

生附子水煎过程中双酯型乌头碱溶出的动态变化研究

黄运东¹, 曾 婷², 张翠仙², 向 俊¹(1. 广东省中医院药剂科, 广东 广州 510120; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 研究生附子临床煎煮过程中双酯型乌头碱的溶出动态变化规律, 建立双酯型乌头碱含量与煎煮剂量和煎煮时间的关系。 **方法** 采用高效液相色谱法 (HPLC), Technologies Athena C₁₈-WP 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇(0.1 %三乙胺)-水(70 : 30), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 35 ℃, 检测波长: 235 nm。 **结果** 生附子水煎液中双酯型乌头碱水煎极不稳定, 随煎煮时间的增加, 乌头碱比例不断增加, 4 h 达到峰值。新乌头碱和次乌头碱相似, 均有下降趋势, 其中次乌头碱明显下降, 0.5 h 最高, 4 h 最低。 **结论** 该方法学考察符合定量要求, 结果准确, 可说明生附子临床水煎液中双酯型乌头碱的溶出动态变化规律。

关键词: 生附子; 水煎液; 双酯型乌头碱; 含量测定

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0349-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.028

Research on Dynamic Variation Patterns of Diester Diterpenoids Alkaloids in Raw Radix Aconiti Lateralis Under Different Clinical Decocting Condition

HUANG Yundong¹, ZENG Ting², ZHANG Cuixian², XIANG Jun¹(1. Pharmacy Department of Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou 510120 Guangdong, China; 2. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the dynamic variation of diester diterpenoids alkaloids in raw Radix Aconite Lateralis during decocting in clinic, and to explore the relationship of diester diterpenoids alkaloids contents with decocting time and the dosage. **Methods** HPLC analysis was performed on a Technologies Athena C₁₈-WP(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with methanol(0.1 % triethylamine) -water(70 : 30) as a mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was fixed at 35 ℃, and the wave length of detection was set at 235 nm. **Results** The diester diterpenoid alkaloids were extremely unstable during the decoction of raw Radix Aconite Lateralis, and the content of aconitine showed a tendency of increasing gradually, and then reached the peak value after decocting for 4 hours. The contents of mesaconitine and hypaconitine showed the same decreasing trend. Hypaconitine content arrived the highest after decocting for 0.5 h, and was the lowest after decocting for 4 h. **Conclusion** The established quantitative method is feasible and precise. It can illuminate the changes of diester diterpenoids alkaloids in Radix Aconite Lateralis during decocting in clinic.

Keywords: Raw Radix Aconite Lateralis; Decocting in clinic; Diester diterpenoid alkaloids; Content and dynamic variation

生附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 子根的加工品, 始载于《神农本草经》, 具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛之功效^[1]。现代药理研

究表明生附子主要毒、效成分均为双酯型乌头碱(包括乌头碱、次乌头碱、新乌头碱)。此类乌头碱毒性极大, 人口服 0.2 mg 乌头碱即可出现中毒症状^[2]。临

收稿日期: 2013-09-22

作者简介: 黄运东, 男, 主管中药师, 学士, 研究方向: 中药处方调剂及管理研究。Email: HYD1391@sohu.com。通讯作者: 向俊, 中药师, 学士, 研究方向: 临床中药学及中药化学成分和质量标准研究。Email: doctortom1986@yahoo.com.cn。

基金项目: 广东省科技计划重点项目(2010A03010003); 广东省中医药局科研课题项目(20121177)。

床上大多久煎后服用,但随着煎煮时间的延长,其药理活性亦随之减弱或消失^[3]。因此,控制好煎煮时间是保证其临床安全用药的关键。尽管有文献^[2]报道附子煎煮过程中酯类生物碱的变化规律,附子炮制品及其配伍煎煮条件的研究^[4-5],但关于生附子临床用药安全的研究鲜见报道。本研究以3种双酯型乌头碱为指标,结合临床生附子用药:剂量大,煎煮时间长等特点^[6],在不同煎煮时间、不同剂量条件下,对双酯型乌头碱的溶出含量进行考察,为指导生附子临床用药提供科学依据,同时也为其复方物质基础研究打下基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器 LC-20A 高效液相色谱仪(SPD-M20A 二极管阵列检测器、LCsolution 色谱工作站),日本岛津公司;RE-201D 恒温水油浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司;SH8-D(Ⅲ)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;D449710032 电子天平,广州市湘仪机电设备有限公司;WEH-203B 三用紫外分析仪,上海精科实业有限公司;KQ-500DB 超声波清洗器,广州市予华仪器有限公司。

1.2 试药 生附子,广州市药材公司,批号:YPA3D0001,经名老中药师刘俭鉴定,为四川江油产毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥子根;乌头碱、次乌头碱、新乌头碱标准品,江中集团中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号依次为:W01-100918, C-023-110822, X-011-110425;水为超纯水;甲醇、三乙胺,均为色谱纯,天津市富宇精细化工有限公司;其他试剂均为分析纯,天津市富宇精细化工有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Technologies Athena C₁₈-WP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇(0.1%三乙胺)-水(70:30);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:235nm;柱温:35℃;进样量:10 μL;理论塔板数:按次乌头碱计算不低于8000;分离度:乌头碱(图1a-2)、次乌头碱(图1a-3)、新乌头碱(图1a-1)与相邻色谱峰的分离度均大于1.5。高效液相色谱图见图1。

2.2 对照品溶液制备 精密称取乌头碱2.3 mg,次乌头碱2.2 mg,新乌头碱2.5 mg,分别于10 mL容量瓶中用甲醇溶解并稀释至刻度,即得对照品溶液。依次精密吸取乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品

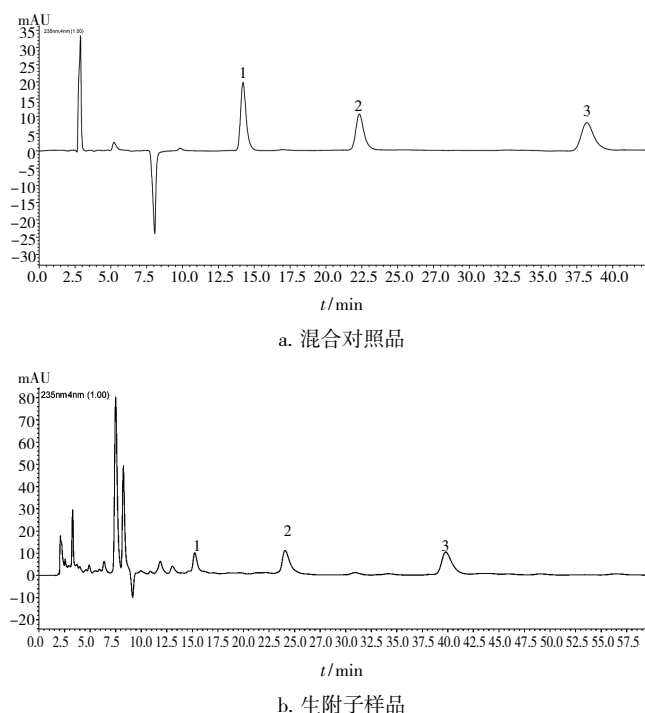


图1 生附子中3种双酯型乌头碱的HPLC图

Figure 1 HPLC results of the diester diterpenoids alkaloids

溶液各0.5 mL置10 mL容量瓶中用甲醇稀释至刻度,即得乌头碱质量浓度为0.0115 mg·mL⁻¹,次乌头碱质量浓度为0.0110 mg·mL⁻¹,新乌头碱质量浓度为0.0125 mg·mL⁻¹的混合对照溶液。

2.3 供试品溶液制备 按照汤剂煎煮方法制成生附子水煎液,煎煮完成后冷却,煎煮液体积约300 mL,将上述样品减压浓缩至大约110 mL,用等体积石油醚萃取2次进行脱脂,挥去溶剂后用3倍量95%乙醇沉糖,静置12 h,过滤,滤液减压浓缩成稠膏状,并用蒸馏水溶解至40 mL,调pH至10.00~11.00,用等体积氯仿萃取5次,每次静置1 h,合并氯仿液,60℃减压浓缩至无溶剂味,用甲醇定容至25 mL容量瓶,上清液用0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得含有生物碱的供试品溶液。以上储备液均保存于0℃冰箱中。

2.4 线性关系考察 精密吸取2.2项下乌头碱、次乌头碱、新乌头碱储备液适量,采用逐级稀释法配制乌头碱浓度为304, 152, 60.8, 30.4, 6.08, 3.04 μg·mL⁻¹,次乌头碱浓度为300, 150, 60.0, 30.0, 6.00, 3.00 μg·mL⁻¹,新乌头碱浓度为284, 142, 56.8, 28.4, 5.68, 2.84 μg·mL⁻¹。照2.1项下的色谱条件进样10 μL,测定峰面积,以峰面积积分值对各进样量进行线性回归,算得标准方程(见表1)。

2.5 精密度实验 取乌头碱、次乌头碱、新乌头碱混

表 1 线性关系试验结果

Table 1 Linear relationship test results of the diester diterpenoids alkaloids

名称	线性范围 / μg	回归方程	相关系数(r)
乌头碱	0.0608 ~ 3.040	$Y=0.4460X+0.06958$	0.9997
次乌头碱	0.0600 ~ 0.600	$Y=0.9381X+0.1669$	0.9992
新乌头碱	0.1136 ~ 8.520	$Y=0.3593X+0.04419$	0.9999

合对照溶液, 在 2.1 项色谱条件下, 重复进样测定 5 次, 记录峰面积值, 结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱 RSD 分别为 0.86 %、0.96 %、0.58 %, 表明仪器精密密度良好。

2.6 重复性实验 取同一批生附子水煎液 5 份, 照供试品制备方法平行制备供试品溶液, 按 2.1 项色谱条件测定, 记录峰面积值, 结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱 RSD 分别为 0.88 %、0.85 %、0.79 %, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性实验 取同一份生附子水煎供试品溶液, 室温放置 0, 2, 4, 8, 24 h 后, 按 2.1 项色谱条件测定, 记录峰面积值。结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱 RSD 分别为 0.83 %、0.97 %和 0.59 %, 表明供试品在测定环境中 24 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率实验 精密称取已知含量的 30 g 生附子 0.5 h 水煎液, 根据测得的样品中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的含量, 配制乌头碱、次乌头碱、新乌头碱含量为原样品 50 %含量的母液, 分别吸取 0.8, 1.0, 1.2 mL 标准溶液, 待水煎液冷却后依次加入其中, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液(共 9 份样品), 依法测定, 记录峰面积值。结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱平均回收率分别为 98.4 %、98.1 %、101 %。RSD 分别为 2.0 %、2.3 %、1.8 %。

2.9 样品含量测定 按 2.1 项色谱条件, 分别测定不同煎煮时间, 不同剂量的生附子水煎液中双酯型乌头碱的含量, 见表 2。

3 讨论

本实验根据生附子中有效成分的结构特点对 HPLC 检测的色谱条件进行优化研究。紫外光谱图显示 3 种双酯型乌头碱皆在 235 nm 附近有最大吸收, 且在该波长下所得色谱分离较好, 故选择 235 nm 作为检测波长。在建立 HPLC 方法时, 系统考察了不同比例流动相对分离效果的影响: 最终选择甲醇(含 0.1 %三乙胺)-水(70 : 30)作为本实验流动相, 经实验证实所选的色谱条件系统适用性好, 结果可靠。

为了更好地模拟生附子临床用药习惯, 指导其

表 2 生附子水煎液含量测定结果($n=2$, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Table 2 The contents of diester diterpenoids alkaloids in decoction of raw Radix Aconiti lateralis

煎煮时 间/h	新乌头碱			乌头碱			次乌头碱		
	生附子剂量/g								
	30	120	200	30	120	200	30	120	200
0.5	67.9	73.2	42.4	126	17.8	4.39	89.2	86.1	45.3
2	134	75.3	68.8	179	62.3	20.3	8.62	43.6	34.9
4	131	65.1	42.0	181	62.5	93.8	*	6.18	6.40

注: * 未检出。

临床用药, 本研究采用生附子为样品, 严格按照临床汤剂煎煮方法制成。研究结果表明, 煎煮过程中双酯型乌头碱溶出量波动较大, 且 3 种生物碱的溶出规律明显不同。

从 3 种双酯型乌头碱的溶出量看, 生附子用量以 30 ~ 120 g 为宜, 以免造成药材浪费和超大剂量使用。因为加大剂量其生物碱含量并没有增加反而减少。

乌头碱的溶出量随煎煮时间延长不断增加, 在 4h 达到最大值; 新乌头碱和次乌头碱二者溶出量相似, 随着时间的增加, 其含量均有下降趋势。但次乌头碱含量下降明显, 0.5 h 溶出量最高, 4 h 最低。提示煎煮时间对次乌头碱含量影响较大, 与文献报道一致^[7], 可能与次乌头碱的水解速率远大于溶出速率^[8]有关。

作为双酯型乌头碱中毒性最强的乌头碱^[9], 溶出量随着时间的增加而变大。煎煮时间从 0.5 h 增加至 4 h 时, 乌头碱的溶出量增加了 1 ~ 5 倍不等, 与次乌头碱的急剧减少形成明显对比。可能由于次乌头碱的水解产物对溶出后的乌头碱的水解和化学反应产生影响, 这将在后续实验中运用液质联用技术进一步探究。

从实验结果得出新乌头碱在煎煮过程中溶出量波动小、在 3 个双酯型乌头碱中保持较高比例的稳定特征, 建议用其作为作质量控制指标, 尤其是复方质量评价的补充^[8]。无论是发挥药效还是毒副作用, 作为复方汤剂中 3 个主要双酯型乌头碱之一的新乌头碱, 其高含量、高比例本身的原因还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(1 部)[M]. 北京: 中国医药科技, 2010: 177-178.
[2] 陈东安, 易进海, 黄志芳. 附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态

- 变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 64-68.
- [3] 龚义明, 邓广海, 林华. 不同煎煮时间对熟附子生物碱的影响[J]. 今日药学, 2011, 21(12): 727-733.
- [4] 秦素红, 章津铭, 何宇新. 基于化学组分动态变化的附子配伍甘草煎煮条件研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 20-23.
- [5] 丘小惠, 何洁. 煎煮时间及甘草配伍剂量对附子中酯型生物碱含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3015-3016.
- [6] 黄臻. 李可老中医“破格救心汤”治疗充血性心力衰竭的临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学第二临床医学院, 2012: 17-20.
- [7] 张丽, 李锦, 王玉明, 等. HPLC法测定附子配伍前后乌头类生物碱含量[J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29(4): 206-209.
- [8] 余葱葱. 附子临床汤剂应用有效物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 64-68.
- [9] 董欣, 王述敏, 李晓明. HPLC测定附子与“半蒺贝菖及”各药材配伍前后3种双酯型生物碱的含量变化[J]. 中药材, 2011, 34(12): 1891-1894.
- (编辑: 修春)

HPLC-ECD 法测定青蒿素溶解度及油水分配系数

王振华¹, 梁家龙¹, 曾令清², 田 军², 马国辉¹(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学科技产业园有限公司, 广东 广州 510445)

摘要: **目的** 建立一种便捷灵敏的青蒿素含量测定方法, 并测定其在不同溶剂中的溶解度及油水分配系数。 **方法** 均匀试验设计优化青蒿素的柱前衍生条件, 采用 HPLC-ECD 法进行测定。 **结果** 优化的青蒿素柱前衍生条件为: 1 mL 青蒿素无水乙醇溶液与 4 mL 氢氧化钠 0.01 mol·L⁻¹ 于 70 ℃ 水浴中反应 50 min 后, 冷却至室温, 再加入 5 mL 醋酸 0.06 mol·L⁻¹。青蒿素在 0.0015~0.7500 μg 范围内线性关系良好。 **结论** 建立的柱前衍生 HPLC-ECD 法专属性强、灵敏度高, 适用于青蒿素的测定。

关键词: 青蒿素; HPLC-ECD; 柱前衍生

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0352-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.029

Determination of Solubility and Oil-water Partition Coefficient of Artemisinin by HPLC-ECD

WANG Zhenhua¹, LIANG Jialong¹, ZENG Lingqing², TIAN Jun², MA Guohui¹(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Science and Technology Park Co., Ltd, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China)

Abstract: **Objective** To establish a sensitive assay method for artemisinin, and to detect the solubility as well as its oil-water partition coefficient in different solvents. **Methods** The pre-column derivatization of artemisinin was optimized by uniform design, and the determination of artemisinin was performed by HPLC-ECD. **Results** The optimal pre-column derivatization conditions were as follows: one milliliter of artemisinin anhydrous ethanol solution and 4 mL 0.01 mol·L⁻¹ sodium hydroxide were reacted in 70 ℃ water bath for 50 min, and then cooled to room temperature with 5 mL of 0.06 mol·L⁻¹ acetic acid added. The content of artemisinin showed good linearity in the range of 0.0015~0.7500 μg. **Conclusion** The pre-column derivatization HPLC-ECD method is highly specific and sensitive, and can be used for the assay of artemisinin.

Keywords: Artemisinin; HPLC-ECD; Pre-column derivatization

收稿日期: 2013-11-26

作者简介: 王振华, 男, 副教授, 博士, 研究方向: 新剂型、新技术应用。Email: wzh@gzucm.edu.cn。

基金项目: 中柬第三方检测平台建设项目(2012年广州市白云区国际科技合作计划项目)(2012-KQ-23)。