

正交试验优选加压酒制山茱萸炮制工艺

许甜甜¹, 聂松柳¹, 沈炳香¹, 吴德玲², 金传山^{2*}

1. 安徽医科大学附属六安医院 药学部, 安徽 六安 237005

2. 安徽中医药大学药学院, 安徽省现代中药重点实验室, 安徽 合肥 230031

摘要: **目的** 优选加压酒制山茱萸炮制工艺。**方法** 以山茱萸中马钱苷、莫诺苷、熊果酸、齐墩果酸的质量分数为评价指标, 采用正交设计法考察加酒量、闷润时间、蒸制时间和蒸制温度对炮制工艺的影响, 确定最佳山茱萸加压酒制工艺。**结果** 最佳炮制工艺参数: 加酒量为药材量的 25%, 闷制时间为 30 min, 蒸制时间为 60 min, 蒸制温度为 115 ℃。山茱萸炮制品外观色泽为紫黑色有光泽, 炮制品的质量稳定。**结论** 结合山茱萸炮制品的质量及外观色泽, 优选的加压炮制工艺能够节约时间, 保证质量, 是一种能够适用于山茱萸企业规模化生产的炮制方法。

关键词: 山茱萸; 加压酒制工艺; 炮制; 正交设计; 马钱苷; 莫诺苷; 熊果酸; 齐墩果酸

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)16-2339-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.16.011

Optimization of high pressure processing of *Comus officinalis* with wine by orthogonal test

XU Tian-tian¹, NIE Song-liu¹, SHEN Bing-xiang¹, WU De-ling², JIN Chuan-shan²

1. Department of Pharmacy, Lu'an Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Lu'an 237005, China

2. Anhui Key Laboratory for Modern Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

Abstract: **Objective** To optimize the high pressure processing of *Comus officinalis* with wine. **Methods** The yield of loganin, morroniside, ursolic acid, and oleanolic acid in *C. officinalis* was served as indexes. The orthogonal design was used to investigate the effects of wine volume, moistening time, processing time, and processing temperature on the processing technology, so as to obtain the optimal high pressure processing of *C. officinalis* with wine. **Results** The best processing conditions were as follows: wine volume was 25% of medicinal herbs, moistening time was 30 min, processing time was 60 min, and processing temperature was 115 ℃. **Conclusion** Combining the product quality and appearance, the processing technology can save time and ensure the quality, which could lay a good foundation for the processing technology by enterprise scale production preparation of *C. officinalis*.

Key words: *Comus officinalis* Sieb. et Zucc.; high pressure processing with wine; processing; orthogonal design; loganin; morroniside; ursolic acid; oleanolic acid

山茱萸 *Corni Fructus* 为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉^[1], 性微温, 味酸、涩, 具有补益肝肾、收涩固脱功效。《中国药典》2010 年版收载的山茱萸的饮片为山萸肉和酒萸肉, 而临床应用主要以酒萸肉为主。传统的山茱萸炮制方法为取山萸肉用 20% 黄酒拌匀, 置于适宜容器内, 密闭, 隔水加热, 炖至酒被吸尽, 色变黑润, 取出干燥即可, 一般情况下

山萸肉的闷润时间为 2 h, 蒸制时间为 4 h^[2]。

本研究基于省时高效的理论采用高压蒸制山萸肉, 通过在实验室条件下对加压酒蒸山茱萸^[3]的炮制工艺进行单因素考察的基础上, 以山茱萸中苷类成分马钱苷、莫诺苷以及三萜酸类成分熊果酸、齐墩果酸为指标, 采用正交试验设计法对加压酒制山茱萸炮制工艺进行优选, 为山茱萸加压酒制工艺研究提供参考依据。

收稿日期: 2014-02-16

基金项目: 国际合作项目 (2011DFA31950)

作者简介: 许甜甜, 硕士。Tel: 18297889026 E-mail: xutiantian18@126.com

*通信作者 金传山, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中药炮制学和中药材加工学教学与科研工作。Tel: (0551)5169044 E-mail: jcs4@sohu.com

1 仪器与材料

Agilent 1260 型自动进样高效液相色谱仪, 含 G1329B 1260 ALS、G1316A 1260 TCC、G4212B 1260 DAD、G1322A 1260 Degasser、G1312C 1260 Bin PumpVL、Agilent OpenLAB 色谱工作站, 美国安捷伦公司; Phenomenex Gemini-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Diamonsil-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); AT 系列溶剂过滤器。AS3120 型超声清洗仪, Autoscience 公司; CP225D 型十万分之一电子天平, 德国 Sartorius 公司; WL—100 型打粉机, 瑞安市威力制药机械厂; HHS111—2 型电热恒温水浴锅, 北京长安科学仪器厂; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; DHG—9140 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海市三发科学仪器有限公司。

莫诺昔对照品 (批号 M-027-120414)、马钱苷对照品 (批号 M-010-110311), 质量分数均≥98%, 成都瑞芬思生物科技有限公司; 熊果酸对照品, 批号 110742-200516, 质量分数≥99.3%, 中国食品药品检定研究院; 齐墩果酸对照品, 批号 120720, 质量分数≥98%, 宝鸡市方晟生物开发有限公司。

实验用山茱萸药材由安徽万生中药饮片有限公司提供, 产地为河南, 样本经过安徽中医药大学方成武教授鉴定为山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Comus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉。

甲醇、乙腈为色谱纯, 天津大茂化学试剂厂; 水为娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈饮料科技有限公司; 其余试剂均为分析纯。海神牌黄酒, 酒精度≥10.0%, 安徽海神黄酒集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 马钱苷和莫诺昔定量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称定在五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的马钱苷和莫诺昔对照品适量, 加甲醇制成含马钱苷 0.074 mg/mL、莫诺昔 0.213 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 取山茱萸粉末 (过 60 目筛) 0.1 g 于 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 冷却后再称定质量, 用 80% 甲醇补充损失的质量, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件^[4]及系统适用性试验 色谱柱为 Phenomenex Gemini-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (15:85), 柱温 30 ℃, 体

流量 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 检测波长为 240 nm。在此色谱条件下 2 个对照品与杂质峰的分度>1.5, 理论塔板数均大于 3 000, 色谱峰对称性良好, 见图 1。

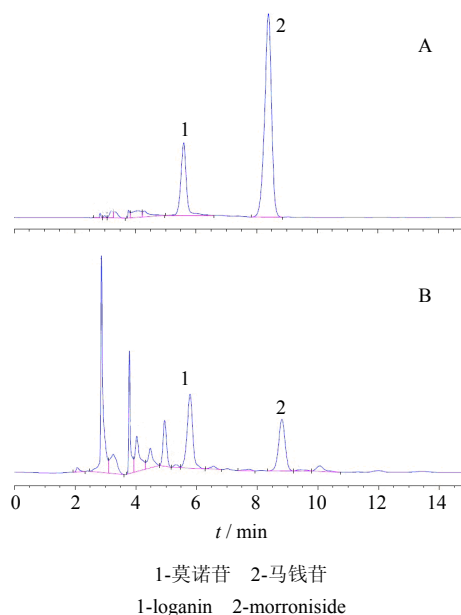


图1 马钱苷和莫诺昔混合对照品 (A) 及山茱萸样品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of mix control of morroniside and loganin (A) and *Corni Fructus* (B)

2.1.4 线性关系考察 在上述色谱条件下, 分别设置已经配制好的马钱苷和莫诺昔混合对照品进样量为 0.5、2、5、7、10、20 μL, 依法测定, 以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 分别以马钱苷和莫诺昔质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 分别得回归方程: 马钱苷 $Y=23\ 835 X+4.229\ 2$, $r=0.999\ 8$; 莫诺昔 $Y=12\ 930 X+6.650\ 3$, $r=0.999\ 9$; 表明马钱苷在 1.85~74.0 μg/mL, 莫诺昔在 5.325~213.0 μg/mL 峰面积与质量浓度具有良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 吸取上述马钱苷和莫诺昔混合对照品溶液, 在上述色谱条件下, 重复进样 6 次, 分别测定峰面积值, 马钱苷的 RSD 为 0.40%, 莫诺昔的 RSD 为 0.17%, 结果表明此实验仪器条件下测定马钱苷和莫诺昔的精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一样品 6 份, 分别按定量测定项下的方法, 测定其中马钱苷和莫诺昔的量, 分别得马钱苷的 RSD 为 1.69%, 莫诺昔的 RSD 为 1.46%。结果表明该方法测定山茱萸中马钱苷和莫诺昔重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取样品溶液, 在样品制备后 0、

3、6、12、18、24 h 进样，测定每一次峰面积值，得马钱苷的 RSD 为 1.30%，莫诺苷的 RSD 为 0.91%。结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 称取已测定马钱苷和莫诺苷量的山茱萸粉末 0.1 g，同“2.1.2”项方法制得供试品溶液，精密吸取供试品溶液 1 mL 于 2 mL 量瓶中，共 6 份，分别加入马钱苷和莫诺苷混合对照品 0.5 mL，加色谱甲醇至刻度。在上述色谱条件下，测定峰面积，计算的马钱苷的平均回收率是 100.63%，RSD 为 2.16%，莫诺苷的平均回收率 99.28%，RSD 为 1.28%。结果表明本方法的准确度以马钱苷和莫诺苷的加样回收率计符合要求。

2.2 熊果酸和齐墩果酸定量测定

2.2.1 对照品溶液制备 精密称定在五氧化二磷减压干燥器中干燥 36 h 的熊果酸和齐墩果酸对照品适量，加甲醇制成含熊果酸 0.315 mg/mL 和齐墩果酸 0.156 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取本品粗粉 2 g，置于 25 mL 容量瓶中，加入甲醇近刻度，在功率 100 W 下超声 30 min，放冷后用甲醇定容，摇匀，滤过即得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件^[5]及系统适用性试验 Diamonsil-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相为甲醇-〔水-冰乙酸-三乙胺 (30:0.1:0.05)〕(88:12)，柱温 25 °C，体积流量 1.0 mL/min，进样量 20 μL，检测波长为 210 nm。在此色谱条件下熊果酸对照品与杂质峰的分度大于 1.5，理论塔板数均大于 3 000，色谱峰对称性良好，见图 2。

2.2.4 线性关系考察 在上述色谱条件下，分别设置已经配制好的熊果酸和齐墩果酸混合对照品进样量为 2、5、7、10、15、20 μL，依法测定，以峰面积为纵坐标 (Y)，分别以熊果酸和齐墩果酸质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线，分别得回归方程：熊果酸 $Y=9\,181.9 X+21.481$ ， $r=0.999\,7$ ；齐墩果酸 $Y=9\,212.1 X+3.357\,1$ ， $r=0.999\,7$ ；表明熊果酸在 31.5~315.0 μg/mL，齐墩果酸在 15.6~156.0 μg/mL 峰面积与质量浓度间具有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 吸取上述熊果酸和齐墩果酸混合对照品溶液，在上述色谱条件下，重复进样 6 次，分别测定峰面积值，熊果酸的 RSD 为 0.39%，齐墩果酸的 RSD 为 0.59%，结果表明此实验仪器条件下测定熊果酸和齐墩果酸量的精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一样品 6 份，分别按定量

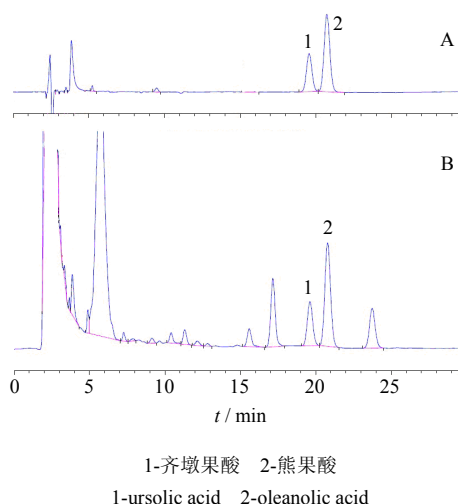


图 2 齐墩果酸和熊果酸混合对照品 (A) 和山茱萸样品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC of mix control of ursolic acid and oleanolic acid (A) and *Corni Fructus* (B)

测定项下的方法，测定其中熊果酸和齐墩果酸的量，分别得熊果酸 RSD 为 2.32%，齐墩果酸 RSD 为 2.47%。结果表明测定本品中熊果酸和齐墩果酸的量重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取样品溶液，在样品制备后 0、3、6、12、18、24 h 进样，测定每一次峰面积值，得熊果酸的 RSD 为 0.94%，齐墩果酸的 RSD 为 2.33%。结果表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 称取已测定熊果酸和齐墩果酸量的山茱萸粉末 2 g，采用“2.2.2”项方法制得供试品溶液，精密吸取供试品溶液 1 mL 于 2 mL 量瓶中，共 6 份，分别加入熊果酸和齐墩果酸混合对照品 0.5 mL，加色谱甲醇至刻度。在上述色谱条件下，测定峰面积，计算的熊果酸的平均回收率是 97.53%，RSD 为 1.28%，齐墩果酸的平均回收率 100.08%，RSD 为 1.98%。结果表明本方法的准确度以熊果酸和齐墩果酸的加样回收率计符合要求。

2.3 正交试验设计

根据《中国药典》2010 年版一部以及《中药炮制学》，酒山茱萸一般选用黄酒的加酒量为 20% 左右，闷润时间为 0~4 h，蒸制时间一般为 4~8 h。研究山茱萸的加压工艺，选用加酒量 (A)、闷润时间 (B)、蒸制时间 (C) 以及蒸制温度 (D) 作为考察因素，每个因素拟定 3 个水平，见表 1，采用 L₉(3⁴) 正交试验设计对 A、B、C 及 D 进行优选，实验安排及结果见表 1。

2.4 炮制品的制备

分别各取山茱萸生品 200 g, 按 $L_9(3^4)$ 正交设计表, 加不同的酒量, 闷润规定的时间, 在设定的温度下于高压灭菌锅中蒸制一定的时间, 取出于 80 °C 烘干。

2.5 正交试验方法与结果

按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, 每组试验平

行 3 次, 分别计算马钱苷、莫诺苷、熊果酸和齐墩果酸的质量分数, 按照综合加权评分法进行综合评分与分析, 选择马钱苷权重系数为 0.4, 莫诺苷权重系数为 0.25, 熊果酸权重系数为 0.25, 齐墩果酸权重系数为 0.1^[6-7], 最后得到综合评分 (综合评分 = 马钱苷 × 0.4 + 莫诺苷 × 0.25 + 熊果酸 × 0.25 + 齐墩果酸 × 0.1)。实验结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A / %	B / min	C / min	D / °C	质量分数 / %				炮制后外观性状	综合评分
					马钱苷	莫诺苷	熊果酸	齐墩果酸		
1	15 (1)	30 (1)	20 (1)	110 (1)	1.010 7	2.732 3	0.181 2	0.073 1	深紫色, 有光泽	1.140 0
2	15	60 (2)	40 (2)	115 (2)	0.932 4	2.385 7	0.183 7	0.074 7	紫黑色, 有光泽	1.022 8
3	15	90 (3)	60 (3)	121 (3)	0.922 5	2.340 5	0.175 6	0.071 4	紫黑色, 有光泽	1.005 2
4	20 (2)	30	40	121	0.938 4	2.328 1	0.179 9	0.072 9	紫黑色, 有光泽	1.009 7
5	20	60	60	110	0.937 4	2.519 6	0.189 8	0.076 7	紫黑色, 有光泽	1.060 0
6	20	90	20	115	0.939 2	2.421 1	0.172 6	0.070 4	紫黑色, 有光泽	1.031 1
7	25 (3)	30	60	115	0.939 2	2.963 5	0.170 7	0.069 7	紫黑色, 有光泽	1.166 2
8	25	60	20	121	0.894 1	2.162 9	0.177 0	0.071 4	紫黑色, 有光泽	0.949 8
9	25	90	40	110	0.949 5	2.221 4	0.183 7	0.074 5	深紫色, 有光泽	0.988 5
K_1	3.168 0	3.315 9	3.120 9	3.188 5						
K_2	3.100 8	3.032 6	3.021 0	3.220 1						
K_3	3.104 5	3.024 8	3.231 4	2.964 7						
R	0.001	0.097	0.037	0.085						

表 2 方差分析结果

Table 2 Results of ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
B	0.018 34	2	19.28	$P < 0.05$
C	0.007 38	2	7.76	
D	0.012 92	2	13.59	
A (误差)	0.000 95	2	1.00	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

由方差分析 (ANOVA) 结果可知, A、C、D 因素都无统计学意义, B 因素有统计学意义, 从省时和经济的角度, 最佳工艺应选 $A_3B_1C_3D_2$, 即最佳加压酒制工艺: 取山茱萸净药材, 加入山茱萸质量的 25% 的黄酒拌匀, 闷润 30 min, 在高压灭菌锅升温升压, 当温度达到 115 °C 时维持 60 min, 后取出, 80 °C 烘干。炮制品为紫黑色, 有光泽且质量较好。

2.6 验证试验

为进一步验证结论的准确性, 按正交试验得出

的最佳工艺方法进行 6 次炮制试验, 观察样品炮制后的性状, 对炮制品中有效成分进行测定, 结果见表 3。

表 3 验证试验结果

Table 3 Results of verification test

试验号	质量分数 / %				外观性状
	马钱苷	莫诺苷	熊果酸	齐墩果酸	
1	0.922 0	2.923 5	0.171 2	0.068 7	黑色略紫, 有光泽
2	0.908 7	2.910 6	0.169 8	0.070 1	黑色略紫, 有光泽
3	0.915 6	2.876 8	0.170 2	0.069 1	黑色略紫, 有光泽
4	0.963 2	2.938 7	0.172 1	0.071 2	黑色略紫, 有光泽
5	0.951 4	2.942 4	0.168 3	0.070 8	黑色略紫, 有光泽
6	0.921 8	2.901 2	0.172 1	0.069 9	黑色略紫, 有光泽

3 讨论

按正交试验结果进行验证试验, 测定山茱萸炮制品中马钱苷的平均质量分数为 0.930 4%, 莫诺苷的平均质量分数为 2.915 5%, 熊果酸的平均质量分

数为 0.170 6%, 齐墩果酸的平均质量分数为 0.07%, 结果表明工艺合理, 稳定可行。

本实验以山茱萸中的苷类成分马钱苷和莫诺苷以及三萜酸类成分熊果酸和齐墩果酸作为山茱萸药材的控制指标, 从山茱萸中有效成分的量, 全面控制山茱萸药材的质量, 为实验的可行性提供足够的依据。

本实验在山茱萸传统的炮制基础上采用高压方法, 大大节省了时效和成本, 且炮制品的色泽和质量稳定, 高压炮制法是中药炮制的新方向, 有着炮制周期短样品质量可靠等优点, 本实验通过高压对山茱萸进行炮制, 为其在工厂大规模生产提供技术支持。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 丁安伟. 中药炮制学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [3] 左 文, 陆兔林, 毛春芹, 等. 正交试验法优选山茱萸高压酒蒸工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 403-405.
- [4] 张振凌, 呼海涛, 刘 博, 等. 不同工艺酒制山茱萸马钱素、莫诺苷含量比较 [J]. 中药材, 2007, 30(10): 1217-1219.
- [5] 查孝柱, 谢晓梅, 吕美红, 等. 含齐墩果酸和熊果酸的 10 种果实类中药 HPLC 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 60-62.
- [6] 褚思娟, 李 林, 张 兰. 山茱萸环烯醚萜苷主要药理作用研究进展 [J]. 中国医药, 2013, 8(4): 568-570.
- [7] 刘 博, 吴和珍. 山茱萸药材中三萜类成分的研究 [J]. 湖北中医杂志, 2010, 32(12): 75-77.