

离子色谱法测定苍耳子中毒性成分羧基苍术 苷和苍术苷含量

刘鹏^{1,2}, 刘玉红², 刘云华², 黄志芳², 陈燕², 易进海^{2*}

(1. 四川医科大学, 四川 泸州 646000; 2. 四川省中医药科学院, 成都 610041)

[摘要] 目的:建立反相离子对色谱测定苍耳子中2种苍术苷毒性成分的新方法,解决现有分析方法时间长、专属性不强的问题。方法:采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),流动相乙腈-0.15% 磷酸二氢钠溶液(含 0.12% 四丁基氢氧化铵,磷酸调 pH 至 3.5)(39:61),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,紫外检测波长 203 nm。结果:在此色谱条件下,羟基苍术苷、苍术苷两种毒性成分 20 min 内即得到了良好分离,保留时间分别为 11.8, 17.8 min;实际进样量分别在 0.15~3.7 μg($r = 0.9999$)和 0.10~2.5 μg($r = 1.000$)呈良好线性关系;平均回收率分别为 101.4% (RSD 1.7%), 101.6% (RSD 1.2%)。结论:该方法快速、准确、专属性强、耐用性好,更适合用于苍耳子药材及制剂的安全性检测。

[关键词] 苍耳子; 反相离子对色谱; 羧基苍术苷; 苍术苷; 毒性成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0061-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040061

Ion Chromatography Method for Determination of Toxic Ingredients Carboxyatractyloside and Atractyloside in Xanthii Fructus

LIU Peng^{1,2}, LIU Yu-hong², LIU Yun-hua², HUANG Zhi-fang², CHEN Yan², YI Jin-hai^{2*}

(1. Sichuan Medical University, Luzhou 646000, China;

2. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective: To establish reversed phase ion pair chromatography method for the determination of two atractyloside toxicants in Xanthii Fructus. This method will shorten the analysis time and improve specificity compared with the former methods. **Method:** The chromatographic separation was carried out on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm). The mobile phase was composed of acetonitrile-0.12% tetrabutylammonium hydroxide in 0.15% sodium dihydrogen phosphate solution (pH of phosphoric acid was adjusted to 3.5) (39:61). The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 30 ℃, with detection wavelength of 203 nm. **Result:** Under the above conditions, two toxicants could be well separated in 20 min (11.8, 17.8 min, respectively). The actual sample size had good linear relationship within the range of 0.15-3.7 μg ($r = 0.9999$) and 0.10-2.5 μg ($r = 1.000$), respectively. The average recovery rate was 101.4% (RSD 1.7%) and 101.6% (RSD 1.2%), respectively. **Conclusion:** This method is quick, accurate, specific and durable, which can be used for safety detection of Xanthii Fructus herbs and their preparations.

[Key words] Xanthii Fructus; reversed phase ion pair chromatography; carboxyatractyloside; atractyloside; toxic ingredient

[收稿日期] 20150202(010)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2009CB522804);四川省科技厅基本科研业务专项(A-2014N-5)

[第一作者] 刘鹏,在读硕士,中药化学成分及质量标准研究,Tel:18121876827,E-mail:542373096@qq.com

[通讯作者] *易进海,研究员,从事中药化学成分及质量标准研究,Tel:028-85210843,E-mail:yijinhai63@163.com

苍耳子具有散风除湿、通鼻开窍的功效,临床上主要用来治疗风寒头痛、鼻渊流涕、风疹瘙痒、湿痹拘挛等^[1],为鼻科常用药。但近年来不断有服用苍耳子及其制剂而出现肾脏、肝脏、心脏损伤或是腹痛、恶心、呕吐等不良反应的报道^[2-3]。有关苍耳子的毒性物质基础,现代研究普遍认为其毒性成分主要为水溶性羧基苍术苷(CAT, carboxyatractyloside),苍术苷(AT, atractyloside)及其衍生物^[4-8]。

目前文献报道的苍术苷类毒性成分的含量测定方法有 HPLC-UV^[9-12], GC-MS^[13], LC-MS^[14-16] 和 HPLC-ELSD^[17], 其中, GC-MS, LC-MS, HPLC-ELSD 的普适性较差,对设备条件要求较高, HPLC-UV 的普适性和设备通用性均较好。本课题组曾报道 HPLC-UV^[9-11] 测定多批苍耳子中羧基苍术苷和苍术苷的含量,发现羧基苍术苷和苍术苷水溶性强,并且紫外仅为末端弱吸收,在检测波长 203 nm 条件下,受苍耳子中大量紫外强吸收的酚酸类成分的干扰, HPLC 图谱出峰较多,导致部分样品中待测组分分离度欠佳,直接影响定量的准确性和重复性。本次研究根据苍术苷类成分中含有磺酸基团的结构特征,选择四丁基铵阳离子为反离子,采用反相离子对色谱法能够提高出峰选择性,在 10 min 内有效消除酚酸类成分及绝大部分杂质的背景干扰, HPLC 图谱中干扰峰明显减少,苍术苷类毒性成分分离度得到显著提高。该方法为苍耳子及其制剂的质量控制提供了新的参考方法。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪,包括在线脱气机、四元泵、DAD 检测器、柱温箱、自动进样器、ChemStation 工作站(美国 Agilent 公司), KQ-300 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), AUW220D 型 1/10 万电子天平(日本岛津公司), Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司), Sorvall ST16R 型离心机(美国 Thermo Fisher 公司)。

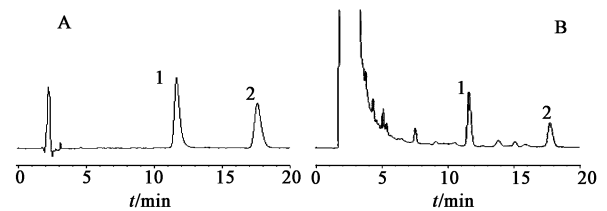
苍耳子药材收集于全国各省份,经四川省中药科学院中药研究所舒光明研究员鉴定为菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* 干燥成熟带总苞的果实,药材均烘干处理,粉碎后过 3 号筛备用。羧基苍术苷、苍术苷对照品为自制,经理化和光谱数据分析,鉴定其结构,纯度 >98.0%。乙腈为色谱纯,水为自制超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱

(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm), 流动相乙腈-0.15% 磷酸二氢钠溶液(含 0.12% 四丁基氢氧化铵, 磷酸调 pH 至 3.5)(39:61), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 进样量 10 ~ 20 μL。在此色谱条件下,所测成分 20 min 内出峰完毕,分离度、峰形均良好,符合定量分析要求,色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 羧基苍术苷; 2. 苍术苷

图 1 苍耳子 HPLC

Fig. 1 HPLC of Xanthii Fructus

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取羧基苍术苷、苍术苷对照品适量,精密称定,分别置于 10 mL 量瓶中,加水溶解至刻度,得质量浓度分别为 1.496, 1.008 g · L⁻¹ 的对照品储备液,各精密吸取 1 mL 置于同一 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得羧基苍术苷、苍术苷质量浓度分别为 0.149 6, 0.100 8 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取苍耳子粉末约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加水 20 mL,称重,超声(300 W, 40 kHz)处理 40 min,取出,放冷,补足减失的质量,摇匀,离心(12 000 r · min⁻¹, 6 min),取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 线性关系考察 精密吸取 2.2.1 项下混合对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,得到羧基苍术苷回归方程为 $Y = 387.67X - 2.8968$ ($r = 0.9999$), 线性范围 0.15 ~ 3.7 μg; 苍术苷的回归方程为 $Y = 454.14X - 2.0492$ ($r = 1.000$), 线性范围 0.10 ~ 2.5 μg。结果表明两组分在各自进样量范围内线性关系良好。

2.4 检测限与定量限 将 2.2.1 项下混合对照品溶液,用水逐级稀释,进样测定峰面积,按 3 倍(S/N = 3)和 10 倍(S/N = 10)信噪比测得羧基苍术苷和苍术苷的检测限分别为 4.7, 6.2 ng, 定量限分别为 15.8, 21.1 ng。

2.5 精密度试验 取 2.2.1 项下混合对照品溶液

按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,结果羧基苍术苷、苍术苷峰面积的 RSD 分别为 0.3%,0.2%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,于 0,2,4,6,12,24 h 进样测定,羧基苍术苷、苍术苷峰面积的 RSD 分别为 0.4%,0.5%。表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批次苍耳子粉末(河北安国)约 1.0 g,共 6 份,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下色谱条件进样分

析,结果羧基苍术苷、苍术苷的平均质量分数分别为 1.694,1.128 mg·g⁻¹;RSD 分别为 1.4%,1.9%。说明该方法的重复性良好。

2.8 回收率试验 取 2.7 项下已知含量的苍耳子样品约 0.5 g,共 6 份,精密称定,准确加入 2 种对照品储备液各 0.5 mL,按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下色谱条件进样分析,测定含量,计算回收率。结果羧基苍术苷、苍术苷平均回收率分别为 101.4%,101.6%;RSD 分别为 1.7%,1.2%。结果见表 1。

表 1 羧基苍术苷、苍术苷加样回收率试验

Table 1 Results of recovery tests of carboxyatractyloside and atractyloside

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
羧基苍术苷	0.497 3	0.842	0.748 0	1.599	101.2	101.4	1.7
	0.504 0	0.854		1.609	100.9		
	0.497 9	0.843		1.624	104.4		
	0.501 5	0.850		1.613	102.1		
	0.498 1	0.844		1.590	99.7		
	0.502 3	0.851		1.600	100.1		
苍术苷	0.497 3	0.561	0.504 0	1.082	103.3	101.6	1.2
	0.504 0	0.569		1.086	102.6		
	0.497 9	0.563		1.072	101.3		
	0.501 5	0.566		1.077	101.5		
	0.498 1	0.562		1.065	99.8		
	0.502 3	0.567		1.076	101.1		

2.9 样品测定 将不同来源的 22 批苍耳子依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行分析,结果见表 2。

3 讨论

3.1 流动相 pH 考察了流动相 pH 为 2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0,5.5 时对分离效果的影响,结果表明降低流动相 pH 目标峰保留时间延长,能够改善分离,可能是 pH 降低有利于形成电中性的离子对,从而使保留时间延长,但是酸性过强对色谱柱损伤较大,综合考虑确定 pH 为 3.5,在此 pH 下两目标峰分离良好。

3.2 离子对试剂浓度 考察了 0.03%,0.06%,0.12%,0.24% 共 4 个离子对试剂浓度对分离效果的影响,结果表明增大离子对试剂浓度可以延长保留时间,相对改善分离效果,但同时也造成苍术苷峰形拖尾,在保证羧基苍术苷、苍术苷峰分离效果良好的前提下,同时兼顾苍术苷峰形对称性的要求,离子

对试剂浓度以 0.12% 为佳。

3.3 耐用性考察 比较了 Agilent Eclipse XDB(4.6 mm×250 mm,5.0 μm),Phenomenex(4.6 mm×250 mm,5.0 μm),Supelco Discover(4.6 mm×150 mm,5.0 μm)3 种品牌的 C₁₈ 色谱柱对羧基苍术苷、苍术苷的分离效果,结果显示通过微调有机相比例均能实现基线分离,说明该方法耐用性较好。

3.4 不同方法的比较 本实验建立的反相离子对色谱测定苍耳子中羧基苍术苷和苍术苷含量的方法,与前期文献报道的 HPLC-UV^[9-12] 相比具有明显的优势,该方法专属性强,能够使紫外强吸收的酚酸类成分及绝大部分杂质都集中在 10 min 内出峰,而苍术苷类毒性成分则在 10 min 以后出峰,从而有效消除了大量杂质峰造成的背景干扰,使苍术苷类毒性成分分离度更佳,结果准确,重复性好。而且,该方法为等度洗脱,分析效率更高,可为苍耳子的质量控制提供新的参考方法。

表 2 不同来源苍耳子中羧基苍术苷和苍术苷的含量测定

Table 2 Contents of carboxyatractyloside and atractyloside in *Xanthii Fructus*

来源	羧基苍术苷	苍术苷
辽宁本溪	0.64	1.220
辽宁沈阳	2.77	0.252
山东枣庄	3.18	0.285
山东济南	2.29	0.451
湖北十堰	1.92	0.708
上海	0.97	1.510
安徽亳州	2.01	0.330
河北保定	3.40	0.421
河北安国	1.69	1.130
河北石家庄	2.92	0.390
新疆乌鲁木齐	2.02	0.468
青海西宁	3.40	-
四川成都	2.82	-
陕西西安	2.52	0.650
吉林长春	3.21	0.185
甘肃兰州	2.28	-
广西玉林	1.74	0.414
广东汕头	1.84	0.206
浙江宁波	3.01	0.317
内蒙古包头	2.95	-
呼伦贝尔	3.14	0.286
内蒙古赤峰	3.11	0.137

[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,2015:162.

[2] 张学梅,张重华. 苍耳子中毒及毒性研究进展[J]. 中西医结合学报,2003,1(1):71-73.

[3] 王璟,莫传丽,却翎,等. 苍耳子不良反应研究进展[J]. 中草药,2011,42(3):613-616.

[4] 阮贵华,李攻科. 苍耳子的化学成分及其分离分析研究进展[J]. 中成药,2008,30(3):421-426.

[5] 宋振玉,张凌云,谢明智,等. 苍耳子的有毒成分及其药理作用[J]. 药学报,1962,9(11):678.

[6] Macleod J K, Moeller P D, Franke F P. Two toxic

kaurene glycosides from the burrs of *Xanthium pungens* [J]. J Nat Prod,1990,53(2):451-455.

[7] Pebay Peyroula E, Dahout Gonzalez C, Kahn R, et al. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside [J]. Nature, 2003, 426 (6962):39-44.

[8] Obatomi D K, Thanh N T K, Brant S, et al. The toxic mechanism and metabolic effects of atractyloside in precision-cut pig kidney and liver slices [J]. Arch Toxicol,1998,72(8):524-530.

[9] 朵睿,陈燕,刘玉红,等. HPLC 测定苍耳子中羧基苍术苷和苍术苷的含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2313-2316.

[10] 刘玉红,朵睿,黄蛟,等. RP-HPLC 法测定苍耳子中苍术苷[J]. 中成药,2012,34(11):2166-2169.

[11] 韩燕全,洪燕,夏伦祝,等. UPLC 指纹图谱技术结合毒性成分含量优选苍耳子的炮制工艺[J]. 中国中药杂志,2014,39(7):1248-1254.

[12] 安靖,王耀登,盛昌翠,等. 苍耳子炮制前后羧基苍术苷和苍术苷的含量比较[J]. 药物分析杂志,2013,33(11):1910-1913.

[13] Laurens J B, Bekker L C, Steenkamp V, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of atractyloside in a patient poisoned with *Callilepis laureola* [J]. J Chromatogr B,2001,765(2):127-133.

[14] 陈璐璐,朱雅玲,杨柳,等. 4 种含苍耳子的复方颗粒中毒性成分苍术苷的含量测定[J]. 中药新药与临床药理,2013,24(3):297-300.

[15] Steenkamp P A, Harding N M, Van Heerden F R, et al. Identification of atractyloside by LC-ESI-MS in alleged herbal poisonings [J]. Forensic Sci Int,2006,163(1):81-92.

[16] Steenkamp P A, Harding N M, Heerden F R, et al. Determination of atractyloside in *Callilepis laureola* using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry [J]. J Chromatogr A,2004,1058(1):153-162.

[17] Calmes M, Crespín F, Maillard C, et al. High-performance liquid chromatographic determination of atractyloside and carboxyatractyloside from *Atractylis gummifera* L. [J]. J Chromatogr A, 1994, 663 (1): 119-122.

[责任编辑 顾雪竹]