

附子单酯型生物碱含量测定方法的优化

张超¹, 杨辛欣², 刘亚楠², 蔡璐², 王帅², 彭雪², 李超英²

1. 澳门大学中华医药研究院, 中药质量研究国家重点实验室, 中国澳门特别行政区 999078
2. 长春中医药大学, 长春 130117

摘要 对比《中国药典》与文献中附子单酯型生物碱 HPLC 含量测定方法, 发现附子 HPLC 含量测定中样品的提取方法、供试品溶液的制备方法、色谱条件、检测方法和含量测定结果均欠佳, 故建立附子新的含量测定方法与《中国药典》含量测定方法比较。优化后的附子单酯型生物碱 HPLC 含量测定方法优于《中国药典》方法。研究建立的附子 HPLC 测定方法简便, 可缩短检测时间, 降低检测成本, 提高了柱效, 为附子安全、有效、质量可控提供更科学完善的检测方法。

关键词 附子; 中国药典; 高效液相色谱法; 单酯型生物碱

附子被誉为回阳救逆第一要药^[1], 具有回阳救逆、温阳补肾、散寒止痛等功效。但是附子属于有毒中药, 现代研究表明附子所含双酯型生物碱, 既是毒性成分, 又是镇痛有效成分^[2]。附子必须经过炮制后入药, 炮制过程中使其部分双酯型生物碱转变成毒性较小的单酯型生物碱^[3-4], 因此 2010 版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)明确规定检测附子的苯甲酰次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱的含量^[5]。目前附子单酯型生物碱含量测定多采用梯度洗脱法^[6-9], 杨文杰等^[10]对附子复方注射液中附子的有效成分单酯型生物碱的高效液相色谱法进行研究, 提出离子液体均匀提取——高效液相色谱法。但是, 2010 版《中国药典》中附子 HPLC 含量测定方法存在样品处理方法复杂, 测试时间长, 并且易造成色谱柱压力过大, 对高效液相色谱仪和色谱柱的损害较大, 导致工作效率降低。另外, 文献报道的附子 HPLC 测定方法中存在测得的含量较低等问题。因此, 本实验开展附子单酯型生物碱 HPLC 含量测定方法的优化研究。

1 仪器与试剂

GKC-11-CR2 电子恒温水浴锅(上海科析实验仪器厂), KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), AL204 型电子天平(梅特勒—托利多仪器上海有限公司), KDM 型调温电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司), Agilent 1100 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司), Megers C18 色谱柱(汉邦科技有限公司), TDLSO-2B 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* De-bx. 子根的加工品, 购于吉林省长春市宏检大药房(长春中医药大学高士贤鉴定); 苯甲酰乌头原碱(111794-201303)、苯甲酰次乌头碱(111796-201303)、苯甲酰新乌头碱(111795-201303)对照品均购自中国药品生物制品检定所; 异丙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、氯化钠、1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐、六氟磷酸铵、超纯水、乙酸、乙酸铵均为分析纯; 乙腈、四氢呋喃、甲醇均为色谱纯。

2 实验研究

2.1 方法学

2.1.1 对照品溶液的配制

取苯甲酰次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱对照品适量, 精密称定, 加乙腈制成每 1 mL 各含 5 μg 的混合溶液, 即得。

2.1.2 标准曲线的绘制

分别精密量取等体积不同质量浓度的标准品溶液注入高效液相色谱仪, 记录其峰面积值。以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 计算线性回归方程。苯甲酰新乌头碱的线性回归方程为 $y=5746.1x+181.66$ ($r=0.9998$), 表明苯甲酰新乌头碱在 0.0493~0.2465 mg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。苯甲酰次乌头碱的线性回归方程为 $y=6135.0x-2.9952$ ($r=0.9997$), 表明当苯甲酰次乌头碱在 0.0491~0.2455 mg·mL⁻¹ 的范围内线性关系良好。苯甲酰乌头原碱的线性回归方程为 $y=6211.4x+6.8095$ ($r=0.9990$), 表明苯甲酰乌头原碱在 0.0495~0.2475

收稿日期: 2015-03-01; 修回日期: 2015-11-10

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(YYZX201265)

作者简介: 张超, 博士研究生, 研究方向为肿瘤药理和药物, 电子信箱: zhangchao_0213@126.com; 杨辛欣(共同第一作者), 讲师, 研究方向为药物新型递药系统, 电子信箱: xinxin_yang1980@126.com; 李超英(通信作者), 教授, 研究方向为药物新型递药系统与新药, 电子信箱: chaoying_li@126.com

引用格式: 张超, 杨辛欣, 刘亚楠, 等. 附子单酯型生物碱含量测定方法的优化[J]. 科技导报, 2016, 34(2): 200-204; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.2.033

mg·mL⁻¹范围内线性关系良好。

2.1.3 精密度实验

精密量取苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头碱标准品溶液,按色谱条件,连续进样6次,每次进样量5 μL,记录峰面积值,并计算其RSD值。苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头碱RSD值为1.10%,符合精密度要求,说明仪器的精密度良好。

2.1.4 重现性实验

按照“供试品的制备方法”项下的方法制备供试品溶液共5份,按照色谱条件进样10 μL,进行检测。记录峰面积值,并计算其RSD值。结果,苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头碱的RSD值为1.89%,表明本方法重现性良好,方法可行。

2.1.5 稳定性实验

选取一批样品,按“供试品的制备方法”项下的方法进行处理,按照色谱条件,分别在制备后0、60、120、240、360、480、600 min进样,记录各个时间点的峰面积值,并计算其RSD值。结果表明苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头碱的RSD值为1.94%,样品处理后的600 min内稳定。

2.1.6 加样回收率

精密量取已知含量的样品6份,分别按照样品:标准品质量比为1:1.2、1:1、1:0.8的比例加入标准品,按“供试品的制备方法”项下的方法制备进行测定,记录峰面积值,计算回收率及RSD值。结果苯甲酰乌头原碱平均加样回收率为100.01%,RSD值为1.52%;苯甲酰次乌头碱平均加样回收率为101.79%,RSD值为1.67%;苯甲酰新乌头碱平均加样回收率为99.65%,RSD值为1.10%,结果表明符合加样回收率的要求,此处理方法合理可行。

2.2 供试品的制备方法

2.2.1 《中国药典》中附子饮片含量测定处理方法(以下简称“药典处理方法”)

取附子粉末约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氨试液3 mL,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶液50 mL,称重,超声处理(功率300 W,频率40 kHz,水温在25℃以下)30 min,放冷,再称重,用上述混合溶液补足减失的重量,摇匀,滤过。精密量取滤液25 mL,40℃以下减压回收溶剂至干,残渣精密加入异丙醇-二氯甲烷(体积比1:1)混合溶液3 mL溶解,滤过,取滤液,即得。

2.2.2 杨文杰等附子含量测定处理方法(以下简称“杨文杰处理方法”)

杨文杰等提出液体均匀提取—高效液相色谱法,样品处理是在液体状态中加入试剂。因此,为了与杨文杰处理方法比较,本文先将附子粉末进行提取。附子提取工艺是本文经过正交实验研究获得,最佳提取工艺为分别用10、8、8倍量蒸馏水回流提取3次,每次1 h,将药渣取出后再分别用10、8、8倍量75%乙醇回流提取3次,每次时间分别为1 h、40 min、40 min。最后将3次水提取液与3次醇提取液混合均匀,回收乙

醇,浓缩至每毫升提取液含附子生药材0.2 g·mL⁻¹。然后使用离子液体均匀提取—高效液相色谱法。

取5 mL附子提取液置于离心管中,加入0.25 g氯化钠,溶解,混匀,加入0.058 g 1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐混匀,将0.26 g六氟硼酸铵溶解于0.8 mL超纯水后加到离心管中,4000 r·min⁻¹离心5 min,吸取底部液体过0.22 μm滤膜,即得。

2.2.3 本文附子含量测定处理方法(以下简称“本文处理方法”)

精密称定附子粉末2 g,加氨试液3 mL,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶液50 mL,称重,超声处理(功率300 W,频率40 kHz,水温在25℃以下)30 min,放冷,再称重,用异丙醇-乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶液补足失重,摇匀,滤过。精密量取滤液25 mL,40℃以下减压回收溶剂至干,残渣用5 mL超纯水溶解,加入0.25 g氯化钠,溶解,混匀,加入0.058 g 1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐混匀,将0.26 g六氟硼酸铵溶解于0.8 mL超纯水后加到离心管中,在4000 r·min⁻¹离心5 min,吸取底部液体过0.22 μm滤膜,即得。

2.3 色谱条件

2.3.1 2010版《中国药典》中附子的HPLC含量测定方法

2010版《中国药典》中附子的HPLC含量测定方法的色谱条件(以下简称“药典的色谱条件”):Megars-C18柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);以乙腈-四氢呋喃(体积比25:15)为流动相A,以0.1 mol·L⁻¹醋酸铵溶液(每1000 mL加冰醋酸0.5 mL)为流动相B,按表1中的规定进行梯度洗脱;检测波长为235 nm,柱温30℃,流速0.8 mL·min⁻¹,进样量为10 μL。

表1 药典色谱条件

Table 1 Chromatographic conditions in the Chinese Pharmacopoeia

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0~48	15→26	85→74
48~49	26→35	74→65
49~58	35	65
58~65	35→15	65→85

2.3.2 杨文杰等研究的附子的HPLC含量测定方法色谱条件(以下简称“杨文杰的色谱条件”)

色谱柱采用 Megars-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇:水(每升含5 mmol乙酸铵和2 mL乙酸)=43:57(体积比),柱温30℃,流速0.6 mL·min⁻¹,紫外检测波长235 nm,进样量为10 μL。

2.4 HPLC测定方法和结果

2.4.1 标准品在药典的色谱条件与文献的色谱条件下的测定结果比较

分别取一定量的混合标准品溶液,在药典的色谱条件与文献的色谱条件下进样10 μL,观察出峰时间和峰形,对比含量。两种色谱条件下的标准品出峰结果如图1所示。

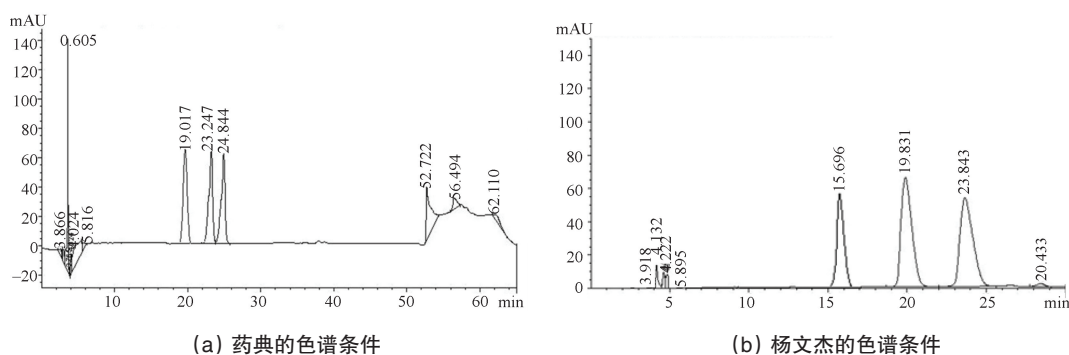


图1 不同色谱条件下标准品HPLC

Fig. 1 HPLC Chromatogram of standards in the different chromatogram conditions

图1(a)表明在药典的色谱条件下采用梯度洗脱的方法,每针测试的时间为65 min,标准品的出峰时间分别为苯甲酰新乌头碱19.017 min、苯甲酰乌头原碱23.234 min和苯甲酰次乌头碱24.944 min左右。但是后2个成分峰的分度不好。

图1(b)表明在杨文杰的色谱条件下每针测试的时间为30 min。标准品的出峰时间分别为苯甲酰新乌头碱16.696

min、苯甲酰乌头原碱19.881 min和苯甲酰次乌头碱23.143 min左右,且3个峰的分度良好。两种色谱条件比较结果杨文杰的色谱条件优于药典的色谱条件。

2.4.2 样品处理方法测定结果比较

在药典的色谱条件下,分别进(药典处理方法、杨文杰处理方法和本文处理方法)3种不同样品处理方法的样品各10 μL ,观察出峰时间和峰形,计算样品含量,结果如图2所示。

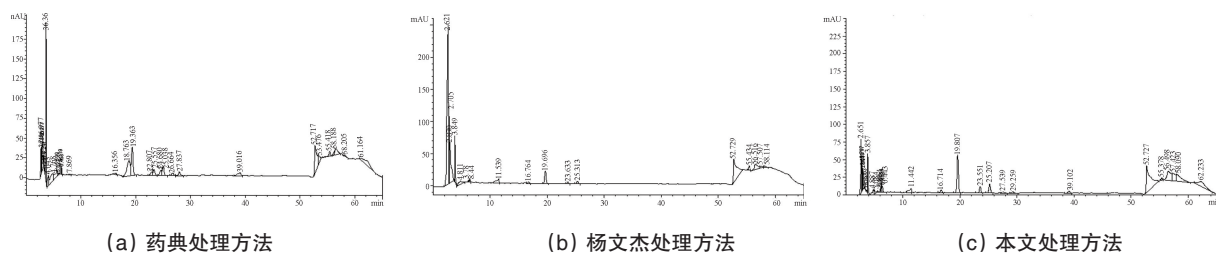


图2 不同处理方法在药典的色谱条件下样品HPLC

Fig. 2 Different methods in HPLC chromatographic conditions

图2(a)表明,药典处理方法在梯度洗脱的条件下,每针测试的洗脱时间为65 min,苯甲酰新乌头碱的出峰时间为19.303 min,苯甲酰乌头原碱的出峰时间为23.357 min,苯甲酰次乌头碱的出峰时间为25.038 min。3个峰没有完全分开,无法计算含量。

图2(b)表明,杨文杰处理方法在梯度洗脱的条件下,3个峰分离度良好,每针测试的洗脱时间为30 min。苯甲酰新乌头碱的出峰时间为19.696 min,其含量为 $0.615 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;苯甲酰乌头原碱的出峰时间为23.633 min,其含量为 $0.132 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;苯甲酰次乌头碱的出峰时间为25.313 min,其含量为 $0.271 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图3(c)表明,本文处理方法在梯度洗脱的条件下,3个峰分离度最好,每针测试的洗脱时间为30 min,苯甲酰新乌头碱的出峰时间为19.607 min,含量为 $2.749 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;苯甲酰乌头原碱的出峰时间为23.551 min,含量为 $0.553 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;苯甲酰次乌头碱的出峰时间为25.207 min,含量为 $0.849 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3种附子样品处理方法比较结果表明,本文处理方法优于杨文杰处理方法,杨文杰处理方法优于药典处理方法。尤其本文建立的样品处理方法测得3种成分(苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头碱)含量均高于杨文杰处理方法的4倍左右。

2.4.3 样品HPLC色谱条件测定结果比较

在杨文杰的色谱条件下,分别进3种不同处理方法的样品各10 μL ,观察出峰时间和峰形,计算样品含量,结果见图3。

图3(a)表明,用药典处理方法处理样品,在杨文杰的色谱条件下,每个样品测试时间为30 min。苯甲酰新乌头碱的出峰时间为16.382 min,苯甲酰乌头原碱的出峰时间为20.222 min,苯甲酰次乌头碱的出峰时间为23.997 min。3个峰的分度较差,尤其是苯甲酰新乌头碱峰形不完整,无法计算成分含量。

图3(b)表明,用杨文杰处理方法处理样品,在杨文杰的色谱条件下,每针的测试时间为30 min,3个峰的分度较好。苯甲酰新乌头碱的出峰时间为17.105 min,含量为1.365

mg·mL⁻¹。苯甲酰乌头原碱的出峰时间 20.198 min, 含量为 0.189 mg·mL⁻¹。苯甲酰次乌头碱的出峰时间为 23.965 min, 含量为 0.372 mg·mL⁻¹。

图 3(c)表明,用本文处理方法处理样品,在杨文杰的色

谱条件下,每针测试时间为 30 min,3 个峰分离度好。苯甲酰新乌头碱出峰时间为 16.833 min, 含量为 3.978 mg·mL⁻¹。苯甲酰乌头原碱出峰时间 19.983 min, 含量为 0.662 mg·mL⁻¹。苯甲酰次乌头碱出峰时间为 23.683 min, 含量为 1.047 mg·mL⁻¹。

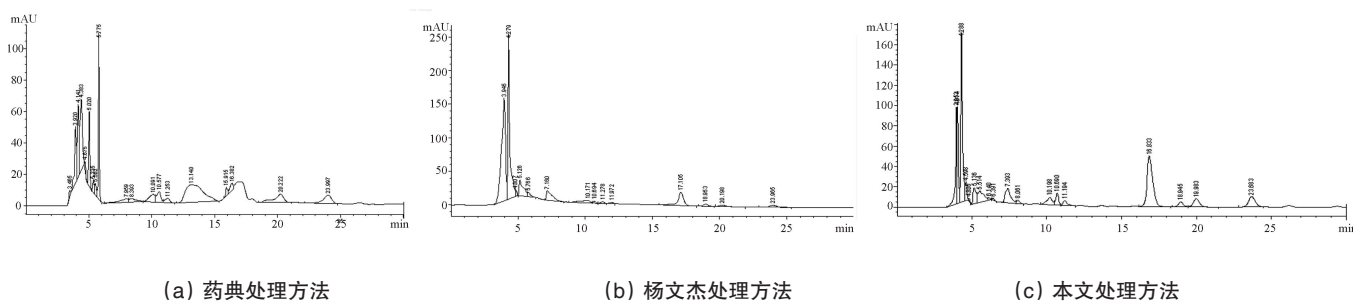


图 3 不同处理方法的处理样品图

Fig. 3 Different methods in HPLC

2.4.4 本文新建立的附子中单酯型生物碱含量测定方法

色谱柱条件:色谱柱采用 Megers-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇:水(每升含 5 mmol 乙酸铵和 2 mL 乙酸)=43:57(体积比), 柱温 30℃, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 紫外检测波长 235 nm。

最佳样品处理方法:取附子粉末约 2 g, 精称, 加氨试液 3 mL, 精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液 50 mL, 称重, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz, 水温 25℃以下)30 min, 放冷, 称重, 用上述混合溶液补足失重, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 25 mL, 40℃以下减压回收溶剂至干, 残渣用 5 mL 超纯水溶解, 加 0.25 g 氯化钠, 混匀, 加 0.058 g 1-己基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐混匀, 将 0.26 g 六氟硼酸铵溶解于 0.8 mL 超纯水后加至离心管中, 4000 r·min⁻¹离心 5 min, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

3 讨论

通过对比药典的色谱条件与杨文杰的色谱条件, 附子混合标准品和 3 个样品的出峰时间, 峰形和成分含量等, 发现: 1) 药典的色谱条件下, 3 个成分苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头碱峰分离度一般, 峰形较完整, 但是与杨文杰的色谱条件相比, 检测时间过长, 需要 65 min, 浪费各种试剂, 并且易产生较大柱压, 约为 12 MPa, 也减少色谱柱的使用时间; 2) 杨文杰的色谱条件下, 样品检测时间为 30 min, 柱压在 10.9 MPa 左右, 且标准品的 3 个峰分离度好, 峰形完整, 优于药典方法, 但是存在 3 个成分含量较低; 3) 本文建立的附子 HPLC 含量测定方法, 样品的出峰时间、峰形和 3 个成分峰分离效果显著优于《中国药典》中附子饮片含量测定处理方法, 测定 3 种成分含量均优于药典处理方法和杨文杰处理方法, 并且含量显著高于杨文杰处理方法 3 倍以上。另

外, 本文方法测试一个样品可节省 35 min, 节省了流动相试剂, 起到保护色谱柱和显著提高工作效率的作用。

总之, 本文建立的附子单酯型生物碱 HPLC 含量测定方法更科学、高效、省时和低成本, 适用于附子类中药饮片及其复方制剂中有效成分的 HPLC 含量测定, 也为 2010 年版《中国药典》中附子有效成分含量测定方法修改提供科学依据。

参考文献(References)

- [1] 李超英, 李玉梅, 张大方, 等. 附子与人参配伍对急性心衰大鼠血流动力学的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 593-598.
Li Chaoying, Li Yumei, Zhang Dafang, et al. Effect of combination of *Radix Aconiti Lateralis* and *Radix Ginseng* on hemodynamics of acute heart failure rats[J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2011, 22(6): 593-598.
- [2] 王立岩, 张大方, 曲晓波, 等. 附子炮制前后有效部位强心作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 5(34): 596-599.
Wang Liyan, Zhang Dafang, Qu Xiaobo, et al. Experimental research on cardiotoxic effect of active compound from raw and processing aconite roots[J]. China Journal Of Chinese Materia Medica, 2009, 5(34): 596-599.
- [3] 魏巍. 乌头降解产物化学成分及生物活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
Wei Wei. The product chemical composition and biological activities of degradation Aconitine[D]. Changchun: Jilin University, 2011.
- [4] 袁小红, 杨婷, 刘卓. 生附子总生物碱及其水解产物中双酯型和单酯型二萜生物碱的分析[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(6): 2385-2386, 2390.
Yuan Xiaohong, Yang Ting, Liu Zhuo. Analysis of diester type and monoester type diterpenoid alkaloids in total alkaloids and their hydrolysis products of *Radix Aconiti Lateralis*[J]. Journal of Anhui Agriculture Sciences, 2013, 41(6): 2385-2386, 2390.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 177-178.

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. Part 1. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science & Technology Publishing House, 2010: 177-178.
- [6] 朱日然, 李启艳, 朱宗敏, 等. HPLC 法测定附子与其炮制品中双酯型生物碱[J]. 中成药, 2011, 8(33): 1375-1378.
Zhu Riran, Li Qiyang, Zhu Zongmin, et al. Analysis of diester diterpenoid alkaloids (DDAs) in *Aconitum carmichaeli* and its processed products by HPLC[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2011, 8(33): 1375-1378.
- [7] 雷崎方, 斯建勇. 附子化学成分含量测定方法研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24: 1480-1485.
Lei Qifang, Si Jianyong. Advances in content determination methods of chemical constituents from *Radix Aconiti Lateralis* preparata (Fuzi)[J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24: 1480-1485.
- [8] 陈东安. 附子酯型生物碱含量测定及煎煮动态变化规律研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
Chen Dongan. Determination of the dynamic changes of aconite and boiling ester type alkaloid content[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [9] 孙兰, 周海燕, 赵润怀, 等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱[J]. 中草药, 2009, 40(1): 131-134.
Sun Lan, Zhou Haiyan, Zhao Runhuai, et al. Determination of six kinds of monoester- and diester-alkaloids in *Radix Aconiti Lateralis* praeparata by HPLC[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2009, 40(1): 131-134.
- [10] 杨瑞杰, 李绪文, 张培旭, 等. 离子液体均匀提取-高效液相色谱法测定参附注射液中 4 种单酯型乌头碱的含量[J]. 高等学校化学学报, 2011, 12: 2752-2756.
Yang Ruijie, Li Xuwen, Zhang Peixu, et al. Determination of four kinds of monoester-diterpenoid aconines in shen-fu injection by homogeneous ionic liquid microextraction-high performance liquid chromatography[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2011, 12: 2752-2756.

Optimization of content determination of monoester-type alkaloids in aconite

ZHANG Chao¹, YANG Xinxin², LIU Ya'nan², CAI Lu², WANG Shuai², PENG Xue², LI Chaoying²

1. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macau 999078, China
2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract This paper aims to optimize the method for content determination of monoester-type alkaloids in aconite by HPLC in the Chinese Pharmacopoeia (2010 edition). By comparing the methods mentioned in the Chinese Pharmacopoeia and in the literature, we found that there are defects in the extraction method of samples, preparation methods of sample solution, chromatographic conditions, detection methods and determination results in content determination of monoester alkaloids in aconite by HPLC. Therefore, we established a new determination method and compared it with the one stated in the Chinese Pharmacopoeia. The established method had better performance than the previous one. This simple method greatly shortened the testing time, reduced the cost, and improved column efficiency, providing a safe, effective, and quality-controllable detection method for aconite.

Keywords aconite; the Chinese Pharmacopoeia; HPLC; monoester alkaloids

(编辑 田恬)