

铁皮石斛超微粉碎破壁工艺的优化

李娟, 麻晓雪, 李顺祥*, 蔡光先, 张家曾

(湖南中医药大学中药现代化教育厅重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 优选铁皮石斛的超微粉碎工艺。方法: 以微粉粒度、细胞破壁率和总多糖含量为综合评价指标, 采用 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ 正交试验考察入磨量、粉碎时间、入磨粒度、粉碎温度和投料水分对铁皮石斛超微粉碎破壁工艺的影响。结果: 最佳超微粉碎工艺为入磨粒径80目, 投料水分4%~6%, 入磨量250g, 粉碎温度0~10℃, 粉碎时间25min; 平均得粉率96.1% (RSD 0.24%), 粒径<75 μm的平均得率96.8% (RSD 0.28%), 平均细胞破壁率98.3% (RSD 0.78%), 总多糖平均质量分数42.2% (RSD 2.85%)。结论: 该工艺合理可行、稳定性好, 为铁皮石斛的临床合理应用提供实验数据。

[关键词] 铁皮石斛; 超微粉碎工艺; 细胞破壁; 粒径分布; 正交试验; 综合加权法

[中图分类号] R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0030-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070030

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000007.html>

[网络出版时间] 2014-01-20 16:02

Optimization of Ultrafine Grinding Technology for Cell Wall Disruption of *Dendrobii Officinalis Caulis*

LI Juan, MA Xiao-xue, LI Shun-xiang*, CAI Guang-xian, ZHANG Jia-zeng

(Key Laboratory of Modernization of Chinese Medicine, Department of Education, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrafine grinding technology for cell wall disruption of *Dendrobii*

[收稿日期] 20130724(014)

[基金项目] 湖南省科技计划重大专项项目(2010FJ1010-3); 国家中医药管理局“药用植物学”重点学科课题(国中医药发[2009]30号); 湖南“中药学”重点学科(湘教通[2011]76号); 湖南省高校科技创新团队项目(湘教通[2010]212号)

[第一作者] 李娟, 在读硕士, 助理研究员, 从事中药物质基础与作用机制研究, Tel: 0731-85189068, E-mail: Forever_lijuan@163.com

[通讯作者] *李顺祥, 教授, 研究员, 从事中药有效成分与资源研究, Tel: 0731-88458229, E-mail: lishunxiang@hotmail.com

[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: 49.
- [2] 高越颖, 蒋秋龙, 冯磊, 等. 王不留行不同提取部位抑制新生血管作用的研究[J]. 海峡药学, 2010, 22(12): 34.
- [3] Feng L, Zhang X P, Hua H, et al. *Vaccaria segetalis* extract can inhibit angiogenesis[J]. Asian Biomed, 2012, 6(5): 683.
- [4] 高越颖. 王不留行抑制血管新生有效部位的提取分离及其活性评价[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [5] 李敏晶, 韩艳玲, 刘远, 等. 超声波提取法对海燕总皂

- 苷提取工艺的研究[J]. 广东化工, 2010, 37(8): 69.
- [6] 周媛, 严铭铭, 邵帅, 等. 黄花草木犀总皂苷提取纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 1.
- [7] 徐伟, 戴莉, 石海英. 超声波提取牛蒡类胡萝卜素工艺条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(7): 3962.
- [8] 任爱农, 卢爱玲, 田耀洲, 等. 层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 372.
- [9] Han E S, Wakabayashi M, Leong L. Angiogenesis inhibitors in the treatment of epithelial ovarian cancer[J]. Curr Treat Options Oncol, 2013, 14(1): 22.

[责任编辑 仝燕]

Officinalis Caulis. **Method:** With particle size, cell wall-broken rate and the content of total polysaccharides as comprehensive evaluation index, L_{16} ($4^3 \times 2^6$) orthogonal test was adopted to optimize ultrafine grinding process by taking grinding time, amount and particle size into mill, grinding temperature and moisture content of materials as factors. **Result:** Optimum grinding process was as follows: particle size into mill 80 mesh, moisture content of materials 4% -6%, materials amount into mill 250 g, grinding temperature 0-10 °C, grinding time 25 min; Average powder yield was 96.1% (RSD 0.24%), average yield of particle size < 75 μm was 96.8% (RSD 0.28%), average cell wall-broken rate was 98.3% (RSD 0.78%), average mass fraction of total polysaccharides was 42.2% (RSD 2.85%). **Conclusion:** This optimized process was reasonable and stable, which provided experimental data for clinical effective application of *Dendrobii Officinalis Caulis*.

[**Key words**] *Dendrobii Officinalis Caulis*; ultrafine grinding technology; cell wall disruption; particle size distribution; orthogonal test; comprehensive weighted method

铁皮石斛为石斛药材中上品,以味甘、质重、柔韧和黏性大者为佳,具有益胃生津、滋阴清热之功效,临床用于治疗热病津伤、胃阴不足、筋骨痿软等症^[1]。铁皮石斛富含多糖、氨基酸、微量元素等营养成分,现代药理研究表明其具有提高免疫、降血糖、抗衰老等作用^[2]。铁皮石斛的传统使用方法包括鲜品直接食用(如直接咀嚼、单味煎煮或与其他药材配伍,代饮茶)和烘干加工制成铁皮枫斗(与西洋参、三七、薏苡仁等药材配伍制成铁皮枫斗晶、铁皮石斛颗粒等成方制剂);前者为鲜品,具有营养成分保存完整、营养成分和药用功能不受影响且易于人体吸收等优点,但不易保存,容易长霉,而且由于所含纤维和黏液多,咀嚼时口感较差,煎煮或茶饮时营养成分不易煎出或溶出,影响了鲜品的使用;成方制剂虽改善了鲜品使用的不便,但铁皮枫斗因含有大量韧皮纤维,药材坚韧,在普通粉碎加工过程中会出现不易粉碎或粉碎不完全等问题,导致药材浪费。

超微粉碎能把原材料加工成微米甚至纳米级的微粉,药材经超微粉碎后不仅可完整保留营养成分、改善口感,而且可通过细胞破壁提高药材中有效成分的溶出,提高药材使用率,还可方便调剂并提高产品质量^[3]。本实验采用正交试验优选铁皮石斛超微粉的制备工艺,为铁皮石斛的合理应用提供实验依据。

1 材料

FFI-15 型柴日式粉碎机(湖南雪峰机械厂),BFM-T6BI 型振动研磨混炼机(济南贝利公司),WINNER3003 型干粉激光粒度仪及 WINNER99 型显微颗粒图像分析仪(济南微纳仪器有限公司),JSM-6360LV 型扫描电子显微镜(日本电子株式会社),UV-1800 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),T-214 型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。

铁皮石斛由湖南龙石山铁皮石斛基地有限公司提供,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为兰科植物铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 的干燥茎,无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110833-200904),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 粒径与粒度分布的测定^[4] 将进样料斗插入干粉进样器的进样口中,在进样槽中加满混匀的样品,单击操作键,采用激光粒度分析仪自动测量颗粒级配结果,打印并保存报告,测量范围 1.0 ~ 300 μm 。

2.2 细胞破壁率的检测^[5-6] 采用质量分析法和显微定量法,以铁皮石斛细粉为参照物,表皮细胞为显微特征计数指标,测定铁皮石斛的细胞破壁率。分别精密称取铁皮石斛细粉与超微粉,制片,于显微镜下观察,分别观察 25 个视野,根据二者完整的茎表皮细胞个数、混悬液体积、称样量,计算铁皮石斛细粉和微粉的显微特征个数,推算细胞破壁率。

$$\text{粉末显微特征个数} = (\text{每个盖玻片下得特征数} \times \text{药材混悬液总体积}) / (\text{盖玻片下混悬液体积} \times \text{药材称取量})$$

$$\text{细胞破壁率} = (\text{细粉显微特征个数} - \text{微粉显微特征个数}) / \text{细粉显微特征个数} \times 100\%$$

2.3 总多糖的含量测定 参照 2010 年版《中国药典》(一部)“铁皮石斛”项下多糖含量测定法^[1],采用苯酚-硫酸比色法,以无水葡萄糖为对照品,于 488 nm 处测定吸光度,计算总多糖含量。

2.4 超微粉制备工艺优选^[4,7-8] 采用 L_{16} ($4^3 \times 2^6$) 正交试验设计法,选取入磨量、粉碎时间、入磨粒度、粉碎温度和投料水分为考察因素,以微粉粒径、细胞破壁率及总多糖含量的综合评分为指标,权重系数依次为 0.4,0.4,0.2,因素水平见表 1,试验安排及

结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 铁皮石斛超微粉碎工艺正交试验因素水平

水平	A 入磨量 /g	B 粉碎时间 /min	C 入磨粒度 /目	D 粉碎温度 /℃	E 投料水分 /%
1	200	15	24	0~10	4~6
2	250	20	50	11~20	6~8
3	300	25	65		
4	350	30	80		

表 2 铁皮石斛超微粉碎工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	E	粒径	细胞破壁率	总多糖质量	综合评分
						<75 μm/%	/%	分数/%	/%
1	1	1	1	1	1	75.6	78.9	42.8	70.4
2	1	2	2	1	1	81.5	85.2	42.2	75.1
3	1	3	3	2	2	87.9	90.9	38.1	79.1
4	1	4	4	2	2	90.5	93.8	37.0	81.1
5	2	1	2	2	2	80.6	83.7	38.9	73.5
6	2	2	1	2	2	77.2	80.8	39.2	71.0
7	2	3	4	1	1	96.5	98.4	42.5	86.5
8	2	4	3	1	1	94.8	98.2	41.8	85.6
9	3	1	3	1	2	82.5	86.1	42.0	75.8
10	3	2	4	1	2	84.5	87.8	41.7	77.3
11	3	3	1	2	1	76.3	81.2	37.2	70.4
12	3	4	2	2	1	85.7	88.6	37.5	77.2
13	4	1	4	2	1	83.5	85.9	38.2	75.4
14	4	2	3	2	1	82.1	85.6	38.0	74.7
15	4	3	2	1	2	78.9	82.1	41.6	72.7
16	4	4	1	1	2	71.3	74.8	41.3	66.7
K_1	76.4	73.8	69.6	76.3	76.9				
K_2	79.1	74.5	74.6	75.3	74.7				
K_3	75.2	77.2	78.8						
K_4	72.4	77.7	80.1						
R	6.0	3.5	9.4	2.0	4.4				

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	94.6	3	31.5	9.0	<0.10
B	44.3	3	14.8	4.2	>0.10
C	266.1	3	88.7	25.4	<0.05
D(误差)	3.5	1	3.5		
E	20.1	1	20.1	5.7	<0.05

注: $F_{0.10}(3,3) = 5.39$; $F_{0.05}(3,3) = 9.28$; $F_{0.05}(1,7) = 5.59$ 。

维在温度较高时变韧导致不易粉碎等原因, 选择控制温度在 0~10℃, 故确定最佳超微工艺为

由直观分析可知, 各因素对铁皮石斛超微粉碎工艺的影响顺序为 $C > A > E > B > D$ 。以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 结果表明因素 A, C, E 对制备工艺具有显著性影响, 因素 B 则无显著性影响, 粉碎 25 和 30 min 的差异较小, 从避免粉碎后期发生逆向变化(粒度增大), 降低粉碎能耗等考虑, 选择粉碎时间 25 min, 因素 D 虽无显著性影响, 但由于铁皮石斛总多糖受热不稳定和药材中韧皮纤

$A_2B_3C_4D_1E_1$, 即铁皮石斛超微粉碎的入磨粒径 80 目, 入磨量 250 g, 含水量 4%~6%, 粉碎温度控制在 0~10℃, 粉碎时间 25 min。

2.5 验证试验 为验证该超微粉碎工艺条件的合理性, 按最佳工艺条件进行 3 批验证试验, 结果见表 4, 平均得粉率 96.1% (RSD 0.24%), 粒径 <75 μm 的平均得率 96.8% (RSD 0.28%), 细胞破壁率 98.3% (RSD 0.78%), 总多糖平均质量分数 42.2% (RSD 2.85%), 与正交试验结果相吻合, 说明优选的超微粉碎工艺稳定可行。

表4 铁皮石斛超微粉的粒度分布

No.	D_{10} / μm	D_{50} / μm	D_{90} / μm	平均粒径 / μm	比表面积 / $\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$
1	2.820	10.939	43.340	18.898	9 695.552
2	2.768	10.886	42.669	18.926	9 762.311
3	2.725	10.711	41.683	18.512	9 855.225

3 讨论

在铁皮石斛细胞破壁率检测中,本文分别对分散介质和显微特征计数指标进行考察^[9]。选择正辛醇、无水乙醇、95%乙醇、正丁醇、稀甘油及10%水合氯醛溶液作为分散介质,通过目测和WINNER99型显微图象分析仪观察可知,采用95%乙醇、无水乙醇、正丁醇及正辛醇作为分散介质时,细胞缩小,不易观察;采用稀甘油作为分散介质时,细粉全部结团,黏附在瓶壁上,无法分散;采用10%水合氯醛溶液作为分散介质时,部分药材细粉结团,不易分散。考虑到铁皮石斛药材中总多糖含量高,在水溶液中易结团的特点,可先用有机试剂快速分散,再加入10%水合氯醛溶液,故确定的分散介质及其加入方法为加入95%乙醇2 mL,振摇使其分散,迅速滴加10%水合氯醛溶液,边加边振摇,使其均匀分散。在显微特征计数指标考察时,通过铁皮石斛细粉的显微特征图分析^[10],除草酸钙针晶、淀粉等后含物外,韧皮纤维及导管等细胞均已碎断散在;薄壁细胞较大且壁薄,大部分已破碎,不完整;表皮细胞表面观呈长条形、长多角形或类多角形扁平,直径15~35 μm ,垂周壁连珠状增厚,粉碎成细粉后有部分完整的细胞存在,故选择茎表皮细胞作为显微特征计数指标。

振动粉碎使物料在磨筒内受到高加速度撞击、剪切,可在极短时间内达到理想的粉碎效果,可适应对纤维状、高韧性、高硬度物料的粉碎。由于铁皮石

斛纤维多,硬度大,故使用贝利粉碎机进行超微粉碎,固定技术参数为研磨介质填充率65%,振动频率1 000次/min,振动强度8 g,振幅5 mm。

正交试验结果分析时,由于各因素的水平数不同,在分析因素主次时,不能完全按极差(R)的大小决定,需要对 R 加以修正,按修正的 R' 值分析因素的主次,计算公式为 $R' = \sqrt{\alpha}Rh$ (α 为该因素各水平的重复数, h 为折算系数,当水平数=2时 $h=0.71$,水平数=4时 $h=0.45$)。

[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,2010:265.
- [2] 李娟,李顺祥,黄丹,等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报,2011,29(18):74.
- [3] 李德成,刘庆燕. 中药超微粉碎技术在中药制剂中广泛应用的优越性[J]. 世界中医药,2011,6(5):454.
- [4] 蔡光先. 中药粉体工程学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:8,183.
- [5] 杨瑛,杨永华,凌翔,等. 蒲黄的细胞破壁率测定及其与粒径值的相关性研究[J]. 中成药,2008,30(11):1646.
- [6] 李雅,蔡光先,杨永华,等. 白芍微粉细胞破壁率的测定[J]. 中国医药导报,2009,6(9):13.
- [7] 周萍,安东,王朝川,等. 变温压差脆化破壁灵芝孢子技术考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):16.
- [8] 刘明芝,周仁郁. 中医药统计学与软件应用[M]. 北京:中国中医药出版社,2006:8,68.
- [9] 蔡光先,杨永华. 单味中药超微饮片的质量标准研究[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2007:8,17.
- [10] 刘学平,汤明辉,戴涌,等. 中药石斛类粉末的显微鉴定研究[J]. 中国药科大学学报,1992,23(3):148.

[责任编辑 仝燕]