

综合评分法优化黑豆汁炖何首乌炮制工艺

田源红, 张丽艳*, 杨玉琴, 李 健, 徐兰楠

(贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002)

摘要:目的 优化黑豆汁炖何首乌炮制工艺。方法 以何首乌中二苯乙烯苷、多糖、大黄的含量为指标, 采用正交设计综合评分法优化黑豆汁炖何首乌的工艺。结果 优化所得工艺为炖 36 h, 干燥 9 h, 干燥温度 80。结论 合理优选出最佳的炮制工艺稳定。

关键词:何首乌; 炮制; 正交实验设计; 综合评分

中图分类号:R283.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0805(2007)03-0549-02

Optimization of Processed Techniques and Quality in Heshouwu Braised by Colligation Score

TAN Yuan-hong, ZHANG Li-yan*, YANG Yu-qin, LI Jian, XU Lan-nan

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

Abstract Objective To optimize the technologies of processing in Heshouwu braised. **Methods** The preparation was optimized by using orthogonal design which took the contents of polysaccharides, 2,3,5,4'-four hydroxy tow cinnamic - 2 - o - D - glycosides, emodin in Heshouwu. **Results** The optimized processing braising for 36 hours, drying 9 hours at 80 were the fairest for all the products. **Conclusion** It is successful to prepare on Heshouwu braised using the optimized technologies of processing.

Key words Heshouwu; Processing; Orthogonal design process; Colligation score

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb 的干燥块根。生品性平, 味苦涩, 微甘, 功能生津润燥, 解毒散结; 制品性变温, 味转甘, 具补肝肾、益精血、强筋骨、乌须发的作用。临床多采用制何首乌入药。何首乌中主要含蒽醌、二苯乙烯苷、卵磷脂、糖类等成分。蒽醌具有泻下作用; 二苯乙烯苷能降低血清中的胆固醇, 具有保肝作用; 卵磷脂是构成神经组织特别是脑脊髓的主要成分, 也是血球和其他细胞膜的原料, 能促进血液中细胞的新生, 具有良好的滋补作用, 还能使血糖升高, 有抗衰老、减轻动脉粥样硬化的作用^[1]; 多糖有良好的抗衰老、补益、强壮作用^[2]。《中国药典》2005版虽记载了何首乌的炮制方法, 但仅做了一般原则性的规定, 未规定其关键炮制工艺参数。本实验采用正交实验设计, 综合评分法, 按照 2005版《中国药典》方法炮制何首乌, 测定其多糖、二苯乙烯苷、大黄素指标, 优化出炮制工艺参数。

1 器材

1.1 药材 何首乌药材购于贵州省凯里地区施秉 GAP药材种植基地, 经我院周汉华副教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb 的干燥根。经鉴定、含量测定均符合 2005版《中国药典》(部)标准。

1.2 仪器 Agilent HP1100型高效液相色谱仪(美国), AB204-S型电子分析天平(万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司), AE240型电子分析天平(十万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司), Cintra-20紫外分光光度计(澳大利亚), CS-9301双波长飞点薄层扫描仪(日本岛津), CAMAG-Linomat-IV半自动点样仪(瑞士卡玛), 薄层色谱数码相机系统。

1.3 试剂 大黄素对照品(批号: 756-8902), 二苯乙烯苷对照品(批号: 110844-200404)均由中国药品生物制品检定所提供, 含量测定用。乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯, 硅胶 G板(青岛海洋化工厂)。苯酚试剂的制备: 取苯酚

500 g, 加铝片 0.5 g 与碳酸氢钠 0.25 g, 蒸馏收集 180 馏分, 称取此馏分 34 g, 加水 500 g 置棕色瓶中备用。

2 方法

2.1 黑豆汁的制备 取黑豆 100 g, 加水适量, 煮约 4 h, 熬汁约 150 g, 豆渣再加水煮约 3 h, 熬汁约 100 g, 合并黑豆汁约 250 g。

2.2 黑豆浸出率的测定 参照《中国药典》2005版水溶性浸出物含量测定项下方法测定, 结果 3 批次浸出物含量为 11.05% ~ 16.46% (n=2)。

2.3 炮制品 取何首乌片与黑豆汁拌匀, 闷润, 置蒸锅内密闭, 隔水分别炖至药物内外呈棕褐色, 取出, 干燥^[3]。每 100 kg 净何首乌片, 用黑豆 10 kg, 用正交实验方法, 按炖制时间、干燥温度、干燥时间作为考察的 3 个因素, 各取 3 个水平设计实验方案。炮制得到 9 个样品, 粉碎过 4 号筛, 备用。见表 1~2。

表 1 因素水平

水平	A	B	C
	炮制 t/h	干燥温度 T/	干燥 t/h
1	28	80	9
2	32	90	8
3	36	100	7

2.4 考察指标的测定

2.4.1 糖含量测定 参照《中国药典》2005版金樱子含量测定项下方法测定^[3]。结果见表 3。

2.4.2 二苯乙烯苷含量测定 参照《中国药典》2005版制何首乌含量测定项下方法测定^[3]。结果见表 3。

表 2 L₉(3)⁴ 正交实验方案

实验号	A	B	空列	C	实验方案
1	1	1	1	1	A ₁ B ₁ C ₁ 28 h, 80, 9 h
2	1	2	2	2	A ₁ B ₂ C ₂ 28 h, 90, 8 h
3	1	3	3	3	A ₁ B ₃ C ₃ 28 h, 100, 7 h
4	2	1	2	3	A ₂ B ₁ C ₃ 32 h, 80, 7 h
5	2	2	3	1	A ₂ B ₂ C ₁ 32 h, 90, 9 h
6	2	3	1	2	A ₂ B ₃ C ₂ 32 h, 100, 8 h
7	3	1	3	2	A ₃ B ₁ C ₂ 36 h, 80, 8 h
8	3	2	1	3	A ₃ B ₂ C ₃ 36 h, 90, 7 h
9	3	3	2	1	A ₃ B ₃ C ₁ 36 h, 100, 9 h

2.4.3 大黄素含量测定

收稿日期: 2006-08-25; 修订日期: 2006-12-20

基金项目: 贵阳市科技局筑科农字(Na [2004]8)

作者简介: 田源红 (1963-), 女(汉族), 贵州贵阳人, 现任贵阳中医学院副教授, 学士学位, 主要从事中药炮制工艺与质量标准研究工作。

*通讯作者简介: 张丽艳 (1964-), 女(汉族), 河南郑州人, 现任贵阳中医学院教授, 学士学位, 主要从事药物分析和新药开发研究工作。

薄层色谱条件:硅胶 G板 10 cm ×10 cm, 110 活化 1 h,原点状点样,展开剂为苯 醋酸乙酯 冰醋酸 (15 5 0.3)。

薄层扫描条件:双波长反射法锯齿扫描。S = 450 nm, R = 550 nm,狭缝宽度 0.4 mm ×0.4 mm。

对照品溶液的制备:精密称取大黄素标准品 14.9 mg置 50 ml容量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 0.298 mg/ml 大黄素对照品溶液。

供试品溶液的制备:取何首乌粗粉约 2 g,精密称定,置 150 ml平底烧瓶中,精密加入 95%乙醇 35 ml,加热回流至沸腾,并保持微沸 1 h。放冷后,取下,用干燥滤器滤过,置干燥蒸发皿中,在水浴上蒸至 10 ml以下,将浓缩后的滤液转移置 10 ml容量瓶中,定容至刻度,密闭,即得。

标准曲线的制备:用自动点样仪,分别将大黄素对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 μl 点于同一硅胶 G薄层板上,按上述条件展开,扫描,以峰面积积分为纵坐标,点样量为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程为: $A = 3.0562C + 808.63$, $r = 0.997$ 。结果表明,大黄素在 0.596 ~ 2.086 μg 范围内呈良好的线性关系。

样品含量测定:分别精密吸取大黄素对照品溶液 2.4 μl 供试品溶液 4 μl,分别交叉点于同一硅胶 G薄层板上,展开,同标准曲线项下操作,扫描,计算含量。结果见表 3。

2.4.4 醇溶性浸出物的测定 参照《中国药典》2005版醇溶性浸出物方法测定,结果醇浸物为 6.69% ~ 11.14%。

3 结果

综合指标的计算^[4]在多指标的优化实验中,有些指标欲求最大值(如多糖、二苯乙烯苷),而有些指标则越小越好(如大黄素)。多数情况下,这些指标之间可能出现矛盾,所以在优化过程中需对各个指标进行综合考虑和权衡。故设计一个综合指标“隶属度”,将各个指标统一综合考察,以综合指标进行直观分析和方差分析。在计算综合指标之前,需先将各指标进行“隶属度”计算。对于欲达到最大值的指标(如多糖、二苯乙烯苷)其指标隶属度 = (指标值 - 指标最小值) / (指标最大值 - 指标最小值)。对于要进行最小化的指标(如大黄素),其指标隶属度 = (指标最大值 - 指标值) / (指标最大值 - 指标最小值)^[5]。可见,指标最大值的隶属度为 1,而最小值隶属度为 0,所以 0 指标隶属度 1。如果各指标的重要性一样,就直接将各指标隶属度相加作为综合分数;如不一样就要求出加权和作为综合分数。根据各成分在何首乌中的重要性,考虑二苯乙烯苷占 40%、多糖占 40%、大黄素 20%的权重。于是每号实验的综合分数 = 多糖隶属度 × 40% + 二苯乙烯苷 × 40% + 大黄素 × 20%,满分为 1.00。评分结果和以综合分数作为总指标进行的直观分析。结果见表 3。

表 3 L₉(3)⁴实验结果与综合评分结果

实验号	A	B	空列	C	糖类成分 (%)	糖隶属度	二苯乙烯苷 (%)	二苯乙烯苷隶属度 (%)	大黄素 (%)	大黄素隶属度	综合分
1	1	1	1	1	26.46	0.00	2.26	1.00	0.4050	0.00	0.40
2	1	2	2	2	29.86	0.13	2.12	0.82	0.3970	0.08	0.40
3	1	3	3	3	32.14	0.21	1.79	0.40	0.3840	0.21	0.29
4	2	1	2	3	36.60	0.37	1.82	0.42	0.3520	0.54	0.42
5	2	2	3	1	40.49	0.52	1.65	0.21	0.3487	0.57	0.41
6	2	3	1	2	40.75	0.53	1.60	0.14	0.3295	0.77	0.42
7	3	1	3	2	45.80	0.71	1.57	0.10	0.3374	0.69	0.46
8	3	2	1	3	48.23	0.80	1.50	0.01	0.3138	0.93	0.51
9	3	3	2	1	53.56	1.00	1.49	0.00	0.3070	1.00	0.60
		A		B		空列		C			
K ₁		1.09		1.28		1.33		1.41			
K ₂		1.25		1.32		1.42		1.28			
K ₃		1.57		1.31		1.16		1.22			
极差 R		0.48		0.04		0.26		0.19			
因素主次		A > C > B									
优方案		A ₃ B ₃ C ₁									

表 4 方差分析

来源	SS	df	MS	F	P
A	0.0398	2	0.0199	398	<0.01
B	0.000267	2	0.0001335	2.67	>0.01
C	0.00627	2	0.003135	62.7	<0.05
误差	0.0001	2	0.00005		

$F_{0.05(2,2)} = 19; F_{0.01(2,2)} = 99$

由方差分析结果可知,各考察因素对制何首乌的质量影响大小顺序为 A > C > B, 炖时间、干燥时间均有显著性影响。干燥温度无显著性影响,故从节约能源考虑选择干燥温度 80。正交设计最佳实验方案为 A₃B₁C₁, 即炖 36 h, 干燥 9 h, 干燥温度 80。

验证实验为进一步验证所得工艺的可行性和稳定性,以炖 36 h, 干燥 9 h, 干燥温度 80 工艺,炮制 3 批样品,进行验证实验,所得实验结果见表 5,综合评价优于正交设计中各次实验,结果令人满意,说明优化成功。

4 讨论

何首乌中有效成分二苯乙烯苷、多糖,其含量应越高越好;结合性蒽醌是何首乌致泻的副作用成分,含量随着炮制时间延长而减少,其游离蒽醌开始时增加,20 h 后就开始减少,致使致泻作用减弱,游离蒽醌(大黄素)越低越好。炖 20 h 后何首乌几乎无毒

性。故传统认为黑豆汁炖何首乌 32 h 为佳^[6]。本实验中多糖含量随炮制时间而增加,与制何首乌补益作用更加突出相一致。二苯乙烯苷、大黄素随炮制时间增加而有所降低。根据各成分在何首乌中的重要性,考虑二苯乙烯苷占 40%、多糖占 40%、大黄素 20%的比例。综合评分得出影响因素主次为 A > C > B, 即炖时间 > 干燥时间 > 干燥温度。优选方案 A₃B₁C₁, 即炖 36 h, 干燥时间 9 h, 干燥温度 80 为佳。由方差分析结果可知,考察因素炖制时间对实验结果有级显著性影响,干燥时间对实验结果有显著性影响。

表 5 验证实验结果

实验号	多糖	二苯乙烯苷	大黄素	综合分
1	53.44	1.48	0.3012	0.60
2	53.23	1.51	0.3027	0.61
3	53.16	1.47	0.3014	0.59
平均	53.28	1.49	0.3018	0.60

为对实验结果进行综合评价,在处理实验数据时,引入了综合指标隶属度的概念,将具有不同考察范围的指标转变成具体数据,使之能综合出最优的炮制工艺参数。黑豆汁炖何首乌饮片:辅料黑豆汁的质量可以控制其水溶性浸出物,本实验黑豆汁水溶性浸出物为 11.05% ~ 16.46%;炮制工艺条件为炖 36 h, 干燥 9 h, 干燥



温度 80 。其醇溶性浸出物 6.69%~11.14%,二苯乙炔苷 1.49%~2.26%含量均大大高于《中国药典》2005 年版制何首乌的醇溶性浸出物不得少于 5.0%,二苯乙炔苷不得少于 0.7% 的限量规定。为申请黑豆汁炖何首乌饮片生产批准文号提供理论依据。

参考文献:

- [1] 龚千锋. 中药炮制学, 第 1 版 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 292
[2] 苗明三. 何首乌多糖对衰老模型小鼠组织的影响 [J]. 中国中医药

信息杂志, 2001, 8(9): 40

- [3] 国家药典委员会. 中国药典, 一部 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 123, 154.
[4] 李云雁, 胡传荣. 实验设计与数据处理, 第 1 版 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 90
[5] 胡容峰, 朱家壁, 彭代银, 等. 综合评价法优化复方丹参口腔速溶片制剂处方 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5): 380
[6] 叶定江, 张世臣, 潘三江. 中药炮制学, 第 1 版 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 348

正交设计研究葎草中总黄酮提取工艺

陈伟光¹, 盛静¹, 林霞¹, 屠婕红¹, 睢凤英¹, 尹秀²

(1. 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001; 2. 浙江大学医学院, 浙江 杭州 310006)

摘要:目的 研究葎草叶中总黄酮的提取工艺条件。方法 采用正交实验法, 以总黄酮含量为考察指标, 对葎草的总黄酮提取条件进行优选。结果 所考察的因素中, 葎草的提取工艺各因素影响程度为: 乙醇浓度 > 溶剂用量 > 提取时间; 最佳水平搭配为: A₂B₂C₁。结论 葎草中黄酮类成分提取的最适宜工艺为: 75% 乙醇, 料液比 1:15, 回流提取 2 次, 1 h/次。

关键词: 葎草; 总黄酮; 正交设计

中图分类号: R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805(2007)03-0551-01

Study on Extraction Technology for Flavonoids in *Humulus scandens* (Lour) Merr. by Orthogonal Design

CHEN Wei-guang¹, SHENG Jing¹, LIN Xia¹, TU Jie-hong¹, SUI Feng-ying¹, YIN Xiu²

(1. Medical School of Jiaxing University, Jiaxing, Zhejiang, 314001, China; 2. Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

Abstract: Objective To ascertain extraction technology condition for flavonoids from *Humulus scandens* (Lour) Merr. **Methods** The optimizing extraction condition on the basis of flavonoids were determined by orthogonal design. **Results** The order of factors which affected the flavonoid extraction was ethanol concentration > solvent quantity > extraction hours; the best level match was: A₂B₂C₁. **Conclusion** The optimum extraction conditions are 75% ethanol extracting with material and solvent ratio 1:15 for 1 hour in water bath for 2 times

Key words: *Humulus scandens* (Lour) Merr.; Total flavonoids; Orthogonal design

葎草为桑科植物 *Humulus scandens* (Lour) Merr 的全草。具清热解毒、利尿消肿等功效, 用于肺结核潮热、胃肠炎、痢疾、淋证、痔疮等证。据报道葎草全草含青兰苷、天门冬素、挥发油、鞣质及树脂; 葎草叶含木犀草素葡萄糖苷、大波斯菊苷、牡荆素等黄酮类成分^[1]。我们在研究葎草提取物的抗菌作用时发现, 其水提取液对革兰氏阳性菌具有较强的抗菌活性, 并证实抗菌作用与葎草中所含的黄酮类成分有关。本研究通过正交实验法考查了乙醇浓度、溶剂用量、提取时间三因素对葎草叶中总黄酮提取率的影响, 以确定其最佳提取条件, 为合理开发葎草资源提供科学依据。

1 仪器与材料

岛津 UV-2401PC 紫外分光光度计, SWB 5200 型超声清洗机 (上海必能信超声有限公司), 电子天平 (北京赛多利斯), 芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0080 9705), 其他试剂均为分析纯。葎草采自嘉兴郊区, 由本学院生药、天然药物化学教研室陈伟光老师鉴定。

2 方法与结果

2.1 标准曲线制备 精密称取干燥至恒重的无水芦丁 20 mg, 置 100 ml 的容量瓶中, 加 60% 的乙醇至刻度, 摇匀, 即得 0.20 mg/ml 对照品溶液。精密吸取该对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 ml, 分别置

25 ml 的容量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 ml, 摇匀, 放置 6 min, 加 10.0% 的硝酸铝溶液 1.0 ml, 摇匀, 放置 6 min, 加 4% 的氢氧化钠溶液 10.0 ml, 用 60% 的乙醇稀释至刻度, 摇匀, 静置 10 min 后于 512 nm 处测吸光度^[2]。以浓度为纵坐标, 吸光度值为横坐标进行线性回归, 得回归方程为: $A = 0.0114C + 0.0257$, $r = 0.9997$ 。线性范围: 0.4~2.0 mg/ml

2.2 样品提取与测定 分别称取葎草叶粉末 3.000 g, 以表 1 因素水平, 按 L₉(3⁴) 正交实验表选择的条件回流提取 2 次, 过滤, 合并提取液, 回收乙醇, 水浴蒸干, 70 °C 干燥 3 h, 干燥器中冷却后称重, 浸膏得率 (%) = 浸膏重 / 样品重 × 100%。结果见表 2。

表 1 因素水平

水平	A	B	C
	乙醇浓度 (%)	溶剂量 倍	提取 t/h
1	50	10	1
2	75	15	1.5
3	95	20	2

2.3 浸膏中总黄酮的测定 取葎草浸膏, 加 60% 乙醇, 超声助溶, 定容于 50 ml 的容量瓶中, 3 000 r/min 离心 15 min, 精密吸取上清液 1.00 ml, 按标准曲线制备项下处理测定黄酮含量。结果见表 3。

2.4 正交实验设计及结果 直观分析, 由表 2 可见, 乙醇浓度 (A) 对总黄酮提取影响最大, 溶剂用量 (B) 次之, 提取时间 (C) 影响最小, 几无影响。最优水平组合为 A₂B₃C₃ 即溶剂为 75% 乙醇、20 倍量溶剂、回流提取 2 h/次。

方差分析结果见表 4。由表 4 可见乙醇浓度对总黄酮提取

收稿日期: 2006-08-18; 修订日期: 2006-12-10

基金项目: 浙江省嘉兴市科技局基金资助项目 (No. 2005AY3042)

作者简介: 陈伟光 (1952-), 男 (汉族), 上海人, 现任嘉兴学院医学院副教授, 主要从事天然药物化学成分的提取分离和定量分析研究。