

基于正交试验和多指标加权法分析并优化醋茺花饮片的炮制工艺*

张萍¹, 米宏英², 严华¹, 魏锋^{1**}, 高慧媛², 马双成¹

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

摘要 **目的:** 基于正交试验设计的多指标加权评分法分析研究并优化醋茺花饮片的炮制工艺, 为规范茺花饮片的醋制炮制工艺提供技术支持。**方法:** 采用正交试验设计, 以醋制品中绿原酸、银椴苷、木犀草素、芹菜素、羟基茺花素、茺花素 6 个成分的总含量, 醇溶性浸出物的量及外观性状为评价指标, 分析辅料醋用量、闷润时间、炮制温度及炮制时间 4 个因素对炮制工艺的影响, 并优选茺花饮片的醋制工艺。**结果:** 辅料醋用量及炮制温度对试验结果有显著影响, 而闷润时间及炮制时间对试验结果无显著影响, 综合考察各因素对工艺的影响, 优化后的醋炙茺花炮制工艺为每 1 kg 茺花饮片加醋 0.3 kg, 闷润 15 min 后 160 °C 炒制 10 min。**结论:** 本研究对规范茺花的醋制炮制工艺具有一定的指导和参考意义。

关键词: 茺花饮片; 正交试验; 醋制工艺; 加权评分法; 成分含量; 浸出物; 外观性状

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793 (2024) 07 - 1145 - 09

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2023 - 0555

Analyze and optimize the stir - baked with vinegar technology of Genkwa Flos decoction pieces by orthogonal experiment and multi - index weighting method *

ZHANG Ping¹, MI Hong - ying², YAN Hua¹, WEI Feng^{1**},
GAO Hui - yuan², MA Shuang - cheng¹

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract **Objective:** To analyze and optimize stir - baked with vinegar technology of Genkwa Flos decoction pieces by multi - index weighted scoring method based on orthogonal experiment, and to provide technical index on standardization of stir - baked with vinegar technology of Genkwa Flos decoction pieces. **Methods:** The orthogonal experiment was employed to analyze and evaluate the four key factors related to stir - baked with vinegar technology including the amount of vinegar, dampening time, temperature and stir - baked time by the six main indicators including the total contents of chlorogenic acid, tiliroside, luteolin, apigenin, hydroxygenkwanin and genkwanin, the content of alcohol extractive and appearance characters. **Results:** The amount of vinegar and stir - baked temperature had notable effects, while the dampening time and stir - baked time had no notable effects on the test results. Considering comprehensively the effects of four key factors, the optimized stir - baked with vinegar technology was as follows: add 0.3 kg of vinegar to 1 kg of Genkwa Flos, and fry at 160 °C for

* 国家中医药现代化研究专项(2018YFC1707003)

** 通信作者 Tel:(010)53852020; E - mail: weifeng@nifdc.org.cn

第一作者 Tel:(010)53852099; E - mail: zhangping@nifdc.org.cn

10 min after dampening for 15 min. **Conclusion:** This study offers guidance and reference for standardizing the stir-baked with vinegar technology of Genkwa Flos decoction pieces.

Keywords: Genkwa Flos decoction pieces; orthogonal experiment; vinegar processing technology; multi-index weighted scoring method; compound content; extractives; appearance character

芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 又名药鱼草、闷头花、鱼毒等, 为常用毒性药材之一。始载于《神农本草经》<草部下品>^[1], 具有泻水逐饮、杀虫疗疮的功效。芫花生品具毒性, 峻泻逐水力较猛, 多外用杀虫疗疮。炮制后毒性降低, 临床上多用于水肿胀满、胸腹积水、痰饮积聚、气逆咳喘等症^[2]。历代文献记载的芫花炮制方法有多种, 包括清炒、醋炒、醋煮、酒炒、醋炙、醋浸、与巴豆共制、捣汁、醋调面裹煨、酒浸等^[3-4]。但延续至今仍然使用的炮制方法有醋炙(炒制)、醋煮法, 在全国各地方炮制规范中均有收载^[5]。芫花炮制的目的是降低毒性, 缓和泻下作用^[6-7]。现行《中华人民共和国药典》芫花标准中收载的是醋炙法, 每 100 kg 芫花, 用醋 30 kg, 炒至醋吸尽。查阅全国各地中药饮片炮制规范可知, 不同地区在芫花饮片炮制时用醋量是不同的, 每 100 kg 芫花用醋量从 18 kg 到 70 kg 不等, 其他炮制工艺参数均没有明确指示, 炮制终点的判断也缺少量化的指标。芫花的炮制工艺与炮制程度, 更多依赖于传统经验判断。

随着现代科学技术的应用与推广, 如何将传统的中药饮片炮制工艺标准化、规范化, 一直是行业内正在探讨的课题^[8-11]。本研究以毒性饮片芫花为研究对象, 在查阅文献基础上, 采用正交试验设计多指标加权评分法, 以芫花中含有的 6 个成分(绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素)的总量、醇溶性浸出物量、饮片外观性状为量化考核指标, 通过考察用醋量、闷润时间、炮制温度以及炮制时间这 4 个因素对芫花炮制工艺的影响, 对其炮制工艺进行优化, 得到影响质量的关键技术参数, 优化筛选芫花醋炙炮制工艺, 规范炮制技术, 进而加强毒性饮片的质量控制, 保证临床用药安全、有效。

1 仪器与试剂

Waters e2690 - 2695 高效液相色谱仪, 包括 e2695 Separations Module, 2998 PDA Detector, Empower 色谱工作站 (Waters 公司), METTLER TOLEDO XPE105 分析天平 (天平精度 0.01 mg, 梅特勒-托利

多国际贸易上海有限公司); KQ - 300DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

对照品绿原酸 (批号 110753 - 202018, 含量以 96.3% 计)、木犀草素 (批号 111520 - 202006, 含量以 96.3% 计)、芹菜素 (批号 111901 - 202004, 含量以 98.4% 计)、芫花素 (批号 111899 - 201202, 含量以 94.9% 计) 由中国食品药品检定研究院提供, 银椴苷 (纯度以 98.5% 计)、羟基芫花素 (纯度以 98.5% 计) 购自上海源叶生物科技有限公司, 均供含量测定用。

甲醇为分析纯, 流动相用乙腈为色谱纯, 水为 Millipore 二次超纯水。芫花样品 (批号 H1901380) 购于饮片生产企业, 经中国食品药品检定研究院张萍研究员鉴定为芫花 (*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.) 正品。辅料醋 (北京龙门醋业有限公司, 批号 6904800168189)

2 含量测定

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液

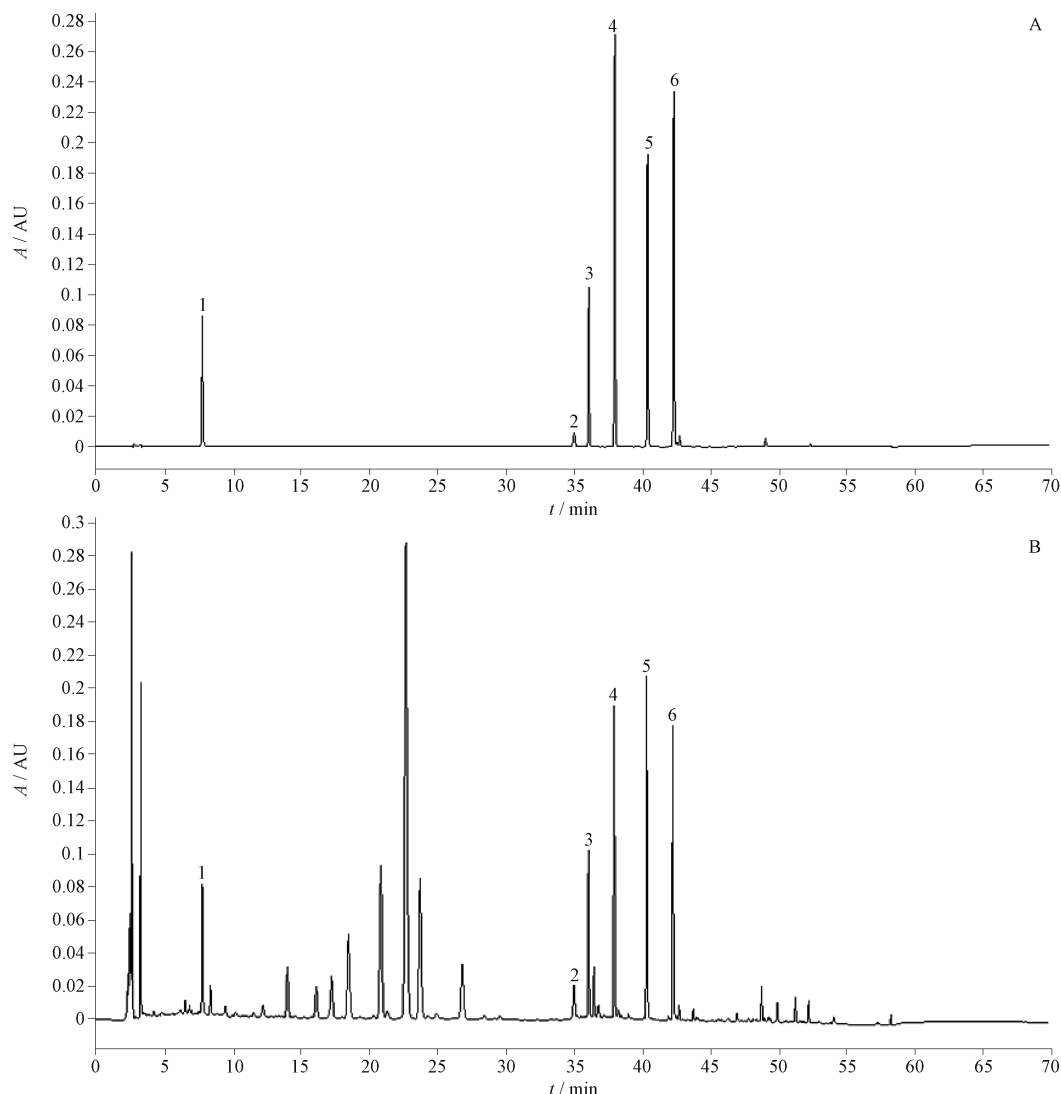
取绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、芫花素、羟基芫花素的对照品适量, 精密称定, 加 70% 甲醇使溶解并定容至 100 mL 量瓶中, 制成每 1 mL 含绿原酸 25 μg 、木犀草素 5 μg 、银椴苷 25 μg 、芹菜素 50 μg 、芫花素 50 μg 和羟基芫花素 50 μg 的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液

取本品粉末 (过 4 号筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称量, 超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 处理 50 min, 放冷, 再称量, 用 70% 甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 4 min, 8% A \rightarrow 15% A; 4 ~ 26 min, 15% A \rightarrow 23% A; 26 ~ 30 min, 23% A; 30 ~ 40 min, 23% A \rightarrow 60% A; 40 ~ 50 min, 60% A \rightarrow 95% A), 流速 1 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。在上述色谱条件下, 混合对照品和样品色谱图见图 1。



1. 绿原酸 (chlorogenic acid) 2. 木犀草素 (luteolin) 3. 银椴苷 (tiliroside) 4. 芹菜素 (apigenin) 5. 羟基芫花素 (hydroxygenkwanin) 6. 芫花素 (genkwanin)

图 1 混合对照品(A)与样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference substances(A) and sample(B)

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系

分别精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 2、5、10、15、20、25 μL , 按“2.2”项下色谱条件进行测定。以各对照品进样量 ($X, \mu\text{g}$) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算线性回归方程。按 $S/N = 10$ 计算, 6 个成分的定量限, 结果详见表 1。

2.3.2 精密度

精密吸取“2.1.2”项下供试品溶液 10 μL , 按“2.2”色谱条件连续进样 6 次, 测定各成分色谱峰的峰面积, 计算绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟

基芫花素、芫花素峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.19%、2.7%、2.4%、0.33%、0.16%、0.10%, 表明仪器性能良好。

2.3.3 重复性

取同一份芫花样品 (批号 H1901380) 粉末 1 g, 共 6 份, 精密称定, 分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 进样 10 μL 进行测定, 记录各成分色谱峰的峰面积, 计算绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的含量均值分别为 0.2%、0.1%、0.1%、0.2%、0.1%、0.2%, RSD 分别为 0.64%、2.7%、1.6%、0.71%、0.55%、2.6%, 表明方法重复性较好。

表 1 6 个成分线性关系考察结果

Tab. 1 Results of linear regression equations of 6 components

成分 (component)	线性回归方程 (linear regression equation)	线性范围 (linear range)/ μg	r	定量限 (limit of quantitation)/ μg
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 1.02 \times 10^6 X - 2.69 \times 10^4$	0.05 ~ 0.65	0.999 7	0.018 4
木犀草素(luteolin)	$Y = 3.41 \times 10^6 X - 9.34 \times 10^4$	0.01 ~ 0.14	1.000	0.010 8
银椴苷(tiliroside)	$Y = 1.67 \times 10^6 X - 1.79 \times 10^5$	0.05 ~ 0.64	1.000	0.161 9
芹菜素(apigenin)	$Y = 2.70 \times 10^6 X - 3.71 \times 10^5$	0.10 ~ 1.30	1.000	0.007 8
羟基芫花素(hydroxygenkwanin)	$Y = 1.17 \times 10^6 X - 2.81 \times 10^5$	0.10 ~ 1.28	1.000	0.006 1
芫花素(genkwanin)	$Y = 7.41 \times 10^6 X - 3.24 \times 10^5$	0.10 ~ 1.26	1.000	0.008 4

2.3.4 稳定性

取同一样品(批号 H1901380)的供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 各进样 10 μL ,测定各成分色谱峰的峰面积,计算绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素峰面积的 RSD 分别为 1.4%、0.74%、0.061%、0.070%、0.16%、1.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.4.5 加样回收率

取已测知含量的样品(批号 H1901380)粉末 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别精密加入 6 个待测成分的对照品溶液(绿原酸 0.97 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、木犀草素 0.13 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、银椴苷 0.73 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芹菜素 0.87 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、羟基芫花素 0.67 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芫花素 0.90 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)各 1 mL,按照“2.1.2”项下方法制备供试溶液,进样 10 μL ,记录峰面积,计算含量。

结果绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的平均回收率($n = 6$)分别为 98.3%、98.2%、98.5%、102.3%、92.9%、103.3%,RSD 分别为 0.67%、1.3%、1.1%、0.62%、1.6%、0.57%。

3 芫花炮制工艺优选

3.1 单因素试验确定正交各因素水平

查阅各地中药饮片炮制规范以及相关文献,关于芫花的炮制工艺各不相同,主要影响因素包括加醋量、闷润时间、火候以及炮制时间等^[3]。综合各个因素最常用的水平范围,选择每个因素各 4 个水平进行单因素试验,不考虑各因素之间交互影响,以上述提到的指标为各水平最终评价标准,以预试验单因素考察的结果为依据,设计正交试验考察的各因素水平,最终得到正交因素水平表见表 2。

表 2 正交因素水平表

Tab. 2 The factors and levels in orthogonal designs

水平 (level)	因素(factor)			
	A 加醋量 (vinegar usage)/%	B 闷润时间 (dampening time)/min	C 炒制温度 (temperature)/ $^{\circ}\text{C}$	D 炒制时间 (stir - baked time)/min
1	20	15	130	10
2	30	30	160	15
3	50	45	190	20

3.2 炮制方法

参照 2020 年版《中华人民共和国药典》四部附录(0213 炮制通则)方法,取芫花饮片 200 g,共 9 份,按表 2 中的因素和水平,加适量的醋拌匀,闷润一定的时间后,置加热到一定温度的炒锅中不断翻炒,用红外测温仪实时测定锅内样品温度,按相应的炒制时间及炒制温度进行炒制后,取出晾干,粉碎后过 4 号筛,待用。

3.3 正交试验及方差分析

3.3.1 样品含量测定

取正交试验的 9 份芫花炮制品,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样 10 μL ,以外标法计算每份样品中绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素含量,最后计算 6 个成分的总含量,结果见表 3。

表 3 正交试验及结果

Tab. 3 Design and results of the orthogonal experiment

序号 (No.)	因素(factor)				试验结果(test result)						综合得分 (score of total factor)
	A	B	C	D	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3	y_1	y_2	y_3	
1	1	1	1	1	0.982 8	31.58	14	48.76	25.47	9.33	83.56
2	1	2	2	2	1.166 7	30.06	7	57.88	24.24	4.67	86.79
3	1	3	3	3	0.976 4	34.29	4	48.44	27.65	2.67	78.76
4	2	1	2	3	1.119 0	32.42	15	55.52	26.15	10.00	91.66
5	2	2	3	1	1.074 5	29.27	14	53.31	23.60	9.33	86.25
6	2	3	1	2	0.960 3	36.50	14	47.64	29.44	9.33	86.41
7	3	1	3	2	1.209 4	26.01	3	60.00	20.98	2.00	82.98
8	3	2	1	3	0.975 7	35.60	9	48.41	28.71	6.00	83.12
9	3	3	2	1	0.905 9	37.20	13	44.94	30.00	8.67	83.61
I	249.11	258.20	253.09	253.41							
II	264.32	256.15	262.06	256.18							
III	249.71	248.78	247.98	253.54							
$(I^2 + II^2 + III^2)/3$	64 756.48	64 723.36	64 740.88	64 708.64							
SS_j	49.47	16.35	33.87	1.63							
f_j	2	2	2	2							
R	0.052 5	0.047 7	0.011 5	0.003 5							

注(note): Y_1 为 6 个成分含量总和; Y_2 为醇溶性浸出物含量; Y_3 为性状得分; y_1 为 6 个成分含量权重得分; y_2 为浸出物含量权重得分; y_3 为性状权重得分; I 为各因素项下第 1 个水平的 3 次试验综合得分的总和, 即 $249.11 = 83.56 + 86.79 + 78.76$; II 为各因素项下第 2 个水平的 3 次试验综合得分的总和, 即 $264.32 = 91.66 + 86.25 + 86.41$; III 为各因素项下第 3 个水平的 3 次试验综合得分的总和, 即 $249.71 = 82.98 + 83.12 + 83.61$ (Y_1 is the total content of 6 components; Y_2 is the content of alcohol-soluble extract; Y_3 is the description score; y_1 is the content weight score of 6 components; y_2 is the weight score of extract content; y_3 is the description weight score; I is the sum of the total factor score of the 3 experiments at the first level of each factor, that is, $249.11 = 83.56 + 86.79 + 78.76$; II is the sum of the total factor score of the 3 experiments at the second level of each factor, that is, $264.32 = 91.66 + 86.25 + 86.41$; III is the sum of the total factor score of the 3 experiments at the third level of each factor, that is, $249.71 = 82.98 + 83.12 + 83.61$)

3.3.2 浸出物含量测定

参照 2020 年版《中华人民共和国药典》一部“芫花”项下【浸出物】方法测定: 取样品粉末约 2 g, 精密称定, 置 100 mL 的锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 50 mL, 密塞, 称量, 静置 1 h 后, 连接回流冷凝装置, 加热至沸腾, 并保持微沸 1 h。放冷后, 取下锥形瓶, 密塞, 再称量, 用 50% 乙醇补足减失的量, 摇匀, 用干燥滤器滤过, 精密量取滤液 25 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 °C 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称量。同时测定样品中的水分, 以干燥品计算得到各样品的浸出物含量, 结果详见表 3。

3.3.3 各指标的权重分析

本次试验在充分考虑各试验因素的影响下, 选用 $L_9(3^4)$ 正交设计表进行试验, 按“3.2”项下方法进行炮

制, 以炮制品外观性状、醇溶性浸出物含量、6 个化学成分(绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素)总含量作为指标, 利用综合加权评分法确定最佳炮制工艺。具体赋予权重: 6 个化学成分总含量(绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素)占 60% (测定方法见“2”项), 醇溶性浸出物含量占 30% (按《中华人民共和国药典》附录 X A 测定), 炮制品外观性状占 10%。得分方法是 6 个成分总含量越高越好, 故以最高的一个为 100 分, 如以 7 号样品含量为 100 分, 则第 1 份样品得分为 $0.982 8/1.209 4 \times 60\% = 48.76$, 依此类推; 醇溶性浸出物得分计算同理; 性状评定标准见表 4, 从表面色泽、质地及气味 3 个方面评定。将各项试验指标权重得分相加即为综合得分, 如第 1 份样品综合得分 = $48.76 + 25.47 + 9.33 = 83.56$, 正交试验结果见表 3。

表 4 炮制品外观性状评定

Tab. 4 Grading standard on description of processed decoction pieces

项目 (item)	评分标准(grading standard)			
	5	3	2	1
色泽(color)	微黄色(dilute yellow)	黄色(yellow)	深黄色(dark yellow)	棕黄色(brown and yellow)
质地(texture)	松软(soft)	软中带脆(soft with crisp)	脆(crisp)	极脆(quite crisp)
气味(taste)	微醋香气(slight sour aroma)	味微酸,无香气(slight sour taste)	味酸(sour taste)	味极酸(more sour taste)

3.3.4 结果分析

3.3.4.1 直观分析 从表3分析结果可知,对于因素 A, $A_2 > A_3 > A_1$; 对于因素 B, $B_1 > B_2 > B_3$; 对于因素 C, $C_2 > C_1 > C_3$; 对于因素 D, $D_2 > D_3 = D_1$ 。通过比较各因素极差值 R 的大小,得出在所选的4个因素中,对茺

花炮制工艺影响因素由大到小的顺序为 A、B、C、D。

3.3.4.2 方差分析 对试验结果进行方差分析,以考察各试验因素对试验结果是否产生显著影响。因素 D(炒制时间)的方差最小,故将因素 D 作为误差项,详见表5。

表 5 方差分析表

Tab. 5 The square variance table

方差来源 (source of mean square)	离均差平方和 (sum of squares of mean deviation)	自由度 (degree of freedom)	方差 (mean square)	F	F 临界值 (F critical value)	P
A	49.47	2	24.74	30.350	19.00	$\leq 0.05^*$
B	16.35	2	8.18	10.031	19.00	≥ 0.05
C	33.87	2	16.94	20.779	19.00	$\leq 0.05^*$
D	1.63	2	0.82	1.000	19.00	≥ 0.05
误差(error)	1.63	2	0.82			

注(note): $F_{0.05}(2,2) = 19.00$, * 表示有显著性影响(means the significant effect)

结果可见因素 A(加醋量)和因素 C(炮制温度)对醋茺花的炮制工艺有显著影响,而因素 B(闷润时间)和因素 D(炒制时间)的影响不显著。现行《中华人民共和国药典》标准中规定茺花饮片加醋后闷润至醋吸干,这一时间可长可短。试验中也考察了闷润时间这一影响因素,虽然对试验结果无显著影响,但考虑到饮片炮制的实际情况,建议饮片加醋后需闷润 15 min 以上较好;同时考虑到茺花饮片为未开放的花蕾入药,质地较软,故建议炒制时间不宜太长,以 10 min 左右时翻炒为佳。综合以上各因素的影响,优化后的醋炙茺花炮制工艺确定为 $A_2B_1C_2D_2$, 即 1 kg 茺花饮片加入 0.3 kg 醋量闷润 15 min 至醋液完全吸尽,160 °C 炒制 10 min。

4 讨论

4.1 提取方法的选择

2020 年版《中华人民共和国药典》一部“茺花”项下的含量测定方法提取供试品溶液,发现操作复杂,且耗时长,易致测定的结果偏差大,故而对提取

方法进行了优化。同时考察了超声提取法和加热回流提取法对提取效率的影响,发现超声提取法测定的各色谱峰强度均高于加热回流提取法,故采用超声法制备供试品溶液。

4.2 提取时间和提取溶剂的选择

首先对提取时间进行考察,分别超声提取 20、30、40、50 和 60 min,结果表明,超声提取 50 min 的供试品溶液各色谱峰峰面积较大,提取率较高,故选择超声 50 min 作为提取时间。

同时考察了提取溶剂,分别以水、50% 甲醇、70% 甲醇和甲醇作为提取溶剂,结果发现采用 70% 甲醇超声提取 50 min 得到的各色谱峰强度较大,提取率较高,因此以 70% 甲醇作为提取溶剂。

4.3 色谱柱选择

分别考察 Agilent Eclipse Plus C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱、Agilent ZORBAX SB - C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱、Agilent TC C_{18}

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱、Kromasil 100-5 C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱和 Diamonsil 5u C₁₈(250 × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 结果表明 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱分离效果较好, 故采用之。

4.4 试验设计选择

中药炮制是一项传统、独特的制药技术, 饮片需经过炮制才可供临床配方或中成药投料使用。在 2020 年版《中华人民共和国药典》四部中仅记载了炮制通则的方法, 实际工作中, 该方法可操作性差, 对中药饮片炮制终点的判断往往依据老药工的传统经验, 缺少炮制工艺的量化控制指标。另外炮制工艺的影响因素较多, 如何评价这些影响因素并建立优化、可量化的炮制工艺一直是业内在探讨的问题。

正交试验是根据正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验进而研究多因素多水平的一种设计方法, 它具有“均匀分散、齐整可比”的优点, 常用于中药制剂的提取工艺、成型工艺等医药科研领域^[12-15]。本研究以芫花醋炙炮制工艺为基础, 基于正交试验设计, 结合多指标加权评分法分析并优化芫花醋炙的炮制工艺, 对影响炮制工艺的多个因素的多个水平进行综合分析, 对试验结果进行极差分析和方差分析, 二者相互验证, 考察各因素对炮制工艺的影响, 方法设计科学、全面, 试验结果可信, 优化的醋炙炮制工艺合理, 对推动中药饮片炮制工艺的规范化、标准化、现代化起到了引领和示范作用。

4.5 因素和水平分析

本试验选择了与炮制工艺紧密相关的 4 个因素, 即用醋量、闷润时间、炮制温度和炮制时间以考察其对醋炙工艺的影响。针对每个因素的水平设定, 在考证文献的基础上, 均分别进行了单因素水平分析, 最终确定每个因素的 3 个水平进行正交试验, 保证试验因素水平设置的合理、科学。将“闷润, 待醋吸尽”“炒制规定的程度”这些操作描述用一定的具体参数指标进行量化和规范化, 使得炮制工艺一定程度上可量化, 便于实际操作, 为进一步控制加辅料制饮片的质量提供了技术支持和保障。

4.6 分析指标选择

芫花中黄酮类成分为主要药效成分群之一, 具有镇咳祛痰、解毒杀虫之功效^[16-19], 考虑到这些成

分在炮制后发生转化而引起含量变化, 是衡量炮制工艺的较理想指标, 故本试验选择了 5 个黄酮类成分银槲苷、木犀草素、芹菜素、芫花素及羟基芫花素和 1 个绿原酸共 6 个成分的含量总和作为分析炮制工艺的定量指标, 同时结合醇溶性浸出物的含量和炮制品外观性状特征等共同作为定性和定量指标, 用以分析并优化芫花醋炙炮制工艺。

4.7 优化炮制工艺的确定

本试验采用方差分析考察各因素及水平在炮制工艺中的影响程度, 由表 5 可见, 加醋量及炮制温度这 2 个因素对试验结果有显著影响, 综合而言, 加醋量为 30% 比例较为合适, 这一结论与现行《中华人民共和国药典》的炮制通则加醋量比例一致, 也符合大多数地方饮片炮制规范的用醋比例。炮制温度是又一显著影响因素, 温度过低, 易炮制不及, 温度过高, 又会炮制太过, 所以适宜的炮制温度是醋炙工艺的关键所在。在现行版《中华人民共和国药典》和各地方饮片炮制规范中均规定用文火炒至(微)干或用文火炒至醋吸尽。文火温度是多少度至今无准确定论, 为此先期进行了炮制温度单因素考察, 优化 4 个温度水平, 分别为 100、130、160 和 190 °C, 发现 100 °C 炒制样品后, 不但耗时较长, 而且饮片表面颜色几乎无变化, 最终选取炮制温度 130、160 和 190 °C 作为试验设计的 3 个水平。

另 2 个因素闷润时间及炮制时间对试验结果无显著性影响, 鉴于芫花饮片为干燥花蕾入药, 质地较轻柔, 易于吸收液体, 且个体较小的实际情况, 闷润时间定为 15 min, 炮制时间定为不断翻炒 10 min 较好。综合以上各因素的影响, 醋炙芫花的优化工艺确定为 A₂B₁C₂D₂, 即 1 kg 芫花饮片加入 0.3 kg 醋量闷润 15 min 至醋液吸尽后, 160 °C 炒制 10 min。

4.8 毒性饮片的炮制

毒性饮片一般均需经过炮制后入药使用, 以保证其临床用药安全, 而炮制工艺是否合理与规范直接影响毒性饮片的安全性和有效性, 凡药制造, 贵在适中, 不及则功效难求, 太过则性味反失^[20]。本文结合现代技术, 将传统的醋炙工艺进行量化考核, 达到炮制工艺标准化、规范化、可操作化, 为建立规范的饮片质量标准打下了坚实基础。同时, 建议优化炮制设备, 并采用红外探测技术控制炒制容器内样品的温度, 实现智能炮制。通过炮制, 一定程度上降低了芫花对肝脏^[21-22]、肾脏^[23]以及胃肠道^[24]等多个

脏器的毒副作用,增强了其利尿的功效。另外,芫花醋炙后所含的化学成分也发生了变化,这些变化是其毒性降低、药效增强的物质基础^[25],尚需要对这些成分的变化开展探索研究,同时需结合药理药效实验进一步阐明毒性饮片炮制减毒、增效的机制^[26-28]。

参考文献

- [1] 顾观光·清. 神农本草经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1955: 86
GU GG · Qing Dynasty. *Shennong Bencao Jing* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1955: 86
- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 166
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 166
- [3] 原思通, 张保献, 王祝举, 等. 中药芫花炮制历史沿革研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(5): 311
YUAN ST, ZHANG BX, WANG ZJ, *et al.* Research on the historical evolution of traditional Chinese medicine Genkwa processing [J]. *China J Chin Mater Med*, 1996, 21(5): 311
- [4] 李菲菲, 彭纓, 宋少江. 芫花炮制研究概况[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(3): 247
LI FF, PENG Y, SONG SJ. Research progress of processed Genkwa Flos[J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2012, 29(3): 247
- [5] 于江泳, 张村. 全国中药饮片炮制规范辑要[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 844
YU JY, ZHANG C. Summary of National Standards for Processing Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016: 844
- [6] 原思通, 张保献, 王祝举, 等. HPLC 法分析炮制对芫花中芫花素的影响[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(12): 728
YUAN ST, ZHANG BX, WANG ZJ, *et al.* HPLC analysis on influence of processing on contents of genkwanin in Flos Genkwa [J]. *China J Chin Mater Med*, 1996, 21(12): 728
- [7] 米宏英, 张萍, 高慧媛, 等. 炮制工艺对芫花化学成分、药理毒理及药材质量影响的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2023, 58(10): 865
MI HY, ZHANG P, GAO HY, *et al.* Recent advances on chemical composition, pharmacology, toxicology and the effect of processing technology on quality of *Daphne genkwa* [J]. *Chin Pharm J*, 2023, 58(10): 865
- [8] 张萍, 张南平, 林瑞超. 多指标正交试验法优选杜仲药材最佳炮制工艺[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1817
ZHANG P, ZNANG NP, LIN RC. Optimum stir-bake with salt water technology on Cortex Eucommiae by multiple indexes orthogonal test [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(11): 1817
- [9] 于晓, 戴衍朋, 周倩, 等. 正交试验设计优选升麻炭最佳炮制工艺[J]. 中国现代中药, 2015, 17(8): 844
YU X, DAI YP, ZHOU Q, *et al.* Optimization of processing technology of carbonized Cimicifugae Rhizoma by orthogonal test method [J]. *Mod Chin Med*, 2015, 17(8): 844
- [10] 代良敏, 代良萍, 陈永钧, 等. 吴茱萸制黄连的炮制工艺优选[J]. 中国现代中药, 2022, 24(8): 1549
DAI LM, DAI LP, CHEN YJ, *et al.* Optimization of processing technology of Euodiae Fructus-fried Coptidis Rhizoma [J]. *Mod Chin Med*, 2022, 24(8): 1549
- [11] 陈李东, 张学顺, 刘晓倩. 酒制补骨脂炮制工艺优化[J]. 药学研究, 2022, 41(2): 100
CHEN LD, ZHANG XS, LIU XQ. Optimization of processing technology of Psoraleae Fructus with wine [J]. *J Pharm Res*, 2022, 41(2): 100
- [12] 肖晓燕, 苏联麟, 陈鹏, 等. 基于正交试验及 AHP 综合评分法优选酒黄精炮制工艺及调节免疫作用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(23): 6391
XIAO XY, SU LL, CHEN P, *et al.* Optimization of processing technology of wine-processed Polygonati Rhizoma based on orthogonal test and AHP-comprehensive scoring method and comparison of immunomodulation functions of Polygonati Rhizoma processed with different methods [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(23): 6391
- [13] 蒋姗, 赵晓梅, 郭杰, 等. 基于有效成分及味觉变化规律的吴茱萸“汤洗”炮制工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(13): 3485
JIANG S, ZHAO XM, GUO J, *et al.* Hot water washing processing technology of Euodiae Fructus based on change laws of active components and tastes [J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(13): 3485
- [14] 赵红, 杨家新, 汪阳. 正交实验在中药中的应用概况[J]. 新疆中医药, 2003, 21(3): 64
ZHAO H, YANG JX, WANG Y. Application of orthogonal experiment in traditional Chinese medicine [J]. *Xinjiang J Tradit Chin Med*, 2003, 21(3): 64
- [15] 董晔, 付桂香, 赵世萍. 正交试验法在天然药物研究中的应用进展[J]. 中国药房, 2007, 18(22): 1743
DONG X, FU GX, ZHAO SP. Progress in the application of orthogonal test in the research of natural medicine [J]. *China Pharm*, 2007, 18(22): 1743
- [16] 张保献, 原思通, 张静修, 等. 芫花的现代研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 2(10): 21
ZHANG BX, YUAN ST, ZHANG JX, *et al.* Overview of modern study on Flos Genkwa [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 1995, 2(10): 21
- [17] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. RP-HPLC 法同时测定芫花药材中 7 种黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 633
PANG NN, BI KS, YAN BQ, *et al.* RP-HPLC simultaneous determination of seven flavonoids in Flos Genkwa [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(4): 633
- [18] 章丹丹, 凌霜, 张洪平, 等. 芫花总黄酮的抗炎机制研究[J].

- 上海中医药杂志, 2010, 44(8): 58
ZHANG DD, LING S, ZHANG HP, *et al.* Anti-inflammatory effect of total flavones from *Daphne genkwa* on stimulated macrophages[J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2010, 44(8): 58
- [19] 宗明月, 张庆然, 王璐琼, 等. 基于网络药理学和分子对接法研究芫花抗炎作用机制[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2021, 34(2): 178
ZONG MY, ZHANG QR, WANG LQ, *et al.* Anti-inflammatory mechanism of *Daphne genkwa* based on network pharmacology and molecular docking[J]. *J Yantai Univ (Nat Sci Eng Ed)*, 2021, 34(2): 178
- [20] 陈嘉谟·明. 本草蒙荃[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2009
CHEN JM·Ming Dynasty. *Bencao Mengquan*[M]. Beijing: Traditional Chinese Medicine Ancient Books Publishing House, 2009
- [21] 韩沁, 邹迪新, 李二文, 等. 芫花水提取物对斑马鱼成鱼及SD大鼠肝毒性的相似性评价及作用机制初探[J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1872
HAN Q, ZOU DX, LI EW, *et al.* Exploration on similar evaluation and mechanism of hepatotoxicity of water extract from Genkwa Flos in adult zebrafish and SD rats[J]. *World Chin Med*, 2020, 15(13): 1872
- [22] 赵崇军, 李二文, 李芝奇, 等. 芫花水提取物对斑马鱼肝脏毒性机制研究[J]. 环球中医药, 2021, 14(10): 1740
ZHAO CJ, LI EW, LI ZQ, *et al.* Study on the toxicity mechanism of Flos Genkwa water extract on zebrafish liver[J]. *Global Tradit Chin Med*, 2021, 14(10): 1740
- [23] 王玉珏, 尚新悦, 姚国栋. 芫花酯甲的药理作用与临床应用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(10): 1188
WANG YJ, SHANG XY, YAO GD. Pharmacological activities and clinical application of yuanhuacine[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2020, 25(10): 1188
- [24] 于金高. “藻戟遂芫俱战草”配伍禁忌基础研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018
YU JG. Basic Research of TCM Incompatibility of “Zao Ji Sui Yuan Ju Zhan Cao” [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2018
- [25] 施洁瑕, 马宏跃, 段金殿, 等. 应用代谢组学探讨芫花酯甲对人肝细胞 L02 的毒性作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(4): 704
SHI JX, MA HY, DUAN JA, *et al.* Toxic effect of yuanhuacine on human L02 liver cells by metabolomics[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2013, 27(4): 704
- [26] 董倩. 芫花及其炮制品的质量评价[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010
DONG Q. Quality Evaluation of *Daphne genkwa* and Its Products [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2010
- [27] 耿璐璐. 基于代谢组学技术的芫花致肝损伤和炮制减毒作用的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2013
GENG LL. Metabonomic Study of Genkwa Flos-induced Hepatic Injury and Detoxification of Herb-processing [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2013
- [28] 韩伟. 芫花化学成分及质量标准研究[D]. 咸阳: 陕西中医学院, 2010
HAN W. Study on Chemical Constituents and Quality Standard of *Daphne genkwa* [D]. Xianyang: Shaanxi University of Chinese Medicine, 2010

(本文于2023年8月29日收到)