

白屈菜蜜炙工艺的优化^Δ

王仁广*,隋欣彤,汪艳群,王鑫荣,钟修俊,赵天倚,王淑敏[#](长春中医药大学药学院,长春 130117)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)12-1473-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.12.11

摘要 目的:优化白屈菜的蜜炙工艺。方法:以水与炼蜜质量比、蜜水与白屈菜质量比、炒制温度、炒制时间为考察因素,白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱总含量为响应值,采用Box-Behnken响应面法优化其蜜炙工艺并验证。结果:最优蜜炙工艺为水与炼蜜质量比1:1.9(g/g),蜜水与白屈菜质量比21:100(g/g),炒制温度122℃,炒制时间10.40min。经3次试验验证,5种成分的平均总含量为10.37mg/g,RSD为0.23%,与预测值(10.39mg/g)的相对误差为0.19%。结论:优化所得白屈菜蜜炙工艺稳定、可行。

关键词 白屈菜;蜜炙工艺;Box-Behnken响应面法;含量测定

Optimization of the Honey-stir-fired Technology of *Chelidonium majus*

WANG Renguang, SUI Xintong, WANG Yanqun, WANG Xinrong, ZHONG Xiujun, ZHAO Tianyi, WANG Shumin(College of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the honey-stir-fired technology of *Chelidonium majus*. METHODS: Taking the mass ratio of water to honey, the ratio of honey water to *C. majus*, stir-fired temperature, stir-fired time as the factors, the total contents of chelidionine, coptisine hydrochloride, sanguinarine, berberine, chelerythrine as response values, Box-Behnken response surface method was used to optimize the processing technology, and validation test was conducted. RESULTS: The optimum process conditions were as follows the ratio of water to refined honey 1:1.9 (g/g), the ratio of honey water to *C. majus* 21:100 (g/g), stir-fired temperature 122 °C, stir-fired time 10.40 min. After 3 times of validation, average total contents of 5 components was 10.37 mg/g (RSD=0.23%), relative error of which with predicted value (10.39 mg/g) was 0.19%. CONCLUSIONS: The optimized honey-stir-fired technology of *C. majus* is stable and feasible.

KEYWORDS *Chelidonium majus*; Honey-stir-fired technology; Box-Behnken response surface method; Content determination

白屈菜为罂粟科植物白屈菜 *Chelidonium majus* L. 的干燥全草,味苦,性凉,有毒,具有解痉止痛、止咳平喘的功效^[1]。药理研究表明,白屈菜具有抑制平滑肌、抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化等多种作用,在临床中被广泛用于治疗溃疡、痉挛、口腔感染、慢性支气管炎、肺结核和哮喘等疾病^[2-8]。白屈菜主要含有生物碱类和非生物碱类成分,而生物碱类成分是其主要的药效成分,包括白屈菜碱、普鲁托品、白屈菜红碱、甲氧基白屈菜碱、血根碱、隐品碱、原阿片碱、小檗碱、盐酸黄连碱、木兰花碱等^[2,9]。有研究将白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱作为白屈菜化学分析的指标性成分^[10-12]。据文献报道,白屈菜在治疗某些胃和胆道疾病时可引发急性肝炎,严重者甚至可导致肝衰竭^[13]。白屈菜红碱可剂量依赖性地对大鼠肺组织产生长期毒性作用,并且可在一定剂量下引起大鼠全身性异常反应^[14-15]。因此,通过炮制降低白屈菜对肝、肺等器官组织的损害,对提高

该药临床应用的安全性和有效性具有重要的意义。

目前,2020版《中国药典》(一部)中关于白屈菜炮制的记载仅有净制方法^[1]。有学者利用醋焖法炮制白屈菜,结果发现,白屈菜醋制品中白屈菜碱等6种生物碱成分的总含量略低于生品^[16]。蜜炙是中药炮制的重要方法之一,其可增强中药的止咳平喘活性并减少毒副作用^[17-18]。现代药理研究表明,紫菀、麻黄、白花前胡等入肺经中药,经蜜炙后可增强其润肺止咳的功效^[19-21]。白屈菜亦为入肺经中药,所含的生物碱成分是其发挥止咳平喘作用的药效成分,加之蜂蜜也具有润肺止咳和一定的解毒作用,因此用蜂蜜炮制白屈菜可能会起到协同和减毒作用^[9,22]。

Box-Behnken响应面设计法适用于多因素、多水平的工艺考察试验,可通过指标量化和非线性拟合建立直观的数学模型来筛选最优工艺,预测科学、客观且准确性较高^[23]。基于此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定白屈菜蜜炙品中白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱的含量;同时以水与炼蜜质量比、蜜水与白屈菜质量比、炒制温度、炒制时间为考察因素^[17-18,24],蜜炙品中白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱总含量为响应值,采用Box-Behnken响应面法对其蜜炙工艺进行优化,以期为

Δ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No. 192485YY010358427)

* 博士研究生。研究方向:中药炮制关键技术及科学内涵。电话:0431-86172786。E-mail:727736000@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药炮制、中药分析、药用微生物物质基础与药理学。电话:0431-86172786。E-mail:446097156@qq.com

白屈菜的炮制加工生产提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究主要所用仪器有LC-2030型HPLC仪及配套的四元梯度泵、紫外检测器、自动进样器、化学工作站(日本Shimadzu公司),HH-6型数显恒温水浴锅(常州市江南实验仪器厂),MS-5型炒货机(常州市金坛迈斯机械有限公司),DE-100型高速万能粉碎机(浙江红景天工贸有限公司),EL-204万分之一型电子分析天平、AB135-S型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)等。

1.2 药材与试剂

白屈菜饮片(批号C18112303)购自河北仁心药业有限公司,经长春中医药大学药学院姜大成教授鉴定为*C. majus* L.的干燥全草;白屈菜碱对照品(批号DST190911-079)、盐酸黄连碱对照品(批号DST190913-003)、血根碱对照品(批号191115-002)、小檗碱对照品(批号DST180603-009)、白屈菜红碱对照品(批号34316-15-9)均购自成都德思特生物技术有限公司,纯度均不低于98%;椴树蜂蜜(批号SC12622242612379)购自吉林汪氏蜜蜂园有限公司;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 炼蜜的制备

取蜂蜜适量,用中火加热至微沸后再用文火加热,使温度达116~118℃;加热至满锅起鱼眼泡、手捻有黏性、两指间尚无长白丝出现,即得炼蜜。每10.00 g蜂蜜可得炼蜜8.01 g^[25]。

2.2 白屈菜蜜炙品的制备

取“2.1”项下所得炼蜜,用适量沸水稀释后,加入白屈菜饮片50.0 g,拌匀,闷润20 min,待蜜汁渗入饮片组织内部后,置于炒货机内炒至颜色变深、不粘手时取出,放凉,即得白屈菜蜜炙品。

2.3 白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分的含量测定

2.3.1 色谱条件 以Waters T₃-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈(A)-1%三乙胺溶液(用磷酸调节pH至3.0,B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 19%A; 5~15 min, 19%A→23%A; 15~45 min, 23%A→25%A),柱温为40℃,流速为1.0 mL/min,检测波长为269 nm,进样量为5 μL。

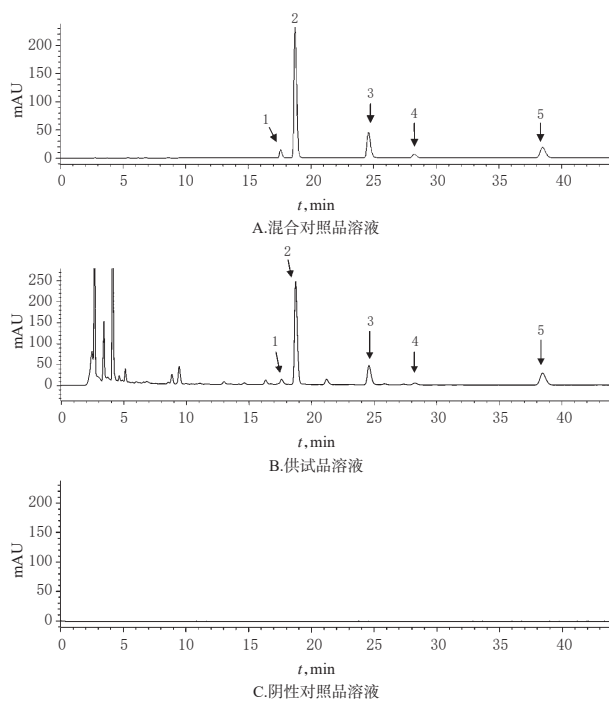
2.3.2 混合对照品溶液的制备 取白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解并定容至25 mL量瓶中,摇匀,制得上述5种成分质量浓度分别为501.00、1 163.80、200.60、50.10、100.50 μg/mL的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取“2.2”项下所得白屈菜蜜炙品粉末(过三号筛),约1 g,精密称定,置于圆底烧瓶

中,精密加入盐酸-甲醇混合溶液(0.5:100, V/V)20 mL,称定质量,加热回流1 h,放冷,再次称定质量,用盐酸-甲醇混合溶液(0.5:100, V/V)补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 mL,蒸干,残渣加50%甲醇使溶解,转移至10 mL量瓶中,加入50%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 以50%甲醇为阴性对照溶液。

2.3.5 系统适用性试验 取上述混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分色谱峰分离度均大于1.5,理论板数均大于3 000,且阴性对照对待测成分的测定无干扰。



注:1.白屈菜碱;2.盐酸黄连碱;3.血根碱;4.小檗碱;5.白屈菜红碱

Note: 1. chelidone; 2. coptisine hydrochloride; 3. sanguinarine; 4. berberine; 5. chelerythrine

图1 白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of 5 components as chelidone in honey-stir-fried *C. majus*

2.3.6 线性关系考察 取“2.3.2”项下混合对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制得系列质量浓度的线性关系溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样,以各待测成分质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

2.3.7 精密度试验 精密吸取“2.3.2”项下混合对照品溶液适量,加甲醇稀释4倍后,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱峰面积的RSD分别为

0.23%、0.23%、0.25%、0.26%、0.32% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

表1 白屈菜碱等5种成分的回归方程与线性范围
Tab 1 Regression equations and linear ranges of 5 components as chelidoniumine

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
白屈菜碱	$y=6\ 799.3x+385.13$	0.999 9	50.01~300.60
盐酸黄连碱	$y=12\ 928.1x+702.73$	0.999 9	116.38~698.28
血根碱	$y=29\ 626x-113.97$	0.999 9	20.06~120.36
小檗碱	$y=4\ 018.9x+224.37$	0.999 9	5.01~30.03
白屈菜红碱	$y=19\ 022x+366.53$	0.999 9	10.05~60.30

2.3.8 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、3、6、12、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱峰面积的RSD分别为1.04%、1.12%、0.94%、1.25%、0.83% ($n=5$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.9 重复性试验 取“2.2”项下白屈菜蜜炙品粉末(过三号筛),约1 g,精密称定,共6份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中5种待测成分的含量。结果,白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱含量的RSD分别为1.42%、1.57%、1.32%、1.64%、1.76% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的“2.2”项下白屈菜蜜炙品粉末(过三号筛),约0.5 g,精密称定,共6份,分别按各成分的已知量精密加入相同质量的“2.3.2”项下混合对照品溶液,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

2.3.11 样品含量测定 取白屈菜蜜炙品粉末(过三号筛)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中5种待测成分的含量。

2.4 单因素实验

在参考文献[17-18,24]的基础上,选择闷润时间、水与炼蜜质量比、蜜水与白屈菜质量比、炒制温度、炒制时间进行单因素考察。

2.4.1 闷润时间 取白屈菜饮片,每份约50.0 g,共6份,按“2.2”项下方法炮制,在水与炼蜜质量比1:1.5(g/g)、蜜水与白屈菜质量比20:100(g/g)、炒制温度110℃、炒制11 min的条件下,考察不同闷润时间(10、20、30、40、50、60 min)对白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分总含量的影响,结果见图2A。由图2A可知,当闷润时间为20 min时,5种成分总含量最高且保持稳定;且当闷润时间>20 min时,5种成分总含量趋于稳定,故选择闷润时间为20 min。

2.4.2 水与炼蜜质量比 取白屈菜饮片,每份约50.0 g,

表2 白屈菜碱等5种成分的加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests of 5 components as chelidoniumine ($n=6$)

待测成分	已知量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
白屈菜碱	1.210 6	1.208 0	2.400 1	98.47	98.89	1.25
	1.210 1	1.208 0	2.406 9	99.07		
	1.212 3	1.208 0	2.395 3	97.93		
	1.211 2	1.208 0	2.425 5	100.52		
	1.210 9	1.208 0	2.386 4	97.31		
	1.210 4	1.208 0	2.419 1	100.06		
盐酸黄连碱	2.669 2	2.655 0	5.244 8	97.01	99.74	1.69
	2.669 2	2.655 0	5.363 0	101.46		
	2.669 2	2.655 0	5.287 8	98.63		
	2.669 2	2.655 0	5.343 8	100.74		
	2.669 2	2.655 0	5.314 1	99.62		
	2.669 2	2.655 0	5.349 4	100.95		
血根碱	0.420 1	0.420 0	0.832 9	98.28	99.95	1.29
	0.419 7	0.420 0	0.839 0	99.84		
	0.420 7	0.420 0	0.834 5	98.53		
	0.421 4	0.420 0	0.846 3	101.16		
	0.421 8	0.420 0	0.845 2	100.81		
	0.420 8	0.420 0	0.845 3	101.06		
小檗碱	0.103 6	0.102 0	0.203 8	98.24	99.39	1.10
	0.101 4	0.102 0	0.202 8	99.41		
	0.104 7	0.102 0	0.207 3	100.59		
	0.105 2	0.102 0	0.205 7	98.53		
	0.102 9	0.102 0	0.203 8	98.92		
	0.104 1	0.102 0	0.206 8	100.69		
白屈菜红碱	0.348 1	0.348 0	0.693 0	99.11	98.91	1.31
	0.347 3	0.348 0	0.691 2	98.83		
	0.348 9	0.348 0	0.688 3	97.52		
	0.349 7	0.348 0	0.701 8	101.18		
	0.348 5	0.348 0	0.693 2	99.04		
	0.347 8	0.348 0	0.688 1	97.79		

共6份,按“2.2”项下方法炮制,在闷润时间20 min、蜜水与白屈菜质量比20:100(g/g)、炒制温度110℃、炒制11 min的条件下,考察不同水与炼蜜质量比(1:0.5、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3,g/g)对白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分总含量的影响,结果见图2B。由图2B可知,随着水与炼蜜质量比增加,5种成分的总含量呈先升高后降低的趋势;当水与炼蜜质量比为1:2(g/g)时,5种成分的总含量最高,故选择水与炼蜜质量比为1:1.5~1:2.5(g/g)。

2.4.3 蜜水与白屈菜质量比 取白屈菜饮片,每份约50.0 g,共6份,按“2.2”项下方法炮制,在闷润时间20 min、水与炼蜜质量比1:2(g/g)、炒制温度110℃、炒制11 min的条件下,考察不同蜜水与白屈菜质量比(10:100、15:100、20:100、25:100、30:100、35:100,g/g)对白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分总含量的影响,结果见图2C。由图2C可知,随着蜜水与白屈菜质量比增加,5种成分的总含量呈先升高后降低的趋势;当蜜水与白屈菜质量比为20:100(g/g)时,5种成分的总含量最高,故选择蜜水与白屈菜质量比为15:100~25:100(g/g)。

2.4.4 炒制温度 取白屈菜饮片,每份约50.0 g,共7

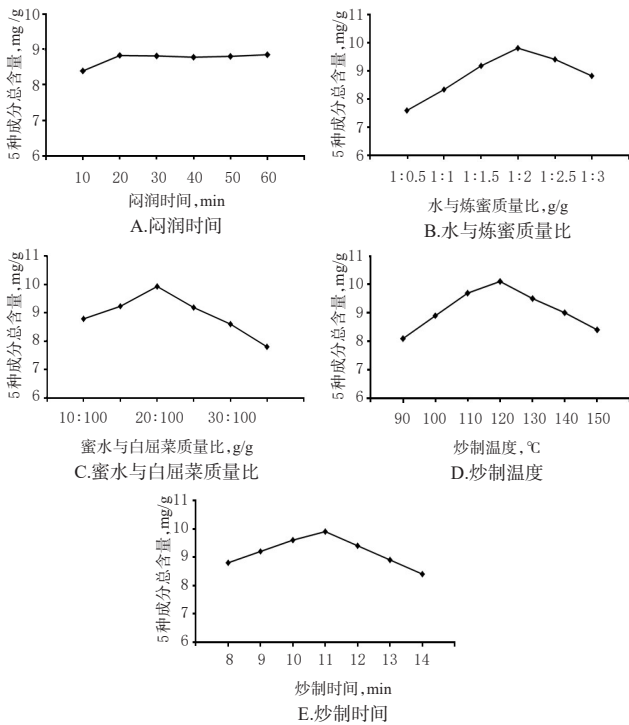


图2 各因素对白屈菜蜜炙品中5种成分总含量的影响
Fig 2 Effects of each factor on the total content of 5 components in honey-stir-fried *C. majus*

份,按“2.2”项下方法炮制,在闷润时间20 min、水与炼蜜质量比1:2(g/g)、蜜水与白屈菜质量比20:100(g/g)、炒制11 min的条件下,考察不同炒制温度(90、100、110、120、130、140、150 °C)对白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分总含量的影响,结果见图2D。由图2D可知,随着炒制温度升高,5种成分的总含量呈先升高后降低的趋势;当炒制温度为120 °C时,5种成分的总含量最高,故选择炒制温度为110~130 °C。

2.4.5 炒制时间 取白屈菜饮片,每份约50.0 g,共7份,按“2.2”项下方法炮制,在闷润时间20 min、水与炼蜜质量比1:2(g/g)、蜜水与白屈菜质量比20:100(g/g)、炒制温度120 °C的条件下,考察不同炒制时间(8、9、10、11、12、13、14 min)对白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分总含量的影响,结果见图2E。由图2E可知,随着炒制时间延长,5种成分的总含量呈先升高后降低的趋势;当炒制时间为11 min,5种成分的总含量最高,故选择炒制时间为10~12 min。

2.5 Box-Behnken 响应面优化白屈菜蜜炙工艺

2.5.1 实验设计与结果 在单因素实验基础上,以水与炼蜜质量比(A)、蜜水与白屈菜质量比(B)、炒制温度(C)、炒制时间(D)为考察因素,以白屈菜蜜炙品中5种成分总含量为响应值,采用4因素3水平设计实验。白屈菜蜜炙工艺的实验因素与水平见表3,实验设计方案与结果见表4。

2.5.2 模型拟合与方差分析 采用Design-Expert 12 软

表3 白屈菜蜜炙工艺的实验因素与水平

Tab 3 Factors and levels of honey-stir-fired technology of *C. majus*

水平	A, g/g	B, g/g	C, °C	D, min
-1	1:1.5	15:100	110	10
0	1:2	20:100	120	11
1	1:2.5	25:100	130	12

表4 白屈菜蜜炙工艺的实验设计方案与结果

Tab 4 Scheme and results of honey-stir-fired technology of *C. majus*

试验号	A	B	C	D	5种成分总含量, mg/g
1	0	-1	0	-1	9.70
2	-1	0	0	-1	9.90
3	1	1	0	0	9.10
4	0	-1	1	0	9.23
5	0	0	1	1	8.68
6	1	-1	0	0	9.45
7	0	0	1	-1	9.82
8	0	1	0	1	8.81
9	1	0	1	0	8.70
10	-1	1	0	0	9.69
11	-1	0	-1	0	8.79
12	1	0	0	0	10.27
13	1	0	0	0	10.32
14	1	0	-1	-1	9.71
15	1	0	0	0	10.17
16	1	1	0	-1	9.89
17	-1	0	0	1	9.21
18	1	1	1	0	9.25
19	-1	-1	0	0	9.23
20	1	0	0	0	10.30
21	1	0	-1	0	9.60
22	1	0	0	0	10.26
23	1	0	0	-1	9.81
24	1	0	0	1	9.10
25	1	-1	0	1	9.12
26	-1	0	1	0	9.86
27	1	0	-1	1	9.34
28	1	1	-1	0	9.13
29	1	-1	-1	0	9.21

件对表4的总含量数据进行拟合并建立二次多元回归模型,得方程为 $Y=10.26-0.02A-0.38B-5.06\times 10^{-3}C-0.08D-0.19AB+0.03AC-0.49AD-0.13BC-6.60\times 10^{-3}BD-0.20CD-0.56A^2-0.34B^2-0.50C^2-0.42D^2$ 。方差分析结果显示,模型的P值小于0.000 1,表明二次方程拟合极显著;拟合方程的相关系数(R^2)为0.980 5,表明响应值的变化有98.05%来自于所选自变量,模型误差较小,可用于预测5种成分总含量;失拟项P值为0.106 5>0.05,表明该模型拟合程度较好。4个因素对白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分总含量影响的显著性由高到低为 $B>D>A>C$ 。其中,因素B、D的影响显著($P<0.05$),而因素A、C的影响不显著($P>0.05$);其余各项因素AD、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 、AB、BC、CD的影响亦显著($P<0.05$),而因素AC、BD影响不显著($P>0.05$),详见表5。

表5 Box-Behnken 响应面回归模型的方差分析结果

Tab 5 Variance analysis of regression model for Box-Behnken response surface test

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
模型	6.88	14	0.49	50.41	<0.000 1
A	5.03×10^{-3}	1	5.03×10^{-3}	0.52	0.484 2
B	1.75	1	1.75	179.23	<0.000 1
C	3.07×10^{-4}	1	3.07×10^{-4}	0.03	0.861 7
D	0.07	1	0.07	7.31	0.017 2
AB	0.15	1	0.15	15.50	0.001 5
AC	3.06×10^{-3}	1	3.06×10^{-3}	0.31	0.584 0
AD	0.97	1	0.97	99.39	<0.000 1
BC	0.06	1	0.06	6.53	0.022 9
BD	1.74×10^{-4}	1	1.74×10^{-4}	0.02	0.895 5
CD	0.17	1	0.17	17.09	0.001 0
A ²	2.06	1	2.06	210.96	<0.000 1
B ²	0.77	1	0.77	79.05	<0.000 1
C ²	1.64	1	1.64	168.53	<0.000 1
D ²	1.17	1	1.17	120.01	<0.000 1
残差	0.14	14	9.74×10^{-3}		
失拟项	0.12	10	0.01	3.77	0.106 5
纯误差	0.01	4	3.27×10^{-3}		
总离差	7.01	28			

2.5.3 响应面分析 为进一步评价各因素交互作用对白屈菜蜜炙品中白屈菜碱等5种成分总含量的影响,本研究采用Design-Expert 12软件分别绘制响应曲面和等高线图,结果见图3。由图3可知,因素A与因素B、因素A与因素D、因素B与因素C、因素C与因素D交互作用较为明显,而因素A与因素C、因素B与因素D交互作用不明显。

2.5.4 最佳炮制工艺的确定及验证 基于Design-Expert 12软件优化得到最优炮制工艺为水与炼蜜质量比1:1.89(g/g),蜜水与白屈菜质量比20.62:100(g/g),炒制温度121.91℃,炒制时间10.37min,白屈菜蜜炙品中5种成分总含量的预测值为10.39mg/g。

结合生产实际,确定最优炮制工艺为水与炼蜜质量比1:1.9(g/g),蜜水与白屈菜质量比21:100(g/g),炒制温度122℃,炒制时间10.40min。按此最优炮制工艺进行3次试验验证。结果,5种成分总含量分别为10.37、10.40、10.35mg/g,平均值为10.37mg/g,RSD为0.23%(n=3);与预测值的相对误差为0.19%,表明模型优化所得蜜炙工艺稳定、可行。

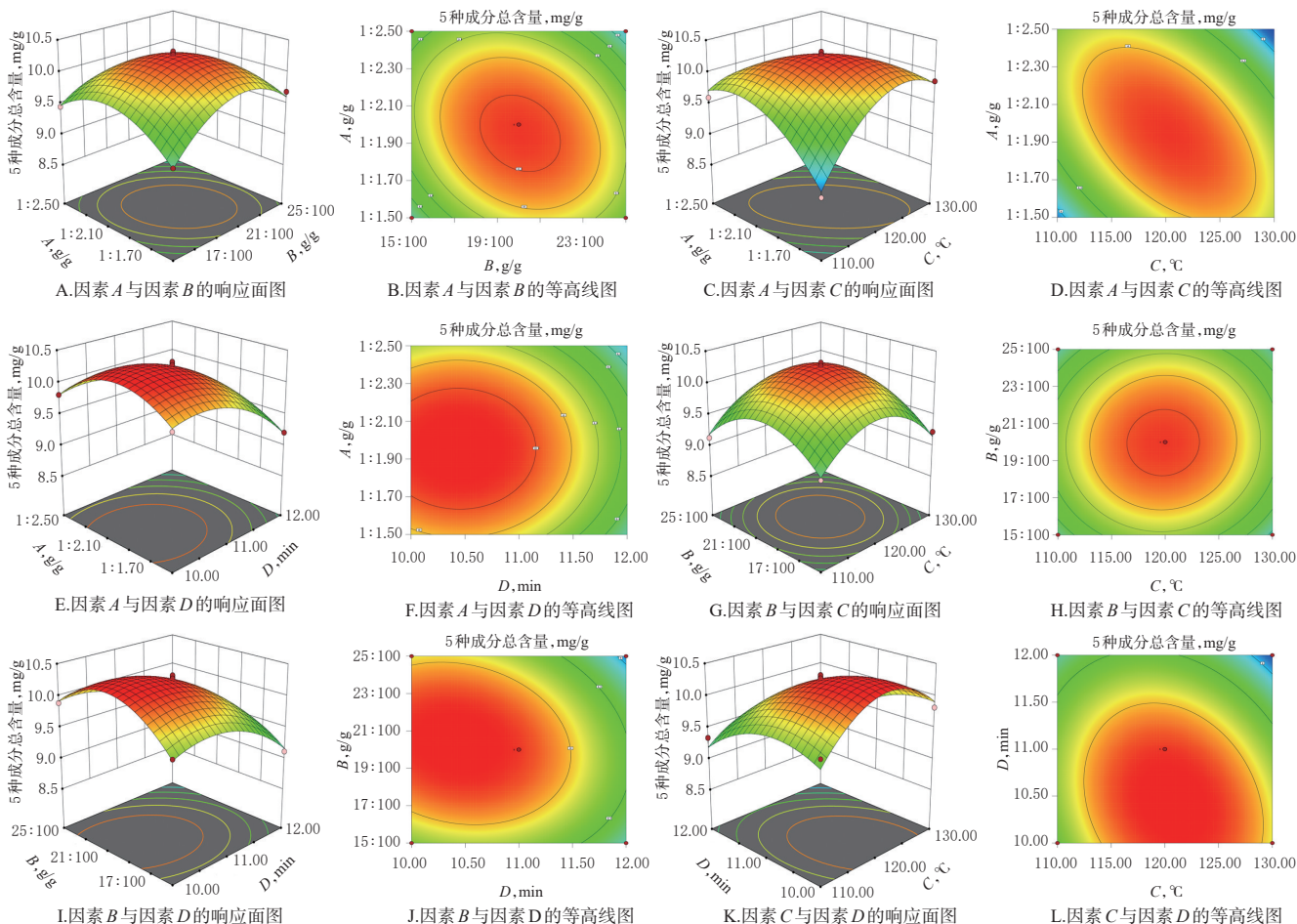


图3 各因素交互作用对白屈菜蜜炙品中5种成分总含量影响的响应面和等高线图

Fig 3 Response surface and contour map of the effects of various factors interaction on the total contents of 5 components in honey-stir-fried *C. majus*

3 讨论

本研究参考文献[10-12]的方法,选择乙腈和1%三乙胺溶液(用磷酸调节pH至3.0)作为流动相,在前期进行的等度洗脱考察中发现,不同比例的流动相均无法使5个待测成分色谱峰的分离度与拖尾因子同时符合要求,因此选择梯度洗脱进行分离。结果显示,采用“2.3.1”项下的洗脱条件时,5个待测成分色谱峰峰形良好,均可实现基线分离,且分离度均大于1.5。同时,课题组又对不同色谱柱(Waters T₃-C₁₈、Inertsil ODS-SP-C₁₈、Diamonsil ODS-C₁₈、Waters CSH-C₁₈、Agilent SB-C₁₈;规格均为250 mm×4.6 mm,5 μm)进行了比较,结果发现,当色谱柱为Waters T₃-C₁₈时,5个待测成分色谱峰的分离度良好且峰形对称,故选择Waters T₃-C₁₈为色谱柱。

在单因素实验中发现,白屈菜蜜炙品中5种成分总含量在炮制过程中主要受闷润时间、水与炼蜜质量比、蜜水与白屈菜质量比、炒制温度、炒制时间的影响;但当闷润时间达到20 min后,其对5种成分总含量的影响较小,故采用Box-Behnken响应面法对其余4个因素进行工艺优化。传统的蜜炙过程采用炒制法,炒制时火候难以掌握,太过易焦化,不及则不能达到炮制的要求,易造成炮制品质量不稳定,从而影响临床应用效果^[26]。为此,本研究采用炒货机进行蜜炙,机器的温度以数显形式展示,可以精确控制炮制温度,优化所得工艺参数属于小试范围,可通过中试放大进行参数修正以适应工业大生产。

在炮制过程中,中药化学成分会在辅料、温度等多方面的作用下发生量变和质变,使得其药效及药性发生改变^[18]。本课题组后期将通过药效学实验比较白屈菜蜜炙前后止咳平喘作用的差异,通过毒理学实验比较其蜜炙前后毒性的变化;同时,采用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术对白屈菜蜜炙前后的化学成分进行分析,以确定蜜炙增效减毒的物质基础。

本研究所得最优蜜炙工艺为水与炼蜜质量比1:1.9(g/g),蜜水与白屈菜质量比21:100(g/g),炒制温度122℃,炒制时间10.40 min。在此工艺条件下,5种成分的平均总含量为10.37 mg/g。优化所得蜜炙工艺预测性良好且稳定、可行,可为规范白屈菜饮片蜜炙工艺、成品质量及其工业化生产加工提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:112-113.
[2] 白冰,张文妮.白屈菜的最新研究进展[J].黑龙江医药,2009,22(6):794-796.
[3] PARK S W, KIM S, KIM Y, et al. Chelidonium majus L. extract induces apoptosis through caspase activity via

MAPK-independent NF-κB signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells[J]. *Oncology Reports*, 2015, 33(1):419-424.
[4] PAN J, YANG Y, ZHANG R, et al. Enrichment of Chelidonium majus from Chelidonium majus L. using macroporous resin and its antifungal activity[J]. *J Chromatogr B*, 2017, 17(17):7-14.
[5] KIM S H, HONG J H, LEE Y C. Chelidonium majus, a principal isoquinoline alkaloid of Chelidonium majus, attenuates eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-4 and eotaxin-2 expression in asthmatic mice[J]. *Pharmacological Reports Pr*, 2015, 67(6):1168-1177.
[6] MONAVARI S H, SHAHRABADI M S, KEYVANI H, et al. Evaluation of in vitro antiviral activity of Chelidonium majus L. against herpes simplex virus type-1[J]. *Afr J Microbiol Res*, 2012, 6(20):4360-4364.
[7] 刘富岗,冯素香,张杰,等.白屈菜多糖对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2017,38(6):481-485.
[8] GU Y, QIAN D, DUAN J A, et al. Simultaneous determination of seven main alkaloids of Chelidonium majus L. by ultra-performance LC with photodiode-array detection[J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(8):1004-1009.
[9] LEI Q F, ZHAO X L, XU L J, et al. Chemical constituents of plants from tribe chelidoneae and their bioactivities[J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(1):1-21.
[10] 左金梁,白璐,宋欣鑫,等. RP-HPLC法同时测定白屈菜药材中血根碱、小檗碱和白屈菜红碱的含量[J].*药物分析杂志*, 2008, 28(6):903-905.
[11] 赵胜男,李瑞海,贾天柱. 21个批次白屈菜6种成分含量测定研究[J].*中华中医药学刊*, 2020, 38(11):215-217.
[12] 鲁文静,罗世恒,陈世忠.白屈菜中多种生物碱含量的高效液相色谱法测定[J].*时珍国医国药*, 2013, 24(3):601-603.
[13] MORO P A, CASSETTI F, GIUGLIANO G, et al. Hepatitis from Greater celandine (Chelidonium majus L.): review of literature and report of a new case[J]. *J Ethnopharmacology*, 2009, 124(2):328-332.
[14] 刘建明,刘宸辰,刘新民,等.白屈菜赤碱对大鼠肺组织的长期毒性作用及其对肺组织中NF-κB表达的影响[J].*吉林大学学报(医学版)*, 2019, 45(3):518-523.
[15] 罗飞亚,马新群,林飞.白屈菜红碱对大鼠的长期毒性实验研究[J].*癌变·畸变·突变*, 2014, 26(6):459-462.
[16] 丁原全,李瑞海,贾天柱.白屈菜炮制方法的初步研究[J].*化学工程师*, 2020, 34(2):68, 73-75.
[17] 沈伟,路立峰,李赫宇.正交实验优化杠板归的蜜炙工艺[J].*中国药房*, 2016, 27(25):3651-3653.
[18] 陈晓霞,鞠成国,贾天柱.综合加权评分法优选百部蜜炙

管花肉苁蓉多糖水提物的分离及免疫活性研究[△]

艾拉旦·麦麦提艾力^{1*}, 李洋¹, 姚军^{1#}, 袁洁²(1.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学厚博学院, 新疆克拉玛依 834000)

中图分类号 R284.2; R285; O629.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)12-1479-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.12.12

摘要 目的:分离管花肉苁蓉多糖水提物,考察分离物的体外免疫活性。方法:采用AB-8大孔吸附树脂法对管花肉苁蓉多糖进行脱色,以多糖保留率和多糖脱色率为指标进行综合评分,以吸附速率、脱色时间、上样质量浓度为因素,采用正交实验优化脱色工艺并验证。采用DEAE-650M离子交换柱层析柱对脱色后的管花肉苁蓉多糖水提物进行分离。采用CCK-8法检测不同质量浓度(6.25~100 μg/mL)分离前、后各种多糖对小鼠巨噬细胞RAW264.7增殖率的影响,采用Griess法和酶联免疫吸附测定法检测低、中、高质量浓度(12.5、25、50 μg/mL)分离前、后各种多糖对脂多糖(LPS)诱导RAW264.7细胞一氧化氮(NO)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)释放量的影响。结果:AB-8大孔吸附树脂的最优脱色工艺为吸附流速1.2 BV/h,脱色时间9 h,上样质量浓度25 mg/mL;3次验证实验的综合评分分别为63.43%、63.29%、63.34%,平均值为63.35%(RSD=0.11%,n=3)。从管花肉苁蓉多糖水提物中分离出1种中性多糖(CTZ)和5种酸性多糖(CT1、CT2、CT3、CT4、CT5),含量分别为299.2、168.0、123.2、121.6、54.4、11.2 mg/g。与对照组比较,6.25~100 μg/mL的CTZ(6.25 μg/mL除外)、CT2、CT4、CT5和6.25 μg/mL的CTC(即分离前的多糖)均可显著增加RAW264.7细胞的增殖率(P<0.05),6.25~100 μg/mL的CT1、CT3和50 μg/mL的CTC均可显著降低RAW264.7细胞的增殖率(P<0.05)。与LPS组比较,低、中、高质量浓度CTC、CT2、CT3、CT5组和低质量浓度CTZ组细胞的NO释放量均显著降低(P<0.05),高质量浓度CT1、CT4组细胞的NO释放量均显著升高(P<0.05);低、中、高质量浓度各组细胞的IL-6(高质量浓度CT1组和低质量浓度CT5组除外)、TNF-α释放量(中质量浓度CT1组除外)均显著降低(P<0.05)。结论:本研究所优化的大孔吸附树脂脱色工艺稳定、可行;管花肉苁蓉多糖水提物中可分离出1种中性多糖、5种酸性多糖,其中酸性多糖CT2的免疫活性较强。

关键词 管花肉苁蓉多糖;脱色;分离;免疫活性

Study on Separation and Immunocompetence of Water Extract of Polysaccharide from *Cistanche tubulosa*

Ailadan · Maimaitiaili¹, LI Yang¹, YAO Jun¹, YUAN Jie²(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Collage of Houbo, Xinjiang Medical University, Xinjiang Klamayi 834000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To isolate the water extract of polysaccharide from *Cistanche tubulosa*, and to investigate their immunocompetence *in vitro*. METHODS: AB-8 macroporous adsorption resin was used to decolorize *C. tubulosa* polysaccharide. The decolorization process was optimized by orthogonal test with retention rate and decolorization rate of polysaccharide as comprehensive score, and using adsorption rate, decolorization time, sample concentration as factors. The verification tests were conducted. DEAE-650M ion exchange column was used to separate the water extract of decolorized *C. tubulosa* polysaccharide.

- 工艺[J].中国药房,2016,27(10):1389-1392.
- [19] 吴毅,陈子珺,胡月娟,等.不同炮制方法的紫菀饮片祛痰作用的实验研究[J].上海中医药大学学报,2006,20(3):55-57.
- [20] 钟凌云,祝婧,龚千锋,等.炮制对麻黄发汗、平喘药效影响研究[J].中药药理与临床,2008,24(6):53-56.
- [21] 张村,殷小杰,李丽,等.白花前胡蜜炙前后的药效学比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):146-148.
- [22] 黄娟,欧小群,韩丽,等.蜂蜜的现代临床应用综述[J].中国当代医药,2012,19(21):20-22.
- [23] 李莉,张赛,何强,等.响应面法在试验设计与优化中的应用[J].实验室研究与探索,2015,34(8):41-45.
- [24] 金晨,翟兴英,黄媛媛,等.金樱子蜜炙工艺优选及其质量控制[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(4):11-14.
- [25] 刘波.中药炮制技术[M].北京:人民卫生出版社,2014:176.
- [26] 李筱玲,衡宁娟,邓寒霜.正交试验法优选蜜炙南五味子工艺条件研究[J].陕西农业科学,2017,63(12):1-3.

△ 基金项目:新疆维吾尔自治区科学技术厅天然药物活性组分与释药技术重点实验室(No.CJDX1713);新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目(No.XJ2020G209);克拉玛依市创新人才工程项目(No.2019RC001A-02);

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail:2205118725@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:药物分析。E-mail:xydyaojun@163.com

(收稿日期:2021-02-02 修回日期:2021-05-24)

(编辑:陈宏)