

多指标综合评分正交试验法优选石榴皮炭最优炮制工艺^Δ

竹慧^{1*},周倩^{2,3#},张慧芳⁴(1.嵊州市中医院,浙江绍兴 312400;2.山东中医药大学药学院,济南 250355;3.山东省中医药研究院,济南 250014;4.金华职业技术学院医学院,浙江金华 321017)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1812-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.26

摘要 目的:优选石榴皮炭的最优炮制工艺。方法:采用正交试验法,以外观性状、没食子酸和鞣花酸含量为评价指标,对主要影响因素(投料量、炒制温度、炒制时间)进行考察,根据多指标综合评分结果确定石榴皮炒炭的最优炮制工艺参数并进行验证。结果:最优工艺为取石榴皮饮片200 g,置于炒药锅中400 ℃炒制20 min。验证试验结果表明,制备的3批石榴皮炭饮片外观性状均符合要求,没食子酸和鞣花酸含量稳定(RSD分别为1.55%、2.11%, $n=3$)。结论:优选的工艺稳定可行,可用于石榴皮炭饮片的制备。

关键词 石榴皮炭;饮片;炮制工艺;外观性状;没食子酸;鞣花酸;多指标综合评分

Optimization of Processing Technology of *Pomegranate rind* Charcoal by Multi-index Integrating Score Orthogonal Test Method

ZHU Hui¹, ZHOU Qian^{2,3}, ZHANG Hui-fang⁴(1.Shengzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Shaoxing 312400, China; 2.College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3.Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 4.School of Medicine, Jinhua Polytechnic, Zhejiang Jinhua 321017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the optimal processing technology for *Pomegranate rind* charcoal. METHODS: Orthogonal test was used to study main factors of the adding amount, frying temperature and frying time. It was determined and verified of the optimal processing technology coefficient of *P. rind* charcoal with the multi-index integrating score of appearance and the content of gallic acid and ellagic acid. RESULTS: The optimal technology was as follows as frying 20 min at 400 ℃ with 200 g *P. rind* charcoal decoction pieces. Verification test showed that the appearance of 3 batches of *P. rind* charcoal decoction pieces were all in line with the requirements and the content of gallic acid and ellagic acid was stable (RSD were 1.55% and 2.11%, $n=3$), respectively. CONCLUSIONS: The optimal processing technology is stable, feasible and can be used for the preparation of *P. rind* charcoal decoction pieces.

KEYWORDS *Pomegranate rind* charcoal; Decoction pieces; Processing technology; Appearance; Gallic acid; Ellagic acid; Multi-index integrating score

石榴皮始载于《雷公炮炙论》,为石榴科植物石榴(*Punica granatum* L.)的干燥果皮,是临床常用中药,具有涩肠止泻、止血、驱虫等功效^[1]。现代药理研究表明,石榴皮或其有效提取部位具有体内、外抗过敏^[2]、预防糖尿病^[3]、抑制肿瘤细胞^[4]、改善慢性肾小球肾炎^[5]、改善大鼠肾纤维化^[6]等多种作用。石榴皮历代有炒炭、炒焦、蒸法、炒法、醋炙等多种炮制工艺,沿用至今并被《中国药典》^[1]及全国、各地炮制规范收录的仅有炒炭法。石榴皮炒炭后,较生品止血和止泻作用增强。但目前石榴皮炭饮片制备缺乏炮制工艺相关研究,包括《中国药典》、全国炮制规范在内,均未记载具体的炮制工艺参数。炮制工艺的不规范导致了市场上饮片质量良莠不齐,因此开展石榴皮炭工艺研究、优选最优工艺参数是非常必要的。本研究采用多指标综合评分正交试验法对石榴皮炒炭工艺进行了优选,

确定了石榴皮炒炭过程中影响石榴皮质量的各项主要工艺参数,从而为保证石榴皮炭饮片的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型高效液相色谱仪、2996型二极管阵列检测器(美国Waters公司);十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);中药炮制控温炉(哈尔滨市测电器厂);ST80型红外温度计(北京雷泰光电技术有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

石榴皮饮片为市售饮片(批号:121104,产地:山东,经山东省中医药研究院林惠彬研究员鉴定为石榴科植物石榴*Punica granatum* L.的干燥果皮);没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110831-200302,供含量测定用);鞣花酸对照品(阿法埃莎化学有限公司,批号:10149850,供含量测定用);其他试剂均为分析纯。

2 没食子酸和鞣花酸含量测定方法研究^[7]

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Hyperclone C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0→20 min, 1%A; 20→80 min, 1%A~15%A; 80→100 min, 15%A~30%

Δ 基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(No. 2009-137);国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目

* 主管中药师。研究方向:医院药学。E-mail:176616770@qq.com

通信作者:助理研究员。研究方向:中药炮制、中药及复方活性成分与质量控制。电话:0531-82949803。E-mail:merveilleqq@163.com

A);流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;检测波长:215 nm(0→15 min)、255 nm(15→100 min);进样量:2 μl。

2.2 对照品溶液的制备

没食子酸对照品溶液:取没食子酸对照品适量,精密称定,加水制成0.31 mg/ml的溶液,作为对照品贮备液;精密吸取5 ml置于10 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

鞣花酸对照品溶液:取鞣花酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成0.28 mg/ml的溶液,作为对照品贮备液;精密吸取3 ml置于10 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取石榴皮炭样品粉末(6号正交试验样品,过40目筛)0.25 g,精密称定,精密加入甲醇25 ml,称质量,超声提取1 h,放凉,再次称质量,用甲醇补足减少的质量,摇匀,滤过,取续滤液,滤液过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.4 系统适用性试验

在上述色谱条件下,分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各2 μl注入液相色谱仪,测定。结果,主峰与其他峰分离度均大于1.5,可达到基线分离,且保留时间适中。供试品主峰保留时间和峰形均与对照品一致,表明该分析条件良好。没食子酸和鞣花酸峰的理论板数分别为12 322、524 372。色谱图见图1。

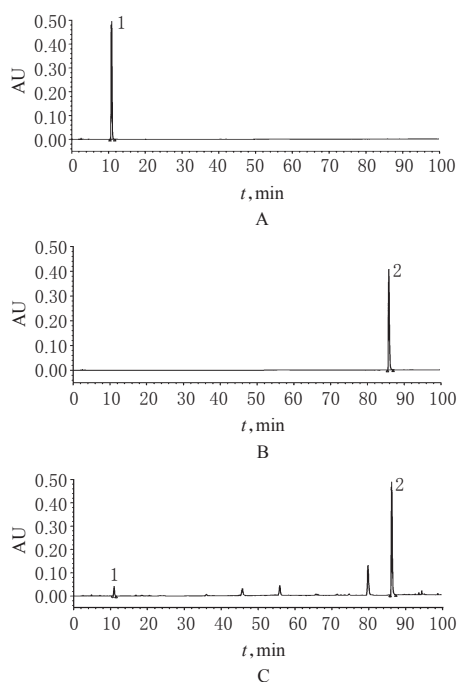


图1 高效液相色谱图

A. 没食子酸对照品; B. 鞣花酸对照品; C. 供试品; 1. 没食子酸; 2. 鞣花酸

Fig 1 HPLC chromatography

A. reference of gallic acid; B. reference of ellagic acid; C. test sample; 1. gallic acid; 2. ellagic acid

2.5 线性关系考察

精密吸取没食子酸对照品贮备液0.3、0.5、1、2、5 ml分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。精密吸取鞣花酸对照品贮备液0.5、1、2、3、5、7 ml分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。分别吸取2 μl,依次注入色谱仪,测定峰面积,以对照品进样质量浓度(μg/ml)为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行回归,得没食子酸回归方程为 $y=3\ 628x-728.6$ ($r=0.999\ 9$),鞣花酸回归方程为 $y=46\ 898x-80\ 556$ ($r=0.999\ 6$)。结果表明,没食子酸和鞣花酸的检测质量浓度线性范围分别为9.3~155、14~196 μg/ml。

2.6 精密度的试验

精密吸取供试品溶液各2 μl,分别连续进样5次,结果没食子酸和鞣花酸峰面积的RSD分别为0.53%和0.36%($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取供试品溶液各2 μl,分别于0、4、8、12、24 h进样测定。结果,没食子酸和鞣花酸峰面积的RSD分别为1.80%和1.44%($n=5$),表明供试品溶液在24 h内稳定性好。

2.8 重复性试验

取同一石榴皮炭样品6份,每份0.25 g,精密称定质量,照“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样2 μl。测得没食子酸的平均含量为1.32%(RSD=2.58%, $n=6$),鞣花酸的平均含量为1.40%(RSD=2.45%, $n=6$),表明方法重复性良好。

2.9 回收率试验

取已知没食子酸和鞣花酸含量的样品粉末6份,各0.125 g,精密称定,分别精密加入没食子酸和鞣花酸对照品适量,依法提取测定,计算回收率。结果,没食子酸和鞣花酸平均回收率分别为100.25%、99.78%,RSD分别为2.37%和2.68%($n=6$),表明该测定方法准确度好。

上述研究表明,建立的含量测定方法重复性好、结果准确,可用于石榴皮炭样品中没食子酸和鞣花酸的含量测定。

3 正交试验法优选石榴皮炭炮制工艺

3.1 因素水平设计

石榴皮炭炮制过程:取一定量石榴皮饮片,在一定温度下炒制至规定程度。影响石榴皮炭质量的主要因素为炒制温度、炒制时间和投料量,分别以外观性状和没食子酸和鞣花酸的含量作为质量评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法对上述因素进行考察。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(投料量,g)	B(炒制温度,℃)	C(炒制时间,min)
1	100	360	16
2	200	400	20
3	300	440	24

3.2 炒制方法及指标评价

取净石榴皮饮片,照正交设计方案分别取一定量投入至预热至设定温度的中药炮制控温炉中,炒制一定时间,取出,晾凉,筛去碎屑,即得。

3.2.1 传统质量评价指标的选择 饮片的传统质量评价是以饮片外观性状为主要指标,是中医药宝贵经验的总结,可在相当程度上代表饮片质量。根据《全国中药炮制规范》^[8]及2010年版《中国药典》对石榴皮炭的性状要求^[1],通过审查石榴皮炭的表面和内部颜色进行打分:若表面呈黑黄色、内部棕褐色,则评为85~100分;表面黑色、内部焦褐色为炮制稍过,表面深褐色、内部黄褐色为炮制稍欠,评为70~85分;表面深黑色、内部焦黑色为炮制较重,表面褐色、内部浅褐色者为炮制较轻,评为60~70分;表面黑亮色、内部深黑色者为炮制过重,表面黄褐色、内部深黄色者为炮制过轻,评为50~60分。

3.2.2 内在质量评价指标的选择 石榴皮的主要成分为鞣质^[9-10],但炒炭后总鞣质含量下降,难以评价石榴皮炭的质量。

研究报告,石榴皮炭中单体鞣质没食子酸和鞣花酸的含量较生品明显增加,鞣花酸和没食子酸又是凝血、止血的有效成分^[1],因此选择这2种成分含量为内在质量的评价指标。

3.2.3 综合评分标准 以综合加权评分的方法对各炮制品进行评价,传统质量评价指标加权系数定为0.4,没食子酸和鞣花酸含量加权系数均定为0.3。各评价指标加权处理如下:外观性状评分=性状得分/9个样品中最高分×40;没食子酸含量评分=没食子酸含量/9个样品中最高含量×30;鞣花酸含量评分=鞣花酸含量/9个样品中最高含量×30。综合评分为三者之和,以综合评分为指标进行分析。

3.3 正交试验结果

正交试验表及试验结果见表2;方差分析结果见表3。

表2 正交试验设计及结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

序号	A	B	C	D	外观性状评分	没食子酸含量,%	鞣花酸含量,%	综合评分
1	1	1	1	1	65	0.81	0.94	57.03
2	1	2	2	2	100	1.66	1.72	100.00
3	1	3	3	3	55	0.72	0.89	50.54
4	2	1	2	3	85	1.41	1.51	85.82
5	2	2	3	1	80	1.32	1.48	81.67
6	2	3	1	2	50	0.92	1.14	56.51
7	3	1	3	2	60	1.12	1.22	65.52
8	3	2	1	3	80	1.02	1.15	70.49
9	3	3	2	1	75	1.06	1.17	69.56
\bar{K}_1	69.190	69.457	61.343	69.420				
\bar{K}_2	74.667	84.053	85.127	74.010				
\bar{K}_3	68.523	58.870	65.910	68.950				
R	6.144	25.183	23.784	5.060				

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis result of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F比	P
A	68.179	2	1.454	
B	959.340	2	20.458	显著
C	955.782	2	20.382	显著
D	46.893	2	1.000	
误差	46.89	2		

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

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

由表2和表3试验结果可见,B、C因素对试验结果有显著性影响。综合直观分析和方差分析结果,石榴皮最优炒炭工艺为A₂B₂C₂,即取石榴皮饮片200 g,置于炒药锅中400℃炒制20 min,即得。

3.4 工艺验证

取3份石榴皮饮片,每份500 g,按最优工艺制备3批石榴皮炭饮片,分别进行外观性状评分以及含量测定,结果见表4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of verification test

样品号	外观性状评分	没食子酸含量		鞣花酸含量	
		平均值,%	RSD,%	平均值,%	RSD,%
1	表面黑黄色,内部棕褐色(>85分)	1.62		1.75	
2	表面黑黄色,内部棕褐色(>85分)	1.65	1.55	1.70	2.11
3	表面黑黄色,内部棕褐色(>85分)	1.60		1.68	

结果,制备的3批石榴皮炭饮片外观性状均符合要求,测得没食子酸和鞣花酸含量稳定,表明确定的石榴皮炒炭工艺

稳定可行。

4 讨论

2010年版《中国药典》中石榴皮饮片以总鞣质含量作为指标评价饮片质量,但因炮制后鞣质含量下降,因此笔者认为其不宜作为正交试验中石榴皮炭样品质量的评价指标。有文献报道,石榴皮炒炭后没食子酸和鞣花酸含量均有上升^[4];笔者在对石榴皮炒炭过程中没食子酸和鞣花酸含量变化规律的研究中也发现,二者含量在炮制过程中均呈现出先升高后降低的变化趋势,且在炮制适中时含量最高;另外,鞣花酸是良好的凝血剂,没食子酸也具有收敛、止血的作用,与石榴皮炭炒炭后增强止血、止泻的功效相一致。因此,选择没食子酸和鞣花酸的含量作为内在质量控制指标评价石榴皮炭的质量,既可以代表饮片质量,另外在一定程度上也可反映石榴皮炭的功效。

因2010年版《中国药典》中石榴皮炭项下无【含量测定】的相关要求,故本文参照文献[7]方法采用高效液相色谱法对没食子酸和鞣花酸的含量进行了测定,方法学考察结果显示,该方法测定结果准确、重复性好,可作为石榴皮炭饮片含量测定方法。

除了内在质量评价,本试验同时还对传统的外观性状进行了考察,通过加权系数计算综合得分来考察石榴皮炭的质量,同时兼顾了外观性状和内部质量,可以更全面地反映饮片的质量。因此,本研究对规范石榴皮炭的炮制工艺、指导企业饮片生产、保证饮片的质量具有一定的借鉴意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:87.
- [2] 杨成,董群. 石榴皮提取物体内抗过敏作用的实验研究[J]. 中成药,2013,35(1):175.
- [3] 张葵之,张红,王雪飞. 石榴皮对抗STZ诱导的小鼠血糖升高作用研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(6):96.
- [4] 章迅,吴艾平,张永红. 石榴皮多酚对人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖及凋亡的影响[J]. 天津中医药大学学报,2012,31(4):214.
- [5] 周本宏,涂杰,刘苗苗,等. 石榴皮鞣质对慢性肾小球肾炎的改善作用[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(21):1739.
- [6] 周本宏,周静,梁艺小,等. 石榴皮鞣质改善大鼠肾纤维化作用研究[J]. 中草药,2014,45(11):1585.
- [7] 周倩,孙立立,戴衍朋,等. 石榴皮、石榴瓢及石榴籽的化学成分比较研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(13):2159.
- [8] 卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京:人民卫生出版社,1988:249.
- [9] 李海霞,王钊,刘延泽. 石榴科植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2002,33(8):765.
- [10] 刘振平,陈祥贵,彭海燕,等. RP-HPLC法同时测定石榴皮中4种多酚类成分的含量[J]. 中国药房,2013,24(3):238.
- [11] 崔翠翠,张学兰,李慧芬. 炮制对石榴皮中没食子酸、鞣花酸和鞣质含量的影响[J]. 中成药,2010,32(4):613.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-24)

(编辑:刘 萍)