

固相萃取-高效液相色谱法测定蒙成药嘎日迪五味丸中生物碱成分

朝鲁门¹ 嵇增云^{2,4} 陈紫薇² 郝俊生^{2,4} 包红英³ 拉喜那木吉拉^{3,4*}

(1.通辽市蒙医医院; 2.通辽市市场检验检测中心; 3.内蒙古民族大学蒙医药学院;
4.国家药品监督管理局中药(蒙药)质量控制重点实验室 内蒙古通辽 028000)

摘要 目的 建立固相萃取-高效液相色谱法测定嘎日迪五味丸中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱等6个生物碱成分。方法:采用C18色谱柱,流动相为0.1mol/L醋酸铵(每1000mL加冰醋酸0.5mL)(A)-乙腈:四氢呋喃(25:15)(B),梯度洗脱(0-50min, 18%B→28%B),检测波长为235nm,流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温为40℃。结果:嘎日迪五味丸中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱分别在0.0263~0.3944、0.0085~0.1280、0.0023~0.0340、0.0021~0.0317、0.0020~0.0300、0.0021~0.0318 mg·mL⁻¹范围内与峰面积线性关系良好(R=0.999),平均回收率分别在96.4%、97.5%、101.4%、94.6%、97.2%、95.5%,RSD分别为1.1%、0.8%、1.0%、1.3%、0.9%、1.4%(n=6)。结论:该方法简便、稳定、重复性良好,可用于嘎日迪五味丸中生物碱成分的质量控制。

【关键词】蒙成药嘎日迪五味丸;固相萃取-高效液相色谱法;苯甲酰新乌头原碱;苯甲酰次乌头原碱;苯甲酰乌头原碱;新乌头碱;次乌头碱;乌头碱

Determination of alkaloid components in Mongolian medicine Gari Di Wuwei Pills by solid-phase extraction-High Performance Liquid Chromatography

Zhao Lumen¹ Ji Zengyun^{2,4} Chen Ziwei² Hao Junsheng^{2,4} Bao Hongying³ La Xinamujila^{3,4*}

(1.Tongliao Mongolian Medical Hospital; 2.Tongliao Market Inspection and Testing Center;
3.College of Mongolian Medicine, Inner Mongolia Minzu University;

4.NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese (Mongolian) Medicine, Tongliao, Inner Mongolia, China 028000)

[Abstract] Objective: To establish a solid-phase extraction-High Performance Liquid Chromatography (SPE-HPLC) method for the determination of six alkaloid components, namely benzoylmesaconitine, benzoylaconitine, benzoylhypaconitine, mesaconitine, hypaconitine and aconitine, in Gari Di Wuwei Pills. Methods: A C18 column was used with a mobile phase consisting of 0.1 mol/L ammonium acetate (0.5 mL glacial acetic acid per 1000 mL) (A) and acetonitrile: tetrahydrofuran (25:15) (B). Gradient elution was performed (0-50 min, 18% B → 28% B), with a detection wavelength of 235 nm, a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and a column temperature of 40℃. Results: Benzoylmesaconitine, benzoylaconitine, benzoylhypaconitine, mesaconitine, hypaconitine and aconitine in Gari Di Wuwei Pills showed good linear relationships with peak area within the ranges of 0.0263-0.3944, 0.0085-0.1280, 0.0023-0.0340, 0.0021-0.0317, 0.0020-0.0300, and 0.0021-0.0318 mg·mL⁻¹, respectively (R=0.999). The average recoveries were 96.4%, 97.5%, 101.4%, 94.6%, 97.2%, and 95.5%, respectively, with RSDs of 1.1%, 0.8%, 1.0%, 1.3%, 0.9%, and 1.4% (n=6). Conclusion: This method is simple, stable, and has good repeatability, and can be used for the quality control of alkaloid components in Gari Di Wuwei Pills.

[Key words] Mongolian medicine Gari Di Wu Wei Wan; Solid-phase extraction-High Performance Liquid Chromatography; Benzoyl neolinearine; Benzoyl neovasicine; Benzoyl vasicine; Neolinearine; Neovasicine; Vasicine

嘎日迪五味丸为蒙医药经典验方,又名嘎日迪-5,先后收载于1984年版《内蒙古蒙成药》^[1]和1998年版《卫生部药品标准》(蒙药分册)^[2]颁布实施,处方由诃子120g、制草乌120g、水菖蒲20g、木香30g和麝香0.1g组成,制成水丸,具有消“粘”,消肿,燥“协日乌素”等功效。但随着市场的推广,常有一些含草乌制剂使用不当造成患者中毒的案例发生。故本研究采用固相萃取-高效液相色谱法对嘎日迪五味丸中6个乌头类生物碱进行含量测定,建立有效的质量控制方法,为该制剂临床用药提供保障,为监管提供技术支撑,也为后续的其他含草乌蒙药制剂的标准提升具有借鉴作用。

1 实验仪器与试剂

1.1 实验仪器

LC-16A型高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-16检测器;Agilent Eclipse Plus C₁₈(4.6x250mm, 5μm)色谱柱;AE-100电子天平(瑞士梅特勒);XS3DU电子天平(百万分之一,瑞士梅特勒-托利多);KQ-200VDE型三顿数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);MH-500调温型电热套(北京科伟永兴仪器有限公司);RE-52AA旋转蒸发

器(上海亚荣生化仪器厂); HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); 混合型阳离子交换反相萃取柱(北京纳欧科技有限公司)。

1.2 试剂

双酯型生物碱对照提取物(批号: 112029-201601; 含新乌头碱 31.7%、次乌头碱 30.0%、乌头碱 31.8%)、苯甲酰新乌头原碱(批号: 111795-202106; 含量: 96.3%)、苯甲酰次乌头原碱(批号: 111796-202207; 含量: 96.4%)、苯甲酰乌头原碱(批号: 111794-202307; 含量: 98.0%)均购自中国食品药品鉴定研究院; 色谱乙腈、色谱四氢呋喃(国药集团化学试剂有限公司); 乙酸铵; 盐酸; 氨水; 甲醇; 异丙醇; 三氯甲烷; 磷酸; 水为超纯水; 嘎日迪五味丸(S1~S7)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse Plus C₁₈ (4.6x250mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.1mol/L 醋酸铵(每 1000mL 加冰醋酸 0.5mL)(A) - 乙腈: 四氢呋喃(25: 15)(B), 梯度洗脱, 0~50min: 18% → 28%(B); 检测波长: 235 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取双酯型生物碱对照提取物 12.815mg、苯甲酰新乌头原碱 11.377mg、苯甲酰次乌头原碱 5.882mg、苯甲酰

乌头原碱 8.707mg, 分别置 100mL 容量瓶中, 加异丙醇: 三氯甲烷(1: 1)混合溶液, 稀释至刻度。再取上述对照品储备液 0.3mL、2.4mL、0.4mL、1.0mL, 置 10mL 容量瓶中, 加异丙醇: 三氯甲烷(1: 1)混合溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取样品粉末 1.0g, 精密称定, 加入 0.1mol/L 盐酸溶液 25mL, 称重, 加热回流 60min, 取出, 冷却, 以 0.1mol/L 盐酸溶液补足减失的重量, 摇匀, 离心(转速为每分钟 5000 转)30 分钟, 滤过, 量取续滤液 15mL, 加在固相萃取柱(以混合型阳离子交换反相吸附剂为填充剂, 200mg, 容量为 6mL, 预先依次用乙腈、水各 6mL 洗脱)上, 依次以水 3mL、氨溶液(5→100)、水、甲醇、乙腈各 5mL 洗脱后, 放置 5 分钟, 用乙腈-浓氨试液(90: 10)混合溶液 10mL 洗脱, 收集洗脱液, 于 40 °C 以下减压回收溶剂至干, 残渣精密加入异丙醇: 三氯甲烷(1: 1)的混合溶液使溶解, 置 5mL 容量瓶至刻度, 滤过, 取续滤液。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备

按照处方比例制成缺制草乌的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察

精密吸取对照品溶液 1、3、5、7、10、12、15μL, 注入液相色谱仪, 测定其峰面积。对照品溶液的进样量质量浓度为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果

成分	线性方程	R	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
新乌头碱	$Y=1.0 \times 10^6 X - 620.1949$	0.9995	0.0021~0.0317
次乌头碱	$Y=1.1 \times 10^6 X + 335.9463$	0.9994	0.0020~0.0300
乌头碱	$Y=9.7 \times 10^5 X + 327.84$	0.9994	0.0021~0.0318
苯甲酰新乌头原碱	$Y=1.4 \times 10^6 X - 3131.3220$	0.9995	0.0263~0.3944
苯甲酰次乌头原碱	$Y=5.4 \times 10^6 X + 1573.7750$	0.9996	0.0023~0.0340
苯甲酰乌头原碱	$Y=3.8 \times 10^5 X - 426.4501$	0.9994	0.0085~0.1280

2.3.2 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 按色谱条件连续进样 6 次, 每次 10μL, 记录新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱峰面积, RSD 分别为 0.48%、0.51%、0.82%、0.15%、0.08%、0.81%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验

取样品 S2, 制备供试品溶液, 在色谱条件下分别于制备后 0、2、4、6、8、12 h, 精密吸取 10μL, 注入液相色谱仪, 记录新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱峰面积, RSD 值分别为 0.27%、0.62%、0.56%、0.26%、0.25%、0.85%, 表明

供试品溶液在 12h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验

取样品 S2, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别精密吸取 10μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 并计算含量。结果显示, 新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱含量的 RSD 分别为 0.85%、0.78%、0.79%、1.3%、1.0%、1.7%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验

精密称取已知含量的 S2 号样品约 0.50 g, 加入含 0.03333mg·mL⁻¹ 双酯型生物碱对照提取物、0.0131mg·mL⁻¹ 苯

甲酰新乌头原碱、 $0.0002\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 苯甲酰次乌头原碱、 $0.0068\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 苯甲酰乌头原碱的混合对照品溶液 5ml, 按供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液, 分别吸取 $10\mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 记录峰面积。乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱及苯甲酰新乌头原碱的加样回收率分别为 95.5%、97.2%、94.6%、97.5%、

101.4%、96.4%, RSD 分别为 1.4%、0.9%、1.3%、0.8%、1.0%、1.1%。

2.3.6 样品含量测定

取 7 批嘎日迪五味丸样品各约 1.0g, 精密称定, 按“2.2.2”项下的供试品溶液制备方法制备, 精密吸取 $10\mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 测定, 并计算含量。结果见表 2。

表 2 7 批嘎日迪五味丸生物碱成分结果

编号	含量/mg						总计/%
	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	
S1	0.0142	0.0182	0.0031	0.2554	0.0095	0.1976	4.98
S2	0.0052	0.1009	0.0004	0.1313	0.0021	0.0683	3.08
S3	-	0.0950	-	0.1534	0.0030	0.2039	4.55
S4	-	0.0134	-	0.1952	0.0046	0.1919	4.05
S5	-	-	0.0318	-	0.0066	-	0.38
S6	0.0171	0.0189	0.0005	0.2767	0.0046	0.0513	3.69
S7	0.0016	0.0297	0.0005	0.1278	0.0037	0.0348	1.98

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察

本实验以嘎日迪 5 味丸中 6 个生物碱提取率为指标, 考察样品取样量 (0.5g、0.7g、1.0g、2.0g、2.5g), 提取方法 (超声处理 30 min、40 min、60 min, 加热回流 30 min、60 min、90 min), 结果样品取样量为 1.0 g、加热回流 60 min 时 6 个生物碱提取率最高。

3.2 色谱条件的选择

本实验以嘎日迪 5 味丸中 6 个生物碱的分离度为指标, 结果流动相为 0.1mol/L 醋酸铵 (每 1000mL 加冰醋酸 0.5mL) - 乙腈: 四氢呋喃 (25: 15) 时, 各成分分离度均大于 1.5, 不同色谱柱 (Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; Agela Promosil C18 色谱柱 250 mm × 4.6 mm, 5 μm; Mars 120 ODS-3 色谱柱 250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、不同流速 (0.9、1.0、1.1mL · min⁻¹)、不同柱温 (30、35、40

℃) 时 R 影响较小。

3.3 乌头碱类成分既具有抗炎镇痛、强心、扩血管、降血压、免疫调节、局部麻醉、抗肿瘤、杀虫等作用, 又具有心血管、神经、消化道、肾等方面毒性作用, 因此在制剂质量控制中需关注乌头碱类成分的含量, 既能满足临床疗效, 又要避免毒性反应, 故制定严谨的乌头碱类成分控制标准十分重要。而制剂的乌头碱类成分与其饮片直接相关, 根据《中国药典》2020 年版一部制草乌中苯甲酰乌头碱成分限度在 0.020%~0.070%^[3] (即 $200\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ~ $700\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 日限量为 2100 μg, 因饮片限量为 1.5~3g), 双酯型乌头碱成分限量为 0.040% (即 $400\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 日限量为 1200 μg)^[4]。本次 7 批嘎日迪五味丸测定结果苯甲酰乌头碱成分在 $6.6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ~ $462.5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 双酯型乌头碱成分在 $13.4\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ~ $106.5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 可看出均在日服限量内, 表明该建立的方法可有效控制嘎日迪五味丸质量。

参考文献:

- [1]内蒙古自治区卫生厅. 内蒙古蒙成药标准[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1984: 153-154.
 - [2]中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 蒙药分册[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1998: 70.
 - [3]中国药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医学科技出版社, 2020: 1088.
 - [4]田友清, 丁平, 支荣荣. 《中国药典》2020 年版一部含乌头碱制剂质量控制探讨 [J]. 中国药品标准, 2023, 24 (02): 122-129.
- 第一作者简介: 朝鲁门 (1990-), 男, 蒙古族, 大学本科, 蒙药师, 主要从事医院药品管理;
*通讯作者简介: 拉喜那木吉拉, 男, 蒙古族, 博士研究生, 教授, 研究方向为蒙药理论及资源学。
基金项目: 内蒙古自治区药品监督管理局药品安全监管科研项目-常用含草乌蒙药医疗机构制剂质量标准提升研究 [NMYJ-KJ-202308]