

台灣與中國大陸產吳茱萸及其同屬植物之活性成分 Dehydroevodiamine, Evodiamine, Rutaecarpine 及 Synephrine 的含量比較

柯漢傑^{1,2} 陳國棟¹ 周正仁² 陳介甫²

¹ 台北醫學大學藥物化學研究所

² 國立中國醫藥研究所

台北市

(2002 年 2 月 25 日受理, 2002 年 5 月 21 日收校訂稿, 2002 年 5 月 21 日接受刊載)

中藥吳茱萸為芸香科(Rutaceae)植物吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.之未成熟乾燥果實, 為我國傳統常用藥物之一。神農本草經將吳茱萸列為草部中品, 可治胃痛、頭痛、腹痛、痢疾、產後出血及停經等疾病, 現代藥理學研究發現其活性成分 dehydroevodiamine (I), evodiamine (II), rutaecarpine (III)有降血壓、抗心律不整、刺激內皮細胞及抑制巨噬細胞釋放一氧化氮之作用, 而 synephrine (IV)具有升血壓之作用。本研究之目的在利用高效液相層析法, 對台灣與中國大陸產吳茱萸及台灣產同屬植物賊仔樹 *Tetradium glabrifolium* (Champ. ex Benth.) T. Hartley 果實中上述四種活性成分含量之異同研究。

本實驗是使用 HP-1100 高效液相層析儀系統: 分離管柱為 C₁₈ (Reversed-phase C₁₈ column), 移動相選擇 acetonitrile, water, sodium dodecyl sulfate, orthophosphoric acid solution (85%)的混合緩衝液, 以線性梯度程式沖提, 流速為 1ml/min, 以 UV 270 nm 波長偵測。

經上述方法分析結果, 四種成分在中國大陸產吳茱萸中之含量分別: I 為 3.00 ± 0.06 mg/g, II 為 3.39 ± 0.18 mg/g, III 為 4.02 ± 0.30 mg/g; 台灣產吳茱萸中之含量: I 為 1.02 ± 0.06 mg/g, II 為 0.40 ± 0.01 mg/g, III 為 0.69 ± 0.03 mg/g; 同屬植物賊仔樹果實中之含量為: I 為 0.76 ± 0.13 mg/g, II 為 1.79 ± 0.37 mg/g, III 為 0.92 ± 0.19 mg/g, 而 IV 為 0.62 ± 0.06 mg/g 僅在中國大陸產吳茱萸中發現。

關鍵詞: 吳茱萸, 臭辣樹, 賊仔樹, 高效液相層析, 含量分析。

前言

中藥吳茱萸為芸香科 (Rutaceae) 植物吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 之未成熟乾燥果實，為我國中醫傳統常用藥物之一¹。神農本草經將吳茱萸列為草部中品，具有溫中下氣、止痛、欬逆寒熱、除濕、血痺、逐風邪、開腠理等功能²，為驅風止痛藥，可治胃痛、頭痛、腹痛、痢疾、產後出血及停經等疾病，現代藥理學研究發現其活性成分 dehydroevodiamine (I, DeHE), evodiamine (II, Evo), rutaecarpine (III, Rut) (Fig.1) 有降血壓、抗心律不整、刺激內皮細胞及抑制巨噬細胞釋放一氧化氮之作用³⁻⁹，而 synephrine (IV, Syn) 具有升血壓之作用。依 1977 年出版之台灣植物誌記載¹⁰，吳茱萸屬植物台灣共有四種即吳茱萸、臭辣樹、山刈葉及三叉虎。吳茱萸與臭辣樹主成分為 quinazolinocarboline alkaloids 及 limonins，而山刈葉與三叉虎主成分則為 acetophenones；因此，1993 年出版之台灣植物誌第二版¹¹，將上述四種植物分屬於賊仔樹屬 (Tetradium) 及三腳龜屬 (Melicope)。亦即原吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (A. Juss.) Benth. 學名更正為 *Tetradium ruticarpum* (A. Juss.) T. Hartley；臭辣樹 *Evodia meliaefolia* (Hance) Benth. 更正為賊仔樹 *Tetradium glabrifolium* (Champ. ex Benth.) T. Hartley。對 I、II、III 之定性及定量，已分別有論文發表¹²⁻¹⁹，未見有 I、II、III 及 IV 四種活性成分同時進行比較之分析，本研究之目的在建立能同時檢測此四種活性成分之新的高效液相層析方法，並比較中國大陸產吳茱萸、台灣產吳茱萸及同屬植物賊仔樹果實中 I、II、III 及 IV 含量之差異。

研究方法

1. 材料與試劑

I、II、III 標準品由本研究室抽取所得¹²，IV 購自 Aldrich 公司。orthophosphoric acid (85%)，acetonitrile (HPLC grade) 及 methanol (HPLC grade)，皆購自 Merck 公司，Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)，購自 Bio-Rad 公司。使用之水經 542A Milli-Q plus system 純化而得 (Millipore Corp, Bedford, MA, USA)；中國大陸產吳茱萸購自迪化街傳統中藥房，台灣產吳茱萸藥材採自宜蘭棲蘭地區，賊仔樹果實採自中橫梨山地區，經本所藥用植物顧問高木村老師鑑定。

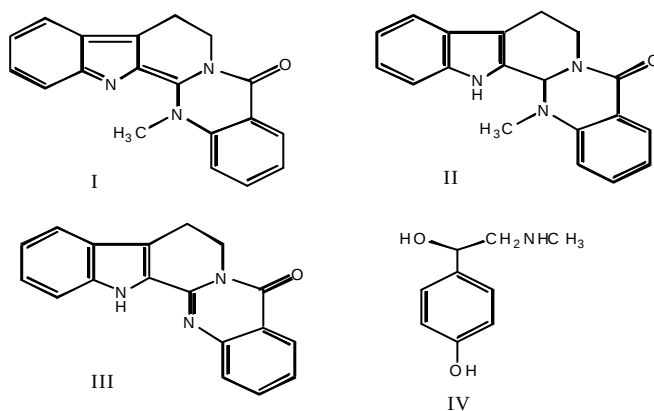


Fig. 1. Chemical structures of four bioactive compounds in *Evodia rutaecarpa*.

I: Dehydroevodiamine ($C_{19}H_{15}N_3O$, MW=301), II: Evodiamine ($C_{19}H_{17}N_3O$, MW=303), III: Rutaecarpine ($C_{18}H_{13}N_3O$, MW=287), IV: Synephrine ($C_9H_{13}NO_2$, MW=167).

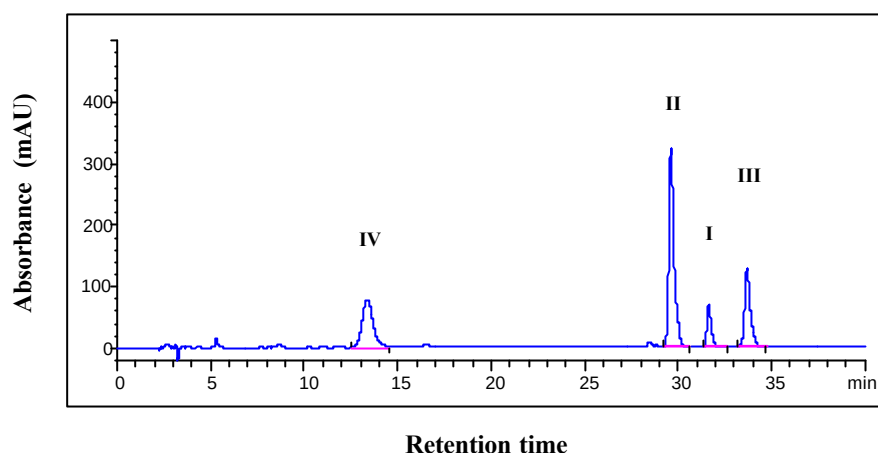


Fig. 2. Typical chromatograms of four bioactive compounds in *Evodia rutaecarpa*. Conditions for HPLC were described as materials and methods. The peak identities of four bioactive compounds were as follows:

I: Dehydroevodiamine, II: Evodiamine, III: Rutaecarpine, IV: Synephrine.

2.儀器設備

本實驗使用之高效液相層析儀為 HP-1100, G1311A 型系統裝置, 包括:自動注射器(HP-G1313A), 層析幫浦 (HP-G1354A), 紫外光檢測器 (HP-G1315A); 分離管柱為 5C₁₈-AR-II column, 5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm (Reversed-phase C₁₈ column, Kyoto Japan)。

3.標準品溶液的配製

精確稱取 I, II, III, 及 IV 各 5 mg, 置入 5 ml 之定量瓶中, 加入甲醇溶解並稀釋至 5 ml, 振盪使其完全溶解, 再經孔徑 0.2 μ m (Millipore) 薄膜濾網過濾, 並加甲醇定量至 5 ml 可得到濃度 1.0 μ g/ μ l 溶液備用。

4.校正曲線的製作

精確配製 1.000, 0.750, 0.500, 0.250, 0.100 μ g/ μ l 不同濃度的標準品溶液, 分別各以 20 μ l 的定量注入高效液相層析儀, 以標準品溶液層析圖之波峰面積積分和濃度作圖, 畫出檢量線之校正曲線, 並計算出線性迴歸方程式及其相關係數。

5.分析精確性

為確認實驗過程定量分析之精確性, 於對照標準品溶液檢量線之範圍內, 在同日不同時間 (intraday) 及不同日間 (interday), 重覆注入高效液相層析儀定量分析, 並計算其精密度 (precision) 與準確度 (accuracy)。

6.藥材甲醇檢液的配製:

稱取不同來源之藥材各 5 g, 分別加入甲醇 100 ml, 靜置 1 小時, 以超音波 30°C 振盪 30 分鐘, 此步驟重覆兩次, 混合這兩次的濾液, 濃縮至 45 ml, 置入 50 ml 之定量瓶中, 加入甲醇調整其體積至 50 ml。並經孔徑 0.2 μ m 薄膜濾網過濾, 可得到濃度 100 μ g/ μ l 溶液備用。

7.回收率試驗

取已知指標成分含量的甲醇檢液，分別注入 0.100, 0.150, 0.200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的標準品溶液，使用高效液相層析儀分析，計算其添加回收率。

8. 靈敏度檢測

將 0.100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 之標準品溶液以甲醇逐次稀釋至 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，定量注入高效液相層析儀偵測，直至其波峰與雜訊之比值約等於 3 以下 ($S/N \geq 3$)。

9. 實驗方法

本實驗分取前配製之藥材甲醇萃取溶液 20 μl ，注入高效液相層析儀，選擇 RP C_{18} 的分離管柱，偵測波長為 UV 270 nm，流速為 1 ml/min，移動相為 (A) $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{SDS}:\text{H}_3\text{PO}_4 = 850\text{ ml}:150\text{ ml}:0.58\text{ g}:0.85\text{ ml}$ ，(B) $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{SDS}:\text{H}_3\text{PO}_4 = 150\text{ ml}:850\text{ ml}:0.58\text{ g}:0.85\text{ ml}$ ，(A)，(B)兩液以線性梯度進行沖提，其比例開始為 20:80，15 分鐘時為 35:65，30 分鐘時為 50:50，45 分鐘時為 65:35，在 35 min 內完成四種藥效成分的定量工作。取層析圖之波峰面積積分與濃度，以標準品溶液之線性迴歸方程式即可計算求出藥材萃取液的濃度，再進一步換算出該藥材中各藥效成分之含量。

實驗結果

1. 精確配製 1.000, 0.750, 0.500, 0.250, 0.100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的標準品溶液，分別各以 20 μl 的定量注射入高效液相層析儀，畫出檢量線之校正曲線，其線性迴歸方程式及其相關係數如下：**I** 為 $Y = 0.68x + 0.08$, $r^2 = 0.99996$ ，**II** 為 $Y = 2.86x - 1.26$, $r^2 = 0.99996$ ，**III** 為 $Y = 1.55x - 1.36$, $r^2 = 0.99996$ 及 **IV** 為 $Y = 0.41x + 0.74$, $r^2 = 0.99995$ ，均呈現良好之線性關係。其分析最低靈敏度 **I** 為 55 ng，**II** 為 30 ng，**III** 為 50 ng，**IV** 為 100 ng。
2. 分析之精確性，於對照標準品溶液檢量線之範圍內，在同日不同時間 (intraday) 及不同日間 (interday)，重覆注入高效液相層析儀定量分析各四次，並計算其精密度 (precision) 與準確度 (accuracy)，結果 C.V. 或 bias 值均小於 3%，顯示 HPLC 方法，用於吳茱萸活性成分之分析，其結果甚佳 (如 Table 1.)。
3. 回收率試驗：使用高效液相層析儀分析，計算其添加回收率的偵測結果分別：**I** 為 $104.14 \pm 1.44\%$ ，**II** 為 $104.38 \pm 4.25\%$ ，**III** 為 $105.84 \pm 4.40\%$ ，**IV** 為 $105.55 \pm 4.66\%$ ，四種指標成分回收率之相對標準偏差範圍在 1.89~6.25 之間。(如 Table 2)

Table 1. Intraday and interday assay variations of synephrine, evodiamine, dehydroevodiamine, rutaecarpine.

Marker Substance	Intraday (Mean $\pm$ S.D.)	Interday (Mean $\pm$ S.D.)	intraday		Interday	
			C.V. %	Bias. %	C.V. %	Bias. %
Synephrine	523.55 $\pm$ 6.91	548.29 $\pm$ 12.14	1.32	1.11	2.08	1.66
Evodiamine	521.42 $\pm$ 5.52	565.35 $\pm$ 9.78	1.06	0.91	1.47	1.21
Dehydro evodiamine	511.57 $\pm$ 6.70	494.34 $\pm$ 6.70	1.31	1.11	1.09	0.85
Rutaecarpine	521.90 $\pm$ 5.52	568.76 $\pm$ 10.67	1.06	0.91	1.41	1.17

Table 2. Recoveries of synephrine, evodiamine, dehydroevodiamine, rutaecarpine in *Evodia rutaecarpa*.

Marker Substance	Added amount (ng)/ μ l	Measured amount (ng)/ μ l	Recovery (%)	*Mean $\pm$ S.D. (%)	R.S.D. (%)
Synephrine	102.84	103.37	100.51	105.55 $\pm$ 4.66	6.25
	144.27	162.37	112.54		
	191.39	198.26	103.59		
Evodiamine	108.53	109.69	101.07	104.38 $\pm$ 4.25	5.52
	147.55	163.42	110.75		
	200.81	200.81	101.31		
Dehydroevodiamine	86.95	91.32	105.02	104.14 $\pm$ 1.44	1.89
	123.28	129.96	105.42		
	196.70	200.57	101.97		
Rutaecarpine	106.73	110.40	103.43	105.84 $\pm$ 4.40	5.79
	149.14	167.71	112.45		
	202.05	205.38	101.65		

*n=3

Table 3. Four bioactive compounds in methanol crude extracts of *Evodia sensu*

Substance (n=3)	E.R.C. (mg/g)	E.R.T. (mg/g)	E.M.T. (mg/g)
Synephrine	0.62 $\pm$ 0.06	N.D.	N.D.
Evodiamine	3.39 $\pm$ 0.18	0.40 $\pm$ 0.01	1.79 $\pm$ 0.37
Dehydroevodiamine	3.00 $\pm$ 0.06	1.02 $\pm$ 0.06	0.76 $\pm$ 0.13
Rutaecarpine	4.02 $\pm$ 0.30	0.69 $\pm$ 0.03	0.92 $\pm$ 0.19

Note: 1. E.R.C. => *Evodia rutaecarpa*, China2. E.R.T. => *Evodia rutaecarpa*, Taiwan3. E.M.T. => *Evodia meliaefolia*, Taiwan

4. N.E. => Not detected

4.本實驗採用 UV 270 nm 來檢測，活性成分之滯留時間分別 IV 為 12.7 分鐘、II 為 29.5 分鐘、I 為 30.8 分鐘、III 為 33.6 分鐘。

5.經上述方法分析結果 (Table 3)，四種活性成分在中國大陸產吳茱萸之含量分別：I 為 3.00 $\pm$ 0.06 mg/g II 為 3.39 $\pm$ 0.18 mg/g III 為 4.02 $\pm$ 0.30 mg/g；台灣產吳茱萸之含量：I 為 1.02 $\pm$ 0.06 mg/g，II 為 0.40 $\pm$ 0.01 mg/g III 為 0.69 $\pm$ 0.03 mg/g；同屬植物賊仔樹果實之含量：I 為 0.76 $\pm$ 0.13 mg/g，II 為 1.79 $\pm$ 0.37 mg/g，III 為 0.92 $\pm$ 0.19 mg/g，而 IV 為 0.62 $\pm$ 0.06 mg/g 僅在中國大陸產吳茱萸中發現。

討 論

早期從中國大陸產吳茱萸中萃取出有升壓成分 IV 以及降壓成分 I、II、III，而台灣產吳茱萸中未檢測

出 IV 之含量。所以我們針對中國大陸、台灣產吳茱萸及同屬植物賊仔樹中活性成分含量之比較研究。在本實驗中發現中國大陸產吳茱萸三種成分 I : II : III 之含量比為 1.00 : 1.13 : 1.34, 台灣產吳茱萸為 1.00 : 0.39 : 0.68, 同屬植物賊仔樹為 1.00 : 2.36 : 1.21, 顯示中國大陸產吳茱萸之三種活性成分含量比相近, 台灣產吳茱萸與賊仔樹之三種活性成分含量落差較大。比較中國大陸與台灣產吳茱萸之結果 : I 大於 2.94 倍, II 大於 8.48 倍, III 大於 5.83 倍。台灣產吳茱萸與賊仔樹, 目前市場上未被作為藥用, 可能與此有關? 比較台灣產吳茱萸與賊仔樹之結果 : I 大於 1.34 倍, II 大於 0.22 倍, III 大於 0.75 倍。顯示賊仔樹含 II 的成分量很高, 可提供研究者另一方向的思考。

以往有關吳茱萸之研究¹²⁻¹⁹, 提出有 I, II, III 單獨或多種活性成分之研究報告, 亦有分別使用不同方法來檢測 IV 與 I, II, III 等活性成分, 本實驗為了使四種活性成分之吸光度能同時呈現, 並為了避開生藥材樣品中其他成分雜訊的干擾, 所以本實驗採用波長 270 nm 來檢測, 四種活性成分在 35 分鐘內即可完成分離。本研究建立一個簡易、精確、快速之高效液相層析方法。

植物中所含之藥效成分, 隨品種、產地、氣候、採收時間、儲存、運輸及製備等情況而有差異。吳茱萸為常用之傳統中藥, 在中國大陸產吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth, 除原植物外尚有石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. Var. *officinalis* (Dode) Huang. 及毛脈吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. Var. *bodinieri* (Dode) Huang. 亦同等使用。品種繁多, 不易辨識, 易於混淆, 故希望能釐清藥材之含量與療效之關係, 以為中藥品質管制把關, 及開發新藥材; 在台灣中藥製劑規定使用水萃取, 未來我們希望能藉由各種萃取之方法, 改變不同成分組合之含量比例, 進而探討其與生物活性之關係, 以驗證中醫藥之療效。

參考資料

1. 江蘇新醫學院, 新編中藥大辭典, 商務印書館香港分館印行, 香港, p1118-1120, 1979。
2. 孫星衍、孫馮翼, 神農本草經, 五洲出版社, 台北, p21, 1969。
3. Chen CF, Chen SM, Lin MT. and Chou SY, In vitro and in vivo studies on the mechanism of cardiovascular effects of Wu-Chu-Yu (*Evodiae Fructus*), Am. Med. Chin J, 9:39-47, 1981.
4. Chiou WF, Chou CJ, Liao JF, Shum AYC, Chen CF, The mechanism of the vasodilatory effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. Eur Pharmacol J, 257: 59-66, 1994.
5. Chiou WF, Chou CJ, Shum AYC, Chen CF, The vasorelaxant effect of evodiamine in rat isolated mesenteric arteries: mode of action, Eur Pharmacol J, 215: 277-283, 1992.
6. Chiou WF, Liao JF, Shum AYC, Chen CF, The mechanisms of vasorelaxant effect of dehydroevodiamine: a bioactive isoquinazolinocarboline alkaloid of plant origin, Cardiovas Pharmacol J, 27: 845-853, 1996.
7. Chiou WF, Liao JF, Chen CF, Comparative study on the vasodilator effects of 3 isoquinazoline alkaloids isolated from *Evodia rutaecarpa*. Natl. Prod. J, 59: 374-378, 1996.
8. Chiou WF, Liao JF, Shum AYC, Chen CF, Studies of the cellular mechanisms underlying the vasorelaxant effects of rutaecarpine, a bioactive component extracted from a herbal drug. Cardiovas Pharmacol J, 29: 490-498, 1997.

9. Chiou WF, Liao JF, Sung YJ, Chen CF, Inhibitory effect of dehydroevodiamine and evodiamine on nitric oxide production in cultured murine macrophages. *J. Natl. Prod.*, 60: 708-711, 1997.
10. Chang CE, In *Flora of Taiwan: Rutaceae*, 1sted; Editorial Committee of Flora of Taiwan; Taipei, Vol III, p514-517, 1977.
11. Chang CE and Hartley TG, In *Flora of Taiwan: Rutaceae*, 2nded; Editorial Committee of Flora of Taiwan; Taipei, Vol III, p533-535, 1993.
12. Lin LC, Chou CJ, Chen KT, Chen CF, Flavonoids from *Evoidae fructus*, *Chin. Med. J.*, 2: 94-100, 1991.
13. Chuang WC, Sheu SJ, A comparative study on processed *evodiae fructus*, *Chin. Pharm. J.*, 46: 89-97, 1994.
14. Chen GL, Yuan YC, Li YF, Lee AR, Chen CF, A stability indicating method for dehydroevodiamine chloride by high-performance liquid chromatography/diode array detector, *Chin. Pharm. J.*, 43: 75-80, 1991.
15. Peng YT, Shum AYC, Tsai TH, Lin LC, Chen CF, High-performance liquid chromatography of the quinazolinocarboline alkaloid dehydroevodiamine, *Chromatogr J.*, 617: 87-93, 1993.
16. Ko HC, Tsai TH, Chou CJ, Hsu SY, Li SY and Chen CF, High-performance liquid chromatographic determination of rutaecarpine in rat plasma: application to pharmacokinetic study, *Chromatogr J.*, 655: 27-31, 1994.
17. Jeng KF, Lin YH, Lin LC, Chou CJ, Tsai TH, Chen CF, High-performance liquid chromatographic determination of evodiamine in rats plasma: application to pharmacokinetic studies, *Chromatogr J. B.*, 668: 343-345, 1995.
18. Wu TS, Yeh JH, Wu PL, Chen KT, Lin LC, Chen CF, 7-Hydroxyrutaecarpine from *Tetradium glabrifolium* and *Tetradium ruticarpum*, *Heterocycles*, 41: 1071-1076, 1995.
19. 江慧玉, 麻黃 厚朴 吳茱萸之成分分析研究, 國立台灣師範大學化學研究所, 碩士論文, 台北 p162-167, 2001。

DETERMINATION OF DEHYDROEVODIAMINE, EVODIAMINE, RUTAECARPINE AND SYNEPHRINE IN EVODIA GENUS PLANTS FROM TAIWAN AND MAINLAND CHINA

Han-Chieh Ko^{1,2}, Kuo-Tung Chen¹, Cheng-Jen Chou² and Chieh-Fu Chen²

¹Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Taipei Medical University

²National Research Institute of Chinese Medicine

Taipei, Taiwan

(Received 25th February 2002, revised Ms received 21th May 2002, accepted 21th May 2002)

Wu-Chu-Yu, the unripe fruit of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth., is a commonly used Chinese herbal drug, which has been classified as "middle class" in Shen-Nong-Ben-Cao-Jing and for the treatment of gastrointestinal disorders, headache, abdominal pain, dysentery, postpartum hemorrhage and amenorrhea. We found that three alkaloids, dehydroevodiamine (**I**), evodiamine (**II**), and rutaecarpine (**III**), obtained from Wu-Chu-Yu, possess hypotensive and antiarrhythmic effects, stimulated endothelial cells and inhibited macrophages nitric oxide release. While, another bioactive compound, synephrine (**IV**), possess hypertensive effect.

In this study, a high performance liquid chromatographic method was developed for simultaneous determination of these four components in *Evodia rutaecarpa* and *Evodia meliaefolia* obtained from mainland China and Taiwan.

The analysis was made by using a gradient elution with a mobile phase solution of acetonitrile, water, sodium dodecyl sulfonate (SDS), orthophosphoric acid (85%) on a C₁₈ column (Reversed-phase C₁₈ column), the flow rate was 1.0 ml/min, and detected by UV (270 nm).

The results demonstrated that 3.00 ± 0.06 mg/g of **I**, 3.39 ± 0.18 mg/g of **II**, 4.02 ± 0.30 mg/g of **III** were contained in *Evodia rutaecarpa* obtained from mainland China; 1.02 ± 0.06 mg/g of **I**, 0.40 ± 0.01 mg/g of **II**, 0.69 ± 0.03 mg/g of **III** and 0.76 ± 0.13 mg/g of **I**, 1.79 ± 0.37 mg/g of **II**, 0.92 ± 0.19 mg/g of **III** were contained in *Evodia rutaecarpa* obtained from Taiwan. and *Evodia meliaefolia* obtained from Taiwan respectively. While, synephrine (0.62 ± 0.06 mg/g) was only detected in *Evodia rutaecarpa* obtained from mainland China.

Key words: Evodia, Tetradium, Dehydroevodiamine, Evodiamine, Rutaecarpine, Synephrine, High-performance liquid chromatography.