

# RP-HPLC-ELSD 测定草乌中准噶尔乌头碱的含量

彭劭<sup>1</sup>, 刘莉萍<sup>2\*</sup>, 金永日<sup>1</sup>, 李绪文<sup>1</sup>

(1. 吉林大学 化学学院, 长春 130012;  
2. 深圳职业技术学院 应用化学与生物技术学院, 广东 深圳 518055)

**[摘要]** **目的:**建立测定草乌中准噶尔乌头碱含量的方法。**方法:**采用反相高效液相色谱法, Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 三乙胺溶液 (40:60), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C; 蒸发光散射检测器 (ELSD) 的漂移管温度 96 °C, 气体 (空气) 压力 2.50 bar, 撞击器呈关闭状态。**结果:**准噶尔乌头碱在 1.5 ~ 30 μg 呈良好线性关系 ( $r=0.9995$ ), 平均回收率为 96.86%, RSD 1.7%。**结论:**该方法简便、准确、快速, 可用于测定草乌中准噶尔乌头碱的含量, 为草乌的质量评价提供依据。

**[关键词]** 草乌; 准噶尔乌头碱; 反相高效液相色谱; 质量评价

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0080-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110080

## Determination of Songorine in Aconiti Kusnezoffii Radix by RP-HPLC-ELSD

PENG Shao<sup>1</sup>, LIU Li-ping<sup>2\*</sup>, JIN Yong-ri<sup>1</sup>, LI Xu-wen<sup>1</sup>

(1. Chemistry College, Jilin University, Changchun 130012, China;  
2. School of Applied Chemistry and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for determining the content of songorine (a kind of diterpenoid alkaloids) in Aconiti Kusnezoffii Radix. **Method:** RP-HPLC was carried out on an Agilent Extend-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% triethylamine solution (40:60) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature of 25 °C. The drift tube temperature of ELSD was set at 96 °C, with the gas (air) pressure of 2.50 bar, and the impactor was in a closed status. **Result:** The songorine showed good linear relationship in the range of 1.5-30 μg ( $r=0.9995$ ). Its average recovery rate was 96.86% with RSD of 1.7%. **Conclusion:** This established method is simple, quick and accurate, which can be used to determine the content of songorine in Aconiti Kusnezoffii Radix and provide reference for quality evaluation of Aconiti Kusnezoffii Radix.

**[Key words]** Aconiti Kusnezoffii Radix; songorine; RP-HPLC-ELSD; quality evaluation

草乌广泛分布于云南、四川、东北等地, 具有祛风除湿、温经止痛的功效, 临床上常用于风寒湿痹, 关节疼痛, 心腹冷痛, 寒疝作痛及麻醉止痛等<sup>[1]</sup>。草乌中的主要化学成分为二萜类生物碱, 它们是主要的药效成分, 但毒性很强, 用药不当易造成中毒现象<sup>[2-3]</sup>。国内外学者对草乌中总生物碱的含量, 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的含量以及苯甲酰乌头原

碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱的含量进行过大量研究和报道<sup>[4-8]</sup>。笔者曾从生草乌根的乙酸乙酯提取物中分离得到 8 个生物碱成分, 通过核磁、质谱等波谱学手段鉴定了它们的结构, 其中准噶尔乌头碱、准噶尔乌头胺和多根乌头碱 3 个化合物为首次从草乌中分离得到。准噶尔乌头碱既是草乌的有效成分又是有毒成分, 具有镇静、降血压、抗

**[收稿日期]** 20150330(015)

**[第一作者]** 彭劭, 在读硕士, 从事药物分析工作, Tel:0431-85167996, E-mail:pengshao1990@126.com

**[通讯作者]** \* 刘莉萍, 硕士, 高级工程师, 从事食品与药物分析工作, Tel:0755-26019306, E-mail:maryliu@szpt.edu.cn

乙酰胆碱作用<sup>[9-10]</sup>。准噶尔乌头碱在草乌中含量较高,且尚未见该成分含量测定的文献报道。本文利用反相高效液相色谱法,采用蒸发光散射检测器(RP-HPLC-ELSD)测定了草乌中准噶尔乌头碱的含量,其研究成果为草乌药材质量标准的完善以及安全用药提供了新的科学依据。

### 1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Alltech 2000 型蒸发光散射检测器(美国 Grace 公司), AG135 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司), Millipore-Q 型超纯水制备仪(法国 Millipore 公司)。

草乌药材购自河北安国、安徽亳州、云南大理和吉林磐石,经吉林大学药学院张静敏教授鉴定为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* 的干燥块根。

对照品准噶尔乌头碱为自制,系从生草乌根中提取分离,并经 NMR, MS, IR 等分析方法鉴定其结构,再与文献[11-12]对照确定其结构,归一化法测得纯度为 99.50%。乙腈色谱纯,水为 Millipore-Q 制超纯水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 三乙胺溶液(40:60), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 蒸发光散射检测器(ELSD) 漂移管温度 96 °C, 气体(空气)压力 2.50 bar, 撞击器呈关闭状态, 进样量 20 μL。在上述色谱条件下进行分析, 对照品及样品的色谱图见图 1, 2。

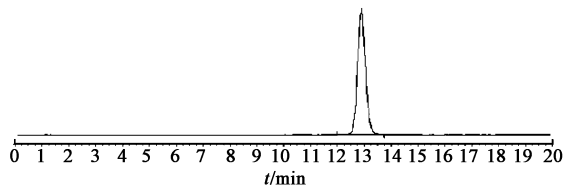
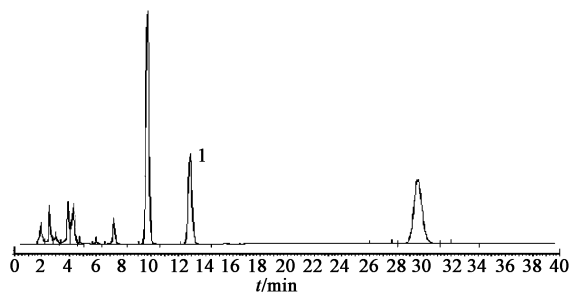


图 1 准噶尔乌头碱对照品溶液 HPLC  
Fig. 1 RP-HPLC-ELSD chromatogram of songorine

**2.2 对照品溶液制备** 精密称取准噶尔乌头碱对照品 7.5 mg, 用乙腈溶解至 5 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 得 1.5 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 置于 4 °C 冰箱中冷藏备用。

**2.3 供试品溶液制备** 精密称取草乌粉末 3.0 g, 以氨水浸湿, 三氯甲烷加热回流提取 2 次, 每次加入氨水 3.0 mL, 三氯甲烷 20 mL, 提取时间分别为 1.5, 1.0 h。过滤, 合并滤液, 减压蒸干, 再用乙腈溶解至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀。过 0.22 μm 微孔



1. 准噶尔乌头碱  
图 2 草乌样品的 HPLC  
Fig. 2 RP-HPLC-ELSD chromatogram of sample

滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

**2.4 线性关系考察** 准确吸取 2.2 项下的准噶尔乌头碱对照品溶液(1.5 g·L<sup>-1</sup>) 适量, 分别以乙腈稀释成质量浓度为 0.075, 0.15, 0.30, 0.60, 0.90, 1.20, 1.50 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜。取上述对照品滤液 20 μL, 按 2.1 项下色谱条件平行测定 3 次, 计算色谱峰面积的平均值。以对照品进样量的常用对数为横坐标, 平均峰面积的常用对数为纵坐标, 考察线性关系。回归方程为  $Y = 1.6311X + 0.1061$  ( $r = 0.9995$ )。结果表明, 在 1.5 ~ 30 μg 呈良好线性关系。

**2.5 精密度试验** 取质量浓度为 0.3 g·L<sup>-1</sup> 的准噶尔乌头碱对照品溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 1 d 内连续进样 6 次, 测定峰面积, 考察其结果表明, 准噶尔乌头碱峰面积的 RSD 0.3%, 日内精密度良好。将该对照品溶液连续进样 3 d, 每天进样 2 次, 测定峰面积, 表明准噶尔乌头碱峰面积的 RSD 1.5% ( $n = 6$ ), 其日间精密度良好。

**2.6 重复性试验** 按照 2.3 的方法制备供试品溶液 6 份, 取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定准噶尔乌头碱的含量。结果准噶尔乌头碱的平均含量为 1.563 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 1.4% ( $n = 6$ ), 表明其日间精密度良好。

**2.7 稳定性试验** 按照 2.3 项下方法制备供试品溶液 1 份, 取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 在 0 ~ 10 h 内每隔 2 h 进样 1 次测定, 结果准噶尔乌头碱峰面积的 RSD 1.7% ( $n = 6$ ), 表明 10 h 内稳定性良好。

**2.8 加样回收率试验** 精密称取草乌样品 3.0 g (准噶尔乌头碱质量分数为 1.563 mg·g<sup>-1</sup>) 6 份, 分成 3 组, 每组分别加入对照品溶液(1.5 g·L<sup>-1</sup>) 2.7, 3.3, 4.0 mL, 按照 2.3 项下方法制成供试品溶液。取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 根据外标法, 计算供试品溶液中准噶尔乌头碱的总含量, 并

计算加样回收率以及 RSD。结果见表 1。

表 1 草乌中准噶尔乌头碱加样回收率试验

Table 1 Results of recovery tests of songorine in *Aconiti Kusnezoffii Radix*

加入量 /mg	测得量 /mg	样品中量 /mg	回收率 /%	平均值 /RSD/%
4.050	8.649	3.960	97.78	96.86/1.7
	8.530	3.841	94.84	
4.950	9.593	4.904	99.07	
	9.397	4.708	95.11	
6.000	10.52	5.831	97.18	
	10.52	5.831	97.18	

注:样品中准噶尔乌头碱实际含量为 4.689 mg。

**2.9 样品含量测定** 精密移取准噶尔乌头碱对照品溶液(1.5 g·L<sup>-1</sup>)3.0 mL 至 10 mL 量瓶中,用乙腈稀释得质量浓度为 0.45 g·L<sup>-1</sup>的对照品溶液,0.22 μm 微孔滤膜过滤。取 20 μL 注入高效液相色谱仪,平行测定 3 次。将 11 批次的草乌药材,按照 2.3 项下方法制成供试品溶液,测定,根据外标法,计算准噶尔乌头碱的含量,结果见表 2。

表 2 草乌样品中准噶尔乌头碱的含量

Table 2 Contents of songorine in *Aconiti Kusnezoffii Radix*  
mg·g<sup>-1</sup>

No.	产地	准噶尔 乌头碱	No.	产地	准噶尔 乌头碱
1	河北安国	1.253	7	云南大理	1.769
2	河北安国	0.945 9	8	云南大理	2.152
3	河北安国	0.572 6	9	云南大理	1.383
4	磐石烟囱山	1.002	10	安徽亳州	1.671
5	磐石烟囱山	1.958	11	安徽亳州	1.599
6	磐石烟囱山	0.997 4			

试验结果表明,不同产地不同批次的草乌药材中准噶尔乌头碱的含量有所差别,但除个别样品含量低于 1.0 mg·g<sup>-1</sup> 外,其余均在 1.0 mg·g<sup>-1</sup> (0.1%) 以上,属于含量较高的生物碱类成分(2010 年版《中国药典》测得草乌中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的总量为 0.10% ~ 0.50%)。因此,认为有必要将准噶尔乌头碱的含量测定纳入草乌质量标准之中。

### 3 讨论与小结

**3.1 色谱条件的选择**<sup>[13-17]</sup> 本文以甲醇-水、乙腈-水为流动相进行测定,发现目标化合物的色谱峰拖尾较严重,而在水相中加入 0.1% 的三乙胺后,峰形

有了明显改善,因此初步选用甲醇-0.1% 三乙胺溶液或乙腈-0.1% 三乙胺溶液作为流动相。由于流动相偏碱性,因此,选择可适用于较高 pH 的 Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱。

在考察紫外检测器(DAD)的测定效果时,发现以甲醇-0.1% 三乙胺溶液为流动相无法使目标化合物与药材中的其他成分达到有效分离。而以乙腈-0.1% 三乙胺溶液为流动相时,发现虽然目标化合物能与其他成分有效分离,但是基线波动较大,导致检测限无法达到测定要求。为此,考察了 Alltech 2000 ELSD 的测定效果,经比较后发现其基线、峰形明显优于 DAD 检测器,并且检测限、精密度均能达到测定要求,最后选用 ELSD 检测器,确定流动相比例为乙腈-0.1% 三乙胺溶液(40:60)。

**3.2 提取方法的选择**<sup>[18-19]</sup> 为保证目标化合物提取完全,本文比较了环己烷、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮 5 种溶剂的提取效果,加氨水与不加氨水的区别,并考察了加热回流、超声、冷浸 3 种提取方法的优劣,以及提取次数和提取溶剂用量的选择。结果表明,以三氯甲烷为溶剂加热回流的提取效果最佳,草乌样品 3.0 g,以氨水 3.0 mL 浸湿、再加入三氯甲烷 20 mL 提取 2 次,可将准噶尔乌头碱提取完全。

本文以三氯甲烷为提取剂,采用反相高效液相色谱-蒸发光散射检测器法准确地测定了草乌中准噶尔乌头碱的含量,目标化合物能达到基线分离,且重复性好,回收率高,结果可靠,为草乌质量标准的完善提供了新的依据。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:220.

[2] Wong S K, Tsai S K, Kwan S Y. Analysis of proprietary Chinese medicines for the presence of toxic ingredients by LC/MS/MS[J]. J Pharmaceu Biomed Ana, 2002, 30 (1): 161-170.

[3] 林学尧, 陈瑞秀, 张秀尧, 等. 一起误服含乌头碱杨梅白酒引起的食物中毒调查分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(6): 879-881.

[4] Huang J M, Guo J X, Sun M M, et al. The method for aconitum alkaloids in *Radix Aconiti kusnezoffii* [J]. J Chin Med Materials, 2002, 25(12): 878-80.

[5] 包勒朝鲁, 乌兰图雅, 那生桑, 等. HPLC 法测定蒙医烘制草乌中的乌头碱含量[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(6): 1363-1365.

- [6] 张聿梅, 谢黔锋, 鲁静, 等. 草乌药材标准修订研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 940-944.
- [7] 张凌, 柳芳林, 刘长安, 等. HPLC 测定草乌与瓜蒌配伍前后 6 种毒性成分的变化[J]. 中草药, 2014, 45(6): 786-790.
- [8] 邓广海, 林华, 龚又明. 草乌及其炮制品中 6 种生物碱类成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 35-38.
- [9] 汪纪武, 肖庆祥. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 956.
- [10] 季宗彬. 中药有效成分药理与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 860.
- [11] 陈亚玲, 袁小红, 侯大斌. 生附子中二萜生物碱化学成分及其杀虫活性的研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(10): 4536-4537, 4540.
- [12] 魏孝义, 张继, 韦璧瑜, 等. 准噶尔乌头二萜生物碱成分的研究[J]. 西北师范大学学报, 1998, 34(3): 45-48.
- [13] 巴图德力根, 布仁巴图, 韩志强. HPLC 法测定蒙药嘎日迪-13 味丸中 6 种乌头类生物碱的含量[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(19): 1961-1963.
- [14] 张小龙, 吴先富, 王昆, 等. HPLC-QTOF-MS 法测定风湿骨痛胶囊中 9 个乌头类生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 414-419.
- [15] 巴图德力根, 布仁巴图, 韩志强. HPLC 法测定蒙药孟根乌森乌日勒中 6 种乌头类生物碱的含量[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(21): 2146-2149.
- [16] 袁圆, 王晓明, 潘桂湘. LC-MS/MS 测定 16 种市售中药制剂中 8 种乌头类生物碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12): 2823-2825.
- [17] 李美艳, 赫清雪, 王爱武. HPLC 同时测定复方藤乌软膏中 6 种乌头类生物碱含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(9): 87-90.
- [18] 曹红云, 牛延菲, 秦波, 等. 正交试验优选雪上一枝蒿中乌头碱的提取工艺[J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(12): 64-67.
- [19] 晓华, 张思远, 海平, 等. 草乌中二萜生物碱的提取工艺及化学成分研究[J]. 安徽农业科学, 2015(2): 113-114.

[责任编辑 顾雪竹]

## 《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种, 其中中国出版的英文期刊 194 种, 中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记); 扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点, 自提供使用以来, 深受用户好评, 被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库, 曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。