

指纹图谱技术优选姜制吴茱萸的炮制工艺

陈华国^{1,2}, 马青青^{1,2}, 周欣^{1,2*}, 杨世林^{1,2}

(1. 贵州师范大学天然药物质量控制研究中心, 贵阳 550001;

2. 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 优选姜制吴茱萸的炮制工艺。方法: 采用吴茱萸脂溶性及水溶性成分指纹图谱技术, 考察姜用量、闷润时间、炒制温度、炒制时间4个因素对制吴茱萸炮制工艺的影响。结果: 姜用量、炒制温度和炒制时间对吴茱萸指纹图谱具有显著影响, 最佳炮制工艺为药材与干姜用量比100:7, 闷润时间2 h, 炒制温度150℃, 炒制时间8 min。结论: 优选的炮制工艺稳定可行, 可为规范姜制吴茱萸炮制工艺提供试验依据。

[关键词] 指纹图谱; 姜制吴茱萸; 炮制工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0032-05

Optimization of Processing Technology for *Evodia rutaecarpa* with *Zingiber officinale* by HPLC Fingerprint Technique

CHEN Hua-guo^{1,2}, MA Qing-qing^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2*}, YANG Shi-lin^{1,2}

(1. Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou

Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Province Key Laboratory for

Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology for *Evodia rutaecarpa* with *Zingiber officinale*. **Method:** Fingerprints of hydrophilic and lipophilic components in *E. rutaecarpa* were selected as indexes, single factor test was employed to investigate impact of four factors on processing technology of *E. rutaecarpa*, including the amount of *Z. officinale*, stuffy embellish time, processing temperature and time. **Result:** The amount of *Z. officinale*, processing temperature and time had significant impact on fingerprint of *E. rutaecarpa*, optimum

[收稿日期] 20120830(007)

[基金项目] 贵阳市科技计划项目([2010]筑科农合同字第1-中-16号); 贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合人才团队[2011]4008)

[第一作者] 陈华国, 硕士, 副研究员, 从事中药质量控制、新药研发, Tel:0851-6700414, E-mail:chenhuaguol981@163.com

[通讯作者] *周欣, 博士, 教授, 从事中药、民族药质量控制, 中药指纹图谱以及中药新药研发, Tel:0851-6702167, E-mail:alice9800@sina.com

[4] 范远景, 马凌云, 徐晓伟, 等. 膜技术分离金银花绿原酸提取液工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(20):43.

[5] 张传平, 黄琳, 吴乔, 等. 膜分离技术在蓝根颗粒生产中的应用[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6):656.

[6] 张小曼, 马银海, 李勇, 等. 膜分离技术提取山竺红色素的工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(10):133.

[7] 郑必胜, 金江涛. 纳滤浓缩西番莲果汁的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(3):244.

[8] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准颁布件[S]. ZGB2011-44.

[9] 王黎明, 梁建宁, 黄晓燕, 等. 灯盏花素分散片及灯盏花素原料的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):77.

[10] 李卓明, 黄雯, 李明, 等. 安神补脑液高效液相色谱指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2):18.

[责任编辑 全燕]

processing technology was as following: ratio of *Z. officinale* and raw material 7: 100, stir-baked 8 min at 150 °C after moistened 2 h. **Conclusion:** Optimized processing technology was stable and feasible, it could provide experimental basis for standardization for processing technology of *E. rutaecarpa* with *Z. officinale*.

[**Key words**] fingerprint; processing *Evodia rutaecarpa* with *Zingiber officinale*; processing technology

吴茱萸具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻等功效,临床用于治疗寒疝腹痛、寒湿脚气、经期腹痛等症^[1]。民间大多以炮制品入药,且炮制方法较多,但尚无明确的规范标准^[2-4]。根据《贵州省中药饮片炮制规范》收录的炮制方法(甘草制、姜制、盐制)^[5],继对甘草制吴茱萸的具体炮制条件参数进行优化后,本试验采用指纹图谱技术,对姜制吴茱萸的炮制工艺进行优化,以确定其生产中各项技术参数,为制吴茱萸规范化生产提供试验依据。

1 材料

1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),AL204,ACS型1/10万电子分析天平(梅特勒-托利多公司),JYC-21CS21型电磁炉(九阳股份有限公司)。

吴茱萸采自贵州铜仁,经贵阳中医学院生药实验室鉴定为吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth 的干燥近成熟果实;姜采自贵州,经贵阳中医学院生药实验室鉴定为姜 *Zingiber officinale* Rosc.。乙腈为色谱纯,水(炮制用自来水,含测用去离子水),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂溶性成分样品溶液的制备 吴茱萸药材粉碎,过4号筛,精确称量0.2 g,加氨水2 mL和三氯甲烷30 mL,回流3次,每次2 h,滤过,合并滤液,回收溶剂,甲醇定容至10 mL。

2.2 脂溶性成分指纹图谱测定条件^[6] Agilent C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~2 min,25% A;2~20 min,25%~42% A;20~34 min,42% A;34~35 min,42%~70% A;35~54 min,70%~85% A;54~56 min,85%~100% A),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温25 °C,检测波长225 nm,停止时间60 min,进样量10 μL。

2.3 水溶性成分样品溶液的制备 吴茱萸药材粉碎,过4号筛,精确称量0.4 g,加水22 mL浸泡0.5 h,水浴80 °C提取7 h,冷却,加无水乙醇至醇体积分数50%,滤过,浓缩,加水定容至10 mL。

2.4 水溶性成分指纹图谱测定条件^[7] Hypersil ODS₂色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.4% H₃PO₄溶液(B)梯度洗脱(0~7 min,

5%~8% A;7~13 min,8%~11% A;13~30 min,11%~30% A),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30 °C,检测波长327 nm,停止时间30 min,进样量10 μL。

2.5 姜汁的制备 根据2005年版《贵州省中药饮片炮制规范》炙姜汁的方法,取干姜30 g,浸泡1 h,煎煮2次,每次30 min,滤过,合并滤液,浓缩至100 g姜汁,备用。

2.6 指纹图谱色谱峰的确定 课题组前期已对吴茱萸脂溶性成分和水溶性成分的指纹图谱进行研究,确定了提取方法和色谱条件。利用HPLC-DAD-ESI-MS对吴茱萸的脂溶性指纹图谱中一些谱峰进行确认,色谱峰1,2,3,4,5,6,7,8,9分别表示柠檬苦素、吴茱萸碱、多花鞣栗酸、吴茱萸次碱,1-甲基-2-壬基-4(1H)-喹诺酮,1-甲基-2-(Z-6-十一碳烯基)-4(1H)-喹诺酮,1-甲基-2-(4Z,7Z-十三碳二烯)-4(1H)-喹诺酮,吴茱萸卡品碱,1-甲基-2-(6Z,9Z-pentadecadienyl)-4(1H)-喹诺酮(图1)。利用HPLC对吴茱萸水溶性指纹图谱中的绿原酸进行确认,其他13个未知物的峰形也较好(图2)。

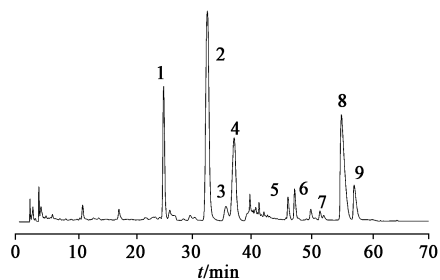


图1 吴茱萸脂溶性成分指纹图谱

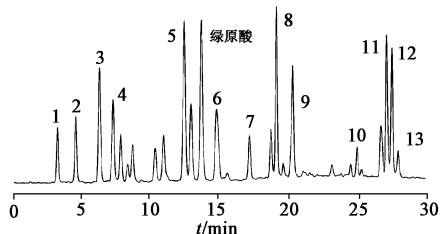


图2 吴茱萸水溶性成分指纹图谱

2.7 炮制工艺优选

2.7.1 姜用量考察 取吴茱萸净药材50 g,分别加姜汁1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5 g闷润4 h,于160 °C炒制10 min,对其指水溶性和脂溶性指纹图

谱进行对比研究(图 3,4)。

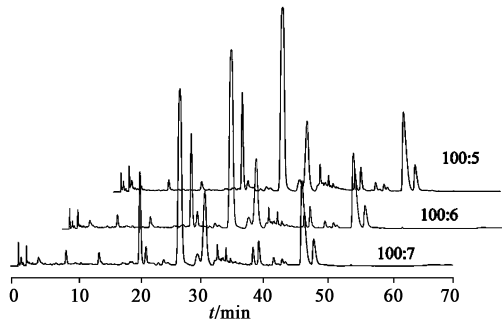


图 3 姜用量对脂溶性成分指纹图谱影响

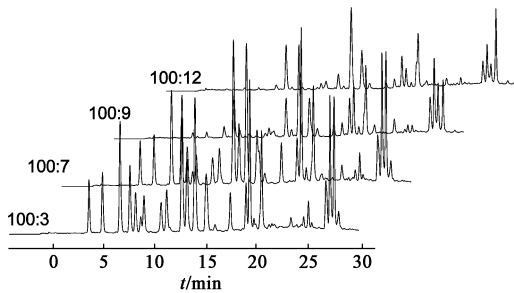


图 4 姜用量对水溶性成分指纹图谱影响

由图 3,4 可知,姜汁用量对脂溶性图谱的主峰数和峰面积均有一定影响,随姜汁用量逐渐增多,峰数无明显变化,1,2 号峰面积随姜汁用量增多有所增加,4 号峰峰面积随姜汁用量增多有所减少,其他峰峰面积无明显变化,说明所含化学成分含量有差别。姜汁用量对水溶性图谱的主峰数和峰面积均有明显影响,随姜汁用量增大,峰数明显减少,绿原酸及 1~12 号峰的峰面积减少,13 号峰峰面积增大,说明姜汁用量对炮制品的水溶成分的化学成分数量及含量有明显影响。综合考虑,选择姜用量 100:7。

2.7.2 闷润时间考察 取吴茱萸净药材 50 g,加姜汁 3.0 g,分别闷润 2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,5.0,6.0 h,于 160 °C 炒制 10 min,对其指水溶性和脂溶性指纹图谱进行对比研究(图 5,6)。结果表明闷润时间对指纹图谱无显著影响,结合生产成本考虑,选择闷润时间 2 h。

2.7.3 炒制温度考察 闷润 4 h 后的吴茱萸生品,炒制 10 min,分别考察 120,150,160,180,210 °C 对炮制工艺的影响,对其指水溶性和脂溶性指纹图谱进行对比研究(图 7,8)。

由图 7,8 可知,炒制温度对脂溶性图谱的峰数和峰面积有一定影响,随炒制温度逐渐增大,主峰数增多,1,2 号峰的峰面积减少,4,5,6,7,8 号峰的峰面积增大,说明所含化学成分及含量有差别,表明炒制温度对炮制品的化学成分具有重要影响。炒制

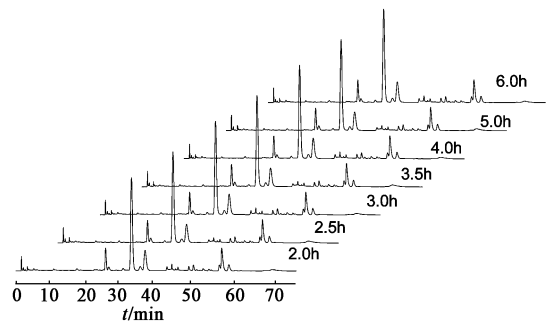


图 5 闷润时间对脂溶性成分指纹图谱影响

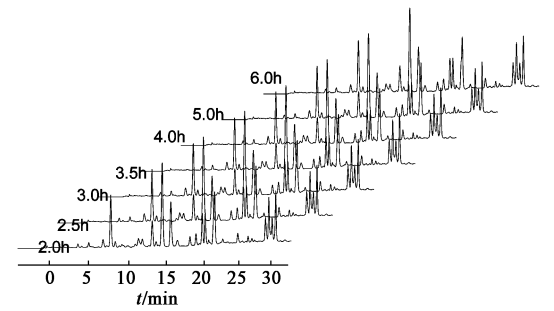


图 6 闷润时间对水溶性成分指纹图谱影响

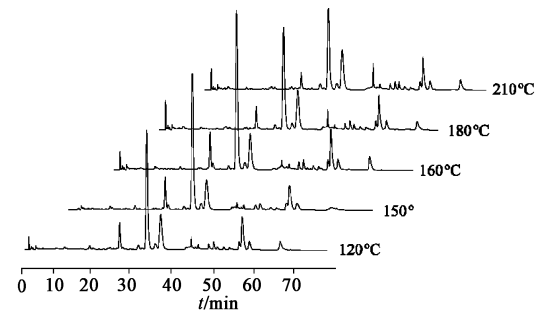


图 7 炒制温度对脂溶性成分指纹图谱影响

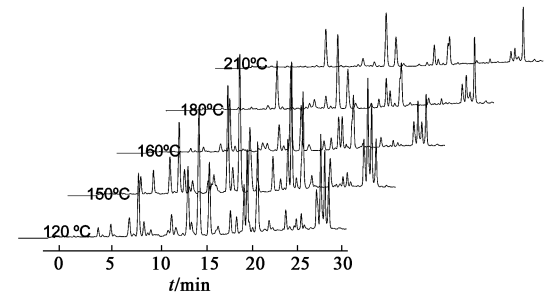


图 8 炒制温度对水溶性成分指纹图谱影响

温度对水溶性图谱的主峰数和峰面积均有明显影响,随炒制温度增高,峰数明显减少,绿原酸及 1~12 号峰的峰面积减少,13 号峰峰面积增大,说明炒制温度对炮制品的水溶成分的化学成分数量及含量有明显影响。综合考虑,炒制温度选择 150 °C。

2.7.4 炒制时间的考察 吴茱萸生品闷润 4 h,于 160 °C 分别炒制 1,2,3,5,6,8,10,12,15,18,20,25 min,对其指水溶性和脂溶性指纹图谱进行对比(图

9,10)。

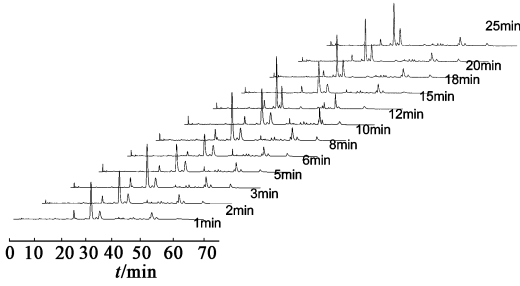


图9 炒制时间对脂溶性成分指纹图谱影响

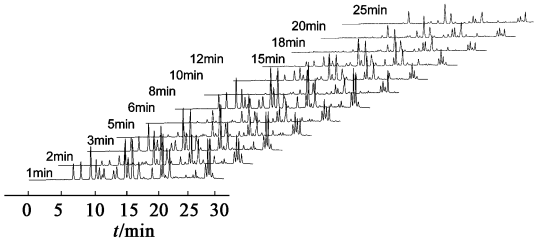


图10 炒制时间对水溶性指纹图谱影响

由图9,10可知,炒制时间对脂溶性成分图谱的峰数和峰面积有一定影响,随炒制温度逐渐增大,主峰数增多,1,2号峰的峰面积减少,4,5,6,7,8号峰的峰面积增大,说明所含化学成分及含量有差别,表明炒制温度对炮制品的化学成分具有重要影响。炒制时间对水溶性图谱的主峰数和峰面积有明显的影响,炒制时间增长,峰数明显减少,绿原酸及1~12号峰的峰面积减少,13号峰峰面积增大,说明炒制温度对炮制品的水溶成分的化学成分数量及含量有明显影响。综合考虑,确定炒制时间8 min。

2.8 生品和炮制品指纹图谱对比 通过对生品和优选条件下的炮制品的脂溶性成分指纹图谱进行比较,发现炮制品中吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的峰高及峰面积明显比生品高;主峰数也比生品多。表明炮制前后其主要化学成分发生了变化(图11)。对生品和炮制品的水溶性成分指纹图谱进行比较,发现炮制品中绿原酸的峰高及峰面积比生品略高;主峰数和生品的一致。表明炮制前后其主要化学成分发生了较小变化(图12)。

2.9 不同炮制条件炮制品脂溶性成分指纹图谱的主成分分析 由指纹图谱中各色谱峰的峰面积可知,不同条件吴茱萸炮制品中9个成分峰面积数据离散,应用SPSS 17.0统计软件包中的因子分析程序对原始数据进行标准化处理,进行主成分分析(图13)。

由图13可知,17个炮制品被聚为I,II,III,IV 4类(炒制温度210℃的样品被聚为I类;炒制温度

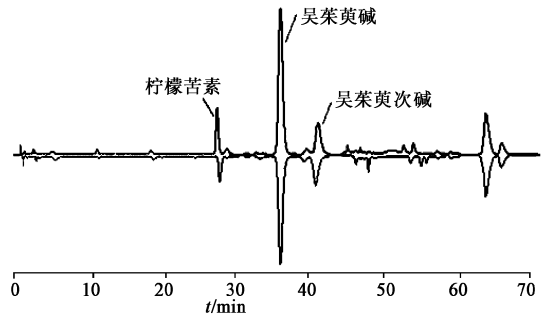


图11 生品(下)和姜制吴茱萸(上)的脂溶性成分指纹图谱

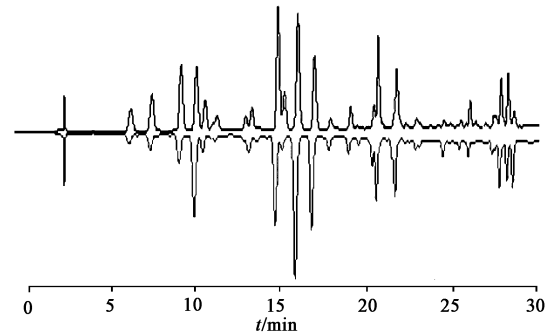


图12 生品(上)和姜制吴茱萸(下)的水溶性成分指纹图谱

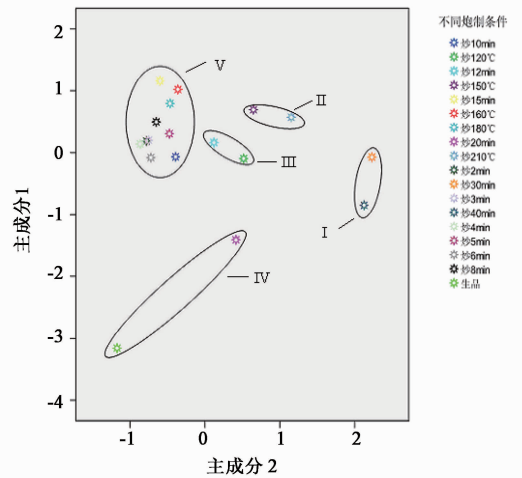


图13 不同炮制条件的炮制品脂溶性成分指纹图谱的主成分分析

180℃的样品被聚为II类;炒制25 min,药材与姜用量比100:12,炒制15 min,炒制20 min,药材与姜用量比100:9和药材与姜用量比100:10.5的样品被聚为III类;其他样品聚为IV类。I类样品中吴茱萸碱、柠檬苦素的含量最低,但吴茱萸次碱,1-甲基-2-壬基-4(1H)-喹诺酮,1-甲基-2-(Z-6-十一碳烯基)-4(1H)-喹诺酮,1-甲基-2-(4Z,7Z-十三碳二烯)-4(1H)-喹诺酮的含量最高,可能与炒制温度过高有关。II类样品中吴茱萸次碱含量仅次于I类样品。

Ⅲ类样品中吴茱萸碱、柠檬苦素的含量较Ⅰ类,Ⅱ类高。Ⅳ类样品中吴茱萸次碱,1-甲基-2-壬基-4(1H)喹诺酮,1-甲基-2-(Z-6-十一碳烯基)-4(1H)-喹诺酮,1-甲基-2-(4Z,7Z-十三碳二烯)-4(1H)-喹诺酮的含量较低,但吴茱萸碱、柠檬苦素含量最高。

2.10 不同炮制条件的炮制品水溶性成分指纹图谱的主成分分析 利用 SPSS 17.0 软件包中 Classify 函数下的 Hierarchical cluster 法,对不同炮制条件炮制品的指纹图谱谱峰进行聚类分析。采用 Euclidean distance(欧式距离)测量,Between groups linkage(类间平均链联结法)聚类,多个样品作为聚类变量,得到聚类谱系图(图 14)。结果显示 19 个样品中 18 号自成一类;其余 18 个样品被聚为另一大类,即 A 类和 B 类;在 A 类中 13,14,15 号样品自成一类,即 A1 类,其余为 A2 类。

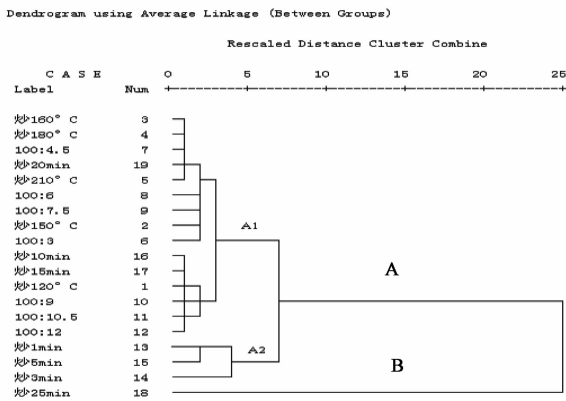


图 14 不同炮制条件的炮制品水溶性成分
指纹图谱的主成分分析

3 讨论

利用 HPLC 指纹图谱技术对吴茱萸生品及不同炮制条件的姜制炮制品进行比较分析,发现吴茱萸不同炮制条件的主峰数及有效成分含量有明显差异,说明不同炮制条件对吴茱萸的化学成分具有较大影响。利用系统聚类分析方法,充分显示了不同炮制条件下吴茱萸的质量差异。

通过试验研究,确定姜制吴茱萸的最佳炮制工

艺,炒制后水分 < 3%,无需再进行干燥处理。历版《中国药典》中都未对吴茱萸炮制品的炮制条件提供具体参数,本试验为其生产利用提供了试验依据。曾采用正交试验法^[8],以吴茱萸碱、吴茱萸次碱及柠檬苦素的含量为指标,考察姜用量、闷润时间、炒制温度、炒制时间 4 个因素对姜制吴茱萸炮制工艺的影响,结果表明姜用量、炒制温度、炒制时间对柠檬苦素含量有显著影响,确定最佳炮制工艺为药材与干姜用量比 100:7.5,闷润 4 h,炒制温度 160 °C,炒制时间 8 min。优化得到的炮制条件与本试验优选的条件有所不同,原因在于本文采用指纹图谱技术,全面考虑炮制后的饮片质量,而不仅仅是只考虑其中的某几个成分含量。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:160.

[2] 赵金明,张振秋.不同炮制方法对吴茱萸中 3 种指标性成分含量的影响研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7),60.

[3] 杨志欣,孟永海,王秋红,等.吴茱萸苦味拆分组分物质基础研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):74.

[4] 张韬,张世臣,魏璐雪.吴茱萸及其炮制品中生物碱的含量测定[J].中国中药杂志,1994,19(7):409.

[5] 贵州省食品药品监督管理局.贵州省中药饮片炮制规范[S].贵阳:贵州科技出版社,2005:288.

[6] 周欣,雷培海,刘海.吴茱萸药材的高效液相色谱指纹图谱研究[J].中华中医药杂志,2008,23(4):313.

[7] ZHOU Xin, ZHANG Yi-sha, ZHAO Yang, et al. An LC fingerprint study of *Poria cocos* (Schw.) wolf [J]. Chromatographia, 2009, 69:1283

[8] 马青青,龚小见,陈华国,等.正交试验法优选姜制吴茱萸的炮制工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):81.

[责任编辑 仝燕]