

# 指纹图谱技术优选甘草炙吴茱萸的炮制工艺

陈华国<sup>1,2</sup>, 马青青<sup>1,2</sup>, 周欣<sup>1,2\*</sup>, 杨世林<sup>1,2</sup>

(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: 优选甘草炙吴茱萸的炮制工艺。方法: 采用吴茱萸脂溶性及水溶性成分指纹图谱技术, 单因素试验考察甘草用量、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: 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-甘草 100:6, 闷润3 h, 180 °C炒制10 min。结论: 该优选工艺稳定可行, 可为规范甘草炙吴茱萸炮制工艺提供试验依据。

**[关键词]** 指纹图谱; 炙吴茱萸; 炮制工艺; 甘草

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0031-05

## Optimization of Processing Technology for *Glycyrrhiza Uralensis*-Processed *Evodia rutaecarpa* by HPLC Fingerprint Technique

CHEN Hua-guo<sup>1,2</sup>, MA Qing-qing<sup>1,2</sup>, ZHOU Xin<sup>1,2\*</sup>, YANG Shi-lin<sup>1,2</sup>

(1. Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize processing technology of *Glycyrrhiza uralensis*-processed *Evodia rutaecarpa*. **Method:** Fingerprint technique of hydrophilic and lipophilic components in *E. rutaecarpa* was used, single factor test was employed to investigate effect of four factors including the amount of *G. uralensis*, moistening time, frying temperature and time on processing technology of *E. rutaecarpa*. **Result:** Frying temperature and time had significant effect on fingerprint of *E. Rutaecarpa*, optimum processing technology was as follows: ratio of *G.*

**[收稿日期]** 20120421(006)

**[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、新药研究, Tel:0851-6700414, E-mail:chenhuaguo1981@163.com

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

[4] 陈艳, 张国刚, 余中平. 蛇床子的化学成分及药理作用的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(4):256.

[5] 周然, 彭涛, 冯玛莉, 等. 蛇床子挥发油止痒作用相关机制研究[J]. 中国药物与临床, 2003, 3(1):9.

[6] 王靖, 董诚明, 张铁军, 等. 降香挥发油羟丙基-β-环糊精包合物制备工艺的研究[J]. 中成药, 2007, 29(2):212.

[7] 张海英, 陈良, 薛洁. 肠胃散片挥发油提取及β-环糊精包合工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17

(17):36.

[8] 张生潭, 汪铁山, 林敬明. 春砂仁挥发油羟丙基-β-环糊精包合物的稳定性及增溶作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):16.

[9] 郭丽蓉, 周莉玲. 冰片β-环糊精、羟丙基-β-环糊精包合物的制备及稳定性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):7.

[责任编辑 仝燕]

uralensis to raw material 6: 100, fried 10 min at 180 oC after moistening 3 h. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, it could provided a scientific basis for standardization for processing technology of *G. uralensis*-processed *E. rutaecarpa*.

[ **Key words** ] fingerprint; processed *Evodia rutaecarpa*; processing technology; *Glycyrrhiza uralensis*

吴茱萸主要分布于亚热带、热带地区,是贵州省地道药材,为临床常用中药品种,大多以炮制品入药。2010 年版《中国药典》收录了甘草炙的炮制方法,2005 年版《贵州省中药饮片炮制规范》收录了甘草炙、姜炙、盐炙吴茱萸的炮制方法及辅料制法,民间关于吴茱萸的炮制方法亦有很多,但均无详细技术参数<sup>[1-3]</sup>。目前以吴茱萸为主的复方制剂被广泛应用于临床,规范的炮制方法对其饮片质量控制具有重要的意义<sup>[4-5]</sup>。本试验采用指纹图谱技术对甘草炙吴茱萸的炮制工艺进行优选,为炙吴茱萸规范化生产提供技术参数。

### 1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent), AL204 型电子分析天平(梅特勒), JYC-21CS21 型电磁炉(九阳), ACS 型 1/10 万分析天平(梅特勒), Hypersil ODS<sub>2</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

乙腈为色谱纯,炮制用水为自来水,含测用水去离子水,其余试剂均为分析纯,药材购自贵州铜仁,经贵阳中医学院生药实验室何顺志研究员鉴定为吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth 的干燥近成熟果实,甘草为光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根及根茎。

### 2 方法与结果

#### 2.1 样品溶液的制备

**2.1.1 脂溶性成分** 取适量吴茱萸药材粉碎,过 4 号筛,精确称量 0.2 g,加氨水 2 mL 和氯仿 30 mL,回流 3 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,浓缩,甲醇定容至 10 mL,即得。

**2.1.2 水溶性成分** 取适量吴茱萸药材粉碎,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,加无水乙醇至含醇量 50%,滤过,浓缩,水定容至 10 mL,即得。

#### 2.2 指纹图谱测定条件<sup>[6]</sup>

**2.2.1 脂溶性成分** Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)进行梯度洗脱(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<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,检测波长 225 nm,停止时间 60 min,进样量 10 μL。

**2.2.2 水溶性成分<sup>[7]</sup>** Hypersil ODS<sub>2</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液(B)进行梯度洗脱(0 ~ 7 min, 5% ~ 8% A, 7 ~ 13 min, 8% ~ 11% A, 13 ~ 30 min, 11% ~ 30% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,检测波长 327 nm,停止时间 30 min,进样量 10 μL。

**2.3 甘草汁的制备** 根据 2005 年版《贵州省中药饮片炮制规范》炙甘草汁的方法,取甘草 60 g,浸泡 1 h,煎煮 2 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,浓缩至 300 g 甘草汁,待用。

**2.4 指纹图谱色谱峰的指认** 课题组已对吴茱萸做了脂溶性成分和水溶性成分指纹图谱方面的研究,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 分别是柠檬苦素,吴茱萸碱,多花罂粟酸,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,见图 1。同时,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,见图 2。

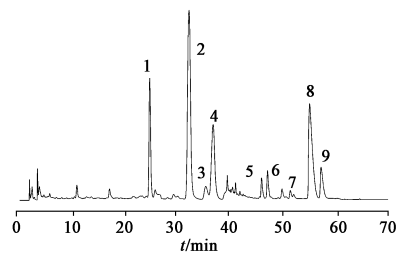


图 1 吴茱萸脂溶性成分指纹图谱

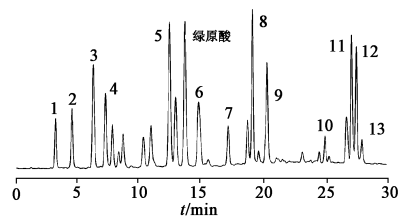


图 2 吴茱萸水溶性成分指纹图谱

## 2.5 炮制工艺的优选

**2.5.1 甘草用量的考察** 固定锅底温度 120 °C (电磁炉自动调节,余同),炒制时间 8 min,根据 2010 年版《中国药典》中药材与甘草比例 100:6,水平考察确定为 100:5,100:6,100:7。对甘草制吴茱萸的炮制工艺进行系统研究,指纹图谱见图 3,4。结果表明甘草用量对指纹图谱无显著影响,故本试验保持与《中国药典》的相关参数一致,选择甘草用量 100:6。

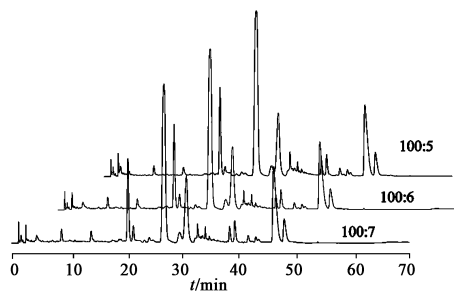


图 3 甘草用量对脂溶性成分指纹图谱影响

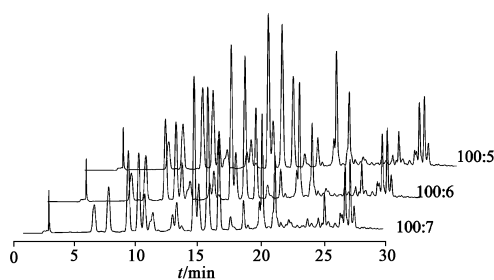


图 4 甘草用量对水溶性成分指纹图谱影响

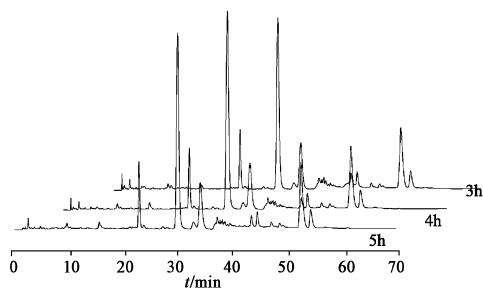


图 5 闷润时间对脂溶性成分指纹图谱影响

**2.5.2 闷润时间的考察** 固定锅底温度 120 °C,炒制时间 8 min,取 50 g 净药材,药材-甘草 100:6 时,闷润 3 h 的炮制品表面较湿润;闷润 6 h 的炮制品表面干燥色黑,故药材闷润时间水平确定为 3,4,5 h,指纹图谱见图 5,6。结果表明闷润时间对指纹图谱无显著影响,考虑到生产实践中时间成本问题,故选择闷润时间 3 h。

**2.5.3 炒制温度的考察** 闷润后的生品,固定炒制

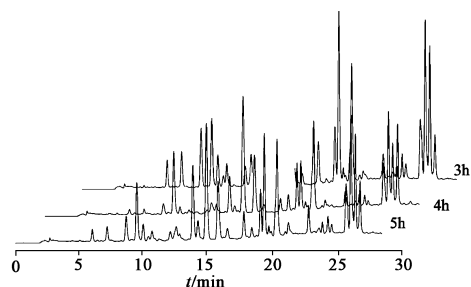


图 6 闷润时间对水溶性成分指纹图谱影响

时间 8 min,分别考查 120,150,160,180,210 °C 对炮制工艺的影响,指纹图谱见图 7,8。结果表明炒制温度对脂溶性图谱的主峰数和峰面积都有一定影响,炒制温度逐渐增高,峰数明显增多,2 号的峰面积在 160 °C 时最大,1 号峰的峰面积在 180 °C 时最大。说明所含化学成分数量及含量有差别。炒制温度对水溶性指纹图谱的主峰数和峰面积均有明显的影响,炒制温度逐渐增高,峰数明显减少,绿原酸及 1~12 号峰的峰面积减少,13 号峰的峰面积增加,说明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。故综合考虑确定炒制温度 160 °C。

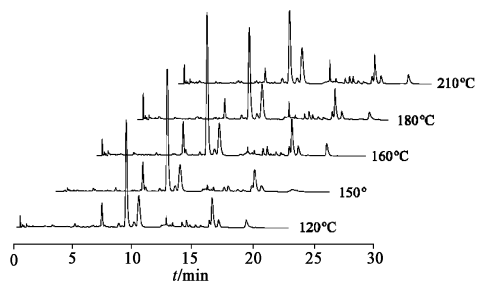


图 7 炒制温度对脂溶性指纹图谱影响

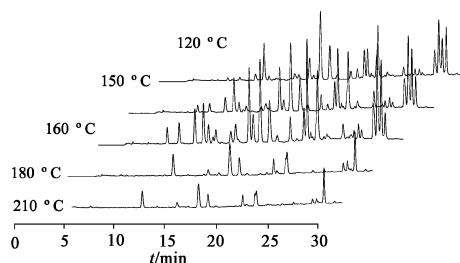


图 8 炒制温度对水溶性指纹图谱影响

**2.5.4 炒制时间的考察** 闷润后的生品,固定锅底温度 120 °C,分别炒制 2,3,4,5,6,8,10,12,15,20,30,40 min,比较其指纹图谱变化见图 9,10。结果发现炒制时间对脂溶性成分图谱的峰数和峰面积有一定影响,炒制时间逐渐增长,主峰数增多,1,2,4,6 号峰的峰面积有明显变化,说明所含化学成分及含

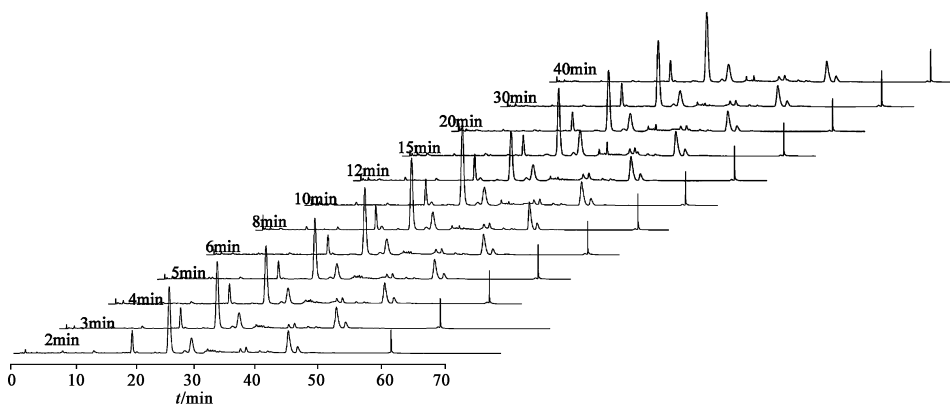


图 9 炒制时间对脂溶性指纹图谱影响

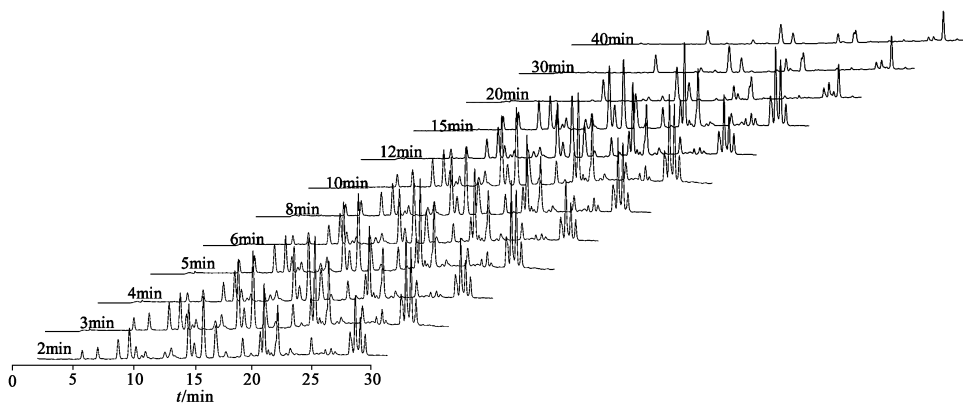


图 10 炒制时间对水溶性指纹图谱影响

量有差别,表明炒制时间对炮制品的化学成分具有重要影响。炒制时间对水溶性成分图谱的峰数和峰面积有一定影响,炒制时间逐渐增长,主峰数减少,绿原酸及 1~12 号峰的峰面积减少,13 号峰的峰面积增加,说明时间对炮制品的水溶成分的化学成分及含量有明显影响。故确定炒制时间 10 min。

**2.6 生品和最佳炮制条件下指纹图谱对比研究**  
优选条件下的吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的峰高及峰面积明显比生品的高,6 号峰的峰面积也有明显变化,而主峰数比生品的少。表明炮制前后其主要化学成分发生了变化(图 11)。对生品和优选条件下炮制品的水指纹图谱比较,发现优选条件下的绿原酸的峰面积明显比生品的高,而其他峰的峰面积比生品的少,表明炮制前后其主要化学成分发生了变化(图 12)。

**2.7 不同炮制品脂溶性成分指纹图谱的主成分分析**  
从指纹图谱各色谱峰的峰面积来看,不同条件吴茱萸炮制品中 9 个成分峰面积数据离散,利用化学计量学中的主成分分析,可把离散的数据标准化处理,以便对样品中的特征元素进行明确的评价。

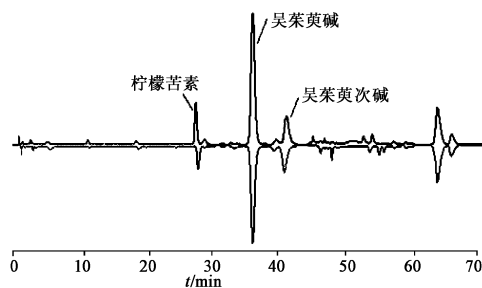


图 11 生品(下)和最佳条件的甘草炙吴茱萸(上)的脂溶性成分指纹图谱

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后进行主成分分析。由主成分分析结果可清楚地看出,18 个不同条件炮制品被聚为 I, II, III, IV, V 五类:炒制 30 min 和炒制 40 min 的样品被聚为 I 类;炒制 20 min 和炒制温度 210 °C 的样品被聚为 II 类;炒制 12 min 和炒制温度 120 °C 的样品聚为 III 类;生品和炒制 20 min 的样品聚为 IV 类;其他样品聚为 V 类。见图 13。

**2.8 不同炮制品水溶性成分指纹图谱的主成分分**

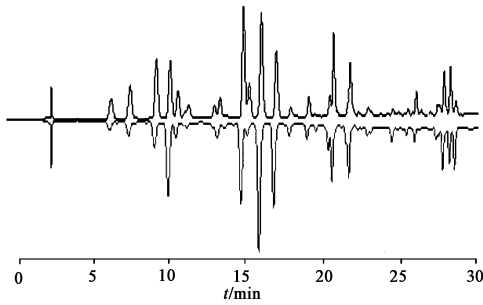


图 12 生品(上)和甘草炙吴茱萸最佳炮制条件(下)的水溶性成分指纹图谱

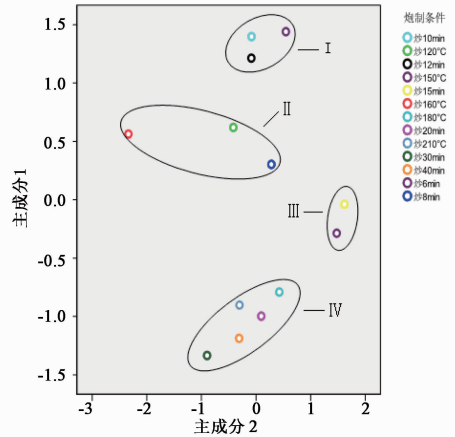


图 14 不同炮制品水溶性成分指纹图谱的主成分分析

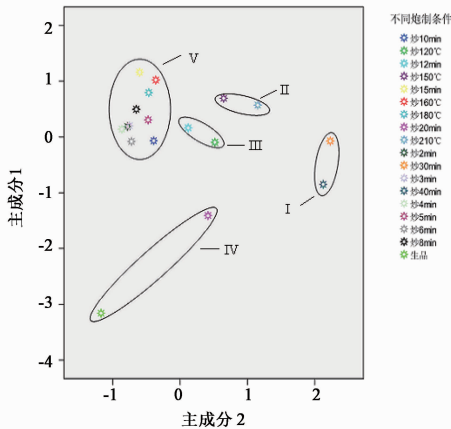


图 13 不同炮制品脂溶性成分指纹图谱的主成分分析

析 由主成分分析结果(图 14)可清楚地看出,13 个炮制品被聚为 I, II, III, IV 四类,炒制 10 min、炒制 12 min 和炒制温度 150 ℃ 的样品被聚为 I 类;炒制温度 120 ℃、炒制 8 min 和炒制温度 160 ℃ 的样品被聚为 II 类;炒制 15 min 和炒制 6 min 的样品被聚为 III 类;其他样品聚为 IV 类。由于本实验的主成分分析基于 14 种化合物含量,故聚类的结果是成分含量的相关与差异造成的。

I 类:各成分含量较接近,其中绿原酸含量均较高,1~12 号化合物含量均较低。

IV 类:各成分含量较接近,其中绿原酸和 1~12 号化合物含量均比明显其他类少,但 13 号化合物含量均比其他类多。

### 3 结论

利用 HPLC 指纹图谱技术对吴茱萸生品及不同炮制条件的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。这与中医药理论中甘草炙吴茱萸具有减毒、增

效的作用存在关联,但目前无研究对其如何减毒进行论述,有待于进一步研究。

主成分分析结果充分显示了不同炮制条件下吴茱萸的质量差异,表明 HPLC 指纹图谱技术在中药炮制品质量控制方面具有优势。通过试验研究,甘草制吴茱萸的最佳炮制工艺为药材与甘草比例 100:6,焖润时间 3 h,炒制温度 160 ℃,炒制时间 10 min。炒制后的炮制品水分 <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,本试验旨在为其生产利用提供科学可行的技术参数。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:160.
- [2] 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.
- [3] 邓先瑜.吴茱萸炮制的历史沿革[J]. 中成药,1999,21(6):297.
- [4] 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.
- [5] 张丽艳,罗君,李健,等.吴茱萸药材薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):72.
- [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, Zhao Yang, Chen Huaguo, et al. Chromatographic fingerprint study on *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by HPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> technique[J]. J Sep Sci, 2010,33(15):2258.

[责任编辑 仝燕]