

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.22.022

高效液相色谱法同时测定吴茱萸-桂枝药对水煎液中 吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸含量*

兰莹, 薛莹, 江阳[△]

(四川省疾病预防控制中心, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立同时测定吴茱萸-桂枝药对水煎液中吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Diamonsil® Plus C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 215 nm(10~20 min, 吴茱萸碱、吴茱萸次碱)和 290 nm(25~38 min, 桂皮醛、桂皮酸), 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。结果 吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸质量浓度分别在 0.026 4~2.642 0 mg/mL($R^2=0.999\ 9$), 0.022 9~2.291 0 mg/mL($R^2=0.999\ 9$), 0.019 6~1.965 5 mg/mL($R^2=0.999\ 9$), 0.017 0~1.708 8 mg/mL($R^2=0.999\ 8$) 范围内与峰面积线性关系良好; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.2%; 平均加样回收率分别为 99.21%, 99.89%, 99.89%, 100.07%, RSD 分别为 0.81%, 0.42%, 0.18%, 0.27% ($n=9$)。结论 该方法稳定性、重复性好, 结果准确、可靠, 检测效率高, 可用于同时测定吴茱萸-桂枝药对水煎液中 4 种成分的含量, 并为吴茱萸-桂枝药对的质量评价提供参考。

关键词: 高效液相色谱法; 吴茱萸-桂枝药对; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 桂皮醛; 桂皮酸

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)22-0088-04

Simultaneous Determination of Evodiamine, Rutecarpine, Cinnamaldehyde and Cinnamic Acid in Decoction of Euodiae Fructus - Cinnamomi Ramulus Couplet Medicines by HPLC

LAN Ying, XUE Ying, JIANG Yang

(Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, Sichuan, China 610041)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the simultaneous determination of evodiamine, rutecarpine, cinnamaldehyde and cinnamic acid in the decoction of Euodiae Fructus - Cinnamomi Ramulus couplet medicines. **Methods** The chromatographic column was Diamonsil® Plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 215 nm for evodiamine and rutecarpine(10-20 min), 290 nm for cinnamaldehyde and cinnamic acid (25-38 min), the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The mass concentrations of evodiamine, rutecarpine, cinnamaldehyde and cinnamic acid showed a good linear relationship with the peak area in the range of 0.026 4-2.642 0 mg/mL ($R^2=0.999\ 9$), 0.022 9-2.291 0 mg/mL($R^2=0.999\ 9$), 0.019 6-1.965 5 mg/mL($R^2=0.999\ 9$) and 0.017 0-1.708 8 mg/mL($R^2=0.999\ 8$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.2%. The average recoveries of evodiamine, rutecarpine, cinnamaldehyde and cinnamic acid were 99.21%, 99.89%, 99.89% and 100.07% with RSDs of 0.81%, 0.42%, 0.18% and 0.27% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is stable, reproducible, accurate and reliable, and has high detection efficiency. It can be used for the simultaneous determination of four components in the decoction of Euodiae Fructus - Cinnamomi Ramulus couplet medicines, and provide a reference for the quality evaluation of Euodiae Fructus - Cinnamomi Ramulus couplet medicines.

Key words: HPLC; Euodiae Fructus - Cinnamomi Ramulus couplet medicines; evodiamine; rutecarpine; cinnamaldehyde; cinnamic acid

吴茱萸-桂枝药对是《金匱要略》中温经汤的核心药对^[1]。吴茱萸味苦辛、性温热,有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻功效,常用于治疗呕吐泄泻、厥阴头痛、高血压等^[2]。吴茱萸碱、吴茱萸次碱是吴茱萸的主要有效成分^[3],二者具有促进肿瘤细胞凋亡、保护心脏血管系统、调节免疫系统药理活性^[4-6],其中吴茱萸碱可通过下调 NOD1 通路诱导肝癌 HepG2 和 SMMC-7721 细胞凋亡^[7],

吴茱萸次碱能明显防治模型大鼠腹主动脉狭窄所致左室肥厚^[8]。桂枝味辛、甘,性温,有散寒解表、温通经脉、平冲降气等功效,常用于治疗风寒感冒、血寒闭经、水肿、心悸等症^[9],桂皮醛、桂皮酸是其主要有效成分,二者可降低血压、抑制肿瘤细胞生长、保护受损的心肌等^[10-11],且桂皮醛可能通过上调肝脏胰岛素信号通路 Akt 而发挥降血糖作用,并可抑制食管癌鳞状细胞癌细

*基金项目:四川省疾病预防控制中心 2019 年度自立科研课题[ZK201906]。

第一作者:兰莹,女,回族,硕士研究生,助理研究员,研究方向为食品化学安全检测,(电子信箱)190003684@qq.com。

[△]通信作者:江阳,女,汉族,硕士研究生,主管技师,研究方向为卫生理化检验,(电子信箱)sunshine1987jy@163.com。

胞Eca109的增殖,促进其凋亡^[12-13],桂皮醛、桂皮酸对缺血性心肌损伤模型大鼠心脏还具有保护作用^[14]。因此,检测吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸的含量对于评价吴茱萸-桂枝药对的质量有重要意义。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时检测吴茱萸-桂枝药对水煎液中上述4种成分的含量,为该药对的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity HPLC™ 高效液相色谱仪,包括 Empower 3.0 色谱工作站,四元高压泵系统,在线脱气系统,自动进样器,柱温箱和 TUV 检测器,数据采集系统(美国 Waters 公司);XS215 型分析天平、XP6 型微量天平(美国 Mettler Toledo 公司);KQ-500D 型超声波清洗器(上海沪粤明科学仪器有限公司);KW8672J 型离心机(北京立离心机有限公司)。

1.2 试剂

吴茱萸药材(批号为 190816)、桂枝药材(批号为 186018),均购自郑州张仲景大药房;吴茱萸碱对照品(批号为 50890-1806,含量≥99.6%),吴茱萸次碱对照品(批号为 280375-181102,含量≥98.9%),桂皮醛对照品(批号为 110710-201821,含量≥99.6%),桂皮酸对照品(批号为 28573-1914,含量≥98%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,甲醇、磷酸均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil® Plus C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~8 min 时 7% A→18% A,8~16 min 时 18% A→36% A,16~25 min 时 36% A→60% A,25~37 min 时 60% A→100% A,37~42 min 时 100% A→7% A,42~47 min 时 7% A);流速:1 mL/min;检测波长:215 nm(10~20 min, 吴茱萸碱、吴茱萸次碱),290 nm(25~38 min,桂皮醛、

桂皮酸);柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

称取吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸对照品各适量,精密称定,分别置 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,得质量浓度分别为 2.642 0,2.291 0,1.965 5,1.708 8 mg/mL 的单一对照品贮备液;各取 2.5 mL,置同一 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容,得吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸质量浓度分别为 0.264 20,0.229 10,0.196 55,0.170 88 mg/mL 的混合对照品溶液。按吴茱萸-桂枝药对比例(1:1, m/m)称取吴茱萸、桂枝各 30 g,精密称定,置 500 mL 圆底烧瓶中,一煎加 360 mL 水,提取 2 h,药液经 200 目滤布滤过,得一煎水提液。药渣加 300 mL 水,提取 1 h,药液经 200 目滤布滤过,得二煎水提液。合并两煎水提液,搅拌均匀,静置 2 h,得吴茱萸-桂枝药对水煎液 630 mL。精密量取 25 mL,置离心管中,3 000 r/min 离心 10 min,精密移取 20 mL,置蒸发皿中水浴减压蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 容量瓶中,定容,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按吴茱萸-桂枝药对水煎液处方及工艺,制备缺吴茱萸、桂枝的阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:分别取 2.2 项下 3 种溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应吸收峰,阴性对照无干扰。详见图 1。4 种成分峰理论板数均大于 10 000,分离度均大于 2。

线性关系考察:取 2.2 项下混合对照品溶液适量,稀释成吴茱萸碱质量浓度为 0.026 4,0.052 8,0.079 3,0.528 4,0.792 6,2.642 0 mg/mL,吴茱萸次碱为 0.022 9,0.045 8,0.229 1,0.458 2,0.687 3,2.291 0 mg/mL,桂皮醛为 0.019 6,0.039 3,0.058 9,0.196 6,0.589 7,1.965 5 mg/mL,桂皮酸为 0.017 0,0.034 2,0.051 2,0.170 8,0.512 6,1.708 8 mg/mL 的系列混合对照品溶液,各精密量取 10 mL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,

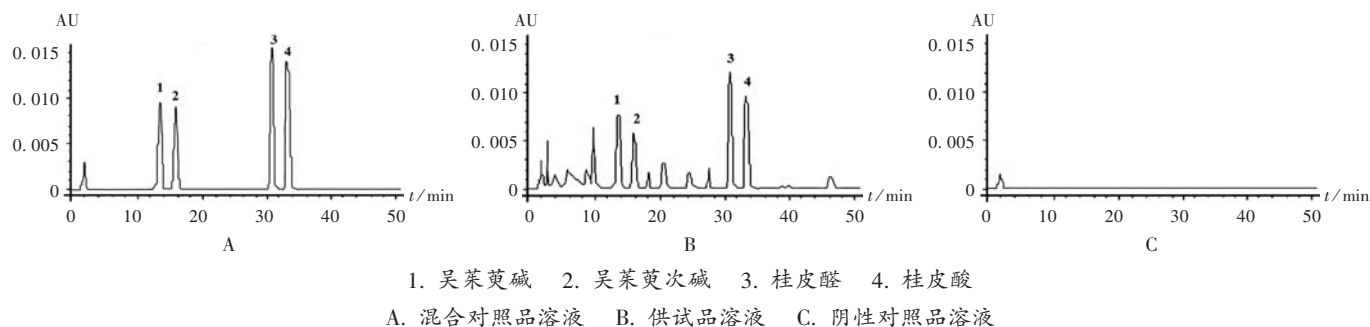


图1 高效液相色谱图

1. evodiamine 2. rutecarpine 3. cinnamaldehyde 4. cinnamic acid

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

记录峰面积。以各成分的质量浓度 (X , mg/mL) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程及线性范围。结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果 ($n=6$)

Tab. 1 Results of the linear relation test ($n=6$)

成分	回归方程	R^2	线性范围 (mg/mL)
A	$Y_1 = 16\,571\,198.7 X_1 + 1\,069.6$	0.999 9	0.026 4 ~ 2.642 0
B	$Y_2 = 16\,570\,076.6 X_2 + 1\,068.5$	0.999 9	0.022 9 ~ 2.291 0
C	$Y_3 = 141\,327\,689.4 X_3 - 2\,357.8$	0.999 9	0.019 6 ~ 1.965 5
D	$Y_4 = 893\,127\,875.9 X_4 + 1\,137.6$	0.999 8	0.017 0 ~ 1.708 8

注: A 为吴茱萸碱, B 为吴茱萸次碱, C 为桂皮醛, D 为桂皮酸。下表同。

Note: A is evodiamine, B is rutecarpine, C is cinnamaldehyde, and D is cinnamic acid, as well as the following tables.

精密度试验: 取供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果吴茱萸-桂枝药对水煎液中吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸峰面积的

RSD 分别为 0.29% , 0.06% , 0.08% , 0.26% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取供试品溶液适量, 室温下分别放置 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸峰面积的 RSD 分别为 1.33% , 0.38% , 1.66% , 1.08% ($n=7$), 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取样品适量, 各 6 份, 按 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, 并计算含量。结果吴茱萸碱、吴茱萸次碱、桂皮醛、桂皮酸平均含量分别为 0.981 9, 0.589 6, 0.213 5, 0.679 8 mg/g, RSD 分别为 0.81% , 1.01% , 1.22% , 2.15% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品适量, 共 9 份, 分别加入低、中、高质量浓度的对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果 ($n=9$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量 (mg)				加入量 (mg)				测得量 (mg)				回收率 (%)				$\bar{X}$ (%)				RSD (%)			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.277 4	0.171 8	0.342 0	0.194 8	0.744 3	0.451 1	0.918 2	0.517 7	99.75	99.13	99.50	99.59								
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.277 4	0.171 8	0.342 0	0.194 8	0.745 5	0.452 3	0.919 3	0.519 2	100.18	99.83	99.82	100.36								
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.277 4	0.171 8	0.342 0	0.194 8	0.744 7	0.453 5	0.919 6	0.518 3	99.89	100.52	99.91	99.90								
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.475 6	0.274 9	0.572 0	0.322 9	0.931 2	0.555 0	1.149 7	0.647 8	97.48	99.75	99.97	100.37								
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.475 6	0.274 9	0.572 0	0.322 9	0.939 7	0.554 3	1.150 8	0.646 2	99.26	99.49	100.16	99.88	99.21	99.89	99.89	100.07	0.81	0.42	0.18	0.27
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.475 6	0.274 9	0.572 0	0.322 9	0.936 4	0.556 0	1.149 3	0.647 1	98.57	100.11	99.90	100.15								
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.634 1	0.391 8	0.807 9	0.451 1	1.095 6	0.673 6	1.385 2	0.775 5	99.04	100.26	99.93	100.16								
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.634 1	0.391 8	0.807 9	0.451 1	1.097 3	0.672 1	1.385 9	0.774 5	99.31	99.87	100.01	99.93								
0.467 6	0.280 8	0.577 9	0.323 7	0.634 1	0.391 8	0.807 9	0.451 1	1.098 1	0.672 9	1.384 3	0.776 3	99.43	100.08	99.81	100.33								

2.4 样品含量测定

取样品, 按 2.2 项下方法平行制备 2 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果 (mg/g, $n=2$)

Tab. 3 Results of content determination of four components in the sample (mg/g, $n=2$)

成分	1	2	成分	1	2
A	0.749 0	0.748 3	C	1.150 2	1.150 6
B	0.554 9	0.555 3	D	0.647 9	0.647 3

3 讨论

3.1 流动相选择

预试验中分别对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸水溶液和乙腈-0.1% 磷酸水溶液 4 个流动相系统进行了考察。结果发现, 采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相时, 各色谱峰的分度度较好, 且基线平

稳, 因此采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相。

3.2 色谱柱选择

预试验中分别考察了 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Diamonsil® Plus C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Welch XB C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 结果发现, Diamonsil® Plus C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 效果较好, 故以该色谱柱进行试验。

3.3 检测波长选择

对 4 种成分对照品溶液分别进行紫外-可见全波长 (190 ~ 400 nm) 扫描, 发现吴茱萸碱、吴茱萸次碱在 215 nm, 桂皮醛、桂皮酸在 290 nm 处有最大吸收, 鉴于吴茱萸-桂皮药对中 4 种成分最大吸收波长不同, 为保证各成分在最大吸收波长处检测, 提高灵敏度, 减少干扰, 故本试验中采用了 HPLC 法波长切换技术。

3.4 方法评价

本研究中建立的 HPLC 法重复性好, 可操作性强,