

· 化学与分析 ·

HPLC 测定雪上一枝蒿中 3 种生物碱的含量

邹大江,黄先菊,高瑞希,梅枝意,李竣*
(中南民族大学药学院,武汉 430074)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定雪上一枝蒿中乌头碱、新乌头碱和雪上一枝蒿甲素的含量。方法:Thermo C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温 30 ℃,流动相甲醇-0.01% 三乙胺(73:27),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm。结果:乌头碱、新乌头碱和雪上一枝蒿甲素的平均加样回收率分别为 98.88% (RSD 0.86%),98.68% (RSD 0.48%),98.94% (RSD 0.65%)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于雪上一枝蒿中 3 种生物碱的含量测定。

[关键词] 雪上一枝蒿; 乌头碱; 新乌头碱; 雪上一枝蒿甲素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)08-0041-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014080041

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000028.html>

[网络出版时间] 2014-02-07 15:13

HPLC Determination of Three Alkaloids in *Aconitum Brachypodum*

ZOU Da-jiang, HUANG Xian-ju, GAO Rui-xi, MEI Zhi-yi, LI Jun*
(College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of aconitine, mesaconitine and bullatine A in *Aconitine brachypdum*. **Method:** A C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used at 30 ℃ with methanol-0.01% triethylamine (73:27) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and UV detection wavelength was set at 240 nm. **Result:** The average recovery of three alkaloids was 98.88% (RSD 0.86%), 98.68% (RSD 0.48%), and 98.94% (RSD 0.65%) respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used in the content determination of three alkaloids in *A. brachypdum* and provide a more reasonable reference to control the quality of *A. brachypdum*.

[Key words] *Aconitine brachypdum*; aconitine; mesaconitine; bullatine A; HPLC

雪上一枝蒿为毛茛科乌头属植物的干燥块根,性温,味苦、辛,有大毒,具有祛风除湿、消肿止痛等功效,主产于云南、四川、陕西、甘肃、宁夏等省也有分布。雪上一枝蒿含乌头碱、新乌头碱、雪上一枝蒿

甲素、乙素、丙素、丁素、庚素等多种生物碱^[1],具有抗炎^[2]、镇痛^[3]、抗肿瘤^[4]等药理作用。这些生物碱既是活性成分又是剧毒成分,因用药不当和质量控制缺乏造成的中毒事例时有发生^[5-6]。以雪上一枝蒿为原料开发了一系列药品已用于临床,但对雪上一枝蒿药材及其制剂的质量控制研究较少,仅限于离子对萃取光度法测定总生物碱^[7],高效液相色谱法(HPLC)测定雪上一枝蒿甲素^[8-10]和雪上一枝蒿庚素^[11]。为了更好地控制药材质量,本研究以乌头碱、新乌头碱、雪上一枝蒿甲素为指标成分进行了定量测定,为进一步研究其质量控制方法提供参考。

[收稿日期] 20131212(006)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102897)
[第一作者] 邹大江, 硕士, Tel: 15072497173, E-mail: 289483751@qq.com
[通讯作者] * 李竣,博士,副教授,从事天然药物化学成分及质量标准研究, Tel: 027-67841196, E-mail: lijun-pharm@hotmail.com

1 仪器与试药

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (Ultimate 3000 自动进样器, Ultimate3000 紫外检测器); R-1001N 型旋转蒸发仪, 水浴锅 (郑州长城科工贸有限公司); 对照品乌头碱 (批号 110720-201111)、新乌头碱 (批号 110799-201106)、雪上一枝蒿甲素 (批号 110895-200404) 购于中国药品生物制品检定所; 雪上一枝蒿购于安徽亳州健桥医药有限公司, 经李竣副教授鉴定为乌头属植物雪上一枝蒿 *Aconitine brachypdum* 的块根; 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 乙醇、三氯甲烷、石油醚、三乙胺均为分析醇。

2 方法与结果

2.1 供试品制备与供试品溶液配制 称取适量雪上一枝蒿块根粉末, 置于 2 000 mL 烧杯中, 加入无水乙醇使粉末完全浸没于乙醇中, 室温放置 1 周, 过滤, 提取 3 次, 合并提取液, 减压浓缩提取液, 得到浸膏。浸膏用 2% H₂SO₄ 充分混悬, 石油醚脱脂, 氨水调 pH 9, 三氯甲烷萃取 3 次, 合并萃取液, 浓缩干燥, 得到供试品。精密称取 0.016 6 g 上述干燥物, 加色谱纯甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得供试品溶液。

2.2 对照品溶液的配制 精密称取对照品乌头碱、新乌头碱、雪上一枝蒿甲素适量, 加色谱纯甲醇溶解, 配制对照品溶液, 浓度分别为 0.414, 0.412, 0.360 g·L⁻¹ 用 0.45 μm 滤膜过滤, 备用。

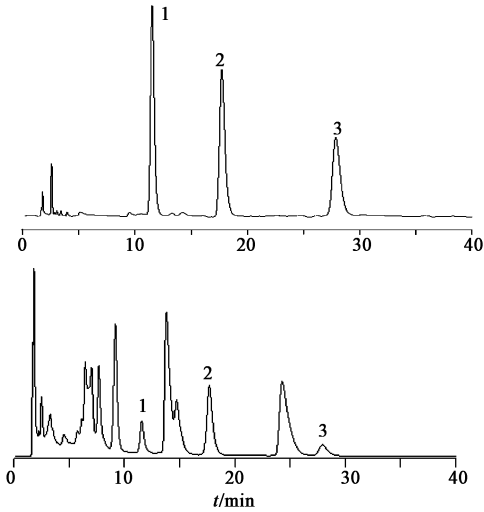
2.3 色谱条件 Thermo C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.01% 三乙胺 (73:27), 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 240 nm, 检测时间 0~40 min, 进样 10 μL。依据对照品在色谱图上的保留时间, 在供试品溶液的色谱图中找出对照品相应的色谱峰, 见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液, 分别进样 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0 μL, 测定各色谱峰峰面积。以对照品进样质量 (μg) 为横坐标, 色谱峰峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归线性方程, 结果见表 1。

表 1 3 种生物碱线性范围考察

化合物	线性范围/μg	回归方程	r
乌头碱	1.035 ~ 24.840	$Y = 1.415\ 7X + 0.304\ 9$	0.999 7
新乌头碱	1.030 ~ 24.720	$Y = 1.719\ 6X - 0.916\ 9$	0.999 8
雪上一枝蒿甲素	0.900 ~ 21.600	$Y = 0.134\ X - 0.133\ 0$	0.999 8

2.5 精密度考察 精密吸取上述对照品溶液, 每次进样 20 μL, 重复进样 6 次, 测定乌头碱、新乌头碱、



A. 对照品溶液; B. 供试品溶液;

1. 新乌头碱; 2. 乌头碱; 3. 雪上一枝蒿甲素

图 1 对照品及供试品 HPLC

雪上一枝蒿甲素的色谱峰峰面积, 计算其 RSD 分别为 0.95%, 1.13%, 1.02%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性考察 精密吸取上述对照品溶液, 分别于制备后的 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 24 h 进样分析, 测定乌头碱、新乌头碱、雪上一枝蒿甲素的色谱峰峰面积, RSD 分别为 1.72%, 1.32%, 1.56%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性考察 取同一批供试品 6 份, 按 2.9 项下方法测定含量, 平行 6 次, 计算新乌头碱、乌头碱、雪上一枝蒿甲素的平均含量, 分别为 0.685% (RSD 0.82%), 2.381% (RSD 1.86%), 0.48% (RSD 1.43%), 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 分别精密称取 3 种生物碱已知含量的供试品 (新乌头碱、乌头碱、雪上一枝蒿甲素的平均含量分别为 0.685%, 2.381%, 0.48%) 6 份, 每份约 16.0 mg, 置 5 mL 量瓶中。每份精密加入新乌头碱 0.120 mg, 乌头碱 0.410 mg, 雪上一枝蒿甲素 0.090 mg, 色谱纯甲醇溶解, 定容, 制得供试品溶液。精密吸取 20 μL, 进样分析, 测定各色谱峰峰面积, 计算 3 种生物碱的回收率, 结果见表 2。

2.9 样品含量测定 按照前述方法制备供试品溶液, 进样分析, 进样量 20 μL, 平行 3 次实验, 测定供试品中 3 种生物碱的平均含量, 结果见表 3。

3 讨论

为使样品各种化合物都达到较好的分离效果, 考察了甲醇-0.01% 三乙胺体系作为流动相多种比例下测试样品中各种化合物的分离效果, 最终确定能使雪上一枝蒿中 3 种生物碱达到良好分离的最佳

表 2 3 种生物碱回收率试验

化合物	取样 /g	样品 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
乌头碱	0.016 1	0.383	0.410	0.786 2	98.35	98.88	0.86
	0.016 3	0.388	0.410	0.793 1	98.81		
	0.017 0	0.405	0.410	0.806 6	97.94		
	0.017 1	0.407	0.410	0.817 7	100.16		
	0.016 8	0.400	0.410	0.807 7	99.43		
	0.016 5	0.393	0.410	0.797 1	98.57		
新乌头碱	0.016 7	0.114	0.120	0.232 0	98.36	98.68	0.48
	0.016 4	0.112	0.120	0.230 5	98.74		
	0.017 0	0.116	0.120	0.235 0	99.14		
	0.016 5	0.113	0.120	0.230 6	97.98		
	0.016 3	0.112	0.120	0.230 4	98.64		
	0.016 9	0.116	0.120	0.235 1	99.23		
甲素	0.017 3	0.083	0.090	0.171 4	98.19	98.94	0.65
	0.016 2	0.078	0.090	0.167 4	99.32		
	0.017 0	0.082	0.090	0.170 9	98.76		
	0.016 4	0.079	0.090	0.167 6	98.41		
	0.017 1	0.082	0.090	0.172 0	99.96		
	0.016 6	0.080	0.090	0.169 1	99.01		

表 3 雪上一枝蒿中 3 种成分含量测定 %

化合物	含量	平均值	RSD
雪上一枝蒿甲素	0.4805	0.484 1	0.80
	0.483 5		
	0.488 2		
新乌头碱	0.701 2	0.702 0	0.57
	0.706 4		
	0.698 5		
乌头碱	2.413 7	2.397 1	0.60
	2.390 4		
	2.387 3		

色谱条件为 Thermo C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 甲醇-0.01% 三乙胺(73:27),柱温 30⁰C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm,检测时间 0~40 min。

[参考文献]

[1] 韩东铁. 雪上一枝蒿的化学成分与药理作用研究概况[J]. 延边大学医报, 2007, 30(3):223.

[2] 黄先菊,任炜,潘乐,等. 雪上一枝蒿醇提物体外抗炎症作用的研究[J]. 中南民族大学学报:自然科学版, 2012,31(4):36.

[3] 黄先菊,任炜,邹大江,等. 雪上一枝蒿的镇痛抗炎作用研究[C]. 武汉:第六届湖北科技论坛,2011:238.

[4] 任炜,郑巧凤,刘涛,等. 雪上一枝蒿的细胞毒作用研究[C]. 北京:第十届全国药用植物及植物药学术研讨会,2011:164.

[5] 王洪云,李智辉. 雪上一枝蒿品种论述[J]. 云南中医中药杂志,2010,31(9):78.

[6] 赵汝频,陈建. 雪上一枝蒿中毒 14 例临床分析[J]. 西南军医,2006,8(5):68.

[7] 高继武,蒋山好. 离子对萃取光度法测定雪上一枝蒿总生物碱含量[J]. 中国民族民间医药杂志,2000, 2:88.

[8] 高绍阳,喻萍,陈武元,等. RP-HPLC 法测定雪上一枝蒿中雪上一枝蒿甲素含量[J]. 药物分析杂志,2005, 25(11):1382.

[9] 李军红,金日显,赵彬,等. HPLC 法测定骨痛灵巴布剂中雪上一枝蒿甲素含量[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(4):59.

[10] 来国防,黄娠,林文涛,等. HPLC 法测定雪上一枝蒿速效止痛搽剂中雪上一枝蒿甲素[J]. 河南大学学报:医学版,2009,28(3):168.

[11] 耿家玲,孟芹,沈勇,等. HPLC 法测定雪上一枝蒿中两种生物碱的含量[J]. 药物分析杂志,2011, 31(2):387.

[责任编辑 顾雪竹]

