

贵州和浙江产吴茱萸指纹图谱分析及含量测定

张红梅¹, 李国², 宋龙¹, 赵志礼¹, 王长虹^{1,3}, 王峥涛^{1,3*}

(1. 上海中医药大学中药学院, 中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203;

2. 浙江星光农业开发有限公司, 浙江 平阳 325400; 3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201210)

[摘要] 目的:应用 UPLC-UV 指纹图谱方法,结合吴茱萸中有效成分柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量测定,评价不同品种及产地的吴茱萸药材质量,为控制市场上吴茱萸药材质量提供依据。方法:采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相乙腈-水梯度洗脱,流速 0.5 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 25 °C。收集了 24 批不同产地不同种吴茱萸样品进行指纹图谱分析,结合主成分分析及有效成分含量测定,对吴茱萸药材整体质量进行评价。结果:建立了吴茱萸 UPLC-UV 指纹图谱,标定了 9 个共有峰。指纹图谱相似度评价结果显示贵州产吴茱萸质量较稳定、统一,浙江产吴茱萸质量稍不统一。主成分分析结果表明,吴茱萸药材不同种之间成分上存在差异性。产地对吴茱萸药材中柠檬苦素和生物碱含量有影响。结论:指纹图谱结合有效成分含量测定的方法可用于吴茱萸药材的整体质量评价,对吴茱萸药材的品种鉴定及质量控制具有指导意义。

[关键词] 吴茱萸; 柠檬苦素; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 指纹图谱; 主成分分析; 超高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0069-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170069

Fingerprint and Content Determination of Euodiae Fructus Collected in Guizhou and Zhejiang

ZHANG Hong-mei¹, LI Guo², SONG Long¹, ZHAO Zhi-li¹, WANG Chang-hong^{1,3}, WANG Zheng-tao^{1,3*}

(1. The Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Ministry of Education, Institute of Chinese Materia Medica, College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai University of

TCM, Shanghai 201203, China; 2. Zhejiang Starlight Agricultural Development Co. Ltd,

Pingyang 325400, China; 3. Shanghai R&D Centre for Standardization of TCM, Shanghai 201210, China)

[Abstract] **Objective:** This study was performed to evaluate the quality of Euodiae Fructus from different varieties and locations and to provide the foundation for quality control it in the market by UPLC-UV fingerprint and content determination of active compounds of limonin, evodiamine and rutaecarpine. **Method:** The separation was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) with gradient elution using acetonitrile-water as mobile phase. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹. UV detecting wavelength was set at 210 nm, and column temperature was set at 25 °C. The holistic quality of 24 samples were evaluated by fingerprint combined with unsupervised principal component analysis (PCA). The three active compounds in 24 samples collected from different varieties and locations were determined. **Result:** An ultra-performance liquid chromatographic method was established for fingerprint analysis, and nine peaks in UPLC profile were found as the same. The result of fingerprint similarity evaluation showed that the quality of Euodiae Fructus collected from Guizhou was stable and consistent, however, that from Zhejiang was inconsistent slightly. The result of PCA showed that there is difference in the components of Euodiae Fructus from different varieties. The contents of limonin, evodiamine and

[收稿日期] 20131201(006)

[基金项目] 上海市卫生局青年科研项目(20114y022)

[第一作者] 张红梅, 博士, 副教授, 从事中药活性成分与质量标准研究, Tel:13916041712, E-mail:naturecolor@163.com

[通讯作者] * 王峥涛, 博士, 教授, 从事中药材资源、鉴定、活性成分与质量标准研究, Tel:021-51322505, E-mail:wangzht@hotmail.com

rutaecarpine in *Euodiae Fructus* were influenced by locations. **Conclusion:** The fingerprint analysis combined with the content determination of active compounds was available for holistic quality evaluation of *Euodiae Fructus*, which is directive is directive significance to origin identification and quality control of *Euodiae Fructus*.

[**Key words**] *Euodiae Fructus*; limonin; evodiamine; rutaecarpine; fingerprint; principal component analysis; UPLC

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸、石虎和疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实^[1],为临床常用中药,市场上吴茱萸主要来源于贵州、湖南、湖北、浙江、广西、安徽等地,贵州被认为是吴茱萸的道地产区^[2]。近些年由于商品市场上对中药材的需求量不断增大,吴茱萸药材的价格也不断升高,一些地区如浙江省也开始大面积栽培吴茱萸。目前对道地产区贵州与其他地区生产的吴茱萸药材进行整体质量评价的报道较少^[3-4],指纹图谱分析方法在吴茱萸质量评价中已有应用,柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱被认为是吴茱萸临床应用的药用物质基础^[5-6]。本文采用 UPLC 指纹图谱及主成分分析法结合有效成分含量测定评价贵州和浙江产不同种吴茱萸的整体质量,探讨品种和产地因素对

吴茱萸药材质量的影响,为控制市场上吴茱萸药材的质量提供依据。

1 仪器与试药

Acquity 型 UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(二极管阵列检测器,美国 Waters 公司),中药指纹图谱相似度评价系统 2.0 版,多变量统计分析软件 MVSP 3.1, CP225D 型分析天平(Sartorius)。

吴茱萸碱(批号 MUST-10110305)、吴茱萸次碱(批号 20110878)、柠檬苦素(批号 20110506)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司,乙腈(色谱纯),水(杭州娃哈哈)。

样品采集于贵州龙溪、白沙、铜仁、赫章及浙江平阳、磐安、缙云、安吉,经张红梅博士鉴定符合《中国药典》规定,见表 1。

表 1 吴茱萸样品来源

No.	编号	产地	种
1	100813-gzlx-2	贵州龙溪	疏毛吴茱萸 <i>Euodia rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
2	100813-gzlx-8	贵州龙溪	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
3	100915-gzlx	贵州龙溪	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
4	100920-gzlx	贵州龙溪	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
5	100813-gzlx-sh	贵州龙溪	石虎 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>officinalis</i>
6	0909-gzbs	贵州白沙	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
7	1009-gzbs	贵州白沙	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
8	100814-gztr-1	贵州铜仁	-
9	100814-gztr-2	贵州铜仁	-
10	090813-gzhz	贵州赫章	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
11	080700-zjwz	浙江平阳	-
12	090721-zjwz	浙江平阳	-
13	100713-zjpy-6	浙江平阳	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
14	100713-zjpy-7	浙江平阳	-
15	100713-zjpy-8	浙江平阳	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
16	100713-zjpy-11	浙江平阳	石虎 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>officinalis</i>
17	100713-zjpy-12	浙江平阳	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
18	100714-zjpy-3	浙江平阳	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
19	100816-zjwa	浙江平阳	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
20	100723-zjpy-5	浙江平阳	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
21	100718-zjpa	浙江磐安	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
22	100718-zjyy	浙江缙云	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
23	100724-zjaj	浙江安吉	吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i>
24	100724-zjaj-1	浙江安吉	吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i>

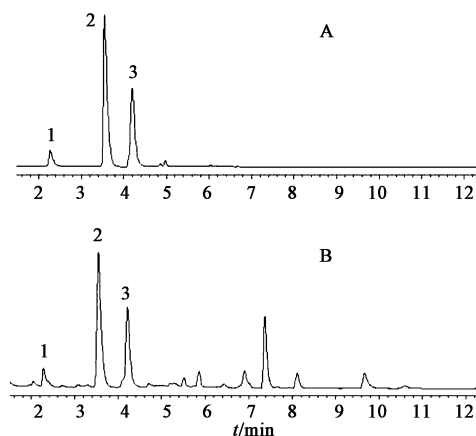
注:“-”样品信息不足,未定种。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (表 2), 柱温 25 °C, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 检测波长 210 nm, 进样量 1 μL。见图 1。

表 2 流动相梯度洗脱程序

t/min	水/%	乙腈/%
0	55	45
3	55	45
4	25	75
12	25	75



A. 混合对照品; B. 样品;

1. 柠檬苦素; 2. 吴茱萸碱; 3. 吴茱萸次碱

图 1 吴茱萸样品 UPLC

2.2 指纹图谱相似度评价 取 24 份吴茱萸药材样品, 制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 进行 UPLC-UV 分析。应用指纹图谱相似度评价软件对样品指纹图谱进行比较, 并进行校正匹配, 确定 9 个共有峰, 见图 2。以标准指纹图谱为参照, 取中位数, 将 24 份样品的 cdf 数据导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版》软件进行处理, 计算其相似度, 并分别进行贵州产和浙江产吴茱萸样品指纹图谱相似度分析, 结果见表 3。

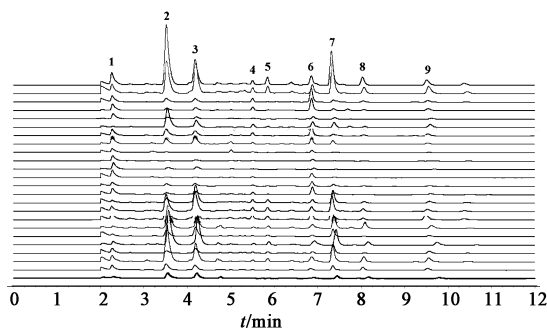


图 2 24 份吴茱萸样品匹配后指纹谱

2.3 主成分分析 通过样品测定, 得到 24 份样品的 UPLC-UV 图谱, 确定 9 个共有峰, 将保留时间和相对峰面积制成相应格式的 Excel 表导入 MVSP 软件进行主成分分析, 结果见图 3。

表 3 吴茱萸样品指纹图谱相似度分析

No.	相似度	贵州产样品相似度	浙江产样品相似度
1	0.895	0.966	
2	0.949	0.953	
3	0.957	0.966	
4	0.676	0.820	
5	0.900	0.980	
6	0.900	0.944	
7	0.872	0.962	
8	0.959	0.974	
9	0.955	0.989	
10	0.808	0.867	
11	0.680		0.806
12	0.794		0.914
13	0.425		0.591
14	0.654		0.729
15	0.464		0.585
16	0.434		0.575
17	0.910		0.932
18	0.842		0.927
19	0.889		0.902
20	0.681		0.811
21	0.622		0.746
22	0.672		0.803
23	0.956		0.947
24	0.945		0.932
对照指纹图谱	1.000	1.000	1.000

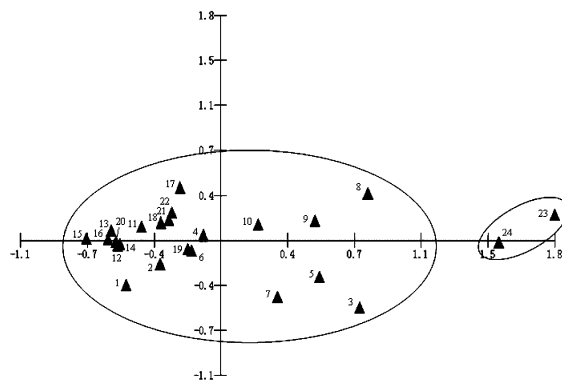


图 3 24 份吴茱萸样品的主成分分析

2.4 柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取柠檬苦素、吴

茱萸碱、吴茱萸次碱对照品适量,用 80% 乙醇溶解并稀释制成 0.662,0.512,0.204 g·L⁻¹的对照品储备液。

2.4.2 供试品溶液的制备 取样品粉末(过 3 号筛)约 0.2 g,精密称定,置锥形瓶中,加入 80% 乙醇 20 mL,浸泡 1 h,超声处理 40 min,放冷,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,备用。

2.4.3 线性关系考察 精密移取对照品储备液 2 mL,置 5 mL 量瓶中,用 80% 乙醇稀释定容,制得含柠檬苦素 0.662 0,0.264 8,0.105 9,0.042 4,0.016 9,0.006 8 g·L⁻¹,吴茱萸碱 0.512 0,0.102 4,0.041 0,0.016 4,0.006 6,0.002 6 g·L⁻¹,吴茱萸次碱 0.204 0,0.081 6,0.032 6,0.013 1,0.005 2,0.000 8 g·L⁻¹的系列对照品溶液。以质量浓度为横坐标(X, g·L⁻¹),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。得回归方程 $Y_{\text{柠檬苦素}} = 7.85 \times 10^5 X + 3.24 \times 10^3$ ($r = 0.999 9$), $Y_{\text{吴茱萸碱}} = 1 \times 10^7 X - 1.5 \times 10^4$ ($r > 0.999 9$), $Y_{\text{吴茱萸次碱}} = 1 \times 10^7 X + 4.9 \times 10^3$ ($r = 0.999 9$)。表明柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱分别在 0.006 8 ~ 0.662 0,0.002 6 ~ 0.512 0,0.000 8 ~ 0.204 0 μg 与峰面积的线性关系良好。

2.4.4 精密度试验 精密吸取同一样品溶液,重复进样 5 次,测定峰面积值,柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 0.30%,0.60%,0.84%。结果表明,仪器精密度良好。

2.4.5 重复性试验 取同一样品按照“供试品溶液的制备”方法平行制备 6 份,在相同色谱条件下进样分析,得柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 2.12%,2.14%,1.42%。结果表明样品制备方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验 取同一份样品溶液,室温下放置,分别在 1,2,4,8,16,24 h 时进样检测,测定峰面积值,得柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰面积的 RSD 分别为 1.78%,2.05%,1.66%。结果表明,样品在室温下 24 h 内稳定。

2.4.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一吴茱萸样品 9 份,各约 0.2 g,分别按 80%,100%,120% 三个水平精密加入柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品适量,按供试品溶液制备方法制备,在上述色谱条件下进样分析,计算加样回收率。结果见表 4。

表 4 吴茱萸中柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的加样回收率

化合物	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
柠檬苦素	0.200 5	2.21	1.83	3.99	97.92	97.35	2.09
	0.200 5	2.21	2.28	4.46	99.05		
	0.200 2	2.20	2.53	4.62	95.10		
吴茱萸碱	0.200 5	0.75	0.60	1.33	97.15	98.55	1.33
	0.200 5	0.75	0.79	1.54	99.75		
	0.200 2	0.75	0.95	1.69	98.78		
吴茱萸次碱	0.200 5	1.21	1.01	2.19	97.55	98.91	2.64
	0.200 5	1.21	1.29	2.53	101.93		
	0.200 2	1.21	1.43	2.61	97.28		

2.4.8 样品测定 精密吸取供试品溶液 1 μL,在上述色谱条件下进样分析,记录色谱图,根据标准曲线回归方程计算 24 份样品中柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量。结果见表 5。

3 讨论

通过比较乙腈-水以及乙腈-磷酸水溶液体系的色谱峰情况进行流动相的选择,发现乙腈-水溶液系统分析的色谱峰峰型较好,且溶液配制简便,故确定以乙腈-水溶液体系作为流动相。

2010 年版《中国药典》规定,吴茱萸含柠檬苦素的量不得少于 1.0%,含吴茱萸碱和吴茱萸次碱的总量不得少于 0.15%。通过对所收集的吴茱萸样品进行含量测定,发现收集于贵州的 10 份药材中有 6 份样品(1,2,5,6,7,10 号)的指标成分含量不符

合《中国药典》规定,且不合格原因均为柠檬苦素的含量不达标。而收集于浙江的 14 份药材中有 8 份样品(11,13,14,15,16,19,20,21 号)的指标成分含量不符合《中国药典》规定,除 19 号样品为柠檬苦素含量不合格外,其余不合格样品均为吴茱萸碱和吴茱萸次碱的总量不达标。从含量测定结果可知,贵州产吴茱萸药材的生物碱含量较高,而浙江产吴茱萸药材的柠檬苦素含量较高,说明产地对吴茱萸样品的质量有一定影响。此外,所收集的 24 份吴茱萸药材中有 14 份指标成分的含量不符合《中国药典》规定,属于劣药,商品市场上吴茱萸药材质量不统一。

收集的 24 份吴茱萸样品的相似度在 0.425 ~ 0.959,相似度值有一定的差异。来自贵州药材的相

表5 吴茱萸药材中柠檬苦素、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量测定($n=3$) %

No.	柠檬苦素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	吴茱萸碱和吴茱萸次碱总量
1	0.215 3 *	0.137 8	0.172 9	0.310 7
2	0.995 0 *	0.166 1	0.147 0	0.313 1
3	1.414 9	0.961 1	0.624 9	1.586 0
4	1.043 3	- ¹⁾	0.187 6	0.187 6
5	0.639 0 *	0.835 9	0.887 0	1.722 9
6	0.240 3 *	0.163 4	0.292 6	0.456 0
7	0.194 9 *	0.587 1	0.333 1	0.920 2
8	1.399 1	0.414 1	0.592 9	1.007 0
9	1.102 5	0.376 8	0.597 9	0.974 7
10	0.207 1 *	0.094 7	0.536 6	0.631 3
11	1.383 3	0.059 2	0.084 2	0.143 4 *
12	1.060 1	0.075 1	0.075 0	0.150 1
13	1.638 5	-	-	- *
14	1.621 1	0.047 9	0.053 8	0.101 7 *
15	1.553 4	-	0.025 8	0.025 8 *
16	1.123 8	-	-	- *
17	1.835 4	0.123 8	0.241 2	0.365 0
18	1.452 5	0.158 1	0.143 2	0.301 3
19	0.004 4 *	0.494 6	0.241 4	0.736 0
20	1.670 1	0.052 4	0.056 2	0.108 6 *
21	1.300 1	0.059 7	0.083 4	0.143 1 *
22	1.594 9	0.094 6	0.102 3	0.196 9
23	1.812 5	0.749 6	0.971 9	1.721 5
24	3.636 5	1.490 9	0.828 5	2.319 4

注:“*”表示含量测定结果不符合2010年版《中国药典》规定;“-”未检测到此成分。

似度在0.867~0.989,而来自浙江药材的相似度在0.575~0.947。结果表明,贵州产吴茱萸质量较稳

定、统一;浙江产吴茱萸质量稍不统一。

通过24份样品的主成分分析结果发现,23,24号浙江安吉产吴茱萸样品距离较近,而与其他样品石虎及疏毛吴茱萸较远,表明吴茱萸种的整体质量与石虎、疏毛吴茱萸种的整体质量有较大差异;石虎和疏毛吴茱萸这两个种的整体质量较接近。吴茱萸药材不同种之间成分上存在差异性。

8,9,11,12,14号样品未采集到原植物样品,不能根据植株器官形态特征进行基源鉴定。根据主成分分析结果,这5份样品位于石虎及疏毛吴茱萸散点中,推测这5份样品可能为石虎或疏毛吴茱萸。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:160.
- [2] 王承南,王红娟,李平,等. 不同产区三种吴茱萸有效成分的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(8):86.
- [3] 洪玉梅,蔡嵩,高慧敏,等. 中药吴茱萸 RP-HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药学杂志,2006,41(12):895.
- [4] 吴燕,黄志芳,舒光明,等. 吴茱萸指纹图谱研究和3种成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,2010,35(24):3329.
- [5] Zhang H M, Wang C H, Wang Z T. Simultaneous analysis of protoberberine and indolequinoline alkaloids in Zuojin pill extract by high-performance liquid chromatography [J]. Acta Chromatogr, 2013, 25(3):589.
- [6] Zhang H M, Wang C H, Cheng X M, et al. Simultaneous determination of limonin, evodiamine and rutaecarpine in Fructus Evodiae by highperformance liquid chromatography[J]. Asian J Trad Med, 2008, 3(5):163.

[责任编辑 顾雪竹]