

多指标正交试验优化姜黄连炮制工艺

张洪利¹, 康大力¹, 黄艳萍¹, 李思华², 汪小根^{1*}

(1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2. 广东省人民医院药学部, 广州 510080)

[摘要] 目的: 通过正交试验设计, 探索量化的姜黄连评价指标, 对姜黄连的炮制工艺进行优化。方法: 选择生姜用量、炮制时间和炮制温度 3 个因素, 采用 $L_9(3^4)$ 安排试验, 以姜黄连指纹图谱峰面积、抑菌作用为指标, 进行综合评价。结果: 姜黄连饮片最佳工艺为: 取黄连饮片加 20% 姜汁闷润, 待姜汁被吸尽后, 置烘箱中烘制, 温度 100 , 时间 90 min, 取出, 放凉。结论: 优化的炮制工艺结果可靠, 同药典法比容易操作, 评价指标可控。

[关键词] 姜黄连; 正交设计; 指纹图谱; 抑菌作用

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0014-03

Study on Processing Method of Rhizoma Coptidis by Multi-index Orthogonal Design

ZHANG Hong-li¹, KANG Da-li¹, HUANG Yan-ping¹, LI Si-hua², WANG Xiao-gen^{1*}

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;

2. Pharmaceutical Department of Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the best technics for preparing Rhizoma Coptidis with objective and quantitative indices by orthogonal experimental design. **Method:** The amount of ginger juice, baking temperature and baking time were selected as experiment actors and $L_9(3^4)$ orthogonal design was used. The best method was optimized with the relative peak area of common peaks in fingerprints of Rhizoma Coptidis and its bacteriostatic action as the investigate target. **Results:** The best preparative technic was as follows: Rhizoma Coptidis mixed with 20% ginger juice thoroughly decocted and moistened, baking at 100 , for 90 min. **Conclusion:** The method is reasonable, simple, feasible and controllable comparing with the pharmacopeia method.

[Key words] Rhizoma Coptidis; orthogonal experimental design; fingerprints; bacteriostatic action

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teetoidea* C. Y. Cheng 的干燥根茎。具清热燥湿, 泻火解毒之功。黄连苦寒, 临床上多用其炮制品, 姜制黄连能缓和其过于苦寒之性, 增强其止呕作用, 可用于治疗胃热呕吐。目前姜黄连的炮制工艺大多沿用传统的操作方法, 2005 年版《中国药典》规定姜黄连的炮制方法为: 取净黄连, 加姜汁拌匀, 置锅内, 用文火炒干, 取出, 放凉。传统操作方

法加热温度和时间控制不严, 全凭操作者主观感觉判断, 导致其质量参差不齐, 影响临床疗效, 因此有必要对其炮制工艺进行研究^[1]。本研究以姜黄连 HPLC 指纹图谱色谱峰峰面积为成分指标, 以抑菌作用为药效指标, 采用正交设计方法, 以烘法代替炒法, 优选了姜黄连的炮制工艺。

1 仪器与试药

岛津 LC-10AVP 高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外可见检测器、VP-ODS 柱、N2000 色谱工作站、AS5150BD-I 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

黄连经成都中医药大学峨眉学院刘晓春副教授鉴定为毛茛科植物黄连 *C. chinensis* 干燥根茎。营养

[收稿日期] 2009-12-21

[通讯作者] * 汪小根, Tel: 020-28854910, E-mail: wangxg@gdyzy.edu.cn

琼脂培养基。金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌为本院微生物教研组保存菌种。盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所);乙腈为色谱纯;甲醇和磷酸均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄连的炮制 取生姜 100 g 洗净,捣烂,加水适量,压榨取汁,姜渣再加水适量重复压榨 1 次,合并汁液,即为姜汁(每 1 mL 含生姜药材 1 g)。取黄连饮片 9 份,每份 50 g,选择生姜用量、烘制温度和烘制时间 3 个因素,每个因素采用 3 水平,用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。因素水平见表 1,炮制所得成品粉碎成细粉。

表 1 因素水平

水平	A 生姜用量 / %	B 烘制温度 /	C 烘制时间 / min
1	5	80	30
2	12.5	100	60
3	20	120	90

2.2 HPLC 指纹图谱的测定

2.2.1 样品溶液的制备 取姜黄连炮制品细粉(过 3 号筛) 0.5 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加入盐酸-甲醇的混合溶液(1:99) 适量,超声处理(30 W, 25 kHz) 30 min,放冷,加盐酸-甲醇的混合溶液(1:99) 稀释至刻度,摇匀,滤过,精密吸取续滤液 1 mL 置 50 mL 量瓶中,加盐酸-甲醇混合溶液(1:99) 至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱 VP-ODS 柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm),岛津公司。流动相乙腈-水-磷酸(300:700:4),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 349 nm,进样量 20 μL 。

2.2.3 方法学考察 精密度试验,取姜黄连粉末 0.5 g,精密称定,按 2.2.1 项下方法制备供试液,重复进样 6 次,记录指纹图谱。结果表明,以盐酸小檗碱为参照物,各主要色谱峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.35%,相对峰面积 RSD 均小于 1.3%。重复性试验,取同批黄连药材 6 份,每份 50 g,同法炮制后取 0.5 g,精密称定,按 2.2.1 项下方法制备供试液,重复进样 6 次,记录指纹图谱。结果表明,以盐酸小檗碱为参照物,各主要色谱峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.45%,相对峰面积 RSD 均小于 2.3%。稳定性试验,取同一供试品溶液,分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进行色谱分析。结果表明,以盐酸小檗碱为参照物,各主要色谱峰的相对保留时间 RSD

均小于 0.42%,主要峰相对峰面积均小于 2.1%。

2.2.4 样品测定 分别精密吸取样品溶液 20 μL ,注入高效液相色谱仪中,记录色谱图。标定共有峰 14 个,见表 2。

采用多指标试验公式法^[2] 进行数据处理。以 X_{ij} 表示第 i 次试验中第 j 个指标的测定值(即 X_{ij} 表示正交试验的第 i 次试验的色谱图中第 j 个色谱峰峰面积值),首先以各指标的最大值作为参照对同一指标各数据进行标准化处理, D_{ij} 表示第 j 个指标下的第 i 个测定值的标准化数据。

$$D_{ij} = X_{ij} / (X_j)_{\max}$$

其中 $i = 1, 2, \dots, 9; j = 1, 2, \dots, 14$

再按各指标的重要程度和各组数据的相对标准偏差确定权重系数。

$$F_j = E_j \times \text{RSD} / \text{RSD}_j$$

其中 RSD 为盐酸小檗碱的相对标准偏差, RSD_j 为第 j 个指标的相对标准差,由于各指标的药效不明确,故认为都很重要,重要程度 E_j 均定为 1。

$$P_i = \sqrt{6} (F_j \times D_{ij}) / \sqrt{6} F_j$$

计算所得的兼顾各项指标综合评分公式 P_i 值越大越好,数据处理结果见表 3。

2.3 姜黄连抑菌作用测定^[3]

2.3.1 样品溶液的制备 分别取正交试验制得的 9 份姜黄连细粉(过 3 号筛) 各 5.00 g 分别置 150 mL 烧瓶中,各加水 100 mL,摇匀,超声处理 10 min,放置,取上清液。残渣再加水 80 mL 超声提取 10 min,取上清液。合并 2 次提取液,水浴分别浓缩至 40 mL,备用。

2.3.2 测定方法 采用琼脂扩散法,将加热的营养琼脂培养基 20 mL 置于平皿内冷却后作为底层,再用分别含金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和粪肠球菌的营养琼脂培养基 5 mL 铺为菌层,待冷凝后在平板上放置外径 8 mm、内径 6 mm、高 10 mm 的钢圈,分别加入样品溶液,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,测抑菌圈直径,以 3 种菌抑菌直径和为指标。正交设计筛选姜黄连炮制工艺结果见表 3。

3 炮制工艺的优选

从表 3 直观分析,姜黄连指纹图谱综合评分与姜黄连的抑菌作用有直接的相关性,二者直观分析结果相似。根据正交设计结果,同时结合生产实际,选择 $A_3 B_2 C_3$ 为最佳炮制工艺,即取黄连饮片加 20% 姜汁闷润,待姜汁被吸尽后,置烘箱中烘制,温度 100 $^{\circ}\text{C}$,时间 90 min,取出,放凉。

表 2 姜黄连炮制品 HPLC 指纹图谱峰面积

样品	色谱峰峰面积						
	1	2	3	4	5	6	7
1	140 079.9	4 507.9	10 535.5	31 364.6	21 741.2	34 171.9	30 719.6
2	125 623.9	3 791.0	10 203.3	30 442.1	22 590.1	35 096.9	31 419.9
3	135 046.6	4 182.1	10 198.1	33 801.9	23 895.1	35 320.9	34 438.4
4	147 644.3	5 226.9	10 038.0	35 369.6	23 965.6	34 320.3	32 679.3
5	151 553.5	3 203.0	9 644.2	34 058.3	23 903.5	35 177.0	35 330.4
6	104 347.0	3 905.1	11 848.9	26 768.0	19 854.6	29 652.2	30 465.8
7	152 493.4	3 887.6	11 854.9	31 075.6	23 231.5	35 565.6	32 297.2
8	159 934.0	4 651.4	11 793.6	30 321.9	23 224.4	34 878.9	33 660.3
9	161 624.8	4 510.3	12 621.5	34 842.7	24 523.5	36 266.8	34 387.9

样品	色谱峰峰面积						
	8	9	10	11	12	13	14
1	28 875.27	95 118.18	165 703.2	218 392.6	33 215.88	187 986.1	747 895.3
2	29 710.89	91 306.46	167 981.3	210 154.4	27 382.02	189 132.9	759 502.3
3	29 509.26	100 417.9	166 029.4	204 533.8	34 864.07	191 669.9	745 776.5
4	30 698.79	98 866.02	172 678.6	206 914.3	35 514.19	197 708.2	752 516
5	33 184.76	10 0437.6	178 899.3	220 215.7	35 783.85	202 392.5	782 268.9
6	25 645.75	93 326.01	153 162.2	188 374.2	28 315.01	182 126.8	710 889.9
7	30 216.94	10 1 06.1	180 709.3	222 708.5	32 565.58	206 401	799 805.1
8	30 232.36	104 878.8	182 622.1	225 840.8	31 530.23	222 858.6	839 330.6
9	30 241.89	99 526.05	182 198.1	216 202.1	36 141.14	202 046.9	810 604.4

表 3 正交设计及试验结果

No	A	B	C	综合评分 / P_i	抑菌圈 / cm
1	1	1	1	0.894	7.2
2	1	2	2	0.880	7.1
3	1	3	3	0.917	7.7
4	2	1	2	0.931	7.9
5	2	2	3	0.944	8.0
6	2	3	1	0.824	7.0
7	3	1	3	0.939	8.1
8	3	2	1	0.960	8.0
9	3	3	2	0.966	8.4
指	K_1	2.691	2.764	2.678	
纹	K_2	2.699	2.784	2.777	
图	K_3	2.865	2.707	2.800	
谱	R	0.058	0.023	0.041	
抑	K_1	22.0	23.2	22.2	
菌	K_2	22.9	23.2	23.4	
作	K_3	24.5	23.1	23.8	
用	R	0.83	0.33	0.53	

4 讨论

黄连主含原小檗碱型生物碱,含有小檗碱、巴马

汀、黄连碱、甲基黄连碱、药根碱、木蓝碱等^[4]。黄连炮制后其成分发生不同程度的变化,可导致药性及功能主治的改变^[5]。利用指纹图谱较单一有效成分筛选的炮制工艺更符合中医用药的目的和更能保证临床的疗效。本实验建立了指纹图谱,主要成分的色谱峰得到有效分离,操作方法简便,结果容易统计。与抑菌实验结果一致。

在预实验中选取了 6 种肠道常见菌:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、表皮葡萄球菌、沙门氏菌、粪肠球菌先进行了姜黄连抑菌作用研究,结果姜黄连对 3 种球菌的抑菌作用强于 3 种杆菌,因此本研究选择金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌 3 种对姜黄连抑菌作用敏感的菌株为筛选菌。

中药炮制中有许多药物是采用药汁进行炮制,达到增效、减毒的目的,这与方剂配伍理论相似。本实验用正交设计,以姜黄连指纹图谱峰面积及 3 种敏感球菌抑菌作用为综合评分进行炮制工艺筛选,结果与临床疗效较接近,为制定姜黄连炮制工艺提供了参考依据。

(下转第 18 页)