

过程控制

正交试验优选知母酒制工艺*

赵琳琳^{1,2}, 赵云平^{1,2}, 魏静娜^{1,2}, 刘征辉^{1,2,3}, 郭永泽^{2,3}, 程奕^{2,3**}

(1. 天津海世达检测技术有限公司, 天津 300381; 2. 天津市现代中药质量检验中心, 天津 300381;
3. 天津市农业质量标准与检测技术研究所, 天津 300381)

摘要 目的: 优选酒制知母的炮制工艺, 确定其工艺参数。方法: 以知母皂苷 B II 和芒果苷含量为考察指标, 选取黄酒用量、焖制时间、炒制温度和炒制时间 4 个因素, 应用 $L_9(3^4)$ 正交设计表, 采用方差分析对知母的炮制工艺优选。知母皂苷 B II 色谱分离条件: 色谱柱为 CAPCELL PAK C_{18} (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 乙腈-水 (25:75) 为流动相, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 芒果苷的色谱分离条件: 色谱柱为 Waters Symmetry C_{18} (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm), 乙腈-0.2% 乙酸溶液 (15:85) 为流动相, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 258 nm。结果: 最佳炮制工艺参数: 黄酒用量 15 g, 焖制时间 90 min, 炒制温度 190 $^{\circ}\text{C}$, 炒制时间 25 min。结论: 优选的炮制工艺稳定可行, 为酒制知母提供实验基础。

关键词: 知母; 酒制; 知母皂苷 B II; 芒果苷; 正交试验; 炮制工艺

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2018)11-2038-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.11.26

Optimization of processing technology of Rhizoma Anemarrhenae with wine by orthogonal test*

ZHAO Lin-lin^{1,2}, ZHAO Yun-ping^{1,2}, WEI Jing-na^{1,2}, LIU Zheng-hui^{1,2,3**},
GUO Yong-ze^{2,3}, CHENG Yi^{2,3**}

(1. Tianjin High-standard Quality Testing Lab, Tianjin 300381, China;

2. Tianjin Center for Quality Testing of TCM, Tianjin 300381, China;

3. Tianjin Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Tianjin 300381, China)

Abstract Objective: To optimize the processing technology of wine roasted Anemarrhena for the optimum process. **Methods:** The contents of timosaponin B II and mangiferin were selected as quality index. The wine volume, the moistening time, the processing time, and processing temperature were optimized as influencing factors by $L_9(3^4)$ orthogonal design experiments. The chromatographic conditions for timosaponin B II were as follows: a CAPCELL PAK C_{18} column (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) was used at 30 $^{\circ}\text{C}$ with the

* 十二五国家科技支撑计划项目 (2011BA107B064)

** 通信作者 Tel: (022) 23678678; E-mail: cychengyi99@126.com

第一作者 Tel: 15822382207; E-mail: zhaolinlin1026@163.com

mobile phase of acetonitrile-water (25:75) at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The chromatographic conditions for mangiferin were as follows: The separation was performed on a Waters Symmetry C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$) column at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ with the mobile phase of acetonitrile-0.2% acetic acid solution (15:85). The elution was set at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the detection wavelength was set at 285 nm. **Results:** The best processing conditions were as follows: 100 g Anemarrhena adding amount of 15 g yellow rice wine was mixed thoroughly and was placed for 90 min, then carbonized by stir-frying at $190 \text{ }^\circ\text{C}$ for 25 min. **Conclusion:** This optimized processing technology is stable and feasible, and can provide experiment basis for wine roasted Anemarrhena.

Keywords: Anemarrhena; processing with wine; timosaponin B II; mangiferin; orthogonal experiment; processing technology

知母 (*Anemarrhena asphodeloides* Bge.) 为百合科植物知母干燥的根茎,在我国许多地区都有种植,具有清热泻火、滋阴润燥等功效,主治高热烦渴、肺热燥渴、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘^[1-3]。知母经酒制后可改变其药物的药性,引药上行,加强清上焦热、止咳等作用;酒制知母在炮制过程中带入乙醇,乙醇对脂溶性成份具有增溶作用,从而加强知母的镇静作用^[4-6]。知母皂苷 B II 是知母中的主要甾体皂苷,具有抗肿瘤,降血糖,改善记忆力,降内热等药理作用;芒果苷是知母中主要的双苯吡酮类成分,具有清热,抗炎,抗病毒,免疫调节等作用^[7-10]。现今国内外对知母的研究主要分为功能性成分、药理性质以及炮制方法等方面,在知母多种炮制方法中盐制知母报道文献较多,酒制知母成分研究报道较少。传统炮制方法是将知母用黄酒拌匀,焖润至吸尽,置于锅内,用文火炒制微黄,取出,放凉,即可^[6];由于没有具体工艺参数和质量标准,可操作性差,缺乏炮制工艺统一性。本文以知母皂苷 B II 与芒果苷为参考指标,利用正交试验优化的炮制工艺,为酒知母的质量控制提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料 知母:安国市惠农中药材良种繁育有限公司提供;对照品芒果苷(批号 111607-201402)、知母皂苷 BII(批号 111839-201102)均购自中国食品药品检定研究院;乙醇和丙酮为分析纯,均购自天津市风船化学试剂科技有限公司;乙腈(HPLC级)购自 Merck 公司;冰乙酸(HPLC级)购自天津光复精细化工研究所;超纯水,高纯氮。

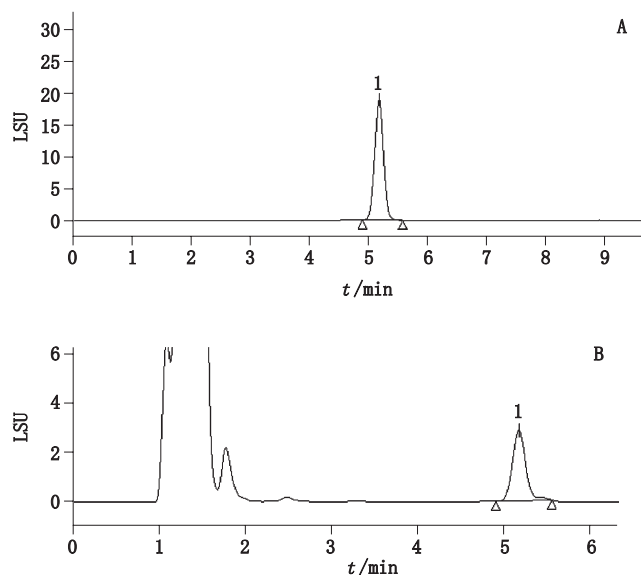
1.2 仪器 Waters 公司 2695 高效液相色谱仪, 2996

紫外检测器, 2424 蒸发光检测器, AS 系列超声波清洗器(天津 Autoscience 仪器有限公司); METTLER AB54, METTLER XS 205 电子分析天平。

2 方法

2.1 色谱条件

2.1.1 知母皂苷 B II 色谱柱: CAPCELL PAK C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$); 流动相: 乙腈-水 (25:75); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样体积: $10 \mu\text{L}$ 。色谱图见图 1。

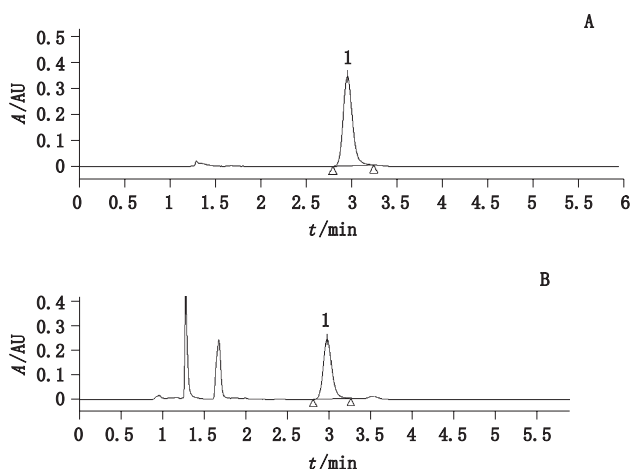


1. 知母皂苷 B II (timosaponin B II)

图 1 对照品 (A) 及样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.1.2 芒果苷 色谱柱: Waters Symmetry C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$); 流动相: 乙腈-0.2% 乙酸溶液 (15:85); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测波长: 258 nm; 进样量: $10 \mu\text{L}$ 。色谱图见图 2。



1. 芒果苷 (mangiferin)

图2 对照品(A)及样品(B)HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的配制

精密称取知母皂苷B II对照品,加30%丙酮水溶液制成 $0.349 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液;另取芒果苷对照品,精密称定,加50%乙醇水溶液制成 $53.3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.3 供试品溶液制备

2.3.1 知母皂苷B II 取本品粉末(过3号筛)0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入30%丙酮水溶液25 mL,称量,超声(50 W, 40 kHz)处理30 min,取出,放冷,再称量,用30%丙酮补足减失的量,摇匀,滤过,取续滤液用于知母皂苷B II的测定。

2.3.2 芒果苷 取本品粉末(过3号筛)0.10 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇水溶液25 mL,称量,超声(50 W, 40 kHz)处理30 min,放冷,再称量,用50%乙醇补足减失的量,摇匀,滤过,取续滤液用于芒果苷含量测定。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取知母皂苷B II对照品溶液和芒果苷对照品溶液各1、5、10、15、20、25 μL 进样测定,以对照品峰面积的对数与对照品进样质量对数绘制标准曲线,知母皂苷B II与芒果苷的回归方程分别为:

$$Y=0.6842X+0.3933 \quad r=1.000$$

$$Y=35.814X-22.040 \quad r=0.9996$$

知母皂苷B II质量浓度在 $34.9\sim 872.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,芒果苷质量浓度在 $5.33\sim 133.3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取同一知母皂苷B II对照品溶液与芒果

苷对照品溶液连续进样6次,测得知母皂苷B II峰面积的RSD为0.73%,芒果苷峰面积的RSD为0.11%,结果可知,相同条件下知母皂苷B II与芒果苷精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一样品,分别称取6份,同“2.3”项下供试品溶液的制备步骤提取,进样,测定知母皂苷B II含量的RSD为1.7%,芒果苷含量的RSD为1.2%。结果表明,知母中知母皂苷B II与芒果苷重复性良好。

2.7 回收率试验

取同一样品称取6份,每份0.10 g,各加入 $0.349 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 知母皂苷B II对照品溶液0.5 mL,同“2.3.1”项下知母皂苷B II供试品溶液的制备步骤操作,进样测定;另取同一样品6份,每份0.10 g,加入 $53.3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芒果苷对照品溶液各1.0 mL,同“2.3.2”项下芒果苷供试品溶液的制备步骤操作,进样测定。结果知母皂苷B II平均回收率为94.1%,RSD为2.1%;芒果苷平均回收率为98.7%,RSD为1.3%。

3 实验结果与讨论

3.1 单因素试验

3.1.1 酒用量的选择 取黄酒5、10、15、20、25 g,分别加水至25 mL,将其均匀地分别喷洒在100 g知母药材饮片上,焖至60 min后,置锅内,用130 $^{\circ}\text{C}$ 火炒制15 min,取出,晾干,筛去灰屑得酒知母饮片,粉碎过3号筛,即得样品粉末。按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测得知母皂苷B II的含量分别为4.03%、4.16%、4.17%、4.34%、4.57%,芒果苷的含量分别为1.24%、1.35%、1.42%、1.47%、1.52%。由结果可知,知母皂苷B II和芒果苷的含量随酒浓度的增大而增高,故选择15、20、25 g为正交试验优化的3个水平因素。

3.1.2 焖制时间的选择 取黄酒15 g,加水至25 mL,将其均匀喷洒在100 g知母药材饮片上,焖至30、60、90、120、150 min后,置锅内,用130 $^{\circ}\text{C}$ 火炒制15 min,取出,晾干,筛去灰屑得酒知母饮片,粉碎过3号筛,即得样品粉末。按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测得知母皂苷B II的含量分别为4.01%、4.86%、5.09%、4.91%、4.56%,芒果苷的含量分别为1.23%、1.36%、1.42%、1.47%、1.45%。由结果可知,随着焖制时间的延长,知母皂苷B II和芒果苷的含量有着不同的变化,为了使2个成分含量可以统一优

化,选择 60、90、120 min 为正交试验优化的 3 个水平因素。

3.1.3 炒制温度的选择 取黄酒 15 g,加水至 25 mL,将其均匀喷洒在 100 g 知母药材饮片上,焖至 60 min 后,置锅内,在 100、130、160、190、220 °C 文火炒制 10 min 取出,晾干,筛去灰屑得酒知母饮片,粉碎过 3 号筛,即得样品粉末。按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测得知母皂苷 B II 的含量分别为 3.72%、3.79%、4.31%、4.32%、4.65%,芒果苷的含量分别为 1.33%、1.45%、1.49%、1.41%、1.40%。由结果可知,知母皂苷 B II 的含量随炒制温度增加而升高,芒果苷的含量在炒制温度为 100~160 °C 时随温度的升高而增加,但当达到一定温度时其含量逐渐降低,考虑炒制温度对芒果苷含量的影响,选择 130、160、190 °C 为正交试验优化的 3 个水平因素。

3.1.4 炒制时间的选择 取黄酒 15 g,加水至 25 mL,将其均匀喷洒在 100 g 知母药材饮片上,焖至 60 min

后,置锅内,在 130 °C 火分别炒制 5、10、15、20、25 min,取出,晾干,筛去灰屑得酒知母饮片,粉碎过 3 号筛,即得样品粉末。按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测得知母皂苷 B II 的含量分别为 3.92%、4.29%、4.21%、4.52%、4.55%,芒果苷的含量分别为 1.13%、1.20%、1.34%、1.41%、1.49%。由结果可知,知母皂苷 B II 和芒果苷的含量随着炒制时间的延长而提高,故选择 15、20、25 min 为正交试验优化的 3 个水平因素。

3.2 正交试验与结果

在前期单因素试验的基础上,选用 $L_9(3^4)$ 正交表(见表 1),以知母皂苷 B II 和芒果苷为指标,选择黄酒用量(A)、焖制时间(B)、炒制温度(C)和炒制时间(D)4 个因素进行比较。按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,精密取 10 μ L 进样,依据“2.1”项下色谱条件测定,得到各正交试验结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 $L_9(3^4)$ 因素水平表

Tab. 1 $L_9(3^4)$ factor level table

水平 (level)	因素 (factor)			
	A 酒用量 (wine of volume)/g	B 焖制时间 (moistening time)/min	C 炒制温度 (processing temperature)/°C	D 炒制时间 (processing time)/min
1	15	60	130	15
2	20	90	160	20
3	25	120	190	25

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

编号 (No.)	A 酒用量 (wine of volume)/g	B 焖制时间 (moistening time)/min	C 炒制温度 (processing temperature)/°C	D 炒制时间 (processing time)/min	含量 (content)/%		综合评分 (comprehensive evaluation)/%
					知母皂苷 B II (timosaponin B II)	芒果苷 (mangiferin)	
1	1	1	1	1	5.92	1.47	7.393
2	1	2	2	2	5.98	1.43	7.410
3	1	3	3	3	6.12	1.57	7.690
4	2	1	2	3	6.14	1.56	7.700
5	2	2	3	1	6.09	1.67	7.760
6	2	3	1	2	5.43	1.60	7.030
7	3	1	3	2	5.81	1.48	7.290
8	3	2	1	3	6.02	1.69	7.710
9	3	3	2	1	5.96	1.51	7.470
K_1	22.493	22.383	22.133	22.623			
K_2	22.490	22.880	22.580	21.730			
K_3	22.470	22.190	22.740	23.100			
K_{j1}	7.498	7.461	7.378	7.541			
K_{j2}	7.497	7.627	7.527	7.243			
K_{j3}	7.490	7.397	7.580	7.700			
R_j	0.008	0.230	0.202	0.457			

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

方差来源 (source of variation)	偏差平方和 (sum of square)	自由度 (degree of freedom)	F 比 (F ratio)	显著值 (significance)
A	0	2	0.000	
B	0.084	2	1.000	
C	0.066	2	0.786	
D	0.322	2	3.834	$P < 0.05$
误差 (error)	0.08	4		

注 (note): $F_{(0.05, 2)} = 19$

3.3 讨论

根据表 3 结果可以看出, 因素影响主次顺序为 $D > B > C > A$, 因素 D (炒制时间) 对试验结果有显著的影响, 而因素 A (酒用量)、 B (焖制时间)、 C (炒制温度) 对试验结果虽有一定的影响, 但未有显著差异。按表 2 中各因素最高值, 选出最佳炮制工艺为 $A_1 B_2 C_3 D_3$, 从而得到本实验酒制知母正交试验最佳炮制方案为: 取黄酒 15 g, 加水至 25 mL, 将其均匀喷洒在 100 g 知母药材饮片上, 焖至 90 min 后, 置锅内, 用 190 °C 火分别炒制 25 min, 取出, 晾干, 筛去灰屑得酒知母饮片, 粉碎过 3 号筛, 即得样品粉末。

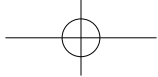
验证试验: 取知母 3 份各 100 g, 分别按最佳炮制方案制备酒知母, 以“2.3”项下方法制备供试品溶液进样, 测得知母皂苷 B II 含量分别为 6.32%、6.15%、6.27%, 芒果苷含量分别为 1.51%、1.47%、1.49%, 其综合评分分别为 7.74%、7.62%、7.76%, 其 RSD 为 1.4%, 通过验证试验结果可以看出, 优选的酒制知母的炮制工艺较稳定。

知母有炒炙、酒炙、盐炙、麸炙等炮制方法。有文献报道, 知母酒炙后知母皂苷 B II 的含量有所下降, 这是因为黄酒的加入对其溶出起到了一定程度的抑制作用, 知母经酒制后知母皂苷 A I 和知母皂苷 A III 的含量显著升高, 有可能是醇的加入使知母皂苷 B II 在炒制加热的过程中发生反应, 这一可能性有待考察^[11]; 芒果苷含量有所升高, 是因为炮制过程中醇的引入与加热使药材质地变得疏松, 有利于芒果苷的溶出, 另一种可能是炮制过程中新芒果苷转化

为芒果苷, 导致芒果苷的含量在炮制过程中含量上升^[12-13], 这种现象还需经过试验验证。本研究为酒炙知母的炮制条件提供了技术参考, 酒炙知母的炮制方法还需考虑其他因素, 并结合更多指标进行深入的研究。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部 [S]. 2015: 212
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 212
- [2] 孙兴华, 张宇伟, 陈芳芳, 等. 知母中化学成分的研究 [J]. 海峡药学, 2015, 27(8): 40
SUN XH., ZHANG YW, CHEN FF, et al. Constituents from *Anemarrhena asphodeloides* Bge. [J]. Strait Pharm J, 2015, 27(8): 40
- [3] 李国龙, 杨洁, 段金殿, 等. 不同产地知母药材质量分析评价 [J]. 中药材, 2015, 38(6): 1148
LI GL, YANG J, DUAN JA, et al. Quality analysis and evaluation of *Anemarrhena asphodeloides* rhizome from different habitats [J]. J Chin Med Mater, 2015, 38(6): 1148
- [4] 赵阳, 康利平, 余河水, 等. 利用 UHPLC/Q-TOF MS 技术进行 7 个甾体皂苷含量测定 [J]. 中国药学, 2013, 22(3): 226
ZHAO Y, KANG LP, YU HS, et al. Simultaneous determination of steroidal saponins in *Anemarrhena asphodeloides* Bge. by ultra high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chin Pharm Sci, 2013, 22(3): 226
- [5] 崔玲玲, 季德, 袁永亮, 等. 知母酒炙前后指纹图谱的比较及对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的比较研究 [J]. 海峡药学, 2016, 28(4): 43
CUI LL, JI D, YUAN YL, et al. Comparison of fingerprints and inhibitory activities on α -glucosidase of crude and processed Rhizoma comparison on fingerprint and inhibitory activities on α -glucosidase of crude and processed Rhizoma *Anemarrhena* [J]. Strait Pharm J, 2016, 28(4): 43
- [6] 李习平, 杨梓, 石继连, 等. 不同炮制方法对知母中芒果苷含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2502
LI XP, YANG Z, SHI JL, et al. Effect of different processing methods on mangiferin content in Rhizoma *Anemarrhena* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 22(10): 2502
- [7] 冯倩茹, 高妮. 知母常用炮制工艺的比较研究 [J]. 临床医学工程, 2012, 19(5): 815
FENG QR, GAO N. A comparative study on processing technology of *Anemarrhena* Rhizoma [J]. Clin Med Eng, 2012, 19(5): 815
- [8] 马河, 刘园华, 张金杰. 知母水溶性小分子提取物对胰岛素抵抗 HepG2 细胞体外糖代谢的影响 [J]. 食品与药品, 2013, 15(1): 26
MA H, LIU YH, ZHANG JJ. Effect of water-soluble small molecule



- extract in *Anemarrhenae Rhizoma* on glucose metabolism in insulin-resistant HepG2 cells [J]. *Food Drug*, 2013, 15(1): 26
- [9] 路明珠, 张治强, 伊佳, 等. 知母皂苷 B- II 抗抑郁作用及其机制研究 [J]. *药学实践杂志*, 2010, 28(4): 283
- LU MZ, ZHANG ZQ, YI J, *et al.* Study on the effect and mechanisms of timosaponin B- II on antidepressant [J]. *J Pharm Pract*, 2010, 28(4): 283
- [10] 张志斐, 肖蓉, 袁志芳, 等. 河北道地药材知母 HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(11): 1569
- ZHANG ZF, XIAO R, YUAN ZF, *et al.* Studies on HPLC-ELSD fingerprints of crude *Rhizoma Anemarrhenae* from Hebei Province [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2006, 26(11): 1569
- [11] 赵璐璐, 刘菲菲, 彭纓, 等. 高效液相色谱法考察不同炮制方法对知母中 5 种主要化学成分的影响 [J]. *色谱*, 2012, 12(30): 1271
- ZHAO LL, LIU FF, PENG Y, *et al.* Effects of different processing methods on five main chemical constituents of *Anemarrhena asphodeloides* Bge. studied by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 12(30): 1271
- [12] 魏静娜, 刘正辉, 赵琳琳, 等. 知母的盐制工艺优化 [J]. *辽宁中医杂志*, 2015, 42(6): 1294
- WEI JN, LIU ZH, ZHAO LL, *et al.* Optimization of salted processing for *Anemarrhena* [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2015, 42(6): 1294
- [13] 宋泽璧, 吴莹, 高慧. HPLC 法测定盐炙前后知母中新芒果苷、芒果苷和异芒果苷 [J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(2): 145
- SONG ZB, WU Y, GAO H. Determination of neomangiferin, mangiferin, and isomangiferin in *Anemarrhenae Rhizoma* before and after stir-frying with salt-water by HPLC [J]. *Drugs Clin*, 2015, 30(2): 145

(本文于 2017 年 8 月 29 日收到)