

HPLC 测定附杞固本膏中单酯型生物碱的含量^{*}

刘 佳, 梅双喜, 杨顺利, 冯莉萍[△]

(云南白药集团创新研发中心 / 云南省药物研究所 / 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

摘要: 目的 建立附杞固本膏中单酯型生物碱的高效液相色谱含量测定方法。方法 色谱柱 Waters XTerra RP18 5mm(4.6mm×250mm);柱温 30℃;流动相:以乙腈-四氢呋喃(25:15)为流动相 A,以 0.1mol/L 醋酸铵溶液(每 1000mL 含冰醋酸 0.5mL)为流动相 B,进行梯度洗脱;流速 1.0mL/min;检测波长为 235nm。结果 经方法学验证表明,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱分别在 0.045-1.800μg、0.0425-1.7000μg、0.0442-1.7680μg 范围内呈线性关系,精密度、稳定性、重现性均符合要求,本测定方法的平均回收率分别为 99.89%、99.22%、101.12%,RSD 为 1.72%、1.75%、2.32%(n=6)。结论 该方法简便、快速、准确、无干扰,可用于该制剂的质量控制。

关键词: 单酯型生物碱; 苯甲酰中乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 含量; 高效液相色谱

中图分类号: R286

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2016)03-0026-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.03.007

附杞固本膏是由附子、枸杞、肉桂等味药组成的复方制剂,其制备工艺为:附子水提取 2 次,第 1 次加压煎煮,第 2 次常压煎煮,滤液减压浓缩后进行醇沉,静置,上清液浓缩至流浸膏备用;枸杞子加水热浸提 2 次,滤液浓缩至流浸膏备用;肉桂(粉碎)水蒸汽蒸馏法提取肉桂油,肉桂油用 β-环糊精包合备用,水提液滤过浓缩至流浸膏备用;合并流浸膏,加入炼蜜,肉桂油 β-环糊精包合物、山梨酸钾、司盘-80,混匀。附杞固本膏现为昆明市中医院的院内制剂,具有培元固本,扶正御邪的功效,主要用于肾阳不足,症见腰膝酸软、畏寒肢冷、神疲乏力、夜尿频多、性欲减退的治疗^[1-2]。该复方的君药为附子,具有回阳救逆,补火助阳,散寒除湿,止痛的功效^[3]。在传统中医治疗中适用于阳虚阴盛急危厥脱症,与其它中药灵活配伍使用,可治疗多种疾病,成为云南中医吴氏流派特色。附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品,毒、效成分为酯型生物碱,其中毒性最大的为双酯型生物碱,如新乌头碱、乌头碱、次乌头碱等^[4]。临床上将其炮制入药,其原理是双酯型生物碱水解为单

酯型生物碱,如苯甲酰中乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱类,毒性降低^[5-7]。本实验采用 HPLC 检测方法检测其单酯型生物碱含量^[8-10],控制附杞固本膏制剂的质量,经方法学考察,认为本法简单、快速、准确、无干扰。

1 试验部分

1.1 仪器和试剂

高效液相色谱仪:岛津 LC-2010A。试剂:乙腈(色谱纯)、四氢呋喃(色谱纯)、重蒸水;醋酸铵、冰醋酸,均为分析纯。对照品:苯甲酰新乌头原碱(批号:111795-200901)、苯甲酰乌头原碱(批号:111794-200901)、苯甲酰次乌头原碱(批号:111796-200901),均为中国药品生物制品检定所提供。样品:附杞固本膏(批号 20110601,20110602,20110603,自制)。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XTerra RP18 5mm(4.6mm×250mm);柱温:30℃;流动相:以乙腈-四氢呋喃(25:15)为流动相 A,以 0.1mol/L 醋酸铵溶液(每

^{*} 基金项目:云南省科技计划项目(2014DC036)

收稿日期:2016-01-18

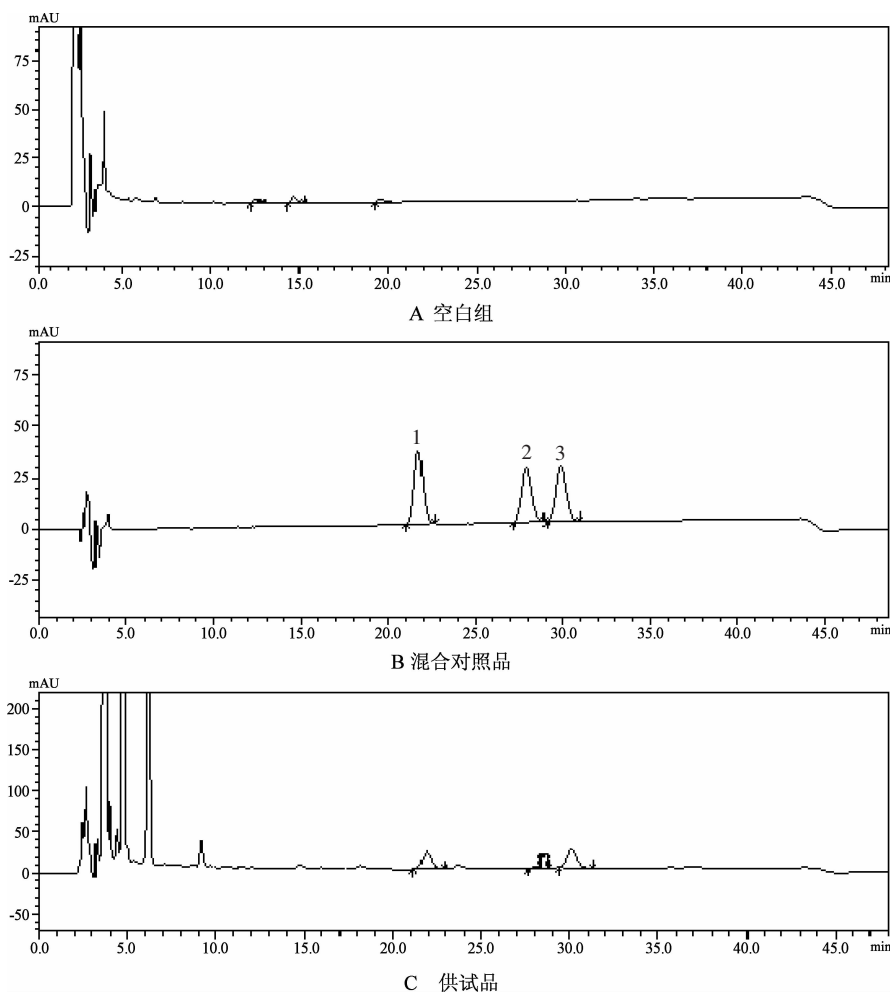
作者简介:刘佳(1982-),女,云南昆明人,工程师,研究方向:天然药物化学研究。

[△]通信作者:冯莉萍,E-mail:67501903@qq.com

1 000mL 含冰醋酸 0.5mL)为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;流速 1.0mL/min;检测波长为 235nm。在此色谱条件下苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱理论塔板数均不低于 3 000,见图 1。

表 1 梯度洗脱流动相比比例

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	12	88
0~40	12→15	88→85



峰 1 为苯甲酰新乌头原碱,峰 2 为苯甲酰乌头原碱,峰 3 为苯甲酰次乌头原碱

图 1 HPLC 色谱图

1.2.2 对照品溶液与供试品溶液的制备

对照品溶液的制备 取苯甲酰新乌头原碱对照品、苯甲酰乌头原碱对照品、苯甲酰次乌头原碱对照品适量,精密称定,加 0.01%盐酸甲醇制成每 1mL 含苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱各 50mg 的混合溶液,作为对照品溶液。

供试品溶液的制备 取附杞固本膏约 5g,精密称定,加 10mL 水稀释,加氨水调 pH 值至 9~10,用乙醚-三氯甲烷(3:1)振摇提取 3 次,每次 20mL,合并乙醚-三氯甲烷层,40℃减压回收溶剂至干,残渣

加 0.01%盐酸甲醇溶液使溶解,转移至 5mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

空白溶液的制备 取一份处方量,不含附子(黑顺片)药材按附杞固本膏生产工艺制备得空白煎膏。称取此膏约 5g,按供试品溶液制备方法制成空白对照溶液。

1.2.3 线性关系的考察

精密称取苯甲酰新乌头原碱对照品 4.50mg、苯甲酰乌头原碱对照品 4.25mg、苯甲酰次乌头原碱对照品 4.42mg 于 25mL 量瓶中,加 0.01%盐酸甲醇溶

液至刻度,分别取 0.25,0.5,1,2,5mL 于 10mL 量瓶中,加 0.01%盐酸甲醇溶液稀释至刻度。分别精密吸取 10mL 的对照品溶液,注入液相色谱仪,按上述色谱条件进行测定,以吸收峰面积的积分值为纵坐标 Y ,进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,得苯甲酰新乌头原碱线性回归方程: $Y=13638735.6X-7867.8$, $R=1$,在 0.045–1.800 μg 范围内呈线性关系。苯甲酰乌头原碱线性回归方程: $Y=12969192.7X-20391.3$, $R=1$,在 0.0425–1.7000 μg 范围内呈线性关系。苯甲酰次乌头原碱线性回归方程: $Y=13125485.6X-18596.5$, $Y=1$,在 0.0442–1.7680 μg 范围内呈线性关系。理论塔板数均在 3000 以上。

1.2.4 仪器精密度试验

精密吸取对照品溶液(苯甲酰新乌头原碱 0.09mg/mL、苯甲酰乌头原碱 0.085mg/mL、苯甲酰次乌头原碱 0.0884mg/mL)10mL,注入高效液相色谱仪,连续测定 6 次,结果见表 39,苯甲酰新乌头原碱 RSD=0.67%($n=6$)、苯甲酰乌头原碱 RSD=0.99%($n=6$)、苯甲酰次乌头原碱 RSD=1.39%($n=6$)。

1.2.5 重复性试验

取附杞固本膏(批号 20110601)样品 6 份,分别按供试品溶液制备方法制备,依法取样 10mL,注入高效液相色谱仪测定,苯甲酰新乌头原碱在样品中的含量为 44.66 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 1.02%($n=6$);苯甲酰乌头原碱在样品中的含量为 7.49 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 2.14%($n=6$);苯甲酰次乌头原碱在样品中的含量为 62.61 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 1.52%($n=6$)。

1.2.6 中间精密度试验

取同批附杞固本膏(批号 20110601)样品,由 3 位不同分析人员按供试品溶液制备方法制备,依法取样 10 μL ,注入液相色谱仪测定,苯甲酰新乌头原碱在样品中的含量为 46.00 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 2.53%($n=3$);苯甲酰乌头原碱在样品中的含量为 7.48 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 1.45%($n=3$);苯甲酰次乌头原碱在样品中的含量为 64.89 $\mu\text{g/g}$,RSD 为 2.01%($n=3$)。

1.2.7 准确度

取已知含量的同批附杞固本膏(批号 20110601)样品 6 份,分别加入苯甲酰新乌头原碱对照品溶液(0.119mg/mL)、苯甲酰乌头原碱对照品溶液(0.029mg/mL)、苯甲酰次乌头原碱对照品溶液(0.165mg/mL)各 0.5mL,按供试品溶液制备方法制备,本测定方法的苯甲酰新乌头原碱平均回收率为 99.89%,RSD=1.72%($n=6$);苯甲酰乌头原碱平均回

收率为 99.22%,RSD=1.75%($n=6$);苯甲酰次乌头原碱平均回收率为 101.12%,RSD=2.32%($n=6$)。

1.2.8 耐用性试验

①稳定性试验

精密吸取同批附杞固本膏样品(批号 20110601)10 μL ,间隔一定时间进样测定,结果表明供试品在 24h 内基本稳定,苯甲酰新乌头原碱 RSD 为 2.05%($n=6$);苯甲酰乌头原碱 RSD 为 0.94%($n=6$);苯甲酰次乌头原碱 RSD 为 0.89%($n=6$)。

②不同品牌色谱柱考察

分别采用 3 根不同色谱柱[色谱柱 1:Waters XTerra RP18 5mm (4.6mm $\times$ 250mm)(Lot NO.0198391881),色谱柱 2:Waters Symmetry Shield RP18 5mm(4.6mm $\times$ 250mm)(LotNO.01683632613637),色谱柱 3:E-cosil HPLC COLUMN C18 5mm (4.6mm $\times$ 250mm)(Lot NO.9FC41230)],依法测定同一批附杞固本膏样品(批号 20110601)中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量,结果显示 3 根色谱柱的保留时间、理论塔板数、分离度、拖尾因子虽有所差异,但均符合要求,而苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量测定结果变化不大,保持一致。

1.2.9 范围

取同批附杞固本膏样品(批号 20110601)高取样量(供试品称样量的 1.5 倍)、低取样量(供试品称样量的 0.5 倍)各 3 份,分别按供试品溶液制备方法制备,依法取样 10mL,注入高效液相色谱仪测定,结果见表 58、59、60,苯甲酰新乌头原碱在样品中的含量为 43.59mg/mL,RSD 为 1.70%($n=6$);苯甲酰乌头原碱在样品中的含量为 8.86mg/mL,RSD 为 2.80%($n=6$);苯甲酰次乌头原碱在样品中的含量为 66.89mg/mL,RSD 为 1.66%($n=6$)。

1.2.10 样品测定

依法测定 3 批样品,结果见表 2。

表 2 3 批样品测定结果表

样品 批号	苯甲酰新乌 头原碱含量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	苯甲酰乌头 原碱含量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	苯甲酰次乌 头原碱含量 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	单酯型生物 碱含量总和 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
20110601	40.26	4.27	54.48	100.16
	39.89	4.15	52.82	
20110602	49.26	7.14	67.73	126.02
	47.74	9.77	70.39	
20110603	48.44	3.78	26.02	79.25
	49.17	3.76	25.90	

2 讨论

本研究应用 Agilent 1100 DAD 检测器对苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱对照品溶液进行光谱扫描,三者均在 235nm 处具有最大吸收,所以将检测波长确定为 235nm。

3 个单酯型生物碱的化学结构和极性相似,在色谱上保留时间比较接近,难以达到有效分离。因此对甲醇-乙腈-0.025mol/LKH₂PO₄, 乙腈-40mmol/L 醋酸铵, 乙腈-四氢呋喃-0.1mol/L 醋酸铵等不同的流动相系统进行了摸索,结果显示乙腈-四氢呋喃-0.1mol/L 醋酸铵溶液进行梯度洗脱,且梯度变化范围较小的时候,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱才能达到有效分离,分离度大于 1.5,峰对称性达到要求。

综上所述,此方法操作简单、结果测定准确,重复性好,可作为附杞固本膏中 3 个单酯型生物碱的含量测定方法。

参考文献:

- [1] 龚一云,杜光明. 巧用附子治疗急症顽症[J]. 中国民族民间医药,2012(23):103-104.
- [2] 陈苏生. 浅谈附子的作用及其临床应用 [J]. 中医杂志,1979(10):46-48.
- [3] 陈昕. 乌头类中药的研究进展[J]. 时珍国医国药,2002,13(12):758-759.
- [4] 杨姝,金振辉,羊晓东,等. 乌头属植物的化学成分及药理作用研究进展[J]. 云南农业大学学报,2007,22(2):293-295.
- [5] 许廷生,梁秀兰. 附子的毒副作用分析及对策[J]. 中国药

师,2003,6(8):518.

- [6] 赵镭,唐星. 附子总生物碱的提取纯化工艺[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(7):433-437.
- [7] 汪云伟,钟恋,杨诗龙,等. 不同处理方式对鲜附子 6 种指标成分的影响 [J]. 时珍国医国药,2015,26(5):1115-1117.
- [8] 刘芳,于向红,李飞,等. HPLC 测定附子及其炮制品中 3 种双酯型生物碱的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(14):1160-1162.
- [9] 方岚,胡旭佳. 高效液相色谱法测定芪桑益肝丸中大黄素的含量[J]. 云南中医学院学报,2004,27(1):44-45.
- [10] 常锦明,宋清宏,曹烨民,等. HPLC 法测定不同产地及炮制方法的乌头类药材生物碱含量 [J]. 上海中医药杂志,2014,48(7):99-103.
- [11] 何军,祝林,奉建芳. 附子总生物碱含量测定方法比较 [J]. 现代中药研究与实践,2003,17(6):20-21.
- [12] 杨云,王浴铭,赵晓华. 附子中乌头生物碱定量方法的研究[J]. 时珍国医国药,1998,9(4):331-332.
- [13] 杜倩,潘金火,严国俊. 复方川乌止痛贴剂中酯型生物碱及总生物碱的含量测定[J]. 时珍国医国药,2008,19(1):158-160.
- [14] 刘玉兰,刘世坤,裴奇,等. 高效液相色谱法测定附子中 3 组分的含量[J]. 中国药房,2006,17(16):1255-1256.
- [15] 魏玉辉,王晓华,沈明谦,等. 藤药中乌头碱含量测定 HPLC 方法的建立[J]. 中成药,2008,30(1):130-131.
- [16] 国药药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:177-178.

(编辑:徐建平)

Content Determination of Monoester Aconitum Alkaloids in Paste of Fuqi Guben by HPLC

LIU Jia, MEI Shuangxi, YANG Shunli, FENG Liping
(Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China)

ABSTRACT: **Objective** Establishing a HPLC method for the determination of monoester aconitum alkaloids in paste of Fuqi Guben. **Methods** Column Waters XTerra RP18 5mm (4.6mm×250mm); column temperature was 30℃; Acetonitrile-tetrahydrofuran (25:15) as the mobile phase A, 0.1mol/L ammonium acetate solution (1000mL containing glacial acetic acid per 0.5mL) as the mobile phase B, gradient elution, flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 254 nm. **Results** Benzoylmesaconine is in the range of 0.045~1.800μg showed a linear relationship, benzoylaconitine is in the range of 0.0425~1.7000μg showed a linear relationship, and benzoylhypaconitine is in the range of 0.0442~1.7680μg showed a linear relationship. Precision, stability, reproducibility are in line with the requirements, the average recovery of this measurement method were 99.89%, 99.22%, 101.12%, RSD was 1.72%, 1.75%, 2.32%(n=6). **Conclusion** The method was so convenient, fast, accurate and no interference that it can be used for quality control of the preparation.

KEY WORDS: monoester aconitum alkaloids; benzoylmesaconine; benzoylaconitine; benzoylhypaconitine; content; HPLC