

正交试验法优选制吴茱萸的炮制工艺

马青青^{1,2}, 陈华国^{1,2}, 赵超^{1,2}, 龚小见^{1,2}, 周欣^{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: 对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, 考察甘草用量、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。结果: 炒制温度对吴茱萸次碱含量有显著影响, 药材与甘草比例为 100:6, 闷润 5 h, 180℃ 炒制 10 min 为最佳炮制条件。结论: 本研究为规范甘草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; 制吴茱萸

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)11-0035-04

Optimization of Processing Technology for *Evodia rutaecarpa* by Orthogonal Text

MA Qing-qing^{1,2}, CHEN Hua-guo^{1,2}, ZHAO Chao^{1,2}, GONG Xiao-jian^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2*}

(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 liquorice by orthogonal test, providing technical index for standardization of stir-bake with liquorice on *Evodia rutaecarpa*. **Method:** The content of evodiamine, rutaecarpine and limonin was selected as index. $L_9(3^4)$ orthogonal test was employed to determine the effects of the four factors including quantities of glycyrrhiza, processing temperature and time. **Result:** Processing temperature had obviously effects on the content of rutaecarpine. The best preparing condition was as follows: the ratio of glycyrrhiza to raw material was 6/100, and stir-baked 10 min with the temperature 180℃ after moistening 5 h. **Conclusion:** The research provided a scientific basis for standardization of processing technology of stir-bake with liquorice on *E. rutaecarpa*.

[Key words] Orthogonal test; processed *Evodia rutaecarpa*

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^[1]。吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素是主要活性成分, 具有抗炎镇痛等作用。民间大多以炮制品入药, 关于吴茱萸的炮制方法很多, 有酒炒、醋炒、童便炒、黄连制、黑豆汁制等。甘草具有补脾益气, 清热解毒, 祛痰止咳等功效^[1]。甘草苷和甘草

[收稿日期] 20100413(003)

[基金项目] 贵阳市科学技术计划项目[2010]筑科农合同字第1-中-16号

[第一作者] 马青青, 硕士研究生, 研究方向天然产物纯化与分析; E-mail: maqingqing666888@163.com

[通讯作者] *周欣, 博士, 教授, 研究方向为中药、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

酸是甘草药效的主要成分^[2]。甘草制吴茱萸有明显的镇痛作用^[3]，历版药典中均记载了甘草制吴茱萸，但一直未见其详细的炮制参数。目前，中成药生产亟待规范其炮制方法，确定炮制品生产中各项技术参数。本试验以吴茱萸碱、吴茱萸次碱及柠檬苦素的含量为考察指标，采用 L₉(3⁴) 正交试验法对甘草制吴茱萸的炮制工艺进行优选，为制吴茱萸规范化生产提供技术参数。

1 材料

1.1 仪器 Agenlient1100 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 电子秤。

1.2 试药 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, 1H-NMR, 13C-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)，甘草苷、甘草酸铵(成都曼思特生物科技有限公司，HPLC 归一化法测定纯度分别为 98.89% 和 99.23%)，乙腈(色谱纯)，水(炮制用自来水，含测用去离子水)，四氢喹(分析纯)，乙酸(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 *Evodia nutaecarpa* (Juss) Benth. 的干燥近成熟果实，甘草(贵州，经贵阳中医学院生药实验室鉴定为光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L.)。

2 有效成分含量测定

2.1 甘草苷、甘草酸含量的测定 参照 2010 年版《中国药典》甘草含量测定项下方法测定^[1]。测得甘草中甘草苷含量 0.62%、甘草酸含量 2.89%。

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

3 甘草制吴茱萸炮制方法优选

3.1 甘草汁的制备 根据 2005 年版《贵州省中药饮片炮制规范》炙甘草汁的方法及甘草和甘草汁的比例(1:5)^[4]，取 60 g 甘草，浸泡 1 h，煎煮 2 次，每次 30 min，过滤，合并滤液，浓缩至 300 g 甘草汁，待用。

3.2 正交试验设计及结果

3.2.1 因素与水平 影响甘草制吴茱萸的炮制工

艺的主要因素有甘草用量(药材与甘草比例)、闷润时间、炒制温度、炒制时间，本试验采用 L₉(3⁴) 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 L₉(3⁴) 正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	甘草用量	闷润时间/h	炒制温度/	炒制时间/min
1	100 5	3	160	10
2	100 6	4	180	15
3	100 7	5	210	20

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

表 2 甘草制吴茱萸正交试验表

No.	A	B	C	D	%		
					吴茱萸碱	吴茱萸次碱	柠檬苦素
1	1	1	1	1	1.57	0.76	10.35
2	1	2	2	2	0.80	1.33	5.15
3	1	3	3	3	1.46	0.94	8.83
4	2	1	2	3	1.01	1.27	5.68
5	2	2	3	1	1.52	1.16	8.89
6	2	3	1	2	1.79	0.66	12.59
7	3	1	3	2	0.53	1.28	2.76
8	3	2	1	3	1.62	0.96	9.79
9	3	3	2	1	1.71	1.06	10.16
吴茱萸碱	3.83	3.11	4.98	4.80	12.01	9.41	74.20
	4.33	3.94	3.53	3.12			
	3.86	4.97	3.51	4.09			
SS	0.05	0.58	0.47	0.47			
吴茱萸次碱	3.02	3.31	2.38	2.98			
	3.09	3.45	3.65	3.27			
	3.30	2.65	3.38	3.17			
SS	0.01	0.12	0.30	0.01			
柠檬苦素	24.33	18.79	32.73	29.40			
	27.16	23.83	20.98	20.50			
	22.72	31.58	20.49	24.30			
SS	3.37	27.65	32.04	13.32			

4 结果分析及工艺验证

4.1 正交试验结果 结果表明，各因素对吴茱萸碱和柠檬苦素的含量均无显著性差异，而炒制温度

表 3 吴茱萸碱含量的方差分析

差异来源	SS	自由度	变异均方	F
A	0.05	2.00	0.03	1.00
B	0.58	2.00	0.29	11.00
C	0.47	2.00	0.24	8.99
D	0.47	2.00	0.24	9.02
总计	1.58	8.00		

表 4 吴茱萸次碱含量的方差分析

差异来源	SS	自由度	变异均方	F
A	0.01	2.00	0.01	1.00
B	0.12	2.00	0.06	8.49
C	0.30	2.00	0.15	21.38
D	0.01	2.00	0.01	1.06
总计	0.45	8.00		

注: C 具有显著性。

表 5 柠檬苦素含量的方差分析

差异来源	SS	自由度	变异均方	F
A	3.37	2.00	1.68	1.00
B	27.65	2.00	13.82	8.21
C	32.04	2.00	16.02	9.52
D	13.32	2.00	6.66	3.96
总计	76.38	8.00		

注: $F(3, 2) = 19.164 19$ 。

对吴茱萸次碱的含量有显著性差异。

从直观分析可看出, 吴茱萸碱、柠檬苦素在药材与甘草比例 100 6, 闷润 5 h, 炒制 10 min, 含量较高。因此, 优选的炮制条件为药材与甘草比例 100 6, 闷润 5 h, 180 炒制 10 min。炮制品经炒制后用甲苯法测得水分小于 3%, 无需再进行干燥处理。

4.2 验证实验 取 50 g 生品, 加 16.5 g 甘草汁闷润 5 h, 每小时搅拌 1 次, 180 炒制 10 min, 平行 3 份。炮制品表面焦黑质脆, 果实内部为黄褐色, 质硬, 有焦香气, 味苦, 粉末呈黄褐色。测得吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素含量分别为 1.56%, 1.28%, 12.92%。

5 讨论

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。取 50 g 净药材, 药材与甘草比例 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, 考察药材与甘草比例水平确定为 100 5, 100 6, 100 7, 闷润时间水平确定为 3, 4, 5 h。闷润后的生品分别炒制 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40 min, 对其指标成分进行含量测定, 水平确定为 10, 15, 20 min。闷润后的生品分别用 120 , 150 , 160 , 180 , 210 炒制, 对其指标成分进行含量测定, 水平确定为 160 , 180 , 210 。从而制定了正交试验的水平参数。

通过对炒制温度进行的单因素考察, 发现吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素含量从 120 随温度增高, 含量逐渐增加, 吴茱萸碱、柠檬苦素含量均在 160 时有最高点, 在炒制温度大于等于 180 时, 随温度增加而降低, 吴茱萸次碱含量则在 180 时有最高点, 炒制温度大于等于 210 时, 随温度增加而降低。见图 1。

通过对炒制时间进行的单因素考察, 发现吴茱萸碱含量在 1~12 min 内没有明显变化, 从 12 min 后随时间增加而逐渐降低。柠檬苦素含量在 1~15 min 内没有明显变化, 从 15 min 后随时间增加而逐

含量/% 炒制温度对指标含量的影响

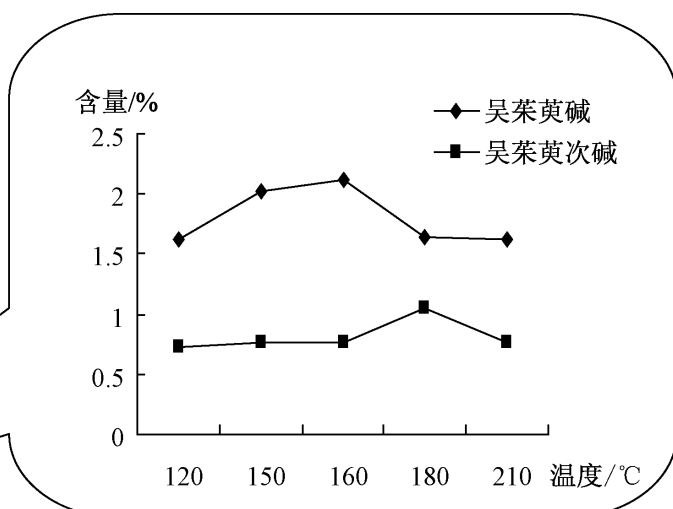
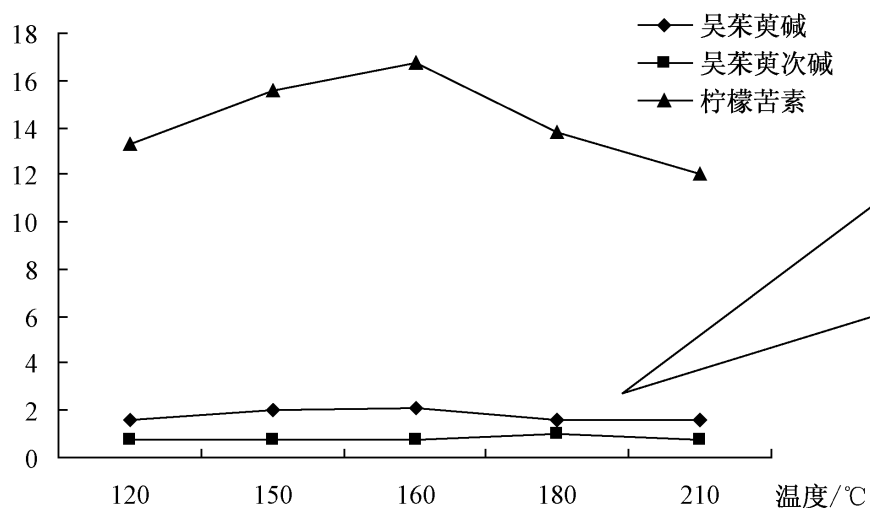


图 1 炒制温度对指标含量的影响

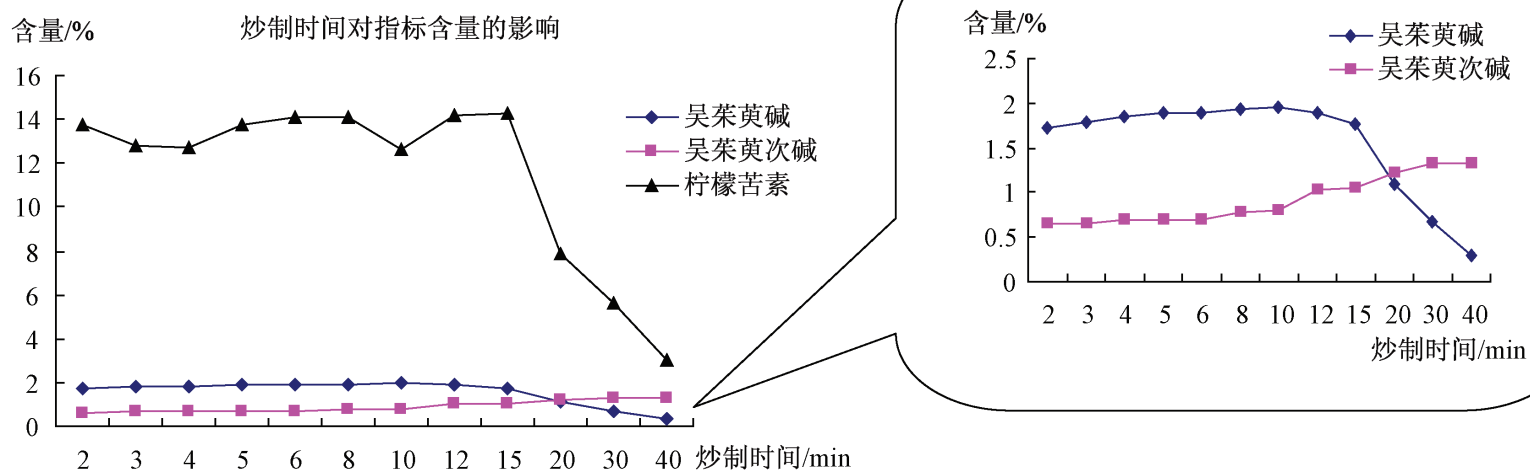


图 2 炒制时间对指标含量的影响

渐降低。吴茱萸次碱含量基本随炒制时间增加而增大,在 40 min 有所降低。见图 2。

吴茱萸碱、吴茱萸次碱与柠檬苦素均具有抗炎和抑制肿瘤作用^[5]。吴茱萸碱具有抗肿瘤、抗伤害感受、减肥、保护心脏、降血压等作用^[6]。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^[7]。本实验优选条件下的炮制品吴茱萸次碱含量是生品的 2 倍多。

本试验采用 $L_9(3^4)$ 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,考察甘草用量、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,炒制温度对吴茱萸次碱含量有显著性影响,结果表明,吴茱萸次碱在炒制温度 180 时含量最高,所以炒制温度确定为 180。为确保吴茱萸碱和柠檬苦素的含量,根据直观分析,甘草用量、闷润时间、炒制时间的水平参数确定为药材与甘草比例 100 6, 5 h, 10 min。炒制后的炮制品水分小于 3%,无需再进行干燥处理。历版药典中都没有对吴茱萸炮制品的炮制条件提供具体参数,本实验为其生产利用提供科学可行的技术参数。

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含量分别为 1.80%,

0.58%, 14.29%, 优选条件下的炮制品的吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素含量分别为 1.56%, 1.28%, 12.92%, 其结果远远高于 2010 年版《中国药典》规定的生品下限(吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量和 0.15%, 柠檬苦素含量 1.0%) 和炮制品下限(吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量和 0.15%, 柠檬苦素含量 0.9%)。本试验再次验证了吴茱萸为贵州的道地药材,其品质优良,质量稳定。

[参考文献]

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010: 80, 160.
- [2] 仇志坤, 冯冰虹. 甘草中主要有效成分的抗肿瘤和神经保护作用[J]. 中国神经肿瘤杂志, 2009, 7(1): 70.
- [3] 杨立平. 吴茱萸炮制研究进展[J]. 湘南学院学报, 2005, 7(1): 68.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 崔岚, 祝德秋, 安富荣, 等. 吴茱萸碱药理作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(6): 108.
- [7] 闵慧. 吴茱萸次碱的药理作用研究进展[J]. 中南药学, 2008, 6(4): 451.

[责任编辑 顾雪竹]