

莨菪浸膏片 HPLC 指纹图谱及莨菪烷类生物碱的定量分析研究

丁琳¹, 戴涌², 杨亚婷², 刘海静^{1,2*}

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065

摘要: **目的** 建立莨菪浸膏片的 HPLC 特征指纹图谱, 并对其中阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱、樟柳碱 4 种莨菪烷类生物碱进行定量分析。 **方法** 采用 GL Sciences Inc C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 检测波长 218 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C, 利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版)”和 SPSS 19.0 建立莨菪浸膏片指纹图谱, 并进行相似度评价及定量分析。 **结果** 标记共有峰 14 个, S1~S4 以及 S11 与对照指纹图谱的相似度大于 0.98, 其他均大于 0.995, 表明 12 批莨菪浸膏片相似度良好。聚类分析结果显示, S1~S6 聚为一类, 其余样品聚为一类。定量分析结果显示不同批次的莨菪浸膏片中均含有阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱, 但含量存在一定差异。 **结论** 该方法较好地反映了莨菪浸膏片中的生物碱组成信息, 且操作简单, 重复性好, 为莨菪浸膏片的质量评价提供了更加全面、科学的数据。

关键词: 莨菪浸膏片; 阿托品; 东莨菪碱; 山莨菪碱; 樟柳碱; 指纹图谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)07-1583-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.015

HPLC fingerprint of Hyoscyamus Extract Tablets and quantitative analysis of tropane alkaloids

DING Lin¹, DAI Yong², YANG Ya-ting², LIU Hai-jing^{1,2}

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China

Abstract: Objective To establish a fingerprint of Hyoscyamus Extract Tablets (HET) by high performance liquid chromatography and determine the content of atropine, anisodamine, scopolamine, and anisodine. **Methods** The separation was performed on a GL Sciences Inc C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with gradient elution of methanol and 0.05% phosphoric acid solution. The detection wavelength was set at 218 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was 30 °C. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM was used for establishing the reference fingerprint and similarity evaluation, and clustering analysis was carried out by SPSS 19.0. **Results** There were 14 marked common peaks, and the similarity of S1—S4, S11 and the control fingerprint was over 0.98, others were above 0.995. It was shown that these 12 batches of samples were of good similarity. Cluster analysis results showed that the S1—S6 were grouped into one class, and the remaining samples were grouped into one class. The results of assay showed that alkaloids in different batches of HET varied a lot in contents but kept consistent in compositions. **Conclusion** The method could well display the chemical information of HET. It has simple operation and good repeatability, which provides more comprehensive and scientific data for quality evaluation of HET.

Key words: Hyoscyamus Extract Tablets; atropine; anisodamine; scopolamine; anisodine; fingerprint

莨菪浸膏片是由三分三 *Anisodus acutangulus* C. Y. Wu et C. Chen, ex C. Chen et C. L. Chen 浸膏或颠茄 *Atropa belladonna* L. 浸膏经过现代工艺制成

的片剂, 主要化学成分为阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、樟柳碱等莨菪烷类生物碱^[1]。莨菪浸膏片属于外周抗胆碱药, 主要药理作用有解除平滑肌痉挛,

收稿日期: 2017-11-10

基金项目: 国家十二五“重大新药创制”专项(2015ZX0903001); 陕西省社会发展科技攻关项目(2016SF-058)

作者简介: 丁琳, 女, 在读硕士, 研究方向为新药研发与中药质量评价。Tel: 18700783890 E-mail: 1144626742@qq.com

*通信作者 刘海静, 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为新药研发与中药质量评价。Tel: (029)62288446 E-mail: liuhaijing1@163.com

增加心肌血流量, 扩张冠状动脉, 改善血液流态、流速、流量, 增加组织供氧量。因此临床常用于冠心病及胃、十二指肠、胆、肾等绞痛的治疗^[2]。迄今为止, 关于莨菪浸膏片的研究主要集中于总生物碱或单一生物碱的含量测定以及临床药效学研究^[3-12], 而指纹图谱及多成分定量分析方面的研究鲜有报道。本研究在建立莨菪浸膏片的 HPLC 指纹图谱基础上, 分析了 12 批样品指纹图谱的异同, 指认其中 4 种共有成分并对其进行定量分析^[13-18]。该方法可弥补含量测定中未知成分较多、测定成分单一的缺陷, 更加全面地反映莨菪浸膏片的质量, 并且本方法中所采用 HPLC 法较之以往的酸性染料比色法和区带毛细管电泳法不仅降低了检验成本, 且操作简单, 准确度高, 重复性好, 两者的结合为莨菪浸膏片的质量评价提供了更加全面的科学数据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Shimadzu LC-30AD 高效液相色谱仪, Empower 工作站, 日本 Shimadzu; GL Sciences Inc C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); XPE105 电子分析天平, Mettler Toledo 公司; TG16-WS 台式高速离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; KQ-500 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试药

对照品硫酸阿托品 (批号 100040-201312, 质量分数 97.2%)、氢溴酸东莨菪碱 (批号 100049-201310, 质量分数 99.6%)、氢溴酸山莨菪碱、(批号 100051-201607, 质量分数 99.3%)、氢溴酸樟柳碱 (批号 100399-200601, 质量分数 100.0%) 均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。12 批莨菪浸膏片均由西安利君制药有限责任公司提供, 批号分别为 1406337、1404225、1505267、1509494、1603144-1、1606354-3、1610544-1、1612013-1、1611592-1、1701067-1、1702123-1、1704217-1, 分别编号 S1~S12。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 GL Sciences Inc C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液, 梯度洗脱程序见表 1; 检测波长 218 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 50 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 混合对照品溶液的配制

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

t/min	甲醇/%	0.05%磷酸水溶液/%
0	3	97
60	25	75
65	50	50
65.1	3	97
80	3	97

酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、氢溴酸山莨菪碱、氢溴酸樟柳碱适量, 加水溶解并定量稀释制成含硫酸阿托品 0.6 mg/mL, 氢溴酸东莨菪碱 0.3 mg/mL, 氢溴酸山莨菪碱 0.3 mg/mL 和氢溴酸樟柳碱 0.3 mg/mL 的混合对照品储备溶液。精密量取混合对照品储备液适量, 定量稀释制成含硫酸阿托品 60 μg/mL、氢溴酸东莨菪碱 30 μg/mL、氢溴酸山莨菪碱 30 μg/mL 和氢溴酸樟柳碱 30 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的配制 取本品 20 片, 研细, 精密称取适量 (约相当于总碱量 0.24 mg), 置具塞离心管中, 精密加入 0.05 mol/L 的硫酸溶液 5.0 mL, 密塞, 精密称定, 置热水浴中超声提取 30 min, 放冷, 再精密称定, 用 0.05 mol/L 硫酸溶液补足减失的质量, 12 000 r/min 离心, 10 min, 取上清液, 滤过, 即得。

2.3 莨菪浸膏片指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (S1), 连续进样 6 次, 记录色谱图; 以阿托品为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 其 RSD 值均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.3.2 重复性试验 取同一供试品 (S1) 6 份, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定; 以阿托品为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 其 RSD 值均小于 3.0%, 表明方法重复性良好, 符合指纹图谱要求。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品 (S1) 溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 记录色谱图; 以阿托品为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 其 RSD 值均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 相似度分析 将各批次样品 (S1~S12) 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录

色谱图,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(国家药典委员会 2004 版)对 12 批莨菪浸膏片样品的 HPLC 指纹图谱进行数据处理,以 S1 号样品图谱为参照谱,设定时间窗宽度为 0.1,采用平均数法自动匹配生成生成莨菪浸膏片指纹图谱共有模式 R,其叠加图谱及对照图谱见图 1。并确认 14 个共有特征峰,通过与对照品比较,指认其中 4 号峰为东莨菪碱,6 号峰为山莨菪碱,7 号峰为阿托品。将该对照图谱的相似度值设定为 1,计算 S1~S12 号样品特征图谱的相似度分别为 0.987、0.986、0.987、0.991、0.997、0.996、0.997、0.998、0.995、0.998、0.994、0.998,其中 S1~S4 以及 S11 与对照指纹图谱的相似度大于 0.98,其余均大于 0.995,表明这 12 批莨菪浸膏片相似度良好。

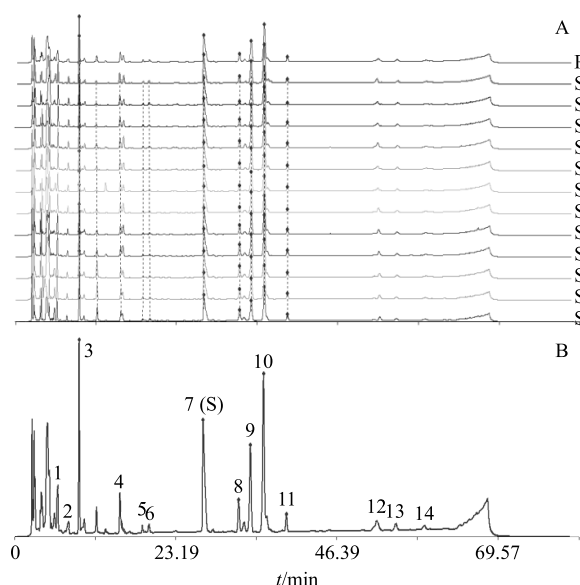


图 1 12 批莨菪浸膏片的 HPLC 指纹图谱 (A) 及共有模式的对照指纹图谱 (B)

Fig. 1 HPLC fingerprints (A) of HET samples and reference (B)

2.4 4 种成分的定量分析

2.4.1 系统适用性考察 精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液 (S1) 各 50 μ L,按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪。结果显示,硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、氢溴酸山莨菪碱与氢溴酸樟柳碱之间分离良好,相邻色谱峰间分离度均大于 1.5,样品测定无干扰。混合对照品溶液及供试品溶液的 HPLC 图见图 2。

2.4.2 线性关系的考察 分别取混合对照品储备液适量,按一定比例稀释配制系列质量浓度混合对照品溶液。精密吸取上述系列质量浓度混合对照品

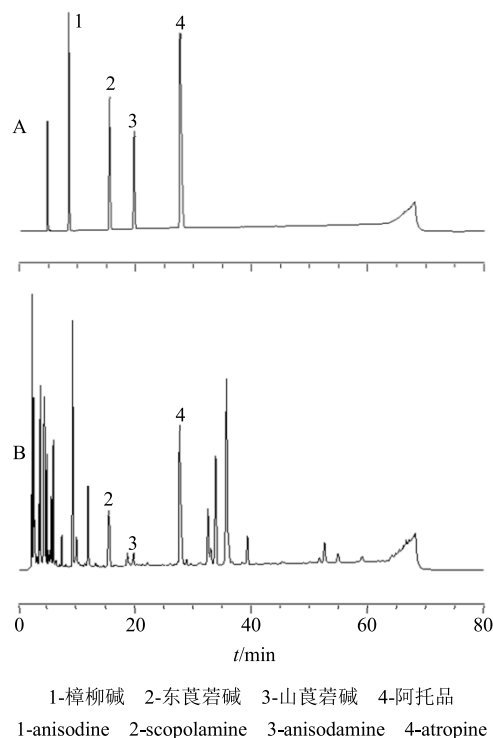


图 2 混合对照品 (A) 和供试品 (B) HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference solution (A), and samples of HET (B)

溶液各 50 μ L 注入高效液相色谱仪,以质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,进行线性回归,所得结果分别为阿托品 $Y=20\,470.95\,X+7\,473.802$, $r=0.999\,8$,线性范围 22.00~66.01 μ g/mL;东莨菪碱 $Y=18\,408.18\,X-1\,223.685$, $r=0.999\,9$,线性范围 9.48~28.45 μ g/mL;山莨菪碱 $Y=23\,003.98\,X-3\,498.553$, $r=0.999\,9$,线性范围 6.32~18.97 μ g/mL;樟柳碱 $Y=19\,793.34\,X-290.529$, $r=0.999\,9$,线性范围 10.21~30.62 μ g/mL。

2.4.3 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 50 μ L,连续进样 6 次,记录峰面积,阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱、樟柳碱峰面积的 RSD 值分别为 0.050%、0.128%、0.139%、0.156%,结果表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品 (S1) 溶液 50 μ L,分别在配制后 0、2、4、8、10、12、24 h 进样测定峰面积,结果阿托品、东莨菪碱、山莨菪碱峰面积的 RSD 分别为 0.991%、1.231%、1.564%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批样品 (S1),按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,测定峰面积,计算阿托品、东莨菪

碱、山茛菪碱质量分数的 RSD 分别为 0.996%、1.473%、1.869%，表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取 9 份样品 (S1) 适量，置具塞离心管中，分别加入低、中、高不同体积的混合对照品溶液各 3 份，按“2.2.2”项下方法制备低、中、高质量浓度的供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率。结果阿托品、东茛菪碱、山茛菪碱的平均加样回收率分别为 95.66%、93.55%、94.89%，RSD 分别为 1.66%、1.47%、1.59%。

2.4.7 样品的测定 将 12 批样品分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进行测定，根据外标法分别计算 4 种生物碱含量，结果见表 2。结果显示，樟柳碱未检出，其余 3 种生物碱各批次间含量存在差异。经分析推断，应为本研究所用制剂年份不同，随着时间的推移，成分含量有下降趋势；而樟柳碱未检出的原因有待更进一步研究。

2.5 聚类分析

以所测 12 批茛菪浸膏片中标定的共有化学成分含量为变量，运用 SPSS 19.0 数据统计软件进行聚类分析，采用组间连接法，利用欧氏距离作为样品测度，结果见图 3。结果表明，12 批茛菪浸膏片可分为 2 类，S1~S6 聚为 1 类，其余样品聚为 1 类，说明本研究样品间质量存在差异，此结果与相似度分析结果基本一致。经分析，此结果主要可能由以下方面的原因引起：其一，本研究所用样品年份不

表 2 12 批样品中 4 种生物碱测定结果

Table 2 Contents of four alkaloids in 12 batches of samples

编号	含量/($\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$)				
	阿托品	东茛菪碱	山茛菪碱	樟柳碱	总生物碱
S1	16.01	1.98	0.81	0	18.80
S2	17.25	2.32	0.74	0	20.31
S3	17.24	2.30	0.63	0	20.17
S4	17.73	2.51	0.44	0	20.68
S5	17.11	2.87	0.58	0	20.56
S6	16.33	3.15	0.73	0	20.21
S7	16.99	3.52	0.68	0	21.19
S8	17.41	3.74	0.65	0	21.80
S9	17.63	3.78	0.81	0	22.22
S10	17.72	3.89	0.83	0	22.44
S11	17.85	4.00	0.82	0	22.67
S12	17.91	4.12	0.91	0	22.94

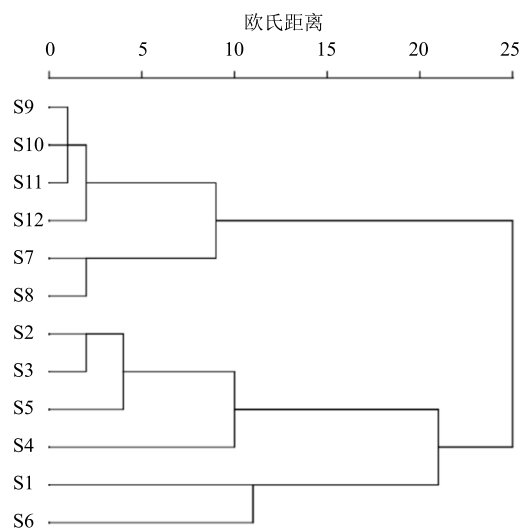


图 3 基于 12 批茛菪浸膏片中 3 种生物碱类成分含量测定的聚类分析

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis based on content of three alkaloids in 12 batches of HET

同；其二，生产工艺随着时间差异也可能存在差异；其三，原料的采购时间可能存在差异等。

3 讨论

本实验利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(国家药典委员会 2004 版)建立 12 批茛菪浸膏片样品的 HPLC 指纹图谱。相似度分析与聚类分析结果表明，不同批次的茛菪浸膏片之间存在较小差异。其差异可能由于本研究所采集的样品年份不同，某些成分含量有所下降，但根据相似性评价结果，其最低大于 0.95，由此可见，虽然某些成分在存储过程中含量有所下降，但所有样品在一定程度上仍具有相似性。因此，样品在存储过程中的质量得到了保障。

本研究同时对茛菪浸膏片中 4 种共有生物碱成分阿托品、东茛菪碱、山茛菪碱、樟柳碱进行定量分析，结果显示，樟柳碱未检出，不同批次间其他 3 种共有生物碱含量存在差异，但其中阿托品含量基本一致，而东茛菪碱及山茛菪碱含量存在较小差异。推断东茛菪碱和山茛菪碱含量不同批次间存在差异的原因可能有 2 种，其一，样品在存储的过程中东茛菪碱及山茛菪碱较阿托品易降解，其二，本实验所收集样品年份不同以及不同批次间原药材的购买与提取亦存在一定差异。而樟柳碱未检出的原因初步推断是因为提取方法，具体原因还需进一步研究。

此外,由于不同厂家的莨菪浸膏片原药材来源不同,规格亦存在差异,且其英文名称一致,针对此“异物同名”情况,会在以后的质量标准提高中提出问题并进行修正。

综上所述,建立莨菪浸膏片特征指纹图谱与莨菪烷类成分定量分析的研究都对莨菪浸膏片的质量控制提供了一定的科学依据和借鉴。其中,对于相关企业,可利用指纹图谱控制样品来源,从而保证产品的稳定性。对于药检行业,可更简单明确地判断产品的真伪优劣。但要对莨菪浸膏片的质量进行更完整、科学的评价,还需对原药材的来源以及有效成分等进行更深入的探索和研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第67卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第19卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 吴少平, 柳小秦, 罗晶, 等. 莨菪浸膏片质量标准研究 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(8): 319-321.
- [4] 庞谤, 杨欣, 孙文基. 高效液相色谱法测定莨菪浸膏片中阿托品的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(3): 414-416.
- [5] 李霞, 罗晶, 柳小秦. 区带毛细管电泳法分离测定莨菪浸膏片中莨菪烷类生物碱 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 121-123.
- [6] 章海弘, 吕小波, 黄春球, 等. 三分三浸膏片与消旋山莨菪碱片的药效对比实验研究 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(29): 23-24.
- [7] 朱虹江, 姜丽娟. 三分三浸膏片治疗脾胃虚寒证胃脘痛 36 例 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(19): 50-51.
- [8] 潘夕春, 陈敏, 张磊, 等. 植物表达载体在三分三发根中的高效表达 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 588-589.
- [9] 严铮辉, 潘夕春, 强玮, 等. PMT 和 H6H 双基因共转化提高三分三托品烷类生物碱质量分数 [J]. 西南大学学报, 2014, 36(2): 21-22.
- [10] Pramod K K, Singh S, Jayabaskaran C, et al. Biochemical and structural characterization of recombinant hyoscyamine 6 β -hydroxylase from *Datura metel* L. [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 9(3): 966-967.
- [11] 陈林, 赵昱, 李海. 植物生长调节剂对药用植物三分三种子萌发的影响 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(14): 3361-3362.
- [12] 杨兴彪, 李海峰. 三分三种子萌发影响因素分析 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(17): 4142-4143.
- [13] 中国药典 [S]. 二部. 2015.
- [14] 国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准 [S]. 2002.
- [15] 张磊, 白青山, 王亮. 复方颠茄口服溶液中硫酸阿托品含量测定及质量标准研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(8): 1407-1409.
- [16] 张文婷, 高杰, 岳超, 等. HPLC 法同时测定颠茄片 5 个指标成分含量及特征图谱分析 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(12): 2154-2156.
- [17] 黄伟, 赵文婷, 赵维良, 等. 颠茄流浸膏真伪鉴别及含量测定方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 151-153.
- [18] 罗亚虹, 刘利敏, 刘红梅. 复方氢溴酸东莨菪碱贴膏含量测定方法 [J]. 中国药师, 2014, 17(1): 170-172.