

正交试验优选酒制狗脊的炮制工艺

徐钢¹, 鞠成国^{1,2}, 周远征¹, 张凡¹, 林桂梅¹, 贾天柱^{1,2*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600;

2. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 优选酒制狗脊的炮制工艺。方法: 以原儿茶酸、原儿茶醛含量为综合评价指标, 选择黄酒比例、浸润时间、蒸制时间、闷润时间为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选酒制狗脊的炮制工艺。结果: 酒制狗脊最佳炮制工艺为每 100 kg 狗脊加 15 kg 黄酒, 室温闷润 2 h, 武火蒸制 4 h 后停火闷 4 h。结论: 优化的酒制狗脊工艺省时、节能、合理可行。

[关键词] 正交设计; 酒制狗脊; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 炮制工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0015-04

Optimization of Processing Technology for Wine-steamed *Cibotium barometz* by Orthogonal Test

XU Gang¹, JU Cheng-guo^{1,2}, ZHOU Yuan-zheng¹, ZHANG Fan¹,
LIN Gui-mei¹, JIA Tian-zhu^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Chinese Materia Medica Processing Engineering Research Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of wine-steamed *Cibotium barometz*. **Method:** Taking the content of protocatechuic acid and protocatechuic aldehyde as comprehensive evaluation index, with the amount of wine, infiltration time, steaming time, moistening time as factors, $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize processing technology of wine-steamed *C. barometz*. **Result:** Optimal processing technology of wine-steamed *C. barometz* was as following: plusing 15 kg rice-wine per 100 kg *C. barometz*, infiltrated for 2 h at ambient temperature, steamed 4 h by high-heat, and then moistened 4 h. **Conclusion:** This optimized processing technology was reasonable and practical with energy and time saving.

[Key words] orthogonal design; wine-steamed *Cibotium barometz*; protocatechuic acid; protocatechuic aldehyde; processing technology

狗脊始载于《神农本草经》,列为草部中品,具有祛风湿、补肝肾、强腰膝的功效,用于治疗风湿痹痛、腰膝酸软、下肢无力^[1]。《雷公炮炙论》始记载其炮炙方法:“凡修事,细剉了,酒拌,蒸,从巳至申,出,晒干用”^[2]。1988 年版《全国中药炮制规范》

(下文简称炮制规范)是取净狗脊片,加黄酒拌匀,润透后置蒸笼内,用武火加热 4~6 h,停火,闷 6~8 h,取出干燥;每狗脊片 100 kg,用黄酒 15 kg^[3]。2010 年版《中国药典》的产地加工是切厚片,干燥,为“生狗脊片”;蒸后晒至六、七成干,切厚片,干燥为“熟狗脊片”;而正文所收录的炮制品则是砂烫狗脊。近年来大多炮制研究均集中于烫狗脊^[4-6],对酒制蒸狗脊的研究几乎无人问津。酒制蒸狗脊可增强补肝肾、强腰膝的作用,在临床上应用颇多,如龟鹿补肾丸、狗脊丸等,但其炮制工艺尚显繁琐,工艺参数不够完善。本实验以狗脊中原儿茶酸、原儿茶醛含量的综合评分为指标,采用正交试验优选酒制

[收稿日期] 20121017(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973938)

[第一作者] 徐钢,硕士,从事中药炮制工艺与原理研究, Tel: 15840655141, E-mail: 526423695@163.com

[通讯作者] * 贾天柱,教授,博士生导师,从事中药炮制原理研究, Tel: 0411-87586499, E-mail: jiatianzhu51@yahoo.com.cn

狗脊的炮制工艺,为其推广应用提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪 (Agilent 公司), AE240 型 1/10 万电子分析天平 (瑞士 METTLER 公司), FA1004B 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), DFT-100 型高速万能粉碎机 (温岭市林大机械有限公司)。

生品狗脊饮片购自安徽省亳州市安东药业,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为蚌壳蕨类植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎。特制黄酒 (即墨市古城春酒厂), 原儿茶酸、原儿茶醛对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110809-200604, 110810-201007), 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 酒制狗脊的蒸制 根据炮制规范, 选择黄酒用量 (每 100 kg 狗脊)、浸润时间、蒸制时间及停火后闷制时间为考察因素, 按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 因素水平见表 1。取净狗脊片, 置适宜容器内, 加入适量黄酒, 用清水稀释至 40 mL, 加至狗脊片中拌匀, 盖保鲜膜, 密闭浸润, 放入蒸锅内武火蒸制, 停火后闷制, 取出干燥。

表 1 酒制狗脊炮制工艺正交试验因素水平

	A	B	C	D
水平	黄酒用量 /倍	浸润时间 /h	蒸制时间 /h	停火闷制 时间/h
1	0.1	0.5	4	0
2	0.15	1	5	4
3	0.2	2	6	8

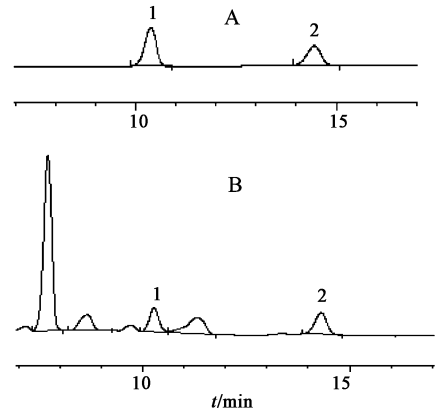
2.2 原儿茶酸、原儿茶醛含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶酸对照品 7.92 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 精密吸取 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度。精密称取原儿茶醛对照品 20.14 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 精密吸取 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度。精密等量吸取上述原儿茶酸、原儿茶醛对照品溶液, 制成含原儿茶酸 ($7.920 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和原儿茶醛 ($2.014 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 每组样品各取 30 g, 粉碎, 过三号筛, 取样品粉末 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇-1% 冰乙酸 (70:30) 溶液 25 mL, 称重, 超声提取 30 min, 取出, 放凉, 称重, 加上上述混合溶液补足减失的质量, 滤过, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微

孔滤膜, 取续滤液备用。

2.2.3 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-1% 冰乙酸溶液 (5:95), 检测波长 280 nm, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 10 μL 。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 原儿茶酸; 2. 原儿茶醛

图 1 酒制狗脊 HPLC

2.3 线性范围考察^[7-8]

2.3.1 原儿茶酸 精密吸取原儿茶酸对照品溶液 1, 4, 6, 8, 10, 12 μL , 按上述色谱条件进行测定, 以对照品进样量为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 得回归方程 $Y = 1431.6X - 2.9348$ ($r = 0.9999$), 表明原儿茶酸在 $0.00792 \sim 0.09504 \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系。

2.3.2 原儿茶醛 精密吸取原儿茶醛对照品溶液 1, 4, 8, 10, 12, 16 μL , 按上述色谱条件进行测定, 以对照品进样量为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 得回归方程 $Y = 3771.0X + 0.4849$ ($r = 0.9999$), 表明原儿茶醛在 $0.00201 \sim 0.03222 \mu\text{g}$ 具有良好线性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液, 连续重复进样 6 次, 每次 10 μL , 按上述色谱条件测定, 结果原儿茶酸和原儿茶醛的峰面积积分值的 RSD 分别为 0.52%, 1.25%, 说明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 取同一批样品 6 份, 分别按 2.2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 结果原儿茶酸和原儿茶醛平均含量分别为 0.196, 0.0458 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.21%, 1.32%, 说明方法重复性良好。

2.6 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, 20 h 进样, 按上述色谱条件进行测定, 结果原儿茶酸和原儿茶醛的峰面积积分值的 RSD 分别为 1.56%, 1.63%, 说明供试品溶液

在 20 h 内基本稳定。

2.7 回收率试验 取已知含量样品 0.5 g,精密称定,分别精密加入已知含量的原儿茶酸对照品溶液 12 mL 和原儿茶醛对照品溶液 11 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,测定,计算回收率。结果原儿茶酸平均加样回收率 100.8%,RSD 1.58%;原儿茶醛的平均加样回收率 101.3%,RSD 2.30%,说明本方法符合有关规定。

2.8 酒制狗脊工艺优选^[9] 原儿茶酸、原儿茶醛均为狗脊中指标性成分,前者含量较高,2010 年版《中国药典》中以原儿茶酸为指标成分,而本试验中发现二者在酒制狗脊中含量均明显增加,故综合评分时将原儿茶酸权重系数定为 0.6,原儿茶醛权重系数定为 0.4。综合指标 $OD = (m_{Ai} \times 0.6/m_{Amax} + m_{Bi} \times 0.4/m_{Bmax}) \times 100$ 。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3,交互作用见表 4。

表 2 酒制狗脊炮制工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	原儿茶酸 (m_A) /mg·g ⁻¹	原儿茶醛 (m_B) /mg·g ⁻¹	综合 指标 (OD)
1	1	1	1	1	0.125	0.055	68.66
2	1	2	2	2	0.145	0.041	66.70
3	1	3	3	3	0.154	0.050	74.39
4	2	1	2	3	0.140	0.072	82.41
5	2	2	3	1	0.145	0.043	68.02
6	2	3	1	2	0.198	0.046	85.63
7	3	1	3	2	0.193	0.035	83.18
8	3	2	1	3	0.137	0.047	68.17
9	3	3	2	1	0.131	0.059	72.83
K_1	69.917	78.083	74.153	69.837			
K_2	78.687	67.630	73.980	78.503			
K_3	74.727	77.617	75.197	74.990			
R	8.770	10.453	1.217	8.666			

表 3 酒制狗脊炮制工艺综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	115.73	2	57.87	44.51	<0.05
B	209.22	2	104.61	80.46	<0.05
C(误差)	2.60	2	1.30	1.00	
D	114.01	2	57.00	43.85	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

直观分析表明,各因素影响原儿茶酸和原儿茶醛含量的主次顺序为 $B > A > D > C$,以极值最小的

表 4 B 与 A,C,D 三因素交互作用

B	A			C			D		
	10	15	20	4	5	6	0	4	8
0.5	68.66	82.41	83.18	68.66	82.41	83.18	68.66	83.18	82.41
1	66.70	68.02	68.17	68.17	66.70	68.02	68.02	66.70	68.17
2	74.39	85.63	72.83	85.63	72.83	74.39	72.83	85.63	74.39

C 因素为误差项进行方差分析,发现 A,B,D 因素均具有统计学差异。对于因素 B,水平 1 与水平 3 接近,但考虑其与其他三因素间的交互作用及实际情况,确定采用水平 3。综合分析,确定最佳工艺组合为 $A_2B_3D_2C_1$,即每 100 kg 狗脊加 15 kg 黄酒,室温浸润 2 h,武火蒸制 4 h 后,停火闷 4 h。测得同批生品狗脊片中原儿茶酸、原儿茶醛含量分别为 0.093,0.022 mg·g⁻¹,与生品相比较,按优选工艺炮制后的样品中,二者含量分别提高了 2.1,2.0 倍,说明酒制狗脊中原儿茶酸和原儿茶醛含量均有显著增加。

2.9 验证试验 取 3 批生品狗脊饮片(每批样品量均为 500 g),按优选工艺进行 3 次验证试验,结果原儿茶酸含量分别为 0.198,0.197,0.195 mg·g⁻¹;原儿茶醛含量分别为 0.044,0.046,0.045 mg·g⁻¹;说明优选的炮制工艺稳定可行。

3 讨论

本实验参照《中国药典》2010 年版中狗脊质量标准内容,选取甲醇-1% 冰乙酸(70:30)为提取溶剂,有效成分提取完全,且色谱峰分离良好,有效地消除了杂质峰干扰。在流动相选择时,比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-冰乙酸、乙腈-冰乙酸等系统,最后确定采用甲醇-1% 冰乙酸溶液(5:95)为流动相,既保证不损伤色谱柱,又使原儿茶酸、原儿茶醛得到良好分离,检测波长的选择参考了贾恒明等^[10]的研究,确定检测波长 280 nm。

在单因素试验考察时,发现净狗脊加黄酒浸润 2 h 即可润透,且酒尽需约 3 h,但试验结果差别不大;蒸制时间考察了 2,5,8 h,结果发现后两者远远好于前者,但两者间差别不大;停火后闷时间考察过程中发现停火后闷润 8 h,锅温基本恢复到室温;同时发现各因素对饮片外观影响不大,故不将其列为考察指标。

炮制规范中规定酒制狗脊炮制方法累计时长最多可达 17 h,费时费工,且对于关键操作步骤及质量好坏评价标准无明确规定。本实验优选的炮制工艺仅需 10 h,较原有炮制规范缩短近一半时间,大大提高了工作效率。试验中发现原儿茶酸、原儿茶醛含

茵陈蒿方传统与现代浸提方法对比

高雅言, 孙盼盼, 张超, 李超英*
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的:对比茵陈蒿方传统与现代浸提方法,确定最佳提取工艺。方法:以茵陈蒿方传统煎煮法为基础,采用紫外分光光度法,以总绿原酸、总环烯醚萜苷、总蒽醌及总多糖的综合评分为指标,通过单因素试验和正交试验优化茵陈蒿方的提取工艺。结果:最佳提取工艺为加12,8,6倍量水提取3次,提取时间分别为1,1,0.5 h;再加6倍量80%乙醇提取2次,每次0.5 h。结论:不同提取方法对茵陈蒿方有效成分含量有明显影响,两步提取法较其他方法更能充分提取其有效成分,且方法稳定可行,为该方合理应用和进一步研究提供实验依据。

[关键词] 茵陈蒿汤;有效组分或成分;传统煎煮;现代浸提

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0018-05

Comparison of Traditional and Modern Extraction Methods for Yinchenhao Prescription

GAO Ya-yan, SUN Pan-pan, ZHANG Chao, LI Chao-ying*
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To determine optimum extraction technology by comparing traditional and modern

[收稿日期] 20121029(008)

[基金项目] 吉林省科技计划项目(200905101)

[第一作者] 高雅言,大专,实验师,从事中药炮制及中药制剂研究,Tel:0431-86045207

[通讯作者] *李超英,博士,教授,从事药物新型给药系统及中药新药研究,Tel:0431-86786969,E-mail:chaoying_li@126.com

量较生品有所增加,推测其炮制原理可能与受热过程中糖苷键断裂使原儿茶酸增加^[11]及黄酒加入增加了原儿茶醛溶出度有关。但蒸法与砂烫法究竟哪个更好,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 2010:209.
- [2] 雷敦. 雷公炮制论[M]. 尚志钧,重辑. 合肥:安徽科技出版社,1991:46.
- [3] 中华人民共和国药政管理局. 全国中药炮制规范[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:71.
- [4] 徐钢,鞠成国,于海涛,等. 中药狗脊炮制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):238.
- [5] 许栒,步显坤,周翎,等. 烫狗脊中的酚性化合物研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):71.

- [6] 于海涛,鞠成国,章琦,等. 狗脊生、制品不同提取部位对成骨细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):36.
- [7] 杜中梅,关复敏,贾天柱. 正交法优选酒炙仙茅的最佳炮制工艺[J]. 中成药,2008,30(6):883.
- [8] 邢俊波,王朝红. HPLC法测定肺炎平胶囊中原儿茶酸和原儿茶醛的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(3):8.
- [9] 王冰,宋崎,周小初,等. 综合加权评分法优化山萸肉蒸制工艺[J]. 中成药,2008,30(10):1487.
- [10] 贾恒明,刘敏,张良,等. HPLC法测定狗脊补肾片中原儿茶酸和原儿茶醛的含量[J]. 解放军药学学报,2006,22(6):448.
- [11] 白桐菲. 狗脊及炮制品化学成分研究[D]. 大连:辽宁中医药大学药学院,2008.

[责任编辑 仝燕]