

# 蒙药那如-3味的醇提工艺优化<sup>Δ</sup>

李君<sup>1,2,3\*</sup>, 顾艳丽<sup>3#</sup>, 祖文<sup>4</sup>, 刘洋<sup>3</sup>, 白图雅<sup>1,2,3</sup>, 胡玉霞<sup>1,2,3</sup>, 张梦迪<sup>1,2,3</sup> (1. 内蒙古医科大学新药安全评价研究中心, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学新药筛选工程研究中心, 呼和浩特 010110; 3. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 4. 内蒙古医科大学图书馆, 呼和浩特 010110)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)16-1988-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.16.12



**摘要** 目的: 优化蒙药那如-3味的醇提工艺。方法: 以苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、胡椒碱和没食子酸含量的综合评分为考察指标, 料液比、乙醇体积分数、提取时间为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计优化蒙药那如-3味的醇提工艺。结果: 最优醇提工艺为料液比1:10(g/mL)、乙醇体积分数75%、提取时间1.5 h。经3次实验验证, 那如-3味醇提物中上述8种成分的平均含量分别为1.69、1.48、14.69、0.28、0.05、0.08、26.01、17.33 mg/g (RSD为0~4.96%,  $n=3$ ), 平均综合评分为19.03分 (RSD=1.42%,  $n=3$ )。结论: 优化所得那如-3味醇提工艺稳定、可行。

**关键词** 那如-3味; 蒙药; 醇提工艺; 工艺优化; 综合评分

## Optimization of Ethanol Extraction Technology of Mongolian Medicine Naru-3

LI Jun<sup>1,2,3</sup>, GU Yanli<sup>3</sup>, ZU Wen<sup>4</sup>, LIU Yang<sup>3</sup>, BAI Tuyu<sup>1,2,3</sup>, HU Yuxia<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Mengdi<sup>1,2,3</sup> (1. Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Research Center for Drug Screening, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 3. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 4. Library of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize ethanol extraction technology of Mongolian medicine Naru-3. METHODS: The  $L_9(3^4)$  orthogonal design was used to optimize ethanol extraction technology of Mongolian medicine Naru-3 with solid-liquid ratio, ethanol volume fraction and extraction time as factors, using comprehensive scores for the contents of benzoyleaconitine, benzoyleneoconitine, benzoylehypoconitine, aconitine, neoconitine, hypoconitine, piperine and gallic acid as indexes. RESULTS: The optimal ethanol extraction technology was that solid-liquid ratio of 1:10(g/mL), ethanol volume fraction of 75%, extracting for 1.5 h. After 3 times of validation tests, average contents of above 8 components in ethanol extract from Naru-3 were 1.69, 1.48, 14.69, 0.28, 0.05, 0.08, 26.01, 17.33 mg/g (RSDs were 0-4.96%,  $n=3$ ), respectively. Average comprehensive score was 19.03 (RSD=1.42%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: The optimal ethanol extraction technology of Mongolian medicine Naru-3 is stable and feasible.

**KEYWORDS** Naru-3; Mongolian medicine; Ethanol extraction technology; Technology optimization; Comprehensive score

蒙药那如-3味收载于《卫生部药品标准·蒙药分册》,由诃子、制草乌、葶苈等3味药材组成,具消“粘”、消肿、燥“协日乌素”、祛风、止痛、散寒之功效,临床常用于类风湿性关节炎、坐骨神经痛及脊髓损伤的治疗<sup>[1]</sup>。那如-3味处方中制草乌具有镇痛、抗炎、杀菌等作用<sup>[2]</sup>,其所含的生物碱类成分既是药效成分亦是毒性成分,且对相关制剂的有效性和安全性具有较大影响<sup>[3]</sup>;诃子主要含有鞣质类、酚酸类等成分,具有抗肿瘤、抗氧化、调节

免疫等作用,且诃子中的酚酸类成分是其发挥抗类风湿性关节炎作用的主要药效物质基础<sup>[4-5]</sup>;葶苈中含有酰胺类、萜类、挥发油类等成分,其所含的酰胺类成分胡椒碱具有抗氧化、抗炎、降脂等作用<sup>[6-8]</sup>。

目前,《卫生部药品标准·蒙药分册》中仅收载了那如-3味组方药材的性状、鉴别、用法用量<sup>[1]</sup>,而未对其主要成分的含量测定作出规定;2020年版《中国药典》(一部)及相关文献中以制草乌的主要成分苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱,葶苈的主要成分胡椒碱以及诃子的主要成分没食子酸作为控制相应单味药材质量的指标<sup>[9-11]</sup>,难以全面反映那如-3味的整体质量。由于制草乌中含有可影响制剂安全性的毒性成分乌头碱、新乌头碱、次乌头碱<sup>[12]</sup>,因此有必要对那如-3味中毒性成分的含量进行控制。此外,由于目前对那如-3味醇提工艺研究的报道较少,且市售制剂为水泛

<sup>Δ</sup> 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(No.2019LH08011);内蒙古自治区科技创新引导项目(No.1639002);内蒙古医科大学青年创新基金项目(No.YKD2018QNCX023);内蒙古医科大学科技创新“英才培育”项目(No.YCPY20200109, No.YCPY2021067)

\* 助理研究员, 硕士。研究方向: 药物新剂型与毒理学。E-mail: nmg15547126231@sina.com

# 通信作者: 教授, 硕士。研究方向: 药物新剂型与药理学。E-mail: gy10303@sina.com

丸,故为完善那如-3味提取工艺,同时为满足后期相关缓控释剂型改进的需要,本研究拟对那如-3味的醇提工艺进行优化,为成型工艺奠定基础。

超高效液相色谱-电喷雾质谱技术(UPLC-ESI-MS)无需将各成分分离,仅通过提取成分离子对即可准确定量,极大地缩短了分析时间且具有较好的选择性<sup>[3]</sup>。多反应监测模式(MRM)可进一步提高检测灵敏度,且各成分目标峰均在不同通道内独立显示,降低了各待测成分难以分离所致的不良影响,在中药复杂成分的定量分析中得以广泛应用<sup>[4]</sup>。正交实验通过正交设计表来安排和分析实验过程所涉及的各个因素,从各因素的所有水平中挑选具有代表性的水平进行实验,并结合综合评价来找出最优的水平组合,现已被广泛应用于各科研领域<sup>[5]</sup>。基于此,本研究采用UPLC-ESI-MS法同时测定那如-3味中苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、胡椒碱和没食子酸的含量;同时,以这8种成分含量为指标,以料液比、乙醇体积分数、提取时间为考察因素<sup>[6-7]</sup>,采用正交实验优化那如-3味的醇提工艺,旨在为其质量控制和相关制剂开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有LC-MS8045型三重四极杆UPLC-ESI-MS联用系统及配备的LC-20AD型输液泵、DGU-20A5R型在线脱气机、SIL-20AC型自动进样器、CTO-20A型柱温箱、CBM-20A型系统控制器、FCV-20AH2型阀切换系统,AP135W型十万分之一电子天平(日本Shimadzu公司);KH-500DV型数控超声波清洗器(昆山禾创超声有限公司);2TB-A型磁力加热搅拌电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司)等。

### 1.2 药品与试剂

苯甲酰乌头原碱(批号111794-201705,纯度≥98.7%)、苯甲酰新乌头原碱(批号111795-201804,纯度≥96.7%)、苯甲酰次乌头原碱(批号111796-201705,纯度≥98.6%)、乌头碱(批号110720-201708,纯度≥94.7%)、新乌头碱(批号110799-201807,纯度≥98.3%)、次乌头碱(批号110798-201609,纯度≥99.2%)、胡椒碱(批号110775-201705,纯度≥98.9%)、没食子酸(批号110831-201805,纯度≥98.8%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸、乙酸铵均为分析纯,水为超纯水。

制草乌(批号20210111)、葶苈(批号20210111)、诃子(批号20210111)饮片均购自北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司,经内蒙古医科大学药学院渠弼教授鉴定,分别为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb.干燥块根的炮制品,胡椒科植物葶苈 *Piper longum* L.的干燥近成熟或成熟果穗,使君子科植物绒毛诃子 *Terminalia chebulata* Retz. var *tomemella* Kurt.的干燥成熟果实。

## 2 方法与结果

### 2.1 那如-3味的制备

分别称取制草乌、葶苈、诃子饮片150、90、300 g,粉碎,混匀,过60目筛,即得那如-3味。

### 2.2 那如-3味中苯甲酰乌头原碱等8种成分的含量测定

2.2.1 色谱与质谱条件 色谱条件如下:以Shim-pack GIST-HP C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 3 μm)为色谱柱,以甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~0.3 min, 5% A; 0.3~2 min, 5% A→50% A; 2~4 min, 50% A→55% A; 4~6 min, 55% A→100% A; 6~7 min, 100% A; 7~7.01 min, 100% A→5% A; 7.01~10 min, 5%A);流速为0.25 mL/min;柱温为35 ℃;进样量为3 μL。质谱条件如下:以ESI为离子源,采用MRM方式进行正、负离子扫描;雾化气流量为3 L/min;加热气流量为10 L/min;接口温度为300 ℃;脱溶剂温度为526 ℃;加热块温度为400 ℃。8种待测成分的质谱参数见表1(表中,Q1表示前四极杆的预杆电压,Q3表示后四极杆的预杆电压),二级质谱图见图1。

表1 苯甲酰乌头原碱等8种成分的质谱分析参数  
Tab 1 Mass spectrometry analysis parameters of 8 components as benzoyleconitine

待测成分	定量离子对(正/负离子)	Q1能量偏差,eV	碰撞能量,eV	Q3能量偏差,eV
苯甲酰乌头原碱	m/z 604.0→105.0(+)	-28	-55	-21
苯甲酰新乌头原碱	m/z 590.0→105.0(+)	-20	-55	-17
苯甲酰次乌头原碱	m/z 574.0→105.1(+)	-20	-55	-30
乌头碱	m/z 646.3→586.1(+)	-30	-37	-38
新乌头碱	m/z 632.3→572.1(+)	-30	-37	-38
次乌头碱	m/z 616.0→556.1(+)	-28	-35	-30
胡椒碱	m/z 286.0→115.0(+)	-20	-40	-20
没食子酸	m/z 169.0→125.0(-)	18	17	21

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、胡椒碱、没食子酸对照品各适量,分别置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解,制成上述8种成分质量浓度分别为228、212、200、200、212、160、368、340 μg/mL的单一对照品贮备液;分别精密量取上述各单一对照品贮备液适量,置于同一5 mL量瓶中,加甲醇稀释,制成上述8种成分质量浓度分别为0.456、0.424、1.600、0.080、0.212、0.320、1.472、4.080 μg/mL的混合对照品溶液。所有溶液均于4 ℃保存,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取“2.1”项下那如-3味约9.0 g,置于圆底烧瓶中,加85%乙醇90 mL,称定质量,用磁力加热搅拌电热套加热提取1.0 h,冷却至室温,再次称定质量,用85%乙醇补足减失的质量,混匀。取上述提取液10 μL,加入甲醇-水溶液(1:1, V/V,下同)990 μL,涡旋混匀30 s;取上述混合溶液100 μL,加入甲醇-水溶液900 μL,经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 专属性考察 取上述空白溶液(甲醇-水溶液)、混合对照品溶液、供试品溶液适量,按“2.2.1”项下试验

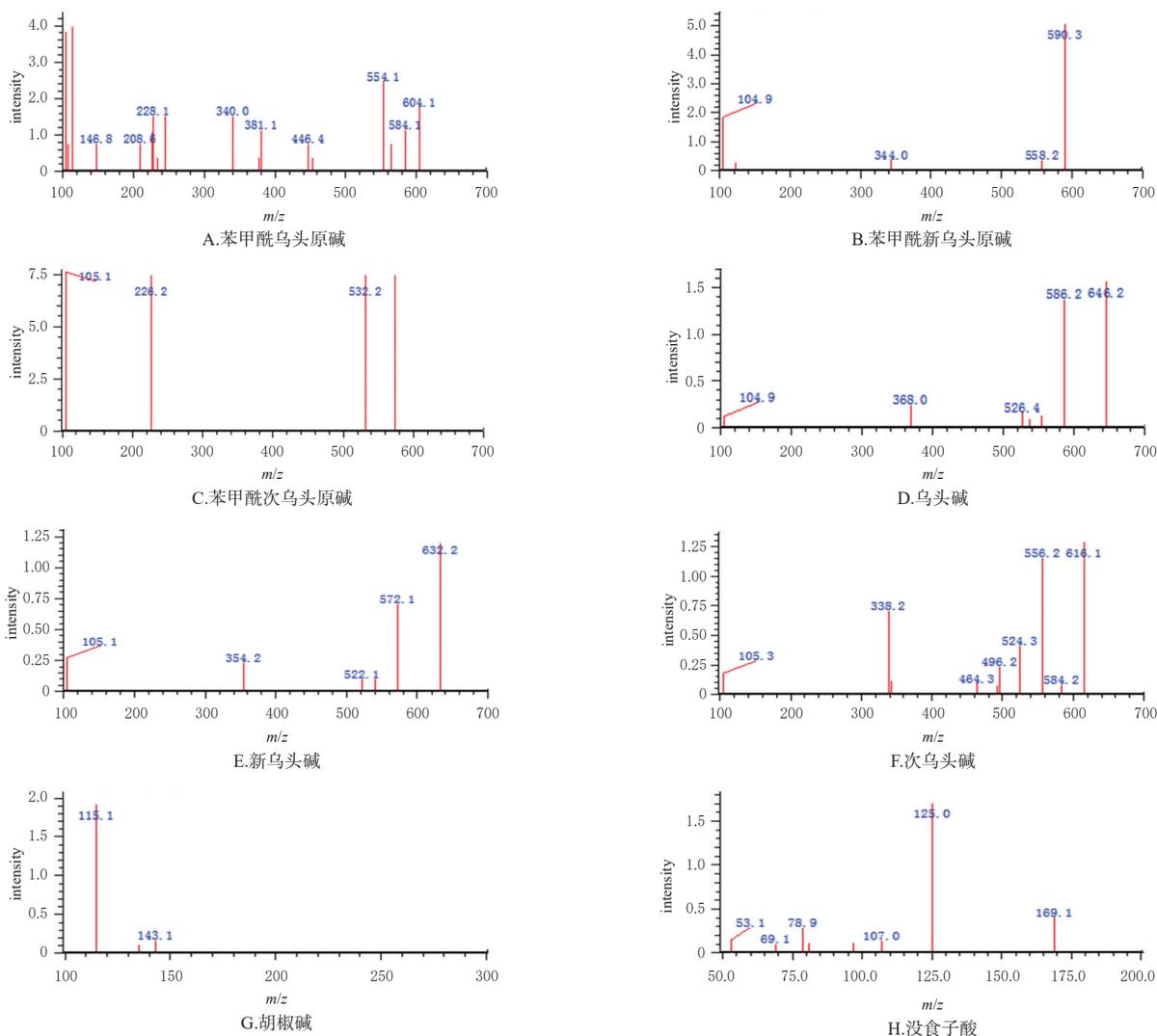


图1 苯甲酰乌头原碱等8种成分的二级质谱图

Fig 1 MS/MS spectra of 8 components as benzoyleconitine

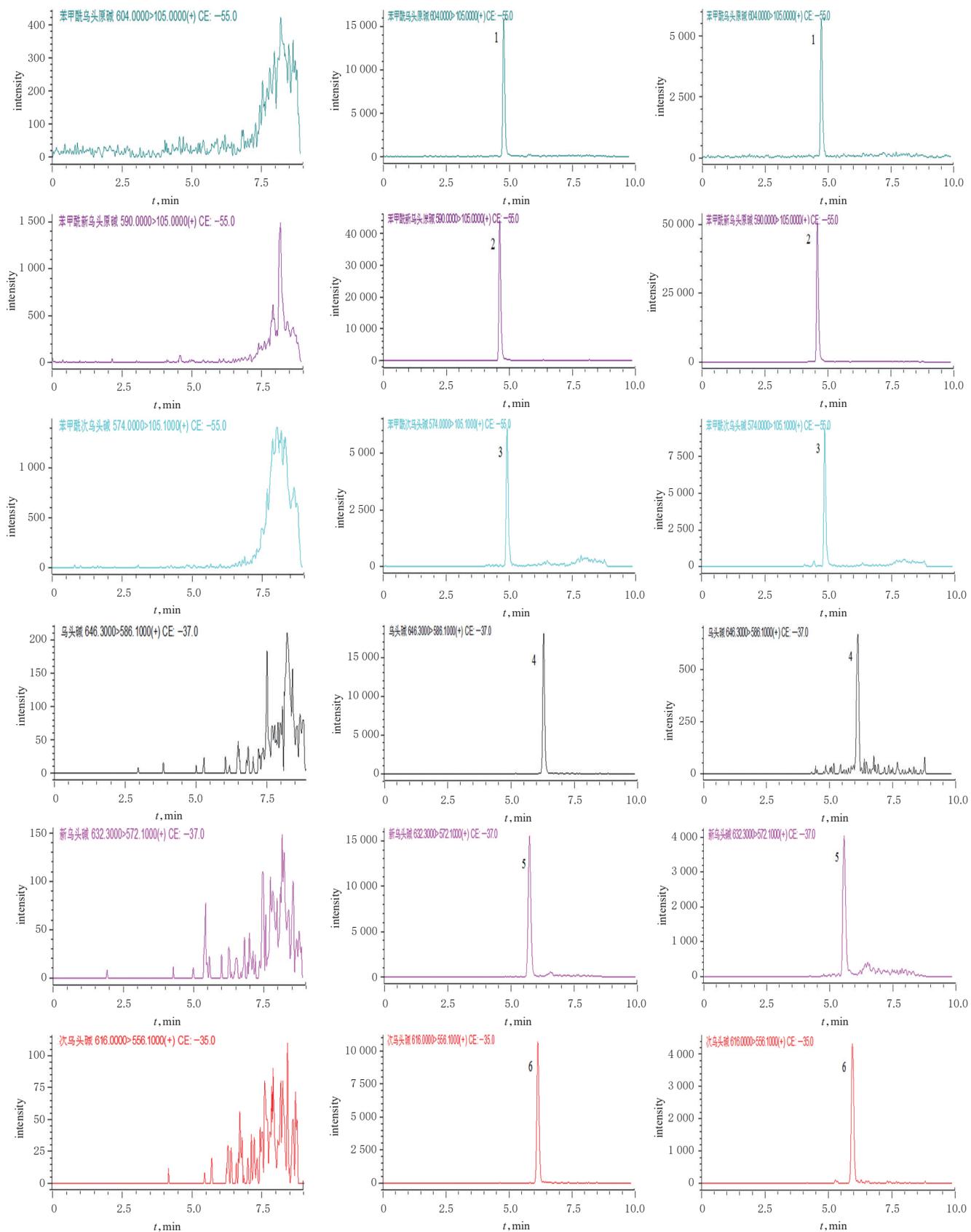
条件进样分析,记录色谱图。结果,在供试品溶液中,各待测成分的出峰位置与混合对照品基本一致,且空白溶液对测定无干扰,详见图2。

2.2.5 线性关系考察 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,加50%甲醇稀释,制成苯甲酰乌头原碱质量浓度分别为2.28、4.56、9.12、22.80、45.60、91.20、182.40、228.00 ng/mL,苯甲酰新乌头原碱质量浓度分别为2.12、4.24、8.48、21.20、42.40、84.80、169.60、212.00 ng/mL,苯甲酰次乌头原碱质量浓度分别为8.00、16.00、32.00、80.00、160.00、320.00、640.00、800.00 ng/mL,乌头碱质量浓度分别为0.40、0.80、1.60、4.00、8.00、16.00、32.00、40.00 ng/mL,新乌头碱质量浓度分别为1.06、2.12、4.24、10.60、21.20、42.40、84.80、106.00 ng/mL,次乌头碱质量浓度分别为1.60、3.20、6.40、16.00、32.00、64.00、128.00、160.00 ng/mL,胡椒碱质量浓度分别为7.36、14.72、29.44、73.60、147.20、294.40、588.80、736.00 ng/mL,没食子酸质量浓度分别为20.40、40.80、81.60、204.00、408.00、816.00、1 632.00、2 040.00 ng/mL的系列线性溶液,按

“2.2.1”项下试验条件进样分析,记录峰面积。以各待测成分的质量浓度( $X$ , ng/mL)为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,结果见表2。

2.2.6 定量限考察 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,用甲醇-水溶液稀释,按“2.2.1”项下试验条件进样测定,以信噪比 $\geq 10$ 计算定量限。结果,苯甲酰乌头原碱等8种成分的定量限分别为2.28、2.00、8.00、1.60、0.40、1.06、7.36、20.40 ng/mL。

2.2.7 精密度试验 分别取“2.2.5”项下苯甲酰乌头原碱质量浓度为45.60 ng/mL、苯甲酰新乌头原碱质量浓度为42.40 ng/mL、苯甲酰次乌头原碱质量浓度为160.00 ng/mL、乌头碱质量浓度为8.00 ng/mL、新乌头碱质量浓度为21.20 ng/mL、次乌头碱质量浓度为32.00 ng/mL、胡椒碱质量浓度为147.20 ng/mL、没食子酸质量浓度为408.00 ng/mL的线性溶液,按“2.2.1”项下试验条件于1 d内连续进样6次,考察日内精密度;按每天1次连续测定6 d,考察日间精密度。结果,8种成分的日内、日间RSD均小于3% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。



A. 空白溶液

B. 混合对照品溶液

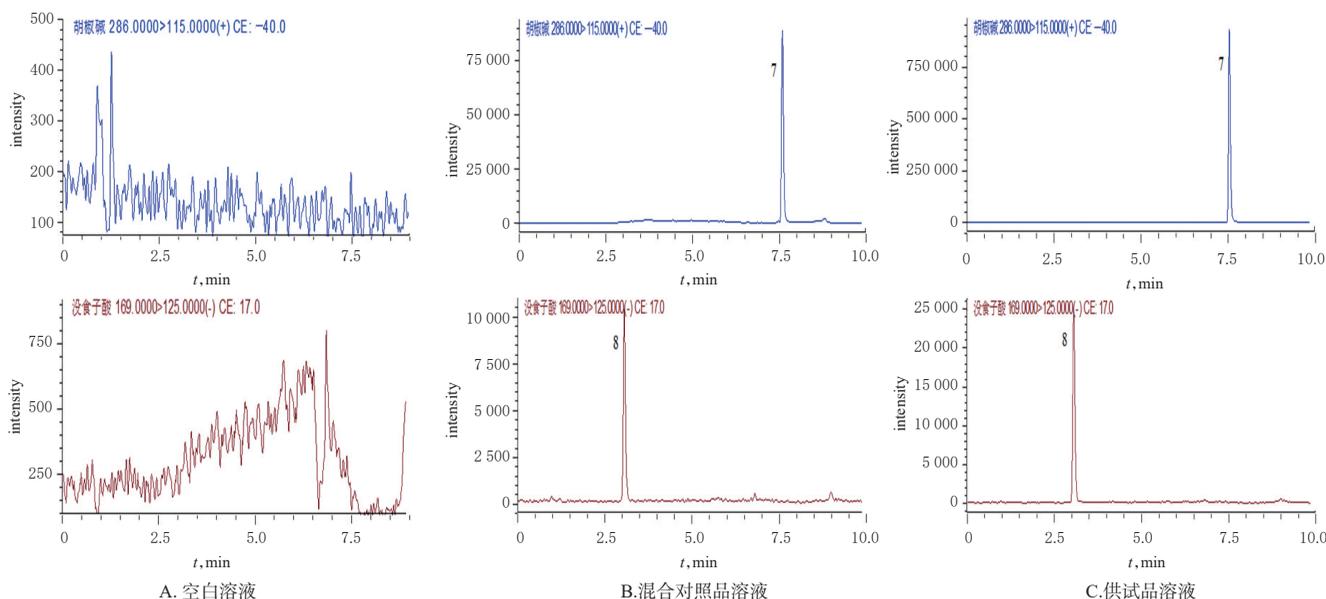
C. 供试品溶液

注: 1. 苯甲酰乌头原碱; 2. 苯甲酰新乌头原碱; 3. 苯甲酰次乌头原碱; 4. 乌头碱; 5. 新乌头碱; 6. 次乌头碱; 7. 胡椒碱; 8. 没食子酸

Note: 1. benzoylaconitine; 2. benzoylneoaconitine; 3. benzoylhypoaconitine; 4. aconitine; 5. neoaconitine; 6. hypoaconitine; 7. piperine; 8. gallic acid

图 2 苯甲酰乌头原碱等 8 种成分的多反应监测模式图谱

Fig 2 Multiple reaction monitoring chromatograms of 8 components as benzoylaconitine



注: 1. 苯甲酰乌头原碱; 2. 苯甲酰新乌头原碱; 3. 苯甲酰次乌头原碱; 4. 乌头碱; 5. 新乌头碱; 6. 次乌头碱; 7. 胡椒碱; 8. 没食子酸

Note: 1. benzoylaconitine; 2. benzoylneoaconitine; 3. benzoylhypoaconitine; 4. aconitine; 5. neoaconitine; 6. hypoaconitine; 7. piperine; 8. gallic acid

续图2

Continued fig 2

表2 苯甲酰乌头原碱等8种成分的回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges of 8 components as benzoylaconitine

待测成分	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围, ng/mL
苯甲酰乌头原碱	$Y=4\ 167.9X+5\ 713.3$	0.999 8	2.28~228.00
苯甲酰新乌头原碱	$Y=40\ 691.9X+78\ 964.6$	0.999 3	2.12~212.00
苯甲酰次乌头原碱	$Y=447.0X+1\ 584.0$	0.999 9	8.00~800.00
乌头碱	$Y=42\ 422.8X+5\ 774.5$	0.999 8	0.40~40.00
新乌头碱	$Y=29\ 194.6X+16\ 450.6$	0.999 5	1.06~106.00
次乌头碱	$Y=32\ 733.2X+43\ 064.1$	0.999 1	1.60~160.00
胡椒碱	$Y=100\ 641.0X+1\ 021\ 260.0$	0.999 0	7.36~736.00
没食子酸	$Y=2\ 797.6X+13\ 542.5$	0.999 9	20.40~2\ 040.00

2.2.8 重复性试验 称取“2.1”项下那如-3味,共6份,每份9.0 g,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下试验条件进样分析,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中8种成分的含量。结果,8种成分含量的RSD均小于5% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.2.1”项下试验条件进样分析,记录峰面积。结果,8种成分峰面积的RSD均小于5% ( $n=7$ ),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.10 加样回收率试验 取已知含量的“2.1”项下那如-3味共6份,置于圆底烧瓶中;精密称取苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、胡椒碱、没食子酸对照品15.75、11.34、129.01、129.64、164.57 mg,加甲醇7 mL溶解,取上述溶液1 mL,置于上述圆底烧瓶中;另精密称取乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品

2.00、5.50、10.50 mg,加甲醇5 mL溶解,取上述溶液100  $\mu$ L,置于上述圆底烧瓶中,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下试验条件进样分析,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

2.2.11 样品含量测定 称取“2.1”项下那如-3味约9.0 g,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下试验条件进样分析,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中8种成分的含量。每样品平行测定3次。

### 2.3 那如-3味的醇提工艺优化

2.3.1 实验设计与结果 本研究前期在参考相关文献的基础上<sup>[16-17]</sup>,选择料液比( $A$ , g/mL)、乙醇体积分数( $B$ , %)、提取时间( $C$ , h)为考察因素,每个因素设置3个水平;同时,选择8种成分含量的综合评分为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验优化醇提工艺。根据那如-3味各组方药材的比例计算综合评分:综合评分=(制草乌中6种生物碱总含量) $\times$ 27.8%+(芫花中胡椒碱含量) $\times$ 16.7%+(诃子中没食子酸含量) $\times$ 55.5%,综合评分越高表明提取效果越好<sup>[14-15]</sup>。那如-3味醇提工艺的因素与水平见表4,实验设计方案与结果见表5(表中, $K_1\sim K_3$ 、 $R$ 均以综合评分计算)。由表5可见,各因素对综合评分影响的顺序由高到低为 $A>C>B$ ,其中 $A_3>A_1>A_2$ 、 $B_2>B_3>B_1$ 、 $C_3>C_1>C_2$ 。方差分析结果显示, $A$ 、 $B$ 、 $C$ 、 $D$ (误差)的偏差平方和分别为24.52、11.62、18.62、7.18,自由度均为2,方差分别为12.26、5.81、9.41、3.59, $F$ 值分别为3.41、1.62、2.62、1.00;其中,因素 $A$ 、 $B$ 、 $C$ 对综合评分均无显著影响( $P>0.05$ )。最优提取工艺为 $A_3B_2C_3$ ,即料液比1:10 (g/mL)、乙醇体积分数75%、提取时间1.5 h。

2.3.2 验证实验 按处方比例称取制草乌、芫花、诃子

表3 苯甲酰乌头原碱等8种成分的加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 3 Results of recovery tests of 8 components as benzyloaconitine( $n=6$ )

待测成分	已知量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
苯甲酰乌头原碱	2.41	2.25	4.86	108.89	104.07	4.42
	2.37	2.25	4.65	101.33		
	2.34	2.25	4.79	108.89		
	2.33	2.25	4.51	96.89		
	2.37	2.25	4.71	104.00		
	2.43	2.25	4.78	104.44		
苯甲酰新乌头原碱	1.71	1.62	3.29	97.53	98.87	2.21
	1.61	1.62	3.21	98.77		
	1.74	1.62	3.29	95.68		
	1.65	1.62	3.30	101.85		
	1.54	1.62	3.14	98.77		
	1.63	1.62	3.26	100.62		
苯甲酰次乌头原碱	18.93	18.83	37.68	99.58	98.79	1.13
	17.74	18.83	36.65	100.42		
	19.64	18.83	38.17	98.41		
	17.82	18.83	36.42	98.78		
	16.56	18.83	35.08	98.35		
	17.46	18.83	35.76	97.19		
乌头碱	0.04	0.04	0.08	100.00	104.17	9.80
	0.04	0.04	0.08	100.00		
	0.04	0.04	0.09	125.00		
	0.04	0.04	0.08	100.00		
	0.03	0.04	0.07	100.00		
	0.03	0.04	0.07	100.00		
新乌头碱	0.10	0.11	0.22	109.09	102.24	7.27
	0.09	0.11	0.19	90.91		
	0.09	0.11	0.21	109.09		
	0.09	0.11	0.20	100.00		
	0.08	0.11	0.20	109.09		
	0.08	0.11	0.20	109.09		
次乌头碱	0.23	0.21	0.43	95.24	99.54	6.86
	0.20	0.21	0.42	104.76		
	0.20	0.21	0.41	100.00		
	0.25	0.21	0.44	90.48		
	0.22	0.21	0.42	95.24		
	0.21	0.21	0.44	109.52		
胡椒碱	17.93	18.52	35.94	97.25	100.87	3.07
	19.14	18.52	37.46	98.92		
	18.59	18.52	37.65	102.92		
	18.32	18.52	37.92	105.83		
	18.08	18.52	36.48	99.35		
	18.26	18.52	36.95	100.92		
没食子酸	25.75	23.51	49.02	98.98	99.22	2.29
	23.48	23.51	47.12	100.55		
	22.03	23.51	44.45	95.36		
	24.12	23.51	47.98	101.49		
	23.07	23.51	46.13	98.09		
	23.80	23.51	47.51	100.85		

饮片,粉碎,过60目筛,称取约180.0 g,共3份,按上述最优提取工艺进行3次验证实验。结果,8种成分的平均含量分别为1.69、1.48、14.69、0.05、0.08、0.28、26.01、17.33 mg/g(RSD为0~4.96%, $n=3$ );平均综合评分为19.03分(RSD=1.42%, $n=3$ ),详见表6。

表4 那如-3味醇提工艺的因素与水平

Tab 4 Factors and levels of Naru-3 ethanol extraction technology

水平	A, g/mL	B, %	C, h
1	1:6	65	0.5
2	1:8	75	1.0
3	1:10	85	1.5

### 3 讨论

本课题组参考文献[18],在采用等度洗脱时发现,制草乌中苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等6种成分色谱峰的峰形较好,但未能分离出胡椒碱和没食子酸,故采用梯度洗脱。结果,8种成分色谱峰的峰形均较好。同时,本课题组又对不同流动相体系(乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液、甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液、乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸溶液)进行了考察,结果发现,当以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相时,胡椒碱、没食子酸的分离度和色谱峰峰形均较差;当以乙腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液、甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相时,胡椒碱、没食子酸的色谱峰峰形较差,且与乙腈-0.1%甲酸溶液比较,苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的响应值均有所减弱且灵敏度较差;当以乙腈-水、甲醇-水为流动相时,8种成分的响应值均较强,但色谱峰存在拖尾现象;当以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相时,各成分的色谱峰峰形对称且灵敏度较高,故选择甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱。

本课题组前期通过质谱扫描来确定了那如-3中8种成分的正、负离子检测模式。结果发现,苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、胡椒碱等7种成分,在正离子模式下可得到1个质子,形成 $[M+H]^+$ 准分子离子峰,故上述7种成分采用MRM正离子模式;而没食子酸在负离子模式下的响应值较强,故该成分采用MRM负离子模式。确定正、负离子检测模式后,本课题组分别在不同碰撞能量(65、55、45、35、25、15 eV)条件下对母离子进行扫描,选择响应值较强的两对碎片离子作为定性离子对,响应值最强的离子对作为定量离子对,通过电压优化确定最终碰撞能量,获得“2.2.1”项下质谱条件。

2020年版《中国药典》(一部)中规定,制草乌中双酯型生物碱以乌头碱、次乌头碱、新乌头碱总量计不得超过0.04%,萆薢中胡椒碱不得低于2.50%,而未对诃子中没食子酸含量作出规定<sup>[11]</sup>。在本研究中,测得制草乌中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的平均总含量为0.041% (0.41 mg/g),萆薢中胡椒碱的平均含量为2.601% (26.01 mg/g),诃子中没食子酸的平均含量为1.733% (17.33 mg/g)。由于本研究所用的提取条件和测定方法与《中国药典》不同,故制草乌中双酯型生物碱总量与药典有出入。

表5 那如-3味醇提工艺的实验设计方案与结果

Tab 5 Experimental design and results of Naru-3 ethanol extraction technology

试验号	A,g/mL	B,%	C,h	D(空白)	苯甲酰乌头原碱,mg/g	苯甲酰新乌头原碱,mg/g	苯甲酰次乌头原碱,mg/g	乌头碱,mg/g	新乌头碱,mg/g	次乌头碱,mg/g	胡椒碱,mg/g	没食子酸,mg/g	综合评分,分
1	1	1	1	1	1.76	1.62	16.38	0.03	0.10	0.25	23.43	10.97	15.60
2	1	2	2	2	1.99	1.70	19.22	0.03	0.09	0.27	25.63	11.62	17.21
3	1	3	3	3	1.72	1.52	16.62	0.02	0.07	0.22	24.28	11.25	15.91
4	2	1	2	3	0.89	0.73	8.66	0.01	0.03	0.10	23.00	8.55	11.48
5	2	2	3	1	1.99	1.75	19.28	0.03	0.08	0.23	24.80	11.00	16.74
6	2	3	1	2	1.30	1.15	12.84	0.02	0.06	0.16	23.32	9.72	13.61
7	3	1	3	2	2.30	2.04	22.88	0.03	0.09	0.28	31.30	14.72	21.08
8	3	2	1	3	1.91	1.64	17.86	0.03	0.09	0.25	31.17	12.82	18.38
9	3	3	2	1	1.95	1.27	14.89	0.02	0.06	0.17	24.46	9.50	14.46
K <sub>1</sub>	48.72	48.16	47.59	46.80									
K <sub>2</sub>	41.83	52.33	43.15	51.90									
K <sub>3</sub>	53.92	43.98	53.73	45.77									
R	12.09	8.35	10.58	6.13									

表6 那如-3味最优醇提工艺的验证实验结果(n=3)

Tab 6 Results of verification tests for optimal ethanol extraction technology of Naru-3(n=3)

序号	苯甲酰乌头原碱,mg/g	苯甲酰新乌头原碱,mg/g	苯甲酰次乌头原碱,mg/g	乌头碱,mg/g	新乌头碱,mg/g	次乌头碱,mg/g	胡椒碱,mg/g	没食子酸,mg/g	综合评分,分
1	1.63	1.48	14.61	0.05	0.08	0.28	26.41	16.77	18.72
2	1.78	1.52	15.45	0.05	0.08	0.29	26.10	17.19	19.23
3	1.65	1.45	14.00	0.05	0.08	0.27	25.51	18.03	19.13
平均值	1.69	1.48	14.69	0.05	0.08	0.28	26.01	17.33	19.03
RSD,%	4.83	2.37	4.96	0	0	3.57	1.76	3.70	1.42

2020年版《中国药典》(一部)中制草乌采用异丙醇-乙酸乙酯提取,因异丙醇和乙酸乙酯毒性较大且不适用于工业大生产<sup>[1]</sup>,基于此本研究参考相关文献[19]及所测各成分的理化性质,最终选择毒性较小且经济的乙醇为提取溶剂。本研究通过正交实验筛选得那如-3味最优醇提工艺为料液比1:10(g/mL),乙醇体积分数75%,提取时间1.5 h。3次验证实验结果显示,8种成分的平均含量分别为1.69、1.48、14.69、0.05、0.08、0.28、26.01、17.33 mg/g(RSD为0~4.96%),平均综合评分为19.03分(RSD=1.42%)。

综上所述,优化所得那如-3味醇提工艺稳定、可行。

## 参考文献

[1] 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[S].呼和浩特:内蒙古科学技术出版社,1998:98.

[2] 包勒朝鲁,那生桑.诃子解毒乌毒蒙医传统观念及现代研究概况[J].中药药理与临床,2020,36(5):223-227.

[3] 何风艳,何轶,戴忠,等. HPLC-MS/MS法同时测定骨刺片中7个生物碱的含量[J].药物分析杂志,2018,38(10):1810-1816.

[4] 赵鹿,廖翠萍,杨秀娟,等.诃子的研究进展及质量标志物的预测[J].中草药,2020,51(10):2732-2744.

[5] 刘芳,张璞,赵鸿燕,等.诃子抗类风湿性关节炎的药效物质基础及药理作用研究[J].中国药房,2017,28(25):3575-3578.

[6] 李丹,杨昇异,赖睿智,等.萆薢化学成分和药理活性研究现状[J].中国临床药理学杂志,2017,33(6):565-569.

[7] HAN S S, SON D J, YUN H, et al. Piperlongumine inhibits proliferation and survival of Burkitt lymphoma in vitro[J]. Leuk Res, 2013, 37(2):146-154.

[8] UMADEVI P, DEEPTI K, VENUGOPAL D V R. Synthesis, anticancer and antibacterial activities of piperine analogs[J]. Med Chem Res, 2013, 22(11):5466-5471.

[9] 李立. HPLC法测定蒙药那如三味丸中没食子酸和胡椒碱的含量[J].中国药师,2015,18(10):1830-1832.

[10] 贾福群. RP-HPLC法测定那如八味丸中没食子酸的含量分析[J].中国民族医药杂志,2015,21(11):36-38.

[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:194,246,248.

[12] 李双,黎锐,曾勇,等.川乌的化学成分和药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2019,44(12):2433-2443.

[13] 陈洁. UPLC-MS/MS法同时测定香青兰中6个活性成分的含量[J].药物分析杂志,2020,40(11):1986-1993.

[14] 马兆臣,陈奎奎,李月婷,等.丹荷颗粒25种特征性成分LC-MS测定及制剂一致性分析[J].中草药,2019,50(24):5970-5979.

[15] 王玄静.正交试验设计的应用及分析[J].兰州文理学院学报(自然科学版),2016,30(1):17-22.

[16] 赵之丽,赵平,邓光锐,等.多指标正交试验优化复方江南卷柏散提取工艺[J].中国药房,2016,27(28):3996-3998.

[17] 王培,赵宏苏,吴德玲,等.正交试验-多指标归一化法优化凤丹皮水提工艺[J].中国药房,2018,29(3):361-364.

[18] 武洁,沈红,朱玲英,等.液-质联用法同时测定大鼠血浆中的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱及其药动学[J].中国医院药学杂志,2011,31(14):1162-1166.

[19] 刘卓,晏星,徐春霞,等.附子双酯型生物碱的提取工艺研究[J].中药材,2011,34(11):1781-1784.

(收稿日期:2021-03-19 修回日期:2021-06-18)

(编辑:陈宏)