

正交试验法优选桑白皮蜜炙工艺

李 群¹, 王 瑾^{2*}, 张会敏¹

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250014

摘 要: 目的 优选桑白皮最佳蜜炙工艺。方法 以传统外观质量和内在质量(总黄酮量、东莨菪内酯量)为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 对蜜与水比例、闷润时间、炒制温度及炒制时间 4 个因素进行考察。结果 最佳蜜炙工艺为取炼蜜 25 g 加入 37.5 g 沸水稀释, 淋入 100 g 桑白皮净制饮片拌匀, 闷润 60 min, 置炒制容器内, 240 ℃炒制 18 min, 取出晾凉。结论 优选出的蜜炙工艺设计合理、结果可靠, 为规范蜜桑白皮饮片生产提供了理论依据。

关键词: 桑白皮; 蜜炙工艺; 正交试验; 东莨菪内酯; 总黄酮

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)03-0000-00

Optimization of technology for stir-baking *Mori Cortex* with honey by orthogonal test

LI Qun¹, WANG Jin², ZHANG Hui-min¹

1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014 China

2. Shandong Traditional Chinese Medicine University, Jinan 250014 China

Abstract: Objective To optimize the technology for stir-baking *Mori Cortex* with honey. **Methods** The traditional appearance and intrinsic quality (the content of scopoletin and the content of total flavone) were chosen as indexes. The best technology was determined by $L_9(3^4)$ orthogonal test. The factors of the ratio of honey to water, the moistening time, stir-baking temperature and stir-baking time were investigated. **Results** The optimal technology was as follows: the ratio of honey to water was 1 : 1.5, the moistening time was 60 min, the stir-baking temperature was 240 ℃ and the stir-baking time was 18 min. **Conclusion** The optimal stir-baking with honey technology for *Mori Cortex* is reasonable, which can be used to guide the standardized production of *Mori Cortex* stir-baked with honey.

Key words: *Mori Cortex*; stir-baking with honey technology; orthogonal test; scopoletin; total flavones

桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮, 具有泻肺平喘、利尿消肿之功效, 用于肺热咳嗽、水肿胀满尿少、面目肌肤浮肿^[1]。宋·《普济本事方》较早以蜜为辅料炮炙桑白皮,“贝母汤”中曰:“洗净蜜炙黄”,“紫苏散”中曰“洗净蜜涂炙黄”^[2], 其后的医籍中均有蜜炙记载。传统认为桑白皮蜜炙可以缓和凉泻之性, 并可免伤肺泻气, 同时兼有润肺止咳之功, 更适合虚劳久咳患者。目前, 市售的桑白皮有生品及蜜炙品两种规格, 历版药典及各省、市炮制规范均收载蜜桑白皮饮片。

近年来对桑白皮的研究多集中在化学成分和药

理药效方面, 对炮制工艺的研究很少^[3], 而且除了蜂蜜的用量, 蜜炙桑白皮的方法没有其它量化标准, 导致桑白皮的蜜炙工艺因人而异。从收集的市售蜜桑白皮饮片来看, 仅在外观颜色上已是差异甚大, 其内在质量更是难以保证。本实验对桑白皮蜜炙最佳工艺进行深入研究, 为蜜桑白皮饮片的质量标准和炮制机制研究提供依据。

1 仪器与材料

Waters 2965 高效液相色谱仪; Waters 2996 二极阵列检测器; 色谱柱 Thermo ODS-2 HYPERSIL (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Anke TLD—40B 离心

收稿日期: 2012-07-12

基金项目: 国家“十二五”行业专项课题(201107007)

作者简介: 李 群, 男, 副研究员, 主要从事中药炮制及饮片质量标准化、中药制剂和保健食品等研究工作。

Tel: 0531-82949830 E-mail: liqun0606@sina.com

*作者简介 王 瑾 Tel: 15168880899 E-mail: wangjin87127@126.com

机(上海安亭科学仪器厂); ZX—002 紫外分光光度计(日本岛津); B3200S2T 超声仪(上海必能信超声有限公司); 瑞士 Mettler XS205 DU 十万分之一电子天平; 中药炮制控温炉(哈尔滨市测电器厂); ST80 红外温度仪; FW177 型粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

东莨菪内酯(批号 110768-200504)、芦丁(批号 100080-200707)对照品中国药品生物制品检定所; 乙醇(分析纯、天津市永大化学试剂有限公司, 批号 20111017); 甲醇(色谱纯、天津市四友精细化学品有限公司, 批号 373749-03971); 亚硝酸钠(分析纯, 批号 20030807)、硝酸铝(分析纯, 批号 20030502)天津市博迪化工有限公司; 氢氧化钠(分析纯, 国营山东单县有机化工厂, 批号 800-51); 洋槐蜂蜜(济南济泉黄岩峰产品开发有限公司, 生产日期: 2011.8.26)。

桑白皮(购自安徽省亳州市精华制药康普有限公司, 产地为河南洛阳, 经山东省中医药研究院李英霞研究员鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮)。

2 方法与结果

2.1 东莨菪内酯的测定

2.1.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 流动相为甲醇-0.2%冰醋酸水溶液(23:77); 柱温 30℃; 体积流量 1 mL/min; 检测波长为 345 nm; 进样量 10 μL; 理论塔板数按东莨菪内酯峰计算不低于 5 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取东莨菪内酯对照品 4.84 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加少量甲醇溶解后定容至刻度, 摇匀, 得东莨菪内酯对照品储备液。精密量取 0.5 mL 储备液, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 19.36 μg/mL 东莨菪内酯对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 40 目筛)约 4 g, 精密称定, 置 500 mL 具塞烧瓶中。加入 30%乙醇 100 mL, 称定质量, 浸渍 18 h, 超声提取 45 min, 放至室温后称定质量, 用 30%乙醇补足缺失的质量, 用脱脂棉滤过, 取续滤液离心, 3 500 r/min 离心 15 min, 精密量取 50 mL 上清液于蒸发皿中, 挥至近干, 加 1 g 硅胶拌匀, 蒸干, 将粉末转移至 50 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 醋酸乙酯, 超声处理 30 min, 滤过, 滤渣用醋酸乙酯洗 3 次, 每次 5 mL, 合并醋酸乙酯液于蒸发皿中蒸干, 用少量

甲醇溶解, 转移至 1 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密量取 0.5 mL 储备液, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀。分别进样 2.5、5、7.5、10、15、20 μL, 以东莨菪内酯质量为横坐标, 相应的色谱峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $Y=5 \times 10^6 X-588\ 11$, $r=0.999\ 8$, 结果表明东莨菪内酯在 48.4~387.2 ng 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密量取 0.5 mL 储备液, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制得东莨菪内酯对照品溶液, 按上述色谱条件连续进样 6 针, 测定其峰面积的 RSD 为 2.06%, 表明精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批样品 6 份, 根据上述方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定峰面积, 其质量浓度的 RSD 为 1.17%, 表明样品重复性较好。

2.1.7 稳定性试验 按上述色谱条件对供试品溶液分别于 0、2、4、6、12、24 h 进行测定, 测得峰面积的 RSD 为 2.15%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知东莨菪内酯量的样品约 2 g, 精密称定, 共称取 6 份, 分别置 500 mL 具塞烧瓶中, 各加入东莨菪内酯对照品溶液(19.36 μg/mL) 0.8 mL, 按供试品制备方法制成供试品溶液, 测定, 计算, 平均回收率为 96.93%, RSD 为 1.61%。

2.2 总黄酮的测定

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取芦丁对照品 5.405 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加少量 60%乙醇溶解后定容至刻度, 摇匀, 即得芦丁对照品溶液(108.1 μg/mL)。

2.2.2 测定波长的确定 取芦丁对照品溶液 5.00 mL, 加 60%乙醇补充至 6.00 mL, 加入 5%亚硝酸钠 1.00 mL, 摇匀静置 6 min 后, 再加入 10%硝酸铝 1.00 mL, 静置 6 min 再加入 4%氢氧化钠 5.00 mL, 用 60%乙醇定容至刻度。摇匀静置 5 min 后在 400~800 nm 范围内扫描, 发现在 498 nm 处有最大吸收, 无杂质峰干扰, 确定其为测定波长。

2.2.3 线性关系考察 分别取 2.00、4.00、6.00、8.00、12.00、16.00 mL 芦丁对照品溶液于 25 mL 量瓶中, 按“2.2.2”中方法显色后测定, 测定结果计算得吸光度(A)值与质量浓度(C)之间的回归方程为 $A=13.151 C-0.035$, $r=0.999\ 4$, 线性范围为 17.9~55.9 μg/mL。

2.2.4 供试品溶液制备 精密称取各炮制品粉末约 1.00 g，置 100 mL 烧瓶中，分别加入 80%乙醇 40 mL，回流提取 2 次，每次 1 h，合并提取液滤过，精密量取滤液 10 mL，于 25 mL 量瓶中，用亚硝酸钠-硝酸铝显色后，在 498 nm 波长下，测定 *A* 值。

2.2.5 精密度试验 精密移取芦丁对照品溶液 14.00 mL 于 25 mL 量瓶中，用亚硝酸钠-硝酸铝显色后，重复测定吸光度 6 次，计算 RSD 为 0.08%，结果表明精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密移取样品续滤液 10.00 mL 于 25 mL 量瓶中，平行 6 份用亚硝酸钠-硝酸铝显色后，测定 *A* 值，计算 RSD 为 1.71%，结果表明重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 精密移取样品续滤液 10.00 mL 于 25 mL 量瓶中，用亚硝酸钠-硝酸铝显色后，分别在 4、6、8、10、15、20 min 后测定 *A* 值，计算 RSD 为 2.27%，结果表明稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 称取已测定的样品约 0.5 g，精密称定，平行 6 份，均加入 2.9 mg 芦丁对照

品，制备供试品溶液，依法测定 *A* 值，计算得芦丁的平均回收率为 101.26%，RSD 为 2.54%。

2.3 蜜与水比例的考察

《中国药典》2010 年版附录 II 药材炮制通则蜜炙法中规定，蜜炙时，应先将炼蜜（本实验炼制方法：将蜂蜜置锅内，加热至徐徐沸腾后改用文火，保持微沸，此时温度为 116~118 ℃，炼制约 4 min）加适量沸水稀释，但对于沸水的用量没有明确规定，而蜜与加入水的比例直接影响饮片闷润的效果以及蜜汁在饮片表面的分布，从而影响到蜜桑白皮的外观及内在质量。

因此，本研究首先以 1：0.5、1：1、1：1.5、1：2 为 4 个水平，以传统外观为评价指标（传统外观质量评分细则见表 1），对蜜与水的比例进行单因素考察。结果表明，蜜与水的比例对炮炙品外观影响较大，其中 1：0.5 的成品外观质量最差，闷润未透，蜜分布不均匀，成品粘手，手握成团不散。因此，选择蜜比水 1：1、1：1.5、1：2 作为正交试验中蜜与水比例的 3 个水平。

表 1 桑白皮蜜炙工艺传统外观质量评分标准
Table 1 Standard for evaluation of the traditional appearance quality

项 目		得 分	
闷润程度（满分 20 分）	闷润透（>80%）20 分	闷润较透（≈50%）10 分	闷润未透（<30%）5 分
蜜分布均匀程度（满分 30 分）	蜜分布均匀蜜汁吸尽 30 分	蜜分布较均匀 15 分	蜜分布不均匀 10 分
火色（满分 30 分）	火色适中、表面深黄色 30 分	火色较浅或较深 15 分	几乎无火色或炒焦 10 分
成品干燥程度（满分 2 分）	成品干燥 20 分	成品偏潮湿 10 分	饮片较软、潮湿 5 分

2.4 桑白皮蜜炙工艺的正交设计试验考察

在查阅文献及单因素试验考察蜜与水比例的基础上，选择了影响桑白皮蜜炙工艺和质量的蜜与水比例（A）、闷润时间（B）、炒制温度（C）和炒制时间（D）为考察因素，每个因素设计 3 个水平，以传统外观质量标准及东莨菪内酯量、总黄酮量作为评价指标，以综合评分的方法，进行 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交试验，对试验结果进行方差分析，优选出科学、合理的桑白皮蜜炙工艺。正交试验设计及结果见表 2。方差分析见表 3。

2.4.1 蜜炙桑白皮质量评价指标的评定 为全面客观反映桑白皮蜜炙工艺中各个因素对蜜桑白皮质量的影响，本试验以传统外观质量和与桑白皮传统功能主治相关的功效成分（东莨菪内酯、总黄酮）的量作为评价指标，采用综合质量评分法评价。

（1）内在质量评分：本试验平行进行 3 次，每

次得到 1 组数据，每组中最高者定为 100 分，最低者定为 20 分。其他以下式计分：得分=20+80×(实际量—最低量) / (最高量—最低量)。以相同方法计算总黄酮量的得分。

（2）综合质量评分：传统外观质量评价和内在有效分量对蜜炙桑白皮均有同等重要的意义，因此传统外观评分的加权系数为 0.5，东莨菪内酯量及总黄酮量的加权系数均为 0.25。综合评分以下式计算：综合质量评分=传统外观评分×0.5+东莨菪内酯得分×0.25+总黄酮得分×0.25。

2.4.2 样品的制备及评分 取净制桑白皮生品饮片 9 份，每份 100 g，按照表 2 设计的条件进行炒制，得到成品，平行试验 3 次。严格按照此标准对正交试验得到的炮制品评分。按“2.1”项中测定条件对炮制品正交样品进行测定得到东莨菪内酯量，按“2.2”项中测定条件对炮制品正交样品进行测定得

到总黄酮量，结果见表 2。

正交试验的方差分析显示，*P* 值均小于 0.05，4 个因素均为主要影响因素。从表 2 中 *K* 值大小可以看出，A 因素“(2)”水平蜜与水 1：1.5 为最好；B 因素“(2)”水平最好，即闷润时间为 60 min；C 因素“(2)”水平最好，即炒制温度为 240 ℃；D 因素“(3)”水平最好，即炒制时间为 18 min。因此，由

*L*₉(3⁴) 正交试验结果，初步认为最佳搭配为 *A*₂*B*₂*C*₂*D*₃。

2.5 验证试验

本试验采用正交法对桑白皮的蜜炙工艺进行优选，以传统外观质量要求和内在质量要求为指标，采用综合质量评分法，优选出的最佳蜜炙工艺为每 100 g 桑白皮丝取炼蜜 25 g，加 37.5 g 沸水稀释，淋

表 2 桑白皮蜜炙工艺优化的 *L*₉(3⁴) 正交试验设计及结果 (*n*=3)
Table 2 Design and results of *L*₉(3⁴) orthogonal test (*n*=3)

试验号	A	B / min	C / ℃	D / min	外观描述	外观得分	总黄酮量 / (mg·g ⁻¹)	东莨菪内酯量 / (μg·g ⁻¹)	综合评分
1	1：1 (1)	40 (1)	200 (1)	12 (1)	闷润未透；饮片表面蜜分布不均匀；几乎无火色；饮片成品较干燥	45.000	5.001	6.290	35.808
2	1：1 (1)	60 (2)	240 (2)	15 (2)	闷润未透；饮片表面蜜分布不均匀；火色适中；饮片成品较干燥	65.000	5.655	7.345	64.744
3	1：1 (1)	80 (3)	280 (3)	18 (3)	闷润未透；饮片表面蜜分布不均匀；火色过重、炒焦；饮片成品干燥	45.00	5.407	7.226	49.931
4	1：1.5 (2)	40 (1)	240 (2)	18 (3)	闷润较透；饮片表面蜜分布均匀；火色适中；饮片成品干燥	100.000	5.226	8.071	81.801
5	1：1.5 (2)	60 (2)	280 (3)	12 (1)	闷润较透；饮片表面蜜分布均匀；火色适中；饮片成品干燥	100.000	5.353	8.604	88.217
6	1：1.5 (2)	80 (3)	200 (1)	15 (2)	闷润透；饮片表面蜜分布均匀；几乎无火色；饮片成品较软、潮湿	65.000	5.125	7.936	61.589
7	1：2 (3)	40 (1)	280 (3)	15 (2)	闷润透；饮片表面蜜分布均匀；火色适中；饮片成品偏潮湿	90.000	4.813	6.883	60.486
8	1：2 (3)	60 (2)	200 (1)	18 (3)	闷润透；饮片表面蜜分布均匀；几乎无火色；饮片成品偏潮湿	70.000	6.125	6.266	65.288
9	1：2 (3)	80 (3)	240 (2)	12 (1)	闷润透；饮片表面蜜分布均匀；几乎无火色；饮片成品较软、潮湿	65.000	5.341	7.961	65.139
<i>K</i> ₁	50.161	59.365	54.228	63.056					
<i>K</i> ₂	77.203	72.751	70.561	62.273					
<i>K</i> ₃	63.638	58.886	66.212	65.673					
<i>R</i>	27.042	13.865	16.333	3.400					

表 3 正交试验方差分析
Table 3 Analysis of variance

变异来源	偏差平方和	自由度	<i>F</i> 值	显著性
A	3 290.753	2	438.135	<i>P</i> <0.01
B	1 114.911	2	148.441	<i>P</i> <0.01
C	1 287.887	2	171.470	<i>P</i> <0.01
D	57.075	2	7.599	<i>P</i> <0.01
误差	67.597	18		

*F*_{0.01}(2, 18)=6.01

入桑白皮丝中拌匀，闷润 60 min，置炒制容器内，240 ℃炒制 18 min 取出，晾凉，即得。

3 批验证试验得到的样品显示，闷润较透，饮片表面蜜分布均匀，火色适中，饮片成品干燥；总黄酮质量分数分别为 10.407、10.341、10.420 mg/g；东莨菪内酯质量分数分别为 5.026、5.138、4.898 μg/g，表明确定的工艺条件操作简便，合理可行，能制备出质量可控的蜜桑白皮饮片。

3 讨论

传统外观质量评价是中医药历史上沿用和发展起来的,并经过实践检验及经验总结得以传承,是传统意义上的中药饮片质量标准,同时是目前单一化学成分和化学部位不能替代的评价标准,因此为全面考察桑白皮蜜炙工艺,将其选作正交试验的评价指标之一。根据《中国药典》2010年版、全国中药炮制规范、各地炮制规范等桑白皮蜜炙的相关传统评定标准,结合老药工的炮制经验,制定评分标准并进行评分。内在质量评价指标依据现代研究成果,徐宝林等^[4]报道东莨菪内酯是桑白皮平喘、利尿的主要成分,韦媛媛等^[5]发现桑白皮总黄酮具有镇咳、祛痰作用,这两类成分均与桑白皮传统作用密切相关,故选用二者质量分数作为内在质量的评价指标。

目前,市售蜜炙桑白皮质量参差不齐,从收集的部分省市的市售样品看,炮炙品外观颜色及炒制

程度不符合“深黄色、不粘手”的传统质量要求,致使储存运输过程中易出现霉变等情况。《中国药典》2010年版中蜜炙法规定将炼蜜中加入适量沸水稀释,但对于水的用量没有明确规定。本研究通过预实验及正交试验发现,蜜与水比例对蜜桑白皮质量具有显著影响,优选得到的蜜与水的比例为指导蜜桑白皮的规范化生产提供了科学理论依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 宋·许叔微述. 普济本事方 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978.
- [3] 李 群. 桑白皮化学成分、质量控制、药理及炮制研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2011, 30(10): 596-599.
- [4] 徐宝林, 张文娟, 孙静芸, 等. 桑白皮提取物平喘、利尿作用的研究 [J]. 中成药, 2003, 25(9): 758-760.
- [5] 韦媛媛, 徐 峰, 陈 侠, 等. 桑白皮总黄酮的镇咳祛痰作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(8): 644-646.