

综合评分法优选黑豆汁提取工艺

白俊其¹, 宋艳刚², 丘小惠^{1*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120; 2. 丽珠集团利民制药厂医药研究所, 广州 韶关 512000)

[摘要] 目的: 优选何首乌炮制中黑豆汁的制备工艺。方法: 以黑豆中总黄酮和干固物的含量为指标, 采用正交设计和综合评分法, 考察加水量、提取时间、提取次数 3 个因素对指标的影响。结果: 最佳提取条件为: 加水 10 倍量, 提取时间 2 h, 提取次数 3 次。结论: 与《中国药典》黑豆汁制法比较, 两种工艺总黄酮和干固物的含量无差异。优选工艺条件能有效保证黑豆中主要成分。

[关键词] 黑豆; 提取工艺; 正交实验设计; 综合评分

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0004-03

黑豆性味甘温、无毒, 入肾、脾、心经, 具有乌须黑发、滋阴润燥、健脑益智、益寿延年之功。自古以来, 黑豆就作为中药炮制加工的主要辅料应用。现代研究表明, 药物经黑豆汁制后能够增强疗效, 降低毒性或副作用^[1-2]。2005 年版《中国药典》(一部) 正文制首乌项下记载了黑豆汁制法^[3], 但并未详细说明其具体工艺参数, 亦未见其制备方法研究的实验报道。本实验采用正交实验设计综合评分法, 以黑豆中总黄酮和干固物的含量为指标, 进一步为何首乌炮制中黑豆汁的制备工艺提供依据。

1 材料

1.1 仪器 紫外-可见光分光光度仪(美国发玛西亚公司, B20-RAD UV/V 4000 型); 电子分析天平(sartorius 公司); AS5150A 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 药材 黑豆(豆科大豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种子), 由广东康美饮片厂提供(批号 20070824), 经该厂质检部鉴定为合格品。

1.3 试剂 供含量测定用芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110833-200502), 乙醇, 亚硝酸钠, 硝酸铝, 氢氧化钠(以上试剂均为分析纯)。

2 方法与结果

2.1 总黄酮及干固物含量的测定

2.1.1 供试品溶液的制备 用移液管精密吸取黑

豆汁提取液 10 mL 于蒸发皿中, 水浴 60 蒸干, 残渣用 30% 乙醇溶解, 过滤, 滤液转入 50 mL 量瓶中, 用 30% 乙醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 15 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇超声溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 得 0.15 mg·mL⁻¹ 芦丁对照品溶液。

2.1.3 标准曲线的绘制^[4] 精密吸取芦丁对照品溶液 1, 3, 5, 7, 9, 11 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入 30% 乙醇至 12.5 mL, 再依次加入 5% NaNO₂ 溶液 0.7 mL, 摇匀, 放置 5 min 后加入 10% Al(NO₃)₃ 溶液 0.7 mL, 摇匀, 放置 5 min 后再加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液 5 mL, 摇匀, 用 30% 乙醇定容至刻度, 混匀。10 min 后以 30% 乙醇作空白, 于 505 nm 处测定吸光度(A)。并以浓度 C 为横坐标, A 为纵坐标, 绘制标准曲线。得回归方程 $A = 11.186C - 0.07$, $r = 0.9998$ 。结果表明, 芦丁在 0.15 ~ 1.65 mg 呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 3.5 mL 于 25 mL 量瓶中, 按照 2.1.3 项下方法连续测定 5 次, RSD 0.79%, 精密度符合规定。

2.1.5 重复性试验 精密吸取供试品溶液 3.5 mL 于 25 mL 量瓶中, 按照 2.1.3 项下方法平行测定 5 份, RSD 1.20%, 表明方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 3.5 mL 于 25 mL 量瓶中, 按照 2.1.3 项下方法显色后, 在 20 min, 1, 2, 3, 4 h 分别测定 A 发现测定结果在 1 h 内基本稳定, 超过 1 h 则出现较明显的下降。因此, 供

[收稿日期] 2009-11-30

[基金项目] 国家“十一五”支撑计划项目(2006BAI09B06-06)

[通讯作者] 丘小惠, Tel: (020) 39318571, E-mail: gxhqxh@medmail.com.cn

试品溶液应于显色后 1 h 内进行测定。

2.1.7 回收率试验 精密吸取已知含量的样品溶液,准确加入芦丁对照品,按照 2.1.3 项下方法测定总黄酮含量,平行 5 份,得平均回收率为 99.78%,RSD 0.88%。结果见表 1。

表 1 回收率试验

No.	样品含量 /mg	加对照品量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	RSD /%
1	0.349 1	0.337 5	0.686 1	99.92	
2	0.349 1	0.337 5	0.692 8	100.90	
3	0.349 1	0.337 5	0.681 6	99.27	0.88
4	0.349 1	0.337 5	0.688 3	100.24	
5	0.349 1	0.337 5	0.677 1	98.61	

2.1.8 样品含量测定 精密吸取供试品溶液 10 mL,转入 25 mL 量瓶中,按照 2.1.3 项下方法分别显色,测定吸光度,带入回归方程,即得样品浓度,进而计算出样品含量。

2.1.9 干固物的测定 用移液管分别精密吸取黑豆汁样品 10 mL 于编好已恒重号的蒸发皿中,每种样品平行 3 份,水浴 60 蒸干,置烘箱中 100 烘 3 h,取出后迅速放入干燥器中冷却 0.5 h,用分析天平精密称重,计算干固物。

2.2 正交试验提取工艺

2.2.1 黑豆汁的制备

2.2.1.1 药典工艺 《中国药典》正文制何首乌项下^[3],黑豆汁制法为“取黑豆 10 kg,加水适量,煮约 4 h,熬汁约 15 kg,豆渣再加水煮约 3 h,熬汁约 10 kg,合并得黑豆汁约 25 kg”^[3]。本实验取黑豆原料 50 g,第 1 次加水 10 倍量,第 2 次加水 6 倍量,按以上方法提取 2 次并挤压药渣,提取液用纯净水定容至 250 mL 量瓶中,冰箱保存,备用。

2.2.1.2 实验工艺 采用正交实验方法,以加水量、提取时间、提取次数作为考察因素,按正交表 $L_9(3)^4$ 各取 3 个水平,设计实验方案见表 2。称取黑豆 50g 共 9 份,分别按实验方案提取,提取液分别用纯净水定容至 250 mL 量瓶中,冰箱保存,备用,以总黄酮含量及干固物含量为指标进行测定,见表 3。

2.3 结果与分析 按照 2.2 项方法分别测定指标,综合加权评分权重系数干固物(i)为 0.4、总黄酮含量(j)为 0.6。干固物(i)和黄酮(j)均为质量分数较高者为好,分别将两项指标最高值定为 100 分。按

表 2 因素水平

水平	A	B	C
	加水量/倍	提取时间/h	提取次数/次
1	6	2	1
2	8	3	2
3	10	4	3

表 3 正交实验与综合评分

实验号	A	B	C	空白	干固物(i)	总黄酮(j)	综合评分
					/g·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	
1	1	1	1	1	0.074 2	1.213	68.06
2	1	2	2	2	0.1375	1.756	80.00
3	1	3	3	3	0.1875	1.947	87.23
4	2	1	2	3	0.187 6	2.629	92.99
5	2	2	3	1	0.156 3	1.899	83.39
6	2	3	1	2	0.071 7	1.037	66.35
7	3	1	3	2	0.228 2	2.896	100.0
8	3	2	1	3	0.171 9	1.995	86.02
9	3	3	2	1	0.187 2	2.833	94.56
综	K_{1A}	235.29	261.05	220.43	246.01		
合	K_{2B}	242.73	249.41	267.55	246.35		
评	K_{3C}	280.58	248.14	270.62	266.24		
分	R_{ij}	15.10	4.30	16.73	6.74		

以下公式计算综合评分 $y_h = 0.6 \times (2y_j \times 10 + 42.08) + 0.4 \times (2y_i \times 100 + 54.36)$ 。

表 3 中极差 R 值大小显示,各因素作用主次为 $C > A > B$,因此以 $A_3 B_1 C_3$ 为佳,即最佳提取条件为:加水量为 10 倍量,提取时间为 2 h,提取次数为 3 次。按此工艺参数提取的黑豆汁中总黄酮的平均质量分数为 $2.896 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,干固物的平均质量分数为 $0.228 2 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.4 方差分析 将正交实验综合评分结果进行方差分析,方差分析结果表明,加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)对黑豆提取工艺的影响均无显著性。比较各因素 MS 值,提取次数和加水量 MS 值与空白 MS 比较差异较大,表明两因素对试验结果仍有一定影响;而提取时间 $MS <$ 空白 MS ,表明该因素对试验结果影响甚微。 P 值大小依次为 $C > A > B$,与前面表 3 的直观分析一致。

2.5 与药典工艺比较

2.5.1 取同一批黑豆 50 g,按 2.1.1 药典工艺提取制备黑豆汁。

2.5.2 取同一批黑豆 50 g,按正交优选最佳工艺

$A_3B_1C_3$ (加水量为 10 倍量, 提取时间为 2 h, 提取次数为 3 次) 工艺制备黑豆汁, 分别测定黑豆汁中总黄酮的质量分数为 $3.1768 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 干固物的质量分数为 $0.1937 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。与 $A_3B_1C_3$ 工艺参数提取比较, 两者差异不显著。

3 讨论

2005 年版《中国药典》(一部) 黑豆汁制法, 未说明加水量。预实验考察了药材吸水量、煎煮过程中水份的蒸发损失量以及最后要制备的豆汁量, 确定加水量范围为药材量的 6 ~10 倍。正交试验结果亦证明加水量为主要影响因素之一。

由于正交试验中总黄酮含量和干固物指标的数量级不同, 为使二者数据对本次提取的贡献均等, 则将干固物含量乘以 100 处理, 黄酮含量则乘以 10 处理, 使二者均达到 10 位数量级。同时, 2 个指标数值做以上处理后最高值在 25 分左右, 将最高值定为 100 分, 其增加固定分值远大于指标数值, 易掩盖其指标数据差异, 因此将指标数值乘以 2 后再按最高值 100 分处理。

多数黄酮类化合物在 200 ~400 nm 有 2 个主要吸收带: 1 个由 B 环桂皮酰基系统的电子跃迁所引

起的带 ; 另 1 个由 A 环苯甲酰基系统电子跃迁所引起的带。异黄酮 B 环不与吡 酮环上的羰基共轭, 故带 I 很弱。黑豆黄酮主要为异黄酮类, 本实验采用的对照品芦丁为黄酮类, 由于结构差异, 两者光谱图吸收带存在一定差异, 直接测定样品溶液的紫外吸收值误差较大。因此采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 反应生成络合物, 样品和对照品光谱图吸收带基本一致, 得到较好测定结果。

[参考文献]

- [1] 郑晓阳, 何凤兰, 黄文峰, 等. 黑豆药品标准的研究 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(4): 34.
- [2] 洪迪清, 高晨曦, 王世清. 黑豆的鉴定研究 [J]. 中国药业, 2007, 16(4): 55.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 123.
- [4] 冯薇, 王文全, 赵平然. 甘草总黄酮含量测定方法研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2608.
- [5] 陈琳, 刘丽梅, 王瑞海. 不同质量大蒜油提取工艺的研究 [J]. 中药材, 2008, 31(1): 144.

[责任编辑 全燕]