

基于响应面法的天麻产地加工炮制一体化工艺研究

单鸣秋^{1,2}, 钱 岩^{1,2}, 于 生^{1,2}, 张 丽^{1,2}, 丁安伟^{1,2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘 要: 目的 利用响应面法优选天麻产地加工的一体化工艺。方法 采用 Box-Behnken 中心组合设计方法对一体化加工工艺中蒸制时间、干燥温度和干燥时间 3 个因素进行考察, 以天麻中 5 个指标性成分天麻素及巴利森苷 A、B、C、E 质量分数的综合评分作为考察指标进行产地加工一体化工艺优化研究。结果 最佳一体化加工工艺为蒸制 30 min, 60 ℃干燥 12 h。结论 响应面法优选天麻产地加工一体化工艺简便易行, 准确度较好, 为中药饮片生产提供了科学的依据和新颖的思路。

关键词: 天麻; 响应面法; 天麻素; 巴利森苷 A; 巴利森苷 B; 巴利森苷 C; 巴利森苷 E; 加工炮制一体化

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)03-0420-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.011

Study on integrative technology of primary processing for *Gastrodiae Rhizoma* based on response surface methodology

SHAN Ming-qiu^{1,2}, QIAN Yan^{1,2}, YU Sheng^{1,2}, ZHANG Li^{1,2}, DING An-wei^{1,2}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To optimize the integrative technology of primary processing for *Gastrodiae Rhizoma* by response surface methodology. **Methods** The single factor experiment combined with Box-Behnken design was used to optimize the integrative technology, with five major characteristic components (gastrodin, parishin A, parishin B, parishin C, and parishin E) as indexes, in order to detect three factors (steaming time, drying time, and drying temperature), and optimize the primary processing of *Gastrodiae Rhizoma*. **Results** Optimum percolation process was as follows: *Gastrodiae Rhizoma* was steamed for 30 min, and dried for 12 h at 60 ℃. **Conclusion** This optimized integrative technology of *Gastrodiae Rhizoma* is reasonable and feasible, and with high accuracy. It could provide the scientific basis and innovative idea to the large-scale production of decoction pieces of Chinese Materia Medica.

Key words: *Gastrodiae Rhizoma*; response surface methodology; gastrodin; parishin A; parishin B; parishin C; parishin E; integrative technology of primary processing

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎。列于《神农本草经》上品, 为我国传统贵重药材。天麻性甘、平, 归肝经, 有平肝息风止痉的功效, 临床上主要用于头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风等的治疗^[1]。《中国药典》2010 年版规定: “立冬后至次年清明前采挖, 洗净, 蒸透, 敞开低温干燥” 制成天麻药材; 天麻药材“洗净, 润透或蒸软, 切薄片, 干燥” 制成天麻饮片。由此可见, 在制成饮片之前, 天麻经历了药材产地

加工阶段和饮片炮制阶段共 2 次“水处理-干燥”过程。天麻中含有较多水溶性的有效成分, 在这种多次蒸(润)-干燥过程中极易损失。此外, 目前有关天麻的产地加工或饮片炮制工艺研究中, 大多以天麻素单一成分为指标, 忽视了其他成分, 尤其是质量分数较高且具有一定生物活性的成分^[2-5]。基于上述考虑, 本实验以天麻素(G)、巴利森苷 A(PA)、巴利森苷 B(PB)、巴利森苷 C(PC) 和巴利森苷 E(PE) 为指标成分, 运用 Box-Behnken 中心组合

收稿日期: 2015-08-26

基金项目: 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心项目(ZDXM-1-3); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 单鸣秋(1978—), 男, 副教授, 博士, 主要从事中药炮制及饮片质量标准研究。Tel: (025)85811519 E-mail: shanmingqiu@163.com

*通信作者 丁安伟(1950—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制研究。Tel: (025)85811523 E-mail: awding105@163.com

设计方法,将药材产地加工和饮片炮制合二为一,采用 1 次“水处理-干燥”过程,优选天麻产地加工炮制一体化工艺。

1 仪器与试药

Agilent 1220 型高效液相色谱仪,包括四元梯度泵、手动进样器、柱恒温系统; Shimadzu Librorael-40SM 型电子分析天平,精确到 0.01 mg。

G 对照品(批号 00256-2013),购自南京泽朗医药科技有限公司; PA(批号 2014-0078)、PB(批号 2014-0079)、PC(批号 2014-0080)、PE(批号 2014-0081)对照品,购自南京森贝伽生物科技有限公司;上述对照品经 HPLC 法检测,质量分数均 $\geq 98.0\%$ 。甲醇为色谱纯,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

天麻采自安徽省六安市霍山县,经南京中医药大学吴啟南教授鉴定,为兰科天麻属植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 指标成分的定量测定

2.1.1 色谱条件^[6] Hypersil C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相为 0.5%醋酸水溶液(A)-0.5%醋酸甲醇溶液(B),线性梯度洗脱:0~10 min, 98% A; 10~60 min, 98%~60% A; 60~75 min, 60% A; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 270 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取各对照品适量,加水制成含 G 1.298 mg/mL、PA 1.927 mg/mL、PB 1.696 mg/mL、PC 1.203 mg/mL、PE 1.714 mg/mL 的混合对照品贮备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 3 号筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 50 mL,放置 2 h,时时振摇,称定质量,加热回流 3 h,放冷,再称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,浓缩至近干,残渣加甲醇-水(3:97)混合溶液溶解,转移至 25 mL 量瓶中。用甲醇-水(3:97)混合溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.2”项下的混合对照品贮备液,分别精密量取 4、2、1、0.5、0.25 mL,置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,配制成 1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#]系列对照品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下,分别进样 20 μ L,每个质量浓度进样 3 次,测定峰面积值。以峰面积平均值与质量浓度进行线性

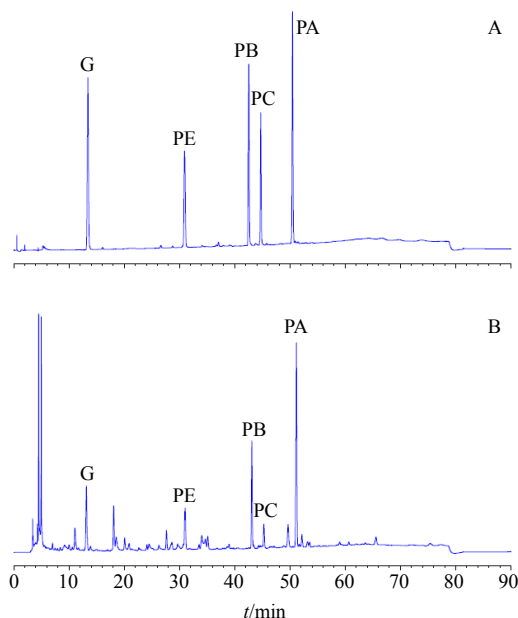


图 1 混合对照品(A)和天麻样品(B)溶液的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A) and *Gastrodiae Rhizoma* sample (B) solution

回归,得回归方程: $G Y=4.12 X-15.18$, $r=0.999 7$, 线性范围 32.45~519.20 μ g/mL; $PA Y=2.72 X+16.36$, $r=0.999 5$, 线性范围 48.18~770.80 μ g/mL; $PB Y=2.56 X-3.64$, $r=0.999 9$, 线性范围 42.40~678.40 μ g/mL; $PC Y=2.69 X-14.88$, $r=0.999 9$, 线性范围 30.08~481.20 μ g/mL; $PE Y=1.89 X-4.19$, $r=0.999 8$, 线性范围 42.85~685.60 μ g/mL。

2.1.5 精密度试验 精密吸取 3[#]对照品溶液 20 μ L,连续进样 6 次,记录色谱图。G、PA、PB、PC、PE 的峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明进样精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取 3[#]对照品溶液 20 μ L,12 h 内每间隔 2 h 进样 1 次,记录色谱图。G、PA、PB、PC、PE 的峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明 12 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取 1 号试验样品 6 份,照“2.1.3”项方法制备供试品溶液,进行测定。G、PA、PB、PC、PE 质量分数的 RSD 均小于 3.0%,表明重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取 1 号试验样品 1 g,精密加入混合对照品溶液(含 G 4.745 mg/mL、PA 15.76 mg/mL、PB 8.012 mg/mL、PC 1.548 mg/mL、PE 6.480 mg/mL) 1 mL,制备成供试品溶液,平行操作 6 份。进样测定, G、PA、PB、PC、PE 的平均回收率在 97.25%~102.56%, RSD 均小于 3.0%。

2.2 天麻产地加工炮制一体化的具体工艺

立冬至次年清明前采挖天麻，立即洗净，取 50 kg，蒸房中蒸制若干时间后切薄片，置烘箱中按设定温度干燥若干时间，取出，即得天麻饮片，制成粉末，备用。

2.3 响应面法优化试验设计与结果^[7-8]

根据 Box-Behnken 的实验设计原理，以蒸制时间 (A)、干燥温度 (B)、干燥时间 (C) 3 个因素为自变量，每个因素取 3 个水平，进行 3 因素 3 水平试验。G、PA、PB、PC、PE 的权重系数分别为 40%、15%、15%、15%、15%。在此基础上进行总加权评分，利用总得分 (T) 对试验结果进行分析：以 X 表示试验中指标成分的质量分数，以各成分质量分数的最大值 ($X_{\max}$) 作为参照对同一指标的各数据进行标准化处理， S 表示试验中该指标成分测定值的标准化数据 ($S=X/X_{\max}$)。因此， $T=S_G \times 40\% + S_{PA} \times 15\% + S_{PB} \times 15\% + S_{PC} \times 15\% + S_{PE} \times 15\%$ 。结果见表 1。

采用 Design-Expert 8.0 软件对表 1 结果进行响应面回归分析，以总得分对 A、B、C 3 因素进行二元多项回归，得到拟合方程： $T=0.85+0.024 A-0.008 66 B-0.047 C-0.023 AB-0.087 AC+0.008 9 BC-0.027 A^2-0.12 B^2-0.078 C^2$ 。

方差分析及回归系数显著性检验结果见表 2，拟合得到的回归方程 $P<0.01$ ，表明该模型在本实验研究范围内有统计学意义。因素 C、AC、 B^2 、 C^2 对响应值的影响都是显著的 ($P<0.05$)，因此各因素对响应值的影响不是简单的线性关系，所选因素之间存在着显著的交互作用。本模型极显著 ($P<0.01$)，失拟项 $P=0.137>0.05$ ，失拟项相对于绝对误差不显著，说明该回归模型与实验数据拟合程度

表 1 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 1 Design and results of Box-Behnken response surface method

试验号	A/min	B/℃	C/h	质量分数/%					T
				G	PA	PB	PC	PE	
1	10	50	15	0.49	1.57	0.83	0.17	0.69	0.725
2	20	60	15	0.55	2.06	0.97	0.21	0.60	0.812
3	20	70	18	0.34	1.52	0.73	0.17	0.71	0.633
4	30	60	12	0.79	2.06	0.91	0.24	0.57	0.938
5	20	50	12	0.48	1.76	0.79	0.18	0.55	0.704
6	20	60	15	0.58	2.13	0.95	0.21	0.59	0.826
7	20	50	18	0.36	1.25	0.69	0.14	0.64	0.591
8	30	60	18	0.43	1.46	0.80	0.18	0.61	0.671
9	20	60	15	0.62	2.11	0.99	0.21	0.63	0.867
10	10	70	15	0.38	2.06	0.91	0.19	0.62	0.713
11	10	60	12	0.40	2.02	0.76	0.16	0.50	0.654
12	30	70	15	0.42	1.12	0.70	0.19	0.66	0.650
13	20	70	12	0.45	2.29	0.79	0.19	0.45	0.710
14	20	60	15	0.65	2.12	0.98	0.21	0.64	0.882
15	20	60	15	0.63	2.12	1.00	0.22	0.68	0.889
16	30	50	15	0.54	1.72	0.82	0.24	0.47	0.756
17	10	60	18	0.52	1.74	0.81	0.17	0.60	0.735

较高，实验误差小，可以采用其优选天麻一体化加工工艺。

利用 Design-Expert 8.0 软件进行拟合，直观了解各因素之间两两交互作用对天麻药材、饮片一体化加工工艺的影响，见图 2。

蒸制时间与干燥温度、干燥温度与干燥时间交互作用响应面图坡度平缓，说明这两个交互作用较弱，对天麻中考察的化学成分量的影响较小。蒸制时间与干燥时间的交互作用响应面图坡度较陡，说

表 2 回归模型方差分析结果

Table 2 Analysis of variance in regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.150	9	0.017	7.290	0.008	A^2	0.003	1	0.003	1.330	0.286
A	0.004	1	0.004	1.960	0.204	B^2	0.058	1	0.058	25.290	0.002
B	0.001	1	0.001	0.260	0.624	C^2	0.026	1	0.026	11.370	0.012
C	0.018	1	0.018	7.780	0.027	残差	0.016	7	0.002		
AB	0.002	1	0.002	0.950	0.361	失拟项	0.011	3	0.004	3.340	0.137
AC	0.030	1	0.030	13.330	0.008	误差	0.005	4	0.001		
BC	0.000	1	0.000	0.140	0.720	总离差	0.170	16			

$P<0.05$ 为显著性差异; $P<0.01$ 为极显著性差异

$P<0.05$ significant difference; $P<0.01$ more significant difference

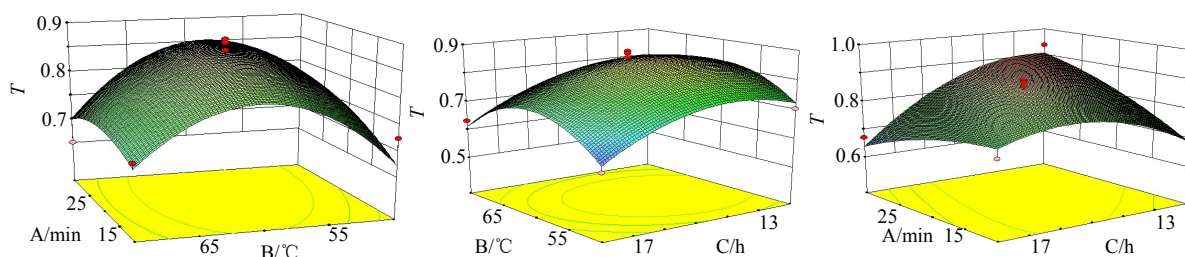


图 2 蒸制时间、干燥温度和干燥时间的交互作用响应面图

Fig. 2 Response surface plot of steaming time (A), drying temperature (B), and drying time (C) for their mutual interaction

明蒸制时间与干燥温度的交互作用较强，对饮片中考察的化学成分影响显著。

根据 Design-Expert 8.0 软件分析计算，天麻加工的最佳工艺为蒸制时间为 30 min，干燥温度为 58.310 °C，干燥时间 12.4 h，理论计算得分为 0.912，为方便实验操作，将最佳工艺修正为蒸制 30 min，60 °C 干燥 12 h。

2.4 验证试验

取天麻，按照优化出的最佳一体化工艺加工，打粉，筛过，制备供试品溶液，经 HPLC 法测定 G、PA、PB、PC、PE 的量，得出加权后的综合得分为 0.938，与预测值 0.912 的相对误差为 2.85%。证明了回归模型较为准确可靠，优化出的一体化加工工艺具有重复性和可操作性。

2.5 与传统工艺的比较

以《中国药典》2010 年版中对天麻产地加工和饮片炮制的描述为准则，结合对天麻种植基地的走访调查，制备天麻传统加工工艺样品（传统饮片加工工艺是将天麻药材采集后洗净，蒸透，敞开低温干燥，再洗净，润透或蒸软，切薄片，干燥。整个过程需要蒸两次，干燥两次，才能加工成天麻饮片）。以 5 个指标性成分质量分数为指标，初步比较一体化工艺产品与传统工艺产品在化学成分上的差异。结果见表 3。

3 讨论

天麻素是天麻中主要有效成分，多项药理研究表明天麻素具有镇痛的作用，临床上多用于治疗头痛、眩晕、神经痛、肢体麻木、手足不遂、冠心病、心绞痛等^[9-14]，《中国药典》2010 年版亦是以天麻素作为指标评价天麻饮片的质量。巴利森苷 A、B、C、E 为天麻素与柠檬酸结合而成的酯类衍生物，在天麻药材、饮片中的量较高，甚至高于天麻素，同时亦为天麻中主要入血成分^[15]。因此，在研究中以这 5 个成分作为指标，优选最佳加工工艺。

表 3 产地加工炮制一体化工艺验证及与传统工艺比较

Table 3 Comparison on integrative technology of processing and traditional processing

工艺	质量分数/%				
	G	PA	PB	PC	PE
一体化工艺 1	0.82	2.08	0.92	0.22	0.58
一体化工艺 2	0.73	1.96	0.88	0.25	0.55
一体化工艺 3	0.81	2.07	0.94	0.23	0.59
一体化工艺均值	0.79	2.04	0.91	0.23	0.57
传统工艺	0.39	1.12	0.64	0.15	0.54

在响应面法试验之前，对蒸制时间、干燥温度和干燥时间进行了单因素考察，以确定各因素合适的水平。通过 5 个成分质量分数的总得分比较，选择了蒸制时间 20 min、干燥温度 60 °C 和干燥时间 15 min 作为中心点。

从“2.5”项试验结果可以发现，5 个成分在一体化产品中的量均明显高于传统工艺产品。由此可见，在与天麻功效相关、反映天麻饮片质量的 5 个指标性成分质量分数方面，一体化工艺优于传统工艺。分析其原因，可能是一体化工艺采用 1 次“蒸制-干燥”，而非传统工艺的 2 次“水处理-干燥”过程，避免或减少了这些水溶性较强的指标性成分的损失。此外，采用一体化工艺可以省去中间的储藏环节，避免了储藏仓库的建设和占用以及此环节可能引起的有效成分的损失与中药材的损耗；可以减少中间的加工环节和物流运输环节，进而减少人力资源和能源的消耗，降低中药饮片加工成本。总之，中药饮片产地加工炮制一体化的实施，能够促进中药材生产和中药饮片市场的快速接轨，减少社会资源与人力资源的不必要浪费，提高中药饮片的品质，推进中药饮片市场向健康方向发展，使中药材种植和饮片炮制加工从传统低效落后的困境中解脱出来，成为高效产业。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 宋 熾, 朱俊杰, 罗 书. 常压蒸制法炮制天麻的工艺研究 [J]. 中成药, 2008, 30(7): 1016-1018.
- [3] 刘 毅, 张丽艳, 谢 宇, 等. 天麻最佳炮制工艺的综合评分法研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 378-379.
- [4] 李德勋, 陈 桂, 肖顺经, 等. 正交试验法优选鲜天麻的蒸制干燥工艺 [J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(2): 56-57.
- [5] 陆建玲. 天麻炮制工艺的革新 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(1): 24-25.
- [6] 王 莉. 天麻化学物质基础及质量控制方法研究 [D]. 大连: 中国科学院研究生院 (大连化学物理研究所), 2007.
- [7] 黄文青, 高 明, 刘 松, 等. 响应面法优化蒸制姜半夏的炮制工艺 [J]. 中药材, 2015, 38(7): 1403-1407.
- [8] 陈林伟, 秦昆明, 王 琴, 等. Box-Behnken 响应面法优选气血双补酒的渗漉提取工艺 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1151-1155.
- [9] 刘艳华. 天麻素注射液治疗紧张性头痛 96 例临床疗效观察 [J]. 中国卫生产业, 2013(16): 74-75.
- [10] 李惠萍. 天麻素治疗眩晕症疗效观察 [J]. 医学信息, 2011, 24(3): 1329.
- [11] 苗 凯, 王 美, 谢 祎. 天麻素治疗冠心病心绞痛临床效果的观察 [J]. 2009, 21(6): 26-27.
- [12] 官昌伦, 曹光宇, 熊 波, 等. 天麻素对偏头痛患者疼痛程度的影响及临床疗效的观察 [J]. 内蒙古中医药, 2014: 2-3.
- [13] 贾 玉. 天麻素治疗血管神经性头痛临床疗效 [J]. 中国现代药物应用, 2015, 9(1): 99-100.
- [14] 乔爱敏, 栗俞程, 刘珍伶, 等. 天麻素对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2118-2123.
- [15] 郑秀艳, 陈华国, 周 欣, 等. 基于入血成分的天麻药材质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6): 1355-1357.