

不同商品规格吴茱萸有效成分含量和肝细胞毒性的研究

张 薇¹, 任 昆¹, 王冬梅², 吴双凤¹, 曲寿河¹, 程喜乐¹, 任舒蒙¹, 潘英妮^{1*}, 刘晓秋^{1*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘 要: 目的 评价市售吴茱萸 *Euodiae Fructus* 的质量并研究不同商品规格吴茱萸中化学成分与肝细胞毒性的相关性, 为吴茱萸全面质量控制提供依据。方法 按吴茱萸药材商品规格收集小花吴茱萸 7 批, 中花吴茱萸 22 批, 大花吴茱萸 10 批, 建立了 UPLC 法同时测定吴茱萸中柠檬苦素 (limonin, LIM)、吴茱萸碱 (evodiamine, EVD)、吴茱萸次碱 (rutaecarpine, RUT)、1-甲基-2-壬基-4-(1H)-喹诺酮 [1-methyl-2-nonyl-4(1H)-quinolone, MNQ]、1-甲基-2-十一烷基-4-(1H)-喹诺酮 [1-methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone, MUQ] 和吴茱萸新碱 (evocarpine, EVC) 的含量; 采用 CCK-8 法检测吴茱萸对 L02 肝细胞的生长抑制作用。运用 SIMCA-P 14.1 统计软件对吴茱萸的细胞存活率进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。结果 有 19 批商品符合《中国药典》2020 年版规定, 不符合药典要求的 20 批样品中有 10 批为药材基原不符, 有 1 批 EVD 和 RUT 的总量不符合药典规定, 9 批 LIM 含量不符合药典规定。7 批小花吴茱萸中 1 批不符合药典要求, 22 批中花吴茱萸中 10 批不符合药典要求, 10 批大花吴茱萸中 9 批不符合药典要求。同时发现小花吴茱萸中 LIM 含量高于中花和大花吴茱萸, 而生物碱含量中花和大花吴茱萸中较高。其中 S33~S39 样品按果实大小属于中花吴茱萸但不含 LIM, 将其称为中花样吴茱萸劣品。基于建立的 UPLC 方法同时测定吴茱萸中 LIM 和 5 种生物碱含量; PCA 分析模型将小花吴茱萸、中花吴茱萸、大花吴茱萸和中花样吴茱萸劣品的毒性很好地区分为 4 个区域, 对 L02 肝细胞的生长抑制作用为中花样吴茱萸劣品 > 大花吴茱萸 > 中花吴茱萸 > 小花吴茱萸, 且 LIM 与 5 种生物碱的比值和吴茱萸对 L02 肝细胞的半数抑制率 (IC₅₀) 总体上呈正相关。结论 吴茱萸的毒性与 LIM 和 5 种生物碱比例有关, LIM 与 5 种生物碱含量和的比值越大, 吴茱萸样品毒性越小。提示大花吴茱萸不适合作为商品流通, 同时吴茱萸质量控制应考虑药材中 LIM 和生物碱类成分含量的比例。

关键词: 吴茱萸; 商品规格; UPLC; 柠檬苦素; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 生物碱; 肝细胞毒性

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)17-5287-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.17.021

Comparison of effective components and hepatotoxicity in the different commercial grades of *Euodiae Fructus*

ZHANG Wei¹, REN Kun¹, WANG Dong-mei², WU Shuang-feng¹, QU Shou-he¹, CHENG Xi-le¹, REN Shu-meng¹, PAN Ying-ni¹, LIU Xiao-qi¹

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, 110016, China

2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, 110016, China

Abstract: Objective To evaluate the quality of Wuzhuyu (*Euodiae Fructus*, EF) in the market, and study the correlation between components and hepatotoxicity of different commercial grades of EF, and provide the foundation for the quality control of EF.

收稿日期: 2021-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773879); 辽宁省高等学校国 (境) 外培养项目 (2018LNGXGJWPY-YB024)

作者简介: 张 薇 (1992—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及中药质量控制研究。Tel: (024)43520708 E-mail: 751305770@qq.com

*通信作者: 刘晓秋, 女, 沈阳药科大学 50 期中药学专业校友, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质及质量评价研究。世界中医药学会联合会中药化学专业委员会理事, 主持国家自然科学基金面上项目 3 项, 主持完成省部级项目 10 余项 (其中为 2010 版药典起草项目 3 项)。获国家科学技术进步二等奖及国家中医药管理局中医药科学技术进步三等奖各 1 项, 获得国家级中药新药证书 2 个, 申请专利授权 3 项。Tel: (024)43520708 E-mail: liuxiaoqi3388@126.com

潘英妮, 女, 硕士生导师, 沈药 64 期中药学专业校友, 研究方向为中药质量控制和药效物质研究。全国中药特色技术传承人才, 辽宁省中药特色技术传承人才, 世界中医药学会联合会满药专业委员会常务理事, 中华中医药学会中药炮制分会委员。主持完成国家自然科学基金青年基金项目 1 项, 第四次全国中药资源普查项目 2 项, 辽宁省教育厅项目 3 项。)

Tel: (024)43520711 E-mail: panyingni@163.com

Methods Seven batches of small flower EF (SEF), twenty-two batches of medium flower EF (MEF) and ten batches of big flower EF (BEF) were collected according to the commercial specifications of EF. The contents of limonin (LIM), evodiamine (EVD) and rutaecarpine (RUT) in 39 batches of EF samples were determined according to 2020 Edition of Chinese Pharmacopoeia. A UPLC method was established for the simultaneous determination of LIM, EVD, RUT, 1-methyl-2-nonyl-4(1H)-quinolone (MNQ), 1-methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone (MUQ), and evocarpine (EVC) in EF. The inhibitory effects of EF samples on L02 cells were detected by CCK-8 method. The principal component analysis (PCA) was performed on the basis of cell viability of 39 batches of EF samples to evaluate the differences toxicity of different categories of EF samples using SIMCA-P 14.1 statistical software. **Results** The results showed that there were 19 batches of EF meeting the requirements of Pharmacopoeia. Of the 20 batches of samples that do not meet the requirements of Pharmacopoeia, 10 batches were inconsistent with the original medicinal materials, EVD and RUT contents of one batch, and LIM contents of nine batches did not meet the requirements. One of seven batches SEF, ten of twenty-two batches MEF, and nine of ten batches BEF did not meet the requirements of Pharmacopoeia. At the same time, it was found that the LIM contents in SEF were higher than that in MEF and BEF, while the alkaloid contents were higher in MEF and BEF. Samples S33~S39 belonged to MEF but do not contain LIM according to the fruit size, which was called inferior products of MEF(IMEF). The method based on UPLC could be applied to determine LIM and five alkaloids in EF. The results of PCA suggested that 39 batches of samples were divided into four groups: SEF, MEF, BEF, IMEF. The inhibition effects of EF samples on L02 cell were IMEF>BEF>MEF>SEF. The result also demonstrated that the ratio of contents of LIM to five alkaloids was positively correlated with the IC₅₀ of EF samples. **Conclusion** The toxicity of EF was related to the ratio of LIM to 5 alkaloids. The greater the ratio of LIM to five alkaloids, the less toxic the EF was. It was suggested that BEF was not suitable for circulation as a commodity, and the proportion of LIM and alkaloids in EF should be considered in quality control.

Key words: Euodiae Fructus; commercial grades; UPLC; limonin; evodiamine; rutaecarpine; alkaloid; hepatotoxicity

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia 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, 收载于《中国药典》2020 年版, 有小毒。具有治疗呕吐、腹泻、头痛、胃痛、痛经等功效。商品流通中按果实的粒头大小吴茱萸被分成小花吴茱萸、中花吴茱萸和大花吴茱萸^[1]。市场上果实的粒头大小不同, 开裂程度不同, 售卖价格也不同。现代药理学研究对吴茱萸的肝毒性报道不一致, Kim 等^[2]研究表明 2 g/kg 吴茱萸水提取物连续给药 13 周, 每周给药 5 次, 大鼠没有明显不良反应。杨秀伟等^[3]研究表明 10 g/kg 吴茱萸水提取和 70%乙醇提取物, 每天 1 次, 连续给药 7 d 对昆明小鼠没有产生急性毒性。黄伟等^[4]研究表明昆明小鼠单次 ig 2.1、4.1、8.2、16.3 和 32.5 g/kg 吴茱萸水提取物, 小鼠血清谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和碱性磷酸酶 (aspartate aminotransferase, AST) 含量显著增加, 具有剂量依赖关系。张晟瑞等^[5]研究表明以 0.65、3.25、6.50 g/kg 连续给药 5、10、15 d 后, 小鼠血清中 ALT、AST、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 的含量显著升高。李莉等^[6]收集吴茱萸、石虎和疏毛吴茱萸 3 个品种吴茱萸样品,

研究表明 16.67 g/kg 吴茱萸水提取物连续 15 d ig 给予昆明小鼠, 表明小鼠血清中 ALT 和 AST 含量显著增加, 肝毒性大小与品种没有明显相关性, 而与产地密切相关。Li 等^[7]研究了 16 个产地共 19 批 35 g/kg 吴茱萸 50%乙醇提取物对小鼠的肝毒性, 表明山东和陕西的吴茱萸对小鼠没有产生肝毒性, 江西的吴茱萸肝毒性最强, 江苏、广东、湖南和广西的吴茱萸毒性较弱。随着吴茱萸的广泛应用, 吴茱萸的肝毒性引起了广泛关注, 但不同商品规格吴茱萸的化学成分和毒性差异未见报道。本实验从不同商品规格的角度探究吴茱萸的成分与肝毒性的关系, 为吴茱萸的质量控制和安全用药提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters UPLC ACQUITY 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); DZKW 型电子恒温水浴锅 (北京永光明医疗仪器厂); KQ5200 型超声清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Varioskan Flash 型全波长多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); CLM-170B-8-NF 型恒温 CO₂ 培养箱 (新加坡艺思高科技有限公司); BDS400 倒置显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司)

1.2 试药

对照柠檬苦素 (LIM)、吴茱萸碱 (EVD) 和吴

茺蔚次碱 (RUT) 均购于成都普菲德生物技术有限公司; 1-甲基-2-壬基-4(1*H*)-喹诺酮 (MNQ)、1-甲基-2-十一烷基-4(1*H*)-喹诺酮 (MUQ) 和茺蔚新碱 (EVC) 均购于上海紫霞生物技术有限公司, 所有对照品质量分数 $\geq 98\%$; 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司)、乙醇和甲酸 (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)、娃哈哈矿泉水 (杭州娃哈哈集团); RPMI 1640 完全培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、二甲基亚砜 (DMSO)、注射用青霉素钠、注射用硫酸链霉素、PBS 和细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CCK-8) 均购于大连美仑生物技术有限公司。

39 批茺蔚来源于安徽、贵州、广西、湖北、四川、浙江、江西、云南和湖南 9 个产地, 根据

药材的大小分为小花茺蔚 (果实直径 2~3 mm)、中花茺蔚 (果实直径 5 mm 左右) 和大花茺蔚 (果实直径 6~10 mm, 其多开裂) 3 个商品规格 (图 1 和表 1), 经沈阳药科大学中药学院潘英妮副教授鉴定为茺蔚 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. 和疏毛茺蔚 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实以及巴氏茺蔚 *Euodia baberi* Rehd. et Wils.、少果茺蔚 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. f. *meionocarpa* (Hand. -Mazz.) Huang、臭辣子 *E. fargesii* Dode、华南茺蔚 *E. austrosinensis* Hand. -Mazz. 和野茶辣 *E. sp.* 的干燥果实, 具体见表 1。



图 1 不同商品规格的茺蔚

Fig. 1 The photographs of different commercial grades of *Euodiae Fructus*

表 1 市售茺蔚样品信息

Table 1 Information of samples collected of *Euodiae Fructus* by HPLC

批次	基原	产地	商品规格	大小/mm	收集时间	鉴定结果	批次	基原	产地	商品规格	大小/mm	收集时间	鉴定结果
S1	石虎	浙江	小花茺蔚	1.5~3	2018-04	+	S21	野茶辣	云南	中花茺蔚	2~5	2018-09	+
S2	石虎	浙江	小花茺蔚	1~3	2018-03	+	S22	石虎	湖南	中花茺蔚	2~5	2018-09	+
S3	石虎	江西	小花茺蔚	2~3	2016-07	-	S23	巴氏茺蔚	安徽	大花茺蔚	4~8	2018-04	+
S4	石虎	江西	小花茺蔚	1~2	2017-01	+	S24	茺蔚	贵州	大花茺蔚	8~10	2018-03	-
S5	石虎	湖北	小花茺蔚	2~3	2018-09	+	S25	茺蔚	贵州	大花茺蔚	7~8	2018-03	-
S6	石虎	湖南	小花茺蔚	1~3	2018-09	+	S26	巴氏茺蔚	广西	大花茺蔚	6~8	2018-03	+
S7	石虎	江西	小花茺蔚	2~3	2018-03	+	S27	茺蔚	湖北	大花茺蔚	6~9	2018-03	+
S8	茺蔚	江西	中花茺蔚	3~4	2018-04	+	S28	臭辣子	湖北	大花茺蔚	5~8	2018-04	+
S9	石虎	云南	中花茺蔚	2~4	2018-04	+	S29	华南茺蔚	贵州	大花茺蔚	7~10	2018-09	+
S10	茺蔚	江西	中花茺蔚	2~5	2016-01	+	S30	巴氏茺蔚	湖北	大花茺蔚	7~8	2018-09	+
S11	石虎	江西	中花茺蔚	2~5	2016-01	+	S31	野茶辣	云南	大花茺蔚	5~7	2018-09	+
S12	石虎	江西	中花茺蔚	2~4	2018-04	+	S32	少果茺蔚	湖南	大花茺蔚	7~8	2018-09	+
S13	茺蔚	广西	中花茺蔚	2~5	2018-04	+	S33	茺蔚	四川	中花样茺蔚劣品	3~5	2018-03	-
S14	臭辣子	湖北	中花茺蔚	2~6	2018-04	+	S34	茺蔚	湖北	中花样茺蔚劣品	2~5	2018-04	-
S15	茺蔚	安徽	中花茺蔚	2~5	2018-04	+	S35	茺蔚	贵州	中花样茺蔚劣品	3~6	2018-04	-
S16	石虎	广西	中花茺蔚	2~5	2018-09	+	S36	茺蔚	湖北	中花样茺蔚劣品	2~3	2018-04	-
S17	石虎	江西	中花茺蔚	2~5	2018-09	+	S37	茺蔚	贵州	中花样茺蔚劣品	3~5	2018-03	-
S18	野茶辣	贵州	中花茺蔚	2~5	2018-09	+	S38	茺蔚	湖南	中花样茺蔚劣品	3~6	2018-09	-
S19	茺蔚	湖北	中花茺蔚	2~5	2018-09	+	S39	茺蔚	湖南	中花样茺蔚劣品	3~6	2018-09	-
S20	石虎	四川	中花茺蔚	2~5	2018-09	+							

“+”为根据课题组前期对 LIM、EVD、RUT 的测定结果符合《中国药典》2020 年版的样品,“-”未检测到 LIM 或 LIM、EVD、RUT 的测定结果不符合《中国药典》2020 年版的样品

“+” means the research group found the samples that met the 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia according to the determination results of LIM, EVD and RUT,“-” means LIM was not detected or determination results of LIM, EVD and RUT don't meet the 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia

2 方法与结果

2.1 吴茱萸中6个指标成分的含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 取吴茱萸粉末约0.3 g, 精密称定, 加70%乙醇25 mL, 称定质量, 浸泡1 h, 超声提取40 min, 冷却至室温, 再次称定质量后补足失重, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别取 LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 对照品适量, 精密称定, 置10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 质量浓度分别为204.5、520、511、507、502、495 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇 (A) -0.1%甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱: 0~8 min, 95%~5% B; 8~10 min, 5% B; 10~12 min, 5%~95% B。体积流量为0.4 mL/min, 检测波长210 nm, 柱温30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量2 μL 。

2.1.4 专属性实验 精密称取吴茱萸适量, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 另取对照品溶液, 进样分析, 记录色谱图。将供试品溶液色谱图和对照品溶液色谱图比较, 结果表明, 供试品溶液中的其它成分不干扰 LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 的测定。各峰与相邻峰分离度大于1.5。LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 的保留时间分别是5.20、6.52、6.86、7.56、8.25、8.42 min, 见图2。

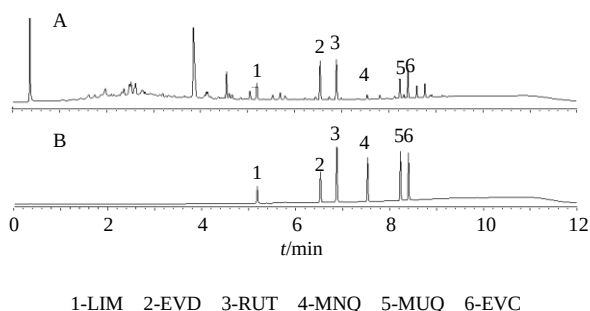


图2 吴茱萸样品 (A) 和混合对照品溶液 (B) 色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Euodiae Fructus (A) and standards (B)

2.1.5 线性方程的绘制 分别精密量取“2.1.2”项储备液适量, 用甲醇稀释配制成 LIM 质量浓度为5.1、7.7、10.2、15.3、20.5和40.9 $\mu\text{g/mL}$; EVD 质量浓度为2.0、5.2、6.5、13.0、26.0和58.5 $\mu\text{g/mL}$;

RUT 质量浓度为1.0、1.7、3.8、7.7、19.2和38.3 $\mu\text{g/mL}$; MNQ 质量浓度为0.2、0.4、0.8、1.5、2.5和4.1 $\mu\text{g/mL}$; MUQ 质量浓度为0.3、0.8、0.9、1.5、3.8和8.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 EVC 质量浓度为0.8、2.0、4.1、9.3、18.6和37.1 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样2 μL 。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归运算, 所得回归方程, 结果见表2。

表2 吴茱萸中6种成分的回归方程

Table 2 Regression data for the six constituents determined in Euodiae Fructus

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
LIM	$Y=3\,472.5+8\,214.6$	0.999 5	5.1~40.9
EVD	$Y=19\,085\,X-11\,526$	0.998 5	2.0~58.5
RUT	$Y=31\,069\,X-17\,632$	0.998 8	1.0~38.3
MNQ	$Y=18\,296\,X+1\,247.6$	0.997 8	0.2~4.1
MUQ	$Y=20\,945\,X-2\,380$	0.997 2	0.3~8.0
EVC	$Y=20\,430\,X-5\,051.9$	0.999 9	0.8~37.1

2.1.6 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件, 连续进样6次, 计算色谱峰面积 RSD, 结果 LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 色谱峰面积 RSD 分别为0.4%、0.3%、0.3%、0.3%、0.4%和0.3%。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批样品 (S9), 按照“2.1.1”项下方法平行制备样品溶液6份, 按照上述色谱条件进行测定, 计算 LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 含量, RSD 分别为2.7%、2.5%、2.4%、2.8%、1.7%和2.2%。

2.1.8 稳定性试验 精密称取同一批样品 (S9), 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于0、2、4、6、12、24 h 按“2.1.3”项下色谱条件进样分析, LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 峰面积的 RSD 分别为0.4%、0.4%、0.2%、0.9%、0.2%和0.4%。

2.1.9 加样回收率试验 取已测定的样品 (S9), 精密称定, 每份0.15 g, 分别加入一定量的对照品, 按“2.1.1”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 进行回收率测定, LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 加样回收率分别为100.06%、101.45%、98.06%、99.75%、98.59%和100.91%, RSD 分别为2.5%、2.7%、2.3%、2.3%、1.9%和1.8%。

2.1.10 样品测定 精密称取吴茱萸适量, 照“2.2.1”项下方法操作, 制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样分析, 计算各样品6种成分的含量, 结果见表3。

表 3 市售吴茱萸中 6 种成分的含量及其对 L02 细胞毒性
Table 3 Contents of six constituents and hepatotoxicity of Euodiae Fructus

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)						LIM 与 5 种生物碱含量之和的比值	IC ₅₀ 值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
	LIM	EVD	RUT	MNQ	MUQ	EVC		
S1	1.190	0.114	0.069	0.062	0.269	0.049	0.211	244.90±6.43
S2	0.744	0.108	0.069	0.058	0.258	0.044	0.139	167.91±3.17
S3	1.848	0.025	0.098	0.024	0.024	0.131	0.612	486.99±5.33
S4	1.247	0.132	0.066	0.059	0.252	0.052	0.203	164.77±1.02
S5	0.825	0.220	0.096	0.013	0.018	0.108	0.181	128.34±2.16
S6	0.766	0.135	0.072	0.071	0.320	0.057	0.117	108.32±3.04
S7	0.839	0.220	0.136	0.020	0.035	0.223	0.132	105.06±1.83
S8	0.748	0.540	0.181	0.056	0.124	0.194	0.068	59.53±3.95
S9	0.734	0.340	0.247	0.042	0.135	0.222	0.074	65.38±4.27
S10	0.229	0.623	0.412	0.094	0.137	0.406	0.014	69.07±3.95
S11	0.453	0.789	0.291	0.035	0.065	0.358	0.029	61.45±2.74
S12	0.847	0.889	0.289	0.025	0.052	0.323	0.054	60.18±1.93
S13	0.258	2.212	0.863	0.065	0.159	0.788	0.006	44.91±0.96
S14	0.668	0.634	0.258	0.100	0.390	0.203	0.042	68.47±2.15
S15	0.587	1.283	0.463	0.055	0.121	0.444	0.025	51.99±3.28
S16	0.780	0.352	0.157	0.012	0.027	0.276	0.095	87.93±3.75
S17	0.739	0.565	0.183	0.021	0.032	0.217	0.073	65.63±4.02
S18	0.828	0.349	0.247	0.026	0.074	0.303	0.083	93.66±2.08
S19	0.843	0.549	0.185	0.087	0.341	0.137	0.065	83.15±1.84
S20	0.812	0.972	0.168	0.053	0.087	0.409	0.048	60.48±4.06
S21	1.229	0.385	0.244	0.028	0.089	0.310	0.116	94.80±3.13
S22	0.552	0.260	0.129	0.013	0.024	0.223	0.085	77.81±2.50
S23	0.288	0.465	0.212	0.051	0.168	0.107	0.029	56.26±3.58
S24	0.041	0.959	0.318	0.029	0.295	0.075	0.002	42.96±2.08
S25	0.056	1.379	0.674	0.042	0.120	0.558	0.002	53.76±3.05
S26	0.400	0.313	0.114	0.012	0.041	0.069	0.073	80.01±0.36
S27	0.242	0.633	0.218	0.058	0.228	0.127	0.019	56.73±5.03
S28	0.367	0.528	0.222	0.073	0.259	0.140	0.030	65.87±2.19
S29	0.157	0.506	0.405	0.038	0.107	0.397	0.011	70.28±3.21
S30	0.588	0.584	0.188	0.073	0.298	0.104	0.047	79.53±0.35
S31	0.708	0.470	0.272	0.029	0.098	0.347	0.058	69.75±0.35
S32	0.255	0.666	0.240	0.114	0.381	0.133	0.017	47.23±3.08
S33	—	2.137	0.896	0.154	0.344	1.326	0.000	39.10±4.30
S34	—	2.109	0.666	0.136	0.258	1.011	0.000	50.50±0.19
S35	—	1.481	0.938	0.153	0.319	1.186	0.000	47.76±2.87
S36	—	1.918	0.867	0.176	0.259	0.879	0.000	50.07±0.78
S37	—	2.212	1.107	0.138	0.329	1.334	0.000	20.41±1.19
S38	—	2.523	0.767	0.058	0.155	0.974	0.000	54.21±2.43
S39	—	2.381	0.733	0.058	0.155	0.822	0.000	52.85±3.13

“—” 代表未检测到

“—” means not detected

2.2 CCK-8 法测定吴茱萸对 L02 肝细胞的毒性

2.2.1 吴茱萸提取物的制备 取吴茱萸粉末各约 50 g, 加 8 倍量 50%乙醇加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压浓缩, 即得。

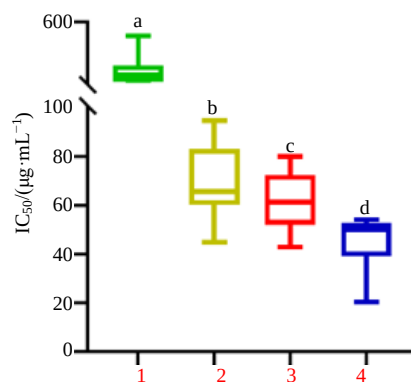
2.2.2 细胞的培养 取 L02 肝细胞用 10 mL 含 10%

胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱内培养。当细胞汇合度达 80%~90%, PBS 清洗 1 次。弃去上清液, 加入 4 mL 的 0.25%胰蛋白酶消化细胞, 待消化完全后加入完全培养基终止反应。吹打细胞培养瓶内各处细胞, 收集混合液至 10

mL 离心管, 于 1000 r/min 离心 7 min。弃去上清液, 按 1:2 进行传代, 将培养板置于 37 ℃, 5% CO₂ 的培养箱内培养。

2.2.3 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期的 L02 肝细胞, 按细胞密度为 2.5×10^4 个/孔铺至 96 孔板中, 培养 24 h 后, 分别加入含 7.81、15.63、31.25、62.5、125、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 吴茱萸的完全培养基, 同时设置 DMSO 对照组, 常规条件下继续培养 48 h 吸去培养基。每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 试剂的完全培养基, 继续培养 1 h。于 450 nm 波长下测定每孔的吸光度 (A) 值, 计算 IC₅₀。利用 excel 的 FORECAST 命令, 通过线形回归方程返回一个预测值计算 IC₅₀ 值, 结果见表 3, 39 批样品对 L02 肝细胞增殖均有抑制作用。小花吴茱萸的 IC₅₀ 值为 105.06~486.99 $\mu\text{g/mL}$; 中花吴茱萸的 IC₅₀ 值为 44.91~94.80 $\mu\text{g/mL}$; 大花吴茱萸的 IC₅₀ 值为 42.96~80.01 $\mu\text{g/mL}$; 中花吴茱萸与大花吴茱萸 IC₅₀ 有交叉, 如中花吴茱萸 (S13) 的 IC₅₀ 值较小, 可以看出毒性与 LIM 与生物碱之和的比值 (0.006) 密切相关。不同商品规格吴茱萸对 L02 肝细胞均有一定程度的抑制作用, 对 L02 肝细胞的生长抑制作用总体呈现中花吴茱萸劣品 > 大花吴茱萸 > 中花吴茱萸 > 小花吴茱萸, 采用 SPSS (25.0) 计算显著性, 见图 3, 不含 LIM 的中花吴茱萸劣品毒性最大; 含结果有 LIM 的样品中, 小花吴茱萸毒性最弱, 中花吴茱萸毒性介于二者之间, 大花吴茱萸毒性最大。

2.2.4 主成分分析 (PCA) 运用 SIMCA-P 14.1 统



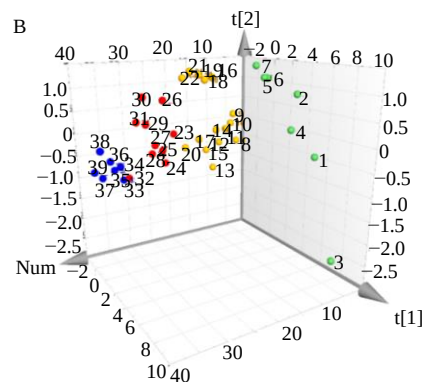
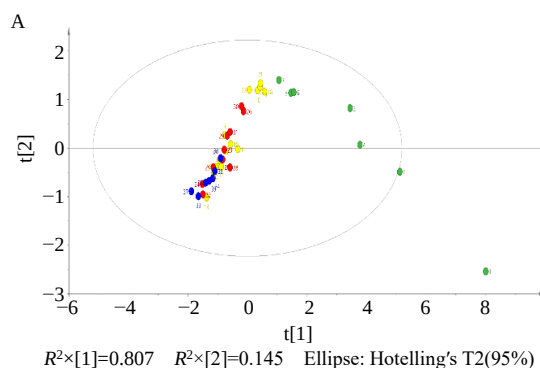
a、b、c、d 表示各组之间有显著性 ($P < 0.01$) 1-小花吴茱萸 2-中花吴茱萸 3-大花吴茱萸 4-中花吴茱萸劣品
a、b、c、d means significant difference among different groups ($P < 0.01$) 1-SEF 2-MEF 3-BEF 4-IMEF

图 3 不同商品规格吴茱萸对 L02 肝细胞的 IC₅₀ 值

Fig. 3 IC₅₀ of different commercial grades of Euodiae Fructus

计软件对 39 批吴茱萸样品的细胞存活率进行 PCA。PCA 模型将小花吴茱萸、中花吴茱萸、大花吴茱萸和中花吴茱萸劣品的毒性很好地区分为 4 组 (图 4), 不同商品规格的吴茱萸的毒性差异明显。

2.2.5 基于热图分析吴茱萸化学成分与其对 L02 细胞 IC₅₀ 相关性 将商品吴茱萸中 LIM 和 5 种生物碱的含量与其对 L02 细胞的 IC₅₀ 值进行热图分析 (图 5), 从上至下, 当 LIM 的含量越高时, 5 种生物碱含量越低, LIM 与 5 种生物碱含量和的比值越大, IC₅₀ 值越大, 细胞毒性越小。总的来说, 吴茱萸样品的 IC₅₀ 值与 LIM 与 5 种生物碱和的含量的比值呈正相关。



绿色为小花吴茱萸, 黄色为中花吴茱萸, 红色为大花吴茱萸, 蓝色为中花吴茱萸劣品
green-SEF yellow-MEF red-BEF blue-IMEF

图 4 市售吴茱萸的 PCA 2D (A) 和 3D (B) 图

Fig. 4 PCA 2D and 3D scattered points of Euodiae Fructus

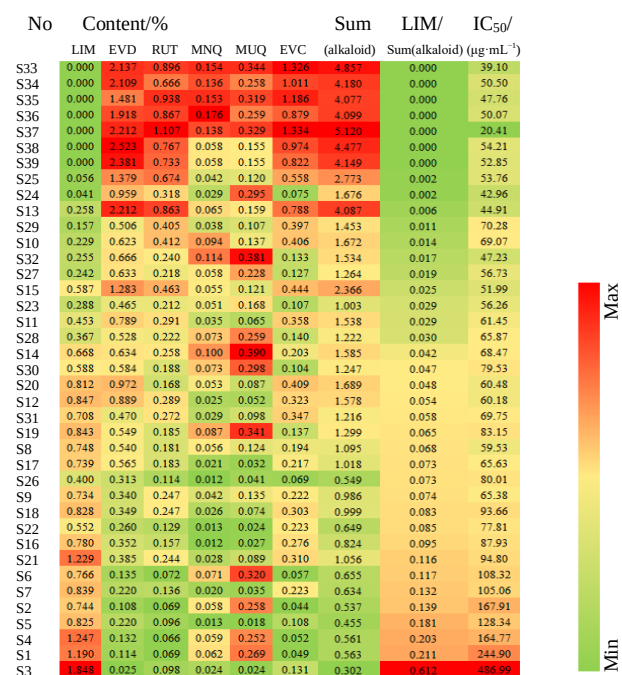


图 5 市售吴茱萸中 LIM 和 5 种生物碱的含量与其对 L02 细胞 IC₅₀ 值的热图

Fig. 5 Heatmap of IC₅₀ and contents of LIM, EVD, RUT, MNQ, MUQ, and EVC of Euodiae Fructus

3 讨论

3.1 市售吴茱萸商品的质量情况

近年常发现与吴茱萸名称相似或外观性状相近的混伪品出现^[8-9], 如芸香科植物巴氏吴茱萸、少果吴茱萸、臭辣子、华南吴茱萸和野茶辣的干燥近成熟果实或成熟果实冒充吴茱萸使用的情况。课题组从 2015 年开始采集和收集吴茱萸样品, 共 39 批。其中小花吴茱萸 (S1~S7) 均为药典收载品种; 中花吴茱萸 (S8~S22) 中 12 批为药典规定品种, 1 批为臭辣子的干燥近成熟的果实, 2 批为野茶辣的干燥果实; 大花吴茱萸 (S23~S32) 中 3 批为药典品种的干燥成熟果实, 其余 7 批分别为巴氏吴茱萸、臭辣子、华南吴茱萸、野茶辣和少果吴茱萸的干燥成熟果实; 中花样吴茱萸劣品 (S33~S39) 均为吴茱萸干燥近成熟果实。

指标成分含量方面, 有 10 批样品不符合药典规定 (见支持信息表 1), 样品 S3 中 EVD 与 RUT 含量合计为 0.025 μg/mg, 小于《中国药典》2020 年版规定的 0.15%; 样品 S24 和 S25 的 LIM 的含量分别为 0.041 μg/mg 和 0.056 μg/mg 小于《中国药典》2020 年版规定的 0.20%; 吴茱萸样品 S33~S39 果实大小 2~6 mm, 市售属中花吴茱萸, 其 LIM 含量

为 0, 称为中花样吴茱萸劣品, 推测其不合格可能与盲目引种或非道地产区种植有关。

非药用部位或者杂质也是导致中药材不合格的主要原因之一, 《中国药典》2020 年版规定吴茱萸杂质不得超过 7%。S20 和 S24 枝、叶、果梗等杂质超过药典规定, S3 辛辣味弱, 略带甜味, 推测是掺糖以增加吴茱萸的质量。

3.2 不同商品规格吴茱萸化学成分与肝细胞毒性的关系

课题组前期谱毒相关性结果表明 EVD、MNQ 和 MUQ 与 L02 细胞毒性具有相关性^[10]。Li 等^[7]通过谱-毒相关性分析 19 批不同产地的 35 g/kg 吴茱萸 50%乙醇提取物连续 ig 给予小鼠 14 d 的肝毒性与 19 批吴茱萸指纹图谱的 46 个共有峰峰面积的相关性, 发现二氢吴茱萸次碱、EVC 和 1-甲基-2-[(6Z, 9Z)-6,9-十五烷二烯基]-4(1H)-喹诺酮等成分与吴茱萸所致肝毒性相关。Liang 等^[11]采用正交偏最小二乘法分析石油醚层、氯仿层、醋酸乙酯层、正丁醇层和水层色谱峰峰面积与连续 ig 小鼠 0.87、1.73 和 3.46 g/kg 吴茱萸 7 d 的肝毒性指标 ALT 和 AST 的相关性, 结果表明松柏苷、MUQ 和 EVC 等成分与吴茱萸所致肝毒性有关。故在药典规定的基础上, 本研究增加了具有代表性且含量较高的 3 种喹诺酮生物碱进行含量测定, 建立了 UPLC 法同时测定 39 批吴茱萸样品中 LIM、EVD、RUT、MNQ、MUQ 和 EVC 含量, 操作简便, 结果稳定准确, 6 种成分分离度较好。含量测定和细胞毒性结果表明, 小花和中花吴茱萸中 LIM 含量较高, 生物碱含量较低, 毒性较小, 而大花吴茱萸中 LIM 含量较低, 生物碱含量较高, 毒性较大, 其中不含 LIM 的中花样吴茱萸劣品毒性最大。课题组前期研究表明^[12], LIM 预处理可降低吴茱萸致 C57BL-6 小鼠肝毒性, 因此, LIM 是吴茱萸质量控制的关键标志物。毒性较大的大花吴茱萸果实大小 6~10 mm, 果实成熟, 开裂, LIM 含量较低, 且不符合《中国药典》2020 年版中吴茱萸为干燥近成熟果实及直径 2~5 mm 大小的规定。综合上述研究结果表明果实大小可作为区分毒性的依据, 商品学分类在一定程度上反映吴茱萸的毒性。

综上, 应基于药典对于市场中不含 LIM 的中花样吴茱萸劣品严格管控, 避免其在市场上流通。大花吴茱萸中 LIM 含量低, 生物碱含量高, 毒性较大不适合入药; 而生物碱类成分同时也是药效成分,

小花吴茱萸中生物碱成分含量过低, 故在临床上, 建议以中花吴茱萸入药, 这与市场上中花吴茱萸售价最高, 普遍认为品质最好的评价一致, 本实验为吴茱萸的质量控制和其安全使用提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈代贤, 郭月秋. 中药真伪质量快速影像检定 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 247-258.
- [2] Kim D, Lee Y H, Park S H, *et al.* Subchronic oral toxicity of *Evodia* fruit powder in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(3): 1072-1078.
- [3] 杨秀伟. 吴茱萸水和 70%乙醇提取物的急性毒性和遗传毒性试验 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1317-1321.
- [4] 黄伟, 孙蓉, 吕丽莉, 等. 吴茱萸水提组分单次给药对小鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 96-99.
- [5] 张晟瑞, 刘舒凌, 钟振国, 等. 吴茱萸不同炮制品致小鼠肝毒性的“量-时-毒”关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4): 881-884.
- [6] 李莉, 赵军宁, 易进海, 等. 吴茱萸多基原、多产地毒性效应特征研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2219-2222.
- [7] Li W L, Sun X M, Liu B M, *et al.* Screening and identification of hepatotoxic component in *Evodia rutaecarpa* based on spectrum-effect relationship and UPLC-Q-TOFMS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(12): 1975-1983.
- [8] 徐国钧. 常用中药材品种整理和质量研究 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994: 23.
- [9] 广东省药品检验所. 中国中药材真伪鉴别图典 2 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2011: 123.
- [10] Zhang W, Ren K, Ren S M, *et al.* UPLC-Q-Exactive-MS analysis for hepatotoxicity components of *Evodiae Fructus* based on spectrum-toxicity relationship [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, 1176: 122772.
- [11] Liang J, Chen Y, Ren G, *et al.* Screening hepatotoxic components in *Euodia rutaecarpa* by UHPLC-QTOF/MS based on the spectrum-toxicity relationship [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): 1264.
- [12] Zhang W, Wang M J, Song H J, *et al.* CYP3A4 inducer aggravates big flower *Evodiae Fructus*-induced hepatotoxicity whereas limonin attenuates its hepatotoxicity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113277.
- [13] 梁彩霞, 杨岚, 张东, 等. 吴茱萸 UPLC 指纹图谱的建立及质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 38-44.

[责任编辑 时圣明]