

# 吴茱萸汤药效物质基础的方法学研究

宁黎丽, 毕开顺\*, 王 瑞, 车镇涛<sup>1</sup>, 王 玺, 罗 旭

(沈阳药科大学药分研究室, 沈阳 110015; <sup>1</sup> 香港科技大学化学系, 香港中文大学中医学院, 香港)

**摘要** 目的: 为确定复方中药的药效物质基础提供方法。方法: 通过对吴茱萸汤进行组方药量变化, 在原方基础上按正交试验法组成 9 个不同配比的处方, 同时对其进行 HPLC 分析和镇痛与止呕两个指标的药理实验, 对所得化学数据和药理数据进行逐步回归分析。结果: 确定吴茱萸汤的药效物质基础主要为产生  $X_4$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$  和  $X_{12}$  号色谱峰中的化学成分(已确认  $X_9$  为吴茱萸次碱)。结论: 本方法对于其他复方中药的药效物质基础确定有一定参考价值。

**关键词** 吴茱萸汤; 高效液相色谱法; 逐步回归分析

复方中药成分复杂, 其特点是“多成分、多靶点、多渠道”, 往往不是一个有效成分, 而是有效成分之间的协同效应, 因此复方中药应作为一个整体进行研究<sup>[1]</sup>。为了建立能评价复方中药质量的新方法, 我们以中医药理论为指导, 从整体出发将传统中医理论与当代科学相结合, 研究了复方中药吴茱萸汤。

吴茱萸汤出自张仲景《伤寒论》<sup>[2]</sup>, 是中医临床常用方剂之一。处方由吴茱萸、人参、生姜和大枣组成, 具暖肝温胃、降逆化浊的功效。近年来, 国内外学者就吴茱萸汤及其组成药味在化学、药理等方面进行了广泛而深入的研究。据报道, 吴茱萸汤中吴茱萸和生姜是该方中不可缺少的药味<sup>[3]</sup>; 吴茱萸中镇痛成分为吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素<sup>[4]</sup>。

本研究以吴茱萸汤原方的基础上, 按正交试验法组成药量配比不同的 9 个处方; 对 9 个处方的水煎醇沉液进行 HPLC 分析和药理实验, 获得化学和药理数据, 经数据处理, 确定反映吴茱萸汤药效的物质基础。

## 实 验 材 料

**仪器设备** 岛津 LC-10A 高效液相色谱仪; SPD-10A 紫外检测器; CLASS-10A 色谱工作站。

**药品与试剂** 吴茱萸碱(evodia mine)、吴茱萸次碱(rutaecarpine), 由中国药品生物制品检定所提供。样品吴茱萸(*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.) 由

本校药用植物教研室孙启时教授鉴定。0.6% 醋酸溶液、2% 硫酸铜溶液(实验前配制)。试剂规格为分析纯或色谱纯。内标: 氯氟舒松(halcinonide)分析纯, 天津制药厂产品。

**动物** 昆明种小鼠, (20 ± 2) g, ♀ ♂兼用; 健康家鸽, (350 ± 50) g, ♀ ♂兼用; 均由沈阳药科大学实验动物室提供。

## 方 法 与 结 果

### 1 HPLC 分析

**1.1 色谱条件** 色谱柱: Hypersil ODS (5 μm, ID 4.6 mm × 200 mm, 大连化物所); A. 流动相: 乙腈—水—四氢呋喃—冰醋酸(48: 52: 1: 0.1), 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 225 nm; B. 流动相: 乙腈—水—四氢呋喃—冰醋酸(3: 97: 2: 0.2), 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 290 nm; 柱温: 20 °C。

**1.2 样品溶液的制备** 按表 1 中 9 个处方药味用量的 1/10 称取所需各生药, 置于圆底烧瓶中, 加入 10 倍量的水, 浸泡 30 min, 急火煮沸后改用小火保持微沸 1 h。倾出药汁(四层纱布过滤)。滤渣再加 10 倍量的水, 同前法煎制, 过滤。合并两次煎液, 并用水洗涤纱布。滤液、洗涤液一并放入 100 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀。精密移取此液 20 mL, 精密加入无水乙醇 60 mL 沉淀(含醇量达 75%), 置冰箱中静置 18 h 后取出, 抽滤, 弃去初滤液, 移取续滤液 20 mL, 于旋转蒸发仪上蒸去乙醇, 浓缩液用氯仿萃取 3 次(20, 20, 10 mL)。合并氯仿层, 于旋转蒸发仪上蒸去氯仿, 残渣用甲醇溶解, 加

收稿日期: 1999-03-15

\* 联系人 Tel: (024) 23843711 - 3363, Fax: (024) 83890024,

E-mail: ksbi@pub.sy.jn.cn

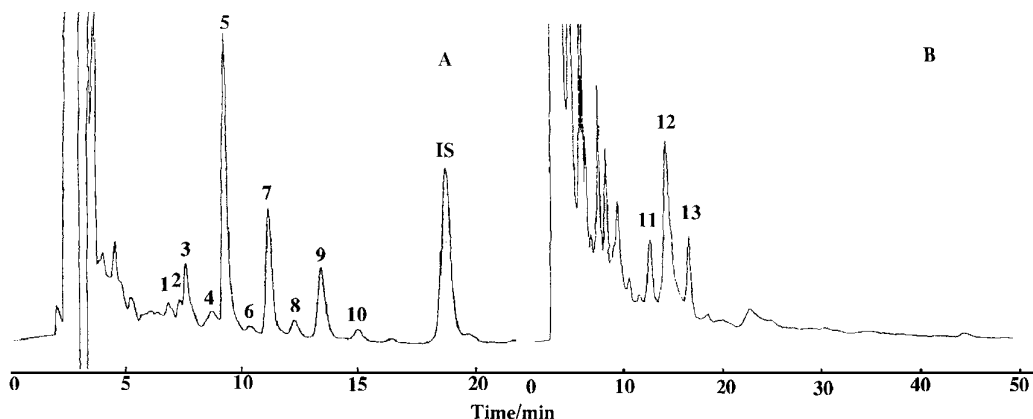
入内标氯氟舒松溶液 0.20 mL (1 mg·mL<sup>-1</sup>) 定容至 5 mL (样 I); 水层定容至 5 mL (样 II)。

**1.3 HPLC 测定** 取样 I、样 II 各 20 μL 分别在 A 和 B 两个色谱条件下进样, 记录色谱图 (图 1)。共分离出 13 个色谱峰。其中吴茱萸碱、吴茱萸次碱对应的色谱峰分别为 7 号和 9 号峰, 峰 IS 为氯氟舒松色谱峰, 按内标法计算吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量, 工作曲线方程分别为:  $Y = 0.0123 + 0.375 X$ ,  $Y = -2.691 \times 10^{-3} + 0.2143 X$ 。1 ~ 4, 6, 8, 10, 11 和 12 号色谱峰为吴茱萸中组分产生, 5 号为生姜中组分产生, 13 号为人参中组分产生。它们的含量按吴茱萸次碱的工作曲线计算, 结果见表 2。

**Tab 1 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) of 9 recipes of Wuzhuyu decoction**

Recipe No.	Weight / g			
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	9	18	9	10
2	9	9	4.5	5
3	9	27	13.5	15
4	4.5	18	4.5	15
5	4.5	9	13.5	10
6	4.5	27	9	5
7	13.5	18	13.5	5
8	13.5	9	9	15
9	13.5	27	4.5	10

R<sub>1</sub>: Fructus Evodiae; R<sub>2</sub>: Rhizoma *Zingiberis recens*; R<sub>3</sub>: Radix Ginseng; R<sub>4</sub>: Fructus Jujubae.



**Fig 1** Chromatograms of the organic phase (A) and aqueous phase (B) of recipes of Wuzhuyu decoction. 1 ~ 4, 6, 8, 10 ~ 12. From Wuzhuyu; 5. From Ginseng; 7. Evodia mine; 9. Rutaecarpine; 13. From *Zingiberis recens*; IS. Internal standard (halcinonide).

**Tab 2 Original HPLC data (μg·mL<sup>-1</sup>) of 9 recipes of Wuzhuyu decoction**

Recipe No.	Peak No.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.1500	0.1304	0.8846	0.2859	3.8270	0.0916	1.3565	0.1378	1.6458	0.1496	1.1739	3.8970	1.3600
2	0.1398	0.1700	0.8716	0.2197	4.2760	0.1147	1.2830	0.3115	1.6181	0.0941	0.5636	1.4716	0.5558
3	0.2774	0.2344	1.0924	0.4320	5.0715	0.1405	1.4301	0.3631	1.6324	0.2564	0.4458	1.6084	0.2545
4	0.1527	0.1014	0.4459	0.2125	4.5120	0.0714	0.6423	0.1664	0.7400	0.0742	0.6626	0.9623	0.6185
5	0.1421	0.0510	0.1558	0.2200	4.8751	0.0892	0.7904	0.2153	0.8942	0.3927	0.7682	0.9876	2.3990
6	0.2173	0.0844	0.6047	0.2454	5.8169	0.1163	1.1409	0.3959	1.2652	0.3152	1.1578	2.9120	1.7274
7	0.2359	1.0796	0.8904	0.3133	6.1081	0.1339	1.9055	0.5602	2.2961	0.5602	2.1948	8.4736	1.9943
8	0.1481	0.0531	0.4366	0.2285	4.2164	0.1060	0.9131	0.2575	1.1440	0.3278	1.6186	5.8676	1.2131
9	0.3009	0.1540	0.9987	0.2887	9.7730	0.1540	2.0437	0.5305	2.2888	0.5956	2.0740	8.1219	0.7896

**2 药理实验**

**2.1 样品溶液的制备** 同 1.2 项下制成样品水煎醇沉溶液, 蒸去乙醇, 作为药理实验的样品溶液 (含生药 1 g·mL<sup>-1</sup>), 冷藏, 备用。

**2.2 镇痛实验**<sup>[4-6]</sup> 将小鼠称重, 标记后随机分

组, 每组 10 只, 编号。给药组按编号 *p*<sub>0</sub> 样品 0.2 mL/10 g, 对照组 *p*<sub>0</sub> 等量生理盐水。给药 1 h 后, 各鼠 *i*<sub>p</sub> 0.6% 醋酸溶液 0.1 mL/10 g, 观察并记录注射醋酸溶液后 5 ~ 15 min 内小鼠出现扭体反应的次数, 实验结果见表 3。

**Tab 3 Analgesia effects of 9 recipes of Wuzhuyu decoction**

Recipe No.	Number of animal	Dosage / (mL/10 g)	Frequency of body twisting in 15 min ( $\bar{x} \pm s$ )
Control	20	0.2	17.4 ± 5.80
1	10	0.2	4.80 ± 2.65**
2	10	0.2	5.40 ± 3.41**
3	10	0.2	5.10 ± 4.09**
4	10	0.2	7.90 ± 2.88**
5	10	0.2	7.80 ± 2.65**
6	10	0.2	7.70 ± 2.31**
7	10	0.2	3.60 ± 2.95**
8	10	0.2	3.40 ± 3.53**
9	10	0.2	3.20 ± 2.09**

\*\*  $P < 0.01$ .

**2.3 止呕实验<sup>[3,5]</sup>** 将已禁食 12 h 的家鸽称重,标记后随机分组,每组 8~10 只,编号。给药组按编号灌服样品 1.0 mL/100 g,对照组  $p_0$  等量自来水。给药 1 h 后,每鸽  $p_0$  2%硫酸铜溶液 1.0 mL/100 g,观察并记录各鸽出现第 1 次呕吐的时间(呕吐潜伏期)和给硫酸铜后 1 h 内呕吐的次数(呕吐频率)。实验结果见表 4。

**Tab 4 Antiemesis effects of 9 recipes of Wuzhuyu decoction**

Recipe No.	Number of animal	Dosage / (mL/100 g)	Frequency of vomiting in 1 h ( $\bar{x} \pm s$ )
Control	20	1.0	7.15 ± 1.18
1	9	1.0	2.33 ± 1.87**
2	10	1.0	2.90 ± 2.70**
3	9	1.0	2.00 ± 2.00**
4	10	1.0	2.80 ± 2.78**
5	10	1.0	3.10 ± 1.52**
6	9	1.0	2.78 ± 2.44**
7	9	1.0	1.56 ± 1.42**
8	8	1.0	1.88 ± 1.96**
9	8	1.0	1.13 ± 1.14**

\*\*  $P < 0.01$ .

### 3 数据处理

#### 3.1 HPLC 数据与药理数据的逐步回归分析

将表 3 和表 4 中的药理数据分别与表 2 中的 HPLC 数据组成原始数据矩阵,采用自编程序进行逐步回归分析<sup>[7]</sup>。在镇痛回归分析中,有 9 个变量(色谱峰以  $X$  表示)对方程作用显著,被保留;镇痛复相关系数  $RR = 1.0000$ 。其中  $X_4, X_9, X_{10}, X_{12}$  与镇痛成正相关,为有效成分; $X_2, X_3, X_5, X_6, X_{13}$  与镇

痛成负相关,减弱镇痛效果。在止呕回归分析中,有 9 个变量对方程作用显著,被保留;止呕复相关系数  $RR = 1.0000$ 。其中  $X_3, X_4, X_5, X_9, X_{10}, X_{12}$  与止呕成正相关,为有效成分; $X_7, X_{11}, X_{13}$  与止呕成负相关,减弱止呕效果。

#### 3.2 处方组成与药理数据的逐步回归分析

将表 3 和表 4 中的药理数据分别与表 1 中的处方用量数据组成原始数据矩阵,采用自编程序进行逐步回归分析。镇痛复相关系数  $RR = 0.9899$ ,止呕复相关系数  $RR = 0.9413$ 。由镇痛结果可知:吴茱萸、生姜、大枣与镇痛成正相关,有镇痛作用;人参与镇痛成负相关,减弱镇痛效果。由止呕结果可知:吴茱萸、生姜与止呕成正相关,有止呕作用;大枣与止呕成负相关,人参与止呕无明显相关性。

#### 3.3 药理数据方差分析<sup>[8]</sup>

由表 3 和表 4 可见各处方均有显著的镇痛、止呕功效,为考察各因素即处方中各单味药的作用是否存在显著性差异,对两组药理数据分别进行方差分析,结果见表 5。由方差分析结果可见,吴茱萸对镇痛和止呕都有显著作用,而人参、生姜和大枣对药效有一定的影响,但不显著,说明吴茱萸在处方中为君药地位。

**Tab 5 Analysis of variance of analgesic and antiemetic data for the four composing herbal medicines**

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Observed variance	Variance ratio
<b>Analgesic</b>				
$R_1$	295.4	2	147.7	16.20**
$R_2$	0.6001	2	0.3001	0.033
$R_3$	0.8001	2	0.4001	0.044
$R_4$	1.400	2	0.700	0.077
Errors	738.7	81	9.120	
Sum	1037	89		
<b>Antiemetic</b>				
$R_1$	29.96	2	14.98	3.642*
$R_2$	6.156	2	3.078	0.748
$R_3$	0.2888	2	0.1444	0.035
$R_4$	0.6222	2	0.3111	0.076
Errors	333.2	81	4.113	
Sum	370.2	89		

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

本研究结果表明:复方吴茱萸汤药效物质基础为产生  $X_4, X_9, X_{10}, X_{12}$  号色谱峰的化学成分(已确认  $X_9$  为吴茱萸次碱),这些成分的镇痛、止呕作用的

回归系数皆为正值,其含量增加,镇痛和止呕作用增强。

## 讨 论

1 处方组成与药理数据的逐步回归分析结果和药理数据的方差分析结果基本一致:吴茱萸、生姜与镇痛、止呕作用皆成正相关,并呈剂量依赖性;人参参与镇痛作用成负相关,与止呕作用无相关性;大枣与镇痛作用成正相关,与止呕作用呈负相关。吴茱萸的回归系数在诸回归方程中均最大,确证了吴茱萸在处方中的君药地位。生姜在止呕实验中的回归系数较大,与文献中“姜素有呕家圣药之称”、“与吴茱萸相辅为用,可进一步加强温胃止呕作用”的报道<sup>[9]</sup>一致。

2 应根据吴茱萸汤的功能主治设计较全面、合理的药效指标。本研究仅选择镇痛、止呕两个指标,所得结论有一定局限性。

3 本研究跨学科地运用中药学、分析化学、数学、药理学和计算机技术研究传统的中药方剂,确定了复

方吴茱萸汤的药效物质基础和质量评价指标,为复方中药的质量标准化进行了有意义的尝试。

致谢 本课题部分经费由香港研究资助局资助。

## 参 考 文 献

- 1 陈耀祖. 中药复方化学研究策略之取议. 化学进展, 1999, 11: 188
- 2 李培生, 刘渡舟编. 汉·张仲景(著). 伤寒论. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 449 ~ 452
- 3 邱赛红, 窦昌贵. 吴茱萸温胃止呕作用的实验研究. 中药药理与临床, 1988, 4: 9
- 4 张明发, 陈光娟, 朱自平. 吴茱萸温中止痛药理研究. 中药材, 1991, 14: 39
- 5 陈奇主编. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 443 ~ 446
- 6 李仪奎主编. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 353 ~ 420
- 7 方开泰, 全辉, 陈庆文. 实用回归分析. 北京: 科学出版社, 1998. 204 ~ 249
- 8 罗旭编. 化学统计学基础. 辽宁: 辽宁人民出版社, 1985. 393 ~ 405
- 9 张毓汉. 促景用姜生干有别论. 浙江中医杂志, 1992, 27: 32

## METHODOLOGICAL STUDY ON THE MATERIAL BASIS FOR THE EFFICACY OF THE TRADITIONAL CHINESE MEDICINE WUZHUYU DECOCTION

Ning Lili, Bi Kaishun, Wang Rui, Che Zhentao<sup>1</sup>, Wang Xi and Luo Xu

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015;

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Hong Kong University of Science and Technology, School of Chinese Medicine, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong)

**ABSTRACT** **AIM:** To develop a method of ascertaining the material basis for the efficacy of the traditional Chinese medicine Wuzhuyu decoction. **METHODS:** Nine different combinations of Wuzhuyu decoction were prepared according to the orthoganol layout  $L_9(3^4)$ . Reversed phase HPLC analysis and analgesia and antiemesis experiments of the respective solutions were carried out. Stepwise regression analysis was adopted to estimate the relationship between the chemical and the pharmacological data. **RESULTS:** The material basis of the Wuzhuyu decoction was found to be produced chiefly by the chemical constituents contained in No.  $X_4$ ,  $X_9$  (rutaecarpine),  $X_{10}$  and  $X_{12}$  chromatographic peaks. **CONCLUSION:** The method can also be applied to the determination of the material basis of other traditional Chinese medicine recipes.

**KEY WORDS** Wuzhuyu decoction; analgesia; antiemesis; HPLC; stepwise regression analysis