

本文引用:李亚娜,徐萍,郝明华.均匀设计优选吴茱萸的半仿生提取法工艺条件[J].新乡医学院学报,2016,33(2):105-107,112. DOI:10.7683/xyxyxb.2016.02.006.

【基础研究】

均匀设计优选吴茱萸的半仿生提取法工艺条件

李亚娜, 徐 萍, 郝明华

(新乡医学院药学院,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 优选吴茱萸的半仿生提取法的最佳工艺条件。**方法** 以吴茱萸碱、总黄酮、挥发油、干浸膏的含量为指标,采用均匀设计优选其半仿生提取法的工艺条件。**结果** 优化条件为:3 煎用水酸碱度(pH)值依次为 6.00、6.50、9.00;煎煮时间依次为 188、95、47 min。**结论** 结合工业生产实际,确定其半仿生提取法工艺条件为:3 煎用水 pH 值依次为 6.00、6.50、9.00;煎煮时间依次为 3.0 h、1.5 h、40 min,吴茱萸半仿生提取法最佳工艺可行。

关键词: 吴茱萸;半仿生提取法;均匀设计;工艺条件

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2016)02-0105-04

Optimizing the best extraction condition of semi-bionic extraction for *evodia rutaecarpa benth* by uniform design

LI Ya-na, XU Ping, HAO Ming-hua

(School of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To optimize the best extraction of semi-bionic extraction for *evodia rutaecarpa benth*. **Methods** Evodiamine, total flavonoid, volatile oil and dry extract were taken as the indexes, and uniform design was used to optimize the best extraction of semi-bionic extraction for *evodia rutaecarpa benth*, the results were comprehensive considered to optimize the semi-bionic extraction conditions. **Results** The optimized technologic condition; the power of hydrogen (pH) values of the water for the first, second and third decoctions were in order of 6.00, 6.50 and 9.00, and the extraction time was 188 min, 95 min and 47 min respectively. **Conclusion** According to industry production condition, the best semi-bionic extraction technologic condition is; the pH values of the water for the three decoctions are in order of 6.00, 6.50, 9.00, and the extraction time was 3.0 h, 1.5 h and 40 min, respectively. The optimized extraction condition of the SBE for *Evodia rutaecarpa Benth* is reasonable.

Key words: *evodia rutaecarpa*(*Juss*) *benth*; semi-bionic extraction; uniform design; technologic condition

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸[*evodia rutaecarpa* (Juss.) benth]、石虎[*evodia rutaecarpa* (Juss.) benth. var. *officinails* (Dode) Huang]的干燥近成熟的果实^[1]。吴茱萸的主要成分有生物碱、苦味素、挥发油、萜类、黄酮、香豆精、甾体、木脂素等。吴茱萸饮片温中止痛力强,临床可用于厥阴头痛、寒疝腹痛、寒湿脚气、经行腹痛、脘腹胀痛、呕吐吞酸、五更泄泻等。吴茱萸中各种中药成分提取法按具体操作可分为浸渍法、渗漉法、热回流法、连续回流提取法、煎煮法及超声提取法。半仿生提取法是一种新的提

取方法,已用于桂枝甘草汤^[2]、甘草^[3]、菟丝子^[4]等的提取,吴茱萸应用半仿生提取法提取研究尚未见报道,为了对其进行系统研究,本研究用均匀设计法,选取吴茱萸碱、总黄酮、挥发油和干浸膏的含量为综合评价指标,优化其半仿生提取法工艺,为以后的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 吴茱萸(北京同仁堂亳州饮片有限责任公司),经新乡医学院药学院徐萍副教授鉴定为芸香科植物吴茱萸的干燥近成熟果实。吴茱萸碱对照品,批号:110802-200908(中国食品药品检定研究院);芦丁对照品,批号:100080-200707(中国食品药品检定研究院)。

1.2 主要仪器 TDL-5 离心机(上海安亭科学仪器厂),pHS-3C 精密酸碱度(power of hydrogen,pH)计(上海仪电科学仪器股份有限公司),UV-2550 紫外

DOI:10.7683/xyxyxb.2016.02.006

收稿日期:2015-10-12

基金项目:新乡医学院研究生科研创新支持计划项目(编号:500111)。

可见分光光度计(日本岛津公司),VARIAN Prostar-210 高效液相色谱仪(美国瓦里安公司)。

1.3 方法

1.3.1 确定考察因素与水平 在药材粒度、煎提方法、煎提温度、煎提用水量、滤过等相同条件下,确定考察因素与水平,见表 1。

1.3.2 均匀设计安排实验 选用 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 均匀设计拟水平表(中国航天总公司第三研究所提供),安排各因素水平进行实验,实验方案见表 2。

表 1 均匀设计因素与水平

Tab.1 Factors and levels of uniform design

因素	水平								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
第 1 煎水 pH 值	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00	4.50	5.00	5.50	6.00
第 2 煎水 pH 值	6.50	6.50	6.50	7.00	7.00	7.00	7.50	7.50	7.50
第 3 煎水 pH 值	8.00	8.00	8.00	8.50	8.50	8.50	9.00	9.00	9.00
3 煎总计时间/h	3.50	3.50	3.50	4.50	4.50	4.50	5.50	5.50	5.50

表 2 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 均匀设计拟水平表

Tab.2 $U_9(9^1 \times 3^3)$ quasi level of uniform design table

序号	第 1 煎水 pH 值	第 2 煎水 pH 值	第 3 煎水 pH 值	3 煎总计 时间/h
1	2.00	7.00	9.00	5.50
2	4.00	6.50	9.00	3.50
3	2.50	6.50	8.00	4.50
4	3.00	7.50	8.50	3.50
5	5.50	7.00	8.00	3.50
6	3.50	7.00	8.00	5.50
7	4.50	7.50	9.00	4.50
8	5.00	7.50	8.50	4.50
9	6.00	6.50	8.50	5.50

1.3.3 制备方法

1.3.3.1 提取物的制备 将吴茱萸药材粉碎,筛取 10~20 目的粗粉 50 g,双提法提取,加热回流提取 3 次,加水量依次为药材量的 10、8、8 倍,第 1 煎水 pH 值用 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸调至规定值,第 2、3 煎水 pH 值用 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调至规定值,水的 pH 值及提取时间按表 2 设定,提取液用 4 层纱布滤过,2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,并记录所得挥发油的体积。合并上清液,水浴浓缩至浸膏状,放入真空干燥箱真空干燥至恒重,得 1~9 号提取物粉末。

1.3.3.2 供试液的制备 吴茱萸碱供试液:精密称定 1.3.3.1 项下 1~9 号样品粉末 0.2 g,分别置于已编号的 100 mL 锥形瓶中,各精密加入体积分数 80% 乙醇 25 mL,静置浸泡 1 h,超声处理(功率 100 W,频率 40 kHz) 40 min,放冷,过滤。滤液旋蒸浓缩至 2~3 mL,转移至 10 mL 容量瓶中,用体积分数 80% 乙醇少量多次洗涤旋蒸瓶,洗涤液并入容量瓶中,并定容至 10 mL,摇匀,即得供测定吴茱萸碱含量的供试液 $A_{1\sim 9}$ 。

吴茱萸总黄酮供试液:精密称定 1.3.3.1 项下

1~9 号样品粉末 0.4 g,分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中,各加入约 90 mL 甲醇,浸泡 4 h,然后超声震荡提取 1 h,提取温度 40 $^{\circ}\text{C}$,取出放冷,过滤除去不溶物,滤液旋蒸浓缩至约 25 mL,转移至 50 mL 容量瓶中,用甲醇少量多次洗涤旋蒸瓶,洗涤液并入容量瓶中,并用甲醇定容至 50 mL,即得供测定吴茱萸中总黄酮含量的供试液 $B_{1\sim 9}$ 。

1.3.4 吴茱萸碱含量测定

1.3.4.1 色谱分析条件 参照文献[5-6]的方法。色谱柱: Biopearl-HC Column C_{18} 柱(4.6 mm \times 250.0 mm, 5 μm);检测波长: 225 nm;流动相: 乙腈-水-四氢呋喃-冰乙酸(50.0 : 49.0 : 0.8 : 0.2);流速: 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温: 室温;进样量: 20 μL 。

1.3.4.2 对照液的制备 精密称取吴茱萸碱对照品 4.1 mg,置于 250 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,制备吴茱萸碱对照品母液($0.0164\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.3.4.3 线性关系考察 精密称取吴茱萸碱对照品溶液 0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度。各取 20 μL 进样,测定峰面积,以进样液浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线。

1.3.4.4 样品中吴茱萸碱含量测定 取供试液 $A_{1\sim 9}$,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液 20 μL 进样。将峰面积带入标准曲线计算吴茱萸碱的含量。

1.3.5 总黄酮的含量测定

1.3.5.1 对照液的制备 参照文献[1]的方法精密称取 120 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥至恒重的芦丁对照品 2.5 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得浓度为 $0.25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品液。

1.3.5.2 线性关系考察 精密吸取芦丁对照品溶液 0.0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,各加水至 2.4 mL,加 72.46 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠溶液 0.4 mL,混匀,放置 6 min。加 26.66 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸铝溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min。加 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠试液 4 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,按照分光光度法在 500 nm 的波长处测定吸收度,将浓度对吸光度进行线性回归。

1.3.5.3 样品中总黄酮含量测定 精密量取 0.3 mL $B_{1\sim 9}$ 供试液分别置于 10 mL 容量瓶中,按绘制标准曲线项下“各加水至 2.4 mL”起,依次加入各溶液,在 500 nm 处测定吸光值,根据标准曲线计算总黄酮含量。

1.3.6 干浸膏含量测定 真空干燥箱中干燥的样品连续 2 次称量差小于或等于 0.01 g,则视为达到恒重,记录结果既为干浸膏含量。

1.3.7 挥发油含量测定 按《中国药典》2010 年版附录 XD 挥发油测定法(甲法)测定不同处理样品中挥发油的含量。

2 结果

2.1 吴茱萸碱的含量

2.1.1 高效液相色谱图 取 1.3.3 项下供试液 A_{1~9},按 1.3.4 项下色谱条件,依法测定吴茱萸对照品和供试液的出峰时间和峰面积,吴茱萸对照品于 12.355 min 时间出现单一峰,各供试液均在相同色谱条件下同一时间出峰,说明各提取物中含有吴茱萸碱,峰面积代表提取物中吴茱萸碱的含量。结果见图 1 和图 2。

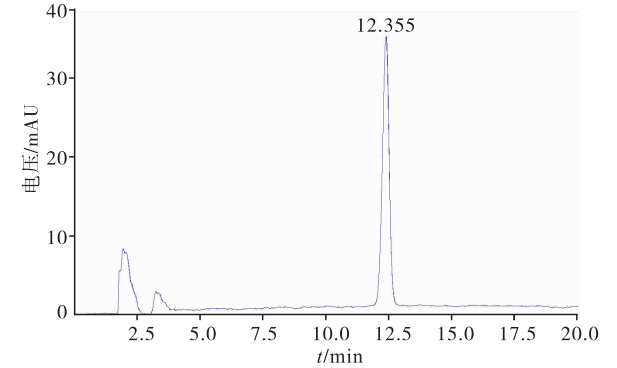


图1 吴茱萸碱对照品色谱图
Fig.1 Standard chromatogram of evodia rutaecarpa alkali

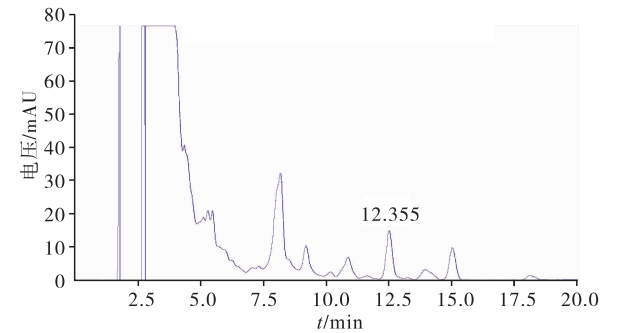


图2 吴茱萸供试液色谱图
Fig.2 Extraction liquid chromatogram of evodia rutaecarpa

2.1.2 线性关系考察 将浓度对峰面积进行线性回归,回归方程为: $Y = 390\ 790X + 1 \times 10^6$, $R = 0.999\ 9$ 。结果表明,吴茱萸碱在 0.82 ~ 13.12 μg 线性关系良好。

2.2 总黄酮含量测定线性关系 以吸收度为纵坐标,质量浓度($g \cdot L^{-1}$)为横坐标,绘制标准曲线,求得回归方程为: $Y = 10.589X + 0.007$, $R = 0.999\ 5$ 。结果表明,芦丁在 0.01 ~ 0.06 mg 线性关系良好。

2.3 各组提取物中吴茱萸碱、总黄酮、干浸膏和挥发油的含量 根据各指标成分测定方法测得各指标的量与吴茱萸原药材的比值,即得不同处理水平下的提

取物中各指标成分含量的百分比。结果见表 3。

表3 提取物中各指标成分的含量

Tab.3 Extract content of each index component				
序号	吴茱萸碱/%	总黄酮/%	挥发油量/%	干浸膏量/%
1	0.022 7	18.12	0.36	38.12
2	0.054 7	16.63	0.24	36.74
3	0.033 4	12.94	0.22	39.08
4	0.034 3	13.25	0.30	39.08
5	0.040 8	14.76	0.20	39.46
6	0.027 0	11.87	0.40	41.72
7	0.036 9	15.04	0.10	40.52
8	0.041 7	15.66	0.16	37.22
9	0.054 6	15.33	0.30	37.48

2.4 工艺条件的优化 以吴茱萸碱量、总黄酮量、挥发油量、干浸膏得率为指标,各指标数据按公式 $X'_{i,j} = (X_{i,j} - \bar{X}_j) / S_j$ 进行标准化处理(式中 $X'_{i,j}$ 为标准化后的值, $X_{i,j}$ 为样品液 i 中成分 j 的含量, \bar{X}_j 为各种样品液 i 中成分 j 的平均值, S_j 为成分 j 的标准偏差)。将标准化后的值根据各指标在工艺选择中的主次,给予不同的加权系数,确定综合评价 Y 值公式: $Y = (\text{吴茱萸碱} + \text{总黄酮} + \text{挥发油}) \times 7 + \text{干浸膏得率} \times 4$,求出综合评价 Y 值,结果见表 4。将表 2 的 4 个因素和表 4 中 Y 值进行二次回归处理,得方程 $Y = 3.329X_1 + 11.080X_2 - 0.037X_1X_2 - 3.073X_2X_4 - 4.250X_3X_4 + 0.234X_1^2 + 2.132X_3^2 + 7.110X_4^2 - 131.210$; Y 的期望值方向大者为佳,经综合分析,得出优化条件为: $X_1 = 6.0$, $X_2 = 6.5$, $X_3 = 9.0$, $X_4 = 5.5$ 。

表4 各指标成分含量的标准化处理结果

Tab.4 Standardized treatment results of each index component					
序号	吴茱萸碱/%	总黄酮/%	挥发油/%	干浸膏/%	Y
1	-1.438 3	1.697 1	1.146 0	-0.050 0	9.633 6
2	1.474 7	0.926 2	-0.104 2	-1.350 4	10.675 3
3	-0.464 3	-0.983 1	-0.312 6	0.112 5	-11.870 0
4	-0.382 3	-0.822 7	0.520 9	0.112 5	-4.338 7
5	0.209 4	-0.041 4	-0.520 9	0.350 1	-1.069 9
6	-1.046 9	-1.536 8	1.562 8	1.763 0	-0.094 3
7	-0.145 7	0.103 5	-1.562 8	1.012 8	-7.183 8
8	0.291 3	0.424 3	-0.937 7	-1.050 3	-5.755 9
9	1.465 6	0.253 5	0.520 9	-0.887 8	12.128 8

3 讨论

吴茱萸作为一种常用药用植物具有明显的药理活性,传统用药主要用于寒凝疼痛、胃寒呕吐和虚寒泄泻等,现代研究表明,吴茱萸具有良好的抗溃疡、保肝、镇痛、抗缺氧、抗菌、抗凝和抗血栓形成等作用,其主要活性成分为挥发油类、吴茱萸碱、吴茱萸内酯和黄酮类。

小鼠模型,外周毒性小,死亡率低,成功率高,可获得与人类 PD 患者类似的行为变化及病理学变化,本研究为研发治疗 PD 的药物和研究 PD 发病机制奠定了基础。

参考文献:

[1] DE LAU L M,BRETELER M M. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. *Lancet Neurol*,2006,5(6):525-535.

[2] 朱丰霞,常海敏,段琰,等. 人参皂苷 Rg1 对帕金森病小鼠黑质中酪氨酸羟化酶及 ephrinB2 和磷酸化 c-Jun 表达的影响[J]. *新乡医学院学报*,2014,31(10):781-785.

[3] ALLCOCK L M,KENNY R A,BUM D J. Clinical phenotype of subjects with Parkinson's disease and orthostatic hypotension; autonomic symptom and demographic comparison [J]. *Mov Disord*, 2006,21(11):1851-1855.

[4] WONG S L,GILMOUR H,RAMAGE-MORIN P L. Parkinson's disease: prevalence, diagnosis and impact[J]. *Health Rep*,2014,25(11):10-14.

[5] LEHRNER J,KOGLER S,LAMM C,et al. Awareness of memory deficits in subjective cognitive decline, mild cognitive impairment, Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. *Int Psychogeriatr*,2015,27(3):357-366.

[6] VON WRANGEL C,SCHWABE K,JOHN N,et al. The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: behavioral and electrophysiological findings[J]. *Behav Brain Res*,2015,279:52-61.

[7] TOY W A,PETZINGER G M,LEYSHON B J,et al. Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) mouse model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*,2013,63:201-209.

[8] WU F,XU H D,GUAN J J,et al. Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2014,284:900-911.

[9] YUAN Y H,YAN W F,SUN J D,et al. The molecular mechanism of rotenone-induced α -synuclein aggregation; emphasizing the role

of the calcium/GSK3 β pathway[J]. *Toxicol Lett*,2015,233(2):163-171.

[10] OLANOW C W,BRUNDIN P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder[J]. *Mov Disord*,2013,28(1):31-40.

[11] ORIMO S. Clinical and pathological study on early diagnosis of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies[J]. *Rinsho Shinkeigaku*,2008,48(1):11-24.

[12] 何莉. 老年帕金森病患者血浆同型半胱氨酸水平与认知障碍相关性分析[J]. *新乡医学院学报*,2014,31(6):432-434.

[13] CIUCCI M R,RUSSELL J A,SCHASER A J,et al. Tongue force and timing deficits in a rat model of Parkinson disease[J]. *Behav Brain Res*,2011,222(2):315-320.

[14] RUSSELL J A,CIUCCI M R,HAMMER M J,et al. Videofluorographic assessment of deglutitive behaviors in a rat model of aging and Parkinson disease[J]. *Dysphagia*,2013,28(1):95-104.

[15] JIANG C,WAN X,JANKOUIC J,et al. Dopaminergic properties and experimental anti-parkinsonian effects of IPX750 in rodent models of Parkinson disease[J]. *Clin Neuropharmacol*,2004,27(2):63-73.

[16] FAURE A,LEBLANC-VEYRAC P,MASSIOUI N. Dopamine agonists increase perseverative instrumental responses but do not restore habit formation in a rat model of Parkinsonism[J]. *Neuroscience*,2010,168(2):477-486.

[17] TANNER C M,KAMEL F,ROSS G W,et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease[J]. *Environ Health Perspect*,2011,119(6):866-872.

[18] CANNON J R,TAPIAS V,NA H M,et al. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*,2009,34(2):279-290.

[19] TAMILSELVAM K,BRAIDY N,MANIVASAGAM T,et al. Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*,2013,2013:102741.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)

(上接第 107 页)

本实验采用均匀设计法对吴茱萸半仿生提取法工艺条件进行优选,以吴茱萸碱含量、总黄酮、挥发油量、干浸膏得率为指标,并对 4 个指标的数据进行标准化处理,以消除各指标之间的单位和量纲的不同,以及各标准变量范围相差悬殊所造成的影响,其结果根据各指标在工艺选择中的主次,给予不同的加权系数,确定综合评价 Y 值,并优选出半仿生提取法最佳条件;3 煎用水 pH 值依次为 6.00、6.50、9.00;煎煮时间依次为 188、95、47 min。结合生产实际,确定吴茱萸用半仿生提取法提取的工艺条件为:3 煎用水 pH 值依次为 6.00、6.50、9.00,煎煮时间依次为 3.0 h、1.5 h、40 min。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:118,946.

[2] 张学兰,徐萍. 均匀设计优选桂枝甘草汤的半仿生提取工艺条件[J]. *中成药*,2006,28(8):1116-1119.

[3] 程艳芹,孙秀梅,张兆旺,等. 均匀设计优选甘草的半仿生提取工艺条件[J]. *中药材*,2007,30(5):598-601.

[4] 李春雨,郭晓伟,王树,等. 均匀设计优选菟丝子半仿生提取工艺[J]. *中国医院药学杂志*,2011,31(10):813-816.

[5] 王群,刘文,宋信莉,等. 多指标优化吴茱萸的提取纯化工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(3):45-47.

[6] 鲍天冬,董宇,杨庆,等. 高效液相色谱法同时测定吴茱萸及其提取物中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯含量[J]. *中国实验方剂学杂志*,2007,13(6):1-3.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)