

醋商陆饮片的炮制工艺研究

陈琳, 吴皓*, 王媚, 陈海兵, 史闰均

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 确定醋商陆饮片的最佳炮制工艺。方法 选择炒制温度、炒制时间和加醋量 3 个因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 以 RP-HPLC 法测定炮制品中活性成分商陆皂苷甲的量, 以小鼠胃肠道试验评价刺激性毒性, 通过多指标综合评分法优选醋商陆的炮制工艺。结果 优选出的醋商陆炮制工艺为: 加入 30% 醋拌匀, 闷润至醋被吸尽, 于 120 °C 炒制 30 min。结论 优选出的醋商陆炮制工艺稳定可行, 重现性好。

关键词: 醋商陆; 商陆皂苷甲; 炮制工艺; 正交试验; 优选

中图分类号: R283.1; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1101-04

Processing technique of *Phytolaccae Radix* stir-baked with vinegar

CHEN Lin, WU Hao, WANG Mei, CHEN Hai-bing, SHI Run-jun

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: **Objective** To optimize the best processing technique of *Phytolaccae Radix* stir-baked with vinegar. **Methods** $L_9(3^4)$ orthogonal test was used with three factors: baked temperature, time, and vinegar amount. The content of esculentoside A was determined by RP-HPLC, and the mucosa irritation test of mice was detected. The processing technology was optimized by comprehensive evaluation. **Results** The optimized processing technology was satisfied with some conditions as the following: stir-baked with 30% vinegar for 30 min at the temperature of 120 °C. *Phytolaccae Radix* was moistened with vinegar to be exhausted. **Conclusion** The optimized processing technology of *Phytolaccae Radix* is stable and feasible with reliable repetition.

Key words: *Phytolaccae Radix* stir-baked with vinegar; esculentoside A; processing technique; orthogonal test; optimize

商陆为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb. 或垂序商陆 *P. americana* L. 的干燥根, 具有逐水消肿, 通利二便, 外用解毒散结等功效。常用于水肿胀满, 二便不通, 外治痈肿疮毒^[1]。因商陆有毒, 一般需经炮制后内服。目前商陆的炮制工艺以醋炙为主, 但在全国范围内其炮制工艺很不统一, 辅料比例和炮制程度没有明确的规定, 导致醋商陆饮片的质量不同, 进而影响了其临床应用效果。

研究表明商陆的主要活性成分为商陆皂苷, 其具有显著的抗炎、诱生 γ -干扰素、增强白细胞的吞噬功能、促进 DNA 转化、抗生育和杀钉螺等作用^[2]。而商陆总皂苷 (esculentosides) 又以商陆皂苷甲 (esculentoside A) 为主^[3]。此外, 《中国药典》2010 年版中商陆项下亦增加了商陆皂苷甲的含量测定项。故选择商陆皂苷甲作为正交试验确定最佳炮制

工艺的指标性成分。

商陆有毒, 中毒者一般在服药后 0.5~3 h 发病, 主要表现为胃肠道反应, 如恶心呕吐、腹痛腹泻, 严重者可出现胃肠道糜烂、溃疡及出血, 呈现呕血、便血等症状^[4-7]。故进行正交试验时还选择了小鼠胃肠道试验作为刺激性毒性效应指标, 综合上述化学指标, 对商陆醋炙过程中的炒制温度、炒制时间和加醋量 3 个主要因素进行了考察, 采用多指标评分法对醋商陆饮片的炮制工艺进行了优选。

1 仪器与材料

Waters 515 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司, 含 ELSD 检测器), Spring-S15i 超纯水发生器 (锐思捷科学仪器有限公司); r-911 全自动放免计数器 (中国科技大学实业总公司); 7160 全自动生化仪 (日本日立); BP211D 电子天平 (德国 Sartorius

收稿日期: 2010-12-01

基金项目: 国家中医药管理局公益性行业专项基金项目 (200807039)

作者简介: 陈琳 (1985—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药炮制工艺及质量标准研究。E-mail: chenliner198506@163.com

*通讯作者 吴皓 Tel: (025)86798163 E-mail: whao5795@vip.sina.com

公司); Smart Sensor AR300 红外测温仪(香港希玛公司); 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); KQ—500DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 80—2B 离心机(上海安亨科学仪器厂); S10 手提高速匀浆机(上海京工实业有限公司)。

商陆生品购自安徽省亳州市永刚饮片有限公司(山西产, 批号 20100122), 经南京中医药大学药学院中药鉴定教研室王春根教授鉴定为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb. 的干燥块根。醋商陆自制。醋为镇江恒顺香醋^[8](江苏恒顺醋业股份有限公司, 批号 20100313)。

商陆皂苷甲对照品(质量分数 $\geq 98.0\%$, 批号 09072431, 上海同田生物技术有限公司), 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。总蛋白试剂盒(批号 20100926, 中生北控股份有限公司); 前列腺素 E_2 (PGE_2) 放免分析试剂盒(批号 20101025, 北京华英生物技术研究所)。

ICR 雄性小鼠, 体质量(20 ± 2) g, SPF 级。由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号 SCXK(沪) 2007-0005。

2 方法与结果

2.1 商陆皂苷甲的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Lichrospher C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-0.4%乙酸(65:35), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L。ELSD 条件: 漂移管温度 90 $^{\circ}$ C, 载气体积流量 2.5 L/min。在该色谱条件下, 信噪比最佳, 商陆皂苷甲与相邻色谱峰分离度良好, 对照品和样品的 HPLC 图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取商陆皂苷甲对照品适量, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 510.4 μ g/mL 商陆皂苷甲对照品储备液。

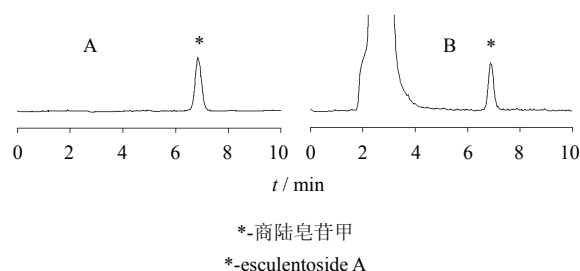


图1 对照品(A)和醋商陆(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and *Phytolacca Radix* stir-baked with vinegar (B)

2.1.3 供试品溶液的制备 取醋商陆粉末(过3号筛)约1 g, 精密称定, 置25 mL具塞锥形瓶中, 精密加入50%乙醇25 mL, 称定质量, 超声处理(功率500 W, 频率40 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用50%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密量取商陆皂苷甲对照品储备液1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL, 分别以甲醇定容至10 mL量瓶中, 摇匀, 得质量浓度分别为51.04、102.08、204.16、306.24、408.32、510.40 μ g/mL系列对照品溶液。各精密吸取20 μ L注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积的自然对数对进样量的自然对数进行线性回归, 得回归方程 $Y = 1.452 X + 9.217 8$, $r = 0.999 5$, 表明商陆皂苷甲在1.21~12.08 μ g其自然对数值与峰面积自然对数值呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取255.2 μ g/mL商陆皂苷甲对照品溶液20 μ L注入高效液相色谱仪, 重复进样5次, 计算得峰面积的RSD为1.9%。

2.1.6 稳定性试验 取醋商陆粉末(过3号筛)约1 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 室温下自然放置, 分别于0、2、4、6、12 h进样测定, 计算得峰面积的RSD为1.8%, 表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.1.7 重现性试验 取醋商陆粉末(过3号筛)约1 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 平行5份, 分别进样测定, 计算得商陆皂苷甲质量分数的RSD为1.4%。

2.1.8 加样回收试验 精密称取醋商陆粉末(过3号筛)共5份, 每份约0.5 g, 分别精密加入商陆皂苷甲对照品3.2 mg, 制备供试品溶液, 测定, 计算得商陆皂苷甲的平均回收率为99.45%, RSD为2.8%。

2.1.9 样品测定 取正交试验制备的9份醋商陆样品, 制备供试品溶液, 分别精密吸取255.2 μ g/mL对照品溶液10、20 μ L, 供试品溶液20 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 用外标两点法自然对数方程计算商陆皂苷甲的量, 结果见表1。

2.2 小鼠胃肠道刺激性试验

2.2.1 样品制备 取醋商陆饮片100 g, 加水800 mL煎煮30 min, 滤过。滤渣再加水600 mL煎煮30 min, 滤过。合并滤液, 浓缩至100 mL, 得1 g/mL水煎液, 作为原液。

2.2.2 小鼠胃肠道刺激性试验 ICR小鼠试验前禁食(不禁水)12 h, 按体质量随机分为9组, 每组10只。每只小鼠按23.4 g/kg的剂量(相当于临床

日用剂量的 20 倍) ig 给药 1 次。3 h 后采集小鼠的胃, 沿胃大弯剪开, 生理盐水冲洗内外壁, 滤纸吸干残留液体, 称质量。加入适量的生理盐水, 匀浆 (4 ℃), 得 10% 匀浆液, 于 3 500 r/min 离心 10 min, 上清液置 -80 ℃ 冰箱保存。检测样本按 PGE₂ 放免分析试剂盒说明的方法进行处理, 在放免液闪计数器上检测^[9-11]。所得含量用蛋白质浓度加以校正, 结果见表 1。

2.3 正交试验

考虑到商陆传统工艺中常用铁锅, 且铁元素对人体影响较小, 又适合工厂生产, 成本较低, 故选用铁锅作为炮制工具。根据相关预试验, 将炒制温度 (A)、炒制时间 (B) 和辅料用量 (C) 作为考察因素, 各因素分别安排 3 个水平进行试验, 选用 L₉ (3⁴) 正交表安排试验 (表 1)。

取 9 份大小均一的净生商陆饮片各 300 g, 按

表 1 L₉ (3⁴) 正交试验设计表及结果
Table 1 Results of L₉ (3⁴) orthogonal test

试验号	A/℃	B/min	C/%	D (空白)	商陆皂苷甲/%	小鼠胃组织 PGE ₂ /(pg·mg ⁻¹)
1	80 (1)	20 (1)	20 (1)	(1)	0.720 7	4.224 0
2	80 (1)	30 (2)	30 (2)	(2)	0.803 9	4.783 6
3	80 (1)	40 (3)	40 (3)	(3)	0.680 9	4.959 4
4	120 (2)	20 (1)	30 (2)	(3)	0.852 7	4.702 7
5	120 (2)	30 (2)	40 (3)	(1)	0.826 7	4.703 0
6	120 (2)	40 (3)	20 (1)	(2)	0.793 1	4.297 6
7	160 (3)	20 (1)	40 (3)	(2)	0.747 5	4.626 3
8	160 (3)	30 (2)	20 (1)	(3)	0.776 9	4.299 7
9	160 (3)	40 (3)	30 (2)	(1)	0.808 9	5.146 2
K ₁	2.205 6	2.320 9	2.290 6	2.356 2		
K ₂	2.472 4	2.407 5	2.465 5	2.344 5		
K ₃	2.333 2	2.282 8	2.255 1	2.310 4		
R _k	0.266 8	0.124 7	0.210 4	0.045 8		
J ₁	13.967 1	13.553 0	12.821 2	14.073 2		
J ₂	13.703 3	13.786 2	14.632 6	13.707 4		
J ₃	14.072 2	14.403 2	14.288 7	13.961 8		
R _j	0.368 9	0.850 2	1.811 3	0.365 8		

表 1 正交试验设计, 加入不同比例的醋拌匀, 闷润至醋被吸尽。于电磁炉上将铁锅加热到一定温度, 投药, 不断翻炒, 用红外线测温仪测量铁锅底部的温度, 炒至一定程度时, 取出, 放凉。共炒制得 9 份醋商陆样品。

2.4 结果分析

2.4.1 直观分析 由极差值 R_k 可知, 在炮制过程中各因素对醋商陆中商陆皂苷甲量的影响程度依次为: A>C>B>D, D 为误差项, 即影响醋商陆饮片中有有效成分量的主要因素依次为炒制温度、辅料用量和炒制时间。由极差值 R_j 可知, 各因素对小鼠胃组织中 PGE₂ 量的影响程度依次为: C>B>A>D, D 为误差项, 即影响醋商陆饮片刺激性毒性的主要因素依次为辅料用量、炒制时间和炒制温度。

2.4.2 方差分析 对商陆皂苷甲的量进行方差分析, 结果表明因素 A 和 C 对醋商陆饮片的质量有显著影响 ($P<0.05$), 因素 B 对其无显著影响。对受试小鼠胃组织 PGE₂ 的量进行方差分析, 结果表明因素 C 对醋商陆饮片的质量有显著影响 ($P<0.05$), 因素 A 和 B 对其无显著影响, 结果见表 2。

2.4.3 最佳工艺的确定及验证 商陆皂苷甲是商陆的有效成分, 也是商陆中量最高的单体成分, 因此将其作为筛选醋商陆炮制工艺的主要指标。小鼠胃肠道刺激性试验由于动物个体差异性等因素影响, 结果具有不确定性, 故将其作为筛选醋商陆炮制工艺的辅助指标。

从商陆皂苷甲质量分数来看, 最佳炮制工艺组合为 A₂B₁C₂ 或 A₂B₂C₂。再从小鼠胃肠道刺激性毒

表2 商陆皂苷甲和小鼠胃组织 PGE₂ 的方差分析Table 2 Analysis of variance about esculentoside A and PGE₂ in mouse stomach tissue

方差来源	商陆皂苷甲					小鼠胃组织 PGE ₂				
	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.011 9	2	0.005 9	31.536 2	$P<0.05$	0.024 1	2	0.012 0	1.027 9	—
B	0.002 7	2	0.001 4	7.211 8	—	0.128 6	2	0.064 3	5.492 2	—
C	0.008 5	2	0.004 2	22.426 5	$P<0.05$	0.616 9	2	0.308 4	26.335 5	$P<0.05$
D (误差)	0.000 4	2	0.000 2			0.023 4	2	0.011 7		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

性来看,这两种炮制工艺中,A₂B₂C₂组合所得醋商陆毒性更低,故将此作为醋商陆的最佳炮制工艺,即:加入30%醋拌匀,闷润至醋被吸尽,于120℃炒制30 min,取出,放凉。重复最佳炮制工艺,得到样品中商陆皂苷甲的质量分数为0.83% ($n=3$),受试小鼠胃组织 PGE₂ 的量为(4.71±0.26) pg/mg ($n=10$)。可知优选出的最佳工艺较稳定。

3 讨论

胃黏膜细胞分泌的 PGE₂ 是一种内源性介质,也是当前公认的胃黏膜保护因子。作为一种局部激素,其通过抑制胃酸分泌,增加黏膜血流,促进胃黏膜和碳酸氢盐分泌,促进蛋白质合成和细胞更新,介导适应性细胞保护作用,从而间接减少黏膜损伤。PGE₂ 量减少,易于导致胃黏膜的损伤^[12-14]。本实验采用受试小鼠胃组织中 PGE₂ 作为刺激性毒性效应指标,在化学指标——商陆皂苷甲的基础上,来辅助筛选醋商陆的炮制工艺。实验结果显示,商陆经醋炙后其商陆皂苷甲的量升高,刺激性毒性降低,即达到了减毒增效的炮制目的。

本实验优选出的炮制工艺中辅料用量与《中国药典》2010年版商陆炮制方法项下辅料用量相符合^[1]。

为何商陆经醋炙后其中的商陆皂苷甲量会升高,笔者认为可能是炮制过程破坏了商陆中可水解商陆皂苷甲的酶,从而保护了商陆皂苷甲,即起到了杀酶保苷的作用。而有些组别的醋商陆中商陆皂苷甲的量低于生商陆(商陆皂苷甲为0.64%),笔者分析是由于商陆皂苷甲在醋的作用下发生了水解,这种水解作用与杀酶保苷作用相互竞争。有关此方面的内容笔者将做进一步的深入研究,以期弄清楚商陆醋制解毒增效的机制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [3] 张剑春, 陈志强. 商陆属植物根有效成分含量比较 [J]. 中草药, 1994, 25(3): 126-127.
- [4] 白志华. 切莫误把商陆当人参 [J]. 中国食品药品监管, 2009, 12: 73.
- [5] 沈广顺, 郭秀英, 周立新, 等. 一起群体急性商陆中毒的调查分析 [J]. 中国城乡企业卫生, 2009, 2: 21.
- [6] 吴兆盟, 李 燕. 商陆误服中毒分析及其混淆品种鉴别 [J]. 中国药业, 2008, 17(18): 60.
- [7] 郭宝科, 张凤琴, 张 黎, 等. 急性商陆中毒10例临床分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18(1): 32.
- [8] 陈 琳, 吴 皓, 王 媚, 等. 中药炮制辅料醋中总酸和乳酸的含量测定 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(9): 52-54.
- [9] 郭晓明, 夏 天, 张 波, 等. 益味冲剂和米索前列醇对大鼠胃黏膜 PGE₂ 及血流量的影响 [J]. 西北国防医学杂志, 2003, 24(4): 280-282.
- [10] 孟德胜, 汪仕良. 槲皮素对烫伤大鼠胃黏膜 PGE₂ 代谢的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(10): 1202-1204.
- [11] 孟德胜, 汪仕良. 烫伤对大鼠肠黏膜内花生四烯酸代谢物的影响 [J]. 第三军医大学学报, 1999, 11: 817.
- [12] Gyires K. Gastric mucosal protection: from prostaglandins to gene-therapy [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(2): 203-215.
- [13] Cryer B. Role of prostaglandins in the stomach and duodenum [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2001, 30(4): 877-894.
- [14] Wallace J L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research [J]. *Am J Med*, 2001, 110(1A): 19S-23S.