

一测多评法测定乌头类药材中生物碱

程丽丽, 许妍妍, Nyirimigabo Eric, 李遇伯, 张艳军*

天津中医药大学 中药学院 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 建立一测多评法同时定量测定乌头类药材中6种乌头类生物碱。方法 采用高效液相色谱法同时测定乌头类药材中6种生物碱,以乌头碱为内参物,测定其与次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的相对校正因子,利用乌头碱和相对校正因子对其他5种生物碱成分进行测定,同时利用外标法测定这6种成分,比较两种测定方法的差异,验证一测多评法的可行性和准确性。结果 在一定线性范围内,乌头碱与次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱的相对校正因子分别为0.780、1.008、0.836、0.907、0.987,在不同实验条件下相对校正因子重现性良好,不同乌头类药材中6种生物碱成分含量计算值与实测值间无显著性差异。结论 一测多评法在乌头类药材及制剂质量控制中应用是可行的、准确的。

关键词: 乌头类药材; 相对校正因子; 一测多评; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)04-0528-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.015

Determination of alkaloids with quantitative analysis of multi-components by single marker

CHENG Li-li, XU Yan-yan, Nyirimigabo Eric, LI Yu-bo, ZHANG Yan-jun

Tianjin Key Laboratory of Chinese Chemistry and Analysis, College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for the simultaneous determination of six alkaloids in the herbs of *Aconitum* L. species. **Methods** An HPLC method was established to determine the six alkaloids (aconitine, hyaconitine, mesaconitine, benzoyleaconine, benzoylhyaconine, and benzoylmesaconine). Using aconitine and five relative correction factors (RCFs), the contents of the five other alkaloids in all samples were calculated by their RCFs, which were compared with those determined by the external standard method. The feasibility and accuracy of QAMS method were verified. **Results** Within a certain range, the RCFs of hyaconitine, mesaconitine, benzoyleaconine, benzoylhyaconine, and benzoylmesaconine to aconitine were 0.780, 1.008, 0.836, 0.907, and 0.987, respectively, with the good repeatability in different experimental conditions. There was no significant difference between the QAMS method and the external standard method. **Conclusion** The QAMS method is feasible and accurate for the quality control of *Aconitum* L. species and their preparations.

Key words: *Aconitum* L. species; relative correction factors; quantitative analysis of multi-components by single marker; HPLC

乌头类药材是我国广泛使用的有毒药材,《中国药典》2010年版^[1]通过检测双酯型生物碱乌头碱、次乌头碱、新乌头碱以及单酯型生物碱苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱来实现乌头类药材多指标成分的测定,以保证此类药材质量。然而这些对照品毒性较大且价格昂贵,因此,

探索一种简单易行的方法来解决对照品缺乏和检测成本昂贵等问题,对乌头类药材质量控制具有重要意义。近年来,王智民等^[2]提出了一测多评(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)的质量评价方法,并在木通^[2]、重楼^[3]、黄连^[4]、大黄^[5]、丹参^[6]、穿心莲^[7]等药材以及速效救心丸^[8]、

收稿日期: 2013-04-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(2011CB505300, 2011CB505302)

作者简介: 程丽丽(1987—),女,硕士研究生,研究方向为中药分析及药动学研究。Tel: 13821515036 E-mail: cll868@126.com

*通信作者 张艳军,博士生导师,主要从事中药药理学方面的研究。Tel: (022) 23051053 E-mail: zyjsunye@163.com

银黄制剂^[9]、元胡止痛胶囊^[10]等复方制剂中得到应用。本实验拟以乌头碱为内参物,采用一测多评法建立乌头类药材中乌头碱与次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的相对校正因子,通过方法学、系统耐用性考察以及一测多评法与外标法实测值比较,验证一测多评法对乌头类药材中 6 种生物碱类成分测定的可行性。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 液相色谱仪, Waters e2695 Alliance 液相色谱仪, Shimadzu LC-20AT 液相色谱仪, Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), Welch Xtimate™ C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), Sartorius BT 125D 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), HH—S₈ 数显恒温水浴锅 (金坛市盛蓝仪器制造有限公司), PHSJ—3F 实验室 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试药

生川乌、制川乌、附子、黑顺片、生草乌药材均由天津中医药大学张鲁博士鉴定、提供,生川乌 (川乌-1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#])、生附子 (附子-1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#]、6[#]、7[#])、制川乌 (制川乌-1[#])、黑顺片 (黑顺片-1[#]) 以及生草乌 (草乌-1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#]) 产地均为四川省,生草乌 (草乌-6[#]) 产地为云南省。乌头碱 (批号 110720-200410, aconitine, AC)、次乌头碱 (批号 110798-200805, hyaconitine, HA)、新乌头碱 (批号 110799-200505, mesaconitine, MA)、苯甲酰乌头原碱 (批号 110797-200405, benzoyleaconine, BAC)、苯甲酰次乌头原碱 (批号 111796-201002, benzoylhyaconine, BHA)、苯甲酰新乌头原碱 (批号 11795-200901, benzoylmesaconine, BMA) 对照品均购自中国食品药品检定研究院,经 HPLC 面积归一化法测得质量分数均≥98%。乙腈为色谱纯 (美国 Sigma 公司),氨水、碳酸氢铵、95%乙醇均为分析纯 (天津市化学试剂批发公司),娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 10 mmol/L NH₄HCO₃ 水溶液 (氨

水调 pH 10.0) (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~15 min, 30% B; 15~40 min, 30%~55% B; 40~55 min, 55%~85% B; 55~60 min, 85%~30% B; 60~70 min, 30% B; 检测波长: 232 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。理论塔板数按乌头碱计不小于 5 000。见图 1。

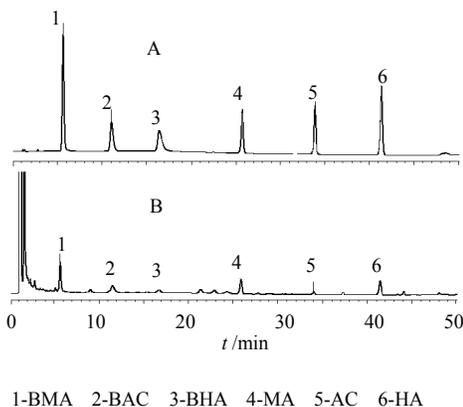


图 1 对照品 (A) 及生川乌 (川乌-3[#]) 供试液 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed substances (A) and *Aconiti Radix* sample No. 3 (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称定乌头碱 3.01 mg、次乌头碱 3.05 mg、新乌头碱 2.02 mg、苯甲酰乌头原碱 3.02 mg、苯甲酰次乌头原碱 3.01 mg、苯甲酰新乌头原碱 3.01 mg, 各置于 2 mL 量瓶中, 用乙腈溶解稀释至刻度, 制得各单一对照品溶液。分别量取上述单一对照品溶液 100、200、150、100、100、200 μL, 乙腈稀释制成系列质量浓度混合对照品溶液, 置于 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取 5.0 g 样品粉末 (过三号筛), 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 倍量 70%乙醇浸泡 30 min 后, 水浴回流提取 15 min, 滤过, 滤渣加入 8 倍量 70%乙醇后再次回流提取 15 min, 滤过, 合并两次滤液, 定容至 100 mL, 摇匀, 取适量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 将混合对照品溶液, 分别进样 10 μL, 以 6 种生物碱的质量浓度对峰面积作回归计算, 得回归方程及线性范围, 见表 1。结果表明乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱在各自相应的质量浓度范围内均呈现出良好的线性关系。

表 1 6 种乌头类生物碱的标准曲线回归方程
Table 1 Regression equations of calibration curves of six alkaloids

化合物	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
AC	$Y=12.911X+1.0477$	1.000 0	0.502~150.5
HA	$Y=10.182X+2.8501$	1.000 0	1.017~305.0
MA	$Y=13.203X+1.2068$	1.000 0	0.505~151.5
BAC	$Y=11.074X-2.0975$	0.999 9	0.503~151.0
BHA	$Y=11.948X-1.6439$	0.999 9	0.502~150.5
BMA	$Y=13.068X-4.5477$	1.000 0	1.003~301.0

2.4.2 检测限和定量限的测定 将混合对照品溶液逐级稀释,依次进行液相分析,按照信噪比法($S/N \geq 3$)进行检测限测定,计算得乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的检测限为 0.63、0.64、0.64、0.32、0.63、0.63 ng。同上法按照信噪比法($S/N \geq 10$)进行定量限测定,计算得乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的定量限为 1.26、2.54、1.27、1.26、1.26、2.51 ng。

2.4.3 精密度试验 取同一份混合对照品溶液于同 1 d 和 3 d 内重复进样,每天进样 5 次,测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱峰面积,结果显示,各成分峰面积日内精密度的 RSD 值分别为 0.9%、0.3%、0.3%、0.5%、1.0%、0.3%,日间精密度的 RSD 值分别为 1.9%、1.9%、2.0%、0.9%、0.9%、1.4%。取生川乌(川乌-3[#])供试品溶液,连续进样 6 次,测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱峰面积,计算得 RSD 值分别为 0.8%、0.2%、0.5%、0.9%、1.2%、0.8%。结果均表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 同一批药材(川乌-3[#])6 份,制备供试品溶液,依次进样分析,测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱峰面积,计算得各成分质量分数的 RSD 值分别为 1.2%、0.7%、1.1%、1.6%、2.0%、1.6%。表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一份药材(川乌-3[#])供试品溶液,分别于样品制备后 0、2、4、6、12、24 h 进样分析,测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯

甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱峰面积,计算各成分峰面积的 RSD 值分别为 1.6%、0.2%、0.6%、1.9%、1.1%、1.4%,表明处理后的样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的药材粉末(川乌-3[#])6 份,各 5.0 g,按照药材已知量的 1 倍加入对照品,制备供试品溶液,在上述色谱条件下进行测定,计算得乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱加样回收率分别为 96.7%、96.8%、98.9%、103.8%、100.9%、101.0%,RSD 值分别为 1.8%、0.6%、0.3%、0.4%、0.9%、0.3%。

2.5 *f* 值的确定及其测定方法的耐用性考察

2.5.1 *f* 值的确定 在线性范围内成分的量(质量或浓度)与检测器响应呈正比,可得响应因子 $f=W/A^{[2,11]}$ 。其中 W 为组分质量浓度, A 为组分峰面积。取绘制标准曲线的系列质量浓度对照品溶液,进样测定,以乌头碱为内参物,根据相对校正因子计算公式(1)^[11]可得出乌头碱对次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱的相对校正因子,经计算, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 分别为 0.780、1.008、0.836、0.907、0.987。

$$f_{km} = f_k / f_m = (W_k \times A_m) / (W_m \times A_k) \quad (1)$$

A_k 为内参物峰面积, W_k 为内参物质量浓度, A_m 为其他组分 m 的峰面积, W_m 为其他组分 m 的质量浓度

2.5.2 测定波长对 *f* 值测定的影响 在同一台高效液相色谱仪上分别于 228、230、232、234、236 nm 波长下测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱的峰面积,计算 *f* 值。结果表明在同一台高效液相色谱仪上,测定波长在规定变化 ± 4 nm 时,对 *f* 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.6%、0.5%、0.3%、0.5%、0.5%。

2.5.3 体积流量对 *f* 值测定的影响 在同一台高效液相色谱仪上,分别设定体积流量为 0.98、1.00、1.02 mL/min,测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的峰面积,计算 *f* 值。结果表明在同一台高效液相色谱仪上,体积流量在规定变化 ± 0.02 mL/min 时,对 *f* 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.2%、0.1%、0.1%、0.1%、0.2%。

进一步测定在体积流量 0.96、1.04 mL/min 时测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的峰面积, 计算 f 值。结果表明在同一台高效液相色谱仪上, 体积流量在规定变化 ± 0.04 mL/min 时, 对 f 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.3%、0.3%、0.6%、0.1%、0.2%。

2.5.4 仪器柱温对 f 值测定的影响 在同一台高效液相色谱仪上, 分别设定柱温箱温度为 29.9、30、30.1 $^{\circ}\text{C}$, 测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的峰面积, 计算 f 值。结果表明在同一台高效液相色谱仪上, 测定柱温箱温度在变化 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$ 时, 对 f 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.2%、0.5%、0.3%、0.2%、0.3%。

进一步考察 27、33 $^{\circ}\text{C}$, 测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的峰面积, 计算 f 值。结果表明在同一台高效液相色谱仪上, 测定柱温箱温度在变化 ± 3 $^{\circ}\text{C}$ 时, 对 f 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.3%、0.7%、0.3%、1.0、0.3%。

2.5.5 流动相组成比例对 f 值测定的影响 在同一台高效液相色谱仪上, 考察有机相各个梯度比例变化 ± 2 , 测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的峰面积, 计算 f 值。结果表明在同一台高效液相色谱仪上, 测定有机相各个梯度比例变化 ± 2 时, 对 f 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.7%、0.3%、0.5%、0.7%、0.5%。

2.5.6 流动相 pH 值对 f 值测定的影响 在同一台高效液相色谱仪上, 考察分别用 pH 9.9、10.0、10.1 的 NH_4HCO_3 水溶液, 测定乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的峰面积, 计算 f 值。结果表明在同一台高效液相色谱仪上, 测定流动相 pH 值变化 ± 0.1 单位时, 对 f 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.1%、0.1%、0.1%、0.1%、0.1%。

2.5.7 不同高效液相色谱仪对 f 值测定的影响 利

用 Agilent Extend- C_{18} 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 分别在 Agilent 1200、Waters e2695 Alliance 和 Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪上进行测定, 结果表明高效液相色谱仪的变化对 f 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.4%、0.3%、0.3%、0.8%、0.4%。

2.5.8 不同色谱柱对 f 值测定的影响 在 Agilent 1200 高效液相色谱仪上, 分别用 Agilent Extend- C_{18} 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Gemini C_{18} 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 和 Welch XtimateTM C_{18} 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 进行测定, 结果表明色谱柱的变化对 f 值影响不大, $f_{AC/HA}$ 、 $f_{AC/MA}$ 、 $f_{AC/BAC}$ 、 $f_{AC/BHA}$ 、 $f_{AC/BMA}$ 的 RSD 值分别为 0.8%、0.7%、0.2%、0.4%、0.4%。

2.6 待测成分峰的定位

一测多评法是通过测定一个成分来实现多个成分的同时测定^[2], 因此, 待测成分峰的准确定位是保证一测多评法能够合理应用的前提, 一般采用常规的保留时间差或相对保留值等参数结合色谱图整体特征, 以及每个峰的紫外吸收特征来定位其他待测成分色谱峰。本实验分别考察了上述两种方法在不同仪器和不同色谱柱上的重现性。结果表明, 相对保留值法对于双酯型生物碱能够准确定位, 但对单酯型生物碱则有较大偏差, $\text{RSD} > 5\%$, 不太适合作为待测成分峰定位的依据, 而保留时间差法对于双酯型生物碱、单酯型生物碱的偏差相对较小, 因此, 采用保留时间差法对待测成分峰进行定位较为可行。见表 2。

王龙星等^[12]通过色谱热力学分析发现, 只要 HPLC 中所使用的 C_{18} 柱的填料类型相同, 无论是等度分离还是梯度分离, 在相同的分析条件下, 即使采用不同的液相色谱系统、不同的色谱柱, 组分的保留时间也存在简单的线性关系。何兵等^[13]采用 5 个对照品做内标并计算其线性方程, 认为假设 5 个点均落在线性方程上, 那么用 2 个点的结果与 5 个点基本一致。本实验采用乌头碱和苯甲酰新乌头原碱两点校正, 推导其校正方程, 计算各待测成分的理论保留时间, 考察不同仪器、不同色谱柱之间的差异, 结果表明次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱保留时间的 RSD 值分别为 4.7%、3.5%、4.2%、4.3%, 该方法用于乌头类药材中乌头生物碱类成分的定位较为可行。

表 2 保留时间差法和相对保留值法对待测成分色谱峰的定位

Table 2 Positioning of analyte peaks by retention time difference method and relative retention value method

色谱柱	保留时间差/min					相对保留值				
	$r_{HA/AC}$	$r_{MA/AC}$	$r_{BAC/AC}$	$r_{BHA/AC}$	$r_{BMA/AC}$	$r_{HA/AC}$	$r_{MA/AC}$	$r_{BAC/AC}$	$r_{BHA/AC}$	$r_{BMA/AC}$
Agilent 1200 色谱仪										
Agilent Extend-C ₁₈	7.429	-8.810	-22.880	-17.520	-28.267	1.219	0.759	0.325	0.483	0.166
Phenomenex Gemini C ₁₈	7.170	-7.545	-21.816	-16.851	-28.702	1.196	0.793	0.403	0.539	0.214
Welch Xtimate™ C ₁₈	6.888	-7.399	-23.499	-18.544	-29.105	1.187	0.799	0.362	0.496	0.209
Waters e2695 Alliance 色谱仪										
Agilent Extend-C ₁₈	7.193	-8.169	-22.276	-17.221	-27.582	1.217	0.753	0.328	0.480	0.167
Phenomenex Gemini C ₁₈	6.916	-7.521	-21.557	-16.034	-28.138	1.193	0.790	0.399	0.553	0.216
Welch Xtimate™ C ₁₈	6.738	-7.401	-23.220	-18.387	-28.666	1.187	0.795	0.356	0.490	0.206
Shimadzu LC-20AT 色谱仪										
Agilent Extend-C ₁₈	7.888	-8.280	-23.644	-17.559	-29.577	1.224	0.765	0.328	0.501	0.160
Phenomenex Gemini C ₁₈	6.816	-7.880	-23.133	-17.040	-30.029	1.180	0.791	0.388	0.549	0.205
Welch Xtimate™ C ₁₈	7.511	-7.885	-24.327	-18.463	-29.834	1.202	0.788	0.346	0.504	0.198
Mean	7.712	-7.807	-22.928	-17.513	-28.878	1.201	0.782	0.359	0.511	0.193
RSD/%	5.0	4.2	3.7	4.5	2.7	1.3	2.1	5.3	8.1	11.0

“-”表示该成分出峰时间早于内参物出峰时间

“-” means retention time of the analyte was earlier than that of the internal standard

2.7 与标准曲线法测定结果的比较

取乌头类药材 10 批, 制备供试品溶液, 进样 10 μL 进行 HPLC 分析。首先采用外标法计算 6 种待测成分的含量, 然后用一测多评法计算 6 种待测

成分的含量, 将按两种方法测定的结果进行比较, 见表 3。结果表明两种方法测定的结果的差异无显著性, 一测多评法在乌头类药材的多指标成分质量评价中应用是可行的。

表 3 一测多评法与标准曲线法同步测定乌头类药材中 6 种生物碱类成分的含量 (n=3, μg·mL⁻¹)

Table 3 Determination of six alkaloids in *Aconitum* L. species by QAMS and external standard methods (n=3, μg·mL⁻¹)

药材	AC		HA		MA		BAC		BHA		BMA					
	外标	外标	一测多评	RSD /%	外标	一测多评	RSD /%	外标	一测多评	RSD /%	外标	一测多评	RSD /%			
川乌-1 [#]	2.72	14.33	14.34	0.1	14.54	14.39	0.5	-	-	-	5.82	5.63	1.7	18.81	18.38	1.1
川乌-2 [#]	2.54	14.51	14.49	0.1	15.13	14.94	0.6	2.87	2.67	3.7	5.98	5.78	1.7	18.64	18.18	1.3
川乌-3 [#]	2.79	19.89	19.81	0.2	14.32	14.18	0.5	16.83	16.59	0.7	5.65	5.46	1.7	24.52	24.09	0.9
草乌-1 [#]	6.74	6.91	7.19	2.0	24.27	24.40	0.3	4.73	4.61	1.4	5.68	5.58	0.8	18.28	18.17	0.3
草乌-2 [#]	133.06	-	-	-	-	-	-	66.39	67.88	1.1	109.86	111.88	0.9	-	-	-
草乌-3 [#]	148.32	-	-	-	1.27	1.35	3.2	57.42	58.68	1.1	90.15	91.79	0.9	4.24	3.98	3.1
黑顺片-1 [#]	0.95	1.60	1.75	4.5	-	-	-	-	-	-	4.66	4.25	4.6	6.58	6.21	3.0
附子-1 [#]	2.82	13.40	13.45	0.2	12.45	12.34	0.4	5.80	5.60	1.8	7.09	6.90	1.4	29.77	29.32	0.8
附子-2 [#]	2.33	27.19	26.84	0.7	4.55	4.53	0.3	7.56	7.31	1.7	2.12	1.96	4.1	12.40	11.95	1.9
附子-3 [#]	2.64	34.07	33.70	0.6	11.70	11.59	0.5	3.52	3.31	3.0	11.23	10.98	1.1	14.39	13.97	1.5

“-”表示未检出或低于定量限

“-” means undetected or below quantification limit

2.8 再验证实验

另取乌头类药材 10 批, 制备供试品溶液, 进样 10 μL 进行 HPLC 分析。首先按照所建立的一测多评法进行测定, 得到待测成分的含量, 然后再以外

标法对其含量进行反证, 进一步验证一测多评法的可行性和可重复性^[11], 见表 4。结果表明, 两种方法测得的含量结果的差异无显著性, 表明一测多评法测得的结果可重复性好。

表 4 一测多评法测定乌头类药材中 6 种生物碱类成分的再验证 ($n=3, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Table 4 Revalidation of QAMS for determination of six alkaloids in *Aconitum L. species* ($n=3, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

药材	AC		HA		MA			BAC			BHA			BMA		
	外标	外标	一测多评	RSD /%	外标	一测多评	RSD /%	外标	一测多评	RSD /%	外标	一测多评	RSD /%	外标	一测多评	RSD /%
川乌-4 [#]	3.85	14.67	14.80	0.5	15.51	15.48	0.1	12.54	12.41	3.7	4.16	4.02	1.7	20.53	20.27	0.6
川乌-5 [#]	4.20	17.64	17.78	0.4	20.98	20.96	0.1	1.95	1.78	4.8	6.31	6.18	1.1	15.63	15.38	0.8
制川乌-1 [#]	0.78	2.37	2.43	1.2	-	-	-	5.53	5.15	3.6	5.11	4.64	4.8	40.91	37.97	3.7
草乌-4 [#]	55.63	-	-	-	2.05	2.14	2.2	46.50	47.44	1.0	38.96	39.55	0.8	-	-	-
草乌-5 [#]	17.32	58.11	58.76	0.6	120.03	131.31	0.5	30.77	31.23	0.7	37.13	37.57	0.6	73.21	74.37	0.8
草乌-6 [#]	39.72	-	-	-	1.33	1.42	3.0	2.82	2.70	2.3	-	-	-	4.68	4.43	2.7
附子-4 [#]	4.10	32.72	32.72	0	7.88	7.91	0.2	6.47	6.32	1.2	3.28	3.14	2.1	21.00	20.77	0.6
附子-5 [#]	4.11	4.79	5.03	2.4	16.10	16.08	0.1	6.30	6.14	1.2	4.40	4.27	1.6	21.95	21.72	0.5
附子-6 [#]	3.69	5.36	5.58	2.0	17.08	16.03	0.2	5.44	5.27	1.6	5.50	5.35	1.4	23.90	23.64	0.6
附子-7 [#]	0.93	27.18	25.53	3.1	5.64	5.33	2.9	5.61	5.12	4.6	7.28	6.70	4.1	29.29	27.30	3.5

“-”表示未检出或低于定量限

“-” means undetected or below quantification limit

结果表明, 不同乌头类药材中生物碱类成分含量有较大差异, 反映了药材质量的参差不齐。共测定了 6 批生草乌药材, 在产地均为四川的 5 批药材中, 双酯型生物碱、单酯型生物碱含量差异尤为显著。因此, 对乌头类药材进行有效的质量控制非常重要。

3 讨论

本实验中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱均为有毒对照品, 有严格的审批、购买及使用程序, 且价格昂贵, 利用一测多评法测定其含量, 可有效节约对照品用量, 降低检测成本, 提高工作效率。

乌头类药材中主要成分为乌头类生物碱, 包括双酯型生物碱乌头碱、次乌头碱、新乌头碱和单酯型生物碱苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱等, 考虑到双酯型生物碱毒性较单酯型生物碱大, 但单酯型生物碱价格较双酯型生物碱昂贵, 且分离制备难度大, 在安全范围内选择双酯型生物碱作为内参物, 课题组前期实验结果表明, 在现有实验条件下, 某些乌头类药材中主要含乌头

碱, 次乌头碱、新乌头碱则未检测到或低于定量限, 因此, 选择双酯型生物碱乌头碱作为内参物。

实验考察了 5 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 水溶液 (含 0.1% 甲酸) - 乙腈 (含 0.1% 甲酸)、10 mmol/L NH_4HCO_3 水溶液 (氨水调 pH 10.0) - 乙腈等流动相, 结果表明在流动相为 5 mmol/L $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 水溶液 (含 0.1% 甲酸) - 乙腈 (含 0.1% 甲酸) 时, 各色谱峰拖尾严重, 且各峰之间分离效果较差, 而当流动相为 10 mmol/L NH_4HCO_3 水溶液 (氨水调 pH 10.0) - 乙腈时, 各色谱峰峰形良好且能得到良好的区分。因此, 选择 10 mmol/L NH_4HCO_3 水溶液 (氨水调 pH 10.0) - 乙腈洗脱系统进行进一步试验。

实验以初始流动相为溶剂在 210~400 nm 进行全波长扫描 6 种乌头类生物碱, 测得 6 种生物碱最大吸收波长均在 232 nm, 且 232 nm 后吸收曲线陡降, 因此, 选择 232 nm 为检测波长。

何兵等^[13]针对校正因子的计算问题提出了斜率校正法和定量因子校正法, 两种方法均以标准曲线 $Y=aX+b$ 中 $a/b > 100$ 为前提, 本实验计算的 6 种成分的标准曲线中 a/b 均小于 100, 因此本实验仍采用常规多点校正法计算相对校正因子。

待测成分峰的准确定位是保证一测多评法能够合理应用的前提,本实验采用常规的保留时间差法、相对保留值法以及一种新的定位方法共同探讨一测多评法在乌头类药材质量控制应用中的可行性。结果表明相对保留值法不太适合作为待测成分峰定位的依据,其他两种方法均可作为待测成分峰定位的依据,而保留时间差法计算相对简单,以保留时间差法作为待测成分峰定位的依据较为合适。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. 一测多评法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [3] 马超一. 血府逐瘀胶囊的活性物质基础和重楼皂苷的定量分析 [D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [4] 匡艳辉, 朱晶晶, 王智民, 等. 一测多评法测定黄连中小檫碱、巴马汀、黄连碱、表小檫碱、药根碱含量 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(5): 390-394.
- [5] Hou J J, Wu W Y, Da J, *et al.* Ruggedness and robustness of conversion factors in method of simultaneous determination of multi-components with single reference standard [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(33): 5618-5627.
- [6] Gao X Y, Jiang Y, Lu J Q, *et al.* One single standard substance for the determination of multiple anthraquinone derivatives in rhubarb using high-performance liquid chromatography-diode array detection [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2118-2123.
- [7] 林青, 匡艳辉, 黄琳, 等. 一测多评法测定穿心莲及其制剂中内酯类成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2406-2411.
- [8] 付滢舟, 冯有龙, 曹玲, 等. 一测多评法测定速效救心丸中冰片的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 775-778.
- [9] 杨菲, 冯伟红, 王智民, 等. 一测多评法测定银黄制剂中4种黄酮类成分含量 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(12): 984-989.
- [10] 杨芳, 万丽, 杨荣平, 等. 一测多评法测定元胡止痛胶囊中欧前胡素、异欧前胡素和延胡索乙素的含量 [J]. 中国药房, 2012, 23(32): 3046-3049.
- [11] 王智民, 钱忠直, 张启伟. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
- [12] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼. 一种提高色谱指纹谱保留时间重现性的新方法 [J]. 分析化学, 2003, 31(10): 1232-1236.
- [13] 何兵, 杨世燕, 张燕. 一测多评中待测成分校正和定位的新方法研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1653-1659.