

# 吴茱萸不同提取物的镇痛作用及其有效成分含量的比较研究

蔡卿嫣, 魏晶晶, 李伟荣(广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

**摘要:** **目的** 比较研究吴茱萸不同提取物的镇痛效果及其 3 种有效成分的含量差异。**方法** 用醋酸扭体法和福尔马林致伤害性疼痛模型观察吴茱萸不同提取物的镇痛作用; 采用高效液相色谱法测定吴茱萸有效成分含量, Phenomenex C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm), 流动相: 甲醇-水梯度洗脱, 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长: 230 nm。**结果** 吴茱萸不同提取物均能显著抑制小鼠扭体反应及福尔马林致痛小鼠 II 相反应舔足时间, 其中乙醇提取物组效果较明显。吴茱萸内酯的线性范围为 80 ~ 500 μg·mL<sup>-1</sup>, 吴茱萸碱和吴茱萸次碱的线性范围为 0 ~ 80 μg·mL<sup>-1</sup>。水提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的提取率分别为 0.747 %、0.009 %、0.004 %; 甲醇提取物中分别为 1.217 %、0.200 %、0.129 %; 乙醇提取物中分别为 1.220 %、0.201 %、0.154 %。**结论** 吴茱萸乙醇提取物的镇痛效果优于甲醇提取物和水提取物, 且有效成分含量高于甲醇提取物和水提取物。

**关键词:** 吴茱萸提取物; 镇痛作用; 高效液相色谱; 有效成分; 比较

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0179-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.016

## Comparison of Analgesic Effect and Active Ingredient Content of Fructus Evodiae Extracts

CAI Qingyan, WEI Jingjing, LI Weirong (Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

**Abstract:** **Objective** To compare the analgesic effect of extracts of Fructus Evodiae, and to determine the active ingredient contents of Fructus Evodiae. **Methods** Analgesic effects of Fructus Evodiae extracts on acetic acid writhing method and pain mice model induced by formalin was observed. HPLC was adopted for the determination of active ingredient contents of Fructus Evodiae. The separation was performed on the Phenomenex C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 4 μm) column with methanol-water as mobile phase in gradient dilution. The flow rate was set at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the ultraviolet detector was operated at 230 nm. **Results** All of the three different extracts of Fructus Evodiae can inhibit mice writhing reaction and shorten the foot licking time of mice in the second phase in formalin-induced pain mice model, and the effect of ethanol extract was more obvious than the others. The linear ranges of evodin, evodiamine and rutaecarpine were 80 ~ 500 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=0.9996$ ), 0 ~ 80 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.9998$ ) and 0 ~ 80 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=0.9997$ ), respectively. The extract rates of evodin, evodiamine and rutaecarpine were 0.747 %, 0.009 % and 0.004 %, respectively in the water extract of Fructus Evodiae, were 1.217 %, 0.200 % and 0.129 % in the methanol extract, and became 1.220 %, 0.201 % and 0.154 % in the ethanol extract. **Conclusion** The analgesic effect of ethanol extract of Fructus Evodiae is superior to that of methanol extract and water extract, and ethanol extract has higher content of active ingredients.

**Keywords:** Fructus Evodiae extracts; Analgesic effect; HPLC; Active ingredients; Comparison

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 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟

收稿日期: 2013-10-09

**作者简介:** 蔡卿嫣, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药安全性与有效性评价。Email: cqywho@163.com。通讯作者: 李伟荣, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药药理与毒理。Email: liwr@gzucm.edu.cn。

**基金项目:** 广东省“211 工程”三期建设项目“药物警戒系统中的中药再评价研究”(粤发改社[2009]972 号)子课题; 广州中医药大学师资队伍建设科研项目(A1033007)。

果实，主要产于贵州铜仁地区。吴茱萸始载于《神农本草经》，辛、苦、热，有小毒，归肝、脾、胃、肾经，能散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻<sup>[1]</sup>，为温中止痛的必备药。临床常用于眩晕、头痛、肋痛、呃逆、胃脘痛、呕吐、腹泻、痛经、脑震荡后遗症等多种疾病<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明，吴茱萸具有镇痛、抗炎、抗肿瘤、减肥、保护心脏、降血压等多种药理学活性<sup>[3]</sup>。吴茱萸镇痛作用的主要成分为吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯和去氢吴茱萸碱等<sup>[4]</sup>，其中吴茱萸次碱镇痛作用最强。有文献<sup>[5-7]</sup>分别报道了吴茱萸水提物、甲醇提取物或乙醇提取物的镇痛作用，结果存在差异。本实验对吴茱萸3种不同提取物的镇痛作用进行了比较，并对其主要有效成分含量差异进行考察，为进一步研究吴茱萸的药效物质基础及作用机制提供参考依据。

1 仪器与材料

**1.1 仪器** LC-高效液相色谱仪(waters 515 泵、waters<sup>TM</sup> 486 紫外检测器)，美国 Waters 公司；Advantage EL-85 冷冻干燥机，美国 VirTis 公司；AUW220D 分析天平，日本岛津公司；HH-1 调温电热套，北京市佳祥科利仪器有限公司。

**1.2 药物及试剂** 药材吴茱萸，康美药业有限公司，批号：110506851，经广州中医药大学祝晨蓀研究员鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.；吴茱萸内酯对照品，中国药品生物制品检定所，批号：110800-200404；吴茱萸次碱对照品，中国药品生物制品检定所，批号：110801-201006；吴茱萸碱标准品，成都瑞芬思生物科技有限公司，批号：w-012-120418；复方氨林巴比妥注射液，天津药业集团新郑股份有限公司，批号：1105122，规格：每2 mL 含氨基比林 0.1 g；甲醇，色谱纯，北京迪马(Dikma) 科技有限公司；水为纯净水，华润怡宝饮料(中国)有限公司；其他试剂均为分析纯。

**1.3 动物** SPF 级 KM 小鼠 160 只，雌雄各半，体质量 18~22 g，由广东省医学实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK(粤)2008-0002。

2 方法与结果

2.1 吴茱萸不同提取物镇痛作用比较

**2.1.1 吴茱萸不同提取物的制备** 将药材用水、70% 甲醇或 70% 乙醇浸泡 1 h 后，80℃ 回流 2 h，用纱布过滤，减压浓缩至 150 mL 左右放入 -70℃ 冰箱过夜冷冻至固体，然后置冷冻干燥机中干燥 24 h 成粉末状，水提物的提取率为 30%、甲醇和乙醇提取物的提取率为 40%，临用前用 0.5% CMC-Na 分别配成所需浓度的混悬液。

**2.1.2 醋酸扭体法<sup>[8]</sup>** 80 只 KM 小鼠随机分为对照组(0.5% CMC-Na)，氨基比林组(150 mg·kg<sup>-1</sup>)，吴茱萸不同提取物组(甲醇提取物 300, 150 mg·kg<sup>-1</sup>；乙醇提取物 300, 150 mg·kg<sup>-1</sup>；水提物 300, 150 mg·kg<sup>-1</sup>)，每组 10 只，雌雄各半，对照组和吴茱萸组每天灌胃给药 1 次，连续给药 1 周，给药容量均为 20 mL·kg<sup>-1</sup>。对照组和吴茱萸提取物组末次给药 60 min 后，氨基比林组腹腔注射给药 30 min 后腹腔注射 1% 醋酸溶液 10 mL·kg<sup>-1</sup>，观察记录潜伏时间以及 15 min 内出现的扭体反应动物数和扭体次数。

**2.1.3 福尔马林致痛实验<sup>[8]</sup>** 80 只 KM 种小鼠随机分为对照组(0.5% CMC-Na)、氨基比林组(150 mg·kg<sup>-1</sup>)、吴茱萸不同提取物组(甲醇提取物 300, 150 mg·kg<sup>-1</sup>；乙醇提取物 300, 150 mg·kg<sup>-1</sup>；水提物 300, 150 mg·kg<sup>-1</sup>)，每组 10 只，雌雄各半，氨基比林组腹腔注射给药，其余组灌胃给药，给药容量均为 20 mL·kg<sup>-1</sup>。氨基比林组药后 30 min、其余组药后 60 min 右后足足底皮下注射 2% 福尔马林溶液 9 μL，观察记录 0~10 min(I 相)、10~30 min(II 相)小鼠累积舔足时间。

2.2 吴茱萸不同提取物主要有效成分含量比较

**2.2.1 供试品溶液的制备** 吴茱萸药材粉碎，过 50 目筛，得吴茱萸药粉，精密称取 0.5 g，加入 25 mL 溶剂(水、70% 甲醇或 70% 乙醇)，回流提取 2 h，4 层纱布过滤后，将损失的体积用相应溶剂补足至 25 mL，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得供试样品。

**2.2.2 色谱条件** Waters 高效液相色谱仪及相关工作站；Phenomenex Synergi Hydro-RP C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm)，流动相为甲醇-水梯度洗脱(见表 1)，流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>，检测波长为 230 nm，定量阀进样，进样量为 20 μL。

表 1 流动相梯度

| Table 1 Gradient of mobile phase |    |    |    |    |    |
|----------------------------------|----|----|----|----|----|
| 时间/min                           | 0  | 12 | 26 | 30 | 37 |
| 甲醇比例/%                           | 40 | 75 | 75 | 40 | 40 |

**2.3 统计学处理方法** 应用 SPSS 统计软件，用单因素方差分析检验组间差异显著性，组间两两比较方差齐时用 LSD 检验，方差不齐时用 Tamhan's T<sub>2</sub> 检验，数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

**2.4 吴茱萸不同提取物对小鼠醋酸扭体反应次数的影响** 由表 2 可见，与对照组比较，氨基比林组和吴茱萸各组小鼠扭体次数均有显著减少( $P < 0.05$ )，吴茱萸各组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )，从抑制扭体反应次数百分率来看，吴茱萸乙醇提取物高剂量组高于吴茱萸提取物其余各组。

表 2 吴茱萸不同提取物对小鼠醋酸扭体反应次数的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 2 Effect of different extract of Fructus Evodiae on acetic acid induced writhing test in mice

| 组别        | 剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> | 扭体次数        | 抑制 /% |
|-----------|-------------------------|-------------|-------|
| 对照组       | —                       | 25.0 ± 4.5  | —     |
| 氨基比林组     | 150                     | 1.3 ± 0.6*  | 96.0  |
| 吴茱萸水提物组   | 300                     | 14.9 ± 4.7* | 40.4  |
| 吴茱萸水提物组   | 150                     | 16.2 ± 3.3* | 35.2  |
| 吴茱萸甲醇提取物组 | 300                     | 14.4 ± 4.6* | 42.4  |
| 吴茱萸甲醇提取物组 | 150                     | 13.8 ± 4.4* | 44.8  |
| 吴茱萸乙醇提取物组 | 300                     | 10.9 ± 3.4* | 56.4  |
| 吴茱萸乙醇提取物组 | 150                     | 14.9 ± 4.2* | 40.4  |

注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ 。

**2.5 吴茱萸不同提取物对福尔马林致痛小鼠累积舔足时间的影响** 由表 3 可见，对于福尔马林致痛实验 I 相反应，仅氨基比林组与对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，小鼠累积舔足时间减少；II 相反应氨基比林组、吴茱萸 3 种提取物高剂量组及乙醇低剂量组与对照组比较，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )；乙醇提取物低剂量组与其余两种提取物的低剂量组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，小鼠累积舔足时

间减少。

表 3 吴茱萸不同提取物对福尔马林致痛小鼠的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

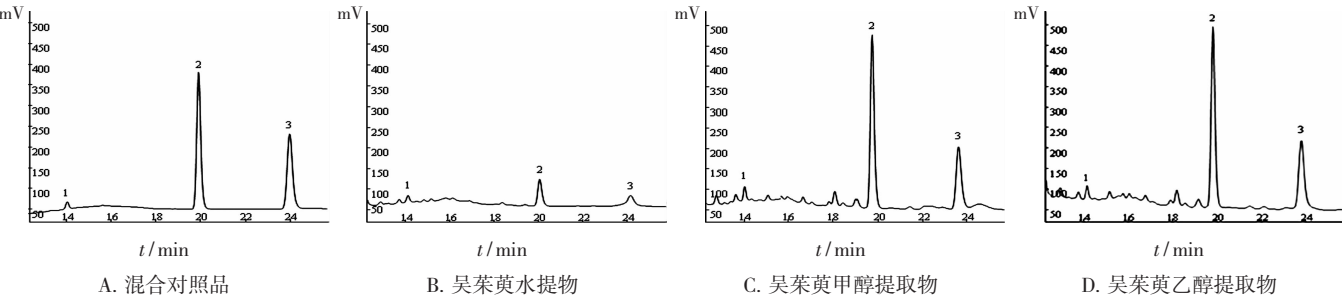
Table 3 Effect of different extract of Fructus Evodiae on the formalin-induced pain mice model

| 组别        | 剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> | I 相 /s        | II 相 /s        |
|-----------|-------------------------|---------------|----------------|
| 对照组       | —                       | 60.07 ± 13.60 | 75.98 ± 15.77  |
| 氨基比林组     | 150                     | 14.52 ± 3.85* | 17.38 ± 4.54*  |
| 吴茱萸水提物组   | 300                     | 50.96 ± 10.64 | 52.64 ± 7.69*  |
| 吴茱萸水提物组   | 150                     | 53.10 ± 14.46 | 72.28 ± 16.00  |
| 吴茱萸甲醇提取物组 | 300                     | 57.79 ± 14.53 | 53.81 ± 6.56*  |
| 吴茱萸甲醇提取物组 | 150                     | 59.24 ± 8.42  | 77.27 ± 18.29  |
| 吴茱萸乙醇提取物组 | 300                     | 55.56 ± 6.83  | 55.01 ± 5.72*  |
| 吴茱萸乙醇提取物组 | 150                     | 56.68 ± 13.24 | 52.34 ± 7.67** |

注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ ；与吴茱萸水提物低剂量组、甲醇提取物低剂量组比较，\*\* $P < 0.05$ 。

2.6 吴茱萸不同提取物部分有效成分的含量比较

**2.6.1 色谱结果** 样品在选定的色谱条件下测定，吴茱萸内酯的保留时间为 14.116 min，吴茱萸碱的保留时间为 19.861 min，吴茱萸次碱的保留时间为 23.881 min，见图 1。



1. 吴茱萸内酯; 2. 吴茱萸碱; 3. 吴茱萸次碱

图 1 吴茱萸对照品及供试品的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of standard and three extracts of Fructus Evodiae

**2.6.2 标准曲线的制备** 精密配置吴茱萸内酯标准品溶液 80, 140, 200, 260, 320, 380, 440, 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，吴茱萸碱和吴茱萸次碱标准品溶液 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；分别进样 20  $\mu\text{L}$ ，记录色谱图，用峰面积  $Y$  与对应标准品的浓度  $X$  进行线性回归，求得回归方程：吴茱萸内酯  $Y=1326X-74814(r=0.9996)$ ；吴茱萸碱  $Y=125639X-50313(r=0.9998)$ ；吴茱萸次碱  $Y=92911X-52811(r=0.9997)$ ，吴茱萸内酯在 80 ~ 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  线性关系良好，吴茱萸碱和吴茱萸次碱在 0 ~ 80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  线性关系良好。

**2.6.3 稳定性试验** 取供试品溶液，间隔 4 h 精密进样 20  $\mu\text{L}$ ，共进行 6 次，水提取物中吴茱萸内酯、吴

茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD 分别为 1.49 %、1.96 %、1.98 %；甲醇提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD 分别为 1.86 %、1.74 %、1.29 %；乙醇提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD 分别为 1.78 %、1.64 %、1.60 %，表明样品在 24 h 内稳定性良好。

**2.6.4 重现性试验** 精密称取吴茱萸药粉，按样品溶液制备方法在相同条件下，处理 5 份样品，分别精密吸取 20  $\mu\text{L}$  进样，计算得水提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD 分别为 1.45 %、1.97 %、1.98 %；甲醇提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD 分别为 1.57 %、1.78 %、1.07 %；乙



醇提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD 分别为 1.94 %、1.20 %、1.23 %，符合分析要求。

**2.6.5 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 20 μL，连续进样 5 次，测定峰面积，吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD 分别为 1.91 %、0.82 %、1.86 %，表明仪器精密度良好。

**2.6.6 回收率试验** 精密称取已知吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量的样品 5 份，分别加入一定量吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱标准品，按照供试溶液制备方法制备样品溶液并测定，计算加样回收率得水提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的均值分别为 97.15 %、96.03 %、98.63 %，RSD 分别为 0.40 %、1.34 %、1.87 %；甲醇提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的均值分别为 97.92 %、97.61 %、96.16 %，RSD 分别为 3.07 %、1.84 %、2.00 %；乙醇提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的均值分别为 98.44 %、96.55 %、96.30 %，RSD 分别为 1.36 %、1.71 %、1.49 %，符合分析要求。

**2.6.7 样品分析结果** 取以上 3 种样品溶液，按上述色谱条件分别进样 20 μL，每个样品平行进样 3 次取平均值，根据标准曲线计算吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量，见表 4。

表 4 吴茱萸 3 种提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 4 Contents of evodine, evodiamine and rutaecarpine in the three extracts from Fructus Evodiae

| 提取溶剂   | 吴茱萸内酯 /%       | 吴茱萸碱 /%         | 吴茱萸次碱 /%        |
|--------|----------------|-----------------|-----------------|
| 水      | 0.747 ± 0.024  | 0.009 ± 0.001   | 0.004 ± 0.001   |
| 70 %甲醇 | 1.217 ± 0.064* | 0.200 ± 0.008** | 0.129 ± 0.005** |
| 70 %乙醇 | 1.220 ± 0.029* | 0.201 ± 0.006** | 0.154 ± 0.002** |

注：与水提取物比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

3 讨论

在前期实验中，经过反复多次的热板实验，吴茱萸各提取物均未显示明显的镇痛效果，而醋酸扭体法和福尔马林致痛实验结果显示有镇痛效果，可能吴茱萸的镇痛作用以抗炎镇痛为主。在醋酸扭体实验中，氨基比林组和吴茱萸各组与对照组比较扭体次数均有显著减少，从抑制程度来看，吴茱萸乙醇提取物高剂量组高于其他各组。福尔马林致痛实验分为两相反应，Ⅰ相反应一般为致痛后 0 ~ 10 min，为急性伤害性的非炎性疼痛，Ⅱ相反应一般为致痛后 10 ~ 30 min，是炎性介质释放产生的炎性疼痛，中枢镇痛药一般可抑制两相疼痛反应，而周围镇痛药仅抑制第Ⅱ相反应。吴茱萸 3 种提取物高低剂量组对小鼠Ⅰ相反应均无明显影响，吴茱萸水、

甲醇提取物高剂量组以及乙醇提取物高、低剂量组小鼠Ⅱ相反应中累积舔足时间明显减少，提示吴茱萸提取物有显著的周围镇痛作用，其中乙醇提取物的作用效果较强。

吴茱萸镇痛的主要成分为吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯等<sup>[3-4]</sup>，《中华人民共和国药典》2010 版一部也主要是对这 3 种成分含量进行了限定，因此本文选取此 3 种主要有效成分进行测定。通过比较吴茱萸 3 种不同提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量，结果显示，水提取物中 3 种有效成分的含量均明显低于醇提物；70 %乙醇提取物中仅吴茱萸次碱的含量略高于 70 %甲醇提取物，其余两种有效成分含量差异不大。由镇痛作用及主要有效成分含量测定结果比较可见，乙醇提取物的镇痛效果最好，有效成分含量亦最高；甲醇提取物中有效成分含量较水提物高，但镇痛效果并不比水提物强，可能与吴茱萸中的其他成分有关。

镇痛中药及其有效物质的止痛效果确切，无耐受性、依赖性及成瘾性，对于慢性疼痛的治疗有特殊的疗效。目前，吴茱萸在临床应用中仍然以水煎剂为主，在水煎过程中有效成分煎出率很低（约为 10 %）<sup>[9]</sup>，本实验通过比较 3 种提取物的镇痛作用及其主要有效成分含量的差异，为吴茱萸更加合理有效地应用于临床提供参考。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1 部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：160.

[2] 张璐，冯育林，王跃生，等. 吴茱萸现代研究概况[J]. 江西医学院学报，2010，22(2)：78-82.

[3] 黄伟，孙蓉，鲍志烨，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.

[4] 龚慕辛，王智民，张启伟，等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理，2009，20(2)：183-187.

[5] 孙蓉，黄伟. 吴茱萸水提组分镇痛及伴随毒副作用研究[J]. 中国药物警戒，2012，9(11)：641-645.

[6] Matsuda H, Wu JX, Tanaka T, et al. Antinociceptive activities of 70 % methanol extract of evodiae fructus (fruit of Evodia rutaecarpa var. bodinieri) and its alkaloidal components[J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20 (3)：243-248.

[7] Ko HC, Wang YH, Liou KT, et al. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of Evodia rutaecarpa and its bioactive components on neutrophils and microglial cells[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 555(2-3)：211-217.

[8] 洪庚辛. 镇痛药研究方法学[M]. 北京：人民卫生出版社，2009：306-307，360-362.

[9] 宋亚芳，王智民，朱晶晶，等. 一测多评法测定吴茱萸中吴茱萸内酯、吴茱萸碱及吴茱萸次碱的含量[J]. 中国中药杂志，2009，34 (21)：2781-2785.

(编辑：修春)