

文章编号: 1006-2858(2007)10-0631-05

# 中药吴茱萸中生物碱类成分的 HPLC 指纹图谱

杨立芳, 李小燕, 尹显洪

(广西民族大学 化学与生态工程学院, 广西 南宁 530006)

**摘要:** 目的 研究中药吴茱萸中生物碱类成分的 HPLC 特征指纹图谱。方法 应用 HPLC 法分析吴茱萸药材生物碱类成分色谱图。色谱柱: Agilent Extend C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水系(水-四氢呋喃-乙酸, 体积比 48:1:0.1); 洗脱方式: 线性梯度洗脱; 柱温: 35 °C; 流速: 1 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 240 nm; 进样量: 20 μL。理论板数按吴茱萸次碱计算不低于 3 000。结果 10 批不同来源的吴茱萸药材所含生物碱类成分均得到很好的分离, 获得 14 个共有特征峰。结论 HPLC 指纹图谱法能较好地识别吴茱萸药材, 为吴茱萸的质量控制提供了方法学依据。  
**关键词:** 吴茱萸; 生物碱; 高效液相色谱法; 指纹图谱  
中图分类号: R 917 文献标志码: A

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 (*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.) 的未成熟果实。主产广西、贵州等省。味辛、苦, 性温, 有毒<sup>[1]</sup>, 含生物碱、挥发油等成分, 生物碱为其主要活性成分<sup>[2]</sup>。国内外对吴茱萸的研究多集中在对其化学成分、药理性质等方面, 而对其质量控制方面的研究多集中在测定其单一组分的含量, 对吴茱萸综合质量的研究较少<sup>[3-7]</sup>。由于受产地、气候和生态环境等的影响, 中药材中主要成分差异较大, 仅针对其中某一个成分进行定性定量分析, 并不能有效地控制中药材或中成药的质量。目前, 指纹图谱已成为国际公认的控制中成药和天然药物质量的有效手段。甄攀等<sup>[8]</sup>利用 HPLC 法研究了吴茱萸水溶性成分的 HPLC 指纹图谱。而对吴茱萸中的主要成分生物碱类成分的指纹图谱的研究目前国内尚未见报道。作者采用 HPLC 法对不同产地的吴茱萸药材中生物碱类成分进行了指纹图谱研究, 制定了吴茱萸生物碱类成分的 HPLC 指纹图

谱, 为吴茱萸真伪鉴别和质量监控提供了依据。

## 1 仪器与材料

高效液相色谱仪 (Series 200 输液泵、Series 紫外-可见检测器、600 Series Link 接口和色谱工作站, 美国 Perkin Elmer 公司), KQ3200DB 数控超声波清洗器 (江苏昆山超声仪器有限公司), AT-130 柱温箱 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

Agilent Extend C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent Technologies)。

吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品 (中国药品生物制品检验所), 甲醇、乙腈 (色谱纯, 天津四友精细化学品有限公司), 其他试剂 (分析纯, 北京化工厂), 水 (二次蒸馏水, 江苏宜兴勤华石英玻璃仪器厂)。

吴茱萸药材 (供试品) 共 10 批, 购自广西南宁各药店, 经吉林省白山市药品检验所宋文耆主任药师鉴定为芸香科植物吴茱萸 (*Evodiaruta ecarpa* (Juss.) Benth.) 的未成熟果实。供试品来源见表 1。

Table 1 Sources of samples

Sample	Regions	Batch	Sample	Regions	Batch
1	Guizhou	20040917	6	Guangxi	20050717
2	Guangxi	20050414	7	Guiding, Guizhou	20050225
3	Guangxi	20040703	8	Guangxi	20051001
4	Guizhou	20050310	9	Guizhou	20050211
5	Hebei	20040322	10	Guangxi	20050318

收稿日期: 2006-11-16

作者简介: 杨立芳 (1969-), 女 (汉族), 吉林白山人, 硕士研究生, 从事天然产物化学与药理学的研究, Tel. 13977166549, E-mail yanglf1990@163.com.

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件选择与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Extend C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水系(水-四氢呋喃-

乙酸,体积比 48:1:0.1);洗脱方式:线性梯度洗脱(见表2);柱温:35℃;流速:1 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长:240 nm;进样量:20 μL。理论板数按吴茱萸次碱计算不低于3 000。

Table 2 Mobile phase gradient

Step	t/ min	(acetonitrile)/ %	(water-THF-HOAc)/ %
1	0 - 15	25	75
2	15 - 45	33	67
3	45 - 65	57	43
4	65 - 105	64	36
5	105 - 120	83	17

### 2.2 供试品溶液的制备

取各批吴茱萸药材粉末各2.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加适量体积分数为20%的氨水6 mL浸泡过夜,加入氯仿50 mL超声提取3 h;过滤,滤液置50℃水浴上挥干;残渣用甲醇溶解,定容于10 mL的量瓶中,用0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

### 2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取适量的吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品,加入甲醇,超声溶解,待溶解完全后定容,制成0.292 g·L<sup>-1</sup>的吴茱萸碱对照品溶液、0.216 g·L<sup>-1</sup>的吴茱萸次碱对照品溶液,分别用0.45 μm微孔滤膜过滤,作为对照品溶液。

### 2.4 供试品含量测定

精密吸取对照品溶液与供试品溶液各20 μL,注入液相色谱仪,记录120 min色谱图,以吴茱萸次碱的色谱峰(s)的保留时间和峰面积为1,计算其他各峰的相对保留时间和相对峰面积。

### 2.5 方法学考察

#### 2.5.1 精密度实验

取4号供试品的溶液,连续重复进样5次,计算相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各色谱峰相对保留时间的RSD在0.2%~2.2%之间(RSD < 3.0%),相对峰面积的RSD为0.5%~3.0%(RSD < 3.0%)。

#### 2.5.2 稳定性实验

取4号供试品的溶液,分别在0、2.5、7.5、22.5、27.5 h进样检测,各色谱峰的相对保留时间的RSD为0.2%~3.0%(RSD < 3.0%);相对峰

面积的RSD为0.4%~2.9%(RSD < 3.0%)。结果表明,供试品的指纹图谱在27.5 h内稳定。

#### 2.5.3 重复性实验

取4号供试品粉末5份,按“2.2”条方法制得供试品溶液,分别进样检测,计算相对保留时间和相对峰面积。共有色谱峰的相对保留时间的RSD在0.3%~3.0%之间(RSD < 3.0%),相对峰面积的RSD为1.2%~3.0%(RSD < 3.0%),说明本实验方法具有较好的重复性。

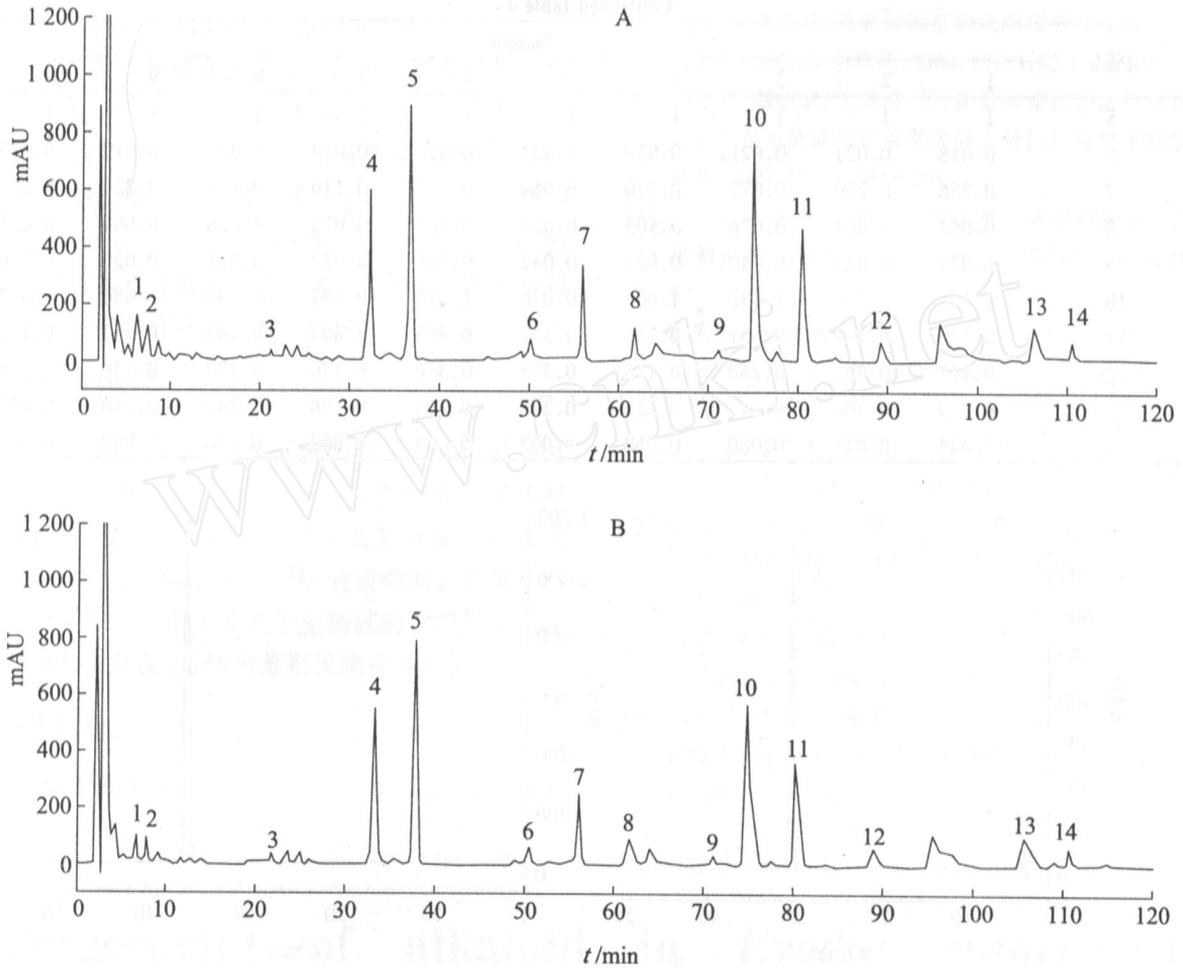
### 2.6 中药吴茱萸生物碱类成分指纹图谱的建立及相似度计算

#### 2.6.1 指纹图谱的建立

取10批不同产地的吴茱萸药材分别按“2.2”条方法制备供试品溶液,进样并记录2 h色谱图。比较各批供试品的色谱图,确定了14个共有峰,色谱图中保留时间(*t<sub>R</sub>*)为36.4 min处的5号色谱峰(吴茱萸次碱)分离良好,保留时间适宜,故选此峰为参照峰,其余各色谱峰均与其比较。供试品及标准品的色谱图见图1、2。各共有色谱峰相对保留时间见表3,各共有峰的相对峰面积见表4。由表4的数据可以反映出不同产地、不同批次的吴茱萸药材中各共有成分含量的差别。

#### 2.6.2 相似度计算

相似度是从量化的角度讨论供试品之间的相关性。相似度常以夹角余弦、相关系数和欧氏距离表示<sup>[9]</sup>。本实验中根据夹角余弦计算峰的相似度,其相似度范围在0.924 4~0.956 2间,已达到指纹图谱相似度的要求(0.9~1.0),结果见表5。



A—Spectrum of No. 4 sample ;B—Spectrum of No. 3 sample

Fig. 1 Fingerprints of alkaloid in *Evodia rutaecarpa*(Juss.) Benth.

Table 3 Relative retention time of HPLC fingerprints of *Evodia rutaecarpa*(Juss.) Benth. samples

Peak	Sample										RSD/ %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.173	0.176	0.170	0.172	0.173	0.173	0.171	0.171	0.171	0.174	1.0
2	0.204	0.208	0.201	0.202	0.201	0.200	0.202	0.201	0.204	0.204	1.2
3	0.586	0.590	0.579	0.582	0.581	0.574	0.586	0.583	0.584	0.584	0.7
4	0.883	0.884	0.881	0.881	0.879	0.878	0.880	0.882	0.884	0.878	0.3
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
6	1.390	1.390	1.364	1.381	1.376	1.356	1.378	1.383	1.381	1.377	0.8
7	1.552	1.547	1.517	1.538	1.535	1.518	1.534	1.536	1.537	1.540	0.8
8	1.716	1.708	1.670	1.702	1.697	1.681	1.695	1.693	1.700	1.701	0.8
9	1.977	1.968	1.922	1.957	1.951	1.929	1.954	1.950	1.956	1.955	0.8
10	2.082	2.075	1.033	2.060	2.066	2.041	2.068	2.057	2.060	2.069	0.7
11	2.235	2.227	2.168	2.209	2.208	2.178	2.208	2.202	2.212	2.211	0.9
12	2.480	2.467	2.399	2.459	2.444	2.417	2.466	2.431	2.455	2.447	1.0
13	2.955	2.944	2.862	2.930	2.916	2.885	2.920	2.897	2.924	2.921	0.9
14	3.077	3.073	2.993	3.044	3.029	2.985	3.039	3.047	3.041	3.036	1.0

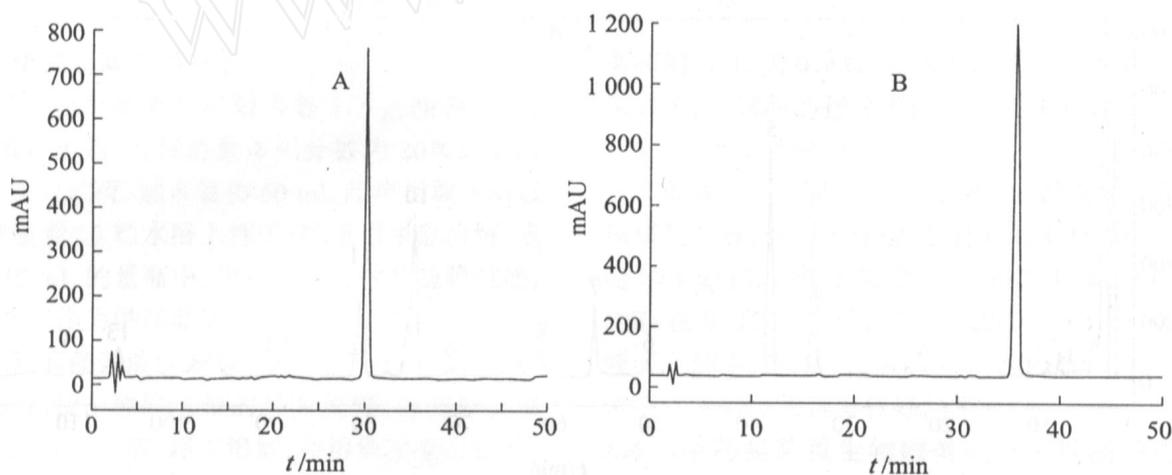
Table 4 Relative peak area of HPLC fingerprints of *Evodia rutaecarpa*(Juss.) Benth. samples

Peak	Sample									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.074	0.207	0.108	0.152	0.218	0.115	0.226	0.169	0.082	0.161
2	0.063	0.106	0.065	0.075	0.100	0.051	0.169	0.090	0.062	0.092
3	0.013	0.013	0.016	0.015	0.037	0.061	0.021	0.028	0.010	0.028
4	1.025	1.006	1.011	0.621	0.601	1.154	0.459	1.213	0.991	0.926

(to be continued)

Continued table 4

Peak	Sample									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	0.018	0.021	0.021	0.030	0.034	0.017	0.048	0.031	0.019	0.023
7	0.256	0.290	0.072	0.270	0.064	0.075	0.116	0.150	0.224	0.066
8	0.063	0.064	0.076	0.103	0.052	0.101	0.075	0.026	0.069	0.055
9	0.027	0.026	0.046	0.025	0.042	0.058	0.027	0.021	0.020	0.040
10	1.114	1.140	1.132	1.001	0.976	1.211	0.987	0.598	1.086	0.977
11	0.556	0.484	0.651	0.720	0.509	0.783	0.604	0.242	0.533	0.480
12	0.115	0.006	0.260	0.118	0.271	0.340	0.170	0.177	0.120	0.288
13	0.269	0.300	0.241	0.261	0.238	0.305	0.196	0.242	0.258	0.013
14	0.044	0.041	0.060	0.058	0.062	0.064	0.069	0.036	0.042	0.047



A—Evodiamine control sample; B—Rutacarpine control sample

Fig. 2 Spectra of control sample

Table 5 Similarity results of fingerprints of crude drugs

Sample	Similarity	Sample	Similarity
1	0.946 9	6	0.944 3
2	0.939 7	7	0.935 4
3	0.937 7	8	0.956 2
4	0.938 5	9	0.948 2
5	0.924 4	10	0.952 8

### 3 讨论

a. 检测波长的选择。在实验过程中,根据供试品的紫外图谱,分别在 225、240、254、290、325 nm 处进行检测。结果表明,检测波长为 240 nm 时,各色谱峰之间分离度好,共有峰多,基线平稳,各峰分布合理,故选择检测波长为 240 nm。

b. 色谱柱的选择。生物碱类物质因碱性较强,所以液相分离较困难。实验中曾试用 Phenomenex Kromasil 氨基柱、pH 范围 2~9 的反向色谱柱,均不能将供试品较好的分离,最后确定采

用 Agilent Extend C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, pH 范围 2~11),指纹图谱中各色谱峰能达到较好的分离。

c. 提取条件的选择。常用的生物碱的提取方法有水或酸水提取法、醇类溶剂提取法、亲脂性有机溶剂提取法。在结合常规提取方法的基础上,采用了体积分数为 20% 的氨水浸泡,氯仿索氏提取。此方法是生物碱的常用提取方法,然而在实验过程中用此法提取出来的供试品的重现性不好,其操作方法也比较烦琐。后先后采用质量分数为 70% 的乙醇浸泡后索氏提取、甲醇浸泡后超声提取等方法,所得色谱图分离效果也均不理想。经多方比较,

最后采用体积分数为 20 % 的氨水浸泡、氯仿超声提取的方法来获得吴茱萸生物碱类成分。

d. 流动相梯度的选择。由于吴茱萸药材中含有近 30 余种生物碱类成分,其结构相近,有些生物碱极性相差不大,这就为流动相梯度的选择带来相当的难度,加之生物碱类成分  $pK_b$  较大,流动相中乙腈和水系的比例稍做调整,对主要峰的分离、分布、峰形等都有着明显的影响。在做了大量的比对工作之后,最终确定了表 2 的梯度程序。

## 4 结论

中药指纹图谱反映了该中药的化学组成及其含量分布状况,可实现对中药的多组分和多指标分析,对鉴别药材的真伪优劣及其稳定性均具有非常重要的参考价值。本实验所得到的色谱指纹图谱反映了中药吴茱萸中生物碱的物质组成及其含量分布状况,可作为鉴别吴茱萸的依据。

### 参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大词典:上册[M]. 上海:上海

科学技术出版社,1985:1118 - 1119.

- [2] 王奇志,梁敬钰. 吴茱萸属植物化学成分和生理活性的研究近况[J]. 中草药,2004,35(8):附7 - 附10.
- [3] 谭生建,赵炳成,王海涛,等. 高效液相色谱法测定戊己丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量[J]. 解放军药学报,2002,18(4):202 - 204.
- [4] 王易宾,卢襄伟,李群,等. 吴茱萸及其炮制品中主要生物碱的高效液相色谱分析[J]. 中药材,1993,16(9):28 - 29.
- [5] 鲁燕侠,蔺兴遥,逯振宇,等. 吴茱萸的化学成分及临床应用[J]. 解放军药学报,2002,18(4):218 - 219.
- [6] 王奇志,梁敬钰,陈军,等. 吴茱萸化学成分研究[J]. 中国药科大学学报,2005,36(6):520 - 522.
- [7] 甄攀,王治宝,白雪梅,等. 吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 HPLC 分析[J]. 中成药,2004,26(3):227 - 229.
- [8] 甄攀,张万明,白雪梅,等. 吴茱萸水溶性成分指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志,2005,40(3):411 - 414.
- [9] 王玺,王文字,张克荣,等. 中药 HPLC 指纹图谱相似性研究的探讨[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(5):360 - 362.

# Fingerprint of alkaloid in *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. by HPLC

YANG Li-fang, LI Xiao-yan, YIN Xian-hong

(Guangxi University for Nationalities, College of Chemistry and Ecology Engineering, Nanning 530006, China)

**Abstract:** **Objective** To study the HPLC fingerprints of alkaloid in *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. and establish HPLC standard fingerprints chromatogram. **Methods** Chromatographic method of alkaloid in *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. was established by using HPLC. **Results** Fingerprints consisted of 14 common characteristic peaks in 10 samples from different areas. **Conclusions** This method is accurate, reliable and provides a scientific basis for the control of the quality of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.

**Key words:** *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.; alkaloid; HPLC; fingerprint