

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)12-0062-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.12.015



正交试验优选吴茱萸汤提取工艺*

安中原, 陈育煌[△], 余 巧, 申 茹, 毛一中

(惠州卫生职业技术学院·广东省惠州市药用植物研究与开发重点实验室, 广东 惠州 516025)

摘要:目的 优选吴茱萸汤的提取工艺。方法 以乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量的综合评分为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选最佳提取工艺, 并验证。结果 最佳提取工艺为加 70% 乙醇, 料液比为 1:20 (m/V), 提取 2 次, 每次 0.5 h。结论 该提取工艺稳定、可行, 可为吴茱萸汤的开发提供参考。

关键词: 吴茱萸汤; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 正交试验; 提取工艺

Optimization of Extraction Process of Wuzhuyu Decoction by Orthogonal Test

AN Zhongyuan, CHEN Yuhuang, YU Qiao, SHEN Ru, MAO Yizhong

(Huizhou Health Sciences Polytechnic · Huizhou Key Laboratory of Medicinal Plant Research and Development, Huizhou, Guangdong, China 516025)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Wuzhuyu Decoction. **Methods** The extraction process was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with ethanol volume fraction, solid-liquid ratio, extraction time and extraction times as the investigation factors, and with the comprehensive score of evodiamine and rutaecarpine contents as the evaluation index, and the verification test was conducted. **Results** The optimal extraction processes were as follows: adding 70% ethanol, the solid-liquid ratio was 1:20 (m/V),

*基金项目: 广东省惠州市医疗卫生类科技计划项目[2020Y170]。

第一作者: 安中原, 男, 硕士, 讲师, 研究方向为中药新剂型, (电子信箱)pleasean@163.com。

[△]通信作者: 陈育煌, 女, 大学本科, 教授, 研究方向为临床药学, (电子信箱)2294518497@qq.com。

本研究中采用了多种神经网络进一步对正交试验所得最优提取参数进行优化, 并最后选择 GA-BP 神经网络对制剂中的提取参数进行优化和设计, 通过模仿大脑的神经网络行为特点对数据进行处理, 其利用实测数据对试验过程进行模拟, 减少人为因素造成的分析偏差, 可弥补正交试验的一些缺陷。通过该方法的预测和验证, 可减少制剂的开发成本, 尤其是节省工艺验证成本。但神经网络算法的应用与选择有待进一步研究。

参考文献

- [1] GE Y, LI J, JIANG WW, et al. A spintronic memristive circuit on the optimized RBF-MLP neural network[J]. Chin Phys B, 2022, 31: 110702.
- [2] KUMAR V, KUMAR A, CHHABRA D, et al. Improved biobleaching of mixed hardwood pulp and process optimization using novel GA-ANN and GA-ANFIS hybrid statistical tools[J]. Bioresour Technol, 2019, 271: 274-282.
- [3] 吴婷婷, 余自成. 人工神经网络技术在药学领域应用的研究进展[J]. 中国临床药学杂志, 2021, 30(1): 72-76.
- [4] RENGANATHAN V. Overview of artificial neural network models in the biomedical domain[J]. Bratisl Lek Listy, 2019, 120(7): 536-540.
- [5] 张 驰, 郭 媛, 黎 明. 人工神经网络模型发展及应用综述[J]. 计算机工程与应用, 2021, 57(11): 57-69.
- [6] 付姝菲, 刘宏艳, 任海燕, 等. BP 神经网络在中医药研究领域中的应用[J]. 医学信息, 2021, 34(12): 12-14.
- [7] 马建春, 马灶亮, 张昊亮, 等. 补阳还五汤提取工艺的响应

面法和人工神经网络模型优化[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 337-340.

- [8] KUMAR A, PATHAK AK, GURIA C. NPK-10: 26: 26 complex fertilizer assisted optimal cultivation of Dunaliella tertiolecta using response surface methodology and genetic algorithm[J]. Bioresource Technology, 2015, 194: 117-129.
- [9] 张曦予, 李锐定, 莫明规, 等. 基于人工神经网络耦联遗传算法(BP-GA)优化干酪乳杆菌 LTL1361 冻干保护剂配方[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 175-184.
- [10] 刘李梅, 彭 伟, 涂 禾, 等. BP 神经网络结合正交试验优化解毒止血颗粒的提取工艺[J]. 世界中医药, 2019, 14(11): 2870-2874.
- [11] 邹慧琴, 李 硕, 陶 欧, 等. RBF 神经网络在中医药领域中的应用及其在 SPSS 17.0 软件中的实现[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(2): 336-338.
- [12] HADJER S. 一类非线性系统基于多层感知神经网络观测器的 RBF 神经网络终端滑模控制器设计[D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [13] 赵海宁, 王亚静, 商利娜, 等. 基于 PCA-RBF 神经网络的中药片剂物料属性-抗张强度预测模型的研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5390-5397.
- [14] 王 强, 冯玲然, 余晓斌. 基于 BP 神经网络和遗传算法优化番茄红素发酵培养基[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(2): 111-119.
- [15] 王 煜. 基于大数据的卒中影响因素及风险预测模型研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2019.

(收稿日期: 2022-12-06; 修回日期: 2023-01-26)

and extracting twice, each time for 0.5 h. **Conclusion** The extraction process is stable and feasible, which can provide a reference for the development of Wuzhuyu Decoction.

Key words: Wuzhuyu Decoction; evodiamine; rutecarpine; orthogonal test; extraction process

吴茱萸汤出自东汉张仲景的《伤寒论》，由吴茱萸、生姜、人参和大枣组方，具有暖肝温胃、降逆止呕功效^[1]。该方可改善机体脾胃虚寒或肝经寒气上逆，具有止呕、抗消化道溃疡、镇痛、镇静等作用^[2-5]，临床广泛用于胃炎、胃痛、胃食管反流、呕吐等消化系统疾病的治疗^[6-9]。将吴茱萸汤开发成胃内漂浮片，可避免煎剂使用不便、不易携带和储存等缺点，还能延长药物在胃内停留和释放的时间，提高其生物利用度。吴茱萸碱和吴茱萸次碱是吴茱萸汤的活性成分^[10]，可作为其质量控制指标。为使处方药材中活性成分提取最大化，本研究中采用正交试验法，以乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数为考察因素，以吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量的综合得分为评价指标，优化吴茱萸汤的提取工艺，为其胃内漂浮片的制备提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); FA2004N 型电子天平(上海菁海仪器有限公司, 精度为 0.1 mg); JA3003 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司, 精度为 1 mg); KQ-500VSM 型双频静音型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); B-220 型恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂); Direct-PureRO 10 型纯水仪(上海乐枫生物科技有限公司)。

1.2 试剂

吴茱萸碱对照品(批号分别为 BWB50890 和 210818)、吴茱萸次碱对照品(批号分别为 BWB50892 和 211017)，均购自北京世纪奥科生物技术有限公司，含量均大于 98%；乙腈、甲醇均为色谱纯，磷酸、乙醇均为分析纯，水为超纯水。吴茱萸(批号为 201101)、人参(批号为 20210405)、大枣(批号为 210301)分别产于广西、辽宁、新疆，均购自惠州市百姓大药房医药连锁有限公司，生姜(沃尔玛 < 广东 > 商业零售有限公司港惠新天地店 < 惠州 >，批号为 202108)，经惠州卫生职业技术学院毛一中教授鉴定均为正品。

2 方法与结果

2.1 吴茱萸碱与吴茱萸次碱含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Thermo ODS-2 Hypersil 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-0.1% 磷酸水溶液(30:32:38, V/V/V); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 225 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.1.2 溶液制备

混合对照品溶液: 分别取吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品 0.009 9, 0.011 2 g, 精密称定, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得混合对照品贮备液, 精密吸取 2 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

供试品溶液: 按吴茱萸汤处方及工艺取药材饮片样品(吴茱萸 9 g、生姜 18 g、人参 9 g、大枣 12 枚), 精密称定。吴茱萸和人参药材饮片样品粉碎, 过 2 号筛; 生姜和大枣(去核)切碎, 加入 70% 乙醇(1:20, m/V, 下同)回流提取 2 次, 每次 0.5 h, 合并滤液, 置 3 000 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

阴性对照品溶液: 按吴茱萸汤处方及工艺制备缺吴茱萸的阴性样品, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

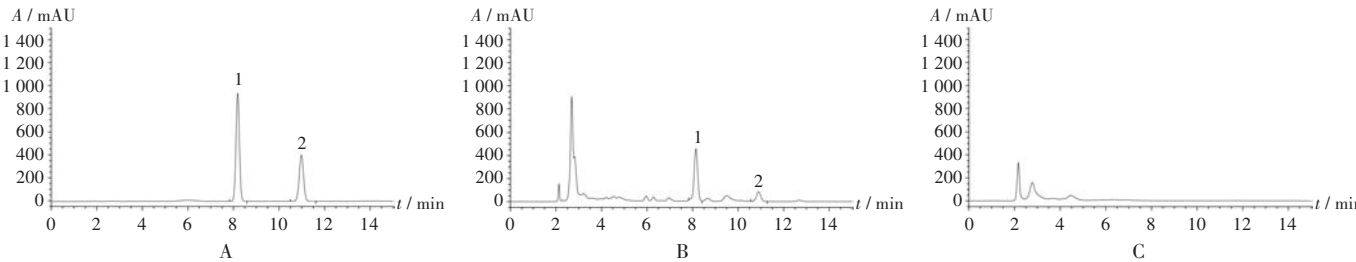
2.1.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.1.2 项下 3 种溶液各适量, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液色谱在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰且分离度高, 阴性对照无干扰。详见图 1。

线性关系考察: 分别精密吸取吴茱萸碱及吴茱萸次碱对照品溶液各适量, 用甲醇稀释成质量浓度分别为 7.9, 9.9, 19.8, 39.6, 79.2, 198 μg/mL 和 3.58, 4.48, 11.2, 22.4, 44.8, 89.6 μg/mL 的系列对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积(Y)为纵坐标、待测成分质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归, 得吴茱萸碱回归方程 $Y_1 = 69.835X_1 - 0.8287$ ($R^2 = 0.9999, n = 6$) 和吴茱萸次碱回归方程 $Y_2 = 60.406X_2 + 59.497$ ($R^2 = 0.9999, n = 6$)。结果表明, 吴茱萸碱、吴茱萸次碱质量浓度分别在 7.9 ~ 198 μg/mL 和 3.58 ~ 89.6 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 分别精密吸取 2.1.2 项下混合对照品溶液 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 0.57% 和 0.86% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一批供试品溶液, 分别于室温放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 1.13% 和 1.45% ($n = 6$), 表明供试品溶液



1. 吴茱萸碱 2. 吴茱萸次碱
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Evodiamine 2. Rutecarpine

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

室温下放置24 h内稳定。

重复性试验:取同一批药材样品,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1.1项下色谱条件下进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果吴茱萸碱和吴茱萸次碱的平均含量分别为8.78 mg/g和4.12 mg/g, RSD分别为2.32%和1.83%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批已知含量的处方量药材适量,共9份,每3份为1组,分别加入低、中、高质量浓度的对照品溶液,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

2.1.4 样品含量测定

取样品适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,

表1 加样回收试验结果($n=9$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n=9$)

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
吴茱萸碱	0.204 2	1.807 1	0.86	2.638 7	96.70	96.93	2.33
	0.202 1	1.788 5	0.86	2.598 4	94.17		
	0.200 7	1.776 2	0.86	2.622 8	98.44		
	0.201 4	1.782 3	1.72	3.513 5	100.65		
	0.200 5	1.774 4	1.72	3.462 5	98.15		
	0.204 1	1.806 3	1.72	3.455 3	95.87		
	0.202 3	1.790 3	2.58	4.211 2	93.83		
	0.204 8	1.812 5	2.58	4.284 1	95.80		
	0.201 5	1.783 3	2.58	4.332 1	98.79		
吴茱萸次碱	0.204 2	0.845 4	0.42	1.265 3	99.98	98.20	2.26
	0.202 1	0.836 7	0.42	1.242 5	96.62		
	0.200 7	0.830 9	0.42	1.230 5	95.14		
	0.201 4	0.833 7	0.84	1.684 3	101.26		
	0.200 5	0.830 1	0.84	1.644 5	96.95		
	0.204 1	0.844 9	0.84	1.670 4	98.27		
	0.202 3	0.837 5	1.26	2.113 4	101.26		
	0.204 8	0.847 8	1.26	2.084 6	98.16		
	0.201 5	0.834 2	1.26	2.045 6	96.14		

按2.1.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,并计算含量。结果吴茱萸碱和吴茱萸次碱的平均含量分别为8.85 mg/g和4.14 mg/g。

2.2 吴茱萸汤提取工艺优选

2.2.1 提取方法考察

按处方量称取药材6份,采用超声法、乙醇回流法提取时均加入70%乙醇(1:20, m/V),水煮法提取时加水;提取时间均为1 h,均提取1次,滤过,置2 000 mL容量瓶中,分别加70%乙醇或水定容,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。综合评分=吴茱萸碱含量 $\times$ 0.65(权重)+吴茱萸次碱含量 $\times$ 0.35(权重)。结果3种方法综合评分分别为4.69分、5.04分、2.19分,故选择乙醇回流法提取。

2.2.2 正交试验

以乙醇体积分数(因素A)、料液比(因素B)、提取时间(因素C)、提取次数(因素D)为考察因素,以吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量的综合评分为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选吴茱萸汤提取工艺。因素与水平见表2,试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab. 2 Factors and their levels

水平	因素A(%)	因素B(m/V)	因素C(h)	因素D(次)
1	60	1:10	0.5	1
2	70	1:15	1.0	2
3	80	1:20	1.5	3

可见,各因素对综合评分的影响大小依次为 $A>D>B>C$ 。由表4可知,4个因素对结果均无显著影响,从节能增效角度看,最后得吴茱萸汤的最佳提取工艺为 $A_2B_3C_1D_2$,即加70%乙醇,料液比为1:20(m/V),提取时间为0.5 h,提取2次。

2.2.3 验证试验

取10倍吴茱萸汤处方量药材,平行3份,按上述最佳提取工艺参数进行验证试验。结果表明,该工艺稳定

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test							
试验号	因素				含量(mg/g)		综合评分
	A	B	C	D	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	
1	1	1	1	1	7.393	3.405	6.00
2	1	2	2	2	8.118	3.726	6.58
3	1	3	3	3	7.847	3.481	6.32
4	2	1	2	3	8.417	3.944	6.85
5	2	2	3	1	7.838	3.745	6.41
6	2	3	1	2	8.880	4.125	7.22
7	3	1	3	2	8.013	3.930	6.58
8	3	2	1	3	8.414	4.184	6.93
9	3	3	2	1	8.216	3.936	6.72
K_1	6.293	6.470	6.710	6.370			
K_2	6.827	6.640	6.717	6.793			
K_3	6.743	6.753	6.437	6.700			
R	0.534	0.283	0.280	0.423			

表 4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the ANOVA					
方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	0.494	2	0.247	1.854	> 0.05
B	0.122	2	0.061	0.458	> 0.05
C	0.153	2	0.077	0.574	> 0.05
D	0.297	2	0.149	1.114	> 0.05
误差	1.07	8			

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

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

表 5 验证试验结果 ($n = 3$)

Tab. 5 Results of the verification test ($n = 3$)			
序号	吴茱萸碱含量(mg/g)	吴茱萸次碱含量(mg/g)	综合评分
1	8.85	4.20	7.22
2	8.90	4.13	7.23
3	8.82	4.10	7.17
$\bar{X} \pm s$	8.86 ± 0.04	4.14 ± 0.05	7.21 ± 0.03
RSD(%)	0.46	1.20	0.47

可行。详见表 5。

3 讨论

3.1 处方药材量选取

吴茱萸汤处方用量,《伤寒杂病论》中记载为“吴茱萸一升(洗,辛热),人参三两(甘温),生姜六两(切,辛温),大枣十二枚(擘,甘温)。上四味,以水七升,煮取二升,去滓”;《方剂学》^[11]中记载为“吴茱萸 9 g、人参 9 g、生姜 18 g、大枣 12 枚”。根据相关临床资料,本研究中选择后一剂量。大枣在处方中无严格定量,且由于市场中红枣大小不一,可能影响料液比,参考文献^[12]按单枚红枣(去核)质量 3 g,折算本方中红枣质量为 36 g。

3.2 色谱条件选择

吴茱萸为方中君药,具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻之功,吴茱萸碱和吴茱萸次碱是其活性成分。本研究中对吴茱萸碱和吴茱萸次碱进行全波长扫描,结果发现,吴茱萸碱的最大吸收波长为 225 nm,吴茱萸次碱的最大吸收波长为 330 nm,在 225 nm 波长处也有明显吸收,故选择 225 nm 作为检测波长。采用高效液相色谱法测定 2 种有效成分含量,预试验中考察不同系统和比例的流动相,如 0.1% 磷酸水溶液(含十二烷基硫酸钠 0.2%) - 甲醇 - 乙腈^[13]、乙腈水溶液^[14]等,最后确定流动相采用乙腈 - 甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液(30:32:38, V/V/V)。在此条件下,吴茱萸碱和吴茱萸次碱的保留时间短,分离度高,同时能避免其他组分的干扰。

3.3 提取工艺优选

本研究中考察了分别采用超声法、回流法、水煮法对提取效果的影响,结果显示,乙醇回流法提取活性成分含量更高,超声法次之,水煮法最低,与吴茱萸汤活性成分醇溶性较高有关^[15];且方中生姜的主要成分为挥发油性物质,人参和大枣的主要成分为水不溶性物质^[16],水煮法不利于上述活性成分的溶出。故最终采用乙醇回流法提取。

综上所述,本研究中优选的工艺操作简便,结果稳定,可用于吴茱萸汤的提取。

参考文献

[1] 朱永芝,姚自凤. 浅谈吴茱萸汤的临床应用[J]. 光明中医, 2014, 29(12): 2674 - 2675.

[2] 张保国,丛悦,刘庆芳. 吴茱萸汤现代药效学研究与应用[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1775 - 1778.

[3] 李文兰,姬海南,王朋倩,等. 虚寒呕吐模型的复制和吴茱萸汤的止呕作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(5): 1066 - 1069.

[4] 魏岳斌,杨小兰,程善廷. 加味吴茱萸汤联合西药对脾胃虚寒型幽门螺杆菌相关性慢性胃炎的疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2013, 21(5): 272 - 273.

[5] 杨坤,甘丽华,郭超峰. 吴茱萸汤方证关系与现代研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(4): 43 - 47.

[6] 杨志明. 吴茱萸汤加减配合穴位隔姜灸治疗脾胃虚寒型胃痛 62 例[J]. 中医临床研究, 2018, 10(22): 108 - 110.

[7] 孙彩芬,赵琼. 吴茱萸汤联合柴胡疏肝散治疗胃食管反流病临床观察[J]. 山西中医药大学学报, 2019, 20(6): 447 - 448.

[8] 谢相智,许国磊,吴欣芳,等. 参赭培气合吴茱萸汤治疗肝胃虚寒型反流性食管炎的临床观察[J]. 世界中医药, 2017, 12(6): 1291 - 1293.

[9] 杨洁,胡淑萍. 吴茱萸汤治疗小儿脾胃虚寒型呕吐临床应用体会[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(14): 2526 - 2547.

[10] 周红祖,余惠旻,彭求贤,等. 黄连与吴茱萸及其不同配伍