

不同年份吴茱萸 UPLC 指纹图谱及多成分化学模式识别研究

张崇佩¹, 张依欣¹, 李 潮¹, 袁小平², 于 欢^{1*}, 龚千锋^{1*}

1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

2. 江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 江西 樟树 336000

摘 要: **目的** 采用 UPLC 法建立不同年份吴茱萸指纹图谱, 结合化学模式识别技术对其进行分析, 并测定其中 4 种质量差异性标志物的含量, 为吴茱萸“陈久者良”的研究提供新的思路 and 对其质量评价提供依据。**方法** 基于 UPLC 法建立 3 种不同年份共 47 批吴茱萸样品的指纹图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版) 计算相似度, 运用主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 对样品进行模式识别。**结果** 建立了 47 批吴茱萸样品的 UPLC 指纹图谱 (相似度均 > 0.997), 标定了 40 个共有峰, 指认了其中 12 个, 运用 PCA 和 OPLS-DA 分析, 有效区分了 3 种不同年份的吴茱萸, 共筛选出 22 个质量差异性标志物, 并对其中新绿原酸、绿原酸、吴茱萸碱和吴茱萸次碱 4 种成分的含量进行了测定。**结论** 通过吴茱萸 UPLC 指纹图谱与多成分化学模式识别技术相结合, 能对不同年份的吴茱萸进行有效区分, 为吴茱萸“陈久者良”及其质量控制提供参考依据。

关键词: 吴茱萸; UPLC; 指纹图谱; 化学模式识别; 含量测定; 陈久者良

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2700-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.029

UPLC fingerprints and multi-component chemical pattern recognition of *Euodiae Fructus* in different years

ZHANG Chong-pei¹, ZHANG Yi-xin¹, LI Chao¹, YUAN Xiao-ping², YU Huan¹, GONG Qian-feng¹

1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Jiangxi Zhangshu Tianqitang Chinese Herbal Pieces Co., Ltd., Zhangshu 336000, China

Abstract: Objective To establish fingerprints of *Euodiae Fructus* in different years by UPLC, analyze them with chemical pattern recognition technology, and determine the content of four quality difference markers, so as to provide new ideas for the research of *Euodiae Fructus* “Chen Jiuzhiliang” and provide basis for its quality evaluation. **Methods** The fingerprints of *Euodiae Fructus* samples in three different years were established based on UPLC method. The similarity was calculated by the Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine (2012A edition), and the pattern recognition was carried out by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** UPLC fingerprints of 47 batches of *Euodiae Fructus* samples (similarity > 0.997) were established, 40 common peaks were identified and 12 of them were identified. PCA and OPLS-DA analysis were used to effectively distinguish three different years of *Euodiae Fructus*. A total of 22 quality differential markers were screened, and the content of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, evodiamine and rutaecarpine were determined. **Conclusion** The combination of UPLC fingerprint of *Euodiae Fructus* and multi-component chemical pattern recognition technology can effectively distinguish *Euodiae Fructus* in different years and provide reference for “the older, the better” and quality control of *Euodiae Fructus*.

Key words: *Euodiae Fructus*; UPLC; fingerprints; chemical pattern recognition; content determination; the older, the better

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* officinalis (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近

收稿日期: 2019-01-06

基金项目: 中药标准化研究项目 (ZYBZH-Y-JX-27)

作者简介: 张崇佩, 在读硕士, 从事中药炮制、饮片质量标准与炮制机制研究。Tel: 18702618261 E-mail: 386562407@qq.com

*通信作者 龚千锋, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究。Tel: (0791)87118852 E-mail: gongqf2002@163.com
于 欢, 讲师, 中药饮片标准化与中药炮制机制研究。Tel: 18607090626 E-mail: 416931863@qq.com

成熟果实。其性味辛、苦，热；有小毒，具有温中散寒、降逆止呕、助阳止泻之功^[1]。化学成分包括生物碱、柠檬苦素、黄酮、酚酸、多糖和挥发油等类^[2-9]。

吴茱萸为中药“六陈”之一，首载于梁·陶弘景的《本草经集注》：“凡狼毒、枳实、橘皮、半夏、麻黄、吴茱萸皆欲得陈久者，其余唯须新精。^[10]”张从正《儒门事亲》中亦有“药有六陈，陈久为良，狼茇半橘，枳实麻黄”^[11]之言。新鲜的吴茱萸气味重，刺激性较强，通过陈放可使其药气逐渐挥发，化学成分缓慢变化^[12]，药性趋于缓和，避免服用时可能产生的毒副作用。张慧芳等^[13]发现不同储藏时间和条件对吴茱萸挥发性成分的影响较大，但受限于药材批次（3 批），无法准确表述不同年份吴茱萸之间的差异性。本实验采用 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的方式，通过相似度评价、SIMCA 14.1 模式识别统计分析软件中主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA），区别于以往对产地或基原关系的化学模式判别^[14-15]，对 47 批吴茱萸样品中 40 个共有峰的差异性标志物进行筛选，揭示 3 种不同年份吴茱萸的差异，为“陈久者良”提供新的研究思路及其质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

Waters UPLC ACQUITY H-Class 型超高效液相色谱仪，包括四元溶剂管理器、SM-FTN 样品管理器、柱温箱、二极管阵列（PDA）检测器和 Empower 3 色谱工作站（美国 waters 公司）；AE240 十万分之一电子天平（美国 Mettler 公司）；SQP 型电子天平 [万分之一，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；YB502N 电子天平（百分之一，上海海康电子仪器厂）；KQ5200B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司，功率 200 W，频率 40 KHz）；Milli QB 型超纯水净化系统（美国 Millipore 公司）。

吴茱萸碱（批号 110802-201710，质量分数 $\geq 99.6\%$ ）、吴茱萸次碱（批号 110801-201608，质量分数 $\geq 99.7\%$ ），去氢吴茱萸碱（批号 20531-201703，质量分数 $\geq 98\%$ ）购于中国食品药品检定研究院；异鼠李素-3-O-芸香糖苷（批号 CHB170224，质量分数 $\geq 98\%$ ）、吴茱萸卡品碱（批号 CHB170224，质量分数 $\geq 98\%$ ）、二氢吴茱萸卡品碱（批号 CHB180316，质量分数 $\geq 98\%$ ）购于成都克洛玛生物科技有限公司；绿原酸（批号 D19-150210，质量分数 $\geq 98\%$ ）、新绿原酸（批号

BCTG-0231，质量分数 $\geq 98\%$ ）、隐绿原酸（批号 BCTG-0210，质量分数 $\geq 98\%$ ）、咖啡酸（批号 BCTG-0286，质量分数 $\geq 98\%$ ）、芦丁（批号 BCTG-0411，质量分数 $\geq 98\%$ ），金丝桃苷（批号 BCTG-0286，质量分数 $\geq 98\%$ ）购于中国固体剂制造技术国家工程研究中心；甲酸（LC-MS，批号 A117-50，Fisher Scientific，赛默飞世尔科技有限公司），乙腈（AC-1026-4000，LCMS，ACS），乙醇（批号 1705021，西陇科学股份有限公司）为色谱纯，水为超纯水，其余为分析纯。

吴茱萸饮片经江西中医药大学付小梅副教授鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实，购于江西樟树天齐堂中药饮片有限公司，产地为江西刘公庙五洲村（S1~S18 为 2016 年，S19~S28 为 2017 年，S29~S47 为 2018 年），样品信息见表 1。

表 1 吴茱萸样品来源信息及指纹图谱相似度评价

Table 1 Source information and fingerprint similarity evaluation of *Euodiae Fructus*

编号	批号	相似度	编号	批号	相似度
S1	A1609001-1	0.999	S25	A1709003-4	0.998
S2	A1609001-2	0.998	S26	A1709003-5	0.998
S3	A1609001-3	0.999	S27	A1709004-1	0.998
S4	A1609001-4	0.998	S28	A1709004-3	0.997
S5	A1609001-5	0.999	S29	A1809001-1	0.998
S6	A1609002-1	0.998	S30	A1809001-2	0.997
S7	A1609002-2	0.999	S31	A1809001-3	0.999
S8	A1609002-3	0.998	S32	A1809001-4	0.998
S9	A1609002-4	0.998	S33	A1809001-5	0.999
S10	A1609002-5	0.997	S34	A1809002-1	0.998
S11	A1609003-1	0.997	S35	A1809002-2	0.998
S12	A1609003-2	0.997	S36	A1809002-3	0.998
S13	A1609003-3	0.997	S37	A1809002-4	0.998
S14	A1609003-4	0.997	S38	A1809003-1	0.998
S15	A1609004-1	0.999	S39	A1809003-2	0.998
S16	A1609004-2	0.999	S40	A1809003-3	0.998
S17	A1609004-3	0.999	S41	A1809003-4	0.998
S18	A1609004-4	0.999	S42	A1809003-5	0.998
S19	A1709001-4	0.999	S43	A1809004-1	0.998
S20	A1709002-2	0.999	S44	A1809004-2	0.998
S21	A1709002-5	0.997	S45	A1809004-3	0.998
S22	A1709003-1	0.998	S46	A1809004-4	0.997
S23	A1709003-2	0.999	S47	A1809004-5	0.999
S24	A1709003-3	1.000			

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 3 号筛)约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 25 mL, 称定重量, 浸泡 1 h, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 40 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2 对照品溶液的制备

取新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、隐绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷、去氢吴茱萸碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸卡品碱、二氢吴茱萸卡品碱对照品适量, 精密称定, 分别加入甲醇制成质量浓度为 0.457、0.282、0.458、0.295、0.464、0.648、0.416、0.204、0.578、0.232、0.202、0.334 mg/mL 的对照品储备液。取以上 12 种对照品储备液适量, 加甲醇稀释成一定浓度的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B); 检测波长 330 nm; 体积流量 0.200 mL/min; 进样量 0.4 μL ; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 样品温度 20 $^{\circ}\text{C}$; 梯度洗脱程序见表 2。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution program of mobile phase

时间/min	A/%	B/%	时间/min	A/%	B/%
0	4	96	16.0	17	83
1.0	4	96	21.0	20	80
3.0	5	95	22.0	25	75
3.5	5	95	24.0	45	55
6.5	6	94	26.0	85	15
8.5	7	93	27.0	85	15
10.0	8	92	28.0	100	0
12.0	12	88	33.0	100	0
15.0	17	83			

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取混合对照品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录各峰面积。测定结果显示各峰面积的 RSD 值为 0.58%~0.86%, 符合要求, 表明仪器的精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号

A1809001-1), 分别于供试品溶液制备后的第 0、2、4、8、12、24 h, 按照“2.3”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。测定结果显示各主要峰面积的 RSD 值为 0.34%~1.55%, 结果表明 24 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取吴茱萸(批号 A1809001-1)粉末约 0.3 g, 平行 6 份, 分别按照“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。测定结果显示各主要峰面积的 RSD 为 0.34%~1.52%, 表明此方法的重复性良好。

2.5 数据分析

通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)软件对 UPLC 指纹图谱数据进行处理, 确定共有峰, 生成对照图谱并进行相似度计算, 对部分共有峰进行指认并计算其含量。以各共有峰峰面积为变量, 将数据导入 SIMCA-14.1 软件进行 PCA 和 OPLS-DA 分析, 筛选导致不同年份吴茱萸间差异的化学成分。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱的构建及共有峰的确定

按“2.1”项下方法制备各供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样, 记录 UPLC 色谱图, 并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)软件, 以 S1 样品色谱图为参照, 建立指纹图谱。叠加图及对照指纹图谱见图 1、2。

47 批吴茱萸样品, 共标记了 40 个共有峰, 且共有峰面积占总峰面积的 95%以上, 符合指纹图谱的相关规定, 并对其中 12 个共有峰成分进行了指认, 分别为新绿原酸(峰 5)、绿原酸(峰 12)、咖啡酸(峰 13)、隐绿原酸(峰 15)、芦丁(峰 21)、金丝桃苷(峰 22)、异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷(峰 23)、去氢吴茱萸碱(峰 28)、吴茱萸碱(峰 33)、吴茱萸次碱(峰 34)、吴茱萸卡品碱(峰 38)、二氢吴茱萸卡品碱(峰 40), 见图 3。

3.2 吴茱萸样品指纹图谱相似度分析

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A 版)软件, 以吴茱萸对照指纹图谱为参照, 计算相似度, 结果见表 1。47 批吴茱萸样品与对照指纹图谱的相似度均在 0.997 以上, 表明不同年份间的吴茱萸药材质量稳定。

3.3 化学模式识别研究

3.3.1 无监督化学模式识别-PCA 将 47 批次吴茱萸样品中 40 个共有峰峰面积数据导入 SIMCA 14.1 软

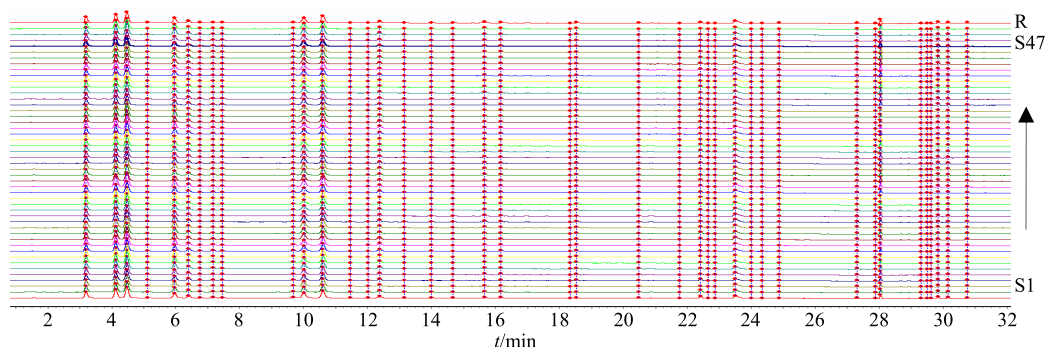


图 1 47 批吴茱萸样品指纹图谱叠加图

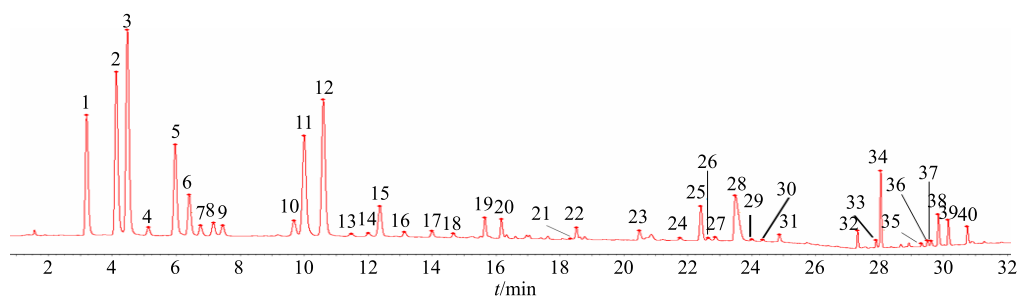
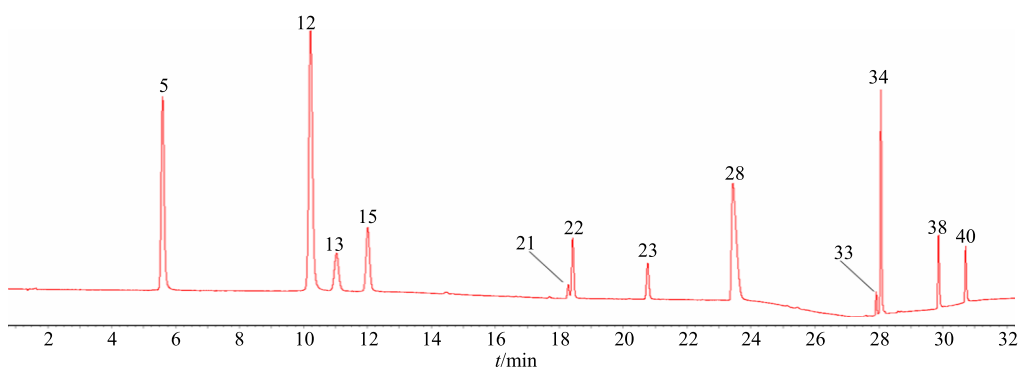
Fig. 1 Fingerprint overlay of 47 batches of *Euodiae Fructus* samples

图 2 吴茱萸对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of *Euodiae Fructus*

5-新绿原酸 12-绿原酸 13-咖啡酸 15-隐绿原酸 21-芦丁 22-金丝桃苷 23-异鼠李素-3-O-芸香糖苷 28-去氢吴茱萸碱 33-吴茱萸碱
34-吴茱萸次碱 38-吴茱萸卡品碱 40-二氢吴茱萸卡品碱
5-neochlorogenic acid 12-chlorogenic acid 13-caffeic acid 15-cryptochlorogenic acid 21-rutin 22-hyperoside 23-narcissoside 28-dehydroevodiamine 33-evodiamine 34-rutaecarpine 38-(Z)-1-Methyl-2-(tridec-8-en-1-yl) quinolin-4 40-1-methyl-2-tridecyl-4 (1H)-quinolinone

图 3 吴茱萸混合对照品色谱图

Fig. 3 Chromatographic charts of *Euodiae Fructus* mixed standards

件中, 进行主成分分析, 前 6 个主成分的特征值均大于 1, 累积贡献率达到 89.866%, 说明前 6 个因子在反映 3 种不同年份吴茱萸与 40 个共有成分的相互关系中起主导作用, 能够揭示样品中大多数的差异信息, 见表 3。

根据 47 批吴茱萸样品 40 个共有峰的 PCA 结果, 提取前 4 个主成分作得分图, 见图 4。结果表

明, 3 种不同年份吴茱萸样品在无监督模式的 PCA 处理下并没有得到很好地区分, 为了更好地考察化学模式识别方法能否将不同年份吴茱萸完全区分, 进一步采用 OPLS-DA 法对样品进行分析。

3.3.2 有监督化学模式识别—OPLS-DA 将 47 批吴茱萸样品按年份分为 3 组, 第 1 组 S1~S18 (2016 年), 第 2 组 S19~S28 (2017 年), 第 3 组

表 3 主成分载荷

Table 3 Loadings of six principal components

峰号	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
1	0.878	-0.024	-0.025	0.459	0.042	0.045
2	0.720	0.015	-0.104	0.656	0.068	0.041
3	0.957	0.036	0.026	0.274	-0.007	0.033
4	0.853	0.241	0.097	0.336	-0.075	-0.098
5	0.988	0.016	0.094	0.089	-0.025	0.025
6	0.931	0.238	-0.040	0.226	0.071	0.012
7	0.582	0.472	-0.341	0.517	-0.048	0.061
8	0.891	0.339	-0.039	0.182	-0.095	-0.012
9	-0.344	0.600	-0.540	0.247	0.276	-0.052
10	-0.523	0.377	-0.456	0.388	0.156	-0.099
11	0.552	0.754	-0.147	-0.200	0.038	0.004
12	0.939	-0.073	0.089	0.159	0.143	0.021
13	-0.758	0.165	-0.108	0.340	0.217	0.207
14	0.956	-0.108	0.105	-0.019	-0.009	0.009
15	0.976	0.163	0.020	-0.075	-0.049	0.039
16	0.388	0.456	-0.539	-0.015	0.105	0.231
17	0.158	0.743	-0.379	-0.416	0.082	0.025
18	0.902	0.054	-0.064	0.137	-0.103	0.011
19	-0.024	0.727	-0.225	-0.463	0.196	0.002
20	0.629	-0.166	0.126	-0.224	0.349	-0.134
21	0.764	0.297	-0.253	-0.300	-0.027	0.092
22	0.811	0.396	-0.213	-0.241	-0.074	0.137
23	0.607	0.690	-0.194	-0.239	-0.073	0.023
24	-0.257	0.198	0.471	0.208	0.625	0.192
25	-0.125	-0.083	0.505	-0.182	0.497	0.529
26	0.836	0.311	0.071	-0.363	0.052	0.030
27	0.930	0.211	0.201	-0.051	0.075	0.104
28	0	0.009	0.358	0.027	-0.406	0.473
29	0.485	0.053	0.615	0.023	0.202	-0.430
30	0.453	0.439	0.370	-0.083	0.184	-0.510
31	0.561	0.353	0.608	0.055	-0.150	0.133
32	0.854	0.214	0.379	-0.133	-0.130	0.022
33	-0.725	0.634	-0.070	0.043	-0.073	-0.027
34	-0.830	0.528	0.098	-0.013	-0.027	-0.011
35	-0.524	0.753	0.275	0.083	-0.132	-0.079
36	-0.469	0.726	0.400	0.102	-0.144	-0.036
37	-0.809	0.556	0.083	0.098	-0.052	-0.024
38	-0.877	0.433	0.064	0.172	-0.025	-0.007
39	-0.501	0.652	0.495	0.096	-0.121	0.002
40	-0.478	0.714	0.413	0.127	-0.073	0.093
特征值	19.666	7.397	3.709	2.573	1.393	1.208
贡献率/%	49.165	18.494	9.273	6.432	3.483	3.020
累积贡献率/%	49.165	67.658	76.932	83.364	86.846	89.866

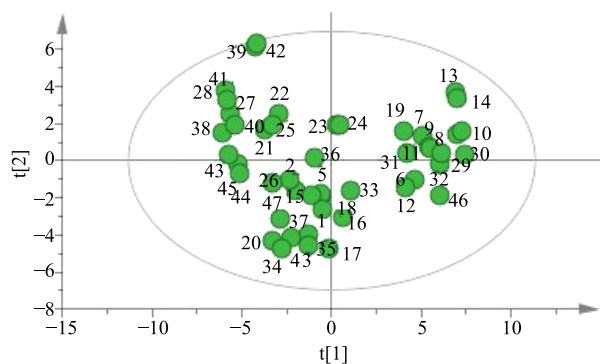
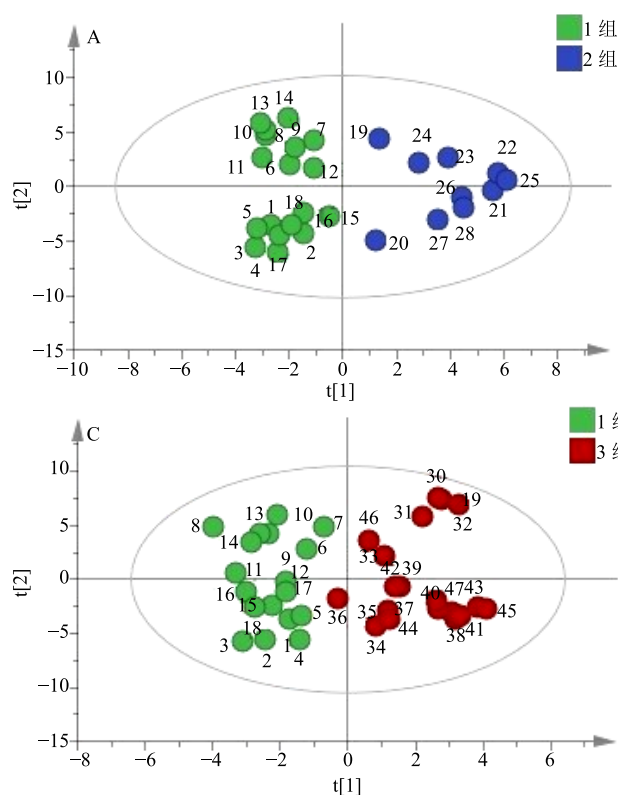


图 4 PCA 得分图

Fig. 4 Score plot of PCA



A-1 组与 2 组得分散点图 B-2 组与 3 组得分散点图 C-1 组与 3 组得分散点图 D-各化合物变量投影重要性 (VIP)

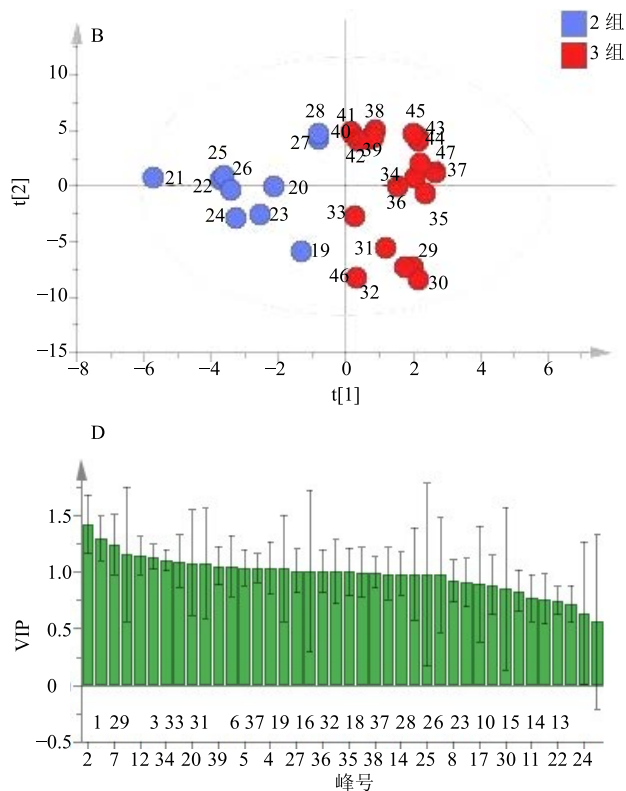
A-score scatter plot of group 1 and group 2 B-score scatter plot of group 1 and group 2 C-score scatter plot of group 1 and group 2 D-VIP

图 5 OPLS-DA 得分散点图

Fig. 5 Score scatter plot of OPLS-DA

通过提取 OPLS-DA 模型中 40 个变量的 VIP 值 (图 5-D), 对 40 个共有峰峰面积 VIP 值大小进行排列, 选择 VIP 值大于 1 的共有峰, 结果显示峰 2、1、7、29、12、3、34、33、20、31、39、6、5、37、4、19、27、16、36、32、35、18 的 VIP 值均大于 1, 说明以上 22 种化学成分对 3 种不同年份吴茱萸样品分类具有显著的影响, 这些成分是引起不同年份吴茱萸变化的主要标志物, 其中 12 号峰为绿原酸, 34 号峰为吴茱萸次碱, 33 号峰为吴茱萸

S29~S47 (2018 年), 通过 OPLS-DA 分析结果可知, 1 组与 2 组区分结果良好, 如图 5-A 所示, 模型主成分回归系数: $R^2_X=0.738$, $R^2_Y=0.862$, $Q^2=0.734>0.5$; 2 组与 3 组区分结果良好, 如图 5-B 所示, 模型主成分回归系数: $R^2_X=0.621$, $R^2_Y=0.773$, $Q^2=0.688>0.5$, 1 组与 3 组区分结果良好, 如图 5-C 所示, 模型主成分回归系数: $R^2_X=0.83$, $R^2_Y=0.826$, $Q^2=0.629>0.5$ 。以上 3 组预测模型下 Q^2 均大于 0.5, 说明 OPLS-DA 预测模型有效, 3 组不同年份吴茱萸样品得到较好的区分。



碱, 5 号峰为新绿原酸。其他色谱峰 VIP 均小于 1, 对不同年份吴茱萸差异性影响不大。

3.4 指标性成分含量测定

3.4.1 线性关系 精密吸取新绿原酸、绿原酸、吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品储备液适量, 配制成 6 个质量浓度系列的混合对照品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件进行测定, 以对照品质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程、相关系数 (r) 和线性范围, 结果见表 4。

表 4 4 种成分的线性关系和线性范围

Table 4 Linear relationship and linear range of four kinds of components

成分	线性关系	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
新绿原酸	$Y=5\,436.2\,X-18\,196$	0.999 7	22.85~114.25
绿原酸	$Y=5\,929\,X+24\,803$	0.999 1	78.96~183.3
吴茱萸碱	$Y=180.07\,X+1\,041.3$	0.999 7	28.90~144.5
吴茱萸次碱	$Y=13\,278\,X+2\,807$	0.999 6	1.16~23.2

3.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液,按照“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次,记录各峰面积。测定结果显示各峰面积的 RSD 值分别为 0.72%、0.56%、0.86%、0.72%,表明仪器的精密度良好。

3.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 A1809001-1),分别于供试品溶液制备后的 0、2、4、8、12、24 h,按照“2.3”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。测定结果显示各主要峰面积的 RSD 值分别为 0.63%、0.53%、0.63%、0.50%,结果表明 24 h 内供试品溶液的稳定性良好。

3.4.4 重复性试验 取吴茱萸(批号 A1809001-1)粉末约 0.3 g,平行 6 份,分别按照“2.1”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。测定结果显示各主要峰面积的 RSD 为 0.62%、0.59%、0.61%、0.48%,表明此方法的重复性良好。

3.4.5 加样回收率试验 精密称取吴茱萸粉末(批号 A1809001-1) 6 份,每份 0.15 g,分别加入新绿原酸、绿原酸、吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品 0.959 7、1.269、0.797 6、0.095 1 mg,按“2.1”项下方法,制备加样样品溶液,按照“2.3”项下色谱条件进行测定,记录峰面积并计算回收率,结果显示新绿原酸、绿原酸、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的回收率分别为 101.03%、99.93%、98.25%、99.02%;RSD 值分别为 0.93%、1.01%、1.14%、1.37%。

3.4.6 样品含量测定 通过对 47 批吴茱萸药材进行色谱分析,测定吴茱萸样品中新绿原酸、绿原酸、吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量,含量测定结果见表 5。

4 讨论

本实验共指认了吴茱萸中 12 种化学成分,包含了酚酸(新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、隐绿原酸),黄酮(芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷)和生物碱(去氢吴茱萸碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸卡品碱、二氢吴茱萸卡品碱) 3 类,但未能检测到《中国药典》2015 年版含量测定项下的柠檬

表 5 吴茱萸 4 种成分含量测定结果

Table 5 Determination of four components in *Euodiae Fructus*

编号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	新绿原酸	绿原酸	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
S1	5.59	8.13	5.60	0.77
S2	5.36	7.84	5.72	0.79
S3	5.39	7.94	5.18	0.72
S4	5.24	7.83	5.49	0.75
S5	5.59	8.21	5.34	0.76
S6	6.56	8.28	5.24	0.63
S7	6.55	8.42	5.30	0.68
S8	6.99	8.69	5.17	0.61
S9	6.67	8.49	5.49	0.66
S10	7.02	8.67	5.18	0.61
S11	6.98	8.57	5.62	0.73
S12	6.74	8.19	5.44	0.68
S13	7.16	8.76	6.11	0.76
S14	7.04	8.77	5.97	0.77
S15	5.27	7.97	5.83	0.79
S16	5.57	8.10	4.87	0.67
S17	5.30	8.01	4.93	0.67
S18	5.59	8.08	5.07	0.69
S19	6.33	8.23	5.77	0.75
S20	4.99	7.53	5.86	0.84
S21	4.93	7.48	7.04	0.97
S22	4.87	7.63	7.36	0.98
S23	5.57	7.85	6.45	0.85
S24	5.65	7.98	6.64	0.85
S25	4.84	7.43	7.04	0.95
S26	4.97	7.57	5.85	0.83
S27	4.58	7.13	8.44	1.04
S28	4.52	7.15	8.67	1.07
S29	6.59	8.44	5.33	0.63
S30	7.06	8.73	4.92	0.59
S31	6.26	8.27	5.61	0.67
S32	6.76	8.57	5.09	0.61
S33	5.48	7.83	5.83	0.72
S34	5.13	7.75	5.66	0.74
S35	5.39	7.88	5.24	0.69
S36	5.44	8.26	6.50	0.85
S37	5.27	7.89	6.00	0.81
S38	4.59	7.11	8.10	1.01
S39	4.78	7.58	9.03	1.09
S40	4.66	7.15	8.00	0.97
S41	4.64	7.17	8.13	1.02
S42	4.85	7.61	9.07	1.08
S43	4.49	7.03	7.89	0.95
S44	4.49	6.95	8.22	0.96
S45	4.51	6.98	7.96	0.96
S46	6.84	8.33	4.86	0.57
S47	4.91	7.27	7.12	0.86

苦素类成分,因其为末端吸收,需在 215 nm 波长附近才有吸收,而在以甲酸水溶液与磷酸水溶液系统为流动相的比较中发现,215 nm 下甲酸水溶液系统几乎没有成分检出,磷酸水溶液系统虽有检出,但杂质峰较多,基线噪音大,不平稳,严重影响其他成分的分离及鉴别;通过进行全波长扫描,提取其中 215、254、330 nm 等较大吸收波长为检测波长,发现以 330 nm 波长下的色谱峰数量多,基线波动稳定,各成分分离度良好,杂峰影响较小;再对比甲醇与乙腈的影响,综合选择以乙腈-0.1% 甲酸为流动相,330 nm 为检测波长最为适宜。

化学模式识别在中药质量控制中的运用越来越广泛,单一的含量测定与指纹图谱也越来越难以全面合理地反映中药材整体的质量情况,而将其与中药研究相结合,使对中药复杂的多成分鉴别转变为对数据的解析,从而更有利于对中药质量的控制。吴茱萸有小毒,其生物碱和挥发油既是功效成分也是毒性成分,功效与毒性密切相关。临床曾报道因服用新鲜、炮制未透或过量的吴茱萸而导致中毒的案例,因而通过陈放来减少辛辣刺激之性,减轻毒副作用,以“陈久者良”。本实验通过 UPLC 指纹图谱与化学模式识别模式相结合的方式,可以对不同年份的吴茱萸药材进行有效区分,找出引起其变化的差异性标志物,并通过对其中新绿原酸、绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱成分的含量测定,从多角度更为全面、准确控制药材质量,同时也可作为药材的贮藏以及质量优劣的判别提供依据,为“六陈”中药的研究提供新思路。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 楼璐璐,徐姗姗,方淡思. 吴茱萸化学成分与质量控制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(8): 2154-2157.
- [3] 苏秀丽,印敏,徐曙,等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析吴茱萸化学成分 [J]. 中成药, 2017, 39(6): 1223-1227.
- [4] Xia X, Luo J G, Liu R H, *et al.* New alkaloids from the leaves of *Evodia rutaecarpa* [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(19): 2154-2159.
- [5] Sugimoto T, Miyase T, Kuroyanagi M, *et al.* Limonoids and quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa* Benth [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(11): 4453-4461.
- [6] 胡传芹,杨鑫宝,杨秀伟,等. 吴茱萸中的黄酮苷类化合物 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2571-2575.
- [7] He Y, Li J, Wu H H, *et al.* A new caffeoylgluconic acid derivative from the nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(13): 1243-1248.
- [8] 赵娟娟,任燕,史亚楠,等. 吴茱萸多糖的含量测定及其抗胃溃疡作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2384-2386.
- [9] 姜方明,李群芳,黄燮南,等. 固相微萃取-气相色谱-质谱联用分析吴茱萸挥发油成分 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7): 1248-1253.
- [10] 陶弘景. 本草经集注 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [11] 张从正. 儒门事亲 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997.
- [12] 徐国钧,徐珞珊. 常用中药材品种整理和质量研究, 第一册 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994.
- [13] 张慧芳,张志杰,武露凌,等. GC-MS 分析不同贮藏条件对吴茱萸挥发油成分的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2006(3): 205-209.
- [14] 曾金祥,魏娟,毕莹,等. 吴茱萸指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 143-147.
- [15] 魏娟,曾金祥,毕莹,等. 吴茱萸水溶性成分 HPLC 指纹图谱与化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3400-3405.