

## 附子总生物碱提取物中3个双酯型和3个单酯型乌头碱成分的含量测定

刘敏<sup>1</sup>, 张海<sup>2</sup>, 蔡亚梅<sup>3</sup>, 陈啸飞<sup>3</sup>, 朱臻宇<sup>3</sup>, 柴逸峰<sup>3</sup> (1. 南京军区联勤部药品仪器检验所, 江苏南京 210002; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438; 3. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 提取附子总生物碱, 采用高效液相色谱法同时测定附子总生物碱提取物中苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱6个成分的含量。方法 采用85%的乙醇回流提取附子药材, 经大孔吸附树脂柱分离后, 制得附子总生物碱提取物, 采用 Waters Terra C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm × 100mm, 3.5 μm); 流动相为 A: 乙腈, B: 水(5 mM 醋酸铵), 梯度洗脱, A 相随着时间的变化: 15% ~ 26% (0 ~ 10 min), 26% ~ 30% (10 ~ 20min), 30% (20 ~ 25 min); 流速 0.5 ml/min; 检测波长 235 nm; 柱温 25 °C; 进样量 5 μl。结果 6个生物碱成分苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱在 20 min 内实现完全分离, 在 11.40 ~ 114.0、10.22 ~ 102.2、10.36 ~ 103.6、6.250 ~ 62.50、13.50 ~ 135.0、15.12 ~ 151.2 μg/ml 的线性范围内, 线性关系良好 ( $r > 0.999$ )。方法学考察结果表明, 日内日间精密密度, 最低检测限和定量限的范围均符合含量测定的要求, 加样回收率 ( $n = 6$ ) 分别为 104.52% (RSD = 2.0%)、103.43% (RSD = 1.6%)、101.92% (RSD = 2.3%)、99.45% (RSD = 2.7%)、97.67% (RSD = 1.9%)、101.15% (RSD = 3.4%)。结论 该方法简便、准确、可靠, 可用于附子提取物中6个乌头碱成分的含量测定。

**[关键词]** 附子总生物碱; 高效液相色谱法; 含量测定

**[中图分类号]** R282.710.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2013)03-0181-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.03.006

## Simultaneous determination of six alkaloids in alkaloids extract of *Radix Aconiti Praeparata* (Fuzi) by HPLC

LIU Min<sup>1</sup>, ZHANG Hai<sup>2</sup>, CAI Ya-mei<sup>3</sup>, CHEN Xiao-fei<sup>3</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>3</sup>, CHAI Yi-feng<sup>3</sup> (1. The Institute of Quality Control of Medical Material and Equipment under the Joint Logistic Department of Nanjing Command, Nanjing 210002, China; 2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China; 3. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To extract alkaloids in *Radix Aconiti Praeparata* (Fuzi) and determine the contents of six alkaloids benzoylmesaconine, benzoylaconine, benzoylhyaconine, mesaconine, aconine and hyaconine by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The crude herb Fuzi was extracted by 85% ethanol, and separated by macroporous resin column. HPLC condition was as follows: Chromatographic column: Waters Terra C<sub>18</sub> (3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm); Mobile phase: A was acetonitrile, B was water (5 mM ammonium acetate), with gradient elution, the gradient of A phase: 15% ~ 26% (0 ~ 10 min), 26% ~ 30% (10 ~ 20 min), 30% (20 ~ 25 min); flowing rate: 0.5 ml/min; detection wave: 235 nm; column temperature: 25 °C; injection volume: 5 μl. **Results** Six alkaloids, including benzoylmesaconine, benzoylaconine, benzoylhyaconine, mesaconine, aconine and hyaconine were separated at baseline within 25 min with good linear ( $r > 0.999$ ) between 11.40 ~ 114.0, 10.22 ~ 102.2, 10.36 ~ 103.6, 6.250 ~ 62.50, 13.50 ~ 135.0, 15.12 ~ 151.2 μg/ml. The result of intra-day and inter-day precisions, limits of detection and quantitation were at normal range. Each of the recovery rates ( $n = 6$ ) was 104.52% (RSD = 2.0%), 103.43% (RSD = 1.6%), 101.92% (RSD = 2.3%), 99.45% (RSD = 2.7%), 97.67% (RSD = 1.9%), 101.15% (RSD = 3.4%). The contents of six alkaloids in Fuzi alkaloids extract were determined. **Conclusion** The method was rapid, simple, reliable and could be used to determine six alkaloids in Fuzi alkaloids extract.

**[Key words]** Fuzi alkaloids extract; HPLC; determination

附子 (*Aconiti Lateralis Radix Praeparata*) 为毛茛科 (*Ranunculaceae*) 乌头属 (*Aconitum*) 植物乌头 (*Aconitum Carmichaelii* Debx.) 子根的加工品, 其味辛、甘、性热、有毒, 入心、脾、肾经, 具有回阳救逆、温补

**[作者简介]** 刘敏 (1974-), 女, 博士, 主管药师。E-mail: lm\_yaofen2003@163.com.

**[通讯作者]** 柴逸峰。Tel: (021) 81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn.

肾阳和祛寒止痛等功效<sup>[1]</sup>。附子生品有大毒,其主要成分为二萜类生物碱,分为双酯型乌头碱、单酯型乌头碱和胺醇型乌头碱,其中双酯型乌头碱的毒性最大,但活性也最强,单酯型乌头碱毒性较小,活性较强,而醇胺型生物碱毒性和活性最小<sup>[2]</sup>。炮制后的附子分为盐附子、黑附片和白附片3种,其毒性显著降低,而主要药理作用未改变,仍具有显著的抗心力衰竭、抗休克及镇痛作用<sup>[3]</sup>。

目前,有关附子生物碱的提取方法及相关文献报道较多<sup>[4-8]</sup>,但对于其中生物碱含量的测定多是采用化学滴定法或紫外法测定总生物碱的含量或是直接测定其中双酯型乌头碱含量来控制附子的质量、药效。由于附子的总生物碱中既包括毒性强的双酯型乌头碱,又包含毒性较小同时又具有一定活性的单酯型生物碱,还包含活性和毒性较小的醇胺型生物碱,所以,仅仅测定附子提取物中总生物碱的含量很难保证附子的药效和毒性,有必要建立一种既能测定双酯型乌头碱又同时测定单酯型乌头碱含量的测定方法,这样既能控制其毒性,保证临床用药的安全性,又确保了其临床疗效<sup>[9-12]</sup>。

## 1 仪器和试剂

**1.1 仪器** Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括 G1379A 真空脱气机, G1311A 四元泵, G1367A 自动进样器, G1316A 柱温箱和 G1315B DAD 检测器; KUDOS-SK2200H 超声发生器(上海科导超声仪器公司); METTLER AE240 型十万分之一电子天平(德国梅特勒公司); DJ-04 药材粉碎机(上海淀久公司)。

**1.2 药品和试剂** 苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱(纯度 >98.0%)购自中国药品生物制品检定所,淡附片(产地:江苏,批号:2011070107)购自上海雷允上中药饮片厂,经第二军医大学生药教研室孙连娜副教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品,符合 2010 版中国药典标准。HPLC 级甲醇购自 Burdick&Jackson 公司(Honeywell, USA), HPLC 级乙腈购自 Merck 公司(Darmstadt, Germany), HPLC 级甲酸购自 Fluka 公司(Buchs, Switzerland), 水为娃哈哈纯净水,其余试剂为分析纯。

## 2 方法和结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、新乌头碱、

乌头碱和次乌头碱各 11.40、10.22、10.36、6.25、13.50、15.12 mg,置 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度分别为 1.140、1.022、1.036、0.625、1.350、1.512 mg/ml 的母液。精密吸取上述对照品溶液各 100  $\mu$ l,分别置 1 ml 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得 6 个成分的混合对照品溶液,然后依次用甲醇逐级稀释,即得系列浓度的混合对照品溶液,置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

**2.1.2 附子总生物碱提取物的制备** 将 10 kg 附子药材粉碎至中粉,加 10 倍药材量的体积分数为 85% 的乙醇溶液作为溶剂,加热回流提取 2 次,每次 2 h,回收乙醇,浓缩至 10 L,调节提取液的 pH 值至 3.0~4.0,静置 12 h,取上清,过 D101 大孔吸附树脂柱,先用 5 倍柱体积蒸馏水除杂,再用 5 倍柱体积的 80% 乙醇洗脱,得附子总生物碱提取液,浓缩干燥得每 1 ml 含 1 g 附子药材的总生物碱提取物。

**2.1.3 附子总生物碱提取物样品溶液的制备** 精密吸取上清液 300  $\mu$ l 加 700  $\mu$ l 乙腈,涡旋 30 s,至离心机中 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液进样分析。

**2.2 色谱条件** 色谱柱: Waters Terra C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm  $\times$  100 mm, 3.5  $\mu$ m); 流动相为 A: 乙腈, B: 水(5 mM 醋酸铵), 梯度洗脱, A 相随时间的变化: 15%~26% (0~10 min), 26%~30% (10~20 min), 30% (20~25 min); 流速 0.5 ml/min; 检测波长 235 nm; 柱温 25  $^{\circ}$ C; 进样量 5  $\mu$ l。按出峰顺序 6 个生物碱成分苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的保留时间分别为: 9.566、11.019、12.125、18.057、20.062、21.065 min。根据混合对照品的色谱图中 6 个峰的相关参数计算系统适用性,其理论塔板数分别为: 22 785、23 598、13 962、8 982、36 751、22 374,分离度分别为: 26.92、4.07、3.14、15.04、4.01、1.82,脱尾因子分别为: 0.941、0.938、0.942、0.955、0.909、0.885。混合对照品、附子总生物碱提取物的 HPLC 色谱图,如图 1 所示。

**2.3 线性关系的考察** 分别将“2.1.1”项下制备的不同浓度的系列对照品溶液按“2.2”项下色谱条件依次连续进样,分别重复 3 次,以对照品溶液浓度(X,  $\mu$ g/ml)对峰面积(Y)进行线性回归,呈良好的线性关系,见表 1。

**2.4 精密度实验** 取“2.1.1”项下制备的系列混合对照品溶液在 1 d 以内分别连续进样 6 次,根据所得峰面积分别考察日内精密度和日间精密度。结果 6 个指标性成分的日内、日间精密度 RSD 均 < 5%,表明方法的精密度良好。

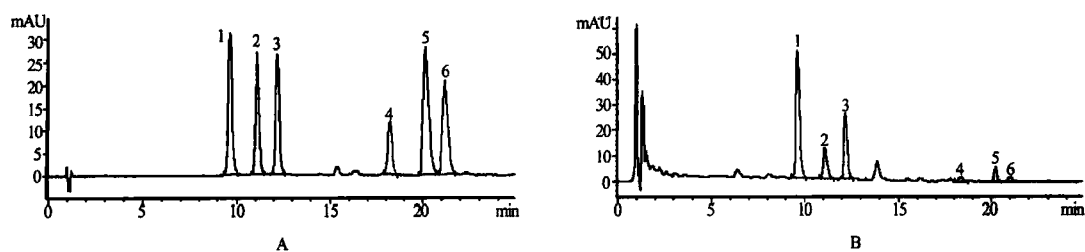


图1 混合对照品溶液(A);附子总生物碱提取物(B)的HPLC色谱图

1-苯甲酰新乌头碱;2-苯甲酰乌头原碱;3-苯甲酰乌头次碱;4-新乌头碱;5-乌头碱;6-次乌头碱

表1 6个生物碱成分的线性关系

成分	回归方程	线性范围(μg/ml)	r
苯甲酰新乌头碱	Y = 14.52X + 1.293	11.40 ~ 114.0	0.999 6
苯甲酰乌头原碱	Y = 12.66X + 0.965 5	10.22 ~ 102.2	0.999 7
苯甲酰乌头次碱	Y = 11.08X + 0.864 7	10.36 ~ 103.6	0.999 9
新乌头碱	Y = 11.58X - 0.985 1	6.250 ~ 62.50	0.999 2
乌头碱	Y = 17.09X + 1.052	13.50 ~ 135.0	0.999 0
次乌头碱	Y = 9.669X + 0.778	15.12 ~ 151.2	0.999 3

**2.5 定量限和检测限考察** 将6个对照品溶液以此进行稀释,以信噪比10:1时,确定其最低定量限;以信噪比3:1时,确定其最低检测限。6个指标性成分的最低定量限分别为5.70、5.11、5.18、6.25、6.75、7.56 μg/ml;最低检测限分别为2.85、2.56、2.59、3.125、3.375、3.28 μg/ml。

**2.6 稳定性实验** 取制备的附子生物碱提取物样品溶液,分别在0、2、4、6、8、12、24 h测定6个成分的峰面积,考察其稳定性。结果6个成分峰面积的RSD分别为2.53%、0.72%、3.44%、1.81%、2.19%、1.43%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

**2.7 重复性实验** 分取同一批附子总生物碱提取物6份,按“2.1.2”项方法分别制成样品溶液,进样分析。提取物中6种成分的平均含量和RSD(n=6)分别为549.8 μg/ml(RSD=0.37%)、160.4 μg/ml(RSD=1.33%)、309.6 μg/ml(RSD=0.84%)、

5.425 μg/ml(RSD=3.46%)、15.64 μg/ml(RSD=2.62%)、4.932 μg/ml(RSD=1.11%),表明方法的重复性良好。

**2.8 加样回收率实验** 精密吸取已知含量的同一批次附子总生物碱提取物样品6份各5 ml,置10 ml量瓶中,精密加入各对照品溶液1 ml,定容到10 ml。依法测定,计算回收率。苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的加样回收率和RSD分别为104.52%(RSD=2.0%)、103.43%(RSD=1.6%)、101.92%(RSD=2.3%)、99.45%(RSD=2.7%)、97.67%(RSD=1.9%)、101.15%(RSD=3.4%)。结果表明,采用本法同时测定6种成分的含量,其加样回收率结果良好。

**2.9 样品测定** 按“2.1.2”项下方法制备3个批次的附子总生物碱提取物样品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样分析计算样品含量,结果见表2。

表2 附子总生物碱提取物中6个生物碱的含量测定结果

编号	苯甲酰新乌头碱	苯甲酰乌头碱	苯甲酰乌头次碱	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱
1	549.8 ± 1.3	160.4 ± 2.1	309.6 ± 2.6	5.425 ± 0.033	15.64 ± 0.41	4.932 ± 0.055
2	522.1 ± 1.6	148.3 ± 2.6	322.5 ± 2.2	5.061 ± 0.018	16.08 ± 0.48	4.682 ± 0.071
3	551.8 ± 2.0	152.0 ± 1.1	315.3 ± 2.1	5.189 ± 0.046	15.21 ± 0.32	4.712 ± 0.062

### 3 讨论

**3.1 附子总生物碱的提取制备** 提取中,分别对附子中总生物碱提取率的各影响因素进行了考察,其因素包括乙醇浓度(A)、附子粒径(B)、料液比(C)、

提取时间(D),提取效果的影响的排序分别是乙醇浓度 > 粒径 > 料液比 > 提取时间,综合各项因素确定最终的提取条件为:采用10倍量85%的乙醇溶液,加热回流提取2次,每次2 h,回收乙醇,浓缩至10 L,调节提取液的pH值至3.0~4.0,静置12 h,

取上清,过 D101 大孔吸附树脂柱,先用 5 倍柱体积蒸馏水除杂,再用 5 倍柱体积的 80% 乙醇洗脱,得附子总生物碱提取液,浓缩干燥得每 1 ml 含 1 g 附子药材的总生物碱提取物。

**3.2 液相色谱条件的选择** 流动相的选择比较了甲醇-水和乙腈-水系统,由于测定的 6 个生物碱成分的最佳吸收波长在 235 nm,采用乙腈-水系统能够有效避免基线波动,有利于化合物的分离,所以采用乙腈-水系统进行分离分析。另由于乌头碱类成分都具有弱碱性,采用纯乙腈-水系统会出现峰拖尾现象,经考察在流动相的水相中加入 5 mM 的醋酸铵后,能够明显改善待分离色谱峰的拖尾现象。所以,最终的色谱条件采用乙腈和 5 mM 的醋酸铵进行分离分析。在此色谱条件下,6 个生物碱类成分在 25 min 内达到完全分离。

**3.3 附子中测定指标性成分的选择** 附子有大毒,其主要成分为二萜类生物碱,分为双酯型乌头碱、单酯型乌头碱和胺醇型乌头碱,其中双酯型乌头碱的毒性最大,活性最强,单酯型乌头碱毒性较小,活性较强,而醇胺型生物碱毒性和活性都较小。而炮制后的附子毒性大大降低,其主要原因在于其中的双酯型乌头碱转变为了单酯型乌头碱,所以,为控制附子的毒性,必须测定其中双酯型乌头碱的含量,为保证附子提取物的药效,有必要同时测定其中单酯型生物碱的含量,所以最终选择其中含量较高的 3 个双酯型乌头碱,包括苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱和 3 个单酯型乌头碱,包括新乌头碱、乌头碱、次乌头碱进行含量测定。

#### 4 小结

本实验通过加热回流提取及加样大孔吸附树脂

的方法分离制备了附子总生物碱提取物,建立了同时测定附子总生物碱中 3 个双酯型和 3 个单酯型乌头碱含量的测定方法,方法学结果表明:日内日间精密度,重复性,最低检测限,加样回收率均符合测定要求。

#### 【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 年版一部[S]. 2010:177.
- [2] 郑 琴,陆浩伟,郝伟伟,等. 乌头类双酯型生物碱水解转化规律及含量计算方法研究[J]. 中国药理学杂志,2011,46(9): 652.
- [3] 余葱葱,郭 力,彭 成. 毒-效双组分控制有毒中药附子临床单煎工艺研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(12): 3087.
- [4] 姚 琳,余丽丽,张茹月. 附子中总生物碱的提取工艺及含量测定[J]. 应用化工,2012,41(3): 486.
- [5] 赵神镭,唐 星. 附子总生物碱的提取纯化工艺[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(7): 433.
- [6] 彭拓华,张少俊,钟世顺,等. D101 型大孔树脂纯化附子生物碱[J]. 中国实验方剂学杂志. 2012,3:16.
- [7] 王健慧,李 勇,孙玉柱,等. 均匀设计法提取附子总生物碱的工艺研究[J]. 安徽农业科学. 2011,39(26):15920.
- [8] 刘 卓,晏 星,徐春霞,等. 附子总生物碱的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学. 2012,40(9): 5199.
- [9] 刘少静,王小库,朱改改,等. RP-HPLC 同时测定附子地上部分中新乌头碱和次乌头碱的含量[J]. 安徽医药,2011,15(9):1078.
- [10] 何 军,祝 林,奉建芳. 附子总生物碱含量测定方法比较[J]. 现代中药研究与实践 2003,17(6):20.
- [11] 郑 琴,陆浩伟,郝伟伟,等. 乌头类双酯型生物碱水解转化规律及含量计算方法研究[J]. 中国药理学杂志 2011,46(9): 652.
- [12] 赵英水,崔秀明,戴 云,等. 高效液相色谱法测定草乌类药用植物活性成分含量[J]. 中国药理学杂志,2007,42(11):815.

[收稿日期]2013-01-13

[修回日期]2013-04-26

(上接第 175 页)

- [12] 汪继敏,胡华琼. 龙胆泻肝汤内外合治急性湿疹临床观察[J]. 湖北中医药大学学报,2011,13(4):59.
- [13] 王小萍,秦亮甫. 秦亮甫教授治疗湿疹 150 例[J]. 上海中医药杂志,2001,7:31.
- [14] 吕玉华. 除湿止痒洗液与 0.05% 地奈德乳膏联合治疗婴儿湿疹疗效观察[J]. 浙江临床医学,2010,12(9):974.
- [15] 马玉红. 肛周局部封闭配合中药治疗肛门湿疹 158 例[J]. 中医研究,2011,24(7): 55.
- [16] 陈国勤. 慢性湿疹辨治杂谈[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(8):74.
- [17] 于 影. 血府逐瘀汤加蝉蜕治疗湿疹 170 例[J]. 河南中医,2008,28(5):63.
- [18] 郝桂峰,温成平. 中药内外合治顽固性湿疹 1 例[J]. 中国中医急症,2010,19(4):691.
- [19] 李广瑞,杨嗣福,欧阳恒. 湿疹治疗的难点及中医对策[J].

中国中西医结合皮肤性病学杂志,2010,9(4):253.

- [20] 胡晓军,李红玲. 除湿止痒软膏治疗皮炎湿疹类皮肤病疗效观察[J]. 中医临床研究,2011,3(17):41.
- [21] 张穆存,曹 宇,张彩虹. 中药熏洗外扑治疗肛门湿疹 108 例[J]. 陕西中医,2005,26(6):512.
- [22] 李 芳,李玉岭. 复方徐长卿洗剂治疗婴儿湿疹 235 例[J]. 中医外治杂志,2005,14(1):26.
- [23] 吕 波,吕 毅. 飞腾八法针法配合围刺治疗慢性湿疹 32 例[J]. 中国民间疗法,2011,19(8):17.
- [24] 李泽玲,林金海. 中西药方内服外敷治疗湿疹 120 例疗效观察[J]. 中国现代药物应用,2011,5(12):80.
- [25] 赵德成,赵 璐,胡春霞. 中西结合治疗慢性湿疹[J]. 中国社区医师医学专业,2011,23(13):190.
- [26] 庞 进,杨 琳. 大黄为主外用治疗皮炎湿疹类疾病经验点滴[J]. 中医外治杂志,2009,18(6):58.

[收稿日期]2012-07-19

[修回日期]2013-04-11