

· 化学与分析 ·

HPLC 同时测定附子中盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱

唐小龙^{1,2}, 易进海^{1*}, 黄志芳¹, 刘云华¹, 陈燕¹, 刘玉红¹

(1. 四川省中医药科学院, 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] 目的: 用 HPLC 同时测定附子中盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱的含量。方法: 采用 Agilent Eclipse C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 280 nm。结果: 盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱色谱峰与其他色谱峰分离良好, 样品中盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱色谱峰的 DAD 光谱与对照品一致, 进样量在 0.005 21 ~ 0.521 μg 和 0.005 24 ~ 0.524 μg 线性关系良好, 平均回收率分别为 100.6% 和 96.5%, RSD 分别为 2.0% 和 1.0% (n = 6)。结论: 实验含量测定方法准确、快速, 为附子质量控制提供参考方法。

[关键词] 附子; 高效液相色谱法; 含量测定; 盐酸多巴胺; 去甲猪毛菜碱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)19-0070-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1108.008.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 11:08

Simultaneous Determination of Dopamine Hydrochloride and Salsolinol in Radix Aconite Lateralis by HPLC

TANG Xiao-long^{1,2}, YI Jin-hai^{1*}, HUANG Zhi-fang¹, LIU Yun-hua¹, CHEN Yan¹, LIU Yu-hong¹

(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of dopamine hydrochloride and salsolinol in Radix Aconite Lateralis. **Method:** The separation was carried on an Agilent Eclipse C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with 0.1% H₃PO₄ as mobile phase at a flow rate of 1 mL · min⁻¹. The column temperature was set at 35 °C and the detector wavelength was at 280 nm. **Result:** Dopamine hydrochloride and salsolinol were all well separated from other substances and their UV spectrums were essentially the same to the standards. The liner ranges of dopamine hydrochloride and salsolinol were 0.005 21-0.521 μg, 0.005 24-0.524 μg. The average recoveries were 100.6% and 96.5%; RSD were 2.0% and 1.0% (n = 6). **Conclusion:** This method is rapid and accurate and is suitable for quality control of Radix Aconite Lateralis.

[Key words] Radix Aconite Lateralis; HPLC; determination; dopamine hydrochloride; salsolinol

附子(Radix Aconite Lateralis)为毛茛科多年生草本植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 子根的加

工品,始载于《神农本草经》,味辛甘,性大热,有毒,归心、肾、脾经,为有毒中药的代表,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效,被历代医家视为补火助阳之要药,也被誉为“回阳救逆第一品药”。目前,附子含量测定主要为 6 种酯型生物碱^[1-5],其水溶性生物碱含量微、不易检测,主要有去甲猪毛菜碱、去甲乌药碱、棍掌碱等。1976 年, Kosuge 等^[6]从日本附子中分离出对心血管系统作用很强的微量水溶性成分 dl-去甲乌药碱 (demethylcoclanrinhihenamine)^[7]; 1978

[收稿日期] 20111114(012)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(2009CB522804); 国家科技支撑计划(2011BAI13B05)

[第一作者] 唐小龙, 硕士, 从事中药化学成分与质量标准

[通讯作者] * 易进海, 研究员, Tel: 028-85210843, E-mail: yijinhai@yahoo.com.cn

年,今野等^[8]从北海道伊达产附子中分离出一种具弱强心作用的成分棍掌碱(coryneine);1979年,Konno等^[9]从日本附子中分离得到具有明显升压和强心作用的活性物质氯化甲基多巴胺(coryneine chloride);1982年,陈迪华等^[10]从云南丽江产附子中分得去甲乌药碱的类似物去甲猪毛菜碱(salsolinol),该成分具有升压及弱强心作用。但目前还未见文献报道附子水溶性生物碱的含量测定。本实验建立了HPLC测定附子中盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱的含量,该方法准确、快速,为附子炮制及其质量控制提供参考方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1200型高效液相色谱仪(包括四元泵,DAD检测器,柱温箱,自动进样器,工作站),CQ-250超声波清洗仪(上海船舶电子设备厂),岛津AUW220D型十万分之一电子天平,3K15型离心机(SIGMA),Millipore Milli-Q Integral 3超纯水机,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

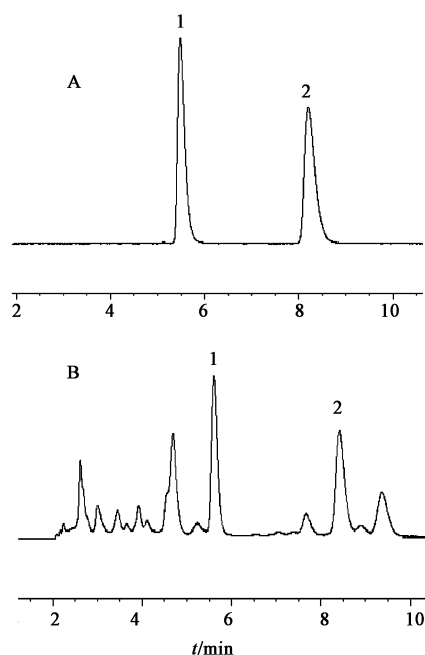
盐酸多巴胺对照品(批号100070-200405)购于中国药品生物制品检定所;去甲猪毛菜碱对照品由本实验室从附子中分得,其纯度为98.2%,经理化性质和光谱数据分析,鉴定其结构。生附子采自四川江油等地,其他实验样品购于成都荷花池药材市场,由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相0.1%磷酸水溶液,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长280 nm,柱温35℃,进样量10~50 μL,对照品溶液及供试品溶液的色谱图见图1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸多巴胺5.79 mg和去甲猪毛菜碱5.83 mg,分别置10 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取上述对照品溶液各0.45 mL置于同一10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,制成每1 mL含盐酸多巴胺26.06 μg和去甲猪毛菜碱26.24 μg的混合对照品溶液I。精密吸取上述混合对照品溶液1 mL置10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液II。

2.3 供试品溶液的制备 取附子粉末(过三号筛)约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入0.05 mol·L⁻¹盐酸50 mL,称定质量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用0.05 mol·L⁻¹盐酸补足减失的质量,摇匀,高速离心



A. 对照品; B. 附子样品;

1. 盐酸多巴胺; 2. 去甲猪毛菜碱

图1 盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱对照品和附子药材HPLC(12 000 r·min⁻¹)5 min,取上清液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 精密吸取2.2项下混合对照品溶液I 5, 10, 15, 20 μL和混合对照品溶液II 2, 5, 10, 15, 20 μL,注入液相色谱仪中,以进样量(μg)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,得到盐酸多巴胺的回归方程 $Y = 834.54X - 0.829$ ($r = 0.9999$);去甲猪毛菜碱回归方程 $Y = 828.85X - 1.058$ ($r = 0.9999$)。结果表明,盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱进样量分别在0.005 21~0.521 μg和0.005 24~0.524 μg线性关系良好。

2.4.2 检测限与定量限 在选定的色谱条件下,当信噪比为3时,测得盐酸多巴胺的检测限为2.35 ng,去甲猪毛菜碱的检测限为2.63 ng;当信噪比为10时,测得盐酸多巴胺的定量限为5.73 ng,去甲猪毛菜碱的定量限为7.87 ng。

2.4.3 精密度试验 精密吸取供试品溶液(S₁)50 μL,连续进样6次,记录峰面积,盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱的RSD分别为0.9%,0.3%,表明仪器精密度好。

2.4.4 重复性试验 取附子粉末(S₁)6份,按2.3项下制成供试品溶液,精密吸取供试品溶液各50 μL,注入液相色谱仪,按2.1项下色谱条件进行检测,记录峰面积,计算含量。盐酸多巴胺的平均含量为0.027 5 mg·g⁻¹ (RSD 1.0%),去甲猪毛菜碱的平

均含量为 $0.1973 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 0.8%) ($n=6$)。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S_1) 于 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 进样测定, 盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 0.8%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 回收率试验 取已知含量的附子粉末 (S_1) 6 份, 精密称取约 1 g, 分别精密加入一定量的盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱对照品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱回收率测定 ($n=6$)

成分	样品	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
	含量 /mg					
盐酸多巴胺	0.027 54	0.028 95	0.056 0	98.3	100.6	2.0
	0.027 95	0.028 95	0.057 2	101.0		
	0.027 52	0.028 95	0.055 9	97.9		
	0.027 92	0.028 95	0.057 3	101.5		
	0.027 67	0.028 95	0.057 3	102.4		
	0.027 59	0.028 95	0.057 3	102.6		
	去甲猪毛菜碱	0.197 3	0.233 2	0.419 8	95.4	96.5
0.200 3		0.233 2	0.422 5	95.3		
0.197 2		0.233 2	0.422 7	96.7		
0.200 0		0.233 2	0.428 0	97.7		
0.198 2		0.233 2	0.422 9	96.4		
0.197 7		0.233 2	0.424 5	97.3		

2.4.7 含量测定 取附子样品, 分别按 2.3 项下方法制成供试品溶液, 依法测定, 计算盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱的含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 流动相的选择 盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱水溶性极强, 色谱保留时间短, 在纯水相中, 即能获得较好的分离 (图 1)。参考文献方法^[11-14], 经进一步优化最终确定流动相为 0.1% 磷酸水溶液, 在此色谱条件下, 样品中盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱与其他色谱峰分离良好, 且与对照品 DAD 光谱一致。

3.2 检测波长的选择 采用二极管阵列检测器考察了盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱的 DAD 光谱, 二者在 280 nm 有最大吸收, 故选择 280 nm 作为检测波长。

3.3 提取方法的考察 考察了水、酸水、30% 甲醇、50% 甲醇、30% 酸甲醇和 50% 酸甲醇对提取效果的

表 2 附子样品 2 种成分的含量测定 ($n=2$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品及编号	盐酸多巴胺	去甲猪毛菜碱
黑顺片 S_1	0.027 5	0.197 3
黑顺片 S_2	0.098 5	0.021 6
黑顺片 S_3	0.129 1	0.089 3
黑顺片 S_4	0.144 5	-
黑顺片 S_5	-	-
白附片 S_6	0.130 0	-
白附片 S_7	0.026 0	-
白附片 S_8	0.031 1	-
白附片 S_9	-	0.0578
白附片 S_{10}	-	-
黄附片 S_{11}	0.033 7	0.200 9
黄附片 S_{12}	0.015 6	0.192 0
黄附片 S_{13}	0.014 4	0.182 7
黄附片 S_{14}	0.016 0	0.172 4
生附子 S_{15}	0.306 7	0.258 4
生附子 S_{16}	0.198 5	0.167 8
生附子 S_{17}	0.163 8	1.149 0
生附子 S_{18}	0.158 4	0.265 5

注: - 未检出。

影响, 结果表明以酸水提取效果最佳; 对酸水浓度 ($0.025, 0.05, 0.1, 0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行了考察, 表明对测定结果无显著影响, 故用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液提取。此外, 还比较了回流与超声对提取效果的影响, 结果表明二者无明显差异, 故选择简便的超声提取。

3.4 结果分析 结果显示, 不同来源的生附子及饮片中盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱的含量差异很大, 总体趋势是生附子 > 黄附片 > 黑顺片和白附片, 部分黑顺片和白附片中盐酸多巴胺和去甲猪毛菜碱已检不出, 表明附子产地及其加工炮制对水溶性生物碱有显著影响。附子水溶性生物碱具有显著的强心和升压作用, 因此, 有必要测定其代表性主要成分的含量, 才能更好地反应、控制附子的质量和有效性。

[参考文献]

- [1] 李志勇, 李彦文, 孙建宁, 等. 乌头类植物药三种双酯型生物碱研究进展[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2009, 18(2): 87.
- [2] 刘芳, 于向红, 李飞, 等. HPLC 测定附子及其炮制品中 3 种双酯型生物碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1160.

安息香不同提取方法的 GC-MS 研究

彭颖,夏厚林*,周颖,王建,黄立华
(成都中医药大学,成都 611137)

[摘要] 目的:考察安息香不同提取方法的化学成分异同,探索安息香挥发性成分分析的最宜提取方法。方法:应用气相色谱-质谱联用技术,分析安息香溶剂提取部位(石油醚和乙醚提取)、水蒸气蒸馏提取挥发油、顶空固相微萃取挥发性成分的同异。结果:安息香溶剂提取鉴定出 5 个化合物(其中石油醚部位 4 个化合物、乙醚部位 4 个化合物),水蒸气蒸馏提取的挥发油鉴定出 19 个化合物,顶空固相微萃取鉴定出 12 个化合物。3 种方法所得成分中皆含有苯甲酸、苯甲酸苄酯、香草醛、肉桂酸苄酯 4 种成分,3 种方法中常规水蒸气蒸馏得到的成分相对较多种类较全面。结论:3 种提取方法中,安息香经常规水蒸气蒸馏提取得到的成分最多且种类最全面,提示此 3 种提取方法中常规水蒸气蒸馏是安息香挥发性成分分析的最宜方法。

[关键词] 安息香; 溶剂提取; 水蒸气蒸馏; 顶空固相微萃取; 气相色谱-质谱联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0073-04

The GC-MS Research on Different Extraction Methods of Benzoinum

PENG Ying, XIA Hou-lin*, ZHOU Ying, WANG Jian, HUANG Li-hua
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the differences and similarities of chemical components obtained through different extraction methods about Benzoinum and to explore the best extraction method to study the volatile

[收稿日期] 20111127(001)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2007CB512606)

[第一作者] 彭颖,硕士研究生,从事中药药效物质基础及质量标准研究,Tel:13547959947,E-mail:pengying502214py@163.com

[通讯作者] *夏厚林,博士,教授,博士生导师,从事中药药效物质基础及质量标准研究,Tel:13568899011,E-mail:xhl64@163.com

- [3] 张聿梅,鲁静,蒋渝,等. 川乌和制川乌中单酯及双酯型生物碱成分的含量测定[J]. 药物分析杂志,2005,25(7):807.
- [4] 陈东安,易进海,黄志芳,等. 附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):64.
- [5] 黄志芳,易进海,吴燕,等. 附片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,36(4):478.
- [6] Kosuge T, Yokota M. Studies on cardiac principle of Aconite root. Chem Pharm Bull. 1976,24(2):176.
- [7] 姜文卿. 附子 1 号对缓慢性心律失常的作用初步临床观察[J]. 中华心血管病杂志,1980,8(2):95.
- [8] 今野,向坂. 附子的新强心成分[J]. 汉方研究,1978,(5):163.
- [9] Konno C, Shirasaka M, Hikino H. Cardioactive principle of Aconitum carmichaeli Roots. Planta Med, 1979,35:150.
- [10] 陈迪华,李慧颖,宋维良. 中国附子成分研究 II. 白附片的化学成分[J]. 中草药,1982,13(11):481.
- [11] 吴艳琼,梁洁雯. HPLC 测定盐酸多巴胺注射液的含量[J]. 广东药学,2005,15(3):15.
- [12] 段晋燕,郭琳娜,张永谦,等. 细胞中多巴胺及儿茶酚胺异喹啉类物质的 HPLC-MS/MS 检测[J]. 化学通报,2010,73(11):1035.
- [13] 刘玉涛,滕显伟. 简述用 HPLC 法测定盐酸多巴胺注射液有关物质的方法[J]. 黑龙江科技信息,2009,(34):299.
- [14] 陈薛钗,王睿,毛健,等. Salsolinol 合成酶的高效液相色谱-电化学活性检测方法研究[J]. 化学通报,2010,73(10):938.

[责任编辑 顾雪竹]