

麸炒薏苡仁炮制工艺的优化

单国顺,步显坤,孙媛媛,张怀,贾天柱*

(辽宁中医药大学药学院,辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:优选麸炒薏苡仁最佳炮制工艺。方法:以薏苡仁中甘油三油酸酯、多糖为指标,采用正交试验法对温度、时间、加麸量 3 因素,每个因素取 3 个水平,进行薏苡仁麸炒工艺的优选。结果:温度、时间对实验结果有显著影响,加麸量对实验结果无显著影响。确定麸炒薏苡仁最佳工艺为:温度 210~220℃,时间 60 s,加麸量 20%。结论:该工艺合理可行。

[关键词] 薏苡仁;炮制工艺;正交试验;甘油三油酸酯;多糖

[中图分类号] R 283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0042-04

具有健脾利湿,清热排脓之功效^[1]。目前临床上多使用薏苡仁的麸炒品,但其炮制程度如何控制,尚缺乏明确的工艺参数和控制指标,这直接影响饮片的质量及临床应用。因此,作者应用高效液相色谱联用电雾式检测器及紫外分光光度法分别测定了薏苡仁中抗肿瘤^[2]和提高机体免疫力^[3]的主要成分甘油三油酸酯和薏苡仁多糖的含量,并以此为指标确定了麸炒薏苡仁的最佳炮制工艺。

1 仪器与试剂

日本岛津公司 LC-20AB 液相色谱仪(LC-20AB 泵,CTO-20A 柱温箱,SIL-20A 自动进样器,CBM-20A 数据转换器);LC-Solution 色谱数据工作站;电雾式检测器(美国惠泽公司);U-3010 紫外分光光度计(日本日立公司);METTLER AE240 型 1/10 万分天平(瑞士 METTLER);FA1004B 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);X/WT 数显调节仪电热恒温水浴锅(余姚市显星仪器有限公司);RE-52A 系列旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHB--III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);电热恒温干燥箱(上海市跃进医疗器械一厂)。

生品薏苡仁药材购自安徽济人药业有限公司,经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定

为禾本科植物薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf 的干燥成熟种仁;麦麸(市售);甘油三油酸酯对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111692-200806);D-无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110833-200503);乙腈、二氯甲烷均为色谱纯,水为纯净水,氮气为高纯氮(纯度达 99.999%),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甘油三油酸酯含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取甘油三油酸酯对照品适量,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加流动相,制成每 1 mL 含 0.146 2 mg 的溶液,即得。

2.1.2 麸炒薏苡仁样品的制备 将铁锅用中火加热至均匀撒入定量麦麸,即刻烟起,随之投入净薏苡仁,快速翻动,炒至薏苡仁表面淡黄色,麦麸黑色时,立即取出,筛去麦麸,放凉,即得^[4]。

2.1.3 供试品溶液的制备 取麸炒薏苡仁样品适量,粉碎(过三号筛),取粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入流动相 50 mL,称定质量,浸泡 2 h,超声处理(功率 250 W,频率 50 Hz) 30 min,取出放冷,用流动相补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即为供试品溶液^[1]。

2.1.4 测定条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈-二氯甲烷 (70:30);柱温 40℃;流速 0.5 mL·min⁻¹;进样量 10 μL。CAD 参数,氮气,压力 35 psi (约 241.3 kPa);Filter: High;Range: 200 pA;Offset: 0。理论塔板数按甘油三油酸酯峰计算应不低于 5 000。甘油三油酸酯对照品、生品薏苡仁及麸炒薏苡仁 HPLC 色谱图分别见图 1。

[收稿日期] 2009-11-27

[基金项目] 国家发改委行业专项(200807037)

[通讯作者] * 贾天柱, Tel: (0411) 87586499, E-mail: jiatz@lnutcm.edu.cn

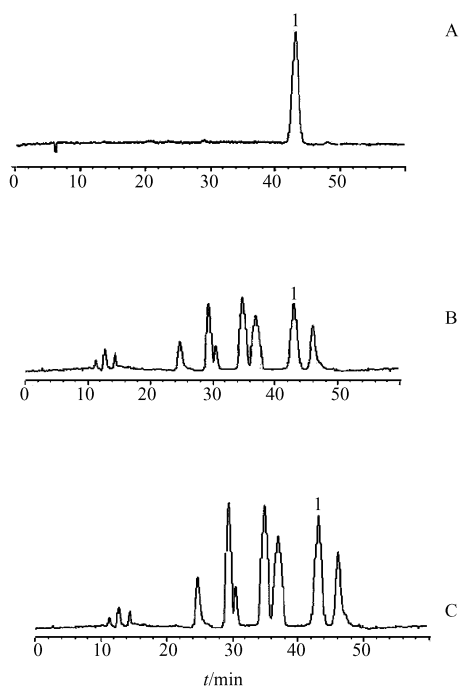


图 1 薏苡仁 HPLC 图

A. 甘油三油酸酯; B. 生品薏苡仁; C. 麸炒薏苡仁; 1. 甘油三油酸酯

2.1.5 线性范围考察 精密吸取浓度为 $0.1426 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甘油三油酸酯对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16 μL , 按 2.1.4 项下操作, 以对照品进样量 (ng) 为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程 $Y = 4804X - 27437$, $r = 0.9991$ 。表明甘油三油酸酯的进样量在 292.4 ~ 2339.2 ng 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 按 2.1.4 项下操作, 重复进样 6 次, 甘油三油酸酯峰面积 RSD 为 2.3%, 结果表明其精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取供试品溶液, 室温下放置, 于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 h 时间间隔, 分别进样分析, 按 2.1.4 项下操作, 峰面积 RSD 为 1.5%, 结果表明供试品溶液室温 48 h 内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 取同批样品 6 份, 按 2.1.3, 2.1.4 项下操作, 测定各样品中甘油三油酸酯的平均质量分数为 0.8834%, RSD 为 1.6%, 证明本方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取已知甘油三油酸酯含量的麸炒薏苡仁样品 6 份, 每份约 0.5 g 精密称定, 分别精密加入甘油三油酸酯对照品适量, 按 2.1.3, 2.1.4 项下操作, 测定样品的峰面积, 计算甘油三油酸酯的回收率, 结果见表 1。

表 1 甘油三油酸酯加样回收率

No.	取样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.5066	4.43	8.53	96.63	99.4	2.6
2	0.5048	4.28	8.60	97.08		
3	0.5055	4.29	8.80	101.35		
4	0.5037	4.27	8.82	102.25		
5	0.5046	4.28	8.62	97.5		
6	0.5074	4.30	8.83	101.8		

注: 加入量均为 4.45 mg。

2.2 薏苡仁中多糖的含量测定

2.2.1 薏苡仁多糖的精制 称取薏苡仁粗粉 50 g, 加入石油醚 (30 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$) 500 mL 回流脱脂 2 次, 每次 2 h, 倾出溶剂, 滤渣挥干, 加入 80% 乙醇 500 mL 加热回流 2 h, 倾出溶剂, 挥干滤渣, 加入蒸馏水 1000 mL 回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并 2 次滤液, 减压浓缩至一定体积, 加 40% 三氯醋酸除蛋白, 过滤, 滤液加乙醇, 使醇浓度达到 70%, 放置冰箱过夜, 抽滤, 沉淀依次用 95% 乙醇, 无水乙醇, 丙酮, 乙醚各洗涤 3 次, 每次 50 mL, 得白色粉末, 真空干燥至恒重, 即为薏苡仁的多糖粗品^[5]。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 150.3 mg D-无水葡萄糖于 250 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 制成浓度为 $0.6012 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液。

2.2.3 测定条件 日立 U-3010 紫外分光光度计, 石英比色皿, 检测波长 486 nm。D-无水葡萄糖标准品、生品薏苡仁样品及麸炒薏苡仁样品紫外扫描均在 486 nm 处有最大吸收。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别吸取葡萄糖储备液 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 mL 于 50 mL 量瓶中, 得到葡萄糖供试液, 分别取各供试液 2 mL 于具塞试管中, 加入 5% 苯酚试液 1 mL, 摇匀后迅速加入浓硫酸 7 mL, 摇匀后放置 5 min, 置 50 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 30 min, 于冰水浴中放置 5 min, 取出, 供紫外测试。取 0.0 mL 为空白液, 于 486 nm 下测定吸光度。以葡萄糖浓度 (C) 为横坐标, 以吸光度 (A) 为纵坐标绘制标准曲线, 并进行回归处理。得回归方程为 $A = 13.046C - 0.011$, $r = 0.9997$ 。D-无水葡萄糖浓度在 $6.012 \sim 60.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与吸光度之间有良好的线性关系。

2.2.5 换算因子的测定 精密称取 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的薏苡仁多糖 33.5 mg, 置于 500 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度。分别精密吸取该溶液 6 份,

每份 2 mL,于具塞试管中,按 2.2.4 项下方法操作,测定吸光度,根据回归方程计算多糖溶液中葡萄糖的质量浓度,按下式计算换算因子 $f, f = W / (C \times D)$, 式中 W 为多糖的质量 (mg), C 为溶液中葡萄糖的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), D 为多糖稀释因素。测得 $f = 3.62$ 其 RSD 为 1.7% ($n = 6$)^[6]。

2.2.6 供试品溶液的制备 取麸炒薏苡仁样品适量,粉碎过三号筛取约 1 g,精密称定,置于 150 mL 圆底烧瓶中,加入石油醚(60~90 °C)50 mL,加热回流 2 次,每次 2 h,放冷,滤过,滤渣挥干石油醚后加入 80% 乙醇 50 mL,加热回流 2 h 放冷,滤过,滤渣用 80% 乙醇洗涤 3 次,每次 10 mL,滤渣挥干乙醇后加入水 50 mL 回流提取 2 h,放凉,滤过,滤渣用水洗涤 3 次,每次 10 mL,合并各次水溶液,定容于 100 mL 量瓶中,精密吸取 5 mL,加水定容于 100 mL 量瓶中,即得供试品溶液。

2.2.7 样品的测定 精密吸取供试品溶液 2.0 mL,按 2.2.4 标准曲线项下的操作,根据回归方程计算供试品液的浓度,并换算成质量分数。多糖的质量分数 $W(\%) = (C \times D \times f / m) \times 100\%$, 式中: C 为样品液中葡萄糖的浓度, D 为多糖稀释因素, f 为换算因子, m 为样品质量。

2.2.8 精密度试验 取一定质量浓度的标准品溶液,按 2.2.4 项下操作,连续 6 次测定吸光度, RSD 为 1.7%, 结果表明精密度良好。

2.2.9 稳定性试验 取供试品溶液 2.0 mL,室温下放置,于 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 时间间隔,分别进行分析,按 2.2.4 项下操作,测定样品吸光度, RSD 为 1.1%, 结果表明供试品溶液于室温下在 60 min 内稳定性良好。

2.2.10 重复性试验 取同批样品 6 份,按 2.2.6, 2.2.4 项下操作,测定样品吸光度,计算相应的多糖含量值,其 RSD 为 1.7%, 证明本方法重复性良好。

2.2.11 加样回收率试验 取已知多糖含量的麸炒薏苡仁样品约 6 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别精密加入 D -无水葡萄糖对照品适量,按 2.2.6, 2.2.7 项下操作,测定样品吸光度,计算多糖回收率,结果见表 2。

3 麸炒薏苡仁工艺优选

3.1 麸炒薏苡仁样品的制备 药材投料量为 50 g,于煤气炉上用铁锅炒制,以红外测温仪测量温度。

3.2 样品溶液的制备及测定 按 2.1.3, 2.2.6 项

下要求制备各样品的供试品溶液。并分别于 2.1.4, 2.2.3 及 2.2.4 项下条件测定薏苡仁中甘油三油酸酯及多糖的含量,进行分析。

表 2 葡萄糖加样回收率

No.	取样量 /g	样品含量 /mg	实测总量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.504 3	16.44	32.88	100.86		
2	0.501 3	16.34	32.22	97.42		
3	0.501 2	16.34	32.17	97.12	99.3	2.1
4	0.504 8	16.46	32.96	101.22		
5	0.503 7	16.42	32.35	97.73		
6	0.504 4	16.44	32.98	101.47		

注:加入量均为 16.3 mg。

3.3 正交试验设计及方法 选择炒制温度、炒制时间和加麸量为考察因素,以 $L_9(3)^4$ 正交表设计实验;以甘油三油酸酯及多糖含量进行综合评分,由综合评分确定所选指标的优劣,其设计及结果见表 3。

表 3 因素水平表

水平	A	B	C
	炒制温度/°C	炒制时间/s	麸药比/g·100 g ⁻¹
1	190 ~ 200	20	10
2	210 ~ 220	40	15
3	230 ~ 240	60	20

本试验采用综合评分法,在各组实验中,以甘油三油酸酯的最高含量计为 50 分,其相应计分为 $M \times 50 / \text{甘油三油酸酯最高含量}$;以多糖值的最高含量计为 50 分,其相应计分为 $N \times 50 / \text{多糖最高含量}$ 。

(即:综合评分 $P = M \times 50 / \text{甘油三油酸酯最高含量} + N \times 50 / \text{多糖最高含量}$)

3.4 数据处理及分析 有关实验数据及其计算分析结果见表 4, 5。

表 4 麸炒薏苡仁炮制正交试验因素水平分析

No.	A	B	C	D	甘油三油酸酯 /%	多糖 /%	综合评分
1	1	1	1	1	0.847 1	4.19	91.26
2	1	2	2	2	0.834 2	2.60	72.65
3	1	3	3	3	0.909 8	4.43	97.23
4	2	1	2	3	0.963 2	3.55	90.07
5	2	2	3	1	0.862 6	3.26	81.57
6	2	3	1	2	0.919 2	4.05	93.43
7	3	1	3	2	0.869 6	2.40	72.23
8	3	2	1	3	0.665 5	2.27	60.17
9	3	3	2	1	0.885 7	2.60	75.32

由试验结果分析可知,对甘油三油酸酯及多糖含量影响因素大小依次为 $A > B > C$, 即炒制温度 >

表 5 方差分析表

方差来源	SS	MS	F	P
A	684.240	342.12	33.986	<0.05
B	483.341	241.671	24.007	<0.05
C	28.147	14.074	1.398	
误差	20.13	10.065		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00, f = 2$ 。

炒制时间 > 麸用量; 最佳炮制工艺为 $A_2B_3C_3$, 即生品薏苡仁于 210 ~ 220 °C, 炒制 60 s, 投麸量 100:20。由方差分析可知, A, B 因素为显著因素, 即炒制温度和炒制时间对甘油三油酸酯和多糖的含量变化有显著性影响。

3.5 最佳工艺验证试验 称取 3 份薏苡仁样品各 50 g, 以最佳工艺方法炒制, 并按 2.1.3, 2.2.6 项下要求制备各样品的供试品溶液。并于 2.1.4, 2.2.3 及 2.2.4 项下条件测定其甘油三油酸酯及多糖含量。结果见表 6。

表 6 验证试验

No.	甘油三油酸酯质量分数	多糖质量分数
1	0.886 2	3.93
2	0.898 3	3.89
3	0.887 5	4.03

结果表明, 3 份样品中甘油三油酸酯和多糖含量相对较高, 证明该工艺切实可行。

4 讨论与结论

现代药理研究表明, 薏苡仁中的薏苡仁油具有抗肿瘤的作用^[3], 其抗肿瘤的活性成分为甘油三酯类组分^[7], 此类成分极性较小, 分子量较大, 如采用气相色谱分离, 则需经皂化及甲脂化后才能实现, 为了能检测样品中所含实际成分的量, 希望选用高效液相色谱法。甘油三酯在紫外区基本无吸收, 采用紫外检测器进行检测(用 203 nm 作为检测波长), 其响应值太小, 基线噪音较大, 所以《中国药典》2005 年版一部中收载薏苡仁的含量测定方法, 采用了通用型检测器蒸发光散射检测器检测其中的甘油三油酸酯含量用以控制薏苡仁本身的质量。但是在使用此方法的过程中发现, 分析过程中色谱峰出现了大量的多重峰, 严重影响了积分的准确性, 进而很难准确的对薏苡仁中的甘油三油酸酯类成分进行含量测定。有文献报道新型的通用型检测器-电雾式检测器(CAD)在甘油三酯、胆固醇等类脂物质的最低检测限达到了 1 ng^[8]。因此, 选用了 CAD 应用于甘油三油酸酯的测定。结果操作简单、高灵敏度、重现性好, 适合薏苡仁中甘油三油酸酯的含量测定。

本实验中甘油三油酸酯的含量测定是在药典基础上建立起来的, 但在使用中为了更好地使对照品峰达到基线分离, 考察了乙腈-二氯甲烷的多个比例, 将流动相比例调整为乙腈-二氯甲烷(70:30), 从而使主要的色谱峰能够达到基线分离。

现有不少文献对多糖含量测定方法进行了研究, 结果发现同一样品用不同的标准溶液测得的含量值是不同的, 所以有必要对不同的标准品溶液进行考察^[9]。已有文献报道薏苡仁多糖是由鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖组成^[5], 因此在薏苡仁多糖含量测定方法的建立前比较了多种单糖的光谱图与薏苡仁多糖的光谱图, 发现葡萄糖的光谱图与薏苡仁多糖的光谱图最为接近。故选用葡萄糖作为薏苡仁多糖含量测定的标准品。

本试验以炒制温度、炒制时间、麦麸用量作为考察因素进行正交设计, 以甘油三油酸酯、薏苡仁多糖的含量为指标, 对麸炒薏苡仁的最佳炮制工艺进行优选, 筛选出最佳工艺为生品薏苡仁药材投麸量 100:20, 于 210 ~ 220 °C, 炒制 60 s。通过对最佳工艺的验证实验, 证明了该工艺确实可行, 该试验结果也为建立麸炒薏苡仁质量标准及工业化生产提供了依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 260.
- [2] 陆蕴, 张仲苗, 章荣华. 薏苡仁油抗肿瘤作用研究[J]. 中药药理与临床, 1999; 21.
- [3] Hideaki O, Yuko H, Tsuneatsu N, et al. Anti-inflammatory activity of benzoxazinoids from roots of *Coix lachryma-jobi* [J]. J Nat Prod, 1988, 51(1): 74.
- [4] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 131.
- [5] 徐梓辉, 周世文, 黄林清. 薏苡仁多糖的分离提取及其降血糖作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 578.
- [6] 段志芳, 章炜中, 黄丽华. 紫背天葵多糖提取与含量测定[J]. 中成药, 2007, 29(2): 274.
- [7] 李大鹏, 黄洁敏, 苏维埃, 等. 薏苡仁油脂的化学成分分析[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 2(10): 99.
- [8] MOREAU R A. The analysis of lipids via HPLC with a Charged Aerosol Detector[J]. Lipids, 2006, 41(7): 727.
- [9] 冯怡, 韩宁, 徐德生. 麦冬多糖含量测定方法的研究[J]. 中成药, 2006, 28(5): 705.

[责任编辑 全燕]