

高效毛细管电泳法测定温胃舒颗粒中乌头碱

李珺沫, 蒋 晔*, 孙 婷

(河北医科大学药学院 分析化学教研室, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立毛细管电泳场放大富集技术快速检测温胃舒颗粒中痕量有效毒性成分乌头碱的方法。方法 采用未涂层石英毛细管(43 cm×50 μm, 有效长度 35 cm)为分离通道, 60 mmol/L 磷酸二氢钠(pH 6.0)-乙腈(8:2)为运行缓冲溶液; 运行电压 10 kV; 进样电压 12 kV, 进样时间 30 s; 在进样之前设定用水冲洗, 压力为 3.5 kPa, 冲洗时间 5 s; 紫外检测波长 235 nm。结果 乌头碱在 $37.5 \sim 2.4 \times 10^3$ ng/mL 线性关系良好($r=0.9995$), 最低检测限为 11.3 ng/mL, 平均回收率大于 97.3%。结论 本方法简便、快速、专属性强、富集效率高, 为温胃舒颗粒在生产过程中的质量控制及临床药物监测提供可靠的分析手段。

关键词: 温胃舒颗粒; 乌头碱; 毛细管电泳

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)10-1577-03

温胃舒颗粒是由党参、附子(制)、黄芪(炙)和肉桂等 10 多味中药制成的中药制剂, 具有扶正固本, 温胃养胃, 行气止痛, 助阳暖中之功效, 临床常用于治疗慢性萎缩性胃炎、慢性胃炎所引起的胃脘冷痛, 腹胀, 暖气, 纳差, 畏寒, 无力等症。方中附子具有回阳救逆, 补火助阳, 逐风寒湿邪等作用, 其主要有效成分乌头碱的毒性很强, 人口服 0.2 mg 即可出现中毒症状, 3~5 mg 可致死^[1]。目前附子没有严格统一的炮制方法, 导致因服用含乌头类中药及其制剂而中毒或死亡的现象屡有发生。因此, 为控制药品质量, 保证用药安全, 有必要对温胃舒颗粒中痕量毒性成分乌头碱进行限量检测。对于乌头碱的检测主要采用分光光度法^[2]、薄层色谱法^[3,4]和高效液相色谱法^[5~7]。分光光度法测定的是药材或制剂中总生物碱, 选择性差, 达不到对乌头碱限量控制的要求。薄层色谱法样品预处理繁琐费时, 并且由于乌头碱的量较低, 共存组分干扰较大而导致特异性差, 误差大, 定量分析不够准确。由于中药制剂成分复杂, 高效液相色谱法对于结构相近的碱性物质的分离难度较大^[7], 因此对样品的预处理及柱效要求较高。本实验建立毛细管电泳场放大富集技术快速检测温胃舒颗粒中的痕量有效毒性成分乌头碱。该方法将毛细管电泳分离度高、样品用量少、环境污染小等优点与场放大富集技术选择性好及适应痕量分析的要求相结合, 大大提高了定量分析中的专属性和灵敏度, 为温胃舒颗粒生产过程中的质量控制及防止药物中毒提供可靠方便实用的分析手段。

1 仪器与试剂

高效毛细管电泳仪、高压电源、紫外检测器(北京彩陆科学仪器有限公司); 未涂层石英毛细管(43 cm×50 μm, 有效长度 35 cm)(河北永年光导纤维厂)。

乌头碱对照品(批号 110720-200410)由中国药品生物制品检定所提供; 温胃舒颗粒由合肥神鹿双鹤药业有限责任公司生产。乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钠为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 电泳条件:运行缓冲溶液为 60 mmol/L 磷酸二氢钠(pH 6.0)-乙腈(8:2); 运行电压 10 kV; 进样电压 12 kV, 进样时间 30 s; 在进样之前设定用水冲洗, 压力为 3.5 kPa, 冲洗时间 5 s; 温度 25 °C; 紫外检测波长 235 nm。开机后毛细管柱用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液冲洗 10 min, 水冲洗 10 min, 运行缓冲液冲洗 10 min, 每次进样前用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液、水和运行缓冲液分别冲洗 3 min。所有溶液在使用前均用 0.45 μm 纤维树脂膜滤过。在以上电泳条件下, 乌头碱峰的保留时间约为 4.0 min, 温胃舒颗粒中其他药材对乌头碱的测定不产生干扰, 见图 1。

2.2 供试品溶液的制备:取本品, 研细, 取粉末 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 1 mol/L 盐酸 10 mL, 冰浴超声处理 40 min, 滤过, 取续滤液 5 mL, 置分液漏斗中, 用乙醚洗涤 3 次, 每次 10 mL, 弃去乙醚液, 将酸水层用氨水调 pH 值为 9~10, 再用乙醚提取 3 次, 每次 10 mL, 收集乙醚层, 挥干, 残

* 收稿日期: 2009-01-10

作者简介: 李珺沫(1981—), 女, 河北唐山人, 助教, 硕士研究生, 研究方向为药物的质量研究与质量控制。

Tel: (0311)86266069 E-mail: lijunmei20082008@163.com

* 通讯作者: 蒋 晔 Tel: (0311)86266069 E-mail: jiangye@hebm.u.edu.cn

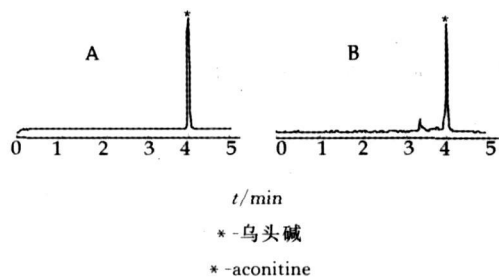


图 1 乌头碱对照品(A)和温胃舒颗粒(B)的高效毛细管电泳色谱图

Fig 1 Capillary electrophoretograms of aconitine reference substance (A) and Wenweishu Granula (B)

渣用 20% 的乙腈溶解, 置 10 mL 量瓶中, 用 20% 的乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取乌头碱对照品约 24 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加 20% 乙腈使其溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系考察: 精密吸取乌头碱对照品溶液 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 加 20% 乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为 1 号工作液。从 1 号工作液中吸取 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加 20% 乙腈稀释至刻度, 摇匀, 得 2 号工作液, 依此法对倍稀释得 3、4、5、6、7 号系列对照品溶液, 质量浓度分别为 2.4×10^3 、 1.2×10^3 、600、300、150、75、37.5 ng/mL。按以上电泳条件进样, 记录色谱峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得线性方程 $Y = 47.2X - 6.1$, $r = 0.9995$ 。结果表明: 乌头碱在 $37.5 \sim 2.4 \times 10^3$ ng/mL 线性关系良好。

2.5 最低检出限测定: 取乌头碱对照品溶液稀释, 进样并记录电泳图, 按 $S/N = 3$ 计, 结果乌头碱最低检测限为 11.3 ng/mL。

2.6 精密度试验: 取同一供试品溶液, 连续进样分析 5 次, 记录峰面积, 结果乌头碱峰面积的 RSD 为 2.3%。

2.7 稳定性试验: 取同一供试品溶液在相同电泳条件下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录色谱峰面积, 结果乌头碱峰面积的 RSD 为 2.9%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重现性试验: 取同一批(批号 0704012)样品 5 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱峰面积, 结果乌头碱峰面积的 RSD 为 2.4%。

2.9 加样回收试验: 精密称取批号 0704012 温胃舒颗粒粉末约 1.00 g, 分别加入 19.2、24.0、28.8 μ g 乌头碱对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算乌头碱加样回收率和 RSD, 结果回收率分别为

97.3%、97.8%、97.3%, RSD 分别为 1.4%、1.7%、1.3% ($n=9$)。

2.10 样品的测定: 取 3 批温胃舒颗粒样品, 制备供试品溶液, 按以上电泳条件进样, 以标准曲线法计算乌头碱的质量分数, 结果见表 1。

表 1 温胃舒颗粒中乌头碱的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of aconitine in Wenweishu

Granula ($n=3$)	
批号	乌头碱/(mg $\cdot$ g $^{-1}$)
0704010	0.030
0704012	0.024
0704013	0.024

3 讨论

3.1 电泳条件及富集条件的优选: 分别考察了缓冲溶液的 pH 值、浓度、有机添加剂、预进溶液、进样时间和运行电压对峰形、保留时间和富集效果的影响, 同时优化了电泳条件。

pH 值对分离度和迁移时间具有显著影响。实验对 pH 4.0~8.0 进行了考察, 结果表明: 随着 pH 值增加, 电渗流增强, 迁移时间继而缩短, 而当 pH 值大于 6.0 时, 迁移时间逐渐增加, 故选择 pH 值为 6.0。

离子强度(浓度)主要影响双电层厚度, 离子强度越大双电层越薄, 电渗降低; 同时浓度越大电流越大, 其产生的焦耳热也越大, 基线噪声提高。故在缓冲溶液 pH 值为 6.0 的条件下, 实验考察了磷酸二氢钠溶液在不同浓度(40、50、60、70、80 mmol/L)时对乌头碱保留情况及峰形的影响, 结果表明磷酸二氢钠浓度为 60 mmol/L 时, 乌头碱峰迁移时间最小, 且与样品中其他药材分离良好, 故选择缓冲溶液的浓度为 60 mmol/L。

有机添加剂主要影响组分的分离选择性和柱效, 同时有机添加剂比例增加, 迁移时间随之增加。实验考察了乙腈比例在 10%~40% 对乌头碱分离度及迁移行为的影响。结果表明: 随着乙腈比例的增加, 乌头碱的分离选择性增加, 当乙腈比例为 20% 时, 乌头碱与样品中其他组分达到良好分离。继续增加乙腈比例, 分离度提高不明显而迁移时间显著增加, 故选择乙腈比例为 20%。

在样品电动进样之前注入一段低电导的溶液塞可以提高富集效果。这是因为施加电压后, 低电导的溶液塞所在区带的电场很强, 在电动进样时, 被分析离子会快速迁移通过低电导的溶液塞, 达到分离电解质的界面时因电场强度的显著降低而快速地降低迁移速率, 从而使分析物离子在分离前得到有效

富集。实验分别考察了预进水和乙腈对富集效果的影响。结果表明:在实验电泳条件下,预进水和乙腈时,与常规电迁移进样相比,检测灵敏度分别提高 400、250 倍。故选择水为预进溶液。

进样时间的长短主要影响进样量的大小,从而影响富集效果。实验考察了进样时间在 20 ~ 40 s 对富集效果的影响。结果表明:随着进样时间的增加,峰高明显增加,在 30 s 之前无减缓趋势,继续增加进样时间,峰高不再增加,峰展宽明显,柱效降低,而不利于定量测定,故选择进样时间为 30 s。

实验考察了在 60 mmol/L 磷酸二氢钠(pH 6.0)-乙腈(8:2)缓冲体系下,不同进样电压(8、10、12、14、16 kV)对富集效果的影响。结果表明:峰高随进样电压的增加而增高,但是随着进样电压的增大,组分保留时间减小,而乌头碱峰与样品中其他组分分离度减小,不利于分离测定。当进样电压为 12 kV 时,乌头碱峰峰形良好,各组分均完全分开,故选择最佳进样电压为 12 kV。

3.2 提取条件的选择:乌头碱的提取常采用冷浸法^[7]和超声提取法^[5],但提取的效果不尽相同。由于乌头碱为亲脂性生物碱,并且对热很不稳定^[8],因此实验利用生物碱的碱性,加酸冰浴超声提取 40 min 使生成盐溶于水,加乙醚萃取去除脂溶性杂质,再碱化,用乙醚萃取,去除水溶性杂质。该法效果良

好,使待测组分处无干扰。同时采用冰浴超声提取既防止成分遇热分解又大大提高了提取效率。

本实验建立了毛细管电泳场放大富集技术快速检测温胃舒颗粒中痕量有效毒性成分乌头碱的方法。该方法样品预处理简单、分离效率高、分析速度快、灵敏度高、线性范围宽、实验成本低、环境污染小。检测灵敏度与常规进样相比提高 400 倍,达到了文献报道的高效液相色谱法^[9]的水平且有较高的分离选择性。

参考文献:

- [1] 符华林. 我国乌头属药用植物的研究概况[J]. 中药材, 2004, 27(2): 149-152
- [2] 姚志凌, 李明辉. 分光光度法测定风湿定胶囊中乌头碱含量[J]. 中国药业, 2007, 16(5): 22-23
- [3] 李焕荣, 张荣华, 崔健, 等. 薄层扫描法测定镇痛宁注射液中的乌头碱的含量[J]. 中草药, 1996, 27(1): 58-59
- [4] 张晓宏, 周莉, 杨龙辉, 等. 血宝胶囊的薄层色谱鉴别及乌头碱的限量控制[J]. 华西药学杂志, 2001, 16(6): 451-454
- [5] 刘刚, 王辉, 周本宏. 高效液相色谱法测定思康达胶囊中乌头碱的含量[J]. 医药导报, 2005, 24(12): 1170-1171
- [6] Wang Z H, Wen J, Xing J B, et al. Quantitative determination of diterpenoid alkaloids in four species of *Aconitum* by HPLC[J]. Pharm Biomed Anal, 2006, 40(4): 1031-1034
- [7] 朱瑞龙, 景明, 柴国林, 等. HPLC 测定附子理中丸双酯型乌头碱含量[J]. 中成药, 1996, 18(10): 13-14
- [8] 孙毅坤, 赵惠萍, 周富荣. HPLC 测定肺康膏中次乌头碱的含量[J]. 中成药, 1999, 21(12): 626-628

HPLC 法测定小半夏汤中 6-姜酚和 6-姜醇

张科卫, 吴皓*, 崔小兵

(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘要: 目的 研究以 HPLC 法同时测定小半夏汤中 6-姜酚、6-姜醇的方法。方法 采用 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(65:35); 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 ℃; 体积流量: 0.8 mL/min。结果 6-姜酚在 1.273~11.457 μg 与峰面积呈现良好的线性关系, $r=0.9999$; 6-姜醇在 0.444~3.996 μg 与峰面积呈现良好的线性关系, $r=0.9998$ 。平均加样回收率($n=5$): 6-姜酚为 99.82%; 6-姜醇为 100.30%。结论 本法操作简便, 结果可靠, 重现性好, 可作为小半夏汤质量控制的方法。

关键词: 小半夏汤; 6-姜酚; 6-姜醇; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)10-1579-03

小半夏汤出自张仲景的《金匱要略》, 虽然仅由半夏、生姜两味药组成, 却有着很好的止呕效果, 所

以历代医家对其倍加推崇, 称其为“呕家圣剂”。目前对其的研究主要集中在药理药效方面^[1]。本课题

* 收稿日期: 2008-12-10

基金项目: 南京中医药大学青年科技创新基金项目(05XZR08)

作者简介: 张科卫(1971—), 女, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事中药复方与炮制研究。

Tel: (025)86798269 E-mail: kewei_31@163.com

* 通讯作者: 吴皓