

山茱萸不同炮制品中齐墩果酸含量的比较

应帮智¹, 张振凌², 朱新成³, 陈永强^{3*}

(1. 商丘市第一人民医院, 河南 商丘 476100; 2. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008;

3. 河南宛西制药股份有限公司, 河南 西峡 439600)

山茱萸是山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Siet. et Zucc. 的干燥成熟果肉。始载于《神农本草经》。具有补肝肾、涩精气、固虚脱的功效, 是成药六、八味地黄丸的重要原料。目前认为山茱萸中所含的熊果酸、齐墩果酸、山茱萸苷、马钱子苷、没食子酸、多糖类等为其主要有效成分, 具有降血糖、增强免疫、抗炎等药理作用^[1]。临床多用其酒蒸、酒炖等炮制品, 并采用薄层扫描法测定熊果酸含量作为其质量控制指标^[2]。据报道炮制对山茱萸熊果酸含量有明显影响^[3], 炮制品中以酒炖品中熊果酸含量较高^[4]。山茱萸中含有齐墩果酸^[5], 但炮制对齐墩果酸含量的影响尚未见到报道。本实验采用薄层扫描法测定山茱萸中齐墩果酸的含量^[6], 比较不同炮制方法对其含量的影响, 为制定山茱萸合理的炮制工艺提供实验依据。

1 仪器与材料

CS—9301 薄层扫描仪(日本岛津); Mettler—AE240 电子天平(瑞士); 微量定量毛细管(Drummond 公司, 美国); 939 型薄层铺板仪(重庆南岸贝尔德仪器技术厂)。

齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所); 硅胶 G(青岛海洋化工厂); 黄酒(绍兴市马山东星酒厂); 试剂均为分析纯。

山茱萸药材产于河南省西峡县, 由宛西制药股份有限公司提供, 经河南中医学院中药资源教研室陈随清副教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Siev. et Zucc.。

取山茱萸样品, 除去杂质和残留的果梗和核, 得净山茱萸。取净山茱萸 200 g, 摊于瓷盘中, 于烘箱中 60 ℃ 烘 8 h 至干, 取出, 放于干燥器中放凉备用, 作为生品。取净山茱萸 200 g, 缓慢加入 40 mL 黄酒搅拌均匀, 加盖密闭, 浸润 2 h 后摊于瓷盘中, 于烘箱中 60 ℃ 烘 8 h 至干, 取出, 放于干燥器中放凉备用^[5], 作为酒浸品。取净山茱萸 200 g, 置于滤布上摊开, 放上蒸笼上蒸 2 h 后, 取出摊于瓷盘中, 于烘箱

中 60 ℃ 烘 8 h 至干, 取出, 放于干燥器中放凉备用^[6], 作为清蒸品。取净山茱萸 200 g, 缓慢加入 40 mL 黄酒拌匀, 加盖闷润 0.5 h, 置于滤布上摊开, 放上蒸笼上蒸 2 h 后, 于烘箱中 60 ℃ 烘 8 h 至干, 取出, 放于干燥器中放凉备用, 作为酒蒸品。取净山茱萸 200 g, 缓慢加入 40 mL 黄酒搅拌均匀, 放上蒸笼上, 隔水炖 2 h 后摊于瓷盘中, 于烘箱中 60 ℃ 烘 8 h 至干, 取出, 放于干燥器中放凉备用, 作为酒炖品。

2 不同炮制品中齐墩果酸的含量

2.1 薄层及扫描条件: 硅胶 G 薄层板(10 cm × 20 cm。取硅胶 G 20 g 加 0.5% CMC—Na 溶液 50 mL, 研匀, 用铺板仪制板, 板厚 0.5 mm, 室温晾干, 110 ℃ 活化 0.5 h, 置于干燥器中备用); 展开剂: 氯仿—甲醇—甲酸(20 : 1 : 0.2); 预饱和 1 h, 必要时可用宽滤纸条助饱和; 展距: 8 cm; 显色剂: 10% 硫酸乙醇液; 置 110 ℃ 烘箱中烘 3 ~ 5 min, 呈现紫红色斑点, 覆盖玻璃板胶布密封后扫描。单波长反射锯齿扫描; 测定波长: 540 nm。

2.2 对照品溶液制备: 精密称取齐墩果酸对照品 0.80 mg, 置 2 mL 量瓶中, 以氯仿溶解, 并稀释至刻度, 即得 0.40 mg/mL 对照品溶液。

2.3 标准曲线制备: 用定量毛细管分别吸取齐墩果酸对照液 1, 2, 3, 4, 5 μL 依次点于同一硅胶 G 板上, 按上述薄层和扫描条件测定, 以斑点面积积分值为纵坐标, 对照品溶液点样量为横坐标, 绘制标准曲线。得回归方程: $Y = 1.087X + 187.4$, $r = 0.999$, 齐墩果酸在 0.40 ~ 2.00 μg 呈良好的线性关系。

2.4 供试品溶液制备: 按文献^[5]所用方法, 分别取各实验样品粗粉 1 g, 精密称取, 置索氏提取器中, 加乙醚 80 mL, 于 50 ~ 60 ℃ 回流提取 2 h, 回收乙醚, 挥发至干, 残渣加氯仿溶解, 滤纸滤过, 滤液定容至 5 mL, 即得。

2.5 精密度试验: 精密吸取供试品溶液, 每点点样量为 2 μL, 依次点 5 点于同一硅胶 G 板上, 展开、显色、扫描, 测定每点面积积分值, 结果其 RSD 为

2. 07%。依次点于 5 块硅胶 G 板上,展开、显色、扫描,测定每点面积积分值,结果其 RSD 为 2.46%。

2. 6 稳定性试验:精密吸取供试品溶液,点样,依上述扫描条件每隔 20 min 测面积 1 次,连续 2 h,面积值基本不变,其 RSD= 0.42% ($n= 7$)。

2. 7 重现性试验:取同一批样品粗粉 5 份,每份 1 g,精密称取,按上述供试品溶液的制备方法制备。分别精密吸取供试品溶液 2 μ L,点于不同的 5 块硅胶 G 板上,展开、显色、扫描,测定齐墩果酸面积积分值,结果其 RSD 为 2.70%。

2. 8 回收率试验:精密称取齐墩果酸适量(约 1.1 mg),加入已知含量的样品中(含齐墩果酸约 1.1 mg),按供试品溶液制备方法制备,依法扫描测定,计算回收率,结果平均回收率为 102.0%, RSD= 2.24% ($n= 9$)。

2. 9 样品含量测定:因回归方程不通过原点,故采用外标两点法,对照品溶液点样量为 2,6 μ L,供试品溶液点样量均为 2 μ L。按上述薄层和扫描条件,对供试品溶液和对照品溶液进行测定。计算样品中齐墩果酸含量,结果见表 1。

表 1 山茱萸炮制品中齐墩果酸含量的测定结果 ($n= 3$)

Table 1 Contents of oleanolic acid in <i>Fructus Corni</i> processed products ($n= 3$)		
样品	齐墩果酸/(mg · g ⁻¹)	RSD/ %
生 品	1.191	1.64
酒浸品	2.023	2.00
清蒸品	1.254	3.99
酒蒸品	2.205	3.54
酒炖品	1.772	2.92

结果表明:山茱萸炮制品中齐墩果酸含量:酒蒸品> 酒浸品> 酒炖品> 清蒸品> 生品。

3 讨论

3. 1 山茱萸由于药用历史悠久,炮制方法较多,本实验所采取的是临床常用的炮制方法与工艺,并且有意设计比较加酒与不加酒的酒蒸与清蒸;加热与不加热的酒蒸、炖与酒拌润;加热过程中酒的挥发与不挥发的酒蒸与酒炖等不同炮制方法与工艺的对照。其具体的炮制工艺参照了《中华人民共和国药典》、《全国中药炮制规范》、《中药炮炙经验集成》等。因为药典和炮制规范均没有详细的规定加热时间,本试验中把各样品的加热时间和烘干时间等条件控制基本相同,如各炮制品同条件下烘干,蒸炖加热时间,辅料用量保持一致等均是为了尽量减少样品炮制工艺因素对齐墩果酸含量造成的差异,进而客观实际地比较不同炮制方法对其含量的影响。

3. 2 实验结果表明不同炮制方法和加入的辅料对齐墩果酸含量影响较大,其炮制品中齐墩果酸含量均高于生品,并且酒蒸品> 酒浸品> 酒炖品> 清蒸品。由此可见,炮制能升高山茱萸中齐墩果酸的含量,其原因可能是存在于山茱萸中结合型的齐墩果酸炮制后分解,也可能是其他成分经炮制后转化,使得齐墩果酸含量升高。齐墩果酸为广谱抗生素,具有明显的抗炎作用^[1],临床上治疗急性病毒性肝炎用炮制品而不用生品,这与山茱萸经炮制后齐墩果酸含量升高是相一致的。

3. 3 为了分析炮制升高山茱萸中齐墩果酸含量的原因,笔者曾测定了上述各种炮制品的收得率及其水分的含量^[7],结果证明上述不同炮制品收率及水分含量并无明显差异,而且以生品中水分含量稍低,所以水分含量并不是生品中齐墩果酸含量低于其他炮制品的原因。炮制使山茱萸中齐墩果酸含量升高,其原因可能是存在于山茱萸中结合型的齐墩果酸炮制后分解,也可能是其他成分经炮制后转化,使得齐墩果酸含量升高,加酒、加热可能促进这种分解转化,所以加酒、加热炮制后含量变化明显,由于酒浸、酒蒸和酒炖炮制工艺存在着加热与不加热、药物受热温度高低、程度快慢的差异,因而在同一时间内使升高的结果也有不同。这提示不同的炮制方法,应该明确规定不同的炮制时间、温度等具体工艺。

3. 4 本实验采用薄层扫描法测定山茱萸中齐墩果酸的含量,所测结果与文献报道山茱萸中齐墩果酸含量相一致^[5]。但由于山茱萸中同时含有熊果酸,与齐墩果酸难以分离,因此本实验有必要采用更合适的分离方法进行深入的比较。

References:

[1] Pan Y, Wang T S. Current studied situation on chemical components of *Cornus officinalis* [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 1998, 14(1): 61.

[2] *Ch P* (中国药典) [S]. 1995 ed. Vol .

[3] Wang P. Analysis of different processed *Cornus officinalis* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1992, 14(10): 19-21.

[4] Wang S H, Liu M. Effect factors on determination of oleanolic acid in *Cornus officinalis* [J]. *J Chin Mater Med* (中药材), 1997, 20(9): 46-49.

[5] Sun W J, Sha Z F. Comparative study in oleanolic acid from 35 different plants [J]. *J Chin Mater Med* (中药材), 1989, 12(12): 19-21.

[6] Institute of Chinese Materia Medica of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products. *Collection of Experience on Chinese Medicinal Preparation* (中药炮炙经验集成) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1974.

[7] Guo F L, Zhang Z L, Wang H P. Comparative study in oleanolic acid from different processed *Cornus officinalis* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2002, (7): 404.