

不同产地粉防己中粉防己碱和防己诺林碱的含量测定

陈伟英¹, 叶泽婷¹, 徐方方¹, 吴云山¹, 刘博¹, 果德安^{1,2} (1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州市中药活性成分手性研究重点实验室, 广东 广州 510006; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: **目的** 比较不同产地粉防己中粉防己碱和防己诺林碱的含量, 为该药材的质量控制提供科学依据。**方法** 采用高效液相色谱法, 以 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.3%三氟乙酸+0.5%三乙胺, 梯度洗脱; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL; 柱温: 25 °C; 检测器为 DAD 检测器; 检测波长为 280 nm。**结果** 在上述条件下, 粉防己碱、防己诺林碱线性范围分别是: 1.56~200 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$)、1.56~200 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$); 精密度、重复性和加样回收率均符合含量测定要求。不同产地的粉防己药材中防己诺林碱含量范围为 0.43%~1.05%, 粉防己碱的含量范围为 0.90~2.23%。**结论** 该试验所建立的方法可为粉防己的质量控制提供科学的依据。不同产地粉防己质量均较好, 但粉防己碱和防己诺林碱的含量存在较大的差异。

关键词: 粉防己; 高效液相色谱法; 粉防己碱; 防己诺林碱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)11-1716-04

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.11.017

Simultaneous Determination of Tetrandrine and Fangchindine in *Stephania tetrandra* from Different Habitats by HPLC

CHEN Weiying¹, YE Zeting¹, XU Fangfang¹, WU Yunshan¹, LIU Bo¹, GUO De'an^{1,2} (1. The Second Clinical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Key Laboratory of Chirality Research on Active Components of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To compare the contents of tetrandrine(TET) and fangchindine(FAN) in *Stephania tetrandra* (or *Stephaniae tetrandrae* radix, STR) from different habitats, so as to provide scientific basis for the quality control of STR. **Methods** The separation was conducted on Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a linear gradient of acetonitrile-(0.3% trifluoroacetic acid - 0.5% triethylamine). The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the injection volume was 10 μL at a column temperature of 25 °C. Detection was performed at 280 nm using diode array detector. **Results** The linear ranges of TET and FAN were 1.56~200 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$) and 1.56~200 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$); precisions, repeatability and recoveries conformed the requirements of content determination. The contents of FAN in samples from different habitats ranged from 0.43% to 1.05%. The contents of TET in samples from different habitats ranged from 0.90% to 2.23%. **Conclusion** The established method can provide scientific basis for the quality control of STR. The contents of TET and FAN were generally high in STR but with large variation in samples of different origins.

Keywords: *Stephania tetrandra*; HPLC determination; tetrandrine; fangchindine

收期日期: 2021-04-29

作者简介: 陈伟英, 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 中药质量控制及体内代谢。Email: weiyingchen2007@163.com。通信作者: 果德安, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 中药质量控制及体内代谢。Email: daguo@simm.ac.cn。刘博, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药化学与结构优化。Email: doctliu@263.net。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1707900); 广东省中医药局科研项目(20211186); 广州市科技局重点实验室项目(202002010004); 广东省重点领域研发计划项目(2020B1111110007); 广州中医药大学一流学科建设项目(2021XK69); 中医湿证国家重点实验室专项(SZ2021ZZ33)。

粉防己为防己科植物粉防己(*Stephania tetrandra* S. Moore)的干燥根^[1], 始载于《神农本草经》, 距今已有两千多年的药用历史, 是中医及瑶族、壮族等多民族的常用药材。其味苦, 性寒, 归膀胱、肺经, 具有祛风止痛、利水消肿的功效, 用于风湿痹痛, 水肿脚气, 小便不利, 湿疹疮毒^[2]。粉防己的主要化学成分为生物碱类, 其中防己诺林碱和粉防己碱作为主要药效成分, 被《中国药典》(2020 版)规定为粉防己质量评价的指标成分^[1]。粉防己具有抗多药耐药、抗心血管系统、抗癌、抗矽肺、抗类风湿性关节炎等多种药理作用^[3-7]。粉防己碱对 Ca^{2+} 通道具有拮抗作用, 在保护心血管系统、抗纤维化、抗炎镇痛、抗肿瘤方面均有药理活性^[2]; 防己诺林碱在抗肿瘤、抑制增生性瘢痕等方面有显著的生物活性^[8]。作为传统中药材, 粉防己的市场需求量在不断增加, 而野生粉防己资源逐渐减少, 粉防己药材供不应求。为满足市场需求, 人工种植已成为粉防己药材的重要来源, 种植基地的主要产区分布于江西的中北部和与其接壤的皖南地区及与湖北交界处。受粉防己高价刺激, 产区延伸至江西福建交界处的武夷山区及与湖南交界的老山区等地^[9]。为保证其用药安全有效, 建立高效、简便的方法测定粉防己中的粉防己碱和防己诺林碱的含量非常重要。《中国药典》(2020 版)中粉防己含量测定方法的流动相为乙腈-甲醇-水-冰醋酸(40:30:30:1), 同时还需添加气泡多、消泡时间长的十二烷基磺酸钠, 配制方法复杂^[1]; 供试品制备时采用加热回流的方法, 操作不够简便。因此, 本研究拟优化供试品制备方法, 建立粉防己中粉防己碱和防己诺林碱的高效液相色谱(HPLC)法, 并测定 24 批具有代表性产地的粉防己中粉防己碱和防己诺林碱的含量, 探讨不同产地的粉防己药材的质量差异。

1 仪器、材料与样品

1.1 仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪(包括四元泵、DAD 检测器, 美国 Agilent 公司); 8510 超声波清洗器(美国 Branson 公司); BT125D 电子天平(十万分之一, 赛多利斯科学仪器北京有限公司); 5418R 冷冻式离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 材料 粉防己对照药材(批号: 121279-201502), 中国食品药品检定研究院; 粉防己碱对照品(批号: 110711-201810)、防己诺林碱对照品(批号: 110793-201807), 中国食品药品检定研究院, 质量分数均大于 99%; 甲醇、乙腈(色谱级, 默克股

份有限公司); 三氟乙酸、三乙胺(分析纯, 麦克林公司); 水为超纯水(默克密理博有限公司 ELIX 超纯水系统制备); 24 个批次不同产地粉防己药材, 由上海药物研究所果德安教授鉴定为防己科植物粉防己(*Stephania tetrandra* S. Moore)的干燥根。样品来源信息见表 1。

表 1 粉防己药材样品的产地信息

Table 1 The habitats of STR samples

编号	产地	编号	产地
S1	山西长治市武乡县	S13	江西省赣州市赣县
S2	河北保定市徐水县	S14	江西省上饶市玉山县
S3	湖南省常德市	S15	江西省宜春市丰城县
S4	福建省福州市	S16	江西省宜春市靖安县
S5	广东省茂名市	S17	湖南省株洲市攸县
S6	江西省赣州市	S18	湖南省湘潭市湘潭县
S7	江西省吉安市吉安县	S19	湖南省怀化市中方县
S8	江西省九江市武宁县	S20	江西省赣州市赣县
S9	江西省萍乡市上栗县	S21	江西省南昌市南昌县
S10	江西省南昌市南昌县	S22	江西省萍乡市湘县
S11	江西省南昌市新建县	S23	江西省抚州市黎川县
S12	江西省宜春市宜丰县	S24	江西省九华药业有限公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为乙腈(A)-0.3%三氟乙酸+0.5%三乙胺(B), 梯度洗脱(0~30 min, 20%~40% A; 30~40 min, 40%~100% A), 检测器为二极管阵列(DAD)检测器, 检测波长: 280 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL ; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。空白样品、对照品与供试品(S1)的 HPLC 色谱图见图 1。

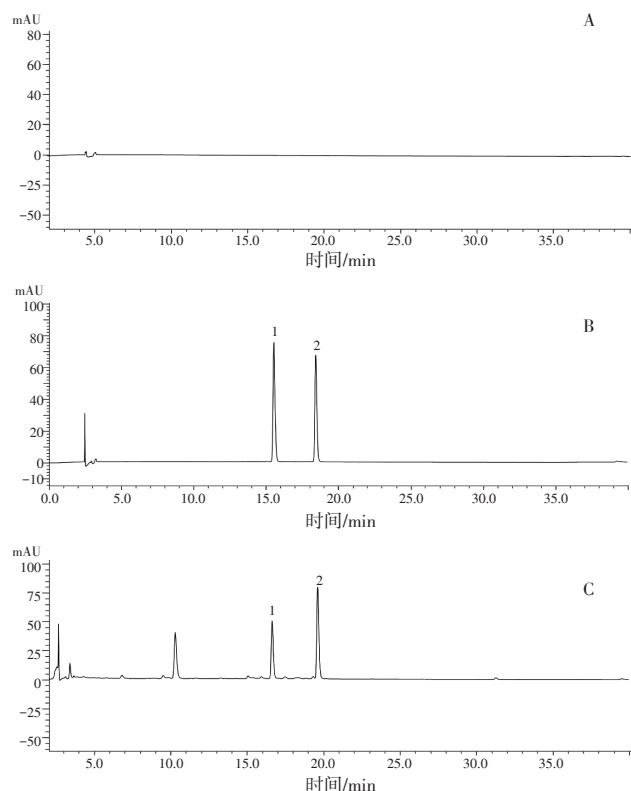
2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取粉防己碱和防己诺林碱对照品 5.00 mg, 置于 5 mL 容量瓶中, 加 80%甲醇水溶液至刻度, 制成 1 mg·mL⁻¹的对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取粉防己药材粉末 0.5 g, 加入 80%甲醇水溶液 20 mL, 超声(90 W)处理 15 min。重复提取 2 次, 合并滤液, 置于 50 mL 容量瓶中。加 80%甲醇水溶液至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别取“2.2.1”项下的粉防己



注: 1. 防己诺林碱; 2. 粉防己碱

图1 空白样品(A)、对照品(B)与供试品(C)的高效液相色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of control sample(A), reference substances(B) and sample 1 solution(C)

碱和防己诺林碱对照品储备液,以80%甲醇水溶液为溶剂,稀释5倍,得到质量浓度均为 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。再采用等倍稀释的方法,制备成质量浓度分别为200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,并记录相应的色谱峰面积。以对照品溶液质量浓度为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,进行线性回归分析,得到粉防己碱的标准曲线为 $Y=8\,518.4X+1\,347.5$, $r=0.999\,8$,线性范围为 $1.56\sim 200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;防己诺林碱的标准曲线为 $Y=6\,074X+954.69$, $r=0.999\,9$,线性范围为 $1.56\sim 200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.2 精密度试验 吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液,按“2.1”项下方法,连续进样6次。记录相应的色谱峰面积,计算得粉防己碱和防己诺林碱峰面积的RSD分别为2.64%、3.67%,表明方法精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一批次供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录相应的色谱峰面积,计算得粉防

己碱和防己诺林碱峰面积的RSD分别为2.33%、1.04%,表明此制备方法下供试品中的粉防己碱和防己诺林碱在24 h内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批粉防己药材6份,按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录相应的色谱峰面积,结果计算得粉防己碱和防己诺林碱的峰面积的RSD分别为2.21%、2.37%,表明方法重复性好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称定已知含量的粉防己药材粉末6份,每份0.25 g;另精密称定粉防己碱对照品和防己诺林碱对照品,配置成浓度分别为0.713、1.324 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,各取2 mL加入到供试品中,按“2.2.2”项下处理供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析,测得峰面积,分别计算回收率。结果防己诺林碱平均回收率为93.35%,RSD为1.50%;粉防己碱平均回收率为103.28%,RSD为1.67%。见表2。

表2 防己诺林碱和粉防己碱加样回收率试验结果

Table 2 Average recoveries of fangchinoline and tetrandrine

名称	原药材 含量/mg	加入 量/mg	测得 量/mg	回收 率/%	平均 值/%	RSD/%
防己诺林碱	1.42	1.42	2.74	92.96	93.35	1.50
	1.42	1.42	2.77	95.07		
	1.42	1.42	2.74	92.96		
	1.42	1.42	2.77	95.07		
	1.42	1.42	2.72	92.00		
	1.42	1.42	2.72	92.02		
粉防己碱	2.65	2.65	5.51	105.43	103.28	1.67
	2.65	2.65	5.47	104.13		
	2.65	2.65	5.39	101.11		
	2.65	2.65	5.40	101.66		
	2.65	2.65	5.43	102.70		
	2.65	2.65	5.48	104.64		

2.4 样品含量测定 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,测定粉防己碱和防己诺林碱的含量。结果24批次样品中,粉防己碱、防己诺林碱和两者合计的平均含量分别0.63%、1.40%和2.03%。见表3。

3 讨论

本研究对不同产地粉防己中粉防己碱和防己诺林碱的含量进行了测定。为了优化供试品制备的提取条件,本研究分别考察了不同的提取溶剂(二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇、80%甲醇、50%甲醇、20%甲醇)、提取方法(浸泡、回流和超声)、提取次数(1、2、3次),提取体积(10、15、20、25 mL)和

表 3 对照药材及 24 批药材样品的含量测定结果($n=3$)

Table 3 Contents of tetrandrine and fangchinoline in reference crude drug and 24 batches of STR($n=3$)

序号	产地	防己诺林碱/%	粉防己碱/%	合计/%
对照药材	中国食品药品检定研究院	0.54	1.28	1.82
S1	山西长治市武乡县	0.88	1.39	2.27
S2	河北保定市徐水县	0.67	1.59	2.26
S3	湖南省常德市	0.67	1.59	2.26
S4	福建省福州市	1.05	2.23	3.28
S5	广东省茂名市	0.89	1.96	2.85
S6	江西省赣州市	0.57	1.05	1.62
S7	江西省吉安市吉安	0.51	1.49	2.00
S8	江西省九江市武宁县	0.43	1.29	1.72
S9	江西省萍乡市上栗县	0.57	1.63	2.20
S10	江西省南昌市南昌县	0.50	1.41	1.91
S11	江西省南昌市新建县	0.67	1.40	2.07
S12	江西省宜春市宜丰县	0.68	1.43	2.11
S13	江西省赣州市赣县	0.63	0.90	1.53
S14	江西省上饶市玉山县	0.83	1.18	2.01
S15	江西省宜春市丰城县	0.61	1.61	2.22
S16	江西省宜春市靖安县	0.47	1.35	1.82
S17	湖南省株洲市攸县	0.63	1.13	1.76
S18	湖南省湘潭市湘潭县	0.64	1.62	2.26
S19	湖南省怀化市中方县	0.81	1.24	2.05
S20	江西省赣州市赣县	0.45	1.27	1.72
S21	江西省南昌市南昌县	0.51	1.37	1.88
S22	江西省萍乡市萍乡县	0.47	1.37	1.84
S23	江西省抚州市黎川县	0.46	1.21	1.67
S24	江西省九华药业有限公司	0.50	1.13	1.63

提取时间(10、15、30、45 min)等对提取效果的影响,最终确定最适的提取条件为:以 80%甲醇为溶剂,提取体积为 20 mL,超声提取 15 min,提取 2 次。本研究建立的 HPLC 测定方法操作简单、准确可靠,精密度、稳定性和重复性良好。

《中国药典》(2020 版)规定粉防己药材中含粉防己碱和防己诺林碱的总含量不得低于 1.6%。本研究 24 批不同产地的粉防己中,防己诺林碱含量在 0.43%~1.05%之间,粉防己碱含量在 0.90%~2.23%之间,总含量在 1.53%~3.28%之间。所有样品中,粉防己碱和防己诺林碱的总含量大于 1.6%的有 23 批,其中福建省福州市粉样品的指标成分含量最高

(3.28%);而江西省赣州市赣县地区样品指标成分的含量最低(1.53%),低于《中国药典》2020 版的规定,为不合格药材。表明不同产地样品所含有粉防己碱和防己诺林碱的含量差异大,本结果与赖晓莲^[10]和杨帆^[8]等的研究结果一致。

安徽皖南山区、浙江北部和江西中北部等地是粉防己的传统产区,湖南省的粉防己种植面积在近几年也逐渐扩大^[11]。本研究中 4 批来自湖南省的样品中防己诺林碱和粉防己碱的平均总含量为 2.09%,比 11 批传统产区江西省样品(1.87%)略高,表明湖南产粉防己药材质量良好;来自山西、河北、山西和广东各有 1 批样品,其质量均合格。可见,在本研究所收集的 24 批不同产地样品中,绝大多数样品符合《中国药典》的标准,质量较好,但各样品的含量差异较大。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 155-156.
- [2] 杨帆. 防己液相指纹图谱鉴别方法构建及不同产地防己药材质量差异分析[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.
- [3] KONG X, REN H, LIU EYL, et al. The cholinesterase inhibitory properties of *Stephaniae tetrandrae Radix*[J]. *Molecules*, 2020, 25 (24): 5914.
- [4] 王蓉, 马腾茂, 刘飞, 等. 防己的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 634-639.
- [5] 席苑, 张海静, 叶祖光, 等. 汉防己甲素现代药理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(1): 20-28.
- [6] 吴天成. 黄芩防己颗粒剂治疗风寒湿痹型类风湿关节炎的临床研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2019.
- [7] 王绍玉. 五苓散合防己黄芪汤治疗半月板损伤关节镜术后肿胀的临床研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [8] 杨帆, 吴梦丽, 高慧, 等. 高效液相色谱法同时测定防己药材中粉防己碱和防己诺林碱含量[J]. *南方农业学报*, 2019, 50 (11): 2545-2551.
- [9] 李全生. 不同产地防己药材质量对比研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [10] 赖晓莲, 郭圣茂, 彭仁, 等. 江西省不同产地粉防己主要药效成分含量分析[J]. *福建林业科技*, 2015, 42(1): 84-86.
- [11] 侯春香, 李德印, 王开堂, 等. 汉防己野生变种开发利用与半人工栽培繁殖技术[J]. *安徽农学通报*, 2017, 23 (13): 126-129.

(编辑: 梁进权)