

# 附子甘草的 HPLC 检测方法学研究

杜欣韵, 刘宁芝, 王 惠, 蒋建兰\*

(天津市生物与制药工程重点实验室, 天津大学化工学院制药工程系, 天津 300354)

**摘要:**利用高效液相色谱(HPLC)建立了附子甘草水提物的检测方法,并进行方法学考察。利用 Waters 高效液相色谱仪对色谱柱、流动相组成、洗脱程序、检测波长、柱温、流速等因素进行考察,最终确定选用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱,以 5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含 0.1% 冰醋酸)-乙腈为流动相进行梯度洗脱,检测波长为 254 nm,流速为 0.4 mL/min,柱温为 30℃;以氢溴酸高乌甲素为内标物,各色谱峰相对保留时间及相对峰面积为指标进行方法学考察,结果表明,该方法重复性、重现性、稳定性良好,RSD 均在 5% 以内。

**关键词:**附子;甘草;HPLC;方法学

**中图分类号:**R284.1

**文献标志码:**A

**文章编号:**0253-4320(2017)03-0203-04

**DOI:**10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2017.03.049

## Analytical of Radix Aconiti Carmichaeli - Glycyrrhiza Uralensis by HPLC

DU Xin-yun, LIU Ning-zhi, WANG Hui, JIANG Jian-lan\*

(Tianjin Key Laboratory of Biological and Pharmaceutical Engineering, Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300354, China)

**Abstract:** A method for analysis of the components extracted from Radix Aconiti Carmichaeli-Glycyrrhiza Uralensis is established by HPLC. Using Waters e2695 HPLC, several factors have been studied, including chromatographic column, composition of mobile phase, elution program, detection wavelength, column temperature and flow rate. Chromatographic conditions are determined as follows: waters symmetry C<sub>18</sub> as chromatographic column, a mixture of 5 mmol/L ammonium acetate (containing 0.1% glacial acetic acid) and acetonitrile as mobile phase, 254 nm of detection wavelength, 0.4 mL/min of flow rate, 30℃ of column temperature and Lappaconitine as the internal standard substance. Both of the relative retention time and relative peak area are analyzed to make the study of methodological observation. The result proves that the established method is accurate, reproducible and stable. All the RSDs are ≤5%.

**Key words:** Radix Aconiti Carmichaeli; Glycyrrhiza Uralensis; HPLC; methodology

附子具有回阳救逆、强心、抗肿瘤等功效<sup>[1]</sup>,广泛应用于中医经典方剂之中。附子中包含的化学成分有生物碱类、多糖类及微量元素等<sup>[2]</sup>,其中生物碱类及多糖类均已被证明具有抗肿瘤的功效<sup>[3-4]</sup>。同时,附子也具有一定的毒性,临床上常以甘草配伍减毒<sup>[5]</sup>。目前对附子甘草药对的研究多集中在配伍机理、配伍前后生物碱类成分的含量变化等<sup>[6-8]</sup>,但以附子甘草水提物为研究对象,对其多种化学成分进行同时检测的方法学研究却很少。

笔者以水为溶剂,采用传统的回流提取方法对提取液浓缩后,仅通过超高速离心、膜过滤等物理手段来去除水煎液中的杂质,而不经醇沉、有机溶剂萃取等精制过程,可以最大限度地保留原提取液的有效成分;利用高效液相色谱建立附子甘草水提物的检测方法,为进一步探索除生物碱类之外的抗肿瘤活性成分提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 试验仪器与试剂

#### 1.1.1 试验仪器

Waterse 2695 型高效液相色谱仪,配四元梯度泵,Waters 2489 UV-Vis 检测器,半导体控温柱温箱,120 位自动进样器,真空脱气机,Empower 3.0 工作站;电子天平(ME204 型),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;超声波清洗机(AS-20500BT),天津奥特赛恩斯仪器有限公司生产;台式高速离心机(3K15),Sigma 公司生产。

#### 1.1.2 试剂

附子、甘草药材,产地四川江油,购自四川道地堂,2015 年;内标物氢溴酸高乌甲素(色谱纯 ≥98%),购自南京森贝伽生物科技有限公司;乙腈(色谱纯 ≥99.9%)、甲醇(色谱纯 ≥99.9%),购自

天津市康科德科技有限公司;醋酸铵(色谱纯 $\geq 98\%$ )、冰乙酸(色谱纯 $\geq 99.8\%$ ),购自天津市科密欧化学试剂有限公司;娃哈哈纯净水。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 供试品的制备

#### (1) 附子甘草提取浸膏的制备

精密称取附子药材 20 g、甘草药材 30 g,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 600 mL 蒸馏水,浸泡 30 min,加热回流提取 120 min,趁热过滤,滤液于 75℃ 减压浓缩,得附子甘草提取浸膏,置于 4℃ 冰箱内冷藏备用。

#### (2) 内标溶液的制备

精密称取氢溴酸高乌甲素 6.3 mg 于 10 mL 容量瓶中,加水超声溶解,放至室温后加水定容至刻度并摇匀,作内标储备液,质量浓度为 630  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。精密吸取该内标储备液 1 mL 于 5 mL 容量瓶中,加水定容至刻度并摇匀,即得内标溶液,质量浓度为 126  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,置于 4℃ 冰箱内冷藏备用。

#### (3) 供试品溶液的制备

取制备的附子甘草提取浸膏约 0.2 g,精密称定,置于 5 mL 容量瓶中,加水超声溶解,放至室温后加水定容至刻度并摇匀,在 7 000 r/min 转速下离心 10 min,取适量上清液与所制备的内标溶液等体积混合,过 0.22  $\mu\text{m}$  水膜,取续滤液,即得供试品溶液。

### 1.2.2 色谱条件的选择

#### (1) 色谱柱的选择

考察了 Waters Symmetry  $\text{C}_{18}$  柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、AkzoNobel Kromasil  $\text{C}_{18}$  柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )及 Acchrom Unitary  $\text{C}_{18}$  柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )3 根色谱柱的分离效果,根据谱图效果确定最佳色谱柱。

#### (2) 检测波长的选择

将制备的供试品溶液用紫外可见分光光度计在 190~400 nm 范围内进行全波段扫描,根据吸收光谱得到最大吸收波长为 265 nm。同时考察了 235、254、265 nm 及 276 nm 4 个波长下的谱图效果,确定最佳检测波长。

#### (3) 流动相组成的选择

考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.5% 冰醋酸、乙腈-5 mmol/L 醋酸铵、乙腈-5 mmol/L 醋酸铵(含 0.1% 冰醋酸)5 种不同流动相组成的分离效果,根据谱图效果确定最佳流动相组成。

### (4) 洗脱程序的确定

以水相为 A 相,有机相为 B 相,考察了不同梯度洗脱方式下的谱图效果,如表 1 所示。根据谱图中色谱峰分布均匀程度、响应值大小、分离度等确定最佳洗脱程序。

表 1 不同程序洗脱方式

时间/ min	梯度 1 B/%	梯度 2 B/%	梯度 3 B/%	梯度 4 B/%	梯度 5 B/%
0	5	5	5	5	5
5	—	—	—	5	5
15	—	—	—	10	10
35	—	—	—	—	—
40	—	—	—	—	—
55	—	—	—	26	26
70	—	—	—	—	27
80	—	—	—	—	30
120	—	—	50	46	46
150	—	50	—	—	—
200	100	—	—	—	—

### 1.2.3 内标物色谱峰的确定试验

取适量所制备的内标溶液与水等体积混合,过 0.22  $\mu\text{m}$  水膜,取续滤液,作为空白内标溶液。将其与所制备的供试品溶液在相同条件下进行检测,根据谱图确定供试品中内标物的色谱峰位置。

### 1.2.4 空白试验

取适量水,过 0.22  $\mu\text{m}$  水膜,取续滤液作空白对照,在 1.2.2 中所确定的色谱条件下进行检测,根据谱图确定空白溶液是否存在干扰。

### 1.2.5 方法学考察

#### (1) 重复性试验

将所制备的同一供试品溶液在 1.2.2 中所确定的色谱条件下连续进样 6 次,以内标物的峰为参照,考察各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积,分别计算其 *RSD* 值。

#### (2) 重现性试验

按 1.2.1 中(3)所述方法重复制备 6 份供试品溶液,在 1.2.2 中所确定的色谱条件下进样检测,以内标物的峰为参照,考察各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积,分别计算其 *RSD* 值。

#### (3) 稳定性试验

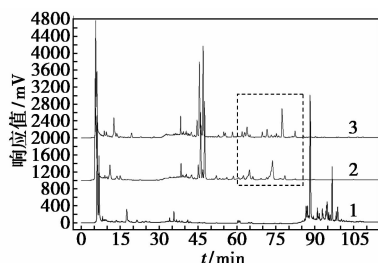
将制备的同一供试品溶液放置 0、4、8、12、24 h,按 1.2.2 中所确定的色谱条件进样检测,以内标物的峰为参照,考察各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积,分别计算其 *RSD* 值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

#### 2.1.1 色谱柱的选择

选择3根不同厂家的色谱柱,在相同条件下分别对供试品进行色谱分析,结果如图1所示。由图1可以看出,Acchrom Unitary C<sub>18</sub>色谱柱整体出峰时间较另外2根色谱柱晚,且色谱峰分布不均匀,分离效果不佳。整体来看,Waters Symmetry C<sub>18</sub>色谱柱及AkzoNobel Kromasil C<sub>18</sub>色谱柱色谱峰数目均较多,分布均匀且响应值适中,但在保留时间60~85 min时,Waters Symmetry C<sub>18</sub>色谱柱分离效果更好。因此,最终确定选用Waters Symmetry C<sub>18</sub>色谱柱。

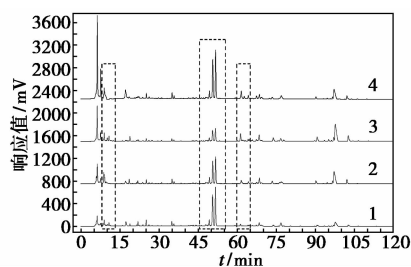


1—Acchrom Unitary C<sub>18</sub>柱;2—AkzoNobel Kromasil C<sub>18</sub>柱;  
3—Waters Symmetry C<sub>18</sub>柱

图1 不同色谱柱下供试品溶液的 HPLC 图

#### 2.1.2 检测波长的选择

不同检测波长下供试品溶液的 HPLC 图如图2所示。由图2可以看出,在4个检测波长下色谱峰数目相差不大,但在保留时间为45~55 min时,235 nm及276 nm 2个波长下的色谱峰响应值过高,不利于其他响应值相对较小的色谱峰的分析;保留时间为8~14 min时,235 nm及265 nm 2个波长下色谱峰分离效果较差;保留时间为60~65 min时,265 nm及276 nm 2个波长下的色谱峰响应值较小。检测波长为254 nm时,基线较为平稳,色谱峰分布均匀,整体响应值适中,能较好地反映出供试品溶液中的整体成分,故最终确定检测波长为254 nm。

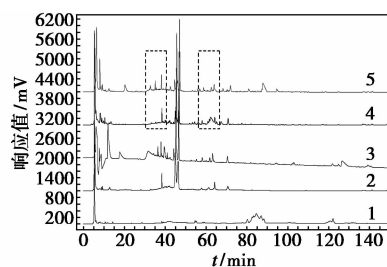


1—276 nm;2—265 nm;3—254 nm;4—235 nm

图2 不同检测波长下供试品溶液的 HPLC 图

#### 2.1.3 流动相组成的选择

不同流动相组成下供试品溶液的 HPLC 图如图3所示。首先对比了甲醇-水及乙腈-水2种流动相体系下的谱图效果,甲醇-水作为流动相时出峰较晚且分离效果极差,因此,基于乙腈-水进行进一步优化。由图3谱线2可以看出,乙腈-水的分离效果仍不理想,这是由于附子甘草提取物中含有甘草次酸等弱酸性物质,在中性 pH 下易解离为离子状态,亲水性强,保留时间过短甚至没有保留,需改变流动相的 pH 使其保持分子形式存在,增加在色谱柱中的保留时间。同时,中性 pH 下硅胶表面的硅醇基易发生去质子化,带负电荷,使得带正电荷的离子与色谱柱之间发生相互作用,导致色谱峰的展宽及拖尾<sup>[9]</sup>,该问题可通过降低流动相 pH 加以改善。因此,进一步考察了乙腈-0.5%冰醋酸、乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液、乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含0.1%冰醋酸)3种流动相组成下的谱图效果。在水相中加入0.5%冰醋酸后,色谱峰数目增多且分离效果有所提高,但在保留时间为30~45 min及75 min之后,基线漂移严重;流动相为乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液时,色谱峰数量较多且基线平稳,但30~40 min及55~65 min时峰的分离效果仍不理想;进一步在5 mmol/L 醋酸铵水溶液中加入0.1%冰醋酸,谱图分离效果明显改善,且峰分布均匀,峰形较好,故最终确定流动相组成为乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含0.1%冰醋酸)。



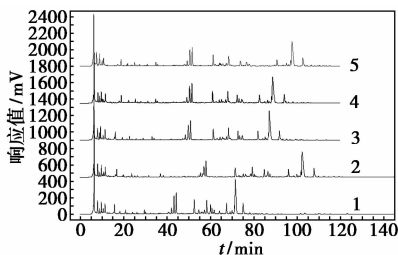
1—甲醇-水;2—乙腈-水;3—乙腈-0.5%冰醋酸;  
4—乙腈-5 mmol/L 醋酸铵;  
5—乙腈-5 mmol/L 醋酸铵(含0.1%冰醋酸)

图3 不同流动相组成下供试品溶液的 HPLC 图

#### 2.1.4 洗脱程序的确定

首先考察了以5%乙腈为初始流动相,在200 min内线性梯度洗脱至100%乙腈结束,以保证各成分都能较好分离。不同洗脱程序下供试品溶液的 HPLC 图如图4所示。由图4可以看出,保留时间为105 min之后基本没有色谱峰,此时有机相比比例为50%,因此将最终有机相比比例降为50%,同时

适当延长有机相比例增加至 50% 的时间,分别设定检测时间为 150 min 及 120 min,比较谱图效果,二者择优。根据谱图,基于表 1 中梯度 3 进行进一步优化。由图 4 可以看出,110 min 之后基本没有色谱峰,因此继续降低最终有机相比例,保持洗脱时间不变;前 15 min 出峰过于密集,由于首先通过色谱柱的成分极性较强,需要较低的有机相比例才能实现有效分离,因此在前 5 min 保持 5% 低有机相浓度的等度洗脱;采用分段调节原则,先保持 55 ~ 120 min 内有机相梯度不变,而后再对此段进行优化。综上,调整为表 1 中梯度 4,结果表明,保留时间为 15 min 左右的峰分布较之前更加均匀,故保留上述调整。55 ~ 70 min(有机相比例为 26% ~ 30%) 出峰过密,因此延长有机相比例在此变化范围内的时间,调整为表 1 中的梯度 5,结果表明,经上述调整后整张图谱色谱峰数目较多且分布均匀,分离状况良好,响应值适中,故确定最终流动相程序洗脱程序为表 1 中梯度 5。

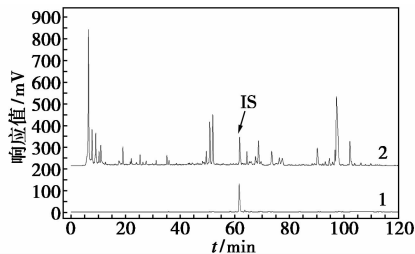


1—梯度 1;2—梯度 2;3—梯度 3;4—梯度 4;5—梯度 5

图 4 不同洗脱程序下供试品溶液的 HPLC 图

## 2.2 内标物色谱峰的确定试验

空白内标溶液与供试品溶液的 HPLC 图如图 5 所示。由图 5 可以看出,内标物氢溴酸高乌甲素的色谱峰与待测物中的各成分分离度良好,响应值适中,可确定内标物(IS)的峰在供试品溶液 HPLC 色谱图中的位置。



1—空白内标溶液;2—供试品溶液

图 5 空白内标溶液与供试品溶液的 HPLC 图

## 2.3 空白试验

做空白对照的 HPLC 呈直线。说明空白对照不存在干扰。

## 2.4 方法学考察

为保证检测方法精确可靠,对选定的 55 个色谱峰进行了方法学考察。以内标物峰为参照,设其保留时间及峰面积为 1,计算其他各峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 范围如表 2 所示。由表 2 可知,RSD 均控制在 5% 以内,说明该方法重复性、重现性均良好,供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

表 2 重复性、重现性、稳定性的相对保留时间及相对峰面积的 RSD

方法学	重复性		重现性		稳定性	
	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积
RSD 范围/%	0.057 ~ 0.312	0.121 ~ 0.372	0.098 ~ 0.328	0.121 ~ 0.328	0.092 ~ 0.246	0.121 ~ 0.246
	0.815	4.372	0.555	4.857	1.244	4.968

## 3 结论与展望

以附子甘草水提物为研究对象,通过试验考察了色谱柱、检测波长、流动相组成、洗脱程序等条件,建立了一种重复性、重现性、稳定性均良好的 HPLC 检测方法。最终确定的色谱条件为:Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱,以 5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含 0.1% 冰醋酸)-乙腈为流动相进行梯度洗脱,检测波长为 254 nm,流速为 0.4 mL/min,柱温为 30℃。

## 参考文献

- [1] 谷捷,李鑫,王宝新,等. 附子的药理作用及其临床应用研究进展[C]//世界中医药学会联合会中医诊断学专业委员会成立大会暨学术年会,2014.
- [2] 雷崎方,斯建勇. 附子化学成分含量测定方法研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2012,10:1480-1485.
- [3] Hazawa M, Wada K, Takahashi K, et al. Suppressive effects of novel derivatives prepared from Aconitum alkaloids on tumor growth[J]. Investigational New Drugs, 2009, 27(2): 111-119.
- [4] 熊海霞,杨颖,孙文燕. 附子多糖的药理作用研究进展[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2013,9:1948-1951.
- [5] 陆燕华,谢丽丽. 附子-甘草配伍研究进展[J]. 上海中医药杂志,2015,(6):91-94.
- [6] Huang A. Research of the change of aconitine with compatibility of radix aconiti, rhizoma zingiberis and liquorice[J]. Guangming Journal of Chinese Medicine, 2011, 26(8): 1709-1710.
- [7] 何瑶,章津铭,高飞,等. 附子甘草配伍减毒增效作用机制研究进展及展望[J]. 中药与临床,2013,4(3):62-65.
- [8] 杨武斌,王平. 乌头碱药理作用及毒性研究进展[J]. 时珍国医国药,2014,(2):427-429.
- [9] 全红娜,金松子,雷勇胜,等. 反相高效液相色谱中流动相选择与优化的研究进展[J]. 现代药物与临床,2014,29(10):1190-1194. ■