

## 正交试验法优选姜制吴茱萸的炮制工艺

马青青<sup>1,2</sup>, 龚小见<sup>1,2</sup>, 陈华国<sup>1,2</sup>, 赵超<sup>1,2</sup>, 周欣<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:对姜制吴茱萸的炮制工艺进行优选研究,为规范吴茱萸的炮制工艺提供技术参数。方法:采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计,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 因素对姜制吴茱萸炮制工艺的影响。结果:姜用量、炒制温度、炒制时间对柠檬苦素含量有显著影响,药材与干姜比例为 100:7.5,闷润 4 h, 160 °C 炒制 8 min 为最佳炮制条件。结论:为规范姜制吴茱萸炮制工艺提供了部分科学依据。

**[关键词]** 正交试验法;姜制吴茱萸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0081-04

## Optimization of Processing Technology for *Evodia Rutaecarpa* Using Stir-bake with Ginger by Orthogonal Text

MA Qing-qing<sup>1,2</sup>, GONG Xiao-jian<sup>1,2</sup>, CHEN Hua-guo<sup>1,2</sup>, ZHAO Chao<sup>1,2</sup>, ZHOU Xin<sup>1,2\*</sup>

(1. The 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, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize and establish a processing technology of *Evodia rutaecarpa* using stir-bake with ginger on orthogonal test, providing technical index for standardization of stir-bake with ginger on *E. rutaecarpa*. **Method:** The content of evodiamine, rutaecarpine and limonin were selected as index;  $L_9(3^4)$  orthogonal test was employed to determine the effects of the four factors including quantities of ginger, moistening time, processing temperature and time. **Result:** Quantities of ginger, processing temperature and time had obviously effects on the content of limonin. The best preparing condition was as follows: the ratio of ginger to raw material was 7.5 to 100, and stir-baked 8 min at the temperature of 160 °C after moistening 4 h. **Conclusion:** The research provided a scientific basis for standardization of processing technology of stir-bake with ginger on *E. rutaecarpa* using stir-bake with ginger.

**[Key words]** orthogonal test methods; processing *Evodia rutaecarpa* using stir-bake with ginger

**[收稿日期]** 20101130(009)

**[基金项目]** 贵阳市 2010 年度科技计划项目([2010]筑科 4 合同字第 3-重 1 号,[2010]筑科农合同字第 1-中-16 号)

**[第一作者]** 马青青,硕士研究生,从事天然产物纯化与分析, E-mail: maqingqing666888@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, E-mail: alic9800@sina.com

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huangak 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss) Benth. var. *bodinieri* (Dodo) Huang 的干燥近成熟果实。吴茱萸具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效,用于寒疝腹痛、寒湿脚气、经行腹痛等症<sup>[1]</sup>。吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素是主要活性成分,具有抗炎、镇痛、止泻等作用<sup>[2-4]</sup>。民

间大多以炮制品入药,吴茱萸的炮制方法很多,但是目前还没有规范其炮制条件的具体标准。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),继对甘草制吴茱萸<sup>[5]</sup>的具体炮制条件参数进行优化后,对姜制吴茱萸的炮制工艺进行了优化,确定其生产中的各项技术参数。本实验以吴茱萸碱、吴茱萸次碱及柠檬苦素的含量为考察指标,采用  $L_9(3^4)$  正交试验法优选姜制吴茱萸的炮制工艺。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Agenlient 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Agenlient 工作站, AL204 型电子分析天平, HB-10250 型超声清洗器, JYC-21CS21 型九阳电磁炉, ACS 电子称。

**1.2 试剂** 吴茱萸碱对照品、吴茱萸次碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110802-200504, 110801-200505), 柠檬苦素对照品(自制,通过波谱解析技术(IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS)分析,鉴定其结构,通过 DAD 检测器检测其纯度为 99.12%,符合含量测定要求), 6-姜辣素(贵州迪大, HPLC 归一化法测定纯度分别为 98.89%, 99.23%), 乙腈(色谱纯), 水(炮制用自来水,含测用去离子水), 四氢呋喃(分析纯), 乙酸(分析纯), 甲苯(分析纯), 吴茱萸(贵州铜仁,经贵阳中医学院生药实验室鉴定为吴茱萸 *E. rutaecarpa* 的干燥近成熟果实,姜(贵州,经贵阳中医学院生药实验室鉴定为姜 *Zingiber officinale* Ross ginger)。

## 2 有效成分含量测定

**2.1 6-姜辣素的测定** 参照 2010 年版《中国药典》生姜含量测定项下方法测定<sup>[6]</sup>。测得生姜中 6-姜辣素质量分数为 0.32%。

**2.2 吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素的测定** 参照 2010 年版《中国药典》吴茱萸含量测定项下方法测定<sup>[1]</sup>。

## 3 姜制吴茱萸炮制方法优选

**3.1 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<sup>[7]</sup>,取 30 g 干姜,浸泡 1 h,煎煮 2 次,每次 30 min,过滤,合并滤液,浓缩至 100 g 姜汁,待用。

### 3.2 正交试验设计及结果

**3.2.1 因素与水平** 影响姜制吴茱萸的炮制工艺的主要因素有姜用量(药材与干姜比例)、闷润时

间、炒制温度、炒制时间,本实验采用  $L_9(3^4)$  正交试验设计(表 1),以吴茱萸碱、吴茱萸次碱及柠檬苦素的含量为指标,对其工艺的水平参数进行优选。

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平

水平	A 姜用量	B 闷润时间 /h	C 炒制温度 /℃	D 炒制时间 /min
1	100:6	3	150	8
2	100:7.5	4	160	12
3	100:9	5	180	16

**3.2.2 方法与结果** 按正交试验设计 1~9 号,取 50 g 净药材 3 份,用适量姜汁闷润,炒至微干。按 2010 年版《中国药典》方法测定吴茱萸碱、吴茱萸次碱及柠檬苦素。结果见表 2。方差分析结果见表 3~5。

## 4 结果分析及工艺验证

**4.1 正交试验** 各因素对吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量均无显著性差异,而姜用量(药材与姜比例)、炒制温度、炒制时间对柠檬苦素的含量均有显著性差异。从直观分析可看出,柠檬苦素在药材与干姜比例 100:7.5,160℃炒制 8 min,含量较高。因此,优选的炮制条件为药材与干姜比例 100:7.5,闷润 4 h,160℃炒制 8 min。炮制品经炒制后用甲苯法测得水分 < 3%,无需再进行干燥处理。

**4.2 验证试验** 取 50 g 生品,按药材与干姜比例 100:7.5 加 12.5 g 姜汁闷润 4 h,每小时搅拌 1 次,160℃炒制 8 min,平行 3 份。炮制品表面焦黄质脆,果实内部为淡黄褐色,质硬,有淡香气,味苦,粉末呈黄褐色。测得吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素质量分数分别为 1.55%, 0.49%, 11.40%。

## 5 讨论

**5.1 单因素考察** 在正交试验之前,对姜用量、闷润时间、炒制温度、炒制时间进行了单因素考察。

姜用量的考察:取 50 g 净药材,分别加姜汁 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20 g 闷润 4 h, 160℃炒制 10 min,对其指标成分进行含量测定,水平确定为 10, 12.5, 15 g,即药材与干姜比例 100:6, 100:7.5, 100:9。

闷润时间的考察:取 50 g 净药材,药材与甘草比例 100:7.5 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,考察闷润时间水平确定为 3, 4, 5 h。

表 2 姜制吴茱萸类正交试验表

No.	A	B	C	D	吴茱萸碱/%	吴茱萸次碱/%	柠檬苦素/%	
1	1	1	1	1	0.79	0.45	4.19	
2	1	2	2	2	0.73	0.32	4.35	
3	1	3	3	3	0.62	0.61	3.11	
4	2	1	2	3	0.81	0.38	4.45	
5	2	2	3	1	0.77	0.33	4.49	
6	2	3	1	2	0.86	0.42	4.65	
7	3	1	3	2	0.76	0.58	3.86	
8	3	2	1	3	0.73	0.48	3.88	
9	3	3	2	1	0.76	0.30	4.70	
吴茱萸碱	I	2.14	2.36	2.38	2.32	6.83	3.87	37.69
	II	2.44	2.24	2.30	2.35			
	III	2.25	2.24	2.15	2.16			
	SS	0.02	0.00	0.01	0.01			
吴茱萸次碱	I	1.38	1.42	1.35	1.08			
	II	1.14	1.13	1.00	1.33			
	III	1.36	1.33	1.53	1.47			
	SS	0.01	0.01	0.05	0.03			
柠檬苦素	I	11.65	12.51	12.72	13.39			
	II	13.59	12.72	13.50	12.86			
	III	12.45	12.46	11.47	11.44			
	SS	0.63	0.01	0.70	0.68			

表 3 吴茱萸碱含量的方差分析

差异来源	SS	f	变异均方	F	P
A	0.02	2.00	0.01	4.71	
B	0.00	2.00	0.00	1.00	
C	0.01	2.00	0.00	2.66	
D	0.01	2.00	0.00	1.98	
总计	0.03	8.00			

表 4 吴茱萸次碱含量的方差分析

差异来源	SS	f	变异均方	F	P
A	0.01	2.00	0.01	1.00	
B	0.01	2.00	0.01	1.19	
C	0.05	2.00	0.02	4.01	<0.05
D	0.03	2.00	0.01	2.17	
总计	0.10	8.00			

表 5 柠檬苦素含量的方差分析

差异来源	SS	f	变异均方	F	P
A	0.63	2.00	0.32	49.03	<0.01
B	0.01	2.00	0.01	1.00	
C	0.70	2.00	0.35	54.32	<0.01
D	0.68	2.00	0.34	52.31	<0.01
总计	2.03	8.00			

注:  $F(3,2) = 19.16419$ 。

炒制温度的考察:闷润后的生品分别用 120, 150, 160, 180, 210 ℃ 炒制, 对其指标成分进行测定, 水平确定为 150, 160, 180 ℃。从而制定了正交试验的水平参数。

炒制时间的考察:闷润后的生品分别炒制 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 min, 对其指标成分进行测定, 水平确定为 8, 12, 16 min。

5.2 干姜用量单因素考察 发现药材与干姜比例从 100:7.5 开始, 吴茱萸碱、柠檬苦素含量开始增加, 吴茱萸次碱含量开始降低。见图 1。

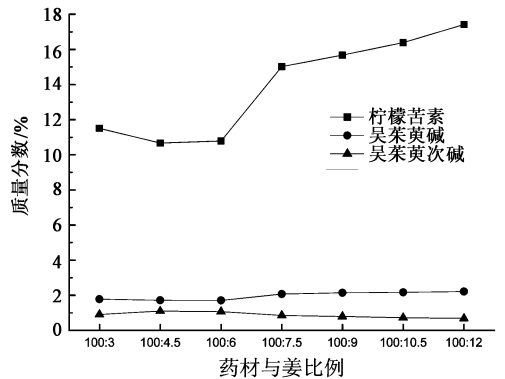


图 1 姜用量对指标含量的影响

通过对炒制温度进行的单因素考察,发现吴茱萸碱、柠檬苦素均在 160 ℃ 时有最高点,吴茱萸次碱则在 210 ℃ 时有最高点。见图 2。

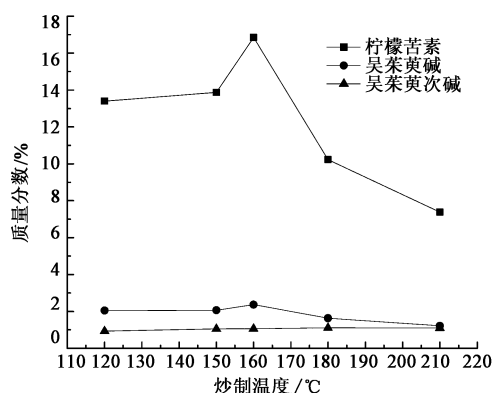


图 2 炒制温度对指标含量的影响

通过对炒制时间进行的单因素考察,发现吴茱萸碱、柠檬苦素质量分数逐渐降低。吴茱萸次碱质量分数随炒制时间增加而增大。见图 3。

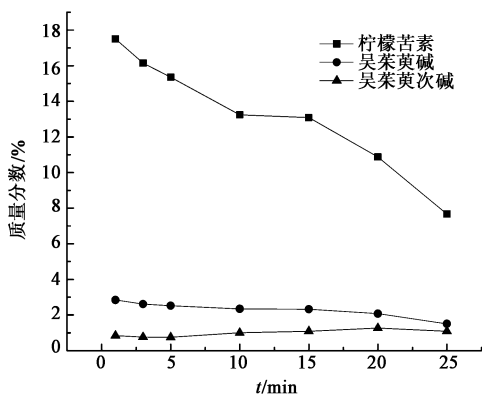


图 3 炒制时间对指标含量的影响

吴茱萸碱、吴茱萸次碱与柠檬苦素均具有镇痛、抗炎和抑制肿瘤作用<sup>[8-9]</sup>。吴茱萸碱具有抗肿瘤、镇痛、抗炎、减肥等作用<sup>[10]</sup>。吴茱萸次碱有抗癌、抗炎、抗过敏、保护心血管、光老化保护、胃黏膜保护、免疫抑制作用等多种药理学活性<sup>[11-12]</sup>。本试验采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计,以吴茱萸碱、吴茱萸次碱及柠檬苦素的质量分数为指标,考察姜用量、闷润时间、炒制温度、炒制时间 4 因素对制吴茱萸炮制工艺的影响。通过方差分析发现,姜用量、炒制温度、炒制时间对柠檬苦素质量分数有显著性影响,结果表明,药材与干姜比例为 100:7.5,闷润 4 h,160 ℃ 炒制 8 min 为最佳炮制条件。炒制后的炮制品水分 <

3%,无需再进行干燥处理。

本试验吴茱萸购自贵州铜仁,生品中吴茱萸碱、吴茱萸次碱及柠檬苦素的质量分数分别为 1.55%, 0.49%, 11.40%, 优选条件下的炮制品的吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素质量分数分别为 2.24%, 0.62%, 14.21%, 其结果远远高于 2010 版《中国药典》规定的炮制品下限(吴茱萸碱、吴茱萸次碱质量分数和 0.15%, 柠檬苦素质量分数 0.9%)。本实验优选条件下的炮制品的吴茱萸碱、吴茱萸次碱与柠檬苦素含量均比生品有提高。本实验为制定合理、规范的炮制工艺提供科学依据。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:93,160.

[2] Matsuda H, Yoshikawa M, Ko S, et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of evodiamine and rutaecarpine[J]. Na Med(Tokyo),1998,52(3):203.

[3] Matsuda H, Yoshikawa M, Iinuma M, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*[J]. Planta Medica,1998,64(4):339.

[4] Yu L L, Liao J F, Chen C F. Anti-diarrheal effect of water extract of *Evodiae fructus* in mice [J]. J ethnopharmacol,2000,73(1-2):39.

[5] 马青青,陈华国,赵超,等. 正交试验法优选制吴茱萸的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):35.

[6] 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.

[7] 龚慕辛,王智民,张启伟,等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(2):183.

[8] 戴媛媛,刘保林,窦昌贵,等. 吴茱萸及其有效成分的药理研究进展[J]. 中药材,2003,26(4):295.

[9] 宋宇. 吴茱萸碱体外抗肿瘤作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2008,13(8):860.

[10] 闵慧,李元建. 吴茱萸次碱的药理作用研究进展[J]. 中南药学,2008,6(4):451.

[11] HU H Y, SONG Z Y, DENG L, et al. Immunoregulatory effect of evodiamine in mice of various germ lins [J]. J Exp Hematol, 2008, 16(4):886.

[责任编辑 蔡仲德]