

UPLC法同时测定不同产地吴茱萸中绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量

吴蔚苗*, 罗锦莹#(佛山市顺德区中医院中药房, 广东佛山 528000)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3446-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.42

摘要 目的:建立同时测定不同产地吴茱萸中绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为0.40 ml/min,检测波长为326、220 nm,柱温为30 ℃,进样量为2 μl。结果:绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的检测质量浓度线性范围分别为7.67~76.67 μg/ml($r=0.999\ 2$)、13.33~133.33 μg/ml($r=0.999\ 7$)、13.33~133.33 μg/ml($r=0.999\ 8$);定量限分别为0.11、0.05、0.05 ng,检测限分别为0.03、0.01、0.01 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为96.19%~101.90%(RSD=2.19%, $n=6$)、95.35%~101.16%(RSD=2.27%, $n=6$)、95.92%~98.98%(RSD=1.33%, $n=6$)。结论:该方法快速、准确,适用于同时测定不同产地吴茱萸中绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量。

关键词 超高速液相色谱法;吴茱萸;绿原酸;吴茱萸碱;吴茱萸次碱;含量测定

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Evodiamine and Rutecarpine in Different Places of *Evodia rutaecarpa* by UPLC

WU Weimiao, LUO Jinying (Dept. of TCM, TCM Hospital of Foshan Shunde District, Guangdong Foshan 528000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, evodiamine, rutecarpine in different places of *Evodia rutaecarpa*. METHODS: UPLC was performed on the column of ACQUITY UPLC BEH C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.1% Phosphoric acid aqueous solution (gradient elution) at a flow rate of 0.40 ml/min, the detection wavelength was 326 nm and 220 nm, column temperature was 30 ℃, and the volume injection was 2 μl. RESULTS: The linear range was 7.67-76.67 μg/ml for chlorogenic acid($r=0.999\ 2$), 13.33-133.33 μg/ml for evodiamine($r=0.999\ 7$) and 13.33-133.33 μg/ml for rutecarpine($r=0.999\ 8$); the limits of quantitation were 0.11 ng, 0.05 ng and 0.05 ng, the limits of detection were 0.03 ng, 0.01 ng and 0.01 ng, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recoveries were 96.19%-101.90% (RSD=2.19%, $n=6$), 95.35%-101.16% (RSD=2.27%, $n=6$) and 95.92%-98.98% (RSD=1.33%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is rapid and accurate, and suitable for the simultaneous determination of chlorogenic acid, evodiamine, rutecarpine in different places of *E. rutaecarpa*.

KEYWORDS UPLC; *Evodia rutaecarpa*; Chlorogenic acid; Evodiamine; Rutecarpine; Content determination

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、助阳止泻之功效,临床常用于治疗厥阴头痛、寒疝腹痛、寒湿脚气、经行腹痛、脘腹胀痛、呕吐吞酸、五更泄泻等证^[1]。现代药理研究发现其具有强心、保护心脏、抗心律失常、降压、抗血栓、抗肿瘤、抗过敏和抗炎镇痛等作用^[2]。吴茱萸主要分布于秦岭以南地区,主产于贵州、湖南、四川、广西、云南等地^[3]。随着市场需求量的不断增加,吴茱萸价格也随之攀升,以致时有以次充好现象出现。现行2015年版《中国药典》(一部)中吴茱萸只以吴茱萸碱和吴茱萸次碱两者总和为质量控制指标^[1];且目前多见采用高效液相色谱法(HPLC)法和超临界流体色谱(SFC)法对吴茱萸中生物碱^[4-7]、苦味素类成分测定的报道^[8-12],对吴茱萸中其他类成分研究报道较少。超高效液相色谱法

(UPLC)作为一种新型液相色谱技术,相比传统HPLC,具有分离能力强、分析速度快、灵敏度高的特点^[13]。因此,笔者采用UPLC法同时快速测定不同产地吴茱萸中绿原酸、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量,以期对吴茱萸的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-Class 型UPLC仪,包括QSM四元溶剂管理器、二极管阵列(PDA)检测器、SM-FTN样品管理器、CH-A型柱温箱、Empower3色谱工作站(美国Waters公司);BP211D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);KQ-100DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:40 kHz);“艾柯”DISCOVER-III-18型实验室专用超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号: MUST-13081601,纯度≥98.0%)、吴茱萸碱对照品(批号: MUST-13060901,纯度≥98.0%)、吴茱萸次碱对照品(批号: MUST-12031010,纯度≥98.0%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

* 主管中药师。研究方向: 中药调配。电话: 0757-22626032。E-mail: 13724672006@163.com

通信作者: 主管中药师。研究方向: 中药调配。电话: 0757-22208163。E-mail: 1656377337@qq.com

1.3 药材

吴茱萸药材(编号:W1-W12)购自佛山市中药店和广州清平药材市场,产自广西、湖南、贵州等省份,经佛山市顺德区中医院李正平副主任中药师鉴定为芸香科植物吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.40 ml/min;柱温:30℃;进样量:2 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution

时间, min	A, %	B, %	检测波长, nm
0	11	89	326
4	11	89	326
6	45	55	220
12	80	20	220

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取绿原酸对照品、吴茱萸碱对照品、吴茱萸次碱对照品适量,精密称定,置于同一25 ml量瓶中,用80%乙醇溶解并定容,制成每1 ml含绿原酸76.67 μg、吴茱萸碱133.33 μg、吴茱萸次碱133.33 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取经充分干燥的吴茱萸粉末(过2号筛)0.2 g,精密称定,置于50 ml具塞锥形瓶中,加80%乙醇25 ml,称定质量,浸泡30 min,超声提取30 min,用80%甲醇补足减少的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取80%甲醇溶液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5,理论板数以绿原酸、吴茱萸碱和吴茱萸次碱峰计分别为11 000、11 500、11 500。结果表明,其他成分对测定无干扰。

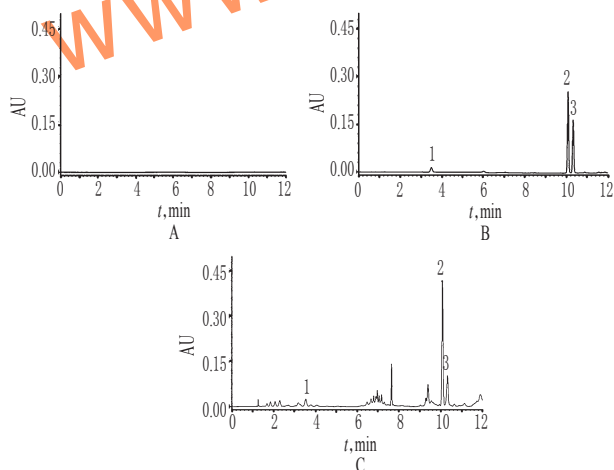


图1 超高效液相色谱图

A. 阴性对照; B. 混合对照品; C. 供试品; 1. 绿原酸; 2. 吴茱萸碱; 3. 吴茱萸次碱

Fig 1 UPLC chromatograms

A. negative control; B. mixed reference substance; C. test sample; 1. chlorogenic acid; 2. evodiamine; 3. rutaecarpine

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml,分别置于5 ml量瓶中,用80%甲醇定容,摇匀,制成不同质量浓度的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液2 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/ml
绿原酸	$y=6110.71x+2232.00$	0.9992	7.67~76.67
吴茱萸碱	$y=40130.87+19232.90$	0.9997	13.33~133.33
吴茱萸次碱	$y=28750.55-12867.31$	0.9998	13.33~133.33

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ),当信噪比为3:1时,得检测限(LOD),详见表3。

表3 定量限与检测限

Tab 3 Quantitation limit and detection limit

待测成分	LOQ, ng	LOD, ng
绿原酸	0.11	0.03
吴茱萸碱	0.05	0.01
吴茱萸次碱	0.05	0.01

2.6 精密度的考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的RSD分别为1.21%、1.48%、0.85%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的RSD分别为2.05%、1.75%、1.48%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性考察

取同一批样品(编号:W1)粉末6份,每份约0.2 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的平均含量分别为10.80、17.17、9.51 mg/g, RSD分别为1.89%、1.37%、2.04%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品粉末(编号:W1)6份,每份约0.10 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

2.10 样品含量测定

取12批样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量,结果见表5。

3 讨论

3.1 提取溶剂的考察

笔者考察了20%、40%、60%、80%、100%乙醇对绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱提取率的影响。结果,40%乙醇作为提取溶剂时,绿原酸提取率最大;100%乙醇作为提取溶剂时,吴

茱萸碱、吴茱萸次碱提取率最大;而80%乙醇作为提取溶剂时,上述3种成分提取率均较大。综合考虑,本试验选择80%乙醇作为提取溶剂。

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Result of recovery test(n=6)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
绿原酸	9.50	1.14	1.05	2.15	96.19	97.78	2.19
	9.50	1.11	1.05	2.18	101.90		
	9.50	1.06	1.05	2.08	97.14		
	9.50	1.09	1.05	2.10	96.19		
	9.50	1.05	1.05	2.08	98.10		
	9.50	1.16	1.05	2.18	97.14		
吴茱萸碱	10.00	1.80	1.72	3.45	95.93	97.09	2.27
	10.00	1.76	1.72	3.43	97.09		
	10.00	1.69	1.72	3.43	101.16		
	10.00	1.73	1.72	3.37	95.35		
	10.00	1.66	1.72	3.34	97.67		
	10.00	1.85	1.72	3.49	95.35		
吴茱萸次碱	9.90	1.00	0.98	1.94	95.92	96.94	1.33
	9.90	0.97	0.98	1.91	95.92		
	9.90	0.94	0.98	1.89	96.94		
	9.90	0.96	0.98	1.92	97.96		
	9.90	0.92	0.98	1.89	98.98		
	9.90	1.03	0.98	1.97	95.92		

表5 样品含量测定结果(n=3)

Tab 5 Result of contents determination of samples(n=3)

编号	产地	含量,mg/g		
		绿原酸	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
W1	贵州遵义	10.80	17.17	9.51
W2	贵州遵义	8.72	13.98	6.10
W3	湖北阳新	8.90	8.75	5.43
W4	湖南新晃	10.42	19.35	12.68
W5	湖南岳阳	10.66	14.71	8.53
W6	广西桂林	7.34	9.95	4.24
W7	广西桂林	8.25	13.84	5.10
W8	江西樟树	8.06	10.90	7.18
W9	江西进贤	8.53	8.70	5.47
W10	四川遂宁	11.53	12.85	7.02
W11	四川泸县	10.78	7.49	3.19
W12	福建松溪	7.32	8.92	6.61

3.2 流动相的考察

笔者考察了甲醇-0.1%磷酸、甲醇-0.3%磷酸、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.3%磷酸作为流动相时的分离效果。结果,乙腈-0.1%磷酸作为流动相时,分离效果最好、基线平且系统压力低。故选用乙腈-0.1%磷酸作为本研究的流动相。

3.3 测定波长的选择

笔者采用PDA检测器,在200~400 nm波长范围内扫描与绿原酸、吴茱萸碱和吴茱萸次碱保留时间相同的供试品色谱峰的紫外光谱,并与对照品的紫外光谱进行比较。结果,绿原酸的最大吸收波长为325.6 nm,吴茱萸碱的最大吸收波长为225.8 nm,吴茱萸次碱的最大吸收波长为215.2 nm。所以,本试验采用波长切换技术,0~4 min波长选取326 nm,4~12 min波长选取220 nm。

3.4 样品含量测定结果分析

笔者测定了12批吴茱萸中绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量。结果,不同产地3种成分含量具有一定差异,绿原酸的含量为7.32~11.53 mg/g,吴茱萸碱的含量为7.49~19.35 mg/g,吴茱萸次碱的含量为3.19~12.68 mg/g,这可能与产地环境因素及采收时间等不同有关。

综上所述,本方法快速、准确,适用于同时快速测定不同产地吴茱萸中绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:171.
- [2] 龚慕辛,王智民,张启伟,等.吴茱萸有效成分的药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2009,20(2):183.
- [3] 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):127.
- [4] 宋亚芳,王智民,朱晶晶,等.一测多评法测定吴茱萸中吴茱萸内酯、吴茱萸碱及吴茱萸次碱的含量[J].中国中药杂志,2009,34(21):2781.
- [5] 吴燕,黄志芳,舒光明,等.吴茱萸指纹图谱研究和3种成分的含量测定[J].中国中药杂志,2010,35(24):3329.
- [6] 曾金祥,刘勇,黄碧涛,等.吴茱萸HPLC指纹图谱的建立及3种成分含量的测定[J].安徽农业科学,2011,39(14):8273.
- [7] 何咏梅,田静,邓晶.HPLC法同时测定吴茱萸中吴茱萸碱、吴茱萸次碱与吴茱萸内酯的含量[J].中国药房,2012,23(31):2944.
- [8] 李振宇,傅青,李奎永,等.超临界流体色谱对吴茱萸中吲哚类生物碱的快速分析[J].色谱,2014,32(5):506.
- [9] 尹元元,闫利华,张启伟,等.吴茱萸及其习用品药材中7个成分的HPLC含量测定[J].中国中药杂志,2014,39(14):2693.
- [10] 杨敏,周萍,徐路,等.吴茱萸中吴茱萸次碱与吴茱萸碱含量的超临界流体色谱法测定[J].分析测试学报,2010,29(7):743.
- [11] 鲍天冬,董宇,杨庆,等.高效液相色谱法同时测定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.
- [12] 蒋俊,贾晓斌,陈彦,等.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[J].中草药,2010,41(3):396.
- [13] 陈佳,王钢力,姚令文,等.超高效液相色谱(UPLC)在药物分析领域中的应用[J].药物分析杂志,2008,28(11):1976.

(收稿日期:2015-07-30 修回日期:2016-05-20)

(编辑:刘柳)