

· 饮片工艺与质量研究专题 ·

编者按:中药饮片炮制工艺及质量评价一直是中药炮制学科研究的重点内容。如何在传承的基础上,科学合理地创新,也是炮制工作者不懈追求的目标。尊重传统经验,传承不泥古,使炮制工艺现代化;尊重饮片传统评价方法,评价标准古今结合,使传统中渗透现代指标。既保护了我国知识产权,又能促进中医药被世人接受。这是中药炮制学科发展创新的目的。

本课题组长长期致力于中药饮片炮制工艺及质量评价研究,完成了国家自然科学基金委员会、国家科技部、国家中医药管理局及省市课题 20 余项,发表论文 100 余篇。在炮制工艺研究中,选择合理的关键因素、客观的评价指标,以规范炮制工艺;在评价饮片质量时,注重传统与现代结合,探索生熟饮片专属性评价,力求质量评价指标客观准确。同时,炮制辅料是影响饮片质量的重要因素,其质量标准目前还不够完善,也是本课题组研究内容之一。课题组所研究内容均为行业关注度高的问题,随着研究的不断深入,希望课题组能在饮片专属性评价和辅料质量标准上有所突破,为饮片行业发展尽绵薄之力。

星点设计-效应面法优选蜜糠炙黄芪的炮制工艺

张金莲^{1,2}, 谢日健^{2,3}, 刘艳菊^{1*}, 刘明贵², 龚千锋², 罗文华^{4*}, 范晖²

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004;

3. 江西青峰医药集团有限公司, 江西 赣州 341000; 4. 江中药业股份有限公司, 南昌 330004)

[摘要] 目的:优选蜜糠炙黄芪的炮制工艺,为该饮片的应用与推广提供参考。方法:以黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、总黄酮及水溶性浸出物含量的总评“归一值”(OD)为评价指标,采用星点设计考察炼蜜用量、炒制时间、炒制温度对蜜糠炙黄芪炮制工艺的影响,对结果进行多元线性回归和二项式拟合,利用效应面法选择较佳炮制工艺条件并进行预测分析。结果:蜜糠炙黄芪最佳炮制工艺为黄芪样品 40 g 加炼蜜 9.6 g,炒制时间 4 min,炒制温度 210 ℃。黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、总黄酮质量分数及水溶性浸出物分别为 0.058%、0.035%、3.28%、48.2%,OD 预测值与真实值的偏差 1.7%。结论:星点设计-效应面法优选的蜜糠炙黄芪炮制工艺简便可行、预测性良好。

[关键词] 蜜糠; 黄芪; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 炮制工艺; 总黄酮; 水溶性浸出物

[中图分类号] R283.3;R943.1;R284.1;R283.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0014-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190014

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1040.008.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 10:40

Optimization of Processing Technology of Astragali Radix with Honey Bran by Central Composite Design-response Surface Methodology

ZHANG Jin-lian^{1,2}, XIE Ri-jian^{2,3}, LIU Yan-ju^{1*}, LIU Ming-gui²,
GONG Qian-feng², LUO Wen-hua^{4*}, FAN Hui²

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

3. Jiangxi Qingfeng Pharmaceutical Group, Ganzhou 341000, China;

4. Jiangzhong Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of Astragali Radix with honey bran. **Method:**

[收稿日期] 20160229(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560651);江西中医药大学樟帮、建昌帮炮制技术传承研究专项(2012ZX3003)

[第一作者] 张金莲, 硕士, 教授, 从事中药学、中药炮制学教学研究, Tel:0791-87118995, E-mail: jxjzjl@163.com

[通讯作者] * 刘艳菊, 博士, 教授, 从事中药炮制学研究, Tel:027-68890231, E-mail: lyj1965954@sohu.com;

* 罗文华, 副主任中医师, 从事中药制造及质量研究, Tel:0791-83797091, E-mail: 173059288@qq.com

Taking overall desirability of contents of astragaloside IV, calycosin glucoside, total flavonoids and water soluble extract as index, the amount of refine honey, frying time and temperature as factors, central composite design-response surface methodology was adopted to optimize processing technology. **Result:** Optimum processing technology was as following: refine honey amount of 9.6 g for 40 g of Astragali Radix, frying time of 4 min, frying temperature of 210 °C. Under these conditions, contents of astragaloside IV, calycosin glucoside, total flavonoids and water soluble extract were 0.058%, 0.035%, 3.28% and 48.2%, respectively. **Conclusion:** This optimized processing technology of Astragali Radix is simple and feasible with good predictability.

[**Key words**] honey bran; Astragali Radix; astragaloside IV; calycosin glucoside; processing technology; total flavonoids; water soluble extract

黄芪功效补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌等^[1], 含有多种活性化学成分, 如多糖类、三萜皂苷类、黄酮类等^[2-6], 具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗病毒、多脏器保护等药理作用^[7-9]。传统中医理论认为, 与黄芪生品相比, 蜜炙后补益作用明显增强。而建昌帮蜜炙黄芪炮制工艺独具特色, 饮片不仅色泽鲜艳, 而且味正醇厚。但由于传统炮制方法多凭经验, 可控性差, 为提高炮制工艺的可控性, 本实验拟采用星点设计-效应面法对蜜炙黄芪炮制过程中的工艺参数进行考察, 为该饮片的质量控制提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), UV-8000S 型紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司), BT224S 型 1/10 万电子天平和 BS124 型 1/1 万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], YF-111 型高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司), GX-9076MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司), SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海雅荣生化仪器设备有限公司), ST20 型红外测温仪(美国雷泰公司)。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 批号 110717-201112), 黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110781-200613), 糠(江西省抚州市临川区孝桥镇农户), 黄芪(亳州蜀中药业有限公司, 经江西中医药大学中药资源学科组付小梅博士鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根), D101 型大孔吸附树脂(艾纳蕾贸易有限公司), 水为超纯水, 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

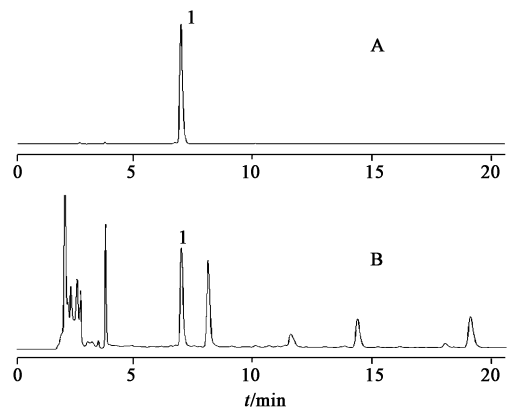
2.1 蜜炙黄芪的制备^[2] 取定量的炼蜜和白开水, 置容器内拌和溶化, 得蜜水溶液; 将干燥黄芪饮

片投入溶液中拌匀, 麻布遮盖闷润 1 d, 经常翻动, 使药汁透尽, 取出稍晾干。取定量的净干糠, 入热锅内用火边炒边淋入一定浓度的蜜水溶液, 至蜜糠不黏糊结团时将蜜糠向四周铺开, 投入蜜水润过的黄芪饮片, 先文火, 后微火, 不断翻动, 慢慢炒炙, 至内外转金黄色, 微黏手时出锅, 筛去糠及灰屑, 摊凉至干爽酥脆、不黏手时, 入陶器内密闭贮藏。辅料用量为每 100 kg 净药材, 用炼蜜 25 ~ 30 kg(润药, 用炼蜜 20 ~ 25 kg, 掺开水或温黄酒 4 ~ 5 kg; 炼糠, 用炼蜜 5 kg, 掺开水 1 kg)。每次入锅饮片与净干糠的质量比 2:1。

2.2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定

^[1,3]

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 260 nm, 进样量 20 μL, 流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 20% ~ 40% A; 20 ~ 30 min, 40% A)。理论板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷计算 > 3 000。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

图 1 蜜炙黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷 HPLC

Fig. 1 HPLC of calycosin glucoside in Astragali Radix processed with honey bran

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 1.83 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲

醇溶解并定容,摇匀,得储备液。精密吸取该储备液 1 mL,置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取本品粉末(过四号筛)约 1.0 g,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,加热回流 4 h,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 4,6,8,10,14,20 μL ,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 448\ 872 X - 20\ 315$ ($r = 0.999\ 7$),线性范围 0.146 4 ~ 0.732 μg 。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一蜜糠炙黄芪供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的 RSD 0.3%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一蜜糠炙黄芪供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,8,12,24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积的 RSD 0.4%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一本品粉末,共 6 份,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的 RSD 0.7%,表明该方法重复性良好。

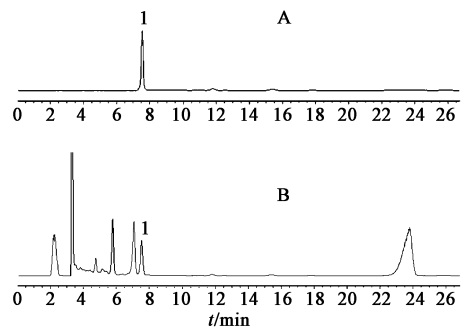
2.2.8 加样回收试验 精密称取蜜糠炙黄芪粉末共 6 份,各加入 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 1 mL,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果平均加样回收率 98.76%,RSD 1.6%。

2.3 黄芪甲苷的含量测定^[1,3]

2.3.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL ,流动相乙腈-水(32:68),蒸发光散射检测器,漂移管温度 60 $^{\circ}\text{C}$,载气压力 2.76×10^5 Pa,增益 500。理论板数按黄芪甲苷峰计算 $>4\ 000$ 。见图 2。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 2.15 mg,置于 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得。

2.3.3 样品溶液的制备 精密称取本品中粉约 4 g,置索氏提取器中,加甲醇 40 mL,冷浸过夜,加入适量甲醇,加热回流 4 h,提取液回收溶剂并浓缩至干,残渣加水 10 mL,微热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 40 mL,合并正丁醇液,用氨



A. 对照品;B. 供试品;1. 黄芪甲苷

图 2 蜜糠炙黄芪中黄芪甲苷 HPLC

Fig. 2 HPLC of astragaloside IV in Astragali Radix processed with honey bran

试液充分洗涤 2 次,每次 40 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,放冷,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,柱高 12 cm),加水 50 mL 洗脱,弃去水液,用 40% 乙醇 30 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 70% 乙醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 4,6,8,10,14,20 μL ,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 31\ 330 X - 19\ 581$ ($r = 0.999\ 8$),线性范围 1.72 ~ 8.60 μg 。

2.3.5 精密度试验 精密吸取蜜糠炙黄芪供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 6 次,结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 0.8%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,8,12,24 h 按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算黄芪甲苷峰面积的 RSD 1.3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 精密称取本品中粉适量,按 2.3.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 1.8%。

2.3.8 加样回收试验 精密称取本品中粉共 6 份,各精密加入 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芪甲苷对照品溶液 2 mL,按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算平均加样回收率 98.65%,RSD 1.3%。

2.4 水溶性浸出物的测定 参照 2015 年版《中国药典》(通则 0512)水溶性浸出物测定法测定。

2.5 总黄酮的含量测定^[4-5]

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称取于 120 $^{\circ}\text{C}$ 干

燥至恒重的无水芦丁 1.52 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇溶解并定容至刻度, 即得。

2.5.2 样品溶液的制备 精密称取蜜糠炙黄芪约 1.0 g, 加 70% 乙醇 20 mL 超声提取 2 次, 每次 30 min, 过滤, 摇匀。精密吸取 2 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5.3 检测波长的选择 分别吸取芦丁对照品溶液和蜜糠炙黄芪供试品溶液 2 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 分别精密加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 摇匀后静置 6 min; 精密加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL, 摇匀后静置 6 min; 精密加入 4% 氢氧化钠溶液 10.0 mL, 用 60% 乙醇定容至刻度, 摇匀后静置 15 min。以 60% 乙醇为空白试剂, 于 400 ~ 600 nm 扫描, 结果二者均在 510 nm 有最大吸收, 故确定检测波长 510 nm。

2.5.4 线性关系考察 精密吸取芦丁对照品溶液 2, 3, 4, 5, 6, 7 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 按 2.5.3 项下方法显色, 于 510 nm 处测定 A, 得回归方程 $Y = 16.313X - 0.003$ ($r = 0.9996$), 线性范围 2.423 ~ 8.512 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.5 精密度试验 取同一蜜糠炙黄芪供试品溶液, 在 510 nm 处连续测定 6 次 A, 结果 RSD 0.9%。

2.5.6 稳定性试验 取同一蜜糠炙黄芪供试品溶

液, 分别于 0, 15, 30, 60, 90, 120 min 测定 A, 结果 RSD 1.2%。表明供试品溶液在 120 min 内稳定性良好。

2.5.7 重复性试验 取同一样品溶液 6 份, 按 2.5.3 项下方法显色, 于 510 nm 处测定 A, 结果 RSD 1.6%。

2.5.8 加样回收试验 精密称取蜜糠炙黄芪样品共 6 份, 各加入无水芦丁 34.00 mg, 按 2.5.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.5.3 项下方法显色, 于 510 nm 处测定 A, 结果平均加样回收率 98.58%, RSD 1.5%。

2.6 蜜糠炙黄芪的制备工艺优选 选取炼蜜用量、炒制时间、炒制温度为自变量, 每个自变量设计 5 个水平, 以黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、总黄酮及水溶性浸出物含量的总评“归一值”(overall desirability, OD) 为因变量, 精密称取黄芪样品 40 g, 共 20 份, 按星点试验优选炮制工艺, 试验安排及结果见表 1。OD = $(d_1 d_2 \dots d_k)^{1/k}$ (k 为指标数), 3 个指标的数值均为越大越好, 故采用 Hassan 方法^[6]进行数学转换求 OD, $d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ 。采用 Design Expert 8.0 软件进行数据处理, 得拟合方程 $Y = -57.495 + 6.601A + 3.434B + 0.204C - 0.063AB - 3.303 \times 10^{-3} AC + 7.206 \times 10^{-3} BC - 0.304A^2 - 0.551B^2 - 4.951 \times 10^{-4} C^2$ ($r = 0.7894$,

表 1 蜜糠炙黄芪制备工艺星点试验分析

Table 1 Central composite test analysis for processing technology of Astragali Radix with honey bran

No.	A 炼蜜用量 /g	B 炒制时间 /min	C 炒制温度 /℃	黄芪甲苷 /%	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷/%	总黄酮 /%	水浸出物 /%	OD
1	8.4	3.4	192	0.0483	0.0265	2.95	48.4	0.38
2	9.6	3.4	192	0.0512	0.0310	4.67	46.9	0.66
3	8.4	4.5	192	0.0468	0.0254	2.19	47.4	0
4	9.6	4.5	192	0.0589	0.0367	2.73	46.5	0.59
5	8.4	3.4	227	0.0423	0.0238	2.63	45.9	0
6	9.6	3.4	227	0.0504	0.0307	3.15	48.1	0.54
7	8.4	4.5	227	0.0439	0.0278	2.88	48.2	0.29
8	9.6	4.5	227	0.0441	0.0265	3.83	48.6	0.35
9	8.0	4.0	210	0.0469	0.0258	2.77	47.9	0.31
10	10.0	4.0	210	0.0493	0.0266	2.61	49.3	0.35
11	9.0	3.0	210	0.0462	0.0234	2.69	47.7	0
12	9.0	6.0	210	0.0454	0.0256	3.08	49.5	0.32
13	9.0	4.0	240	0.0521	0.0321	2.76	44.9	0.41
14	9.0	4.0	180	0.0547	0.0332	3.54	42.6	0
15~20	9.0	4.0	210	0.0578	0.0359	3.23	47.9	0.73

注: 15~20 号为重复性试验。

$P=0.0181$),说明该方程拟合度较好,绘制各自变量的相应曲面,见图 3。

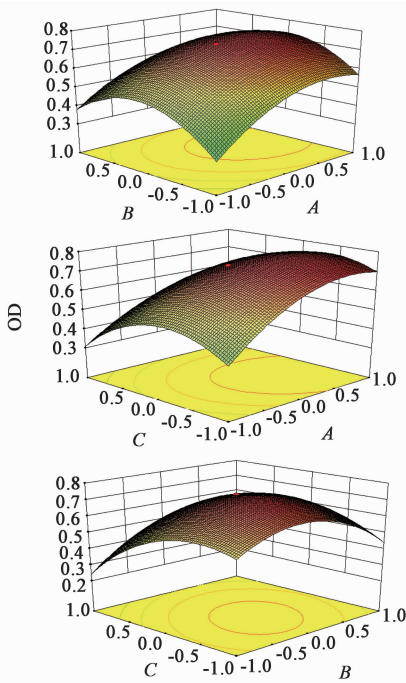


图 3 炼蜜用量、炒制时间、炒制温度对蜜糠炙黄芪炮制工艺影响的响应面

Fig. 3 Response surfaces of effect of the amount of refine honey, frying time and frying temperature on processing technology of Astragali Radix with honey bran

2.7 验证试验 由响应面试验可知,蜜糠炙黄芪的最佳工艺为炼蜜用量 9.6 g,炒制时间 4 min,炒制温度 210 ℃,OD 预测值 0.77。精密称取黄芪样品 100 g,共 3 份,按优选的工艺进行炮制,结果黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、总黄酮质量分数及水溶性浸出物分别为 0.058%,0.035%,3.28%,48.2%,OD 预测值与真实值的偏差 1.7%,说明优选的炮制工艺稳定可靠。

3 讨论

黄芪是常用的补气药,功效补气固表、利水消肿、托毒排脓、生肌等^[1],在中医临床辨证应用中是不可或缺的补气药。其中黄芪甲苷是黄芪活性成分——皂苷类成分中研究较为系统的,具有多种药理作用^[10]。汪德清等^[11]对黄芪总黄酮抗肝损伤作用进行了研究,结果表明黄芪总黄酮可预防扑热息

痛诱导的肝损伤。故本文选择黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、总黄酮作为指标成分,而水溶性浸出物含量则作为总成分评价的参考指标。蜜糠炙黄芪是建昌帮独特的一种炮制方法,在炮制过程中发现,蜜糠炙后的黄芪表面金黄色。不仅颜色鲜艳,而且气味芳香。一方面可能是蜜糠本身的特性,另一方面可能是炮制后的饮片能够及时密闭赋色。但要全面系统地阐述其炮制机制,还需要对其药理作用进行深入研究。

[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,2015:302-303.
- [2] 张金莲,曾昭君,潘旭兰,等. 蜜糠在建昌帮中药炮制中的应用[J]. 中草药,2013,44(21):3092-3094.
- [3] 胡瑞义,魏蓓蕾. 黄芪提取物对慢性非细菌性前列腺炎大鼠的作用及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(13):152-155.
- [4] 甘秀海,梁志远,赵超. 冷水花总黄酮的提取工艺优选及抗氧化活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(16):10-13.
- [5] 宋秋焯,陈梅,吴启南. 淡竹叶中总黄酮提取工艺研究[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(3):46-47.
- [6] Abu-lzzza K A, Carcia-Contreras L, Lu D R. Preparation and evaluation of sustained release AZT-loaded microspheres: optimization of the release characteristics using response surface methodology [J]. J Pharm Sci, 1996,85(2): 144-149.
- [7] 全欣. 黄芪主要活性成分的药理作用[J]. 时珍国医国药,2011,22(5):1246-1249.
- [8] 易炳学,余书琦,张金莲,等. 黄芪的研究概况[J]. 江西中医药大学学报,2014,26(2):98-100.
- [9] 张蕾,高文远,满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(21):3203-3207.
- [10] 陈燕瑞,曾以旺,王少平,等. 黄芪中免疫活性成分的不同提取方式比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):42-44.
- [11] 汪德清,田亚平,Neil T G,等. 黄芪总黄酮抗肝损伤作用初探[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(S1):149-151.

[责任编辑 刘德文]