

正交试验法优选疏毛吴茱萸提取工艺

张红梅¹, 王长虹^{1,2*}, 王峥涛^{1,2*}

1. 上海中医药大学中药学院 中药研究所 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203
2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201210

摘要: 目的 优选疏毛吴茱萸的提取工艺。方法 以柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱为定量指标成分, 采用 HPLC 法测定, 以浸膏得率和指标成分平均提取率为指标, 选择乙醇体积分数、提取时间、提取次数和粒度为考察因素, 选用 L₉(3⁴) 正交表安排试验。结果 疏毛吴茱萸最佳提取工艺为原药材以 10 倍量 80%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h。结论 优选的疏毛吴茱萸提取工艺合理可行, 为实际生产提供参考。

关键词: 疏毛吴茱萸; 柠檬苦素; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 提取工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2001-04

Optimized extraction process of *Euodia rutaecarpa* by orthogonal test

ZHANG Hong-mei¹, WANG Chang-hong^{1,2}, WANG Zheng-tao^{1,2}

1. The Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Ministry of Education, Institute of Chinese Materia Medica, College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
2. Shanghai R&D Centre for Standardization of Traditional Chinese Medicines, Shanghai 201210, China

Key words: *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang; limonin; evodiamine; rutaecarpine; extraction process; orthogonal test

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 和疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实^[1-3], 具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻之功效。文献报道常以吴茱萸碱和吴茱萸次碱为指标成分进行吴茱萸提取纯化工艺的优化^[4-8]。研究表明^[9-11], 吴茱萸中主要活性成分为生物碱和苦味素等, 其中生物碱类成分吴茱萸碱具有抗肿瘤、抗炎镇痛、降血压、增强心肌收缩力等作用, 吴茱萸次碱具有舒血管、降血压、抗癌、抗炎、抗溃疡等作用, 苦味素类成分柠檬苦素具有抗炎、镇痛等活性, 共同体现吴茱萸临床药理作用。本实验以柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱为指标成分, 采用 HPLC 法进行指标成分定量检测, 以浸膏得率和指标成分平均提取率为指标, 采用正交试验设计优选疏毛吴茱

萸提取工艺参数。

1 仪器与材料

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司)及 Rev.B.01.01 色谱工作站(惠普公司), 电子分析天平(德国 Sartorius 公司), KQ—250DB 数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), 数显恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司), DZF—6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。乙腈为色谱纯, 水为纯净水, 乙醇为国产分析纯。吴茱萸碱(批号 01-2009)和吴茱萸次碱(批号 01-2020)由上海中药标准化研究中心提供, 柠檬苦素为实验室自制, 质量分数均 > 98%。疏毛吴茱萸药材(批号分别为 2006092001、2006092002、2006092003)购于上海华宇药业有限公司, 由上海中药标准化研究中心检测部技术室吴立宏博士鉴定为疏毛吴茱萸 *Euodia rutaecarpa*

收稿日期: 2011-01-29

基金项目: 上海市科学技术委员会科研项目资助课题(04DZ19851)

作者简介: 张红梅(1978—), 女, 博士, 讲师, 主要从事中药活性成分与质量标准研究。Tel: (021)51322203 E-mail: naturecolor@163.com

*通讯作者 王长虹 Tel: (021)51322511 E-mail: wchcxm@hotmail.com

王峥涛 Tel: (021)51322507 E-mail: wangzht@hotmail.com

(Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实, 凭证标本存放于上海中药标准化研究中心标本室。

2 方法与结果

2.1 柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Lichrospher-RP₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为乙腈-水 (46:54), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 225 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品 54.5、7.98、4.64 mg 置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇超声溶解稀释并定容, 即得 545.0、79.8、46.4 μg/mL 混合对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密移取混合对照品溶液 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 依次对半稀释, 重复操作 6 次, 摇匀, 分别进样测定。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归分析。回归方程分别为: 柠檬苦素 $Y=2.0133X+1.5619$ ($r=1.0000$), 吴茱萸碱 $Y=89.207X+5.1675$ ($r=1.0000$), 吴茱萸次碱 $Y=20.918X+0.2581$ ($r=0.9999$); 结果表明柠檬苦素在 10.9~545.0 μg/mL、吴茱萸碱在 1.3~79.8 μg/mL、吴茱萸次碱在 0.7~46.4 μg/mL 与峰面积的线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 精密吸取柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱质量浓度分别为 68.1、2.5、2.9 μg/mL 的混合对照品溶液 20 μL, 按上述色谱条件连续重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果三者峰面积的 RSD 分别为 0.98%、1.32%、2.29%; 连续测定 4 d, 三者峰面积的 RSD 分别为 0.77%、0.77%、2.63%。

2.1.5 稳定性试验 取批号为 2006092001 药材的提取物样品, 制备供试品溶液, 分别于室温下静置 0、1、2、4、8、12、24 h 后测定, 结果柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 1.71%、1.72%、2.23%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.6 重现性试验 取批号为 2006092001 药材的提取物样品, 制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 结果柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱质量分数的 RSD 分别为 1.17%、2.08%、2.82%。

2.1.7 加样回收率试验 取批号为 2006092001 药材的提取物样品 9 份, 各约 0.1 g (含柠檬苦素 4.24 mg、吴茱萸碱 0.14 mg、吴茱萸次碱 0.14 mg), 精密称定, 每 3 份分别按 80% (含柠檬苦素 3.41 mg、

吴茱萸碱 0.11 mg、吴茱萸次碱 0.11 mg)、100% (含柠檬苦素 4.24 mg、吴茱萸碱 0.14 mg、吴茱萸次碱 0.14 mg) 和 120% (含柠檬苦素 5.09 mg、吴茱萸碱 0.17 mg、吴茱萸次碱 0.17 mg) 3 个水平精密加入混合对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率。结果柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的平均加样回收率分别为 99.8%、97.9%、99.0%, RSD 分别为 2.12%、2.27%、3.06%。

2.1.8 疏毛吴茱萸药材中柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的测定 取疏毛吴茱萸药材粉末 (过 3 号筛) 约 0.1 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞三角瓶中, 加 80%乙醇约 40 mL, 称定质量, 浸泡 1 h, 超声提取 20 min, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10 μL 进样分析。结果测得药材中柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的平均质量分数分别为 1.93%、0.06%、0.06%, RSD 分别为 1.43%、1.05%、2.05%。

2.1.9 各试验产物中柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的测定 精密称取各试验所得干浸膏约 0.2 g, 置 100 mL 量瓶中, 加 80%乙醇超声溶解, 冷却至室温后定容。精密移取 2 mL 至 10 mL 量瓶中, 加 80%乙醇定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液按上述色谱条件进样 20 μL, 连续重复进样 3 次, 测定峰面积, 取平均值, 根据各回归方程计算柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的质量分数。

2.2 干浸膏得率的测定

取各试验所得的浸膏约 2 g, 精密称定, 水浴蒸干后, 于 105 °C 干燥 5 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 再于 105 °C 干燥 1 h, 冷却称定质量, 至两次质量的差异不超过 0.3 mg 为止记录干浸膏质量, 计算干浸膏得率。

2.3 提取工艺的优选

2.3.1 因素水平的选择 吴茱萸活性成分以脂溶性为主, 根据预试验结果选择乙醇为提取溶剂。为了对影响提取效果的乙醇体积分数 (A)、提取时间 (B)、提取次数 (C) 和粒度 (D) 进行优选, 选择活性成分柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱为定量指标成分, 以干浸膏得率和指标成分平均提取率为评价指标, 选用 L₉(3⁴) 正交表进行试验。

2.3.2 正交试验设计与结果分析 精密称取疏毛吴茱萸药材约 50 g, 采用回流提取法, 按正交表条件进行试验, 提取后回收溶剂并将提取物在 60 °C 下减压真空干燥至恒定质量, 记录浸膏量。依次测得

每组干浸膏得率及每组浸膏中柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱提取率（提取率=干浸膏中指标成分

质量/药材中指标成分质量），结果见表 1。以极差最小的因素作为误差项进行方差分析，结果见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果 ($n=3$)
Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test ($n=3$)

试验号	A/%	B/h	C/次	D	浸膏得率/%	提取率/%			平均提取率/%
						柠檬苦素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	
1	60% (1)	1 (1)	1 (1)	原药材 (1)	31.54	76.62	76.04	79.94	77.53
2	60% (1)	1.5 (2)	2 (2)	粗粉 (2)	45.39	84.81	88.73	76.35	83.30
3	60% (1)	2 (3)	3 (3)	中粉 (3)	49.35	90.45	95.05	93.11	92.87
4	70% (2)	1 (1)	2 (2)	中粉 (3)	43.79	77.95	99.00	91.03	89.33
5	70% (2)	1.5 (2)	3 (3)	原药材 (1)	41.96	77.50	97.73	99.27	91.50
6	70% (2)	2 (3)	1 (1)	粗粉 (2)	36.24	81.24	83.04	71.18	78.49
7	80% (3)	1 (1)	3 (3)	粗粉 (2)	39.17	91.04	95.60	95.93	94.19
8	80% (3)	1.5 (2)	1 (1)	中粉 (3)	31.60	88.46	96.00	79.36	87.94
9	80% (3)	2 (3)	2 (2)	原药材 (1)	36.26	76.78	99.09	90.80	88.89
K_1	42.093	38.167	33.127	36.587					
K_2	40.663	39.650	41.813	40.267					
K_3	35.677	40.617	43.493	41.580					
R_K	6.416	2.450	10.366	4.993					
J_1	84.567	87.017	81.320	85.973					
J_2	86.440	87.580	87.173	85.327					
J_3	90.340	86.750	92.853	90.047					
R_J	5.773	0.830	11.533	4.720					

表 2 方差分析结果
Table 2 Analysis of variance

名称	方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
浸膏得率	A	68.085	2	7.452	
	B (误差)	9.137	2	1.000	
	C	185.748	2	20.329	$P<0.05$
	D	40.201	2	4.400	
平均提取率	A	52.051	2	48.330	$P<0.05$
	B (误差)	1.077	2	1.000	
	C	199.542	2	185.276	$P<0.01$
	D	39.289	2	36.480	$P<0.05$

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

由直观分析结果可见，各因素对浸膏得率的影响效果顺序为 $C>A>D>B$ ，优选水平组合为 $A_1B_3C_3D_3$ ；对指标成分平均提取率的影响效果顺序亦为 $C>A>D>B$ ，优选水平组合为 $A_3B_2C_3D_3$ 。方差分析结果表明，因素 C 对浸膏得率影响显著 ($P<0.05$)；因素 C 对柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸

次碱的平均提取率具有极显著影响 ($P<0.01$)，因素 A、D 则具有显著影响 ($P<0.05$)；因素 B 对浸膏得率和指标成分平均提取率均无显著影响。综合以上分析，最佳提取工艺为 $A_3B_1C_3D_3$ 。为便于大规模实际生产，减少操作步骤，提高生产效率，节约能源，将粒度因素改为原药材（果实直径 $<5\text{ mm}$ ），优选最佳提取工艺为 $A_3B_1C_3D_1$ ，即吴茱萸原药材以 10 倍量 80%乙醇提取 3 次，每次 1 h。

2.4 验证试验

取疏毛吴茱萸药材约 500 g，共 3 批，批号分别为 2006092001、2006092002、2006092003，按最佳提取工艺进行放大试验，各批次的浸膏得率分别为 33.52%、33.66%、33.38%，柠檬苦素提取率分别为 73.19%、73.06%、74.17%，吴茱萸碱提取率分别为 79.65%、81.60%、78.81%，吴茱萸次碱提取率分别为 79.70%、77.23%、74.33%，平均提取率分别为 77.51%、77.30%、75.77%。

3 讨论

《中国药典》2010 年版一部中吴茱萸定量测定

项下所用流动相为乙腈-水-四氢呋喃-冰醋酸(41:59:1:0.2),本实验进行柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱 HPLC 分析方法优化时,简化流动相组成为乙腈-水(46:54),且分离度及理论塔板数等色谱参数均符合《中国药典》要求,为吴茱萸及相关产品的质量分析提供了优化方法。

本实验根据文献报道^[2-5]及实际生产情况,选择乙醇和水为提取溶剂,考察溶剂种类对疏毛吴茱萸有效成分的提取率。结果用乙醇提取时,柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱有一定程度的溶出;而以水为提取溶剂时3种有效成分均没有被检出,表明乙醇比水对疏毛吴茱萸中有效成分的提取率高,故选择乙醇为提取溶剂。

本实验选择吴茱萸中主要有效成分柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱为指标成分进行定量检测,以浸膏得率和指标成分平均提取率为指标,采用正交试验设计优选疏毛吴茱萸提取工艺,为疏毛吴茱萸提取物实际生产提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] Yang X W, Teng J, Zhao B, *et al.* Studies on absorption and transport of limoninoids from *Fructus Evodiae* in Caco-2 cell monolayer model [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 53-58.
- [3] 滕杰,杨秀伟,陶海燕,等.疏毛吴茱萸果实挥发油成分的气-质联用分析[J].*中草药*, 2003, 34(6): 504-505.
- [4] 王晖,张丽艳,杨卫平,等.正交实验法优化疏毛吴茱萸提取工艺[J].*中国民族民间医药*, 2010, 19(23): 52-53.
- [5] 娄方明,黄燮南,钱静.微波提取吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的工艺研究[J].*遵义医学院学报*, 2009, 32(6): 599-602.
- [6] 张丽艳,杨玉琴,刘毅,等.吴茱萸降压颗粒提取工艺研究[J].*中国中药杂志*, 2008, 33(7): 828-831.
- [7] 周锦珂,曾荣华,李金华,等.吴茱萸药材中吴茱萸碱及吴茱萸次碱的超声提取中试研究[J].*中药材*, 2008, 31(8): 1247-1248.
- [8] 许海玉,刘莹,张铁军,等.氧化铝柱纯化吴茱萸提取液中总生物碱和柠檬苦素的研究[J].*中草药*, 2010, 41(5): 741-744.
- [9] 黄伟,孙蓉,鲍志焯,等.与功效和毒性相关的吴茱萸化学成分研究进展[J].*中国药物警戒*, 2010, 7(8): 482-485.
- [10] 郭惠,杨云云,王昌利.吴茱萸碱药理研究进展[J].*陕西中医*, 2010, 31(12): 1685-1686.
- [11] 杨云云,郭惠,王昌利.吴茱萸生物碱及其主要成分吴茱萸次碱药理研究进展[J].*中药药理与临床*, 2010, 26(5): 182-183.