

· 中药制剂 ·

正交设计法优选红芪最佳蜜炙烘制工艺*

李越峰^{1,2} 牛江涛^{1,2} 曹瑞^{1,2} 司昕蕾^{1,2} 边甜甜^{1,2} 严兴科^{1,2#}

(1 甘肃中医药大学 甘肃 730000; 2 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室)

摘要:目的 优选红芪蜜炙最佳烘制炮制工艺,为红芪炮制品质量控制及标准化炮制提供实验依据。**方法** 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法,以毛蕊异黄酮和芒柄花素含量的平均值为综合评价指标,优选红芪蜜炙烘制炮制工艺。采用高效液相色谱法(HPLC),梯度洗脱,测定红芪中的毛蕊异黄酮和芒柄花素含量。**结果** 红芪蜜炙最佳烘制炮制工艺为:烘制温度70℃,烘制时间2.5 h,厚度3 cm。**结论** 红芪烘制炮制品能够达到2015版《中国药典》要求,且方法简单可行,重现性好,可为进一步研究红芪最佳炮制工艺提供科学依据,为红芪炮制工业生产规范化提供科学依据。

关键词:红芪;蜜炙烘制;正交设计

中图分类号:R283.3

doi:10.3969/j.issn.1006-2157.2017.02.015

Optimization of processing technology of honey barked *Hedysari Radix* using orthogonal design method*LI Yuefeng^{1,2}, NIU Jiangtao^{1,2}, CAO Rui^{1,2}, SI Xinlei^{1,2}, BIAN Tiantian^{1,2}, YAN Xing Ke^{1,2#}

(1 Gansu University of Chinese Medicine, Gansu 730000; 2 Gansu Provincial Key Laboratory of Standard and Quality of Chinese Medicine Research)

Abstract: **Objective** To optimize the processing technology of honey baked *Hedysari Radix*, so as to provide the experimental basis for the quality control of *Hedysari Radix* processed products and standardization of the processing. **Methods** $L_9(3^4)$ orthogonal design method was used, and the mean content of calycosin and formononetin which were detected by HPLC with gradient elution were taken as the comprehensive evaluation indexes, the processing technology was optimized. **Results** The optimum processing technology of honey baked *Hedysari Radix* was thickness of 3 cm at the temperature of 70℃ for 2.5 h. **Conclusion** *Hedysari Radix* baking processed products produced by the optimum technology met with the requirement of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 Edition), which was simple, feasible, and repeatable. The method would provide evidence for further research on optimum processing technology and for standardization of industrial production.

Keywords: *Hedysari Radix*; honey baked; orthogonal design method

红芪(*Hedysari Radix*),也称“独根”,是豆科植物多序岩黄芪(*Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.)的干燥根,因其皮色红润,故称红芪,又称黑芪。其药用历史悠久,最早记载于《神农本草经》黄芪项

下,列为上品。性甘,微温。归肺、脾经。具有补气升阳,固表止汗,利水消肿,生津养血,行滞通痹,托毒排脓,敛疮生肌。炙红芪(*Hedysari Radix preparata cum melle*)为红芪的蜜炙炮制加工品,性甘,

李越峰,女,博士,教授,硕士生导师

通信作者:严兴科,男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药及复方有效成分及质量研究,E-mail: lyfyxk@126.com

* 国家自然科学基金资助项目(No. 81460611),国家教育部科学技术研究重点基金资助项目(No. 212186),甘肃省自然科学基金资助项目(No. 2010-1010RJA212, No. 2014145RJA076),甘肃省财政厅高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. 2013-2),兰州市科技局资助项目(No. 2014-1-188),甘肃省中医药管理局资助项目(No. GZK-2015-57)

温,具有补中益气的功效。用于气虚乏力,食少便溏^[1]。中医用药十分讲究药材的地道性和饮片炮制工艺的独到性。对这些优秀的传统文化,我们应当继承与时俱进,但传统炮制方法存在火候不易控制、评判标准不能统一的缺点。而采用烘制炮制方法,可以充分利用现代科学技术的成果,因其温度、时间等条件的可控性能形成统一规范,更能适应市场经济条件下大流通的要求。本试验通过优选红芪蜜炙最佳烘制炮制工艺,为红芪炮制品质量控制及标准化炮制提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent1260液相色谱仪);电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司,型号:101-2A型);十万分之一分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司,型号:BT125D);万分之一分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司,型号:AL104);超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:SB-5200 DTD);粉碎机(北京兴时利和科技发展有限公司,型号:2N-04A);电热恒温水浴锅(余姚市上通温控仪器厂,型号:HHS11S);马弗炉(沈阳市节能电炉厂,型号: SX₂-4-9)。

1.2 材料

毛蕊异黄酮对照品 HPLC ≥ 98% (北京北纳创联生物技术研究院,批号:150629);芒柄花素对照品 HPLC ≥ 98% (北京北纳创联生物技术研究院批号:150419);乙腈(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂,批号:20151201);甲醇(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂,批号:20160305);磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20150707);无水乙醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司,批号:20151202);水(娃哈哈纯净水),蜂蜜(购于超市)。

试验所用红芪药材样品采自甘肃省陇南市武都区米仓镇,经甘肃中医药大学药学院鉴定教研室鉴定为豆科植物多序岩黄芪的干燥根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent HC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.01%磷酸水溶液,梯度洗脱程序为0~12 min,乙腈30%~33%;12~13 min,乙腈31%~40%;13~25 min,乙腈40%;流速:1.0 mL/min;检测波长:248 nm;柱温:30 ℃;进样量10 μL^[2],见图1、图2、图3。

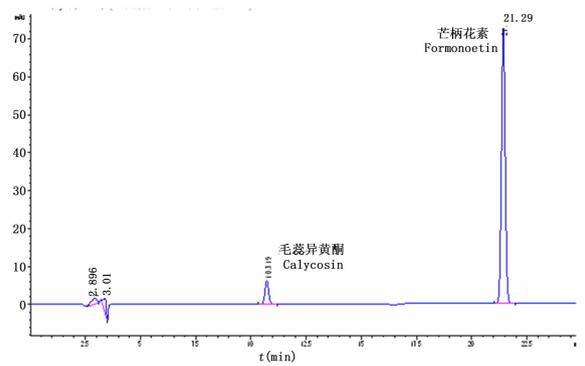


图1 混合对照品 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed reference samples

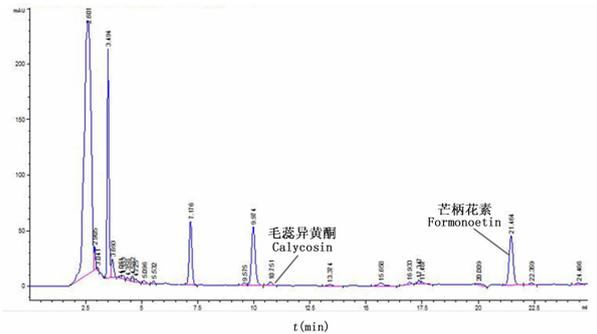


图2 红芪生品 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of crude *Hedysari Radix*

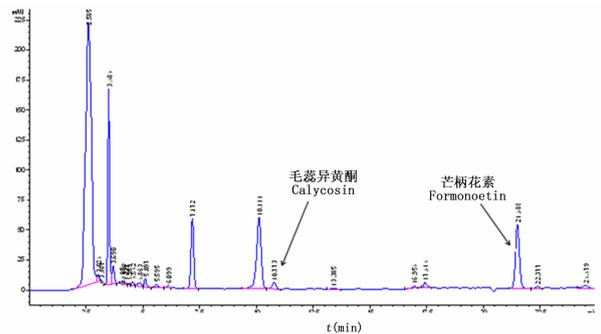


图3 红芪烘制品 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of baked *Hedysari Radix*

2.2 红芪炮制品的制备

根据2015版《中国药典》先将炼蜜加适量沸水稀释后,加入红芪饮片中拌匀,闷润1 h,备用。每100 kg红芪用炼蜜25 kg,水为蜜的20%。

2.2.1 传统炒制

用文火炒至不黏手,表面红棕色,略有光泽,具蜜香气,取出,放凉。

2.2.2 烘箱烘制

采用L₉(3⁴)正交设计法^[3-4],分别考察烘制温度(A)、烘制时间(B)和堆积厚度(C)对红芪炮制的影响,因素水平见表1。

表1 红芪蜜炙烘制工艺因素水平表

Table 1 Factor and level table of honey baked Radix Hedysari processing

水平 Level	因素 Factor		
	A(°C)	B(h)	C(cm)
1	70	1.5	1
2	80	2.0	2
3	90	2.5	3

2.3 对照品溶液的配制

分别精密称取毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品 0.97 mg、3.99 mg, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇超声溶解, 定容于 10 mL 容量瓶中, 作为母液 A、B。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取样品粉末 2.0 g, 置 150 mL 锥形瓶中,

加入甲醇 30 mL, 于 75 °C 水浴回流提取 1 h, 4 °C 保存 1 h 后过滤, 滤液 45 °C 水浴浓缩后定容至 10 mL 容量瓶中, 备用。进样前以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取 3.2 项下的 A、B 母液一定量, 将其制成 6 个系列浓度的混标溶液^[5], 其中毛蕊异黄酮浓度为 0.242 5、0.485 0、0.727 5、0.970 0、1.455 0、1.940 0 mg/L, 芒柄花素浓度为 3.990、5.985、7.980、9.975、11.970、13.965 mg/L, 进样 10 μL, 测定峰面积。以浓度(mg/L)为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程及其线性范围, 结果见表 2。结果表明毛蕊异黄酮、芒柄花素分别在 0.242 5 ~ 1.940 0、3.990 0 ~ 13.965 0 mg/L 范围内时线性关系良好。见图 4、图 5。

表2 毛蕊异黄酮、芒柄花素成分的线性回归结果

Table 2 Linear regression results of calycosin and formononetin

成分 Component	回归方程 Regression equation	r^2	线性范围 Linear range (mg/L)
毛蕊异黄酮 Calycosin	$Y = 39.454X + 1.2294$	0.9999	0.2425 ~ 1.9400
芒柄花素 Formononetin	$Y = 64.550X - 7.4638$	0.9997	3.9900 ~ 13.9650

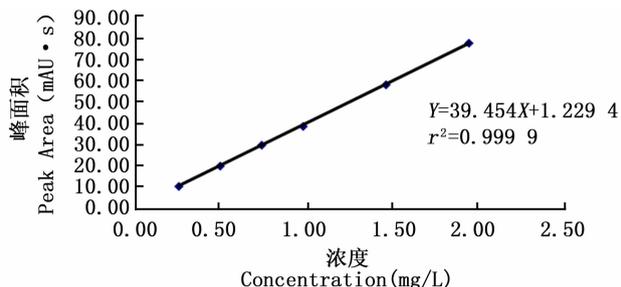


图4 毛蕊异黄酮标准曲线

Fig. 4 Standard curve of calycosin

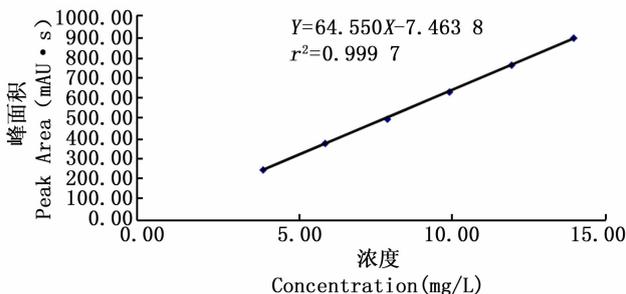


图5 芒柄花素标准曲线

Fig. 5 Standard curve of formononetin

2.6 精密度试验

精密吸取“3.2”项下所制毛蕊异黄酮和芒柄花素的母液, 连续进样 6 次, 按“3.1”项下色谱条件测

定峰面积, 分别计算其 RSD。结果得毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 为 0.16% ($n=6$), 芒柄花素峰面积的 RSD 为 0.77% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一红芪供试品溶液, 于 4 °C 下放置保存, 分别于 0、4、8、12、20、24 h 进样检测并记录数据, 按 2 个异黄酮类成分的峰面积积分值分别计算其 RSD 值。结果得毛蕊异黄酮峰面积的 RSD 为 1.56% ($n=6$), 芒柄花素峰面积的 RSD 为 0.55% ($n=6$), 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验

精密称取同一份红芪样品(烘制, 90 °C, 烘制 2 h, 厚度 1 cm)粉末 6 份, 按“3.3”项下方法制成 6 份供试品溶液, 按“3.1”项下色谱条件测定并记录数据, 分别计算各成分含量的 RSD。结果得毛蕊异黄酮的平均含量为 4.44 μg/g, RSD 为 2.80% ($n=6$), 芒柄花素的平均含量为 39.91 μg/g, RSD 为 0.40% ($n=6$)。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知毛蕊异黄酮和芒柄花素含量的同一红芪样品(红芪生品)6 份, 每份约 1.0 g, 精密加入等量的毛蕊异黄酮和芒柄花素对照品, 按“3.3”

项下方法制备供试品溶液,按“3.1”项下色谱条件 测定。结果见表3、表4。

表3 毛蕊异黄酮加样回收试验表

Table 3 Test results of calycosin recovery

取样量 Sample amount (g)	样品中含量 Content in sample (μg)	加入量 Added amount (μg)	测得量 Measured amount (μg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD(%)
1.000 3	2.533 8	2.425 0	4.899 7	97.56	96.31	0.89
1.000 2	2.533 5	2.425 0	4.901 2	97.64		
1.000 3	2.533 8	2.425 0	4.866 0	96.17		
1.000 2	2.533 5	2.425 0	4.856 7	95.80		
1.000 0	2.533 0	2.425 0	4.825 3	94.53		
1.000 1	2.533 3	2.425 0	4.864 4	96.13		

表4 芒柄花素加样回收试验表

Table 4 Test result of formononetin recovery

取样量 Sample amount (g)	样品中含量 Content in sample (μg)	加入量 Added amount (μg)	测得量 Measured amount (μg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD(%)
1.000 3	21.401 1	19.950 0	40.667 9	96.58	96.29	1.13
1.000 2	21.399 0	19.950 0	40.301 8	94.75		
1.000 3	21.401 1	19.950 0	40.761 5	97.04		
1.000 2	21.399 0	19.950 0	40.664 1	96.57		
1.000 0	21.394 7	19.950 0	40.386 3	95.20		
1.000 1	21.396 8	19.950 0	40.864 2	97.58		

2.10 毛蕊异黄酮和芒柄花素含量测定结果及正交试验结果

样品的供试品溶液均按“3.3”项下方法制备,按“3.1”项下所述色谱条件进行测定,分别记录毛蕊异黄酮和芒柄花素相应色谱峰的峰面积积分值,然后将色谱峰峰面积代入相应的回归方程,计算药材红芪中毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量。见表5、表6、表7。

根据正交试验结果,由R值决定主要因素:C > A > B,即厚度因素对烘制炮制的影响最大,时间因素影响最小;影响大小依次为厚度 > 温度 > 时间。而由方差结果分析可知只有C为P < 0.05,厚度因素的影响具有显著性差异。正交实验结果分析得出红芪蜜炙最佳烘制炮制工艺为A₁B₃C₃,即温度70℃,时间2.5h,厚度3cm。将红芪蜜炙烘制炮制工艺结果与生品、传统炒制品进行比较,可以发现最佳烘制炮制工艺下红芪的毛蕊异黄酮和芒柄花素含量均明显升高。

表5 红芪不同炮制品毛蕊异黄酮和芒柄花素的含量测定结果

Table 5 The content of calycosin and formononetin in different processed products of *Hedysari Radix*

样品号 Sample No.	炮制条件 Condition	毛蕊异黄酮含量 Content of calycosin (μg/g)	芒柄花素含量 Content of formononetin (μg/g)	总含量 Total content (μg/g)
1	A ₁ B ₁ C ₁	5.151 0	43.721 5	48.872 5
2	A ₁ B ₂ C ₂	5.244 8	45.121 6	50.366 4
3	A ₁ B ₃ C ₃	7.911 6	49.699 6	57.611 2
4	A ₂ B ₁ C ₂	4.711 0	42.277 0	46.988 0
5	A ₂ B ₂ C ₃	4.962 5	48.576 7	53.539 2
6	A ₂ B ₃ C ₁	5.369 5	40.727 1	46.096 6
7	A ₃ B ₁ C ₃	6.614 7	42.959 4	49.574 1
8	A ₃ B ₂ C ₁	4.475 5	39.865 1	44.340 5
9	A ₃ B ₃ C ₂	4.004 9	41.194 4	45.199 3
10	炒制品 Baked	4.776 7	37.291 0	42.067 7
11	生品 Crude	5.080 2	42.798 9	47.879 1

2.11 质量标准考察

根据 2015 版《中国药典》中方法分别测定红芪生品、炒制品和最佳烘制炮制品的水分、灰分、醇溶性浸出物,结果见表 8。药典规定:红芪饮片生品和炙品水分均不超过 10.0%;红芪饮片生品灰分不超

过 6.0%,炙品灰分不超过 5.0%;红芪饮片生品醇溶性浸出物含量不少于 25.0%,炙品醇溶性浸出物含量不少于 35.0%。可得出生品、炒制品、烘制炮制品都符合药典质量要求规定。

表 6 红芪烘制蜜炙正交试验结果

Table 6 The result of orthogonal designed method for honey baked *Hedysari Radix*

试验号 Test No.	温度 Temperature	时间 Time	厚度 Thickness	毛蕊异黄酮含量 Content of calycosin(μg/g)	芒柄花素含量 Content of formononetin((μg/g)	平均值 Average(μg/g)
1	1	1	1	5.151	43.722	24.436
2	1	2	2	4.145	45.122	24.633
3	1	3	3	7.912	49.700	28.806
4	2	1	2	4.711	42.277	23.494
5	2	2	3	4.963	48.577	26.770
6	2	3	1	5.370	40.727	23.048
7	3	1	3	6.615	42.959	24.787
8	3	2	1	4.475	39.865	22.170
9	3	3	2	4.005	41.194	22.600
I	77.875	72.717	69.655			
II	73.312	73.573	70.727			
III	69.557	74.454	80.362			
R	8.318	0.881	9.635			

表 7 方差结果分析表

Table 7 Analysis of variance

方差来源 Source	离均差平方和 SS	自由度 df	方差 Variance	F	P
A	11.568 1	2	5.784 1	16.701	0.056
B	0.502 5	2	0.251 2	0.725	0.580
C	23.182 2	2	11.591 1	33.468	0.029
误差 Error	0.692 7	2	0.346 3		

表 8 水分、总灰分、醇溶性浸出物考察结果表

Table 8 The result of moisture content, total ash content and alcohol-soluble extract

项目 project	生品 Crude	炒制品 Fried	烘制品 Baked
水分 Moisture content(%)	5.80	5.84	6.55
总灰分 Total ash content(%)	0.30	4.50	1.15
醇溶性浸出物 Alcohol-soluble extract(%)	37.50	47.08	41.00

3 讨论

3.1 提取工艺考察

根据查阅文献得到供试品溶液的提取工艺:精密称取红芪样品粉末 3.0 g,置 150 mL 锥形瓶中,加

入甲醇 30 mL,于 80 °C 水浴回流提取 1 h,过滤,滤液减压回收甲醇,至一定量后再以适量甲醇定容至 10 mL 容量瓶中,备用^[6]。但我们在实验过程中发现 3 g 药材粉末的甲醇提取液定容于 10 mL 容量瓶时有沉淀析出,且对甲醇加入量(30、60 mL)和提取时间(1、2、4 h)进行考察后,得到最终的提取工艺:精密称取药材样品粉末 2.0 g,置 150 mL 锥形瓶中,加入甲醇 30 mL,于 75 °C 水浴回流提取 1 h,4 °C 保存 1 h 后过滤,滤液 45 °C 水浴浓缩后定容至 10 mL 容量瓶中,备用。

3.2 流动相的选择和梯度洗脱

3.2.1 洗脱系统的选择:甲醇-水梯度洗脱;乙腈-水梯度洗脱;乙腈-0.01% 磷酸水梯度洗脱。用甲醇-水与乙腈-水梯度洗脱系统对同一样品进行分析,结果表明,甲醇-水梯度洗脱基线漂移较重,色谱峰宽,峰形不好,出峰数目少,乙腈-水梯度洗脱系统更好。用乙腈-水与乙腈-0.05% 磷酸梯度洗脱系统对同一样品进行分析,乙腈-0.01% 磷酸梯度洗脱,吸收峰数目多,峰形好,更优于乙腈-水梯度洗脱系统,分析为相似相容原理的作用。故流动相系统选用乙腈-磷酸(pH=3)梯度洗脱^[7]。

3.2.2 检测波长确定:通过 190~400 nm 全波段扫描后发现,在 248 nm 处有最大吸收,且此时基线稳

定,毛蕊异黄酮和芒柄花素峰型最好,峰面积最大。因此,确定 248 nm 为检测波长。

4 结论

现代研究表明,红芪中毛蕊异黄酮、芒柄花素、浸出物及多糖具有多种生物学活性^[8-12]。本文通过正交试验设计,对红芪蜜炙炮制品进行了芒柄花素、毛蕊异黄酮含量对比分析,优选出明确的炮制工艺。红芪蜜炙的最佳烘制炮制条件为:温度 70 ℃,烘制时间 2.5 h,厚度 3 cm。质量标准考察结果表明优选结果的烘制炮制工艺科学合理可行,为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。本试验以毛蕊异黄酮、芒柄花素的含量为指标进行炮制工艺的优选,为进一步对炮制后红芪中其他有效成分含量变化及其炮制机理提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2015 版. 北京:中国医药科技出版社,2015:152-153.
- [2] 王燕. 甘肃地产药材红芪的质量评价研究[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2015.
- [3] 庞善起. 正交表的构造方法及其应用[D]. 西安:西安电子科技大学,2003.
- [4] 刘瑞江,张业旺,闻崇炜,等. 正交试验设计和分析方法研究[J]. 实验技术与管理,2010,27(29):124-125.
- [5] 李成义,王燕,强正泽,等. 甘肃不同产区红芪中指标性成分含量的比较[J]. 中国现代中药,2014,16(10):796-799.
- [6] 梁丽娟,赵奎君,屠鹏飞,等. HPLC 法同时测定黄芪中 4 种黄酮类成分的含量[J]. 中国药房,2010,21(15):1385-1387.
- [7] 李越峰,严兴科. 正交试验法优选甘草最佳微波炮制[J]. 中药材,2012,35(2):202-203.
- [8] 宋瑞霞,余静,杨丽丽,等. 甘肃黄芪毛蕊异黄酮对血管内皮细胞 ACE、ACE2 表达的影响[J]. 中国药学杂志,2008,43(8):594-597.
- [9] 于杰,赵丕文,牛建昭,等. 芒柄花素的植物雌激素作用研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(22):3060-3063.
- [10] 唐菁燕,胡光,许贝文,等. 毛蕊异黄酮通过雌激素受体促进内皮细胞增殖[J]. 中药药理与临床,2009,25(6):14-17.
- [11] 郑海生,金智生,刘凯,等. 红芪多糖对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠胰岛素敏感性影响的研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(7):1516-1518.
- [12] 向红,王雅莉,邱桐,等. 红芪水提物对急性肺损伤模型大鼠的保护作用[J]. 中国药房,2014,25(15):1352-1354.

(收稿日期:2016-10-11)