

3 讨论

指纹图谱技术是国际公认的控制中药质量的有效手段,它以其信息量大的特点克服了中药材、中成药的复杂性。本实验通过高效液相色谱法建立了清风胶囊的指纹图谱,结果表明10批不同清风胶囊各峰的相对保留时间基本一致,色谱图形基本一致。同时该方法可以对处方主要药材进行鉴定,同时对药材中的已知主要有效物质进行鉴定,为该制剂的质量控制提供很好的依据。

通过对图谱的分析,在色谱图中8号峰面积大、分离效果好;通过归属分析该峰为君药青风藤药材中的青藤碱峰。青藤碱是青风藤中生物碱成分,也是中国药品生物制品检定所确认的标准物质,因此选定8号峰为本指纹图谱技术要求的参照峰。

本制剂为中药复方制剂,成分复杂,故采用梯度洗脱。通过分析本品主要含生物碱和皂苷类物质,而生物碱的高效液相法测定时,一般采用pH值较

高的流动相系统,所以色谱柱的选择时选用能耐受高pH的色谱柱。分别考察了依利特柱、戴安柱、Waters柱及Ultimate柱对指纹图谱的分离情况,结果显示,Ultimate柱对色谱峰的峰分离好,峰型对称,故选Ultimate色谱柱作为检测柱;同时比较甲醇-水-磷酸盐缓冲液及乙腈-水-磷酸盐缓冲液等系统以及不同的梯度洗脱方法等,结果发现本实验采用的乙腈-水-磷酸盐缓冲液系统可以使样品色谱峰得到较好地分离,且色谱峰峰形较好,故选用该系统为流动相。

参考文献:

- [1] 莫志贤,王彩云,罗晓云,等. 清风胶囊用于海洛因依赖者戒毒治疗的临床观察[J]. 中药材,2003,7(26):531-533.
- [2] 高秀丽,蒋倩,张敏,等. 龙血竭胶囊的HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,39(6):855-857.
- [3] 孙宁,秦培勇,谭天伟. 乳快消片HPLC指纹图谱的研究[J]. 中草药,2009,39(11):1659-1661.
- [4] 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[S]. 2002.

HPLC-DAD 法测定炮制辅料吴茱萸汁中绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱

蒋俊^{1,2},贾晓斌^{1,2*},陈彦¹,蔡宝昌³,吴皓³

- (1. 江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室,国家中医药管理局中药释药系统重点研究室,江苏南京 210028;
2. 江苏大学药学院,江苏镇江 212013; 3. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室,江苏南京 210029)

摘要:目的 测定吴茱萸的炮制辅料吴茱萸汁中3类组分的4个代表性成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯、绿原酸,为吴茱萸炮制辅料吴茱萸汁的质量控制提供重要依据。方法 采用HPLC-DAD法,色谱柱为Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸,梯度洗脱程序;体积流量:1 mL/min;检测波长:205、225、324 nm;柱温:25℃。结果 绿原酸、吴茱萸内酯均为水溶性成分,在吴茱萸汁中的质量分数分别为6.638、8.234 mg/g,吴茱萸碱和吴茱萸次碱均为脂溶性成分,在吴茱萸汁中的质量分数分别为0.406、0.380 mg/g。结论 吴茱萸的炮制辅料吴茱萸汁中主要含有绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱等成分,对这些成分进行测定,可为吴茱萸炮制辅料吴茱萸汁的质量控制提供重要依据。

关键词:吴茱萸;炮制辅料;吴茱萸汁;高效液相色谱

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2010)03-0396-03

吴茱萸的炮制是取吴茱萸汁制黄连,炮制目的是用药性辛热的吴茱萸来抑制黄连的苦寒之性,使黄连寒而不滞的同时又增强黄连清气分湿热,散肝胆郁火的功效,主要用于积滞内阻、胸膈痞闷、胁肋胀满、下痢脓血等症^[1]。吴茱萸具有散寒止痛、助阳

止泻等功能^[2],主要含有生物碱、苦味素、挥发油、萜类、有机酸类等成分,其中吴茱萸碱、吴茱萸次碱等生物碱类成分和吴茱萸内酯等苦味素类成分为主要活性成分^[3]。因此吴茱萸汁的制备及其质量将直接影响到吴茱萸的临床疗效。目前,对吴茱萸药材或

收稿日期:2009-08-10

基金项目:江苏省中医药领军人才专项(2006);江苏省中药炮制重点实验室开放课题(ZYPZ002)

作者简介:蒋俊(1986—),男,江苏镇江人,主要从事中药新剂型、新技术和中药炮制、制剂分析等方面研究。

Tel:(025)85637809 E-mail:xuyan9323@126.com

饮片中相关成分的测定报道较多^[4-6],但对茱萸黄的炮制辅料吴茱萸汁中成分的研究报道很少,还没有炮制辅料吴茱萸汁的质量控制标准。本实验研究建立 HPLC-DAD 法同时测定茱萸黄炮制辅料吴茱萸汁中生物碱、苦味素、有机酸类等 3 类组分的 4 个代表性成分:吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯、绿原酸,以期此方法能为茱萸黄炮制辅料吴茱萸汁的质量控制和制定提供重要依据。

1 仪器与试剂

Agilent HP1200 高效液相色谱仪,包括四元泵,DAD 检测器(美国 Agilent 公司)。

吴茱萸药材购自湖北阳新县吴茱萸药业公司,经南京中医药大学药教研室吴德康教授鉴定为芸香科植物石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实;绿原酸(批号 0753-200111)、吴茱萸碱(批号 11080 2-200606)、吴茱萸次碱(批号 0801-9702)、吴茱萸内酯(批号 110800-200404)对照品均购自中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯;水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

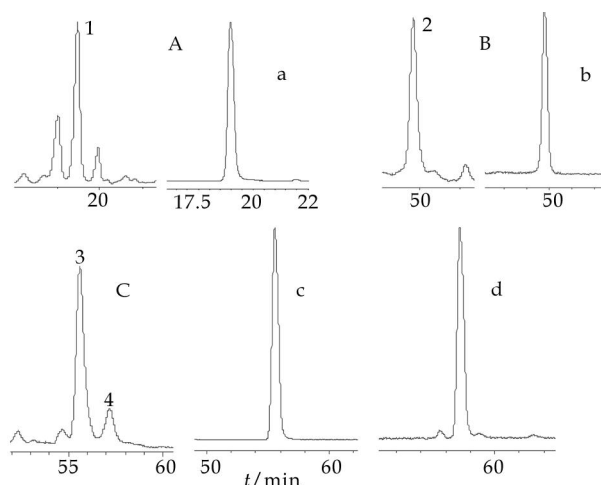
2.1 吴茱萸汁的制备:称取吴茱萸药材 2 g,加水 16 倍,提取 3 次,每次 1.5 h,合并 3 次提取液,离心,抽滤,得吴茱萸汁。

2.2 色谱条件:色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸,梯度洗脱程序:0~7 min:乙腈 5%~8%,7~13 min:乙腈 8%~11%,13~40 min:乙腈 11%~40%,40~70 min:乙腈 40%~60%;体积流量:1 mL/min;检测波长:205、225、324 nm;柱温:25℃。在此条件下,绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱均达到基线分离。HPLC 图谱见图 1。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取绿原酸 3.45 mg,吴茱萸内酯 3.53 mg,吴茱萸碱 3.20 mg,吴茱萸次碱 4.18 mg,加甲醇稀释至 10 mL,作为储备液。取储备液各 1 mL 加甲醇定容至 10 mL,即得。

2.4 供试品溶液的制备:将所得吴茱萸汁加蒸馏水定容至 100 mL,加入甲醇至 200 mL,充分振荡后,静置过夜,滤过,定容至 200 mL,即得。

2.5 线性试验:精密称取绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱适量,配制成质量浓度分别为 0.345、0.334、0.320、0.418 mg/mL,分别精密进样 1、2、5、10、20、30、40、60 μL。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得 4 种成分的回归方



1-绿原酸 2-吴茱萸内酯 3-吴茱萸碱 4-吴茱萸次碱
a-绿原酸对照品 b-吴茱萸内酯对照品 c-吴茱萸碱对照品
d-吴茱萸次碱对照品

A-检测波长 324 nm(检测绿原酸) B-检测波长 205nm(检测吴茱萸内酯) C-检测波长 225nm(检测吴茱萸碱、吴茱萸次碱)

1-caffeoyl tartaric acid 2-evodiamine 3-evodiamine 4-rutecarpine
a-caffeoyl tartaric acid reference substance b-evodiamine reference substance
c-evodiamine reference substance d-rutecarpine reference substance

A-detection wavelength 324 nm (detecting caffeoyl tartaric acid)
B-detection wavelength 205 nm (detecting evodiamine) C-detection wavelength 225 nm (detecting evodiamine and rutecarpine)

图 1 吴茱萸汁样品和对照品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Fructus Evodiae juice sample and reference substances

程、相关系数及线性范围,见表 1。

表 1 回归方程、相关系数及线性范围

Table 1 Equation, correlation coefficient, and linear range

成分	线性方程	r	线性范围/μg
绿原酸	$Y = 589.64 X + 72.286$	0.999 8	0.345 ~ 20.70
吴茱萸内酯	$Y = 243.65 X - 107.63$	0.999 2	0.334 ~ 20.04
吴茱萸碱	$Y = 2453.1 X + 5673$	0.998 6	0.320 ~ 19.20
吴茱萸次碱	$Y = 697.97 X + 776.9$	0.995 6	0.418 ~ 25.08

2.6 精密度试验:精密吸取上述各对照品溶液,进样 10 μL,重复 6 次,测定峰面积值,结果绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的 RSD 分别为 0.74%、0.37%、0.45%、0.56%。

2.7 重现性试验:取批号为 080901 样品,精密称定 5 份样品,按供试品溶液制备方法分别制备 5 份供试品溶液,进行重复性试验,测定 4 种成分的量,计算各成分质量分数的 RSD 值,结果绿原酸为 2.06%、吴茱萸内酯为 1.78%、吴茱萸碱为 1.95%、吴茱萸次碱为 1.65%。

2.8 稳定性试验:取批号为 080901 样品,制备供试品溶液,按上述色谱条件,分别于 0、1、2、4、8、12、

24 h 进样测定,每次 60 μL ,计算峰面积的 RSD 值,结果绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的分别为 1.64%、1.69%、1.58%、1.39%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 回收率试验:取批号为 080901 样品,精密称取 1 g,按样品溶液处理方法制备吴茱萸汁,重复 6 份,分别加入绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品 6.823、7.885、0.421、0.382 mg,按上述色谱条件测定,计算加样回收率,结果绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的回收率分别为 96.11%、109.86%、98.78%、98.65%,RSD 分别为 1.08%、2.16%、1.72%、2.06%。

2.10 样品测定:取 5 批样品,每批平行 3 份,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,外标法计算,各成分的测定结果见表 2。

表 2 吴茱萸汁中各成分的测定结果($n=3$)

Table 2 Determination of every component in

Fructus Evodiae juice ($n=3$)

批号	绿原酸/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	吴茱萸内酯/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	吴茱萸碱/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	吴茱萸次碱/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
080901	6.855	7.969	0.407	0.391
080902	6.751	8.080	0.408	0.407
080903	6.300	8.259	0.447	0.403
080904	6.636	8.376	0.384	0.348
080905	6.646	8.479	0.383	0.351

3 讨论

实验中对绿原酸、吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱进行全波长扫描发现,绿原酸在 324 nm 有最大吸收,吴茱萸内酯在 205 nm 有最大吸收,且在其他波长吸收很弱,吴茱萸碱和吴茱萸次碱在 225 nm 处有最大吸收;为便与检测,且考虑到样品中各成分含量不高,故选用 205、225、324 nm 同时测定

吴茱萸汁中成分。该方法准确、可靠、重现性好,可以用于辅料吴茱萸汁的质量控制。

在吴茱萸汁的制备过程中,采用了正交试验优选出的吴茱萸最佳水提工艺,即加入 16 倍量的水,提取 3 次,每次 1.5 h。实验中发现,不宜将吴茱萸药材粉得太细,否则在水煎煮过程中易起泡且会影响吴茱萸中有效成分的溶出,此结论也与文献报道一致^[7]。本实验中未粉碎,在提取前浸泡 30 min 后加热提取,效果较好。

萸黄连作为一种传统的炮制工艺,能一直沿用至今,可见其临床疗效确切;但是,迄今为止仍未有对萸黄连及其辅料进行质量控制的统一标准,这给辅料生产制备带来了随意性,工艺不规范、质量不明确,其质量好坏无从考证和判断。这样,严重影响了辅料的质量和其在主药中所发挥的作用。因此,为提高辅料的质量,开展辅料制备工艺规范化研究,并制定出切实可行的质量标准意义重大。本研究对吴茱萸汁进行成分分析和质量控制为萸黄连炮制辅料的质量标准的制定提供了重要依据。

参考文献:

- [1] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2005.
- [2] 王奇志,梁敬钰. 吴茱萸属植物化学成分和生理活性的研究近况[J]. 中草药,2004,35(8):7-10.
- [3] 周红祖,余惠,彭求贤. 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):75-77.
- [4] Chuang W C, Chu C Y, Sheu S J, et al. Determination of the alkaloids in *Evodiae Fructus* by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 727: 317-323.
- [5] 王世永,李小定. 吴茱萸中吴茱萸碱和次碱的提取及测定[J]. 湖北农业科学,2008,47(3):41-343.
- [6] 雷培海. 吴茱萸指纹图谱研究[D]. 贵阳:贵州大学,2006.
- [7] 廖庆文,罗杰英,鄢丹. 正交试验优选左金漂浮片中挥发油提取工艺研究[J]. 中国药业,2006,15(14):3-4.

化瘀通脉汤的 HPLC 指纹图谱研究

马 瑛,刘 芳,柴士伟

(天津中医药大学第一附属医院,天津 300193)

摘要:目的 建立化瘀通脉汤剂的高效液相色谱指纹图谱,以评价化瘀通脉汤剂的质量。方法 采用大连依利特 Hypersil ODS2 C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.05%甲酸,梯度洗脱;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL 。测定了 12 批化瘀通脉汤剂并进行指纹图谱分析。结果 建立了丹参水溶性成分指纹图谱共有模式,显示 14 个共有峰,指认了阿魏酸、丹酚酸 B 2 个特征峰。结论 指纹图谱色谱图中

收稿日期:2009-10-30

作者简介:马 瑛(1969—),女,天津人,副主任药师,硕士,主要从事中药鉴定、临床药学等。