

吴茱萸药材 HPLC 含量测定方法的优化

黄志芳¹, 易进海^{1*}, 吴燕², 刘云华¹, 陈燕¹, 刘玉红¹

(1. 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的: 优化吴茱萸药材 HPLC 含量测定方法。方法: 流动相 [乙腈-四氢呋喃 (25:15)] -0.02% 磷酸水溶液 (35:65), 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 220 nm。结果: 柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱色谱峰与其它色谱峰分离良好, 样品中柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱色谱峰的 DAD 光谱与对照品基本一致, 进样量在 0.196 8 ~ 3.936, 0.153 6 ~ 3.072, 0.097 4 ~ 1.948 μg 线性关系良好, 平均回收率分别为 97.8%, 100.7%, 98.4%, RSD 分别为 1.7%, 1.3%, 1.1% (n=6)。结论: 建立的吴茱萸药材 HPLC 含量测定方法, 测定结果准确, 可信。

[关键词] 吴茱萸; HPLC; 含量测定; 柠檬苦素; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱

吴茱萸药材为芸香科植物吴茱萸 *Evodia 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 的干燥近成熟果实, 具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻等功效, 常用于治疗厥阴头痛、寒疝腹痛、呕吐吞酸等^[1]。吴茱萸主要有效成分为生物碱类和柠檬苦素类, 其中吴茱萸碱和吴茱萸次碱, 具有镇痛和抗炎作用^[2], 柠檬苦素具有调节体内胆固醇水平, 防止动脉粥样化和除虫等作用^[3]。2010年版药典一部吴茱萸药材标准中测定了柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量, 在按照药典标准进行测定过程中, 作者发现柠檬苦素色谱峰 DAD 光谱与对照品光谱不一致, 因此, 本文对吴茱萸药材含量测定 HPLC 色谱条件进行优化研究, 并用不同品牌的色谱柱进行验证。本法测定结果准确、可信, 为吴茱萸药材的质量控制提供可靠的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (包括四元泵, DAD 检测器, 柱温箱, 自动进样器, 工作站); KQ-100 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); 岛津 AUW220D 型 1/10 万电子天平。乙腈、四氢呋喃为

美国 Tedia 色谱纯; 水为纯净水; 其余试剂均为分析纯。

柠檬苦素对照品 (批号 110800-200404)、吴茱萸碱对照品 (批号 110801-200304)、吴茱萸次碱对照品 (批号 110802-200505) 购于中国药品生物制品检定所。吴茱萸药材采自贵州、重庆、四川、湖南、江西、广西等地, 由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为芸香科植物吴茱萸 *E. rutaecarpa*, 石虎 *E. rutaecarpa* var. *officinalis* 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* var. *bodinieri* 的干燥近成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 [乙腈-四氢呋喃 (25:15)] -0.02% 磷酸水溶液 (35:65); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 220 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL; 理论塔板数按柠檬苦素峰计算不少于 3 000。

2.2 供试品溶液的制备^[1] 取本品粉末 (过 3 号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 乙醇 25 mL, 称定重量, 浸泡 1 h, 超声处理 (功率 100 W, 频率 40 kHz) 40 min, 放冷, 再称重, 用 80% 乙醇补足失重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

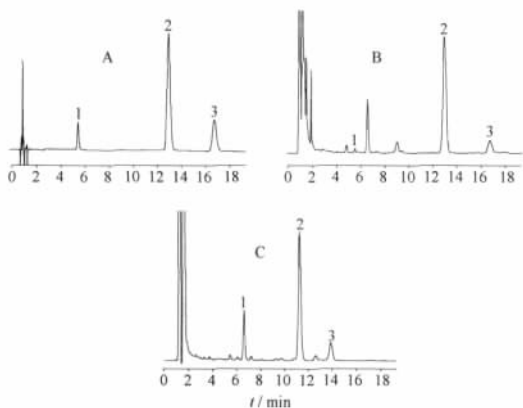
2.3 对照品溶液的制备 精密称取柠檬苦素 9.84 mg、吴茱萸碱 7.68 mg 和吴茱萸次碱 4.87 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取上述对照品溶液各 2.0 mL 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含柠檬苦素 0.196 8 mg、吴茱萸碱 0.153 6 mg、吴茱萸次碱 0.097 4 mg 的混合对照品溶液。

[稿件编号] 20100419006

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2009CB522804)

[通信作者] * 易进海, 研究员, Tel: (028) 85210843, E-mail: yijinzhai@Yahoo.com.cn

2.4 药典色谱条件与本文色谱条件 HPLC 图谱比较 分别采用 2010 版《中国药典》色谱条件 [流动相为乙腈-水-四氢呋喃-冰醋酸(41:59:1:0.2)] 和本文色谱条件,应用不同品牌色谱柱,对同一样品进行分离测定,HPLC 图谱见图 1,含量测定结果见表 1。由结果可知,采用不同条件、不同色谱柱,对同一样品进行测定,吴茱萸碱和次碱的含量无显著性差异,但柠檬苦素的含量差异较大。根据 DAD 光谱推断,采用药典色谱条件进行测定时,柠檬苦素色谱峰不纯,因而造成测定结果偏高,且不同色谱柱分离状况基本一致。采用本文色谱条件进行测定,柠檬苦素色谱峰 DAD 光谱与对照品基本一致,不同色谱柱分离状况良好。



A. 对照品; B. 样品(本文色谱条件); C. (药典色谱条件);
1. 柠檬苦素; 2. 吴茱萸碱; 3. 吴茱萸次碱。
图 1 不同色谱条件下的 HPLC 图

表 1 不同色谱条件及不同品牌色谱柱含量测定结果比较 %

色谱条件	色谱柱	柠檬苦素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
药典条件	Agilent Eclipse C ₁₈	6.88	1.289	0.278
	Supelco Discovery C ₁₈	6.78	1.305	0.276
	Phenomenex Luna C ₁₈	6.85	1.318	0.284
本文条件	Agilent Eclipse C ₁₈	0.578	1.303	0.282
	Supelco Discovery C ₁₈	0.583	1.326	0.289
	Phenomenex Luna C ₁₈	0.574	1.314	0.287

2.5 线性关系 分别精密吸取上述混合对照品溶液 1,2,5,10,15,20 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标进行线性回归,得到柠檬苦素的回归方程 $Y = 334.71X + 0.84$, $r = 0.9998$; 吴茱萸碱回归方程 $Y = 8981.36X + 1.39$, $r =$

0.9998; 吴茱萸次碱回归方程 $Y = 5579.82X + 1.47$, $r = 0.9999$ 。结果表明,柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱进样量分别在 0.1968 ~ 3.936, 0.1536 ~ 3.072, 0.0974 ~ 1.948 μg 线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密吸取供试品溶液(No. 1) 10 μL,连续进样 6 次,记录峰面积,柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD 分别为 0.80%, 0.30%, 0.50%,表明仪器精密度好。

2.7 重复性试验 取药材粉末(No. 1) 6 份,按 2.2 项下制成供试品溶液,精密吸取供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进行检测,记录峰面积,计算含量。柠檬苦素的平均质量分数 0.576% (RSD 1.4%); 吴茱萸碱的平均质量分数 1.298% (RSD 1.2%); 吴茱萸次碱的平均质量分数 0.283% (RSD 0.90%) ($n = 6$)。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液于 0,1,2,4,8,24 h 进样测定,柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 0.90%, 0.30%, 0.60%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 回收率试验 取已知含量的吴茱萸药材粉末(No. 1) 6 份,精密称取 0.25 g,分别精密加入一定量的柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,依法测定,计算加样回收率。柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的平均回收率分别为 97.8%, 100.7%, 98.4%, RSD 分别为 1.7%, 1.3%, 1.1% ($n = 6$)。

2.10 含量测定 吴茱萸药材 24 批,分别按 2.2 项下方法制成供试品溶液,依法测定,计算吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的含量,见表 2。

3 讨论

3.1 流动相的选择 参考文献 [4-6],本试验曾试用乙腈-水、甲醇-乙腈-水-磷酸、乙腈-甲醇-水(含 2% 四氢呋喃和 0.4% 冰醋酸)等流动相系统,但柠檬苦素的分离效果均不理想。经进一步优化最终确定了本文所述流动相,在此色谱条件下,柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱色谱峰与其它色谱峰分离良好,样品中柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱色谱峰的 DAD 光谱与对照品基本一致,且在 3 种不同品牌的色谱柱均可实现 3 种成分的基线分离。

3.2 检测波长的选择 2010 年版《中国药典》采用 225 nm 作为检测波长,本文采用二极管阵列检测器考察,结果显示吴茱萸碱、吴茱萸次碱 220 nm 的峰

表 2 吴茱萸药材中 3 个被测成分质量分数 (n=3) %

No.	基源	采集地	吴茱萸 萸碱	吴茱萸 次碱	柠檬 苦素
1	吴茱萸	重庆荣昌县安富镇沙河村	1.298	0.283	0.576
2		广西南宁市茅桥植物园	0.297	0.278	0.472
3		重庆荣昌县安富镇石庙村	1.237	0.277	0.719
4		重庆酉阳县板溪乡	0.039	0.035	1.219
5		重庆秀山县城关吴茱萸种植基地	0.544	0.141	0.234
6		重庆南川县三泉镇黄草坪	0.051	0.026	0.451
7		重庆南川县三泉镇石门沟	0.415	0.131	0.534
8		重庆合川县铜溪吴茱萸种植基地	2.063	0.516	0.174
9		四川通江县铁溪镇	0.303	0.184	0.593
10		四川宜宾筠连县团林村	1.420	0.456	0.288
11		四川攀枝花市米易县普威乡	1.163	0.801	0.070
12	疏毛 吴茱萸	贵州铜仁市印江县	1.644	0.359	0.392
13		贵州松桃县正大吴茱萸 GAP 种 种植基地	0.101	0.080	1.626
14		贵州玉屏县	1.679	0.373	0.378
15		湖南新晃县黄雷乡赶水村	0.757	0.252	0.592
16		贵州铜仁市川洞乡	0.065	0.075	1.551
17		湖南新晃县凉伞乡	0.769	0.264	0.587
18	石虎	湖南新晃县黄雷乡赶水村	0.722	0.214	0.951
19		湖南新晃县凉伞乡	1.139	0.279	0.637
20		贵州玉屏县城关镇	1.056	0.268	0.677
21		贵州松桃县正大吴茱萸 GAP 种 种植基地	0.687	0.204	0.905
22		重庆市秀山县史目村	0.200	0.111	1.692
23		四川平武县锁江镇	1.109	0.199	0.163
24		江西瑞昌市南阳乡	0.131	0.107	1.490

面积和 225 nm 差不多,而柠檬苦素 220 nm 的峰面积则比 225 nm 大了 1 倍多,为保证所测 3 种成分均有较大响应值,故选择 220 nm 作为检测波长。

3.3 提取方法的考察 比较了回流和超声 2 种提

取方法,结果表明 2 种方法无明显差异,故选择操作简便的超声提取。此外,还考察了甲醇、80% 乙醇和乙醇对提取效果的影响,结果表明以 80% 乙醇作为提取溶媒各成分含量最高。

3.4 本文测定结果显示,不同产地和品种吴茱萸药材中吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素的含量均有一定的差异,但吴茱萸、疏毛吴茱萸和石虎 3 个基源中各成分的含量幅度无明显差异,表明吴茱萸药材中 3 种主要有效成分的含量与品种基源无相关性,从而印证了现行版中国药典吴茱萸药材项下同时收入吴茱萸、疏毛吴茱萸和石虎的合理性。此外,根据测定结果还可以看出,吴茱萸药材中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的总量与柠檬苦素的含量呈现负相关趋势,与文献报道一致^[5]。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 160.
- [2] 战光绪,吴大正,胡之壁,等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 上海中医药杂志,2006,40(2): 62.
- [3] 施英,徐玉娟,陈卫东,等. 桔核中柠檬苦素类物质最佳提取条件的探讨及清除 DPPH 活性的研究[J]. 食品与机械,2006,22(6): 74.
- [4] 段朝辉,张红梅,朱恩园,等. 吴茱萸质量标准研究——TLC 指纹图谱鉴别及 HPLC 测定吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量[J]. 上海中医药杂志,2008,42(5): 86.
- [5] 洪玉梅,王智民. HPLC 测定吴茱萸及其炮制品中吴茱萸内酯的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(20): 1726.
- [6] 莫善列,李战,欧莹,等. 吴茱萸高效液相色谱指纹图谱的研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(11): 2229.

Optimization of a HPLC determination method for *Evodia rutaecarpa*

HUANG Zhifang¹, YI Jinhai^{1*}, WU Yan², LIU Yunhua¹, CHEN Yan¹, LIU Yuhong¹

(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China)

[Abstract] A HPLC method for determination of limonin, evodiamine and rutaecarpine in *Evodia rutaecarpa* was optimized. The mobile phase was [acetonitrile-tetrahydrofuran (25: 15)]-0.02% H₃PO₄ (35: 65). The detection wavelength was 220 nm and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. Limonin, evodiamine and rutaecarpine were all well separated from other substances and their UV spectrums were essentially the same to the standards. The liner ranges of limonin, evodiamine and rutaecarpine were 0.196 8-3.936, 0.153 6-3.072, 0.097 4-1.948 μg. The average recoveries were 97.8%, 100.7% and 98.4%. RSD were 1.7%, 1.3% and 1.1% (n=6). The method of this article is accurate, reproducible and can be used to enhance the quality control of *E. rutaecarpa*.

[Key words] *Evodia rutaecarpa*; HPLC; determination; limonin; evodiamine; rutaecarpine

doi: 10.4268/cjcm20110422

[责任编辑 王亚君]