

三棱贵州特色炮制方法的工艺研究¹

迮薇薇，王建科，李玮，李妍

(贵州中医药大学，贵州 贵阳 550025)

【摘要】 目的：考察不同因素对三棱贵州传统炮制工艺的影响，对贵州特色炮制工艺进行优选。方法：以三棱总黄酮类、总皂苷类化合物和醇溶性浸出物为考察指标，对炮制中醋的用量、蜜麸的用量、炒制温度及炒制时间影响炮制的各个因素进行单因素考察，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验和综合评分法来优选三棱贵州传统炮制方法的最佳炮制工艺，初步考察贵州传统炮制方法对三棱饮片的影响。结果：最佳工艺为每 100 g 三棱饮片，用 15 g 的醋将其闷润，待醋被吸尽后，用 10 g 的蜜麸于 $130^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ 下炒制 2 min。结论：优选出的最佳工艺稳定可控，为指导三棱贵州传统炮制工艺的继续研究提供了参考依据。

【关键词】 三棱，正交试验，总黄酮，总皂苷，炮制工艺

【中图分类号】 R283.3 **【文献标识码】** :A **【文章编号】** : 1003-6563(2019)06-0033-05

三棱为三棱科的植物黑三棱 *Sparganium Stoloniferum* Buch-Ham. 的干燥块茎，形状多为圆锥形，稍微扁平，外表颜色呈黄白色至灰黄色。体较重，质多坚实，气略微味淡，嚼之有麻辣感^[1]。三棱以破血行气，消积止痛的功用为主。临床上主要用以治疗气滞血瘀所导致的症瘕积聚及饮食积聚脘腹胀痛的症状。主产于江西、河南、江苏、山东等省^[2]。它为中药中较常用于活血化瘀药物中的破血消症药。传统理论认为可以增强破血软坚和止痛作用^[3]，而贵州的传统炮制方法，采用的是具有地方特色的醋润蜜麸妙法，传统认为蜜麸炮制药物能够发挥缓和药性、给药物赋色、矫味、消除副作用以及改变药性等作用。目前尚未见对于研究贵州法炮制三棱的报道，因此，本文通过研究贵州传统法炮制三棱的辅料用量、时间以及温度等因素优选出最佳的贵州法三棱炮制工艺，为今后进一步的深入研究醋润麸炒三棱提供理论依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

TU-1810 紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司），JA2003 型电子分析天平，LDP-150 型高速多功能粉碎机（浙江永康市红太阳机电有限公司），WREA. WREU 型便携式表面温度计（上海自动化仪表三厂）。

1.2 试药

三棱饮片所购药材产地为安徽，经贵州中医药大学药教研室魏升华老师鉴定为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium*

¹收稿日期：2019-05-09；修回日期：2015-05-21

基金项目：贵州省大学生创新基金项目（贵中医大创合字（2016）29号）；贵州省国内一流建设学科项目：（中药学）（GNYL（2017）008号-7）。

作者简介：迮薇薇，女，硕士，研究方向：中药炮制学。

stoloniferum Buch-Ham ; 芦丁标准品 (中国食品药品检定研究所提供, 纯度-92. 5%); 三棱对照药材 (中国食品药品检定研究所提供, 批号:12152-201103);无水乙醇 (天津市富宇精细化工有限公司, 批号 20160715); 硝酸铝 (天津科密欧化学试剂有限公司, 批号 20160416); 氢氧化钠 (天津市永大化学试剂有限公司, 批号 20160108); 亚硝酸铝 (天津市永大化学试剂有限公司, 批号 20160108); 甲醇 (天津市富宇精细化工有限公司, 批号 20160727); 硫酸 (重庆川东化工有限公司, 批号 20160601); 香草醛 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号 20150710); 醋 (市售晋中市健酿坊醋业有限公司醋业, 乙酸含量 ≥ 4.5 g/100mL); 酸甲酯标准品 (贵州迪大生物科技有限公司提供 20160312)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

2.1.1 芦丁对照品溶液的制备

精密称取芦丁标准品 3 mg 于 25 mL 容量瓶中, 加适量乙醇后放置于温水浴上使其充分溶解后定容至刻度, 即为 $0.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液。

2.1.2 胆酸甲酯对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重后的胆酸甲酯对照品 10mg, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀即得 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2 标准曲线的制备

2.2.1 总黄酮标准曲线的制备

精密量取芦丁对照品 1 mL、1.5 mL、2 mL、2.5 mL、3 mL、3.5 mL、4 mL 分别定容到 10 mL 容量瓶中。分别取各溶液 3 mL 于 25 mL 容量瓶中加 3 mL 蒸馏水, 然后取 6 mL 蒸馏水作为空白溶液, 加入 5% 的亚硝酸钠溶液 1 mL, 放置 6 min 后加入 10% 的硝酸铝溶液 1 mL, 放置 6 min 后, 加入氢氧化钠溶液 10 mL, 然后加蒸馏水至刻度, 15 min 后按紫外分光光度计法 (《中国药典》2015 年版四部) 在 505 nm 波长处测定吸光度。以吸光度 (Y) 为纵坐标, 芦丁溶液浓度 (X) 为横坐标绘制标准曲线, 得出三棱总黄酮回归方程为: $Y = 10.268X + 0.001$, $r = 0.9995$, 即: 芦丁浓度在 0.018~0.072 mg/mL 内, 吸光度与浓度呈良好的线性关系。

2.2.2 总皂苷标准曲线的制备

精密量取胆酸甲酯对照品 1 mL、1.5 mL、2 mL、2.5 mL、3 mL、3.5 mL、4 mL 分别定容至 10 mL 容量瓶。取各溶液 0.2 mL 于 10 mL 比色管中, 再加蒸馏水 0.3 mL 然后取蒸馏水 0.2 mL 作为空白对照, 精密加入 8% 的香草醛乙醇溶液 0.5 mL, 和 77% 的硫酸溶液后, 摇匀, 置 60℃ 恒温水浴中恒温 10 min 后, 将其放于冰水中冷却 15 min 后按紫外分光光度计法 (《中国药典》2015 年版四部) 在 529 nm 波长处测定吸光度。以吸光度 (Y) 为纵坐标, 芦丁对照品溶液浓度 (X) 为横坐标绘制标准曲线, 得出三棱总皂苷回归方程为: $Y = 5.5929X + 0.0012$, $r = 0.9996$, 即: 胆酸甲酯浓度在 0.032 - 0.128 mg/mL 内, 吸光度与浓度的线性关系良好。

2.3 样品测定

2.3.1 称取 1g 醋润蜜麸炒三棱粉末加入 50%乙醇 20mL 回流提取 2 h, 即得测定总黄酮供试品, 照标准曲线制备项下方法, 自“取各溶液 3 mL 于 25mL 容量瓶中加 3 mL 蒸馏水”起依法测定吸亮度, 从标准曲线上读出供试品中总黄酮浓度, 计算, 即得。

2.3.2 称取 0.6 g 粉末加入 70%乙醇 30 mL 回流提取 2 h, 即得测定总皂苷供试品。照标准曲线制备项下方法, 自“取各溶液 0.2 mL 于 10 mL 比色管中”起依法测定吸亮度, 从标准曲线上读出供试品中总皂苷浓度, 计算, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

2.4.1.1 测定总黄酮精密度试验

精密量取浓度为 $0.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芦丁对照品溶液 3 mL, 按照“2.2.1”项下方法连续测定 6 次吸亮度, 并计算 RSD, 结果显示 RSD 为 0.62%。

2.4.1.2 测定总皂苷精密度试验

精密量取浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胆酸甲酯对照品溶液 0.2mL, 按照“2.2.2”项下方法连续测定 6 次吸亮度, 并计算 RSD, 结果显示 RSD 为 0.95%。

2.4.2 重复性试验

2.4.2.1 测定总黄酮重复性试验

精密称取三棱粉末 1.0g 共 6 份, 按“2.3.1”项下制备供试品溶液, 测定吸亮度并计算 RSD, 结果显示 RSD 为 1.48%。

2.4.2.2 测定总皂苷重复性试验

精密称取三棱粉末 0.6 g 共 6 份, 按“2.3.2”项下制备供试品溶液, 测定吸亮度并计算 RSD, 结果显示 RSD 为 1.91%。

2.4.3 稳定性试验

2.4.3.1 测定总黄酮稳定性试验

取同一供试品溶液分别在 10min、20min、30min、40min、50min、60min 照“2.2.1”项下方法测定吸亮度并计算 RSD, 结果显示 RSD 为 2.67%。

2.4.3.2 测定总皂苷稳定性试验

取同一供试品溶液分别在 10min、20min、30min、40min、50min、60min 照 2.2.2 项下方法测定吸亮度并计算 RSD, 结果显示 RSD 为 2.97%。

2.4.4 加样回收率试验

2. 4. 4. 1 总黄酮加样回收率试验

精密称取已知总黄酮含量的醋润蜜麸炒三棱粉末 0. 5 g，共 6 份，置于锥形瓶中，各自加入芦丁对照品 3. 8268 mg，按“2. 3. 1”项下方法制备供试品，计算加样回收率及 RSD，结果显示平均加样回收率为 97%，RSD 为 2. 69%。

2. 4. 4. 2 总皂苷加样回收率试验

精密称取已知总皂苷含量的醋润蜜麸炒三棱粉末 0. 3 g，共 6 份，置于锥形瓶中，分别加入胆酸甲酯对照品 5. 0880 mg，按“2. 3. 2”项下方法制备供试品，计算加样回收率及 RSD，结果显示平均加样回收率为 98%，RSD 为 2. 54%。

2. 5 醋润蜜麸炒三棱工艺考察

2. 5. 1 正交试验工艺考察

根据单因素结果考察三棱贵州炮制工艺，在米醋用量、蜜麸用量、炒制温度和炒制时间因素中各选 3 个水平采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法选择三棱贵州最优炮制工艺，取 9 份均匀的三棱药材各 200 g，按照贵州三棱传统炮制方法（醋润麸炒法）进行实验。各辅料用量均为药材用量的百分比为其用量。

正交试验完成后，采用综合评分法对正交试验结果进行评分，目前三棱的有效药用成分还不是很明确，药典中有其醇浸出物含量的限定，本实验在综合评分中经分析，最终以总黄酮和总皂苷各占 30%、醇浸出物占 40%的权重进行评分，因此，综合评分=总黄酮隶属度×30% +总皂苷隶属度×30% +醇浸出物×40%。公式中隶属度=[(指标值-指标最小值)/(指标最大值-指标最小值)]，满分为 1. 0000 分。醇溶性浸出物的测定参照《中国药典》2015 版四部 2201 项下醇溶性浸出物热浸法操作，用 50%的乙醇作为溶剂进行测定。结果见表 1-表 4。

表 1 正交试验因素水平表

水平	米醋用量/% (A)	蜜麸用量/% (B)	炒制温度/℃ (C)	炒制时间 /min (D)
1	15	10	130±10	2
2	20	15	150±10	5
3	25	20	170±10	8

表 2 正交试验计划表

所在列 因素	米醋用量/% (A)	蜜麸用量/% (B)	炒制温度/℃ (C)	炒制时间 /min(D)
试验 1	15	10	130 ± 10	2
试验 2	15	15	150 ± 10	5
实验 3	15	20	170±10	8
实验 4	20	10	150 ± 10	8
实验 5	20	15	170±10	2
实验 6	20	20	130±10	5
实验 7	25	10	170 ± 10	5

实验 8	25	15	130±10	8
实验 9	25	20	150±10	2

表 3 正交试验结果

序号	米醋用量 /%(A)	蜜麸用量 /%(B)	炒制温度 /℃(C)	炒制时间 /min(D)	总黄酮 含量/%	总皂苷 含量/%	醇浸出物 含量/%	实验结果
试验 1	15	10	130±10	2	0.3365	0.8646	6.9533	0.4460
试验 2	15	15	150±10	5	0.3295	0.8150	6.9100	0.3405
实验 3	15	20	170±10	8	0.3490	1.0247	7.4533	0.8174
实验 4	20	10	150±10	8	0.3381	0.7767	6.6067	0.2707
实验 5	20	15	170±10	2	0.3284	0.7815	6.4367	0.1830
实验 6	20	20	130±10	5	0.3274	0.7640	6.1467	0.0883
实验 7	25	10	170±10	5	0.3826	0.8634	6.5600	0.6013
实验 8	25	15	130±10	8	0.3625	0.7752	6.5900	0.3977
实验 9	25	20	150±10	2	0.3544	0.8448	5.7767	0.2397
均值 1	0.535	0.439	0.311	0.290				
均值 2	0.181	0.307	0.284	0.343				
均值 3	0.413	0.382	0.534	0.495				
极差	0.354	0.132	0.250	0.205				

表 4 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
米醋用量	0.194	2	7.462	19.000	无
蜜麸用量	0.026	2	1.000	19.000	无
炒制温度	0.113	2	4.346	19.000	无
炒制时间	0.068	2	2.615	19.000	
误差	0.03	2			

经正交试验直观分析可知，在炮制工艺中各因素对其的影响顺序为 A>C>D>B，可以得出在炮制中，醋的用量影响最大，然后是炒制温度的影响大于炒制时间，蜜麸用量对该工艺的影响最小。方差分析结果表明各因素对炮制试验结果均无显著性的影响，所以优选三棱贵州传统炮制工艺时从节约资源的角度出发，最终优选出三棱最佳的炮制工艺 A₁B₁C₁D₁为三棱贵州传统炮制的最佳工艺，即：取三棱饮片每 100 g，用 15 g 的醋将其闷润，待醋被吸尽后，用饮片 10 g 的蜜麸于 130℃±10℃下炒制 2min 取出筛去蜜麸，然后将药材摊开放凉即可。

2.5.2 正交验证试验

每份取 500 g，平行取 3 份。该药材为同一个产地同一批次的三棱药材，按“2.5.1”项下确定的工艺进行炮制工艺炮制三棱，再按照“2.3”项下供试品溶液的制备后显色测定含量，可以得出，三次结果的差异较小，证明该工艺稳定可控。结果见表 5。

表 5 工艺验证结果

编号	检测指标	含量/%	均值	RSD/%
1	总黄酮	0.35	0.36	1.83
2		0.37		
3		0.36		
4	总皂苷	1.07	1.05	1.96
5		1.03		
6		1.05		
7	醇浸出物	7.03	6.99	0.65
8		6.99		
9		6.94		

3 讨论

三棱中化学成分有总黄酮、总皂苷、苯丙素类、生物碱、挥发油等^[4]，现临床上广泛用于于脑血栓中风，冠心病肿瘤，宫外孕及子宫肌瘤等疾病^[5]。目前关于三棱炮制研究较少，历版《中华人民共和国药典》中三棱的炮制方法都为醋炙法^[6]，而贵州传统醋润麸炒炮制三棱的方法未见报道，本文考察工艺的指标主要为三棱中部分药效成分，以及对成品质量影响较大的辅料用量、炒制时间以及炒制温度为主要因素，采用正交法实验对贵州法的炮制工艺进行筛选，为贵州三棱饮片质量标准提供参考依据。贵州传统炮制方法中，蜜麸味甘性偏，炮制后可以起到矫味、矫臭、赋色、健胃和中，缓和药性或降低副作用的目的^[7]；醋作为传统炮制辅料，味酸，苦，性温，入肝、胃经^[8]。具有止痛、活血、引药入肝经、增强疗效、缓和药性等作用。三棱作为破血消症药，多药性峻猛，力量较强，而三棱贵州传统炮制中采用蜜麸和醋一起进行炮制，综合考虑炮制作用可能于缓和三棱的峻猛之性、增强疗效有关，但贵州传统方法炮制三棱的炮制原理、醋润麸炒后对三棱其他化学成分影响、药理学的影响以及与药典所记载的醋炙法的异同点还需要进一步深入研究。

参考文献【REFERENCES】

- [1]国家药典委员会.中国药典：一部[s].北京：中国医药科技出版社，2015:13.
- [2]康廷国.中药鉴定学[M].北京：中国中医药出版社，2012：183.
- [3]毛春芹，陆兔林，邱鲁婴.三棱不同炮制品总黄酮镇痛作用研究[J].南京中医药大学学报：自然科学版，2001(5):299-300.
- [4]冯娅茹，张文婷，李三文，等.三棱化学成分及药理作用研究进展[J].中草药，2017,48(22)：4804-4818.
- [5]张卫东，杨胜.中药三棱化学成分的研究[J].中药药理与临床，2007,5(4)：23-26.
- [6]陆兔林，毛春芹，叶定江.正交法优选醋炙三棱最佳炮制工艺[J].中草药，2015,31(9)：665-667.
- [7]童恒力，钟凌云.蜜麸炒炮制法研究概述[J].时珍国医国药，2017,28(7)：1725-1727.

[8]王修宁, 韩丽, 张浩, 等. 食醋氨基酸指纹图谱的建立及特征分析[J]. 理化检验:化学分册, 2016, 52 (9) :1095-1099.