

响应面分析法优化吴茱萸中去氢吴茱萸碱的提取工艺

邹骏^{1,2}, 杨家强^{1*}

(1. 遵义医学院药学院, 贵州 遵义 563003; 2. 贵州省骨科医院药剂科, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 通过响应面分析法对吴茱萸中去氢吴茱萸碱的提取工艺进行优化。方法: 以去氢吴茱萸碱提取率为指标, 采用单因素试验和响应面分析法考察药材粉碎度、液料比、乙醇体积分数、提取时间对去氢吴茱萸碱提取率的影响。结果: 最佳提取工艺条件为粉碎度 90 目, 加 18.73 倍量 65.22% 乙醇提取 0.82 h, 去氢吴茱萸碱提取率达 6.97 mg·g⁻¹。结论: 采用响应面分析法优化吴茱萸中去氢吴茱萸碱提取条件是合理可行的, 为吴茱萸的质量控制提供实验依据。

[关键词] 吴茱萸; 去氢吴茱萸碱; 响应面分析法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0059-03

[doi] 10.11653/syjf2013140059

Optimization of Extraction Technology of Dehydroevodiamine from *Evodia rutaecarpa* by Response Surface Methodology

ZOU Tao^{1,2}, YANG Jia-qiang^{1*}

(1. Pharmacy School of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China;

2. Department of Pharmacy, Guizhou Provincial Hospital of Orthopedics, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of dehydroevodiamine (DHED) from *Evodia rutaecarpa* by response surface methodology. **Method:** With yield of DHED as index, single factor tests and response surface methodology were adopted to investigate effect of crushed mesh of drugs, solid-liquid ratio, the concentration of alcohol and extraction time on yield of DHED. **Result:** Optimum extraction technology of DHED was as following: crushed degree of *E. rutaecarpa* 90 mesh, extracted 0.82 h with 18.73 times the amount of 65.22% ethanol, and yield of DHED was up to 6.97 mg·g⁻¹. **Conclusion:** It was feasible to optimize extraction technology of DHED from *E. rutaecarpa* by response surface methodology, it could provide basis for quality control of *E. rutaecarpa*.

[Key words] *Evodia rutaecarpa*; dehydroevodiamine; response surface methodology

吴茱萸始载于《神农本草经》, 具有散寒止痛、降逆止呕、降压等功能^[1-2]。国内外研究发现, 其化学成分之一的去氢吴茱萸碱具有较强的体外抗乙酰胆碱酯酶^[3-4]及修复脑细胞治疗中风^[5]等作用。近年来, 去氢吴茱萸碱在治疗老年痴呆症与中风的前景受到人们密切关注, 但有关吴茱萸中去氢吴茱萸提取工艺的研究还未见报道。响应面分析法是一种

优化工艺条件的有效方法, 可用于确定各因素及其交互作用在工艺中对指标(响应值)的影响, 精确地表达因素和响应值间的关系^[6-7]。该法常用于同时存在多因素的试验优化上, 具有使用简单、精密度高、预测性好等优点^[8], 已被广泛应用于医药、生物、食品、农业等领域^[9-10]。本实验以去氢吴茱萸碱提取率为指标, 通过单因素试验基础考察乙醇体积分数、提取时间、原料目数、溶剂倍数对提取工艺的影响, 利用响应面分析法优化工艺参数, 为吴茱萸的开发利用提供实验依据。

1 材料

PB203-E 型电子分析天平 (Mettler-Toledo),

[收稿日期] 20130118(006)

[第一作者] 邹骏, 中级研究员, 从事天然产物及制剂学研究, Tel: 13595282620, E-mail: liyangfly@sohu.com

[通讯作者] * 杨家强, 副教授, 从事药物化学研究, Tel: 0852-8609461, E-mail: yjqzmc@163.com

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(安捷伦公司),WF-30B 型高效万能粉碎机(常州迈步),标准检验筛(上海多阳)。

吴茱萸购于贵阳药材市场,经贵州省骨科医院黄剑锋副主任药师鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth 的干燥近成熟果实。去氢吴茱萸碱对照品(购自上海凯博生化试剂有限公司,批号 BZP0728),甲醇、乙醇为工业级经重蒸使用,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 去氢吴茱萸碱的提取及测定 采用 HPLC,精密称取去氢吴茱萸碱对照品 30 mg,置于 50mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,用甲醇将其稀释为质量浓度分别为 0.12,0.24,0.36,0.48,0.60 g·L⁻¹ 的系列对照品溶液,各进样 10 μL,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 28\ 334X - 101.61$ ($R^2 = 0.999\ 7$),线性范围 0.12 ~ 0.60 mg。将吴茱萸于粉碎机中粉碎,依次过 40,60,80,120 目标准检验筛,加乙醇于室温下浸提,浓缩,干燥,采用标准曲线法测定提取液中去氢吴茱萸碱含量。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 药材粒度 分别取未粉碎、过 20,40,80,120 目标准筛样品 1.00 g 于圆底烧瓶中,加 20 倍量 70% 乙醇于室温下浸提 1 h,结果去氢吴茱萸碱提取率分别为 5.8,6.0,6.2,6.7,6.5 mg·g⁻¹。

2.2.2 乙醇体积分数 取过 80 目标准筛样品 1.00 g,分别用 20 倍量体积分数为 50%,60%,70%,80%,90% 的乙醇溶液提取 1 h,结果去氢吴茱萸碱提取率分别为 5.5,5.2,5.8,4.6,3.5 mg·g⁻¹。

2.2.3 料液比 取 80 目样品 1.00 g,分别用 10,15,20,25,30,40 倍量 70% 乙醇提取 1 h,结果去氢吴茱萸碱提取率分别为 3.9,4.1,4.7,4.5,4.0,3.7 mg·g⁻¹。

2.2.4 提取时间 取过 80 目标准筛样品 1.00 g,加 20 倍量 70% 乙醇分别提取 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h,结果去氢吴茱萸碱提取率分别为 5.1,5.6,5.5,5.2,4.9 mg·g⁻¹。

2.3 响应面试验优化

2.3.1 Box-Behnken 试验设计 在单因素试验基础上,选择粉碎度,液料比,提取时间,乙醇体积分数为考察因素,以去氢吴茱萸提取率为响应值,采用四因素三水平的响应曲面法试验进行提取工艺优化因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

2.3.2 建立模型及方差分析 通过 Design Expert 软件对上述试验结果进行多元回归拟合,得回归方

程 $Y = 7.01 + 0.28X_1 - 0.32X_2 - 0.34X_3 - 0.085X_4 - 0.21X_1^2 - 0.50X_2^2 - 0.53X_3^2 - 0.43X_4^2 + 0.40X_1X_2 + 0.29X_1X_3 - 0.28X_1X_4 + 0.085X_2X_3 + 0.21X_2X_4 + 0.36X_3X_4$,其方差分析见表 3。结果显示,去氢吴茱萸碱提取模型的 $P < 0.05$,说明该回归模型是显著的,用该模型来分析各因素对提取工艺的影响是合理的。各因素对去氢吴茱萸碱提取率的影响顺序依次为提取时间 > 液料比 > 粉碎度 > 乙醇体积分数。

表 1 吴茱萸中去氢吴茱萸碱的提取工艺优选响应面试验因素水平

水平	X_1 粉碎度 /目	X_2 液料比	X_3 提取时间 /h	X_4 乙醇体积 分数%
-1	60	15:1	0.5	60
0	80	20:1	1.0	70
1	100	25:1	1.5	80

表 2 吴茱萸中去氢吴茱萸碱的提取工艺优选响应面试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	去氢吴茱萸 提取率/mg·g ⁻¹
1	0	0	1	-1	6.03
2	1	1	0	0	7.03
3	-1	0	-1	0	6.90
4	0	0	-1	-1	6.53
5	-1	-1	0	0	6.60
6	0	-1	0	-1	6.41
7	1	0	1	0	6.20
8	0	1	-1	0	5.69
9	0	0	0	0	7.11
10	0	0	0	0	7.02
11	0	0	0	0	7.06
12	0	-1	1	0	5.89
13	0	1	0	1	6.15
14	0	1	0	-1	5.96
15	-1	0	0	-1	6.10
16	0	-1	-1	0	6.97
17	1	0	0	1	5.86
18	1	0	-1	0	6.99
19	0	-1	0	1	5.76
20	0	0	-1	1	5.59
21	-1	1	0	0	5.01
22	1	-1	0	0	7.03
23	0	0	0	0	6.67
24	0	0	1	1	6.52
25	0	0	0	0	7.20
26	-1	0	1	0	4.96
27	-1	0	0	1	6.61
28	0	1	1	0	4.95
29	1	0	0	-1	6.48

表3 提取工艺回归模型的方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	9.11	14	0.65	2.73	0.035 0
X_1	0.97	1	0.97	4.07	0.043 3
X_2	1.25	1	1.25	5.24	0.038 1
X_3	1.41	1	1.41	5.94	0.028 7
X_4	0.087	1	0.087	0.36	0.555 9
X_1^2	0.29	1	0.29	1.21	0.290 3
X_2^2	1.63	1	1.63	6.83	0.020 5
X_3^2	1.82	1	1.82	7.63	0.015 3
X_4^2	1.21	1	1.21	5.08	0.040 8
X_1X_2	0.63	1	0.63	2.65	0.125 6
X_1X_3	0.33	1	0.33	1.39	0.258 3
X_1X_4	0.32	1	0.32	1.34	0.266 3
X_2X_3	0.029	1	0.029	0.12	0.732 7
X_2X_4	0.18	1	0.18	0.74	0.403 9
X_3X_4	0.51	1	0.51	2.15	0.164 9

2.3.3 验证试验 根据所得模型,可预测在稳定状态下提取量的最大值 = 7.012,对应的粉碎度 90 目,液料比 18.73:1,提取时间 0.82 h,乙醇体积分数 65.22%。按该提取工艺条件进行 3 次平行试验,结果测得去氢吴茱萸碱平均提取率 6.97 mg·g⁻¹,与理论预测值的相对误差 0.63%,说明该条件可靠。

3 讨论

吴茱萸含有的吴茱萸碱、吴茱萸次碱和去氢吴茱萸碱均属于吲哚类生物碱,在结构上有一定相似性,很容易发生转化,因此提取时间不宜过长,以保证产品的质量与得率;去氢吴茱萸碱的乙醇提取液中含有多种杂质成分,如脂质、鞣质等,除去这些杂质的方法不当也会影响产品得率。本实验通过调整溶剂及合理液料比以除去这类淀粉杂质,同时部分鞣质也会被除掉。为提高去氢吴茱萸碱提取率,提取液可用石油醚、乙酸乙酯等萃取,以除去油脂、蜡等杂质。

[参考文献]

[1] 宋亚芳,张启伟,龚慕辛,等. 吴茱萸化学成分分析方法研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(4):82.

[2] 杨志欣,孟永海,王秋红,等. 吴茱萸苦味拆分组物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):74.

[3] Park C H, Lee Y J, Lee S H, et al. Dehydroevodiamine HCl prevents impairment of learning and memory and neuronal loss in rat models of cognitive disturbance[J]. J Neurochem,2000,74(1):244.

[4] PENG J H, ZHANG C E, WEI W, et al. Dehydroevodiamine attenuates hyperphosphorylation and spatial memory deficit induced by activation of glycogen synthase kinase-3 in rats [J]. Neuropharmacology,2007,52(7):1521.

[5] 张常娥,王晓丽,赵灿国,等. 去氢吴茱萸碱对 D-半乳糖大鼠学习记忆障碍的预防作用及其机制[J]. 广东医学,2012,33(16):2395.

[6] 赵选民. 试验设计方法[M]. 北京:科技出版社,2006:191.

[7] Ferreira S L C, Bezerra M A, Santosw N L, et al. Application of doehlert designs for optimisation of an online preconcentration system for copper determination by flame atomicabsorption spectrometry [J]. Talanta,2003,61(3):295.

[8] 崔清华,王莹,侯林,等. 响应面分析法优选石菖蒲挥发油提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):62.

[9] 彭晓霞,路莎莎. 响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):296.

[10] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报,2001,22(3):91.

[责任编辑 仝燕]