

一测多评法同时测定附子中 5 种水溶性成分的含量

孙玲, 于广华, 火跃芳

(盐城卫生职业技术学院, 江苏 盐城 224005)

[摘要] **目的:** 建立一测多评的方法测定附子中 5 种水溶性成分含量的方法。**方法:** 以盐酸多巴胺为参照物, 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.2% 磷酸水, 梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 260, 280 nm, 对附子中 5 种水溶性成分进行含量测定并计算其相对校正因子, 采用外标法与一测多评法分别测定 10 批附子药材中的含量, 以验证一测多评法在附子水溶性成分含量测定中的准确性与可行性。**结果:** 建立用于测定附子中 5 种水溶性成分含量的一测多评方法, 并对 10 批附子药材进行测定, 其计算值与测定值的差异较小 (RSD < 5%)。**结论:** 一测多评法用于测定附子中 5 种水溶性成分的含量方法简单、有效, 结果准确无误, 可为后续的一测多评法的研究提供参考价值。

[关键词] 附子; 一测多评; 去甲猪毛菜碱; 盐酸多巴胺

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0084-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110084

Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker for Simultaneous Determination of Five Kinds of Water-soluble Components in Aconiti Lateralis Radix Praepapata

SUN Ling, YU Guang-hua, HUO Yue-fang

(Yancheng Institute of Health Science, Yancheng 224005, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) method for the determination of five kinds of water-soluble components in Aconiti Lateralis Radix Praepapata. **Method:** With hydrochloride dopamine as the reference, chromatographic separation was achieved on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The content in five kinds of water-soluble components of aconite was determined and relative correction factors were calculated with methanol-0.2% phosphoric acid water as the mobile phase with gradient elution, at column temperature of 30 ℃ and flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, with detection wavelength of 260 nm and 280 nm. External standard method and QAMS assay were used to respectively determine the contents in 10 batches of aconite medicinal materials and verify the accuracy and feasibility of QAMS. **Result:** QAMS was established for determining five kinds of water-soluble components of in Aconiti Lateralis Radix Praepapata, and 10 batches of aconite were measured. The difference between the calculated and measured values was small (RSD < 5%). **Conclusion:** QAMS for measure five kinds of water-soluble components in Aconiti Lateralis Radix Praepapata is simple, effective, accurate, and provides a reference for its subsequent evaluation study.

[Key words] Aconiti Lateralis Radix Praepapata; quantitative analysis of multi-components by single marker; norepinephrine salsoline; hydrochloride dopamine

附子始载于《神农本草经》, 具有回阳救逆、温阳就里、补火助阳、散寒止痛等功效, 为回阳救逆第一品, 临床上主要用于治疗心律失常、关节炎、恶性肿瘤的抑制等。研究发现, 附子的化学成分主要为

[收稿日期] 20160321(014)

[基金项目] 江苏高校品牌专业建设工程资助项目 (PPZY2015A097)

[第一作者] 孙玲, 硕士, 从事中药鉴定及中药分析研究, Tel: 15961932682, E-mail: vivianlovesun@163.com

生物碱、多糖及油脂类等,但其微量的水溶性成分如盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷等对心血管系统呈现出明显的药理学活性,如对抗不同类型的心律失常、扩张血管、抗炎、抗肿瘤或进行局部麻醉等^[1-5]。但附子中的部分水溶性成分含量较少,检测困难,故本实验建立对附子中水溶性成分(盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷)一测多评的检测方法^[6-9],为今后附子中水溶性成分的含量测定提供参考。

1 仪器与试剂

2695-2996型高效液相色谱系统(Empower工作站,美国Waters公司),Ultimate 3000型DGLC高效液相色谱仪(美国Dionex公司),Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),ZORBAX SB-Aq C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Agilent),Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),MS105DU型电子分析天平,AG285型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

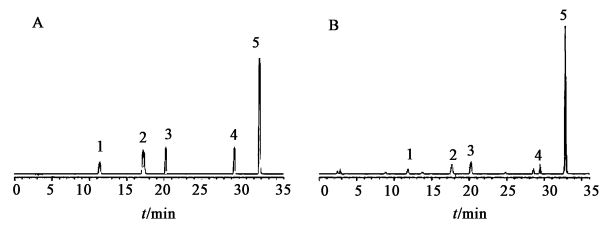
附子药材购自四川省江油、西昌和布拖等基地,由作者鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* 的子根。对照品盐酸多巴胺(中国食品药品检定研究院,批号100070-200405),去甲猪毛菜碱(为本实验室自制,经色谱分析,纯度 > 98.5%),尿嘧啶(北京盛世康普化工技术研究院,批号YY91786),尿苷(江苏诚意药业有限公司,批号11411474116),鸟苷(北京盛世康普化工技术研究院,批号YY95029),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 一测多评方法学考察

2.1.1 色谱条件与系统适应性 Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 0~12% A, 10~30 min, 12%~13% A, 30~35 min, 13%~25% A),柱温40℃,流速1.0 mL·min⁻¹,盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱检测波长280 nm,尿嘧啶、尿苷、鸟苷检测波长260 nm,洗脱时间40 min,进样量10 μL,5种化合物的对照品和样品色谱图见图1。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷适量,置25 mL量瓶中,加水至刻度,配制成盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷质量浓度分别为0.342 3, 0.031 2, 0.281 9, 0.205 1, 0.279 1 g·L⁻¹的混合对照品溶液,摇匀后备用。



1. 尿嘧啶; 2. 盐酸多巴胺; 3. 去甲猪毛菜碱; 4. 尿苷; 5. 鸟苷

图1 混合对照品(A)和附子样品(B)HPLC(280 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances and the *Aconiti Lateralis Radix Praepapata* (280 nm)

2.1.3 供试品溶液的制备 称取附子药材粉末(过65目筛)0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入水50 mL(含盐酸0.001 mol),称定质量,超声30 min,放冷至室温后再次称定质量,加水补足失去质量,摇匀,以0.45 μm微孔滤膜滤过,弃初滤液,备用。

2.1.4 线性范围 精密吸取2.1.2项下制备的混合对照品适量,加水溶解,配制成不同质量浓度的系列混合对照品溶液,按2.1.1项下的色谱条件进行测定。以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,计算回归方程。结果盐酸多巴胺回归方程 $Y = 35\,932.84X + 2\,083.53$ ($r = 0.999\,9$),去甲猪毛菜碱回归方程 $Y = 43\,843.5X + 8\,546.37$, ($r = 0.999\,9$),尿嘧啶回归方程 $Y = 53\,974.05X + 5\,243.6$ ($r = 0.999\,9$),尿苷回归方程为 $Y = 53\,474.15X + 53\,463.82$ ($r = 0.999\,8$),鸟苷回归方程为 $Y = 26\,137.27X + 5\,373.48$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷分别在0.125~2.807, 0.178~2.978 9, 0.201~4.432, 0.109~2.593, 0.109~3.327 μg呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取2.1.3项下制备的供试品溶液15 μL,按2.1.1项下色谱条件连续进样5次,测定各成分的峰面积,结果盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷相对峰面积的RSD分别为2.6%, 2.2%, 1.9%, 2.1%, 2.3%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取2.1.3项下制备的供试品溶液,室温放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h后按2.1项下色谱条件进样分析,测定。结果盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷峰面积的RSD分别为0.9%, 0.9%, 0.5%, 0.4%, 1.0%,说明其在24 h内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 平行称定6份附子药材粉末(过65目筛)各0.25 g,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,计算5种化合

物的含量,结果显示,盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷含量的 RSD 分别为 2.9% ,2.1% ,3.1% ,1.9% ,1.6% 。

2.1.8 加样回收试验 称取附子药材粉末(过 65 目筛)0.25 g,分别加入适量 2.1.2 项下制备的混合对照品溶液,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进行分析测定,计算附子药材的回收率,结果见表 1。

表 1 附子中 5 种水溶性成分的加样回收试验

Table 1 Sample recovery aconite in five kinds of water-soluble components

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
盐酸多巴胺	0.250 4	0.057 2	0.100 7	0.156 3	98.41	99.92	1.9
	0.250 2	0.056 2	0.100 2	0.152 5	96.11		
	0.250 9	0.055 7	0.100 3	0.159 8	103.79		
	0.250 3	0.055 2	0.100 2	0.157 3	101.90		
	0.250 5	0.055 6	0.100 1	0.155 8	100.10		
去甲猪毛菜碱	0.250 2	0.257 7	0.300 3	0.555 7	99.23	99.25	0.9
	0.251 3	0.256 1	0.300 1	0.562 2	102.00		
	0.250 3	0.256 6	0.299 6	0.552 6	98.80		
	0.250 7	0.256 8	0.300 3	0.552 1	98.33		
尿嘧啶	0.250 4	0.255 9	0.300 1	0.548 1	97.37		
	0.250 4	0.015 3	0.100 2	0.116 5	101.00	100.05	1.3
	0.250 6	0.015 5	0.100 1	0.113 6	98.00		
	0.251 1	0.015 3	0.099 8	0.116 8	101.70		
尿苷	0.250 5	0.015 1	0.100 4	0.115 8	100.30		
	0.250 9	0.015 2	0.100 2	0.114 7	99.30		
	0.250 5	0.056 1	0.100 3	0.153 2	96.81	99.47	1.7
	0.250 1	0.055 7	0.100 2	0.156 6	100.70		
	0.250 2	0.055 8	0.100 4	0.159 8	103.59		
鸟苷	0.250 6	0.055 1	0.100 1	0.153 9	98.70		
	0.250 8	0.056 6	0.099 7	0.158 3	102.01		
	0.250 5	0.066 2	0.100 1	0.164 1	97.80	100.57	1.1
	0.250 7	0.066 1	0.100 4	0.168 2	101.69		
	0.250 5	0.065 5	0.100 2	0.165 3	99.60		
0.250 7	0.065 2	0.100 1	0.163 2	98.73			
0.250 3	0.065 7	0.100 3	0.167 2	100.72			

2.2 相对校正因子的计算 以盐酸多巴胺为内标物,按照公式 $f_{ks} = f_k / f_s = W_k \times A_s / W_s \times A_k$,以 280 nm 检测波长下的所测得的 5 种成分的峰面积来计算盐酸多巴胺对去甲猪毛菜碱、尿嘧啶、尿苷、鸟苷的相对校正因子。结果见表 2。

表 2 5 种化合物的相对校正因子

Table 2 Relative correcting factors (RCFs) of five compounds

进样量 / μL	$f_{\text{盐酸多巴胺/去甲猪毛菜碱}}$	$f_{\text{盐酸多巴胺/尿嘧啶}}$	$f_{\text{盐酸多巴胺/尿苷}}$	$f_{\text{盐酸多巴胺/鸟苷}}$
2	0.616 8	0.231 4	0.390 6	0.810 1
5	0.590 7	0.221 2	0.400 2	0.813 2
10	0.626 1	0.234 7	0.402 5	0.810 3
15	0.608 3	0.236 5	0.391 5	0.812 2
20	0.628 8	0.240 1	0.396 2	0.808 8

2.3 系统适应性评价

2.3.1 不同液相色谱仪及色谱柱对相对校正因子的影响 取 2.1.2 项下制备的混合对照品,按 2.1.1 项下条件分别进样 5 次,每次 15 μL ,考察 Waters 2695-2996 高效液相色谱仪和 Ultimate 3000 DGLC 高效液相色谱仪和 Kromasil C_{18} 色谱柱, Agilent ZORBAX SB-Aq C_{18} , Diamonsil C_{18} 对相对校正因子的影响,按 2.2 项下公式计算,结果见表 3。

2.3.2 不同进样量对相对校正因子的影响 精密吸取 2.1.2 项下制备的附子混合对照品适量,按 2.1.1 项下条件进样,分别测定不同进样量(8, 10, 12, 14 μL)下色谱峰的峰面积,结果显示峰面积 RSD 依次为 1.5% ,1.7% ,1.2% ,1.6% ,1.5% ,表明柱温对附子药材的相对校正因子影响无显著差异。

2.3.3 不同实验员对相对校正因子的影响 精密吸取 2.1.2 项下制备的混合对照品溶液各 15 μL ,按 2.1.1 项下条件,由 3 名不同的实验员分别测定附子药材中 5 种水溶性成分的含量,计算 RSD,结果 RSD 分别为 2.4% ,2.6% ,2.8% ,2.5% ,1.8% ,表明不同的实验员对附子药材的相对校正因子无显著影响。

2.3.4 不同柱温对相对校正因子的影响 精密吸取 2.1.2 项下制备的混合对照品溶液各 15 μL ,按 2.1.1 项下条件进样,分别在 25,30,35,40,45 $^{\circ}\text{C}$ 下测定 5 种成分,结果峰面积的 RSD 依次为 2.0% ,2.9% ,2.9% ,2.1% ,2.3% ,表明柱温对附子药材的相对校正因子无显著影响。

2.3.5 待测组分色谱峰的定位 精密吸取 2.1.2 项下制备的混合对照品溶液,在 Ultimate 3000 DGLC 高效液相色谱仪谱仪中,分别采用 Kromasil C_{18} , Agilent ZORBAX SB-Aq C_{18} 和 Diamonsil C_{18} 3 种不同填料色谱柱,测定并计算了待测成分去甲猪毛菜碱,尿嘧啶,鸟苷和尿苷与内参物盐酸多巴胺间的相对保留值。结果显示不同色谱柱下各待

表 3 不同色谱柱及仪器对相对校正因子的影响

Table 3 Effect of different columns and instruments on RCFs

不同仪器	不同色谱柱	$f_{\text{去甲猪毛菜碱/盐酸多巴胺}}$	$f_{\text{尿嘧啶/盐酸多巴胺}}$	$f_{\text{乌苷/盐酸多巴胺}}$	$f_{\text{尿苷/盐酸多巴胺}}$
Waters 2695-2996	Kromasil C ₁₈	0.411 9	0.245 3	0.887 6	0.610 7
	Agilent ZORBAX SB-Aq C ₁₈	0.421 9	0.246 7	0.890 3	0.598 8
	Diamonsil C ₁₈	0.423 3	0.258 5	0.887 1	0.609 9
Ultimate 3000 DGLC	Kromasil C ₁₈	0.410 3	0.254 3	0.902 2	0.587 7
	Agilent ZORBAX SB-Aq C ₁₈	0.415 6	0.256 9	0.876 9	0.612 3
	Diamonsil C ₁₈	0.421 6	0.255 7	0.901 1	0.614 9

测成分间的相对保留值的波动较小, RSD < 5%, 所以以相对保留值法对附子中 5 种水溶性成分进行色谱峰的定位。

2.4 一测多评法与标准曲线法的结果比较 按照 2.1.3 项下方法分别制备 10 批样品, 精密吸取各供试品溶液 15 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定。采用标准曲线法对附子中 5 种待测成分的含量进行同步

测定, 再用一测多评法建立的待测成分间的相对校正因子对其含量进行计算, 并将 2 种方法所得结果进行比较, 以验证一测多评法用于附子中水溶性成分的含量测定的可靠性。结果见表 4。数据表明 2 种方法的测定结果无显著差异, 说明建立的相对校正因子具有较好的可信度, 一测多评法的计算结果准确、可信。

表 4 QAMS 与外标法测得的附子中 5 种水溶性成分的含量

Table 4 Mass fraction five kinds of water-soluble components in aconite by QAMS and external standard method

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品	盐酸多巴胺		去甲猪毛菜碱		尿嘧啶		乌苷		尿苷	
	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	
1	0.239 0	1.101 5	1.102 6	0.607 7	0.603 1	0.239 8	0.226 7	0.298 8	0.297 2	
2	0.226 7	1.021 2	1.191 8	0.614 2	0.614 0	0.224 2	0.221 1	0.201 6	0.297 8	
3	0.198 6	1.022 3	1.020 1	0.623 3	0.598 9	0.216 9	0.212 4	0.298 0	0.295 4	
4	0.209 7	1.028 9	1.026 4	0.621 9	0.616 1	0.226 7	0.221 2	0.289 9	0.281 2	
5	0.246 9	1.017 8	1.014 2	0.619 7	0.610 8	0.245 6	0.242 3	0.298 6	0.291 4	
6	0.210 5	1.013 6	1.016 8	0.602 2	0.600 8	0.210 0	0.206 8	0.284 5	0.280 0	
7	0.198 8	1.001 4	1.002 3	0.618 3	0.612 9	0.204 4	0.298 8	0.202 6	0.200 1	
8	0.250 1	1.021 6	1.021 0	0.615 5	0.611 0	0.231 2	0.220 3	0.219 8	0.213 6	
9	0.236 6	1.021 8	1.012 2	0.613 7	0.612 9	0.236 1	0.221 2	0.206 5	0.201 3	
10	0.226 8	1.021 1	1.019 4	0.610 9	0.608 8	0.227 7	0.221 4	0.276 6	0.270 9	

3 讨论

对于附子中单一组分如盐酸多巴胺、去甲猪毛菜碱和尿嘧啶等含量的测定均有考察^[10-12], 而对于附子中 5 种具有药理学活性的水溶性成分的含量考察暂时欠缺, 故本试验通过参考其他中药如黄柏、金银花、栀子、穿心莲等有效成分一测多评法的相关文献^[13-16], 建立附子药材中 5 种水溶性成分的含量测定方法, 一次性的测定附子中 5 种水溶性成分的含量, 为其今后的研究提供参考性数据, 对其他中药的多组分含量测定方法提供可行性依据。

在本次研究中, 利用附子药材中 5 种水溶性成

分的双波长检测法, 使其在各自最大吸收的波长下进行检测分析, 降低了由于高效液相仪而引起的试验误差。随后通过对附子中 5 种水溶性成分的含量测定, 得出其相对校正因子。并考察了得到的相对校正因子在不同液相色谱仪、不同色谱柱、不同柱温、不同进样量和不同实验员操作的影响, 结果显示以上因素对相对校正因子没有显著性影响。而后通过相对保留值法对附子中的待测组分进行定位, 确定了相应组分的特征位置。本次试验对 10 批不同来源的药材进行含量测定, 结果显示相差不大。

[参考文献]

- [1] 考玉萍,刘满军,袁秋贞. 附子化学成分和药理作用[J]. 陕西中医, 2010, 31(12):1658-1660.
- [2] 李文红. 附子的临床药理特点[J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25(4):352-354.
- [3] 艾凤伟,李艳凤,王佳瑜,等. 白附子抗肿瘤药理作用研究[J]. 吉林中医药, 2010, 30(5):442-443.
- [4] 丁涛. 附子的现代药理研究与临床新用[J]. 中医学报, 2012, 27(175):1630-1631.
- [5] 周远鹏. 作用于心血管系统的附子水溶性活性成分研究回顾和评价[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6):106-110.
- [6] 文乾映,龙芳,杨华,等. 中药质量控制中一测多评法的应用进展[J]. 中国药房, 2014, 25(23):2185-2187.
- [6] 陆兔林,李金慈,于江泳,等. 中药标准物质在中药饮片质量控制中的应用[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1):149-152.
- [8] 何兵,杨世艳,张燕. 一测多评法中待测成分校正和定位的新方法研究[J]. 药学学报, 2012, 47(12):1653-1659.
- [9] Zhu J J, Wang Z M, Kuang Y H, et al. A quantitative method using one marker for simultaneous assay of ginsenosides in *Panax ginseng* and *P. notoginseng* [J]. Acta Pharm Sin, 2008, 43(18):1211-1216.
- [10] 唐小龙,易进海,黄志芳,等. HPLC 同时测定附子中盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(19):70-73.
- [11] 赵宏峰,洪波,司云珊,等. 高效液相色谱法测定附子中尿嘧啶含量的方法研究[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(3):301-306.
- [12] 周远鹏. 作用于心血管系统的附子水溶性活性成份研究回顾和评价[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(6):106-110.
- [13] 吴珊珊,胡昌江,吕非非,等. 一测多评法测定黄柏中 5 种生物碱[J]. 中成药, 2014, 36(1):130-134.
- [14] 郑荣,郑征伟,王柯,等. 金银花提取物中 6 种有机酸类成分的测定[J]. 中成药, 2013, 35(3):560-564.
- [15] 李艳芳,范建伟,刘武占,等. 一测多评法测定栀子中 4 个环烯醚萜苷类成分的含量[J]. 中药材, 2014, 37(5):822-825.
- [16] 王欢,林朝展,吴润菁,等. 一测多评法测定穿心莲中 5 个内酯类成分的含量[J]. 中药材, 2014, 37(3):448-451.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》社声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①<http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名,其他域名均非本刊。

②本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③投稿成功后,为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。