

不同采收时期吴茱萸果实 活性成分变化研究

吴波, 曾金祥*, 张寿文, 朱玉野, 朱继孝, 王晓云, 徐赞峰

(江西中医学院, 江西省中药种质资源工程技术研究中心, 江西 南昌 330004)

摘要: 采用 HPLC 法同时精密测定江西省吴茱萸规范化种植基地的吴茱萸果实不同采收时期果实内吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱 3 种有效成分含量。结果表明: 吴茱萸果实中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量在不同采收时期存在较大差异, 呈现出在采收初期含量快速增加, 随后开始逐渐降低的变化规律。确定江西省吴茱萸果实的最佳采收期为 8 月初。

关键词: 吴茱萸果实; HPLC; 有效成分; 最佳采收期

中图分类号: Q949.752.7 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)02-0388-04

A Study on Variation of Active Components of Different Collecting Times at *Evodia rutaecarpus* Fruit

WU Bo, ZENG Jin-xiang*, ZHANG Shou-wen, ZHU Yu-ye,
ZHU Ji-xiao, WANG Xiao-yun, XU Yun-feng

(Chinese Medicine Germplasm Resource Engineering Technology Research Center of Jiangxi Province, JXTCMI, Nanchang 330004, China)

Abstract: HPLC method was used to determine accurately the active components limonin, evodiamine and rutacarpine at different collecting times of *Evodia rutaecarpus* from standardized planting bases in Jiangxi Province. The results showed that limonin, evodiamine and rutacarpine in *Evodia rutaecarpus* fruit had great diversity at different collecting times. The variational law was that the active component increased rapidly at initial collecting time but declined step by step afterwards. The optimal collecting time for *Evodia rutaecarpus* fruit in Jiangxi Province was early August.

Key words: *Evodia rutaecarpus* fruit; HPLC; active components; optimal collecting time

吴茱萸果实为常用中药,《中华人民共和国药典》2010 版一部(以下简称《药典》)收录的法定吴茱萸药材为芸香科(Rutaceae)植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpus*. (Juss.) Benth., 石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var *oficinalis* (Dode) Huang 和疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实,具有散寒止痛、助阳止泻的功效^[1],在治疗和预防心血管疾病、抗菌消炎、抗过敏、抗肿瘤等方面有显著疗效^[2-4],是江西省著名道地药材之一。

收稿日期: 2011-11-02 修回日期: 2011-12-22

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2011BAI04B04)

作者简介: 吴波(1980—)男,讲师,博士生,主要从事中药资源开发利用研究, E-mail: wuboxtcmi@sina.com; * 通讯作者: 曾金祥, 副教授, 博士, 主要从事中药化学分析研究, E-mail: zjinxiang@163.com。

吴茱萸的主要活性成分为生物碱类物质,以吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯为主^[5],上述 3 种成分是《药典》公认的衡量吴茱萸果实质量优劣的指标成分。不同采收时期直接影响着中药材的活性成分含量高低,对中药材不同采收期活性成分进行研究可以确定最佳采收时期,从而为提高药材品质提供依据,其已成为从源头上提高中药材品质的有效手段之一^[6-8]。由于作为药材的江西省吴茱萸果实采收时段为每年 7 月至 9 月,该期间吴茱萸果实的有效成分含量变化较为剧烈,因此,确定最佳吴茱萸果实采收期具有重要的现实意义和应用价值。本研究采用 HPLC 法同时精密测定了不同采收期江西省吴茱萸果实中活性成分吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量,确定了江西省吴茱萸果实的最佳采收时期为 8 月初,为吴茱萸果实药材的合理开发利用提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验仪器设备 Waters 2695 separations module 高效液相色谱仪, waters 2996 photodiode array detector 检测器, waters empowder 化学工作站; BP211D 电子天平(Sartorius, 十万分之一); KQ5200 超声波清洗器(昆山超声仪器厂); 高速中药材粉碎机(瑞安市环球药械厂)。

1.1.2 主要实验试剂 高效液相用四氢呋喃、乙腈为色谱纯,水为去离子超纯水,其余试剂为分析纯。吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品购自中国药品生物制品检定所,纯度均大于 98%。

吴茱萸果实采自江西省樟树市吴城乡天齐堂药业公司吴茱萸 GAP 基地,由江西中医学院药学院赖学文副教授鉴定为石虎。样品采收时期详见表 1。

表 1 吴茱萸果实采收时期

Tab. 1 The collecting times of *Evodia rutaecarpus* fruit

药材批次 Batch of crude drug	采收时间 Collecting time	品种 Variety
1	2011-07-15	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var <i>oficinalis</i> (Dode) Huang
2	2011-07-25	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var <i>oficinalis</i> (Dode) Huang
3	2011-08-05	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var <i>oficinalis</i> (Dode) Huang
4	2011-08-15	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var <i>oficinalis</i> (Dode) Huang
5	2011-08-25	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) Benth. var <i>oficinalis</i> (Dode) Huang

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 乙腈-水-四氢呋喃-乙酸(41:59:1:0.2); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm; 进样量: 10 μL。柱温: 30 °C。

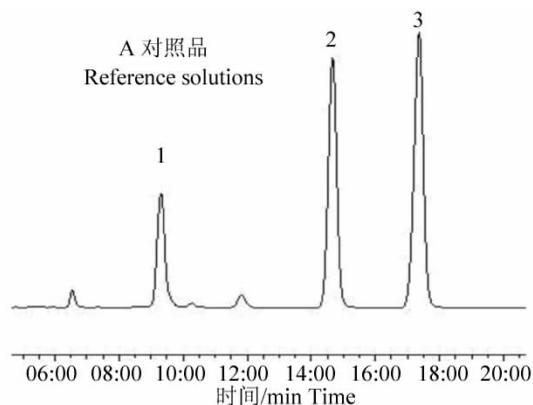
1.2.2 溶液制备 (1) 对照品制备。精密称取吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品适量,加甲醇超声溶解并定容至 10 mL,吴茱萸内酯的质量分数为 695 μg/mL,吴茱萸碱的质量分数为 161 μg/mL,吴茱萸次碱的质量分数为 167 μg/mL。并配成一定浓度混标溶液,进样量 10 μL,检测波长为 210 nm,记录色谱图,结果见图 1。

(2) 样品溶液的制备。将吴茱萸药材粉碎,过 30 目筛,称取 0.5 g,加 φ=80% 的乙醇 25 mL,浸泡 1 h,称重,超声提取 40 min,补重,过滤,取续滤液 10 mL,分析前以 0.22 μm 微孔滤膜滤过。进样量 10 μL,记录色谱图,并根据对照品色谱保留时间定性确定样品中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱,检测波长为 210 nm,其典型色谱图谱如图 2 所示。

2 结果与分析

2.1 线性关系考察

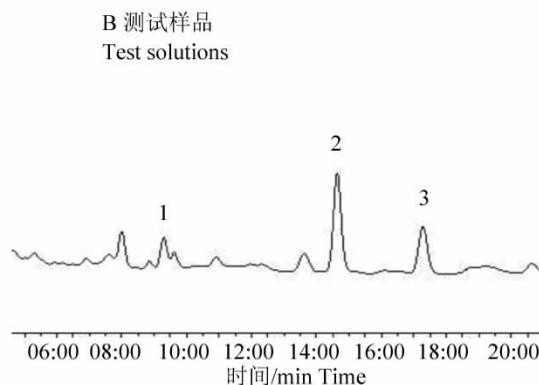
分别吸取不同体积的各对照品溶液进样,在 210 nm 波长下进行检测。测定相应标准品峰峰面积,



1、2、3 分别为吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱。
1: limonin; 2: evodiamine; 3: rutacarpine.

图 1 对照品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference solutions



1、2、3 分别为吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱。
1: limonin; 2: evodiamine; 3: rutacarpine.

图 2 测试样品 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of test solutions

根据峰面积 Y 与对应含量 X 进行线性回归分析。各活性成分线性回归方程、相关系数、线性范围见表 2。

表 2 吴茱萸活性成分线性回归分析参数

Tab. 2 Linear - regression analysis reference in active principles of *Evodia rutaecarpus*

活性成分 Active principle	线性回归方程 Linear-regression equation	相关系数 R Correlation coefficient	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Linearity range
吴茱萸内酯 Limonin	$y = 125\ 072x - 183\ 482$	0.998 6	0.801 ~ 16.1
吴茱萸碱 Evodiamine	$y = 284\ 474x - 143\ 240$	0.996 4	0.804 ~ 16.7
吴茱萸次碱 Rutacarpine	$y = 346\ 271x - 188\ 664$	0.997 4	3.05 ~ 69.5

2.2 精密度考察

取供试品溶液 10 μL 按 1.2.1 项下条件连续进样 6 次测定。吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱各峰峰面积的 RSD 分别为 3.1%、1.8%、2.1%。

2.3 重复性实验

取吴茱萸药材,按 1.2.2 项下样品溶液的制备方法分别处理 5 份,依次进样 10 μL 按 1.2.1 项下条件进样测定。吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱各峰峰面积的 RSD 分别为 2.3%、1.4%、1.9%。

2.4 回收率试验

精密称取吴茱萸果实 0.5 g,共 5 份,加入设定量的对照品,按照供试品制备与测定方法,计算回收率。吴茱萸内酯的平均回收率为 102.4% $RSD = 3.2\% (n = 6)$; 吴茱萸碱平均回收率为 99.6% $RSD = 1.7\% (n = 6)$; 吴茱萸次碱平均回收率为 99.5% $RSD = 1.9\% (n = 6)$ 。

2.5 样品测定

精密称取不同采收时期的吴茱萸果实 0.5 g,平行 3 份,按 1.2.1 项下条件测定。如图 2 所示吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱各峰分离良好。其保留时间分别为 9.26 min、14.61 min 和 17.38 min。

取所采 5 个批次吴茱萸样品 10 μL 进样分析,平行测定 3 次,根据各活性成分平均峰面积,通过线性回归方程,计算 3 种活性成分百分含量(图 3)。

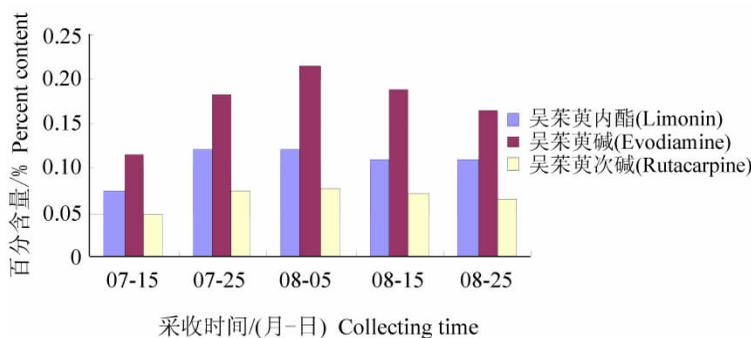


图 3 不同采收期活性成分含量

Fig. 3 Active principles component content at different collecting times

2.6 不同提取溶剂和体积分数对分析物提取含量的影响

以 8 月 5 号采收的吴茱萸果实为试验材料, 分别采用甲醇和乙醇为提取溶剂, 每种溶剂均设置 3 个不同的体积分数, 分别为 50%、80% 和 100%, 均以超声提取法提取分析物。

分别取 10 μL 分析提取物进样分析, 平行测定 3 次, 根据各活性成分平均峰面积, 通过线性回归方程, 分别计算 3 种活性成分百分含量(图 4)。

2.7 不同浸泡时间分析物提取含量变化

以 8 月 5 号采收的吴茱萸果实为试验材料, 均以 $\varphi = 80\%$ 浓度的乙醇为提取溶剂, 分别浸泡 20、40、60 和 80 min, 均以超声提取法提取分析物。

分别取 10 μL 分析提取物进样分析, 平行测定 3 次, 根据各活性成分平均峰面积, 通过线性回归方程, 分别计算 3 种活性成分百分含量(图 5)。

3 讨 论

3.1 样品提取

本试验采用了较强极性的溶剂甲醇和乙醇为提取溶剂, 分别设置了 50%、80% 和 100% 3 个体积分数梯度, 经过对比, 发现以体积分数为 80% 的乙醇为提取溶剂, 对 3 个活性成分的提取比较完全, 样品重复性好, 因此 80% 的乙醇被选择为提取溶剂。甄攀等^[9]对吴茱萸总生物碱提取条件进行了研究, 结果也表明乙醇是良好的生物碱提取溶剂, 氯仿不适合生物碱提取分离。本试验还比较了不同浸泡时间对分析物提取的影响, 发现浸泡 60 min, 分析物提取较为完全, 浸泡时间也不宜过长, 否则会降低提取效率, 此结论与魏宁等^[10]的研究结果一致。此外, 在提取方法选择上, 由于超声提取法更为简单方便, 在药材有效成分提取上应用广泛^[11], 因此, 本试验采用体积分数为 80% 乙醇超声方法来制备样品。

3.2 流动相及色谱条件的选择

由于吴茱萸果实中含有的活性成分种类繁多, 结构复杂^[12], 因此, 色谱条件较难确定, 且流动相组成多样。Yang 等^[13]采用 HPLC 法, 以不同比例的乙腈-水为流动相体系梯度洗脱, 同时测定了吴茱萸果实中槲皮素、吴茱萸碱的含量。本试验使用 Hypersil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 采用乙腈-水-四氢呋喃-乙酸水为流动相系统, 从分离情况和出峰时间等综合分析, 选择乙腈-水-四氢呋喃-乙酸水的比例 41:59:1:0.2 洗脱为佳。在此条件下, 吴茱萸内酯、吴茱萸碱、吴茱萸次碱得到很好分离, 峰形对称且分离度较好, 保留值适宜, 柱后处理简便。吴茱萸内酯在 210 nm 波长下具有最大吸收, 且吴茱萸碱与吴茱萸次碱吸收也较好, 为便于检测, 确定 210 nm 为最佳检测波长。

3.3 不同采收时期含量变化规律

以生物碱类物质为活性成分的药用植物, 其植株体内有效成分含量与采收时期密切相关。曾建红等^[14]和王艳红等^[15]分别研究了不同采收期半夏生物碱含量的变化规律和不同采收期平贝母总生物碱含量, 其植株内生物碱含量均呈现先迅速上升, 后缓慢下降的变化规律, 本试验结果显示, 吴茱萸果实中吴茱萸内酯、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量在采收初期快速增加, 随后又缓慢降低, 这与其他研究者的研究结论相符。分析其原因, 可能与吴茱萸生长习性和当地天气状况有关。江西省 7 月中下旬雨水少, 温度高, 有利于植株体内生物碱类物质的合成与积累; 进入 8 月份后, 台风和雨水天气增多, 生物碱类物质合成与积累速度下降。因此, 根据本试验结果, 确定 8 月初为江西省吴茱萸果实采收的最佳时期。

(下转第 402 页)

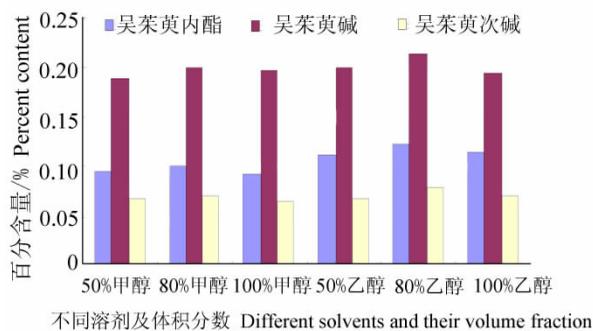


图 4 不同类型和体积分数的提取溶剂对 3 种活性成分含量的比较

Fig. 4 Three active principles components content used different type and concentration extraction solvents in *Evodia rutaecarpus* fruit

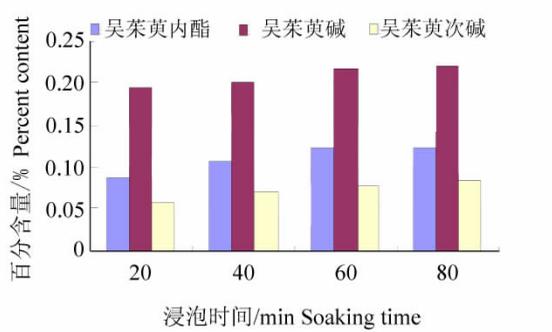


图 5 不同浸泡时间活性成分含量比较

Fig. 5 Three active principles component content at different soaking times

- semi-quantitative analysis of trace-elements in a plant sample[J]. Chinese Physics Letters 2010 27(6):063202.
- [8] Ryan B Anderson, Richard V Morris, Samuel M Clegg, et al. The influence of multivariate analysis methods and target grain size on the accuracy of remote quantitative chemical analysis of rocks using laser induced breakdown spectroscopy [J]. Icarus, 2011, 215: 608-627.
- [9] M Darby Dyar, Jonathan M Tucker, Seth Humphries et al. Strategies for mars remote laser-induced breakdown spectroscopy analysis of sulfur in geological samples [J]. Spectrochimica Acta. Part B: Atomic Spectroscopy, 2011, 66(1): 39-56.
- [10] Dawn E Lewis, Jorge Martinez, Charlemagne A Akpovo et al. Discrimination of bacteria from Jamaican bauxite soils using laser-induced breakdown spectroscopy [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 401(7): 2225-2236.
- [11] Samek O, Lambert J, Hergenroder R et al. Femtosecond laser spectrochemical analysis of plant samples [J]. Laser Phys Lett, 2006, 3(1): 21-25.
- [12] Ma S, Gao X, Guo K M, et al. Analysis of the element content in poplar tree leaves by femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy [J]. SCIENCE CHINA Physics, Mechanics & Astronomy 2011, 54(11): 1953-1957.
- [13] Nunes L C, Braga J W B, Trevizan L C, et al. Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrients in sugar cane leaves [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2010, 25: 1453-1460.
- [14] 张大成, 马新文, 朱小龙, 等. 激光诱导击穿光谱应用于三种水果样品微量元素的分析 [J]. 物理学报, 2008, 57(10): 6348-6353.
- [15] 张大成, 马新文, 朱小龙, 等. 用激光诱导击穿光谱技术比较百合和土豆中的微量元素 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(5): 1189-1192.
- [16] http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html.
- [17] 鲁翠萍, 刘文清, 赵南京, 等. 土壤重金属铬元素的激光诱导击穿光谱定量分析研究 [J]. 物理学报, 2011, 60(4): 395-399.

(上接第391页)

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 160.
- [2] Yi H H, Rang W Q, Deng P Y, et al. Protective effects of rutaecarpine in cardiac anaphylactic injury is mediated by CGRP [J]. Planta Med, 2004, 70(12): 1135-1139.
- [3] Woo H G, Lee C H, Noh M S, et al. Rutaecarpin, a quinazolinocarboline alkaloid, inhibits prostaglandin production in RAW 264.7 macrophages [J]. Planta Med, 2001, 67(6): 505-509.
- [4] Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, et al. Mechanism-based inactivation of human liver microsomal CYP3A by rutaecarpine and limonin from evodia fruit extract [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2005, 20(1): 34-45.
- [5] 龚慕辛, 宋亚芳, 王智民, 等. 吴茱萸化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 792-794.
- [6] 崔小兵, 许金国, 郁红礼, 等. 加拿大一枝黄花不同采收期总黄酮及芦丁含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 177-178.
- [7] 任飞, 王羽梅, 孙鸣燕. 不同采收期辣木多糖及可溶性糖含量变化的研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2204-2205.
- [8] 董琦, 马世震, 胡凤祖. HPLC法测定不同采收期栽培藏木香中内酯类成分 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1186-1187.
- [9] 甄攀, 杨凤珍. 吴茱萸总生物碱提取条件的考察 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(8): 504-505.
- [10] 魏宁, 刘庆元. 正交试验法优化吴茱萸水提工艺 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11(6): 510-511.
- [11] 徐春龙, 林书玉. 超声提取中草药成分研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(6): 933-937.
- [12] 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.
- [13] Zhao Yang, Li Zhang wan, Zhou Xin, et al. Quality evaluation of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 48: 1230-1236.
- [14] 曾建红, 彭正松. 不同采收期半夏生物碱含量的变化规律 [J]. 中南林学院学报, 2004, 24(4): 109-112.
- [15] 王艳红, 吴晓民, 郝友兰. 不同产地和采收期的平贝母总生物碱含量 [J]. 中药材, 2006, 29(1): 8-10.