

【 评价方法学 】

一测多评法测定华佗豆 4 种生物碱

陈 超¹, 周福军², 单 淇², 华 洁², 王 淼², 侯文彬^{2*}

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘 要: 目的 建立一测多评法检测华佗豆药材中 4 种生物碱的量。方法 以华佗豆碱乙为内标, 建立华佗豆碱甲、碱丙、碱丁的相对校正因子, 在考察相对校正因子的重现性后, 进一步采用外标法与一测多评法所计算出的成分含量进行比较。结果 6 批华佗豆药材中, 各成分采用相对因子计算的量与采用外标法计算的结果无显著差异。结论 一测多评法操作简单、结果准确、可靠, 可用于华佗豆 4 种生物碱的测定。

关键词: 一测多评; 华佗豆; 生物碱; HPLC; 华佗豆碱甲; 华佗豆碱乙; 华佗豆碱丙; 华佗豆碱丁

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2017) 07 - 0938 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.011

Quantitative analysis on contents of four alkaloid components in *Calonyction muricatum* by QAMS

CHEN Chao¹, ZHOU Fu-jun², SHAN Qi², HUA Jie², WANG Miao², HOU Wen-bin²

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To develop a method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for simultaneously determining four compounds in *Calonyction muricatum*. **Method** An HPLC method was developed as QAMS to determine ipalbidine, ipalbidinium, and ipalbinium in *C. muricatum*, using ipalbine as the internal reference substance, the relative correction factor (RCF) of the three components was determined by HPLC with good reproducibility. Their contents in six batches of samples were determined by both external standard method and QAMS. **Result** No significant differences were found in the quantitative results of three alkaloid compounds in six batches of *C. muricatum* determined by external standard method and QAMS. **Conclusion** It is feasible and suitable to evaluate the quality of curcuma aromatic by QAMS.

Key words: quantitative analysis of multi-component with a single-marker; *Calonyction muricatum* (Linn) G. Don.; alkaloid; HPLC; ipalbidine; ipalbine; ipalbidinium; ipalbinium

华佗豆, 又名天茄子、天茄, 是旋花科植物丁香茄 *Calonyction muricatum* (Linn) G. Don. 的种子^[1]。现代研究结果表明^[2], 华佗豆含有生物碱、挥发油、黄酮类、酚类、糖类、苷类等化学成分, 主要成分为生物碱类, 如华佗豆碱甲、碱乙、碱丙、碱丁等。药理研究表明^[3-4]华佗豆碱甲 (ipalbidine) 是作用于中枢神经系统的非阿片类镇痛剂, 具抗炎、解热等

作用。Mafel 等^[5]通过对比不同碱类镇痛活性发现, 华佗豆碱甲、华佗豆碱丙具有镇痛活性高、药效持续时间长的特点。此外, 王英明等^[6]通过预试验, 推测华佗豆内生物碱类成分可能具有抑菌活性。文献资料表明华佗豆的生物碱类成分具解热、镇痛、抗炎、抑菌等多种生物活性。华佗豆为地方药, 对其研究甚少, 国内仅在化学成分方面有所研究, 限

收稿日期: 2017-02-24

作者简介: 陈 超, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析与检验研究。Tel: 18649130861 E-mail: ccv9090@163.com

*通信作者 侯文彬, 男, 研究员, 主要从事中药新药的研究与开发。Tel: (022)23006903 E-mail: houwb@tjpr.com

制了药物的开发利用。本文采用一测多评法对华佗豆中的有效成分4种生物碱进行含量研究,对该药的研究开发具有重要意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent-1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent-1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 色谱柱: Diamonsil Plus C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 北京迪马科技); Promosil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 博纳艾杰尔科技有限公司); ReproSil-Pur Basic C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 德国迈克公司); BK-240A 型超声波清洗机(巴克超声波科技集团有限公司)。

1.2 材料

华佗豆(购自广西,且经天津药物研究院中药部侯文彬研究员鉴定为旋花科植物丁香茄的干燥种子); 甲醇为色谱纯,水为超纯水,磷酸为色谱纯,四丁基氢氧化铵 25%为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 采用 Diamonsil Plus C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,检测波长 234 nm,

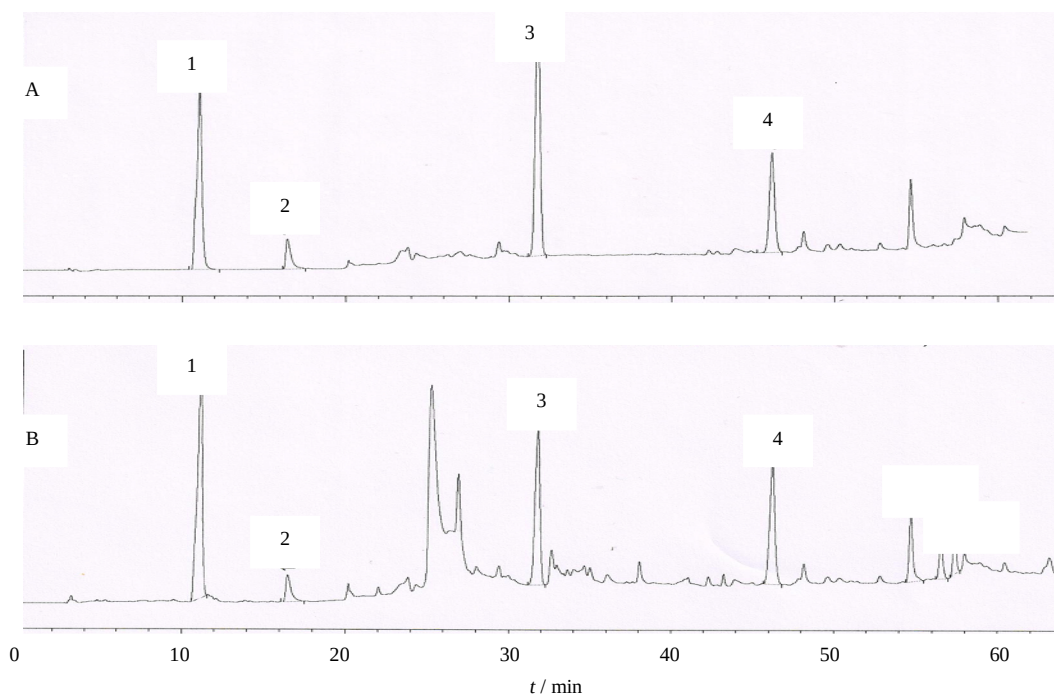
柱温 35℃,进样量 5 μL,体积流量 1.0 mL/min,流动相为甲醇(A)-0.012 6 mol/L 磷酸氢二钠+0.21% 四丁基氢氧化铵 25%加水至 780 mL 用 10%磷酸(B)调 pH=7,梯度洗脱(0~60 min, 0%~65% A; 60~60.1 min, 65%~0%A; 60.1~75 min, 0%A)。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取华佗豆碱甲、华佗豆碱乙、华佗豆碱丙、华佗豆碱丁适量,精密称定,加甲醇溶解,分别配置成浓度为 21.6、60.6、21.1、61.8 mg/mL 的混合对照品溶液,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称定华佗豆粉末(过 60 目筛) 0.2 g 至 25 mL 量瓶,加甲醇适量,超声处理 60 min,放至室温,定容至刻度,滤过备用。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 2、5、10、15、20、25 μL 进样测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,并进行线性回归分析,结果见表 1。结果可见 4 种对照品的峰面积与相对应的进样量呈良好线性关系。

2.1.5 校正因子的计算 取 2.1.2 项下的混合对照品溶液,进样 2、5、10、15、20、25 μL 测定,以华佗豆碱乙为内标,计算华佗豆碱甲、华佗豆碱丙、华佗豆碱丁的相对校正因子。结果见表 2。



1-华佗豆碱丁 2-华佗豆碱丙 3-华佗豆碱乙 4-华佗豆碱甲

1-ipalbinium; 2-ipalbidinium; 3-ipalbine; 4-ipalbidine

图1 混合对照品(A)和华佗豆样品(B)的HPLC色谱图

Fig.1 HPLC of references (A) and sample of *C. muricatum* (B)

表 1 4 种对照品的线性关系考察

Table 1 Results of linear relationship

成分	回归方程	R^2	线性范围/ μg
华佗豆碱甲	$Y = 2\,084.782\,4x - 8.968\,4$	0.999 6	0.043 2~0.540 0
华佗豆碱乙	$Y = 1\,763.770\,3x - 21.667\,5$	0.999 7	0.121 2~1.515 0
华佗豆碱丙	$Y = 596.069\,7x - 0.937\,4$	0.999 4	0.042 2~0.527 5
华佗豆碱丁	$Y = 1\,245.401\,3x + 7.877\,2$	0.999 3	0.123 6~1.545 0

表 2 不同成分的相对校正因子

Table 2 RCFs in different components

进样体积/ μL	$F_{\text{碱甲/碱乙}}$	$F_{\text{碱丙/碱乙}}$	$F_{\text{碱丁/碱乙}}$
2	0.851 6	2.840 7	1.305 8
5	0.833 3	2.813 8	1.320 7
10	0.848 8	2.939 8	1.372 9
15	0.846 4	2.986 9	1.371 1
20	0.849 5	2.864 5	1.381 7
25	0.843 4	2.973 3	1.413 6
平均值	0.845 5	2.903 2	1.361 0
RSD%	0.71	2.30	2.70

2.1.6 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL ，连续进样 6 次，准确记录 4 种成分的峰面积，结果显示峰面积的 RSD 分别为 1.87%、1.14%、1.58%、1.32%，仪器精密度较好。

2.1.7 稳定性试验 精密称取华佗豆药材制备的供试品溶液 10 μL ，分别于制备后的 0、2、4、6、12、16、24 h 进样，记录峰面积，结果显示其峰面积的 RSD 分别为 1.76%、2.09%、2.31%、1.58%，供试品溶液具有较好的稳定性。

2.1.8 重复性试验 精密称取华佗豆粉末约 0.2 g，6 份，并按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液，进样分析，结果可见华佗豆碱甲、碱乙、碱丙、碱丁的平均质量分数为 0.94、7.75、1.85、11.18 mg/g，其 RSD 分别为 1.19%、1.87%、1.96%、2.34%，表明本法重复性较好。

2.1.9 加样回收率 精密称取华佗豆粉 9 份，每份约 0.1 g，置 25 mL 量瓶中，精密加入对照品溶液（添加对照品量约相当于半量的 80%、100%和 120%）于上述量瓶中，再分别加甲醇至 25 mL 于瓶中，依“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液。分别取对照品溶液和供试品溶液，注入液相色谱仪进行测定，计算，结果显示华佗豆碱甲、碱乙、碱丙、碱丁的平均回收率为 99.1%、98.1%、99.3%、96.2%，RSD

分别为 1.31%、1.57%、2.41%、1.73%。

2.2 校正因子重现性考察

2.2.1 不同仪器对校正因子的影响 分别采用 Agilent 1260、Agilent 1100 进行采样检测，色谱柱为 Diamonsil Plus C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm)，进样量分别为 2、5、10、15、20、25 μL 。测定结果详见表 3。由分析结果可见，不同色谱仪所得的相对校正因子无明显差异。

表 3 不同色谱仪对相对校正因子的影响

Table 3 RCFs in different instruments

仪 器	$F_{\text{碱甲/碱乙}}$	$F_{\text{碱丙/碱乙}}$	$F_{\text{碱丁/碱乙}}$
Agilent 1260	0.857 2	2.901 6	1.362 7
Agilent 1100	0.845 2	2.903 4	1.360 1
平均值	0.851 2	2.902 5	1.361 8

2.2.2 不同色谱柱对校正因子的影响 选取 Agilent 1260 色谱仪，分别采用色谱柱：Diamonsil Plus C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；Promosil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)；ReproSil-Pur Basic C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 进行采样检测，进样量分别为 2、5、10、15、20、25 μL 。测定结果详见表 4。由分析结果可见，不同色谱柱所得的相对校正因子无明显差异。

表 4 不同色谱柱对相对校正因子的影响

Table 4 RCFs in different columns

色 谱 柱	$F_{\text{碱甲/碱乙}}$	$F_{\text{碱丙/碱乙}}$	$F_{\text{碱丁/碱乙}}$
Diamonsil Plus C18(2)	0.840 1	2.901 7	1.360 2
Agela Promosil C18	0.837 9	2.901 1	1.363 9
ReproSil-Pur Basic C18	0.848 6	2.916 9	1.369 4
平均值	0.842 2	2.906 6	1.364 5
RSD%	0.55	0.25	0.28

2.2.3 不同实验室对相对校正因子的影响 采用 Agilent 1260 色谱仪和 Diamonsil Plus C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱，分别由 3 组实验人

员和3间实验室对校正因子进行考察。进样量分别为2、5、10、15、20、25 μL 。测定结果见表5。由分析结果可见,不同实验室所得的相对校正因子无明显差异。

2.3 一测多评法与外标法测定结果比较

称取不同批次华佗豆粉末0.2 g,按上述2.1.3供试品溶液的制备方法进行制备,并按上述色谱条件进行测定,进样量为10 μL ,计算华佗豆碱甲、碱乙、碱丙、碱丁的量,并与外标法计算结果进行

比较。见表6。

表5 不同实验室对相对校正因子的影响

实验室	$F_{\text{碱甲/碱乙}}$	$F_{\text{碱丙/碱乙}}$	$F_{\text{碱丁/碱乙}}$
实验室(1)	0.841 2	2.892 7	1.368 4
实验室(2)	0.848 6	2.901 7	1.361 3
实验室(3)	0.837 1	2.911 9	1.364 6
平均值	0.842 3	2.902 1	1.364 8
RSD%	0.56	0.27	0.21

表6 一测多评法与外标法测定结果比较

Table 6 Comparison on results by two methods

药材产地 及批次	华佗豆碱乙/%	华佗豆碱甲/%		华佗豆碱丙/%		华佗豆碱丁/%	
	外标法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法
广西(1)	0.775	0.094	0.097	0.185	0.189	1.118	1.121
广西(2)	0.458	0.332	0.334	0.238	0.242	1.030	1.035
广西(3)	0.640	0.193	0.198	0.119	0.123	1.050	1.055
广西(4)	0.739	0.129	0.132	0.122	0.126	1.089	1.093
广西(5)	0.699	0.113	0.120	0.140	0.144	1.107	1.110
广西(6)	0.619	0.084	0.088	0.119	0.125	1.076	1.079

将上述外标法实测的4种成分含量与一测多评计算的成分含量进行比较,无明显差异,因此可以推断利用一测多评在华佗豆药材中生物碱成分的测定具有适应性和可行性。

3 讨论

3.1 供试品溶液的选择

本实验分别对提取溶剂和提取时间进行了考察。分别采取了甲醇、70%乙醇、乙醇作为提取溶剂,结果显示甲醇的提取效果最好,且各色谱峰峰形也较好,达到基线分离,故选择甲醇作为提取溶剂。在提取时间上,笔者分别进行了90、60、30 min提取时间的考察,结果以提取60 min效果好,故选择提取时间定为60 min。

3.2 耐用性考察

本实验分别在2台高效液相色谱仪和3根不同厂家的色谱柱上,对华佗豆碱甲、碱乙、碱丙、碱丁之间的相对校正因子进行了考察,并对一测多评在华佗豆质量控制的评价方面进行了验证试验,结果表明,相对校正因子具有一定的稳定性和可重复性,而通过一测多评所计算出的成分含量与采用外标法实测的含量之间无明显区别,故表明一测多评适应于华佗豆药材成分含量的计算。

3.3 流动相的考察

本实验曾选用乙腈-磷酸水、甲醇-磷酸水及甲醇-磷酸水-三乙胺等系统进行摸索,但因为测定成分为生物碱,均不能很好的将四种成分分开,后选用甲醇-磷酸盐和四丁基氢氧化铵组成的离子对系统,采用梯度洗脱方式,能将4种成分很好的分离,但由于离子对和梯度洗脱方式,使图谱的基线稍有漂移,但不影响测定结果。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西瑶族习用药材质量标准: 第一卷 [M]. 2013: 50-52.
- [2] 梁洁, 翁翎, 温海成, 等. 壮药华佗豆化学成分初步研究 [J]. 广西中医药大学学报, 2014, 17(1): 62-64.
- [3] 陈秀青, 褚云鸿. 埃必定对人血白细胞呼吸爆发和氧自由基的抑制作用 [J]. 中国药理学通报, 1998, 14(3): 243-244.
- [4] 陈秀青, 褚云鸿, 韩桂珍. 埃必定的抗炎作用 [J]. 中国药理学通报, 1998, 14(2): 167-169.
- [5] Ysrael M C, Nonato M G. Biological activities of chemical constituents from *Ipomoea muricata* (Jacq) Convolvulaceae [J]. Acta Manilana, 1999, 47: 41-52.
- [6] 王英明. 天茄子化学成分研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2000: 20-22.