

HPLC法同时测定附子中6种单酯和双酯型生物碱

孙 兰¹, 周海燕^{1,2}, 赵润怀², 游 畅¹, 高 超¹, 常 琪¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100094; 2. 中国药材集团公司, 北京 102600)

摘要:目的 建立附子中单酯及双酯型生物碱成分的高效液相色谱定量方法。方法 附子干燥粉末用氨水浸润后,以异丙醇-醋酸乙酯(1:1)超声提取30 min,提取液蒸干后溶于0.01%盐酸甲醇中,经微孔滤膜滤过后,20 μ L进行HPLC分析。HPLC分析采用Zorbax Extend-C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),以乙腈-40 mmol/L 醋酸铵缓冲液(氨水调pH 10.0)为流动相进行梯度洗脱,体积流量1.0 mL/min,检测波长230 nm。结果 6种被测生物碱成分,包括乌头碱、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分离良好,各成分质量浓度与峰面积在测定范围内均呈良好的线性关系($r > 0.999$),重现性好,6种成分的RSD($n=5$)均小于1.50%;平均加样回收率($n=5$)为98.20%~100.47%;最低检测限分别为0.26、0.36、0.92、0.30、0.52、0.82 ng。结论 本研究所建立的HPLC方法稳定可靠、简便易行,可用于附子类药材中单酯型和双酯型生物碱的同时定量分析,为附子药材及其炮制品的质量评价和质量控制奠定了基础。

关键词: 附子; 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; HPLC

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)01-0131-04

Determination of six kinds of monoester- and diester-alkaloids in *Radix Aconitii Lateralis Praeparata* by HPLC

SUN Lan¹, ZHOU Hai-yan^{1,2}, ZHAO Run-huai², YOU Chang¹, GAO Chao¹, CHANG Qi¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. China National Group Corporation of Traditional and Herbal Medicine, Beijing 102600, China)

Abstract : Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of monoester- and diester aconitium alkaloids, including aconitine, hyaconitine, mesaconitine, benzoyleaconine, benzoylhypaconine, and benzoylmesaconine in Chinese materia medica, *Radix Aconitii Lateralis Praeparata*. **Methods**

The powdered *Radix Aconitii Lateralis Praeparata* material was alkalized by adding aqueous ammonia, and then extracted with a mixture solvent of isopropanol-ethyl acetate (1:1) by ultrasonic extraction for 30 min. The extract solution was concentrated to dryness and reconstituted in methanol containing 0.01% hydrochloric acid. After filtration, the sample solution was analyzed by HPLC. The assay was performed on a Zorbax Extend-C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), eluted with a mobile phase consisted of acetonitrile and 40 mmol/L ammonium acetate (pH value 10.0, adjusted with aqueous ammonia) and gradient elution at a flow rate of 1 mL/min. The eluent was monitored by a UV detector at 250 nm. **Results** Excellent chromatographic separation was achieved for six studied alkaloids with good linearity ($r > 0.999$) over the studied concentration ranges. RSD ($n=5$) were less than 1.50% and extraction recovery ($n=5$) were ranged from 98.20% to 100.47% for the six studied alkaloids. The limits of detection were 0.26, 0.36, 0.92, 0.30, 0.52, and 0.82 ng, respectively. **Conclusion** The HPLC method developed for simultaneous determination of monoester- and diester-aconitium alkaloids is simple and valid. It can be used for quality evaluation and quality control of *Radix Aconitii Lateralis Praeparata* and its processing products.

Key words: *Radix Aconitii Lateralis Praeparata*; aconitine; hyaconitine; mesaconitine; benzoyleaconine; benzoylhypaconine; benzoylmesaconine; HPLC

收稿日期: 2008-04-15

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAI09B05-2)

作者简介: 孙 兰 (1961—), 女, 副主任技师, 主要从事天然药物化学研究和中草药成分分析。

E-mail: lsun@implad.ac.cn Tel: (010) 62899728

* 通讯作者 常 琪 Tel: (010) 62829823 E-mail: qchang@implad.ac.cn

附子来源于毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根,具有回阳救逆、补火助阳、逐风寒湿邪的功效^[1],为最具特色的临床治疗阳虚里寒证的首选药物。附子属于毒性药材,其中所含的主要有效成分为剧毒的双酯型乌头生物碱,如乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)、中乌头碱(mesaconitine)。附子在炮制加工过程中,其双酯型生物碱会水解去掉一个酯基,转化成单酯型乌头生物碱,如苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine)、苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine)和苯甲酰新乌头原碱(benzoylmesaconine),或继续水解去掉两个酯基转化为乌头原碱(aconine)。炮制水解使得附子的毒性大大降低,但其药理活性亦随之减弱或消失^[2]。这就要求建立能够同时兼顾附子安全性和有效性的科学、量化的质量控制标准。由于附子产区分布广泛,原药材规格及炮制工艺变化很大,因此附子的质量参差不齐。2005 年版《中国药典》采用薄层色谱法仅对附子中的乌头碱做了限量检查^[1],这不能全面准确地反映附子药材中药效成分的概况。本实验首次建立了可同时检测双酯型和单酯型 6 种主要乌头生物碱成分,包括乌头碱、次乌头碱、中乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的 HPLC 测定方法,为附子药材及其炮制品中有效的毒性成分的限量制定提供参考。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪为 Waters 高效液相色谱系统,包括 600 型泵;486 型紫外检测器;717 型自动进样器和 Empower 色谱工作站。柱温由 CBL 100 型柱温箱控制。精密天平为 Mettler Toledo XS105。

乌头碱(批号 110720-200410)、次乌头碱(批号 110798-200404)、中乌头碱(批号 110799-200404)均为定量测定用,购自中国药品生物制品检定所。苯甲酰乌头原碱(质量分数 > 98%,批号 446-24-0)、苯甲酰次乌头原碱(质量分数 > 95%,批号 63238-66-4)、苯甲酰新乌头原碱(质量分数 > 98%,批号 63238-67-5)购自香港赛马会中药研究所。附子生药材 2007 年采自四川的布托、江油、安县、南郑和固城,并经中国药材集团公司赵润怀主任中药师鉴定。附子炮制品由中国药材集团公司科技研发部制备。色谱纯乙腈和甲醇均为 Merck 产品;分析纯盐酸、乙酸铵和氨水为北京化工厂产品。水为去离子重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Agilent Zorbax Extend-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温 25 °C;流动相为 A

和 B 两相梯度洗脱,A:乙腈,B:40 mmol/L 乙酸铵缓冲液(氨水调 pH 10.0);洗脱程序:0~10 min,A 为 28%;10~15 min,A 为 28%~33%;15~45 min,A 为 33%~50%;45~60 min,A 为 50%。体积流量 1.0 mL/min。检测波长 230 nm,进样量均为 20 μL。

2.2 供试品溶液制备:精密称取过 60 目筛的附子生药材细粉约 2 g,平行称 3 份,分别置于 200 mL 三角瓶中,各加 25%氨水 2 mL,润湿 30 min。精密量取萃取溶剂异丙醇-醋酸乙酯(1:1)混合液 100 mL,加至含样品的三角瓶中并称定质量。超声 30 min 后,将此样品瓶放置至室温,再称质量,用萃取溶剂补足失去的质量,混匀后滤过。精密量取续滤液 40 mL,浓缩至小体积,再将其用萃取溶剂完全转移至一蒸发皿上蒸干。残渣用 0.01%盐酸-甲醇溶解并定容于 2 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,得供试品溶液。

2.3 对照品液制备:精密称取乌头碱、次乌头碱、中乌头碱对照品 2.02、7.21、5.11 mg 置同一 10 mL 量瓶内,用 0.01%盐酸甲醇溶液溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 0.202、0.721、0.511 mg/mL 双酯型生物碱对照品液。

精密称取苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱 1.02、1.12、1.31 mg 各置于 1 mL 量瓶内,用 0.01%盐酸甲醇溶液溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 1.02、1.12、1.31 mg/mL 的 3 个单酯型生物碱的对照品液。

2.4 标准曲线制备:精密吸取双酯型生物碱液 5 mL,置于 10 mL 量瓶中,加 0.01%盐酸甲醇溶液至刻度,摇匀,并将此溶液逐级稀释共配制 10 份不同质量浓度的对照品溶液。分别精密吸取 3 个单酯型生物碱储备液 0.10、0.15、0.40 mL,置于同一 1 mL 量瓶中,加 0.01%盐酸甲醇溶液至刻度,摇匀,并将此溶液逐级稀释成 7 个不同质量浓度的对照品溶液。按上述色谱条件进行分析,以峰面积(Y)对进样量(X)进行回归计算,回归方程见表 1。

2.5 精密度试验:将 2.4 项下的含适宜浓度的双酯型生物碱对照品溶液和单酯型生物碱对照品溶液,按上述色谱条件分别连续进样测定 5 次,记录各自的峰面积,并计算其 RSD 值。结果显示,乌头碱、次乌头碱、中乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的 RSD 分别为 0.76%、0.86%、0.95%、0.20%、0.29%、0.79%。

2.6 重现性试验:精密称取附子生药材细粉约 2 g 共 5 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按上述色

表 1 被测生物碱的线性范围和线性关系

Table 1 Linear ranges and correlation of studied alkaloids

成分	线性范围/ μg	线性方程	r
乌头碱	0.004~0.404	$Y=1.52 \times 10^6 X+3.36 \times 10^3$	0.999 98
	0.081~6.466	$Y=1.50 \times 10^6 X+2.03 \times 10^4$	0.999 94
次乌头碱	0.014~1.442	$Y=1.45 \times 10^6 X+1.35 \times 10^4$	0.999 95
	0.288~23.072	$Y=1.42 \times 10^6 X+6.97 \times 10^4$	0.999 96
中乌头碱	0.010~1.022	$Y=1.40 \times 10^6 X+1.06 \times 10^3$	0.999 99
	0.204~16.352	$Y=1.36 \times 10^6 X+6.23 \times 10^4$	0.999 96
苯甲酰乌头原碱	0.002~1.224	$Y=1.13 \times 10^6 X+8.20 \times 10^3$	0.999 98
	0.204~2.050	$Y=1.08 \times 10^6 X+6.43 \times 10^4$	0.999 44
苯甲酰次乌头原碱	0.011~1.120	$Y=1.02 \times 10^6 X-7.64 \times 10^3$	0.999 33
	0.224~3.360	$Y=1.02 \times 10^6 X-1.46 \times 10^4$	0.999 90
苯甲酰新乌头原碱	0.105~2.620	$Y=1.13 \times 10^6 X+1.72 \times 10^4$	0.999 45
	0.524~10.480	$Y=1.10 \times 10^6 X+2.39 \times 10^4$	0.999 99

谱条件进行 HPLC 分析。根据所得 6 种生物碱的峰面积并计算其在样品中的量,结果乌头碱、次乌头碱、中乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱质量分数的 RSD 分别为 0.47%、0.86%、0.36%、0.35%、0.56%、1.48%。

2.7 稳定性试验:取同一附子生药材供试品溶液,室温放置 0、2、4、6、8、10、12、24、36 h 后,按上述色谱条件进行 HPLC 分析,测定 6 种生物碱的量。乌头碱、次乌头碱、中乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱在不同时间量的 RSD 分别为 0.39%、0.27%、0.35%、0.71%、0.82%和 0.29%。

表 2 附子样品中 6 种被测生物碱的量(n=3)

Table 2 Contents of six studied alkaloids in Radix Aconitii Lateralis Praeparata (n=3)

附子药材(来源)	质量分数/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)					
	乌头碱	次乌头碱	中乌头碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱
生药材(布拖)	278.13	694.46	1 040.88	9.75	6.96	72.75
生药材(江油)	131.83	287.56	150.58	1.54	17.67	61.58
生药材(安县)	125.13	2 422.29	170.75	2.17	8.63	105.96
生药材(南郑)	204.21	1 132.83	494.63	11.92	16.83	55.67
生药材(城固)	232.96	1 869.58	116.54	4.50	21.83	295.92
黑顺片(江油)	1.54	51.96	0.479	14.83	31.79	75.63
黑顺片炮制过程(煮前)	6.33	191.42	135.50	1.96	4.00	15.79
黑顺片炮制过程(煮后)	1.50	126.29	47.00	5.25	14.21	53.42
黑顺片炮制过程(蒸制前)	19.92	134.88	64.00	3.08	8.42	30.83
黑顺片加工过程(蒸制后)	2.08	30.96	0.63	16.79	41.88	89.42

3 讨论

3.1 目前报道的用于附子中生物碱定量测定的 HPLC 方法大都集中在双酯型生物碱^[3~7]上,对于单酯型生物碱测定的报道^[8,9]很有限。张聿梅等^[8]除了测定川乌中的 3 个单酯型生物碱,还测定了苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱,对后两者的分离度欠佳,其中苯甲酰次乌头原碱对照品在流动相 pH 5.5~6.0 时,液相色谱中出现 2 个峰,刘秀秀等^[9]测定了附子中的苯甲酰乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱。本实验建立了同时测定 3 种单酯型和 3

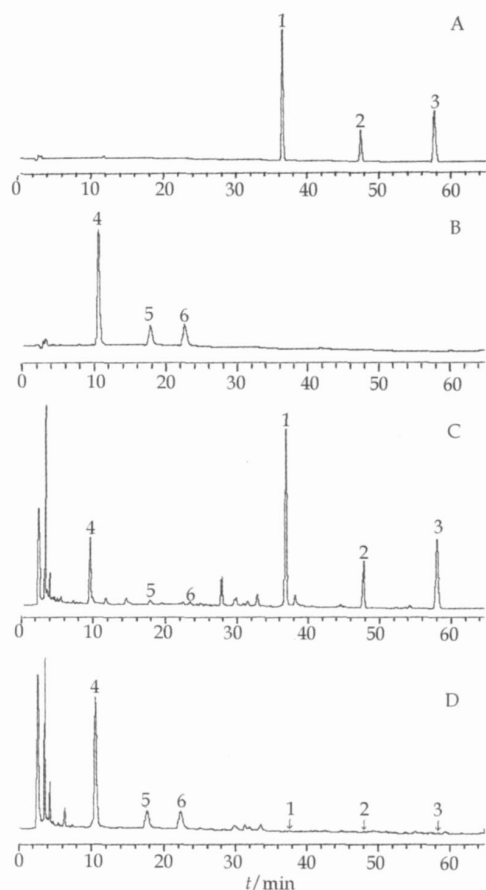
2.8 加样回收率试验:精密称取附子生药材细粉 1 g 共 30 份,每 5 份用于一种生物碱的回收率测定,共 6 组。每一组样品分别加入同一种对照品溶液适量,按 2.2 项下方法进行供试品溶液的制备和 HPLC 分析。根据测得量和加入量计算其回收率。乌头碱、次乌头碱、中乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的平均加样回收率(RSD)分别为 98.67%(1.15%)、100.47%(2.55%)、98.20%(2.40%)、100.35%(0.96%)、100.27%(1.56%)和 98.47%(1.15%)。

2.9 最低检测限:将对照品溶液以 0.01%盐酸甲醇溶液不断稀释并进行 HPLC 分析。当信噪比为 3 倍时的进样量即为最低检测量。本色谱条件下,乌头碱、次乌头碱、中乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的最低检测限分别为 0.26、0.36、0.92、0.30、0.52、0.82 ng。

2.10 样品测定:取不同产地的附子生药材或其炮制品适量,粉碎成细粉,过 60 目筛。精密称取各样品约 2 g,每个样品平行称 3 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,并按上述色谱条件进行 6 种生物碱的分析,用当天随行的供试品溶液进行计算,结果见表 2,对照品及供试品图谱见图 1。

种双酯型乌头生物碱的 HPLC 方法,线性范围宽、稳定性好、重现性高、专属性强、成本低、效率高,对附子药材及其炮制品的质量控制和优化炮制工艺具有重要的意义。

3.2 有关附子中生物碱提取方法的优化已有报道^[4,5,8]。本实验对所报道的两种常用方法进行了比较。研究发现用乙醚^[4,5]作溶剂提取时,无论是采用冷浸法或超声法,由于其极易挥发,使得测定结果的重现性差,且单酯型生物碱乌头碱、次乌头碱和中乌头碱的实验结果偏低。用异丙醇-醋酸乙酯



1-中乌头碱 2-乌头碱 3-次乌头碱 4-苯甲酰新乌头原碱
5-苯甲酰乌头原碱 6-苯甲酰次乌头原碱

1-mesaconitine 2-aconitine 3-hypaconitine 4-benzoylmesaconin
5-benzoylaconine 6-benzoylhypaconine

图 1 乌头生物碱对照品(A、B)、江油产附子生药材(C)和黑顺片(D)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of alkaloids reference substance (A and B), Radix Aconitii Lateralis Preparata (C), and its processing herbal product Heishunpian (D)

(1) 混合液作溶媒^[8]提取时,杂质干扰少,6种被测成分的平均加样回收率介于 98.20%~100.47%,实验结果稳定,重现性好,RSD 在 0.35%~1.48%,完全能达到定量的要求。该方法灵敏度高、操作简单、耗时短、方便易行,是一种较好的、值得推广的附子中乌头类生物碱的提取方法。

3.3 3种单酯型生物碱,即苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱的化学结构相似,极性相似,在色谱柱上的保留时间比较接近。因此在进行梯度洗脱时,在单酯型生物碱出峰的前段,需将梯度变化范围缩小,使洗脱时间延长,这样方可使这3种成分得到充分分离。

3.4 高效液相色谱法测定乌头类生物碱成分多采用含二乙胺和三乙胺的碱性流动相,或酸性乙酸铵为流动相^[8]。这些流动相对同时测定单酯型和双酯型生物碱不能达到满意的分离效果。本研究比较了多种流动相,最终选定以乙腈-碱性乙酸铵缓冲液(pH 10.0)为流动相,并进行梯度洗脱。同时还比较了 Alltima C₁₈ (Altech)、Symmertry C₁₈ (Waters)、Purospher RP-18 (Merck) 和 Zorbax Extend-C₁₈ (Agilent) 4个色谱柱。结果表明,附子中的双酯型及单酯型乌头类生物碱6种成分在 Zorbax Extend-C₁₈ 色谱柱上柱效较高,峰形尖锐,对称性好,与其他成分达到了基线分离,并可在 65 min 内完成1次进样测定。

3.5 本研究利用建立的 HPLC 方法对来自不同地区的附子生药材及其炮制品黑顺片(表2)进行了6种生物碱的定量测定,结果表明在生药材中双酯型生物碱的量明显高于单酯型生物碱,且以次乌头碱的量最高。在炮制品黑顺片中,双酯型生物碱的量明显低于其在未炮制的生药材中,说明其被水解转化为单酯型生物碱或乌头原碱。研究发现,不同产地附子药材及其炮制品中这6种乌头生物碱的量差异很大,这就要求应对附子类药材中的各生物碱进行定量监测,以保证在安全的前提下,正确有效地使用这类药材。同时,在炮制过程中,可利用此 HPLC 方法对各生物碱进行动态监控,有效地将毒性成分控制在适当范围内。由于本实验未收集到足够多的不同规格和不同批次的附子炮制品,同时未进行安全性的评价,因此无法制订出双酯型生物碱的上限和下限。此有效毒性成分的限量还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 彭波,杨华元. 乌头、附子及其主要生物碱的研究进展[J]. 华西药学杂志, 1993, 8(3): 158-161.
- [3] 赵英永,崔秀明,张文斌,等. RP-HPLC法测定草乌中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱[J]. 中草药, 2006, 37(6): 940-942.
- [4] 王瑞,刘芳,孙毅坤,等. 不同附子炮制品中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量的 HPLC 测定[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(10): 1361-1363.
- [5] 刘芳,于向红,李飞,等. HPLC 测定附子及炮制品3种双酯型生物碱的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1160-1162.
- [6] 刘秀秀,晁若冰. HPLC 控制参附子注射液及附子3种双酯型生物碱[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(2): 153-154.
- [7] 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(2): 1255-1256.
- [8] 张聿梅,鲁静,蒋渝,等. 川乌和制乌中单酯及双酯型生物碱的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 807-812.
- [9] 刘秀秀,晁若冰. 反相离子对色谱法测定附子中生物碱成分[J]. 药学报, 2006, 41(4): 365-369.