

正交试验法优选山茱萸高压酒蒸工艺的研究

左文, 陆兔林*, 毛春芹, 安晏, 张琦

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046)

摘要:目的 优选山茱萸的最佳高压酒蒸工艺。方法 以马钱苷、5-羟甲基糠醛为指标, 采用正交试验法, 考察酒用量、闷润时间、蒸制温度、蒸制时间 4 个因素(每个因素取 3 个水平), 对山茱萸最佳炮制工艺进行优选。结果 最佳酒蒸工艺为取山茱萸 100 g, 加入 20% 酒, 闷润 1 h, 115 °C 高压蒸 1 h。结论 优选得到的山茱萸炮制工艺稳定、合理。

关键词:山茱萸; 马钱苷; 5-羟甲基糠醛; 高压酒蒸工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)03-0403-03

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc 的干燥成熟果肉, 具有补益肝肾、涩精固脱之功, 炮制后滋补作用增强。山茱萸传统炮制方法繁多, 现代炮制方法有酒蒸、清蒸、醋蒸、醋拌、盐制、蜜拌、蜜蒸等^[1]。《中国药典》2005 年版收载常压酒蒸(或酒炖)。文献报道, 酒蒸山茱萸一般酒的用量为 20% ~ 30%, 闷润时间 0~ 4 h, 蒸制时间 4~ 8 h^[2-5]。目前采用的蒸制工艺较为传统原始, 缺乏客观可控性较强的工艺参数, 生产效率低, 饮片质量难以控制。本实验通过对常压酒蒸和高压酒蒸工艺的比较, 体现了高压蒸制的优势, 确定了该法的科学可行性。《中国药典》2005 年版中山茱萸以马钱苷为指标, 采用高效液相色谱法测定。山茱萸酒蒸后, 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的量较生品中明显增加。研究表明, 5-HMF 具有多种生物活性, 是酒萸肉补益肝肾作用增强的物质基础之一^[6], 对山茱萸饮片质量标准的建立, 炮制工艺及机制的研究具有重要意义, 文献报道也多用高效液相色谱法测定^[7]。因此, 本实验采用高压蒸制的方法制备酒萸肉, 以马钱苷和 5-羟甲基糠醛作为指标性成分, 采用正交试验优选最佳工艺参数。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); MLS-3780 型实验室用高压灭菌器(SANYO 公司); 电子天平(FA1104); KQ-500B 型超声清洗器(昆山超声仪器有限公司); LXJ-11B 低速大容量多管离心机。

乙腈、甲醇(色谱纯)、水(重蒸水), 其他试剂均为分析纯; 马钱苷对照品(批号 111640-200502)、

5-羟甲基糠醛(批号 127860-200508)对照品由中国药品生物制品检定所。山茱萸药材购自河南西峡, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc 的干燥成熟果肉。

2 方法与结果

2.1 高压蒸制工艺设计: 取净山茱萸 100 g, 共 9 份, 以马钱苷、5-羟甲基糠醛为指标, 选取酒的用量、闷润时间、蒸制温度、蒸制时间作为考察因素, 每个因素 3 个水平, 各因素水平见表 1, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 加黄酒闷润, 置高压灭菌柜内蒸制, 进行最佳工艺考察。结果见表 2。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 酒的用量/%	B 闷润时间/h	C 蒸制温度/°C	D 蒸制时间/h
1	10	1	102	0.5
2	20	2	110	1.0
3	30	3	115	1.5

2.2 马钱苷的测定

2.2.1 色谱条件: 依利特 C_{18} 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(15: 85); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 240 nm^[7]。

2.2.2 对照品溶液的制备: 精密称定马钱苷对照品适量, 用甲醇定容, 配制成质量浓度为 40.48 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 线性关系考察: 精密吸取上述对照品溶液适量稀释成 4.048、8.096、16.192、24.288、32.384、

①收稿日期: 2009-05-27

基金项目: 国家“十一五”支撑项目(2006BAI09B06-06)

作者简介: 左文(1982-), 女, 江苏南京人, 南京中医药大学 07 级中药学硕士研究生, 主要从事中药炮制、中药质量标准及中药 6 类新药的

开发研究。Tel: 13776691399 E-mail: zuowen2009@yahoo.cn

* 通讯作者 陆兔林 E-mail: lutuling2005@126.com

40.48 μg/mL 的溶液。分别各精密吸取 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 17.7175 X - 0.5663$, $r = 0.9998$, 线性范围 0.0405~0.4048 μg。

2.2.4 供试品溶液制备: 取酒茺肉粉末(过 3 号筛)约 0.1 g, 精密称定, 置具塞离心管中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 超声处理 45 min, 离心, 取上清液定容至 25 mL, 作为供试品溶液。

2.2.5 样品测定: 精密吸取上述供试品溶液 10 μL, 分别注入色谱仪进行测定, 带入回归方程计算马钱苷的量。结果见表 2。

2.3 5-羟甲基糠醛的测定

2.3.1 色谱条件: 依利特 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(5:95); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 284 nm^[8]。

2.3.2 对照品溶液的制备: 精密称取 5-羟甲基糠醛对照品适量, 以甲醇定容配成 52.2 μg/mL 的对照品溶液。

2.3.3 线性关系考察: 精密吸取上述对照品溶液适量稀释成 3.88、5.22、10.44、20.88、31.32 μg/mL 的溶液, 分别各精密吸取 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 80.4851 X + 22.2411$, $r = 0.9995$, 线性范围 0.0388~0.3132 μg。

2.3.4 供试品溶液制备: 同 2.2.4 项下方法。

2.3.5 样品测定: 精密吸取上述供试品溶液 10 μL, 注入色谱仪进行测定, 带入回归方程计算 5-羟甲基糠醛的质量。结果见表 2。

表 2 酒制山茺萸工艺 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 2 L₉(3⁴) Orthogonal test of processing technology for wine prepared *Fructus Corni*

试验号	A	B	C	D	马钱苷 / %	5-羟甲基糠醛 / %	综合加权
1	1	1	1	1	0.6749	0.1060	0.7808
2	1	2	2	2	0.6562	0.6227	1.2788
3	1	3	3	3	0.6594	0.5478	1.2072
4	2	1	2	3	0.6673	0.6045	1.2717
5	2	2	3	1	0.7054	0.3999	1.1054
6	2	3	1	2	0.6818	0.1631	0.8449
7	3	1	3	2	0.7287	0.6190	1.3477
8	3	2	1	3	0.6788	0.2252	0.9040
9	3	3	2	1	0.7031	0.1228	0.8259
Ij	3.2669	3.4003	2.5297	2.7121			
IIj	3.2221	3.2882	3.3765	3.4715			
IIIj	3.0776	2.8781	3.6603	3.3830			
R	0.0065	0.0504	0.2306	0.1149			

2.4 实验结果分析: 以马钱苷和 5-羟甲基糠醛的总量为指标进行综合加权评价, 对上述实验结果进行方差分析, 结果见表 3。

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
B	0.0504	2	0.0252	7.7253	P < 0.05
C	0.2306	2	0.1153	35.3604	
D	0.1149	2	0.0575	17.6236	
A	0.0065	2	0.0033	1	

$F_{0.05}(2, 2) = 19$ $F_{0.01}(2, 2) = 99$

结果显示: C 因素有显著性差异, 故 C 因素确定为 3 水平; B 因素影响较小, 考虑到今后大生产过程中提高效率、节约能耗的原则, 确定为 1 h; A、D 因素遵循润透、蒸透即可的原则, 分别确定为 2 水平。因此, 最终确定最佳高压蒸制工艺为 A₂B₁C₃D₂, 即取山茺萸 100 g, 加 20% 酒闷润 1 h, 115 °C 蒸 1 h。

2.5 最佳高压蒸制工艺条件的验证试验: 取山茺萸 100 g, 共 3 份, 按正交试验得到的最佳工艺条件炮制, 即加 20% 酒, 闷润 1 h, 115 °C 蒸 1 h。干燥后打粉, 取样测定高压蒸制品中马钱苷和 5-羟甲基糠醛的量。结果见表 4。

表 4 高压蒸制验证工艺中马钱苷和 5-羟甲基糠醛的测定
Table 4 Determination of loganin and 5-HMF in samples by high pressured steamed processing technology

试验号	马钱苷 / %	RSD / %	5-羟甲基糠醛 / %	RSD / %
1	0.7261		0.4789	
2	0.7195	0.48	0.4677	1.21
3	0.7236		0.4714	

可见 3 次试验所测得的马钱苷和 5-羟甲基糠醛的量与最佳工艺所测得的平均量均相近, 说明该工艺稳定、可行。

2.6 生品、常压蒸、高压蒸马钱苷、5-羟甲基糠醛的比较

2.6.1 生品: 取山茺萸药材 100 g, 除去杂质和残留果核。

2.6.2 常压蒸制: 参考“十五”课题——山茺萸炮制机制研究确定的最佳炮制工艺, 即取山茺萸 100 g, 加 20% 黄酒, 密闭, 闷润 1 h, 置蒸锅中蒸制 8 h。

2.6.3 高压蒸制: 取山茺萸 100 g, 加 20% 酒, 密闭, 闷润 1 h, 置高压灭菌柜 115 °C 蒸 1 h。

2.6.4 不同炮制方法所得样品中马钱苷、5-羟甲基糠醛的测定和比较: 方法同前, 结果见表 5。山茺萸经蒸制后马钱苷降低, 并产生新成分 5-羟甲基糠醛。高压蒸制品各成分与常压蒸制品差别不大或高于常压蒸制品。

表 5 生品、常压蒸、高压蒸样品中马钱苷、5-羟甲基糠醛的测定

Table 5 Determination of loganin and 5-HMF in processed products of *Fructus Corni* steamed at pressure and high pressure

样品	马钱苷量/%	5-羟甲基糠醛/%
生品	0.80	—
常压蒸制品	0.63	0.37
高压蒸制品	0.72	0.47

3 讨论

笔者另外进行了山茱萸不同炮制品对小鼠补益作用的实验研究。结果表明,常压蒸酒萸肉、高压蒸酒萸肉均能增强补益作用,两者的补益效果无显著性差异,但与同剂量的生品比较,两者补益作用均增强(另文发表)。采用高压蒸制法炮制山茱萸,操作简便,压力、时间、温度等便于控制,既提高了工作效率,又减少了药汁的损失。与常压蒸制方法相比,高

压酒蒸山茱萸的成分及药效均未发生明显变化,而高压蒸制明显降低了能耗,节约了时间。故此方法既不违背传统的炮制原理,又符合药材炮制的现代要求,可推广用于大规模生产。

参考文献:

- [1] 贾岗,邵玉蓝,张云,等. 山茱萸炮制历史沿革及现代研究[J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 69-71.
- [2] 余宗亮,蔡宝昌,丁霞. 正交实验优选山茱萸炮制工艺[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(2): 135-137.
- [3] 呼海涛,张振凌. 酒蒸山茱萸肉炮制工艺研究[J]. 中外健康文摘, 2007, 4(12): 1656-1657.
- [4] 刘波,江崇湖,朱冬梅. 酒蒸山茱萸肉炮制工艺的研究[J]. 山东中医杂志, 2007, 26(9): 634-635.
- [5] 宋崎,周小初,宋英,等. 正交设计法优化酒萸肉炮制工艺条件[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(6): 85-87.
- [6] 丁霞,王明艳,余宗亮,等. 山茱萸中 5-羟甲基糠醛的分离鉴定及生物活性研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 392-396.
- [7] 中国药典[S]. 一部, 2005.
- [8] 杜伟峰,蔡皓,丁霞,等. RP-HPLC 法测定山茱萸生品和酒制品中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱素[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1813-1815.

HPLC 法测定六味地黄片中马钱苷和丹皮酚

魏惠珍¹, 邱伟华², 饶毅^{1,2*}, 陈银芳², 陈燕军², 杜艳龙¹

(1 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006; 2 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 建立六味地黄片中马钱苷、丹皮酚的测定方法。方法 采用高效液相色谱法同时测定六味地黄片中马钱苷、丹皮酚。色谱条件: Hypersil ODS₂ C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水梯度洗脱; 检测波长: 238 nm。结果 马钱苷和丹皮酚的线性范围分别为 2.47~988.80 μg (r = 0.9997)、1.58~633.60 μg (r = 0.9999), 平均回收率分别为 100.2% (RSD 为 2.40%, n = 6)、99.80% (RSD 为 1.56%, n = 6)。结论 该方法操作简便、准确, 重现性好, 有利于提高六味地黄片制剂的质量控制水平。

关键词: 六味地黄片; 马钱苷; 丹皮酚; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)03-0405-03

在六味地黄方的所有剂型中, 各剂型制备工艺差异较大, 如蜜丸为六味药材粉末加炼蜜制丸而成, 而片剂为山茱萸、茯苓、牡丹皮粉碎成细粉, 熟地黄等其余 3 味药材水煎煮、浓缩成膏, 与上述细粉混匀、制粒、压片成型。组成相同而剂型不同的六味地黄方其化学成分的种类和量必定存在差别^[1], 而化学成分是其发挥疗效的物质基础, 其中马钱苷具有增强机体免疫能力等生理活性, 丹皮酚具有抗炎、镇痛、解痉等药理作用^[2]。六味地黄片为其剂型之一, 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第八册六味地黄片项下采用紫外分光光度法测定丹皮

酚, 该法专属性不强。故本实验采用 HPLC 法进行六味地黄片中马钱苷和丹皮酚的同时测定, 在现有质量标准的基础上增加了主要活性成分马钱苷的检测, 实现了多个成分同时控制, 进而完善六味地黄产品的质量控制系统, 确保其疗效。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Waters 2996 二极管阵列检测器(美国 Waters 公司); Empower 色谱工作站; Millipore 超纯水仪(Millipore 公司); AR5120 型电子分析天平(奥豪斯国际贸易(上海)有限公司); AB104-1N 型电子分析

①收稿日期: 2009-07-23

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(0640168)

作者简介: 魏惠珍(1965-), 女, 江西南昌人, 副主任药师, 硕士生导师, 长期从事中药质量控制研究。

Tel: (0791)7119651 Fax: (0791)7119609 E-mail: weihuizhen_101@126.com

* 通讯作者 饶毅 Tel: (0791)7119609 E-mail: raoyi99@126.com