

吴茱萸降压颗粒的质量标准研究*

刘毅, 张丽艳**, 杨玉琴, 李健, 钟正灵, 谢宇

(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

摘要 目的: 建立吴茱萸降压颗粒的质量控制方法。**方法:** 采用 TLC 方法对制剂中吴茱萸、人参、泽泻、大枣进行定性鉴别; 采用 HPLC 法对制剂的主药吴茱萸中吴茱萸次碱、吴茱萸碱进行含量测定。采用 SHIMADZU C_{18} 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 以甲醇-水 (70:30) 为流动相, 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 检测波长 225 nm。结果: 吴茱萸、人参、泽泻、大枣的定性鉴别方法专属性强, 阴性无干扰; 吴茱萸次碱、吴茱萸碱加样回收率 ($n=5$) 分别为 100.2% 和 101.2%, RSD 为 1.3% 和 1.0%; 吴茱萸次碱、吴茱萸碱进样量在 0.33~1.64 μ g 和 0.24~1.18 μ g 范围内与峰面积呈良好的线性关系。结论: 本法简便可行, 重复性好, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 吴茱萸降压颗粒; 吴茱萸次碱; 吴茱萸碱; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0016-05

Study on the quality control standard of Wuzhuyu Jiangya granules*

LIU Yi, ZHANG Li-yan**, YANG Yu-qin, LI Jian, ZHONG Zheng-ling, XIE Yu

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

Abstract Objective To establish the quality control standard of Wuzhuyu Jiangya granules. **Methods** Fructus Evodiae, Radix et Rhizoma Ginseng, Rhizoma Aconitidis and Fructus Jujubae were identified by TLC. The content of rutaecarpine and evodiamine in Wuzhuyu Jiangya granules were determined by HPLC. SHIMADZU C_{18} column (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) was used, with methanol-water (70:30) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, the detection wavelength was 225 nm and the column temperature was 25 $^{\circ}$ C. **Results** The TLC identification methods for the Fructus Evodiae, Radix et Rhizoma Ginseng, Rhizoma Aconitidis and Fructus Jujubae was high specificity, the negative sample didn't interfere the identification of TLC. The average recoveries ($n=5$) of rutaecarpine and evodiamine were 100.2% and 101.2%, RSD were 1.3% and 1.0% respectively. The linear ranges of rutaecarpine and evodiamine were 0.33~1.64 μ g and 0.24~1.18 μ g. **Conclusion** The method is simple, reproducible and may be used for the quality control of Wuzhuyu Jiangya granules.

Key words Wuzhuyu Jiangya granules, rutaecarpine, evodiamine, HPLC

吴茱萸降压颗粒主要用于高血压病的治疗。该制剂由吴茱萸、人参、泽泻加 70% 的乙醇提取; 生姜、杜仲、大枣水煎醇沉; 合并滤液, 回收乙醇并浓缩, 干燥, 制粒, 即得。功能: 调肝泻浊, 降压固本。主治: 阴阳失衡, 痰浊上泛, 厥阴痰浊的眩晕头疼、失眠症候。高血压病的预防与治疗已成为心血管领域中最重要、全球性课题之一。方中君药吴茱萸为最常用中药, 为贵州著名地道药材, 也为常用苗药, 吴茱萸中的生物碱为其降压主要有效成分之一^[1]。因此, 利用吴茱萸汤在镇痛、降压方面的现代药理研

究成果^[2], 结合中医药理论及临床多年的治疗经验, 巧用仲景吴茱萸汤化裁, 采用吴茱萸为君药, 配以人参、杜仲、泽泻、大枣、生姜 5 味中药组成经验方, 用于调肝泻浊, 降压固本治疗高血压, 经临床多年应用, 疗效显著。现代药理研究表明: 该制剂具有良好镇痛、镇静、降压作用。

吴茱萸次碱及吴茱萸碱为该制剂中主要有效成分之一, 中国药典 2005 年版一部吴茱萸项下^[3]及文献^[4,5]均有相关含量测定的研究报道, 但经采用, 分离效果均不理想。作者经多次实验探索, 确定了该

* 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目 (黔科合中药专字 [2004] 13 号)

** 通讯作者 Tel: (0851) 5615344 E-mail: zyl1964@163.com

制剂中吴茱萸次碱及吴茱萸碱的含量测定方法。结果较为满意。

同时,根据处方中药物的性质,本文还采用薄层色谱法分别对吴茱萸、人参、泽泻、大枣进行了定性鉴别。为吴茱萸降压颗粒质量控制方法的制定提供实验依据。

1 仪器与试药

REPROSTAR-3 薄层色谱数码相机系统(瑞士);美国 Agilent-1100 型高效液相色谱仪,检测器为二极管阵列检测器;AG135 型电子天平(梅特勒-托利多公司);硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂)。对照品吴茱萸次碱(801-9001)、吴茱萸碱(0802-9702)、人参皂苷 R_b (110704-200217)、人参皂苷 R_g (0703-200221)、人参皂苷 R_e (110754-200319)、齐墩果酸(110709-200304)及对照药材人参(120917-200406)、泽泻(121081-200302)均由中国药品生物制品检定所提供;吴茱萸降压颗粒(批号:050301, 050302, 050303),贵阳中医学院药物分析实验室制;阴性样品均自制。甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 吴茱萸 称取本品 0.2 g 研细,加甲醇 5 mL,超声处理 1 h(功率 250 W,频率 40 kHz),滤过,取续滤液作为供试品溶液;取缺吴茱萸阴性样品,依法制成阴性对照溶液;另取对照品吴茱萸次碱、吴茱萸碱适量,加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述 4 个溶液各 2 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-石油醚-甲醇-环己烷-(10:6:0.8:0.8)为展开剂,展开至 8 cm,取出,晾干,置紫外灯(365 nm)下检视。样品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。阴性对照无干扰,结果见图 1。

2.1.2 人参 取本品 15 g 研细,加甲醇 50 mL,置水浴上加热回流 1 h 滤过,滤液蒸干,残渣加水 15 mL 使溶解,移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤 2 次,每次 40 mL,再用正丁醇饱和的水 40 mL 洗涤 1 次,合并正丁醇提取液,回收溶剂至干,残渣加甲醇 5 mL 使溶解,置于 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 10~15 mm,柱高 10 cm)上,以水 100 mL 洗脱,弃去洗脱液,再用 70% 乙醇 100 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,即得供试品

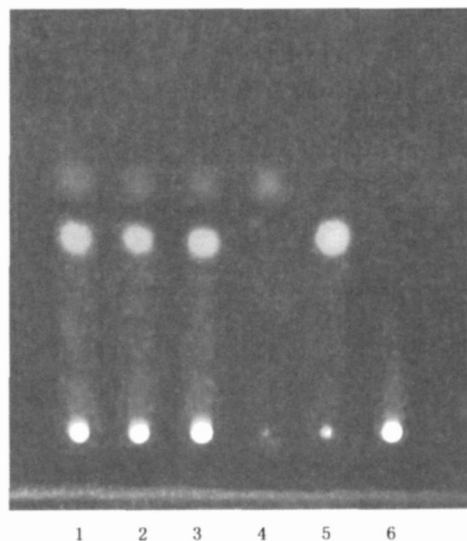


图 1 吴茱萸薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatogram of Fructus Evodiae

1~3. 样品 (sample) 4 吴茱萸次碱对照品 (rutaecarpine reference substance) 5 吴茱萸碱对照品 (evodiamine reference substance) 6. 阴性样品 (negative sample without Fructus Evodiae)

溶液;取缺人参阴性样品,依法制成阴性对照溶液;另取人参对照药材 1 g 同法制成对照药材溶液,再取对照品人参皂苷 R_b 、人参皂苷 R_g 、人参皂苷 R_e 适量,加甲醇制成每 1 mL 各含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。分别吸取上述 6 个溶液各 5 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-乙酸乙酯-水(4:1.4:5)的上层溶液为展开剂,展开至 8 cm,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置日光下检视。样品色谱中,在与对照药材及对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照无干扰,结果见图 2。

2.1.3 泽泻 称取本品 5 g 研细,加正丁醇 50 mL,超声处理 40 min(功率 250 W,频率 40 kHz),滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,即得供试品溶液;取缺泽泻阴性样品,依法制成阴性对照溶液;另取泽泻对照药材 1 g 同法制成对照药材溶液。吸取上述 3 个溶液各 2 μ L,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以石油醚-乙酸乙酯-乙醇(9:7:1)为展开剂,展开至 8 cm,取出,晾干,喷以 2.5% 硫酸乙醇溶液,在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,立即检视。样品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照无干扰,结果见图 3。

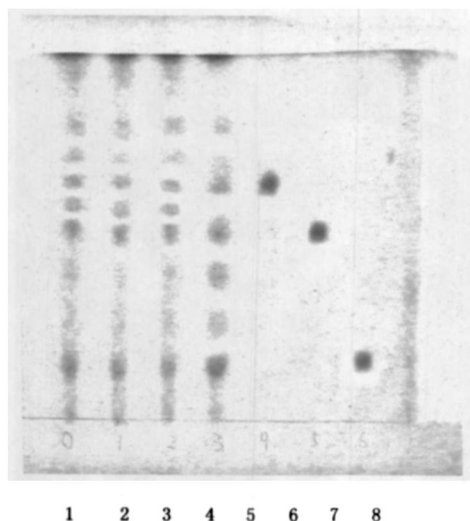


图 2 人参薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatogram of Radix et Rhizoma Ginseng

1~3 样品 (sample) 4 人参对照药材 (Radix et Rhizoma Ginseng reference crude drug) 5. 人参皂苷 R_{g1} 对照品 (ginsenoside R_{g1} reference substance) 6 人参皂苷 R_e 对照品 (ginsenoside R_e reference substance) 7 人参皂苷 R_{b1} 对照品 (ginsenoside R_{b1} reference substance) 8 阴性样品 (negative sample without Radix et Rhizoma Ginseng)

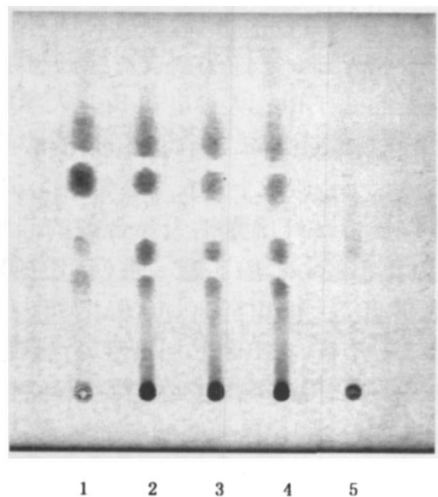


图 3 泽泻薄层色谱图

Fig 3 TLC chromatogram of Rhizoma Aconitidis

1 泽泻对照药材 (Rhizoma Aconitidis reference crude drug) 2~4 样品 (sample) 5 阴性样品 (negative sample without Rhizoma Aconitidis)

2.1.4 大枣 取本品 4 g 研细, 加乙醚 20 mL, 浸泡 1 h 超声处理 15 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 滤过, 滤液浓缩至 1 mL, 作为供试品溶液; 取缺大枣阴性样品, 依法制成阴性对照溶液; 另取齐墩果酸对照品, 加乙醇制成 1 mL 含 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述 3 个溶液各 3 μ L, 分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-冰醋酸 (14: 4: 0.5) 为展开剂, 展开至 8 cm, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105

℃ 加热至斑点显色清晰。样品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。阴性对照无干扰, 结果见图 4

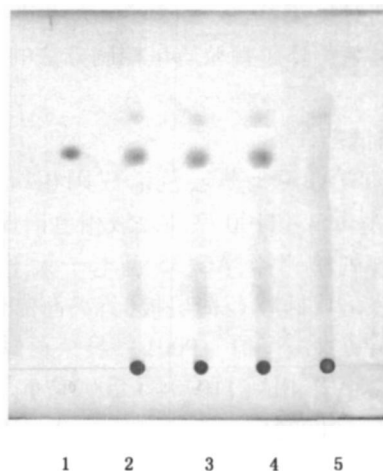


图 4 大枣薄层色谱图

Fig 4 TLC chromatogram of Fructus Jujubae

1. 齐墩果酸对照品 (oleanolic acid reference substance) 2~4 样品 (sample) 5. 阴性样品 (negative sample without Fructus Jujubae)

2.2 含量测定

2.2.1 溶液制备

2.2.1.1 对照品溶液 取吴茱萸次碱 4.1 mg, 吴茱萸碱 2.95 mg 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成含 0.16 mg $\cdot$ mL⁻¹ 吴茱萸次碱、0.12 mg $\cdot$ mL⁻¹ 吴茱萸碱的混合对照品溶液, 备用。

2.2.1.2 供试品溶液 取本品装量差异下的内容物, 研细, 取约 1 g 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 精密加入甲醇 10 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 30 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定重量, 加甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 即得供试品溶液。

2.2.1.3 阴性对照溶液 取缺吴茱萸阴性样品约 1 g 精密称定, 依“2.2.1.2”项下方法操作, 即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: SHIMADZU C_{18} 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇-水 (70: 30), 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长: 225 nm, 柱温: 25℃。在本色谱条件下, 分别吸取对照品溶液、供试品溶液、缺吴茱萸阴性对照溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 5。结果表明: 阴性对照图谱在吴茱萸次碱、茱萸碱出峰位置无干扰峰干扰测定, 在本试验条件下, 茱萸次碱、茱萸碱峰与其他组分峰分离完全。

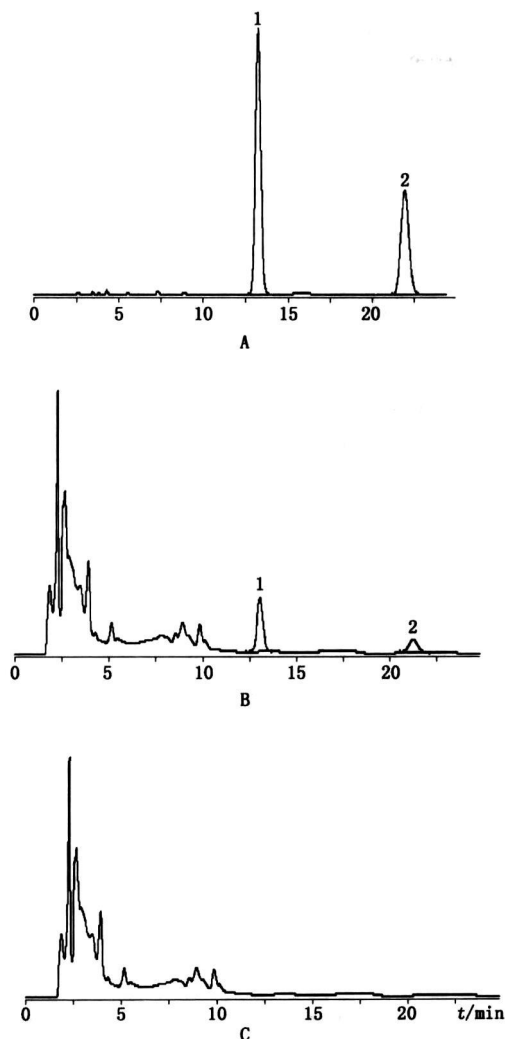


图 5 对照品 (A)、吴茱萸降压颗粒 (B) 及阴性样品 (C) HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of reference substances (A), Wuzhuyu Jiangya granules (B), and negative sample without Fructus Evodiae (C)
1 吴茱萸次碱 (nutaecapine) 2 吴茱萸碱 (evodiamine)

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。在上述色谱条件下进样 10 μ L, 测定峰面积。以峰面积积分值 (A) 为纵坐标, 进样量 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算得吴茱萸次碱及吴茱萸碱回归方程分别为:

$$A = 8.959 \times 10^3 X + 1.9 \quad r = 0.9999$$

$$A = 8.086 \times 10^3 X + 0.6 \quad r = 0.9999$$

吴茱萸次碱进样量在 0.33~1.64 μ g 范围内线性关系良好; 吴茱萸碱进样量在 0.24~1.18 μ g 范围内线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μ L, 连续进样 5 次, 测定峰面积积分值。结果: 吴茱萸次碱的 RSD 为 0.6%, 吴茱萸碱的 RSD 为 0.5%, 表明

本法精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批样品 5 份, 按样品测定法测定, 吴茱萸次碱、吴茱萸碱含量分别为 5.78 和 3.62 $\text{mg} \cdot \text{袋}^{-1}$, RSD 分别为 1.4% 和 1.5%, 表明本法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液在 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 分别进样 10 μ L, 测定峰面积积分值, 求得吴茱萸次碱、吴茱萸碱的 RSD 分别为 1.4% 和 0.9%。结果表明供试品溶液在 5 h 内稳定。

2.2.7 加样回收率试验 取已知含量的样品 (吴茱萸次碱、吴茱萸碱含量分别为 0.0578% 和 0.0362%) 约 0.5 g 共 5 份, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入对照品溶液 (吴茱萸次碱浓度 0.28 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吴茱萸碱浓度 0.18 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 mL。按“2.2.1.2”项下方法操作, 进样 10 μ L, 计算回收率。结果吴茱萸次碱、吴茱萸碱平均回收率 ($n = 5$) 分别为 100.2% 和 101.2%, RSD 分别为 1.3% 和 1.0%。

2.2.8 样品测定 精密吸取供试品溶液 10 μ L, 进样测定, 测量峰面积。以外标法计算 3 批样品中吴茱萸总碱含量分别为: 9.48, 9.48, 9.40 $\text{mg} \cdot \text{袋}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 展开剂的选择 采用中国药典人参鉴别项下方法^[1]对人参进行鉴别, 样品中各成分不能很好地分开。根据文献[6]调整展开剂的比例, 当以展开剂正丁醇-乙酸乙酯-水 (4:1.4:5) 上层溶液进行展开时, 所得斑点能完全分开且清晰, 重现性好。

3.2 提取溶剂的选择 精密称取本品 1 g 分别用 50% 甲醇、乙醇、甲醇各 10 mL 超声处理 30 min, 结果吴茱萸总碱的含量分别为 5.13, 7.41, 8.98 $\text{mg} \cdot \text{袋}^{-1}$, 故采用甲醇为提取溶剂。

3.3 提取溶剂用量的选择 精密称取本品 1 g 分别用 5 mL、10 mL、15 mL、25 mL 甲醇超声处理 30 min, 结果吴茱萸总碱的含量分别为 9.13, 9.41, 8.48, 7.32 $\text{mg} \cdot \text{袋}^{-1}$, 故采用 10 mL 甲醇提取。

3.4 提取时间的选择 精密称取本品 1 g 加甲醇 10 mL 分别超声提取 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 吴茱萸总碱的含量分别为 8.22, 9.41, 9.38, 9.42 $\text{mg} \cdot \text{袋}^{-1}$ 。结果表明: 超声提取 30 min 时总碱含量较高, 且与超声提取 60 min 所得总碱含量差异较小, 综合考虑则选择超声提取 30 min。

3.5 流动相的选择 吴茱萸次碱及吴茱萸碱为吴

茛菪中主要有效成分,文献[3]已有相关含量测定的研究报道,但乙腈价格较高,为节约成本,且达到较好的分离效果,作者经多次实验探索确定了正文所述的流动相,并取得了较为满意的分离效果。

参考文献

- 1 HUANG Hui-lan(黄慧莲), LIU Xian-wang(刘贤旺), LUO Guang-ming(罗光明), *et al*. Research development in Evodia rutaecarpa(吴茛菪研究进展). *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践), 2003, 17(3): 62
- 2 XIAO Shi-ying(肖诗鹰). Research and development of the Wuzhuyu decoction(吴茛菪汤的研究与开发). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1999, 24(8): 503
- 3 ChP(中国药典). 2005. Vol (一部): 118
- 4 ZHU Kun-fu(朱坤福). Determination of rutaecarpine in Wuzhuyu granules by TLCs(薄层扫描法测定吴茛菪颗粒剂中吴茛菪次碱的含量). *Shizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2003, 14(6): 337
- 5 YU Zhi-guo(于治国), HOU Xiao-hong(侯晓虹), SHI Ya-min(时雅旻), *et al*. Determination of evodiamine and rutaecarpine in Evodia rutaecarpa and Huatuo Zaizao pill by HPLC(HPLC测定吴茛菪及其制剂中吴茛菪碱和吴茛菪次碱含量). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 1999, 34(10): 691
- 6 GAO Qun(高群), SONG Dian(宋奠). Study on quality standards for Bushen Mingmu oral solution(补肾明目口服液的质量标准研究). *West China J Pharm Sci*(华西药理学杂志), 2002, 17(1): 46

(本文于 2007 年 11 月 22 日收到)

李云龙所长会见 WHO 官员 David Wood 博士和 Ivana Knezevic 博士

2008 年 12 月 9 日,应李云龙所长邀请,WHO 免疫、疫苗和生物制品司司长 David Wood 博士与质量、安全和标准组组长 Ivana Knezevic 博士对我所进行了友好访问。

首先,李云龙所长致辞欢迎 WHO 官员的到访,WHO 官员对我所的热情接待表示感谢。随后,王军志副所长向外宾简要介绍了中检所的职能、组织机构以及我所在生物制品方面与 WHO 合作的进展情况。接着,双方就合作的具体内容进行了会谈。双方一致同意在以下方面进行合作: 1 参加国际标准物质协作标定; 2 相互支持学术交流,加强双方感兴趣的领域的合作; 3 参加 WHO 指南专家会议,分享中检所质量研究成果; 4 承办 WHO 在中国召开的专业会议; 5 培训中方人员。

在会谈中,David Wood 博士非常赞赏我所积极参与国际事务的热情,对我所大力支持 WHO 工作表示感谢,并提议双方进一步加强在生物制品领域的合作与交流,为将来在我所设立 WHO 生物制品质量标准化中心打下良好基础。李云龙所长对此表示赞同并对 WHO 一直以来对我所的支持和帮助表示感谢。

参加此次会见的还有我所外事处李玲处长、生物制品检验处沈琦副处长等。

(中国药品生物制品检定所生检处、外事处供稿)