

HPLC 法测定不同种吴茱萸果实中吴茱萸碱的含量

杨武德, 李 香, 彭小冰, 杨卫平

(贵阳中医学院药学系, 贵阳 550002)

摘要: 目的: 建立用高效液相色谱法(HPLC)测量中药吴茱萸中吴茱萸碱的含量的方法。方法: 以乙醇为溶剂用超声震荡提取法提取吴茱萸碱, 提取液用 HPLC 法分析。色谱柱: Welchrom—C18(5 μm, 250 mm × 4.6mm); 流动相: 甲醇—水—三乙胺(70:30:0.04), 流速: 1 ml/min, 柱温: 30℃, 检测波长: 225 nm。结果: 吴茱萸碱的回归方程为 $Y = 4.49 \times 10^7 X - 6356.53$, 其线性范围为 0.0106~0.0848 μg, 相关系数 $r = 0.9999$, 平均回收率为 100.6%。结论: 吴茱萸中吴茱萸碱的含量分别为 0.506% 和 0.512%; 方法稳定, 重现性好, 操作简单, 结果准确。

关键词: 吴茱萸; 吴茱萸碱; HPLC

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1005-5320(2009)04-0029-02

吴茱萸 *Evodiand rutaecarpa (Juss.) Benth* 是芸香科植物茱萸的干燥成熟果实, 具有温胃止吐、温脾止泻、镇痛、升高体温等作用。吴茱萸的主要有效成分为挥发油和生物碱, 生物碱包括吴茱萸碱和吴茱萸次碱等。临床实验表明, 吴茱萸碱可抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡和抑制肿瘤细胞的转移, 吴茱萸碱对心肌缺血再灌注损伤有一定的保护作用^[1]; 此外, 吴茱萸碱还具有强心作用^[2]。本实验在参考文献的基础上, 用乙醇作为提取溶剂, 采用超声震荡法提取吴茱萸碱, HPLC 法检测, 建立了吴茱萸中吴茱萸碱的分析方法。该方法稳定性高, 重现性好, 操作简单, 分析速度快, 是吴茱萸质量监控较理想的方法。

1 仪器与试剂

LC-20AT/日本岛津高效液相色谱仪, HS10260D 型超声波清洗器(天津恒奥科技有限公司)。AB265S 型电子天平(十万分之一, 上海奥豪斯有限公司)。吴茱萸碱对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号: 110802-200505)。

吴茱萸药材由贵阳中医学院中药鉴定学王世清教授鉴定分别为吴茱萸 *Evodiand rutaecarpa (Juss.) Benth* 的果实; 疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa (Juss.) Benth. var. bodinieri (Dode) Huang* 干燥将近成熟的果实, 产地均为贵州余庆 GAP 规范化种植基地。

收稿日期: 2009-03-02

基金项目: (973 项目) 国家重点基础研究发展计划中医专项“辛热药性与通心阳药的相关研究”(2007CB512606)

作者简介: 杨武德(1968-), 男, 副教授, 学士, 研究方向: 中药质量标准及中药化学成分。通讯作者: 杨卫平教授, 研究生导师。

甲醇(色谱纯), 乙醇、三乙胺(分析纯), 娃哈哈纯净水。

2 方法与结果^[3,4]

2.1 色谱条件 LC-20AT/日本岛津高效液相色谱仪, SPD-20A UV/Vis Detector, Welchrom—C18(5 μm, 250 mm × 4.6 mm) 色谱柱, 流动相: 甲醇—水—三乙胺(70:30:0.04); 流速为 1.0 ml/min; 柱温 30℃; 检测波长 225 nm。

2.2 色谱系统适用性 在以上色谱条件下检测, 吴茱萸碱的保留时间为 10.58 min。以吴茱萸碱计算, 理论塔板数为 10538, 拖尾因子为 1.02, 与其前一组分的分离度为 2.25, 与其后一组分的分离度为 1.82。

2.3 吴茱萸碱的含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称取一定量吴茱萸药材置 100 ml 容量瓶中, 加入 100 ml 95% 乙醇。精密称定重量, 浸泡 1 h, 超声 40 min, 冷却, 称重补足重量, 过滤、取续滤液备用, 用 0.45 μm 滤膜滤过后上机分析。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称定 2.12 mg 的吴茱萸碱对照品置 100 ml 容量瓶中, 用乙醇溶解并稀释至刻度, 制成浓度为 21.2 μg/ml 的对照品溶液。

2.3.3 工作曲线的制备 精密吸取已知浓度(21.2 μg/ml) 0.5、1.5、2、2.5、3、3.5、4 ml, 分别置 5 ml 容量瓶中, 用 95% 乙醇定容至刻度, 分别制成浓度为 0.00212、0.00636、0.00848、0.0106、0.01272、0.01484、0.01696 mg/ml 的吴茱萸碱对照品溶液。分别精密吸取 5 μl 进样, 测定记录峰面积, 以吴茱萸碱对照品溶液的质量浓度 X(mg/ml) 为横坐标,

色谱峰面积值 Y 为纵坐标, 进行回归分析, 得回归方程为: $Y = 4.49 \times 10^7 X - 6356.53$, 相关系数 $r = 0.9999$. 其线性范围为 $0.0106 \sim 0.0848 \mu\text{g}$, 表明在该线性范围内, 吴茱萸碱峰面积与进样量有良好的线性关系。

2.3.4 精密度的试验 称取一定量的吴茱萸药材约 0.2 g, 依 2.3.1 项下制备供试样品溶液于一日内重复进样 6 次, 每次进样 5 μl , 记录峰面积, 平均峰面积为 490149, 吴茱萸碱的日内精密度的 RSD 分别为 1.70%, 表明仪器精密度较好。

2.3.5 稳定性试验 称取一定量的吴茱萸药材, 依 2.3.1 项下制备供试样品溶液于一日内每隔 2 h 进样一次, 连续进样 5 次, 每次进样 5 μl , 记录峰面积, 平均峰面积 490373.8, RSD 为 1.33%, 表明样品在 8 h 内的稳定性较好。

2.3.5 重复性试验 称取吴茱萸样品 6 份, 每份约 0.2 g, 均精密称定, 依 2.3.1 项下制备供试样品溶液并测定, 每份进样 2 次, 每次进样 5 μl , 记录峰面积, 吴茱萸碱平均数据含量 5.05%, RSD 为 2.80%, 表明样品重复性好。

2.3.6 回收率试验 向已知吴茱萸碱含量的样品中加入吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品, 依 2.3.1 项下制备供试样品溶液并测定, 计算回收率, 数据见表 1。

表 1 加样回收实验结果(n=5)

药材中含 量(mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率(%)	RSD (%)
0.5225	0.5231	1.052	101.2		
0.5215	0.5231	1.041	99.32		
0.5210	0.5231	1.040	99.22	100.6	1.38
0.5316	0.5231	1.060	101.0		
0.5448	0.5231	1.081	102.5		

2.3.7 样品分析 取吴茱萸药材, 干燥, 粉碎, 过筛, 精密称取 0.2 g, 共 3 份, 加入 100 ml 溶媒 95% 乙醇, 精密称定重量, 浸泡 1 h, 超声 40 min, 冷却, 称重并补足重量, 过滤、取续滤液备用, 用 0.45 μm

滤膜过滤后上机分析, 进样量 5 μl , 每个样品进样 2 次。残渣经检测, 没有发现吴茱萸碱和吴茱萸次碱色谱峰, 结果见表 2、表 3。

表 2 吴茱萸的果实中的吴茱萸碱测定结果

称样量	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
0.2142	0.502		
0.2137	0.506	0.506	0.79
0.2245	0.510		

表 3 疏毛吴茱萸的吴茱萸碱测定结果

称样量	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
0.2247	0.514		
0.2143	0.512	0.512	0.31
0.2145	0.511		

3 讨论

溶剂试验表明, 吴茱萸碱不溶于水、酸水和碱水等水溶性溶剂, 也不溶于有机溶剂氯仿。本实验比较了常用的几种提取方法, 超声震荡提取法提取效率最高。提取吴茱萸碱的最佳条件为用 500 倍溶媒乙醇浸泡吴茱萸药材 60 min, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 超声震荡提取 40 min。吴茱萸碱的对照品溶液在 200~ 400 nm 扫描, 它们的最大吸收峰均在 225 nm 附近, 本实验采用 225 nm 作为检测波长。色谱图显示, 峰数少, 组分简单, 易于分离。

参考文献:

[1] 战光绪, 吴大正, 胡之璧. 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): 62-63.

[2] Zhang Y, Wu L J, Tashiro S, et al. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(1): 83.

[3] 侯晓虹, 于治国, 杜惠莲, 等. 高效液相色谱法测定大鼠血浆中吴茱萸次碱浓度[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(5): 335-337.

[4] 李琴韵, 洪筱坤, 王智华, 等. 高效毛细管电泳法测定吴茱萸中吴茱萸碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(6): 370-372.

本刊欢迎 E-mail 投稿

(本刊收到投稿会即刻邮件回复“已收到”字样, 如作者所发邮件投稿或修改稿未见回复, 说明邮件发送并未成功, 请重发或电话联系本刊编辑部确认。)

(本刊邮箱 1: wijk@chinajournal.net.cn
邮箱 2: wijk@periodicals.net.cn)