

基于多成分定量分析结合薄层色谱检查的颠茄流浸膏质量评价

王迅¹, 黄巧玲^{1*}, 张文婷^{2*} (1.杭州市第三人民医院, 杭州 310009; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要:目的 建立颠茄流浸膏中同时测定4种指标成分含量的方法,结合薄层色谱检查,为其质量评价提供依据。方法 采用HPLC,色谱柱:Agilent Kromesil 100-5 C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.05%甲酸溶液,梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温为30 °C。采用薄层色谱法进行阿托品检查。结果 4种活性成分东莨菪苷在0.065 76~0.657 6 μg ($r=1.000$ 0)、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷在0.082 16~0.821 6 μg ($r=0.999$ 9)、东莨菪内酯在0.049 84~0.498 4 μg ($r=1.000$ 0)和芦丁在0.010 00~0.099 98 μg ($r=0.999$ 9)内,均呈良好线性关系;东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯和芦丁的加样回收率分别为100.6%, 99.8%, 99.9%和97.9%, RSD分别为1.4%, 1.6%, 1.4%和1.5%。部分批次指标成分含量低且检出硫酸阿托品。结论 建立的含量测定方法灵敏度高,结果准确,适用于颠茄流浸膏的质量评价。

关键词: 颠茄流浸膏; 东莨菪苷; 山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷; 东莨菪内酯; 芦丁; 硫酸阿托品

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)02-0187-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.02.012

引用本文: 王迅, 黄巧玲, 张文婷. 基于多成分定量分析结合薄层色谱检查的颠茄流浸膏质量评价[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2): 187-191.

Quality Evaluation of Belladonna Liquid Extract by Multicomponent Quantitation and TLC

WANG Xun¹, HUANG Qiaoling^{1*}, ZHANG Wenting^{2*} (1.Hangzhou Third Hospital, Hangzhou 310009, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method of the simultaneous determination of 4 components in Belladonna liquid extract, provide the basis for its quality evaluation by combing with TLC. **METHODS** Adopting HPLC and using Agilent Kromesil 100-5 C₁₈ chromatographic column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.05% formic acid for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The temperature of column was 30 °C. Atropine sulfate was identified with TLC method. **RESULTS** Four active ingredients had good linear relationships: scopolin was in the range of 0.065 76~0.657 6 μg ($r=1.000$ 0), kaempferol-3-*O*-galactosyl(6→1)-rhamnosyl-7-*O*-glucoside was in the range of 0.082 16~0.821 6 μg ($r=0.999$ 9), scopoletin was in the range of 0.049 84~0.498 4 μg ($r=1.000$ 0) and rutin was in the range of 0.010 00~0.099 98 μg ($r=0.999$ 9). The average recoveries of scopolin, kaempferol-3-*O*-galactosyl(6→1)-rhamnosyl-7-*O*-glucoside, scopoletin and rutin were 100.6%, 99.8%, 99.9% and 97.9%. And their RSDs were 1.4%, 1.6%, 1.4% and 1.5%. The contents of some ingredients were low and atropine sulfate was detected in some samples. **CONCLUSION** This method has high sensitivity, it is accurate and suitable for the quality control of Belladonna liquid extract.

KEYWORDS: Belladonna liquid extract; scopolin; kaempferol-3-*O*-galactosyl(6→1)-rhamnosyl-7-*O*-glucoside; scopoletin; rutin; atropine sulfate

颠茄草为从国外引种的栽培品,在我国使用历史悠久,具解痉作用。颠茄流浸膏为茄科植物颠茄 *Atropa belladonna* L.的干燥全草经加工制成的流浸膏,为维U颠茄铝、颠茄片等的原料,主要用于胃及十二指肠溃疡及轻度胃肠、平滑肌痉挛,抑制腺体分泌以及胃肠道、肾、胆绞痛,输尿管结石等引起的腹痛,胃炎及胃痉挛引起的呕吐和腹泻,迷走神经兴奋导致的多汗、流涎、心

率慢、头晕等症状^[1-4]。颠茄草及其制剂含莨菪类生物碱,主要成分为左旋天仙子胺,而阿托品为其消旋体,在颠茄草及其制剂中含量极低。颠茄草及其制剂除含有莨菪类生物碱外,还含有东莨菪苷、东莨菪内酯等成分^[5-6],现代药理学研究发现,东莨菪苷、东莨菪内酯等具有抗炎、抗肿瘤、抗HIV及平喘、利尿、抗凝血等功效^[7-8]。由于早期质量标准欠合理,仅以阿托品作为定性和定量

作者简介: 王迅,女,药师 Tel: (0571)87823149 E-mail: 137154441@qq.com *通信作者: 黄巧玲,女,主任药师 Tel: (0571)87827540 E-mail: HQL6512@163.com 张文婷,女,博士,主任中药师 Tel: (0571)87180337 E-mail: leozhwt@163.com

指标,使不法企业有机可乘,在2009年和2011年全国范围内抽取的300余批次颠茄片/颠茄酞及部分市售颠茄浸膏和颠茄流浸膏中发现大量使用硫酸阿托品勾兑产品,不仅扰乱了药品监管,也对用药的有效性和安全性带来隐患^[9-10]。中国药典2015年版收载了硫酸阿托品薄层色谱鉴别、特征图谱、硫酸阿托品 HPLC 含量测定,由于缺乏专属性定量指标的约束,使得颠茄流浸膏质量依旧良莠不齐。本实验建立了 HPLC 同时测定颠茄浸膏中东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯、芦丁4种活性成分的含量,通过成分的定量分析,结合薄层色谱法对阿托品的检查,可为颠茄流浸膏的质量评价提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,配备 G1311B 四元泵、G1329B 自动进样仪、G1316A 柱温箱、G4212BDAD 检测器,Chemstation 色谱工作站);Centrifuge 5430R 型高速离心机(美国 Eppendorf)。

东莨菪内酯(批号:110768-200504;供含量测定用)、芦丁(批号:100080-201610;供含量测定用,HPLC 以 91.9%计)、硫酸阿托品(批号:100040-201613;供含量测定用)购自中国药品生物制品检验研究院;东莨菪苷和山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷为自制(纯度>98%);硫酸天仙子胺(USP,批号:1335009);颠茄流浸膏(烟台鲁银药业有限公司,批号为 L091112, L091115, L091127, L100118, L100401, L100419;市场购买,编号 S1、S2、S3、S4、S5);甲醇、甲酸为色谱纯;水为 Mili-Q 纯化水,其他为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Kromasil 100-5 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流动相为甲醇-0.05%的甲酸溶液,流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 344 nm;梯度洗脱条件:0~5 min, 5%→15%甲醇, 5~60 min, 15%→60%甲醇。

2.2 对照品溶液配制

分别精密称取东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯和芦丁

4种对照品适量,用50%乙醇制成浓度分别为32.88, 41.08, 24.92和4.999 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取颠茄流浸膏样品1 mL,置25 mL量瓶中,加50%乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液2, 4, 8, 12, 16, 20 μL,依次注入高效液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进样分析,测定峰面积,以峰面积积分值为Y坐标,以进样量(μg)为X坐标进行线性回归,得回归方程分别如下:①东莨菪苷:Y=1.483 6X+3.977 9, r=1.000 0,线性范围为0.065 8~0.658 μg;②山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷:Y=1.256 8X+3.701 8, r=0.999 9,线性范围为0.082 2~0.822 μg;③东莨菪内酯:Y=3.848 7X+3.309, r=1.000 0,线性范围为0.049 8~0.498 μg;④芦丁:Y=1.623 7X+0.595, r=0.999 9,线性范围为0.010 0~0.100 μg。结果表明:东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯和芦丁在各自的线性范围内,其进样量值与峰面积积分值呈良好的线性关系。色谱图见图1。

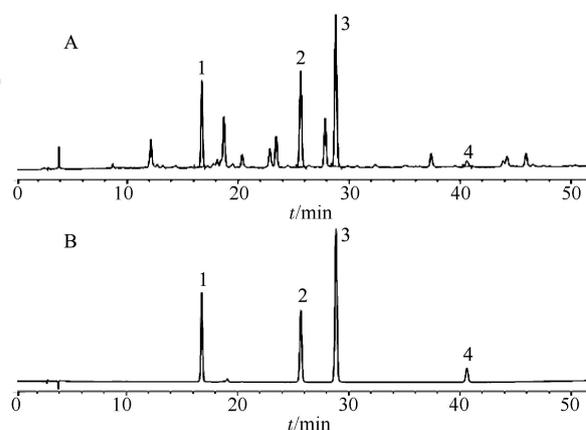


图1 HPLC 图谱

A-颠茄流浸膏; B-混合对照品; 1-东莨菪苷; 2-山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷; 3-东莨菪内酯; 4-芦丁。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-Belladonna liquid extract; B-mixed reference; 1-scopolin; 2-kaempferol-3-*O*-galactosyl(6→1)-rhamnosyl-7-*O*-glucoside; 3-scopoletin; 4-rutin.

2.5 仪器精密度试验

精密吸取对照品溶液10 μL,连续重复进样6

次, 分别测得 4 个成分的峰面积积分值, 计算各成分 RSD, 东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯和芦丁的 RSD 分别为 0.6%, 0.5%, 0.4% 和 0.7%, 表明仪器精密程度良好。

2.6 重复性试验

取同一批号(L091112)供试品, 按“2.3”项下供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定 4 个成分的含量, 计算 RSD, 考察方法重复性。结果东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯和芦丁含量分别为 0.791, 1.288, 0.663 和 0.068 8 mg·mL⁻¹, RSD 分别为 0.3%, 0.3%, 0.3% 和 1.6%, 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量的同一批号(L091112)供试品 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液适量, 按“2.3”项下供试品溶液制备方法操作, 分别测定各成分含量并计算回收率, 考察方法准确性(回收率)。结果东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯和芦丁平均加样回收率分别为 100.6%, 99.8%, 99.9% 和 97.9%, RSD 分别为 1.4%, 1.6%, 1.4% 和 1.5%, 说明本法的准确性良好。结果见表 1。

2.8 稳定性试验

取混合对照品溶液和同一供试品溶液(批号: 091112), 分别在 0, 1, 8, 22, 34, 50 h 进样, 测定各指标成分峰面积, 计算 RSD, 结果混合对照品溶液东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯和芦丁峰面积 RSD 分别为 0.6%, 0.5%, 0.4% 和 0.7%, 供试品溶液峰面积 RSD 分别为 0.2%, 0.3%, 0.4% 和 1.0%, 表明混合对照品溶液和供试品溶液在 50 h 内稳定性良好。

2.9 样品含量测定

用本实验建立的 HPLC 测定了 11 个不同批号的颠茄流浸膏中东莨菪苷、山柰酚-3-*O*-半乳糖-(6→1)鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、东莨菪内酯和芦丁的含量, 结果见表 2。

2.10 硫酸阿托品 TLC 检查

取颠茄流浸膏 0.6 mL 于分液漏斗中, 加水

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery test($n=6$)

成分	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
东莨菪苷	0.395 4	0.411 0	0.808 4	100.49	100.6	1.4
	0.395 4	0.411 0	0.806 8	100.09		
	0.395 4	0.411 0	0.820 3	103.37		
	0.395 4	0.411 0	0.807 1	100.17		
	0.395 4	0.411 0	0.805 4	99.74		
	0.395 4	0.411 0	0.804 8	99.61		
山柰酚-3- <i>O</i> - 半乳糖-(6→ 1)鼠李糖-7- <i>O</i> - 葡萄糖苷	0.644 0	0.513 5	1.153 3	99.18	99.8	1.6
	0.644 0	0.513 5	1.152 3	98.99		
	0.644 0	0.513 5	1.172 9	103.00		
	0.644 0	0.513 5	1.156 4	99.79		
	0.644 0	0.513 5	1.152 8	99.09		
	0.644 0	0.513 5	1.150 1	98.56		
东莨菪内 酯	0.331 5	0.311 5	0.641 1	99.38	99.9	1.4
	0.331 5	0.311 5	0.640 6	99.21		
	0.331 5	0.311 5	0.651 4	102.67		
	0.331 5	0.311 5	0.642 0	99.67		
	0.331 5	0.311 5	0.640 8	99.28		
	0.331 5	0.311 5	0.640 7	99.26		
芦丁	0.034 38	0.062 49	0.095 10	97.17	97.9	1.5
	0.034 38	0.062 49	0.095 73	98.19		
	0.034 38	0.062 49	0.097 34	100.76		
	0.034 38	0.062 49	0.095 17	97.29		
	0.034 38	0.062 49	0.094 87	96.81		
	0.034 38	0.062 49	0.095 22	97.36		

表 2 颠茄流浸膏样品中 4 种有效成分含量测定结果

Tab. 2 Contents determination of the four active ingredients in Belladonna liquid extract mg·mL⁻¹

批号	成分				总量
	山柰酚-3- <i>O</i> -半乳 东莨菪苷 糖-(6→1)鼠李糖 -7- <i>O</i> -葡萄糖苷	东莨菪 内酯	芦丁		
L091112	0.791	1.288	0.663	0.069	2.811
L091115	0.815	1.338	0.689	0.064	2.906
L091127	0.910	1.493	0.769	0.080	3.252
L100118	0.518	1.101	0.466	0.047	2.132
L100401	0.629	0.929	0.615	0.062	2.235
L100419	0.774	1.601	0.714	0.037	3.126
S1	0.662	1.122	0.674	0.217	2.675
S2	0.599	0.853	0.613	0.049	2.115
S3	0.366	0.381	0.156	0.044	0.947
S4	0.186	0.358	0.196	0.047	0.786
S5	0.339	0.645	0.262	0.061	1.307

20 mL、浓氨试液 2 mL，用乙醚振摇提取 2 次，每次 20 mL，合并乙醚液，水浴蒸干，残渣加甲醇 1 mL 使溶解，即得供试品溶液。另取硫酸天仙子胺对照品、硫酸阿托品对照品适量，分别加甲醇制成每 1 mL 各含 3 mg 的溶液，作为对照品溶液。吸取对照品溶液 5 μ L、供试品溶液 10 μ L，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以浓氨溶液-水-丙酮(3:7:90)为展开剂，展开，取出，晾干，置 105 $^{\circ}$ C 干燥 5 min，放冷，喷以稀碘化铋钾试液至斑点清晰。样品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点，见图 2。再喷以 10%亚硝酸钠溶液，放置 5~15 min。供试品色谱中，在与天仙子胺对照品色谱相应位置上斑点颜色由橙色变为红棕色，不得出现与硫酸阿托品对照品相同的灰蓝色斑点，出现灰蓝色则说明样品中含较高比例的硫酸阿托品，样品 S3、S4、S5 检测到硫酸阿托品。

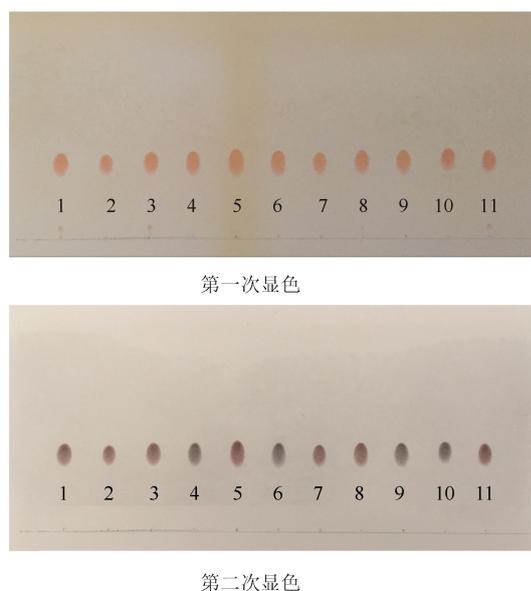


图 2 颠茄流浸膏薄层色谱图
1~3, 11-鲁银样品; 4-S3; 5-硫酸天仙子胺对照品; 6-硫酸阿托品对照品; 7-S1; 8-S2; 9-S4; 10-S5。

Fig. 2 TLC chromatograms of Belladonna liquid extract
1~3, 11-samples of Luyin; 4-S3; 5-reference substance of hyoscyamine sulfate; 6-reference substance of atropine sulfate; 7-S1; 8-S2; 9-S4; 10-S5.

3 分析与讨论

根据 11 批颠茄流浸膏测定数据，8 批样品 4 个成分的总和在 2.1~3.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，3 批样品在 0.8~1.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，提示不同批次颠茄流浸膏该 4 个成分总含量存在差异。表明不同批次 4 个成分

的含量存在差异，使用 SPSS19.0 版软件中的系统聚类法，将 4 个成分的含量导入 SPSS 软件，进行聚类分析，结果见图 3。由图可知，11 批颠茄流浸膏明显聚为 2 类，S3~S5 被聚为一类，其余 8 批聚为另一类，结果与 4 个成分含量总和一致。根据薄层色谱检查结果，S3~S5 为含有较大比例硫酸阿托品成分的样品，说明根据 4 个成分含量结果的差异也可将颠茄流浸膏是否添加硫酸阿托品进行分类。

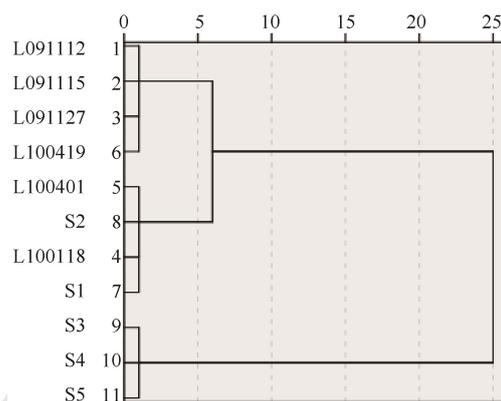


图 3 11 批颠茄流浸膏样品聚类分析图
Fig. 3 Cluster analysis of 11 batches Belladonna liquid extract

根据硫酸阿托品薄层色谱检查结果，第一次显色后，供试品均呈现与硫酸天仙子胺或硫酸阿托品相同的斑点，说明含有相应生物碱成分，但第二次显色后，S3~S5 呈现与硫酸阿托品相同的斑点，提示该 3 批样品含有较大比例的硫酸阿托品成分。

由于茄科较多植物含有颠茄草相同的生物碱类成分，如三分三、天仙子等，单靠生物碱类成分较难完成对颠茄制剂真伪优劣的评价。颠茄流浸膏提取的原料药为颠茄草，中国药典 2015 年版中，颠茄草为全草入药，包含地上部分和地下部分，生物碱外其他成分如黄酮类、木脂素类成分由于在不同部位分布不同，东莨菪苷主要分布于根部，芦丁在叶花果中含量较高而根部几乎不含，山柰酚-3-O-半乳糖-(6 \rightarrow 1)鼠李糖-7-O-葡萄糖苷在叶子中最高，东莨菪内酯在各部位均有分布^[11]，含量的高低反映了药材不同药用部位的组成与质量，同时测定该 4 个成分的含量，较合理地反映了颠茄流浸膏的质量。

本研究采用HPLC同时测定了颠茄流浸膏中4个成分的含量,该方法简便、重复性好,联合薄层色谱法检查硫酸阿托品,可为颠茄流浸膏的质量评价提供依据。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S]. 2015: 420, 1710.
- [2] ZHANG W T, MA L K, HUANG Q W, et al. Operational essentials and revision situations of *Belladonna* products in Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition) [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2016, 33(5): 623-625.
- [3] YANG L B, LI S L. Effect of treating intractable diarrhea in infants by codeine phosphate and belladonna [J]. *J Appl Clin Pediatr*(实用儿科临床杂志), 2007, 22(13): 1014-1015.
- [4] 张小山. 对维 U 颠茄铝制剂中不同颠茄料源性质的分析判定与监管[J]. *中国药物与临床*, 2013, 13(3): 132-134.
- [5] ZHANG W T, GAO J, YUE C, et al. Study on simultaneous determination of five main marker components in belladonna tablets and fingerprint analysis by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2014, 34(12): 2154-2159.
- [6] HUANG W, GAO J, CHENG W M, et al. Simultaneous determination of nine active ingredients in belladonna herb by HPLC [J]. *Asian J Chem*, 2014, 26(11): 3134-3138.
- [7] HE L, YANG S L, WU D S, et al. Coumarins from *Skimmia arborescens* and its anti-inflammatory effect [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2012, 37(6): 811-813.
- [8] ZHANG S Y, MENG L, GAO W Y, et al. Advances on biological activities of coumarins [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2005, 30(6): 410-414.
- [9] HUANG W, ZHANG W T, ZHAO W L, et al. Study on identification and content determination of extractum *Belladonnae Liquidum* [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2012, 32(1): 151-154.
- [10] HUANG W, ZHANG W T, ZHAO W L. A quick check of adulterated atropine in belladonna extract tablets [J]. *Chin Med Herald*(中国医药导报), 2011, 8(22): 67-68.
- [11] ZHANG W T, ZHANG C Y, HUANG W, et al. Dynamic accumulations and distributions of eight chemical constituents of Hunan *Belladonnae Herba* in various parts and different growing periods [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2016, 47(22): 4072-4075.

收稿日期: 2019-04-30

(本文责编: 李艳芳)

中国现代应用药理学

<http://www.chinjmap.com>