

• 综述 •

吴茱萸化学成分分析方法研究概述

宋亚芳^{1, 2}, 张启伟², 龚慕辛², 王智民^{2*}

(1. 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 在分析吴茱萸相关文献的基础上, 总结了吴茱萸化学成分的分析方法研究现状, 主要对生物碱、内酯及挥发性成分含量测定方法进行介绍和讨论, 包括反相高效液相色谱法(RP-HPLC)、液-质联用法(LC-MS)、气-质联用法(GC-MS)、毛细管电泳法(CE)测定吴茱萸主要化学成分的方法, 为进一步研究吴茱萸的质量控制提供参考。

[关键词] 吴茱萸; 含量测定; 高效液相色谱; 液质联用; 气质联用

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2009)01-0082-03

Quantitative Analysis Method for Chemical Components in Fructus Evodiae

SONG Yafang^{1, 2}, ZHANG Qi-wei², GONG Mu-xin², WANG Zhi-min^{2*}

(1. He'nan University of Traditional Chinese Medicine, He, nan Zhengzhou 450008, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] By analyzing the published papers recently related to Fructus Evodiae, the outline of quantitative assay research methods was reviewed. The markers for quality control mainly focus on alkaloids Jimonins and volatile oil, and the methods including high performance liquid chromatography (HPLC)、gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis(CE) et al.

[Key words] Fructus Evodiae; quantitative assay; HPLC; LC-MS; GC-MS

吴茱萸为常用中药, 始载于《神农本草经》。《中国药典》2005年版一部收录的吴茱萸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、助阳止泻功能^[1]。吴茱萸所含化学成分类型较多, 包括生物碱、苦味素、挥发油、黄酮、香豆精、甾体、萜类、木脂素、多糖等, 其中生物碱和柠檬苦素类为其主要有效成分。为了有效控制吴茱萸的质量, 十几年来研究工作者建立了多种成分的分析方法, 现就其研究进展做一归纳和评述。

1 生物碱和内酯的分析方法

1.1 反相高效液相色谱(RP-HPLC)法 随着仪器性能的不断改善, 梯度洗脱被用于吴茱萸中多成分的含量测定, 达到了提供更多样品信息, 全面控制药材质量的目的。在报道的文献中, 用 RP-HPLC 法测定吴茱萸碱和吴茱萸次碱的最多。流动相主要有乙腈-水^[2], 乙腈-水-甲醇^[3]和乙腈-水-四氢呋喃-乙酸^[4]系统, 检测波长以 225 nm 为多, 也有用 254, 260, 280, 290 nm 检测的。经光谱扫描确认, 吴茱萸碱最大吸收波长在 225 nm, 且 230 nm 后吸收曲线陡降; 吴茱萸次碱最大吸收波长在 345 nm, 在 220~240 nm 左右有强吸收肩峰。因此, 要同时测定两者, 以选 225 nm 最为合适。很多研究者选用其他波长, 多考虑了在 225 nm 处有溶剂吸收, 事实上不影响其含量测定。样品处理多为甲醇超声或回流, 少数有用氯仿回流提取的。

测定吴茱萸内酯时, 样品用 50% 乙醇或 50% 甲醇回流提取, 流动相采用乙腈-水^[5]或甲醇-乙腈-水-磷酸^[6]系统, 检测波长为其最大吸收波长 204 或 205 nm。同时测定吴茱萸炮制品及其提取物中吴茱萸内酯、吴茱萸碱及吴茱萸次碱含量时, 流动相多采用乙腈-水-四氢呋喃-冰醋酸系统^[7], 为兼顾

[收稿日期] 2008-11-26

[基金项目] 国家十一五支撑计划项目(2006BA108B03); 2007年中医药行业科技专项项目(200707007)

[通讯作者] * 王智民, Tel/Fax: (010) 84014128; E-mail: zhmw123@263.net

三者同步测定,检测波长为 225 nm。吴茱萸多成分含量测定时^[8],流动相中多加入乙酸钠 SDS 等改性剂,以达到增加流动相对样品的溶解性、改善分离程度、改善峰形的目的,检测波长多选 254 nm, 250 nm。

事实上,同步测定极性差异较大的多种成分时,用同一种提取方法很难保证每种成分的充分提取,测得的含量也难以代表其真实含量,而且即使采用梯度洗脱,要达到多成分良好的分离也有一定难度,这些原因影响了同步测定方法的推广应用。但如果同步测定极性相近的成分,并对提取条件进行充分考察,则可避免上述问题的发生。

1.2 液相色谱-质谱联用(LC-MS)法 液质联用技术已逐渐成为中药现代研究的强有力手段。采用液相色谱-电喷雾串联质谱分离鉴定了吴茱萸药材中吴茱萸碱、吴茱萸次碱、羟基吴茱萸碱、吴茱萸酰胺甲、吴茱萸酰胺^[9]。吴茱萸药材用浓氨水润湿,以氯仿为溶剂,索氏提取器提取,用无水乙醇、四氢呋喃溶解,定容。色谱柱 Altima C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 3 μm),流动相为乙腈-水(55:45),质谱条件:电离方式 AP-ES,毛细管电压 4 000 V;碰撞诱导解离电压:70 V,液相分流比 1:3。Zhou Yan 用高效液相空压化学离子串联质谱(HPLC/UV/APCI-MS/MS)法测定吴茱萸中 5 种吲哚喹啉生物碱的含量^[10]。LC-MS 由于具有良好的灵敏度、高度的专属性和通用性,加之对色谱分离度要求不高,分析速度快,尤其适合于结构近似成分的测定。

1.3 毛细管电泳法 毛细管电泳法具有样品用量少、分离时间短、前处理简单、分离效率高和灵敏度高等特点。Lee MC^[11]等建立了测定吴茱萸中 10 种生物碱的方法。采用胶束电动毛细管法(MECC)在 15 min 内测定了吴茱萸碱、吴茱萸次碱、羧基吴茱萸碱及 6 种喹啉酮;用毛细管电泳法(CZE)在 5 min 内测定了去氢吴茱萸碱。

李琴韵等采用该法对中国药典收载的 3 个不同品种和不同产地吴茱萸中所含吴茱萸碱进行含量测定^[12]。同时还采用两种波长下(196 nm、254 nm)对上述样品中的蛋白质类物质进行指纹谱分析。建立蛋白质类物质的指纹谱,能将 3 种不同品种的吴茱萸明显地区分。

2 挥发性成分的测定

气相色谱-质谱联用(GC-MS)法兼有色谱法分离效率高、定量准确以及质谱法鉴定能力强、选择性高等特点,并且具备了两者共有的分析范围宽,灵敏度高,分析速度快的优点。用 GC-MS 进行定性分析时,可以得到对应于每个色谱峰的质谱图,根据质谱可对每个色谱组分定性。现代 GC-MS 联用仪均带有质谱检索库,通过计算机对质谱数据进行检索,作出相关组分的定性结论。滕杰等采用本方法研究了疏毛吴茱萸果实挥发油成分^[13]。在 80 min 内共检测出 193 个峰,鉴定了其中的 41 个峰,主要为单萜烯类、单萜醇类、倍半萜烯类和酯类等化合物。还有人采用顶空固相微萃取法研究吴茱萸中的芳香成分。

3 其他成分的测定

以 RP-HPLC 法测定吴茱萸中金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷含量^[14],样品用甲醇回流提取,以甲醇-0.5%磷酸(50:50)为流动相,在 360 nm 检测。以 HPLC 方法测定了吴茱萸中绿原酸的含量^[15],水提样品,以乙腈-0.4%磷酸作流动相,梯度洗脱,327 nm 检测。采用分光光度法^[16],以苯酚-硫酸法显色,测定了吴茱萸中多糖的含量。用湿法硝酸-双氧水进行消解,电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)同时测定吴茱萸样品中钾、镁、铅、铜等多种微量元素^[17]。用氨基酸自动分析仪以及 HPLC 法测定吴茱萸中氨基酸的含量^[18]。

4 结束语

综上所述,随着对吴茱萸研究的深入,分析对象已逐渐由吴茱萸碱、吴茱萸次碱等吲哚类生物碱及挥发性成分向喹啉酮类生物碱、柠檬苦素、多糖、黄酮苷、绿原酸等扩展,由测定单一或少数同类成分向同时测定多类成分发展,以便更全面地控制吴茱萸药材的质量。在吴茱萸的研究工作方面可以说已经取得了很大的进展,但同时也存在着许多问题有待解决,吴茱萸品种多,产地多,质量参差不齐,品种间的质量内涵和评价指标的科学性尚待进一步探索,因此亟需建立符合中医药用药特点的质量标准。此前研究多集中在低极性的生物碱成分(这些成分在临床用药的水煎过程中的煎出率很低,约 10% 左右),ChP2000 2005 也都是选用吴茱萸碱和吴茱萸次碱为指标进行质量评价,这样,许多道地产区的药材多不合格,难以全面反映吴茱萸的质量。鉴于临床用药常入汤剂,其水溶性成分易被煎出结合其现已明确的药效,因此可以说水溶性成分(苦味素和黄酮苷类)或其与生物碱类成分一起发挥着有效成分群的作用。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. (一部) 北京: 化学工业出版社, 2005: 118.
- [2] 干治国, 侯晓虹, 时雅, 等. HPLC 测定吴茱萸及其制剂中吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(10): 691.
- [3] 甄攀, 王治宝, 白雪梅. 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.
- [4] 洪玉梅, 范强, 王智民. 吴茱萸及其炮制品中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量比较[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 559.
- [5] 李丽, 贾英, 陈晓辉, 等. HPLC 法同时测定吴茱萸中吴茱萸苦素和柠檬苦素的含量[J]. 中国天然药物, 2003, 1(3): 158.
- [6] 洪玉梅, 蔡嵩, 王维皓, 等. 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.
- [7] 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): 1.

- [8] Chuang WC, Cheng CM, Chang HC, et al. Contents of constituents in mature and immature fruits of *Evodia* species [J]. *Planta Medica* 1999, 65(6) : 567.
- [9] 张雪琴, 周欣, 王道平, 等. 液相色谱——电喷雾质谱联用研究不同产地吴茱萸中生物碱成分[J]. *分析化学*, 2005, 33(2) : 241.
- [10] Zhou Y, Li SH, Jiang RW, et al. Quantitative analyses of indoloquinazoline alkaloids in *Fructus Evodiae* by high-performance liquid chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* . 2006, 20(20) : 3111.
- [11] Lee MC, Chuang WC, Sheui SJ. Determination of the alkaloids in *Evodia fructus* by capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A* , 1996, 755(1) : 113.
- [12] 李琴韵, 王智华, 洪筱坤. HPLC-FPS 技术对吴茱萸质量的研究[J]. *中成药*, 2003, 25(7) : 570.
- [13] 滕杰, 杨秀伟, 陶海燕, 等. 疏毛吴茱萸果实挥发油成分的气-质联用分析[J]. *中草药*, 2003, 34(6) : 504.
- [14] 潘浪胜, 吕秀阳, 许海丹, 等. RP-HPLC 法测定吴茱萸中金丝桃苷和异鼠李素-3-O-半乳糖苷的含量[J]. *中草药*, 2005, 36(2) : 284.
- [15] 张万明, 甄攀, 白雪梅, 等. RP-HPLC 测定吴茱萸中绿原酸的含量[J]. *中成药*, 2006, 28(1) : 131.
- [16] 杨风珍, 甄攀, 速茂林, 等. 中药吴茱萸中多糖含量的测定[J]. *张家口医学院学报*, 1999, 16(1) : 16.
- [17] 张胜帮, 孙培龙. ICP-AES 法测定吴茱萸中多种微量元素的研究[J]. *浙江工业大学学报*, 2006, 34(1) : 43.
- [18] 刘斌, 李飞. 吴茱萸及其炮制品中氨基酸的分析[J]. *中国中药杂志*, 1995, 20(10) : 602.