用于蜜炙金樱子的质量控制。

[关键词] 金樱子; 综合评分法; 蜜炙工艺; 指纹图谱; 芦丁; 相似度

[中图分类号] R283.1; R283.3; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0011-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015040011

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141229.1036.008.html>

[网络出版时间] 2014-12-29 10:36

Optimization of Honey Processing Technology and Quality Control of Rosae Laevigatae Fructus

JIN Chen¹, ZHAI Xing-ying^{1,2}, HUANG Yuan-yuan¹, LIU Wen-qin¹, ZHANG Ling^{1*} (1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize honey processing technology of Rosae Laevigatae Fructus and establish fingerprint of ethyl acetate extract of this processed product. **Method:** Taking composite score of contents of total polysaccharides, total flavonoids and extract as index, $U_7(7^6)$ uniform design was adopted to investigate influences of the content of honey, the amount of dilution water, stir-frying temperature and time on honey processing technology of Rosae Laevigatae Fructus. Fingerprint analysis was employed by 2004B version of 'Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System of Traditional Chinese Medicine' with mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid solution (B) for gradient elution (0-20 min, 5%-9% A; 20-30 min, 9%-15% A; 30-35 min, 15%-17% A; 35-60 min, 17%-27% A; 60-75 min, 27%-30% A; 75-90 min, 30%-40% A) and detection wavelength at 360 nm. **Result:** Optimum honey processing technology was as following: added 20% honey by comparing with the content of Rosae Laevigatae Fructus, diluted honey by water to 0.4 (water compared with honey), heating in 180 °C and frying for 6 min. Fingerprints of ten batches of Rosae Laevigatae Fructus had seven common peaks, similarities among ten batches of samples were all > 0.8. **Conclusion:** This optimized honey processing technology is reasonable, liable and stable. Fingerprint analysis method is simple and accurate with good reproducibility, it can be used in quality control of Rosae Laevigatae Fructus processed by honey.

[收稿日期] 20140606(011)

[基金项目] 江西省卫生计生厅中医药科研计划项目(2011A006);江西省科技计划指导项目(2009ZDS13100)

[第一作者] 金晨, 硕士, 助教, 从事中药资源开发与利用研究, Tel:0791-87119027, E-mail: last59@sina.com

[通讯作者] *张凌, 教授, 从事药物成分分析研究, Tel:0791-87118731, E-mail: dw64810@163.com

[**Key words**] *Rosae Laevigatae Fructus*; comprehensive evaluation method; honey processing technology; fingerprint; rutin; similarity

金樱子功能固精缩尿、固崩止带、涩肠止泻,用于治疗遗精滑精、遗尿尿频、崩漏带下、久泻久痢^[1],主要活性成分为多糖、黄酮类、三萜类及其衍生物等^[2],具有降血糖^[3]、抗菌^[4]、抗炎^[5-6]、抗氧化^[7-8]、抗肿瘤等药理作用。根据临床用药目的不同,金樱子的炮制方法主要有炒制和蒸制,其中炒制又分清炒、蜜炒等,蒸制分盐蒸、酒蒸等,但2010年版《中国药典》金樱子炮制项下并未收载相关炮制方法。1988年版《全国中药炮制规范》中金樱子炮制方法为取炼蜜,用适量开水稀释后,加入金樱子拌匀,闷透,置锅内,用文火加热,炒至表面红棕色、不粘手为度,取出放凉;每金樱子100 kg用炼蜜20 kg。但各地方炮制规范中对金樱子的炮制方法并不一致。本实验拟制定金樱子蜜炙工艺参数,通过指纹图谱法控制蜜炙金樱子的质量,为该药材的开发利用提供参考。

1 材料

UNICO-2000型紫外-可见分光光度计(尤尼康检测仪器有限公司),1200系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),BS214-D型1/1万电子天平(德国赛多利斯公司),FW100型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),TN408LC型红外测温枪(上海仪迷杰光电技术有限公司),CFP-110X50型报喜龙电炒锅(报喜龙电器厂),GZX-9146MBE型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司)。金樱子购自江西中医药大学饮片厂,经本校刘勇副教授鉴定为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* 的干燥成熟果实,取新鲜金樱子,筛去刺,纵切成两瓣,除去毛、核,备用;样品采集地分别为江西中医药大学后山、江西九江、江苏、广东清远、广东佛山、广东汕头、湖南长沙、安徽亳州、安徽合肥及浙江杭州,依次编号为

S1,S2,S3,S4,S5,S6,S7,S8,S9,S10。*D*-葡萄糖、芦丁对照品和金樱子对照药材(R)(中国食品药品检定研究院,批号分别为0833-9501,100080-200306,121047-201003),百花蜜(上海冰雪食品有限公司),乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 指标性成分的测定

2.1.1 总多糖 精密称取金樱子样品约0.5 g,参照2010年版《中国药典》金樱子项下多糖类成分含量测定的方法测定,最终值应剔除空白的影响。

2.1.2 总黄酮 精密称取120℃干燥至恒重的芦丁对照品10 mg,加80%乙醇溶解并定容至25 mL量瓶中,摇匀,得储备液。精密吸取储备液0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mL,分别置于10 mL量瓶中,加5%亚硝酸钠0.3 mL,放置6 min,加10%硝酸铝0.3 mL,放置6 min,加4%氢氧化钠4 mL,加80%乙醇至刻度,摇匀,放置15 min.于510 nm处测定吸光度(A),以A为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 0.02C - 0.082 (r = 0.9995)$,线性范围0~48 mg·L⁻¹。

2.1.3 浸出物 取样品0.3 g,按照《中国药典》2010年版附录XA水溶性浸出物(热浸法)测定。

2.2 炮制工艺优选^[9] 以总多糖、总黄酮和水溶性浸出物含量为综合评价指标,三者的权重系数分别为0.8,0.15,0.05。选择炼蜜用量、稀释用水/炼蜜量、炒制温度及炒制时间为考察因素,文火温度120~150℃,武火温度150~180℃。取大小、色泽均匀的金樱子6份,每份500 g,按照U₇(7⁶)均匀设计表进行试验,出锅后放凉,筛去灰屑,每组试验平行3次;另每组取对应量的蜜不加药材按对应工艺炒制作为空白组。试验安排见表1,方差分析见表2。

表1 金樱子蜜炙工艺均匀试验分析

Table 1 Uniform design of honey processing technology of *Rosae Laevigatae Fructus*

| No. | X ₁ 加蜜量 /% | X ₂ 炒制温度 /℃ | X ₃ 炒制时间 /min | X ₄ 稀释用水- 炼蜜量 | 总多糖 /% | 总黄酮 /% | 水溶性浸出物 /% | 综合评分 |
|-----|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|-----------|--------------|-------|
| 1 | 15.0 | 100 | 8 | 0.90 | 18.23 | 0.99 | 28.76 | 0.522 |
| 2 | 17.5 | 140 | 14 | 0.80 | 24.74 | 1.21 | 33.14 | 0.686 |
| 3 | 20.0 | 180 | 6 | 0.70 | 36.01 | 0.93 | 41.57 | 0.890 |
| 4 | 22.5 | 80 | 12 | 0.60 | 27.96 | 0.59 | 38.10 | 0.680 |
| 5 | 25.0 | 120 | 4 | 0.50 | 29.08 | 0.86 | 40.01 | 0.738 |
| 6 | 27.5 | 160 | 10 | 0.40 | 39.40 | 0.32 | 49.26 | 0.889 |

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of comprehensive score

| 模型 | SS | f | MS | F | P |
|------|-------|---|-------|--------|-------|
| 1 回归 | 0.091 | 3 | 0.030 | 7.762 | 0.116 |
| 残差 | 0.008 | 2 | 0.004 | | |
| 总计 | 0.099 | 5 | | | |
| 2 回归 | 0.099 | 5 | 0.045 | 16.911 | 0.023 |
| 残差 | 0.091 | 2 | 0.003 | | |
| 总计 | 0.008 | 3 | | | |

由方差分析可知,方程模型 1 无统计学意义,而方程模型 2 具有统计意义,说明方程模型 2 可信,得方程综合评分 (Y) = 0.660 + 0.003 X_2 - 0.405 X_4 。确定金樱子最佳蜜炙工艺为取净制的金樱子肉,加药材量 20% 炼蜜,用水稀释炼蜜使稀释用水/炼蜜量为 0.4 后浸润,待吸尽,投入锅内于 180 ℃ 加热待起烟,加入金樱子炒 6 min,炒至外表红棕色,出锅筛去灰屑,放凉,即得。

2.3 验证试验 取大小均匀、色泽均一的金樱子饮片 500 g,按 2.2 项下优选的工艺制备 3 批样品,结果总多糖、总黄酮、水溶性浸出物质量分数分别为 36.02%, 0.98%, 41.57%, RSD 依次为 0.08%, 2.70%, 0.08%。消除空白影响后求出综合评价值 0.895, RSD 0.40%,说明优选的工艺条件合理、可靠、稳定可行。

2.4 指纹图谱分析^[10-11]

2.4.1 供试品溶液的制备 精密称取金樱子饮片粉末(过三号筛)1.0 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 50 mL 超声提取 30 min,过滤,残渣加甲醇重复提取 2 次,合并滤液,将甲醇挥干后加水 30 mL 使溶解,转移至分液漏斗中,加乙酸乙酯 50 mL 萃取,共萃取 3 次,合并乙酸乙酯液,将乙酸乙酯挥干,加甲醇定容于 10 mL 量瓶中,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4.2 色谱条件 Diamonsil(迪马)C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 5% ~ 9% A; 20 ~ 30 min, 9% ~ 15% A; 30 ~ 35 min, 15% ~ 17% A; 35 ~ 60 min, 17% ~ 27% A; 60 ~ 75 min, 27% ~ 30% A; 75 ~ 90 min, 30% ~ 40% A),检测波长 360 nm,柱温 25 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。按此条件测定金樱子样品,标定主要共有峰 7 个,其中 6 号峰为芦丁,见图 1。

2.4.3 方法学考察 取金樱子样品,按 2.4.1 项下

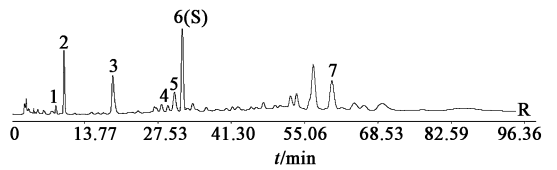
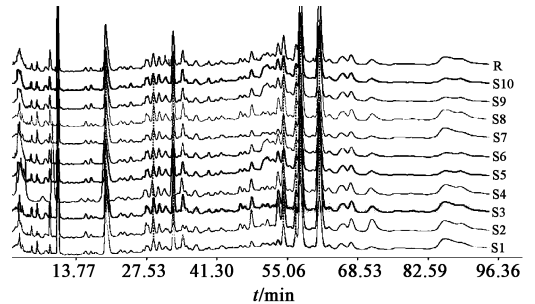


图 1 金樱子 HPLC 指纹谱共有峰

Fig. 1 Common peaks of Rosae Laevigatae Fructus fingerprint

方法制备供试品溶液,按 2.4.2 项下色谱条件测定,结果主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2%,表明精密度、重复性、稳定性良好。

2.4.4 样品测定 分别取自制蜜炙金樱子 10 批,按 2.4.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.2 项下色谱条件测定,见图 2。运用《中药指纹图谱相似度计算软件》2004B 版,将数据导入,经过多点校正及色谱峰匹配,得 10 批不同产地金樱子的相似度评价,结果见表 3。



R. 对照药材; S1 ~ S10. 样品

图 2 蜜炙金樱子 HPLC 指纹谱

Fig. 2 Fingerprint of Rosae Laevigatae Fructus processed by honey

3 讨论

选择芦丁为指标成分测定金樱子中总黄酮含量,加入铝离子试剂,同时控制适宜 pH,使黄酮类化合物与铝盐形成络合物,在可见区能获得稳定的特征吸收峰,芦丁为 UV 测定总黄酮含量时最常用的对照品,且该成分在金樱子中存在,建立的测定方法稳定可靠。金樱子在中医临床使用中多以炮制饮片入药,炮制方法主要有蜜炙、盐制和炒制等。文献报道金樱子经炮制后饮片中有有效物质含量以蜜炙为优^[12],故本文选择蜜炙金樱子为研究对象,探索合理、稳定的金樱子蜜炙工艺。

金樱子中主要药效物质——总多糖具有抗氧化、免疫抑制、调节血脂、肝损伤保护等作用,金樱子中重要药效物质——黄酮类物质具有抗氧化、抑制血小板聚集、抗心脑血管疾病等作用,水溶性浸出物含量是饮片评价的重要指标,本文采用均匀设计,以总多糖、总黄酮及水溶性浸出物含量为指标综合评

表3 蜜炙金樱子相似度评价

Table 3 Similarity evaluation of *Rosae Laevigatae Fructus* processed by honey

| 样品 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | 对照 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1 | 1 | 0.952 | 0.960 | 0.885 | 0.810 | 0.978 | 0.958 | 0.940 | 0.960 | 0.978 | 0.974 |
| S2 | 0.952 | 1 | 0.953 | 0.809 | 0.896 | 0.948 | 0.916 | 0.952 | 0.953 | 0.948 | 0.953 |
| S3 | 0.960 | 0.953 | 1 | 0.882 | 0.897 | 0.971 | 0.947 | 0.960 | 0.990 | 0.971 | 0.995 |
| S4 | 0.885 | 0.809 | 0.882 | 1 | 0.813 | 0.812 | 0.883 | 0.885 | 0.862 | 0.812 | 0.853 |
| S5 | 0.810 | 0.896 | 0.897 | 0.813 | 1 | 0.864 | 0.836 | 0.810 | 0.897 | 0.864 | 0.894 |
| S6 | 0.978 | 0.948 | 0.971 | 0.812 | 0.864 | 1 | 0.963 | 0.978 | 0.971 | 1 | 0.982 |
| S7 | 0.958 | 0.916 | 0.947 | 0.883 | 0.836 | 0.963 | 1 | 0.958 | 0.947 | 0.963 | 0.959 |
| S8 | 0.940 | 0.952 | 0.960 | 0.885 | 0.810 | 0.978 | 0.958 | 1 | 0.960 | 0.978 | 0.974 |
| S9 | 0.960 | 0.953 | 0.990 | 0.862 | 0.897 | 0.971 | 0.947 | 0.960 | 1 | 0.971 | 0.995 |
| S10 | 0.978 | 0.948 | 0.971 | 0.812 | 0.864 | 1 | 0.963 | 0.978 | 0.971 | 1 | 0.982 |
| 对照 | 0.974 | 0.953 | 0.995 | 0.853 | 0.894 | 0.982 | 0.959 | 0.974 | 0.995 | 0.982 | 1 |

价金樱子蜜炙工艺,根据各指标的重要性及含量分别赋予对应加权系数,优选的炮制工艺稳定可行。对蜜炙金樱子乙酸乙酯部位的指纹图谱进行研究,标定了7个共有峰,并对10批次的蜜炙金樱子样品进行分析,相似度良好,除2批样品外,均>0.95,建立的HPLC快速、准确、高效,适用于蜜炙金樱子的质量控制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:206.
 [2] 肖凯军,刘晓红. 金樱子果实的化学成分及其应用[J]. 现代食品与药品杂志,2006,16(4):1-3.
 [3] 齐海燕,董媛媛,邓翀. 7种酸味中药对STZ致小鼠糖尿病的作用[J]. 陕西中医学院学报,2014,37(2):60-62,84.
 [4] 赵鑫荟,艾启俊. 18种中草药对大肠杆菌抑菌效果的研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(2):599-600.
 [5] 罗俊华,姜辉,吴娜. 金樱子对阿霉素肾病大鼠尿蛋

白排泄的影响[J]. 当代医学,2013,19(10):27-28.
 [6] 罗俊华,姜辉,李娟,等. 金樱子对阿霉素肾病大鼠肾组织TXB₂和6K-PGF1 α 表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2013,22(7):703-704.
 [7] 罗卫民,刘越峰,罗湘玉,等. 金樱子对阿霉素心肌损伤大鼠的抗氧化和抗凋亡保护作用[J]. 中国医药导报,2014,11(7):15-18.
 [8] 周钰娟,罗玉平,许金华,等. 金樱子提取液体外抗氧化作用研究[J]. 现代生物医学进展,2012,12(36):7057-7060,7119.
 [9] 姜雷,郭玉岩,吕少娃,等. 多指标综合评分法优选青防痛瘀散提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):26-28.
 [10] 徐锋,杨焯,舒秋娥,等. 大血藤的HPLC指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):145-149.
 [11] 刘硕,马方励,李养学,等. 巴戟天及不同盐分炮制品中糖类成分HPLC-ELSD指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):106-110.
 [12] 南云生,任雷. 金樱子炮制研究[J]. 中药材,1993,16(11):18-21.

[责任编辑 刘德文]