

## 炮制辅料吴茱萸汁的质量标准

韩旭阳<sup>1,2</sup>, 边宝林<sup>1</sup>, 李娆娆<sup>1\*</sup>, 王智民<sup>1</sup>, 闫利华<sup>1</sup>, 麻印莲<sup>1</sup>, 方婧<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京市中医研究所, 北京 100010)

**[摘要]** 目的: 建立吴茱萸汁的质量标准。方法: 采用薄层色谱法(TLC)对吴茱萸汁进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量, Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-水-四氢呋喃-冰醋酸(40:60:1:0.2)为流动相, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 吴茱萸内酯、吴茱萸碱检测波长为 225 nm、吴茱萸次碱检测波长为 343 nm。结果: 薄层鉴别专属性强, 重复性良好。吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱分别在 0.12 ~ 8.10 ( $r=0.999\ 9$ ), 0.028 ~ 1.80 ( $r=0.999\ 8$ ), 0.012 ~ 0.75 μg ( $r=0.999\ 9$ ) 线性关系良好。平均回收率和 RSD 依次为 101.49%, 2.21%; 102.65%, 1.51%; 100.47%, 2.42% ( $n=6$ )。结论: 方法简便, 可靠, 可操作性强, 适用于吴茱萸汁炮制辅料的质量控制。

**[关键词]** 吴茱萸汁; 薄层色谱; 高效液相色谱仪; 质量标准

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0132-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013170132

## Quality Standard for Evodiae Juice, an Adjuvant Material of Processing

HAN Xu-yang<sup>1,2</sup>, BIAN Bao-lin<sup>1</sup>, LI Rao-rao<sup>1\*</sup>, WANG Zhi-min<sup>1</sup>, YAN Li-hua<sup>1</sup>, MA Yin-lian<sup>1</sup>, FANG Jing<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100010, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the quality standard for Evodiae juice, an adjuvant material of

**[收稿日期]** 20130118(004)

**[基金项目]** 北京市自然科学基金项目(7112097); 中国中医科学院自选课题(ZZ2006096)

**[第一作者]** 韩旭阳, 硕士, 从事中药饮片质量标准研究, E-mail: rubyhxy@163.com

**[通讯作者]** \*李娆娆, 博士, 副研究员, 从事中药炮制研究, Tel: 010-64014411-2975, E-mail: leeraorao@163.com

采用了高效液相色谱-蒸发光散射检测器法, 该方法无干扰, 重复性好, 且灵敏稳定, 适用于养血益肾胶囊中黄芪甲苷的含量测定。

### [参考文献]

- [1] 邱勇波, 刘锦, 武飞. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国疗养医学, 2011, 20(5): 435.
- [2] 李发美, 熊志立, 鹿秀梅, 等. 中药质量控制的研究策略和色谱技术[J]. 色谱, 2006, 24(6): 537.
- [3] 王慧森, 刘明, 李更生. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法在中药研究中的应用[J]. 中医研究, 2008, 21(8): 61.
- [4] 杨胜, 张定堃, 苏柘僮, 等. 中药复方制剂质量控制的研究[J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(5): 387.
- [5] 张莲珠, HPLC 测定黄芪甲苷概况[J]. 中成药, 2005,

27(5): 587.

- [6] 李代晓, 吕英超, 李云霞. 高效液相色谱蒸发光散射检测器测定复方石韦片中黄芪甲苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 93.
- [7] 陈洪英, 刘显峰. 老年咳喘片的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 80.
- [8] 潘涛, 文晓柯, 欧阳波, 等. 胎乐颗粒中黄芪甲苷的提取工艺研究[J]. 中医药导报, 2012, 9(7): 107.
- [9] 贾媛, 恽菲, 常星洁, 等. 多指标优选芪葵颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 28.
- [10] 刘明, 王慧生, 李更生. 正交试验优选强心胶囊制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 47.

[责任编辑 顾雪竹]

processing. **Method:** The Evodiae juice was identified by TLC. The content of evodin, evodiamine and rutaecarpine in the Evodiae juice was determined by HPLC simultaneously. The column of Agilent C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-water-tetrahydrofuran-glacial acetic acid (40:60:1:0.2). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The wavelength was set at 225 nm for evodin and evodiamine, 343 nm for rutaecarpine. **Result:** TLC pots were clear with strong specificity, good repeatability and easy identification. While the linear range of evodin, evodiamine and rutaecarpine were 0.12-8.10 μg ( $r=0.9999$ ), 0.028-1.80 μg ( $r=0.9998$ ), 0.012-0.75 μg ( $r=0.9999$ ). The average recoveries of three compounds were 101.49% with RSD 2.21%, 102.65% with RSD 1.51% and 100.47% with RSD 3.42% ( $n=6$ ) respectively. **Conclusion:** The method is convenient, accurate and reproducible. It can be used for the quality control of Evodiae juice, the adjuvant material.

[**Key words**] Evodiae juice; TLC; HPLC; quality standard

吴茱萸汁系吴茱萸的水煎液,为常用的中药药汁辅料。吴茱萸性味辛、苦、热,有小毒,具有温中下气、散寒止痛、降逆止呕、温中止泻的功效<sup>[1]</sup>。吴茱萸汁常用来炮制黄连,可以抑制其苦寒之性,使其寒而不滞,可清气分湿热,散肝郁胆火<sup>[2-3]</sup>。吴茱萸汁是在黄连的炮制过程中加入,辅料质量直接影响饮片的质量。

吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱为吴茱萸的主要有效成分,也是吴茱萸汁的主要有效成分,以这3个成分为指标的吴茱萸汁最佳制备工艺<sup>[4]</sup>已有报道,而该药汁辅料的质量标准尚未见到报道。本文作者对此进行了实验研究,对实验室生产的吴茱萸汁样品以及药厂中试生产进行了薄层、含量测定等实验,以期为该药汁辅料的国家标准和行业标准提供实验数据。

## 1 材料

Waters 2487 型高效液相色谱仪(600 Pump; Waters 600 Controller; Waters 2487 Detector), Millennium<sup>32</sup> 色谱管理软件(美国 Waters 公司)。

吴茱萸碱对照品(批号 110802-200505)购于中国食品药品检定研究院,供含量测定用。吴茱萸内酯、吴茱萸次碱均购于上海顺勃生物工程有限公司,经 HPLC 面积归一化法测定纯度均 >98%,符合对照品要求。甲醇、乙腈为色谱纯,水为自制高纯水。其余试剂均为分析纯。

吴茱萸样品 23 批,经中国中医科学院中药所冯学锋研究员鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth., 石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实。其中实验室 1#-13#为实验室样品;中试 1#-10#为中试样品。

吴茱萸汁的制备工艺:取吴茱萸 10 g,煎煮 3

次,首次加水量为 12 倍,浸泡 30 min 后煎煮 45 min,第 2 次加水量为 8 倍,煎煮 20 min,第 3 次加 6 倍量水,煎煮 20 min。合并 3 次煎出液,滤过,常温浓缩至 9 mL·g<sup>-1</sup>。

## 2 方法与结果

**2.1 TLC 鉴别** 取本品中试样品 1~10#,每份 35 mL,水浴加热浓缩汁 2 mL,加 5 mL 乙酸乙酯溶液,超声 15 min,取乙酸乙酯层作为供试品溶液。另取吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品加适量甲醇分别制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版附录 VI B)试验,吸取供试品溶液、对照品溶液各 5 μL 分别点于同一 GF<sub>254</sub> 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯(6:4)为展开剂,展开,取出,晾干。置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品相应位置上,显相同颜色荧光斑点;然后喷 10% 硫酸醇液,105 °C 加热至斑点清晰,置紫外灯(254 nm)下检视,供试品色谱中,在与吴茱萸内酯对照品相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

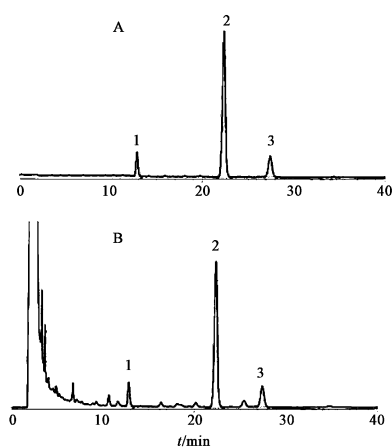
### 2.2 含量测定<sup>[5-8]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-水-四氢呋喃-冰醋酸(40:60:1:0.2)为流动相,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,吴茱萸内酯、吴茱萸碱检测波长为 225 nm,吴茱萸次碱检测波长为 343 nm。

**2.2.2 对照品溶液** 取吴茱萸内酯对照品、吴茱萸碱对照品、吴茱萸次碱对照品,精密称定,加乙腈配制成 0.50,0.04,0.015 g·L<sup>-1</sup> 的溶液。

**2.2.3 供试品溶液** 分别准确量取各批药汁,每份 15 mL,水浴蒸干,乙腈-水(6:4)40 mL 作为回流溶剂,称重,回流 1 h,称重,补足减失质量,滤过,即得。

**2.2.4 线性关系考察** 精密吸取吴茱萸内酯对照



A. 对照品; B. 样品; 1. 吴茱萸内酯; 2. 吴茱萸碱; 3. 吴茱萸次碱

图 1 吴茱萸汁的 HPLC

品 ( $0.54 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、吴茱萸碱对照品 ( $0.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、吴茱萸次碱对照品 ( $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )，分别用甲醇依次稀释为  $0.27, 0.135, 0.0675, 0.0338, 0.0169, 0.00844$ ;  $0.06, 0.03, 0.015, 0.0075, 0.00375, 0.00188$ ;  $0.025, 0.0125, 0.00625, 0.00312, 0.00156, 0.000781 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别吸取上述各对照品溶液  $15 \mu\text{L}$ ，注入液相色谱仪，测定，以峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标，对照品进样量 ( $X$ ) 为横坐标，绘制标准曲线，其回归方程依次为  $Y_{\text{吴茱萸内酯}} = 2.9 \times 10^6 X + 5.8 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ )， $Y_{\text{吴茱萸碱}} = 2.0 \times 10^8 X - 2.2 \times 10^4$  ( $r = 0.9998$ )， $Y_{\text{吴茱萸次碱}} = 1.0 \times 10^8 X + 1.2 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ )。结果表明，吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱分别在  $0.12 \sim 8.10, 0.028 \sim 1.80, 0.012 \sim 0.75 \mu\text{g}$  线性关系良好。

**2.2.5 精密度试验** 取原药 2#,  $10 \text{ g}$ ，精密称定，照吴茱萸汁的制备工艺制备吴茱萸汁、照 2.2.3 项下的方法制备供试品溶液，进样  $15 \mu\text{L}$ ，连续进样 6 次，测得吴茱萸内酯峰面积 RSD  $0.96\%$ 、吴茱萸碱峰面积 RSD  $0.36\%$ 、吴茱萸次碱峰面积 RSD  $0.67\%$ ，结果表明仪器精密度良好。

**2.2.6 重复性试验** 取原药 2#, 6 份，每份  $10 \text{ g}$ ，精密称定，照吴茱萸汁的制备工艺制备吴茱萸汁、照 2.2.3 项下的方法制备供试品溶液，进样  $15 \mu\text{L}$ ，测得吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的平均含量依次为  $6.558, 0.374, 0.121 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，RSD  $0.77\%$ ， $0.75\%$ ， $0.89\%$ ，表明供试品溶液的制备方法重复性良好。

**2.2.7 稳定性试验** 精密吸取上述供试品溶液，分别于  $0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 \text{ h}$  进样，测得吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 RSD  $1.2\%$ ， $1.0\%$ ， $1.1\%$ ，

表明供试品溶液在  $24 \text{ h}$  内稳定。

**2.2.8 加样回收率试验** 采用加样回收法，取已知含量原药 2#, 6 份，每份分别加入吴茱萸内酯对照品  $30.75 \text{ mg}$ ，吴茱萸碱对照品  $2.10 \text{ mg}$ ，吴茱萸次碱对照品  $0.16 \text{ mg}$ ，分别照吴茱萸汁的制备工艺制备吴茱萸汁、照 2.2.3 项下的方法制备供试品溶液，分别进样  $15 \mu\text{L}$ ，测定，结果见表 1。

表 1 吴茱萸汁中 3 个对照品的加样回收率试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
吴茱萸内酯	32.7	32.76	65.34	99.63	101.43	1.99
	32.7	32.76	66.56	103.36		
	32.7	32.76	66.91	104.43		
	32.7	32.76	65.60	100.43		
	32.7	32.76	65.34	99.63		
	32.7	32.76	65.81	101.07		
吴茱萸碱	1.87	1.99	3.94	104.02	102.68	1.30
	1.87	1.99	3.94	104.02		
	1.87	1.99	3.90	102.01		
	1.87	1.99	3.92	103.02		
	1.87	1.99	3.87	100.50		
	1.87	1.99	3.91	102.51		
吴茱萸次碱	0.61	0.60	1.19	96.67	100.00	2.36
	0.61	0.60	1.22	101.67		
	0.61	0.60	1.21	100.00		
	0.61	0.60	1.21	100.00		
	0.61	0.60	1.23	103.33		
	0.61	0.60	1.20	98.33		

**2.2.9 样品含量测定** 取各份吴茱萸原料，制备吴茱萸汁样品，按照供试品溶液的制备方法制备，依照上述方法测定含量，测定结果见表 2。结果显示实验室样品含量与中试样品含量结果接近，说明该吴茱萸汁制备工艺稳定可行，适宜放大生产。

### 3 讨论

#### 3.1 薄层色谱条件的选择

**3.1.1 展开剂的选择**<sup>[9]</sup> 比较了石油醚-乙酸乙酯，石油醚-丙酮，环己烷-乙酸乙酯，环己烷-丙酮，环己烷-乙酸乙酯，石油醚-氯仿-丙酮-甲醇-二乙胺，石油醚-乙酸乙酯-三乙胺等溶剂系统对吴茱萸内酯、吴茱萸次碱和吴茱萸碱的分离效果，结果表明以环己烷-乙酸乙酯 (6:4) 为展开剂，能使吴茱萸内酯、吴茱萸次碱和吴茱萸碱得到很好的分离。

**3.1.2 显色剂的选择** 比较改良碘化铋钾试剂、 $10\%$  硫酸醇液为显色剂，最后确定置紫外光灯 ( $365 \text{ nm}$ ) 下，供试品溶液中，在吴茱萸碱对照品、吴茱萸

表2 吴茱萸汁样品含量测定

No.	植物来源	吴茱萸内酯	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
		mg·g <sup>-1</sup>	mg·g <sup>-1</sup>	mg·g <sup>-1</sup>
实验室 1#	吴茱萸	4.964	0.116	0.101
实验室 2#	吴茱萸	9.230	0.504	0.234
实验室 3#	石虎	3.854	0.165	0.118
实验室 4#	石虎	3.814	0.071	0.052
实验室 5#	石虎	7.453	0.132	0.090
实验室 6#	石虎	5.895	0.103	0.081
实验室 7#	石虎	5.935	0.104	0.123
实验室 8#	吴茱萸	6.439	0.399	0.214
实验室 9#	吴茱萸	4.293	0.626	0.252
实验室 10#	吴茱萸	4.780	0.287	0.274
实验室 11#	吴茱萸	7.034	0.075	0.064
实验室 12#	石虎	4.896	0.053	0.048
实验室 13#	石虎	5.658	0.195	0.103
平均含量		5.711	0.218	0.135
中试 1#	石虎、吴茱萸	5.242	0.172	0.038
中试 2#	吴茱萸	7.220	0.483	0.215
中试 3#	吴茱萸	6.004	0.241	0.147
中试 4#	吴茱萸	5.502	0.321	0.145
中试 5#	石虎	6.881	0.278	0.095
中试 6#	石虎	7.787	0.179	0.077
中试 7#	石虎、吴茱萸	7.961	0.282	0.149
中试 8#	吴茱萸	11.493	0.375	0.249
中试 9#	石虎、吴茱萸	6.95	0.407	0.133
中试 10#	石虎	4.604	0.221	0.078
平均含量		6.964	0.296	0.133

次碱对照品的相应位置上显相同颜色的荧光斑点;以 10% 硫酸醇液为显色剂,105 ℃ 加热,置紫外灯 254 nm 下,供试品溶液中,在吴茱萸内酯对照品的位置上也显相同颜色的荧光斑点。

**3.1.3 样品前处理方法的选择** 比较了用甲醇、乙腈、乙酸乙酯加热回流提取吴茱萸汁浸膏,用乙酸乙酯提取杂质少、斑点重叠较少,最后选定用乙酸乙酯提取吴茱萸汁浸膏。

**3.2 液相色谱柱及流动相的选择**<sup>[10]</sup> 比较了 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱与 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱对吴茱萸汁 3 个成分的分离效果,结果显示前者能使吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱达到基线分离,而用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱则吴茱萸内酯与其他成分未能

达到基线分离,因此确定使用 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱。本实验进行流动相的优化,确定以乙腈-水-四氢呋喃-冰醋酸(40:60:1:0.2)为流动相。该流动相方法与《中国药典》2010 年版<sup>[11]</sup> 吴茱萸相下含量测定条件基本吻合,同时也证明了药典方法的可行。

吴茱萸汁作为常用炮制辅料,其质量标准研究尚属于空白领域。本课题对 13 批实验室样品与 10 批中试样品进行测定,结果显示,这些样品中 3 个成分的含量接近,说明本文所采用的吴茱萸汁制备工艺稳定,所确定的质量标准可操作性强,适合放大生产。本实验所确定的药汁质量标准为提高饮片质量的稳定性提供了实验数据。

#### [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] 原思通. 医用中药饮片学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:95.
- [3] 叶定江,原思通. 中药炮制学辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:114.
- [4] 韩旭阳,边宝林,李烧烧,等. 正交设计优选吴茱萸汁的制备工艺[J]. 中国中药杂志,2009,34(23):3025.
- [5] 李福兴,王建江. 柠檬苦素类化合物的研究现状[J]. 国外医学:中医分册,2000,22(3):131.
- [6] 邹丽娟,陈颖,杨庆,等. 吴茱萸对黄连生物碱在大鼠肠道吸收中的影响研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):147.
- [7] 于肖,吴大正. 黄连吴茱萸药对水提物对乙醇致大鼠胃损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):60.
- [8] 周红,余惠旻,彭求贤,等. 黄连与吴茱萸及其不同配伍的化学成分、药理及药性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(9):75.
- [9] 张丽艳,罗君,李健,等. 吴茱萸药材薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):72.
- [10] 鲍天冬,董宇,杨庆,等. 高效液相色谱法同时测定制吴茱萸及其提取物中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(6):2.

[责任编辑 顾雪竹]