

RP-HPLC 法测定白附片中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱

张启云¹, 朱战杰¹, 余日跃², 刘红宁², 徐国良^{1*}

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004;
2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

[摘要] 目的: 测定白附片中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱 3 种脂溶性生物碱含量。方法: 用反相离子对 HPLC 法, 使用 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 流动相: 乙腈-5 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄ 溶液, 磷酸调至 pH4.5(52:50), 内含 7 mmol·L⁻¹ 十二烷基磺酸钠(SDS); 检测波长: 235 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 结果: 以上 3 种生物碱可以完全分离, 准确测定。结论: 该方法准确度高, 可应用于白附片中生物碱的含量测定。

[关键词] 白附片; 高效液相色谱法; 新乌头碱; 乌头碱; 次乌头碱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)12-0001-03

Determination of Aconitine, Mesaconitine, Hypaconitine in Radix Aconitilateralis Preparata by IP-LC

ZHANG Qi-yun¹, ZHU Zhan-jie¹, YU Ri-yue², LIU Hong-ning², XU Guo-liang^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation (Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi University of TCM, Nanchang Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To develop on IP-LC method for determination of three alkaloids: aconitine, mesaconitine, hypaconitine in the Chinese traditional medicine Radix Aconitilateralis Preparata (Baifupian). **Methods:** An Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column was used at room temperature. The mobile phase was CH₃CN-5 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄ (52:50) containing 7 mmol·L⁻¹ SDS at a flow-rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detector was set at UV 235 nm. **Result:** These three alkaloids can be completely separated and determined quantitatively. **Conclusion:** This method is accurate and suitable for the determination of three alkaloids in Baifupian.

[Key words] Baifupian; HPLC; aconitine; mesaconitine; hypaconitine

附子为毛茛科植物乌头 (*Aconitum carmichaeli* Debx.) 侧根 (子根) 的加工品。附子性大热, 味辛、甘, 有毒, 具有强心、降压、抗炎和镇痛等作用。附子根据炮制和加工方法不同, 加工品种有黑顺片 (Black Slice)、白附片 (White Slice) 和盐附子 (Salted Aconite Daughter root) 等。其中白附片为临床常用中药之一,

具有回阳救逆, 助阳补火, 逐风寒湿邪之功能。用于亡阳虚脱, 肢冷脉微, 阳痿, 宫冷, 心腹冷痛, 虚寒吐泻, 阴寒水肿, 阳虚外感, 寒湿痹痛。附子中的生物碱主要有乌头碱 (aconitine, AC)、新乌头碱 (mesaconitine, MA, 又称中乌头碱)、次乌头碱 (hypaconitine, HA, 又称下乌头碱)。乌头碱等双酯型生物碱为剧毒化合物, 附子经炮制后, 其总生物碱的含量下降, 且各生物碱的含量比例也发生了变化^[1]。为控制药物的毒性, 检测附子加工炮制后各毒性生物碱的含量非常必要。目前, 检测附子、乌头中生物碱的方法有酸碱滴定法^[2]、薄层扫描法和高效液相色谱法^[3-5]、毛细管电泳法^[6]及气相色谱法^[7]等。但

[收稿日期] 2007-04-02

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 基金资助项目 (2006CB504702)

[通讯作者] * 徐国良, Tel: (0791) 7118657;
E-mail: xuguoliang6606@126.com

白附片中生物碱的高效液相检测方法未见报道。

本文建立的反相离子对高效液相色谱法可以同时测定白附片中上述 3 种生物碱成分,分离度好、准确度高,可应用于白附片中生物碱的含量测定,对白附片的质量控制具有重要意义。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, Chromator Solution Light 工作站; METTLER AE-40 分析天平, KQ-250VDB 型双频数控超声清洗器, 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品购于中国药品生物制品检定所, 十二烷基磺酸钠(SDS, 离子对色谱用, Sigma 公司), 水为超纯水, 乙腈(HPLC 级, Product of Tedia, USA), 甲醇(HPLC, 山东禹王试剂), 白附片药材为市售, 其它试剂为分析纯。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的配制 精密称取 1.611 mg 乌头碱、2.000 mg 新乌头碱、2.000 mg 次乌头碱, 置于 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 作为混合对照品溶液 A, 冷藏备用。

2.2 供试品溶液的配制 将白附片药材粉碎, 取药材粉末 5 g, 精密称定, 加浓氨试液 2 mL, 使其润湿, 密塞放置 1 h。加氨水饱和的乙醚 50 mL, 超声处理 8 min, 放置过夜。过滤, 并用氨水饱和的乙醚洗涤 3 次。每次 10 mL, 收集、合并所有滤液, 于水浴上挥干溶剂。精密加入甲醇 10 mL 溶解残渣, 过滤, 取滤液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm); 流动相: 乙腈-5 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄ 溶液, 磷酸调至 pH4.5(52:50), 内含 7 mmol·L⁻¹ SDS, 超声除气泡; 检测波长: 235 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。

2.4 测定方法 在选定的色谱条件下, 分别吸取混合对照品溶液 A 和供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积, 按外标法计算各组分的含量。

3 结果

3.1 线性范围 在色谱条件下, 分别取混合对照品 A 1 mL 于 25 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 作为对照品 B; 取对照品 B 1 mL 于 25 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 作为对照品 C。分别取对照品 A、B、C 各 10, 5, 2 μL 进样, 记录色谱图, 测定峰面积, 以峰面积(A)对生物碱量(X)进行线性回归, 线性方程见表 1。

表 1 3 种生物碱的回归曲线和线性范围

生物碱	线性范围 (μg·mL ⁻¹)	回归曲线	r
新乌头碱(MA)	0.392 0~ 196	A = 13 409.39X - 577.25	0.999 9
乌头碱(AC)	0.039 6~ 198	A = 10 780.53X - 3 716.51	0.999 9
次乌头碱(HA)	0.041 4~ 207	A = 12 466.68X - 3 648.23	0.999 9

3.2 检测限 按信噪比 3:1 计, 各组分的检测限按进样量计算新乌头碱、乌头碱、次乌头碱, 分别是: 2.612, 0.264, 0.276 ng。

3.3 精密度 分别取混合对照品溶液和供试品溶液 20 μL 重复进样 5 次, 记录色谱图, 测定峰面积, 求得 RSD, 结果新乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品 RSD 分别为 1.11%, 1.36%, 1.60%, 供试品 RSD 分别为 1.83%, 1.61%, 1.34% 见表 2。

表 2 3 种生物碱的精密度

生物碱	Precision(RSD/%)	
	对照品	样品
新乌头碱(MA)	1.11	1.83
乌头碱(AC)	1.36	1.61
次乌头碱(HA)	1.60	1.34

3.4 方法的专属性 在选定的色谱条件下, 混合对照品溶液、白附片的供试品溶液和空白溶剂的色谱图如图 1。

3.5 药材提取超声时间方法的考察 本实验考察了超声时间对所提取的脂溶性生物碱含量的影响, 图 2 是超声时间为 2, 4, 6, 8, 10 min 后从各样品所提取的脂溶性生物碱含量变化(浓度 μg/mL)的曲线图, 在 8 min 后, 各脂溶性生物碱含量基本不变, 因此, 选择 8 min 为提取过程药材的超声时间。

3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在 0, 2, 4, 10, 20 h 进样 20 μL 测定, 结果白附片中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.39%, 2.91%, 1.79%, 表明供试品溶液在 20 h 内测得峰面积基本不变。

3.7 重复性试验 取同一批白附片药材样品 5 份, 按供试品溶液制备方法操作, 依上述测定条件分别进样 20 μL 测定含量, 结果新乌头碱、乌头碱、次乌头碱平均含量分别为 0.895 2, 0.295 7, 1.950 8 mg; RSD 分别为 1.31%, 1.88%, 3.85%。

3.8 加样回收率试验 精密称取 5.0 g 白附片药材粉末, 加入一定浓度的对照品, 按照供试品处理方法处理, 得待测溶液, 取 20 μL 进样, 记录色谱图, 测定

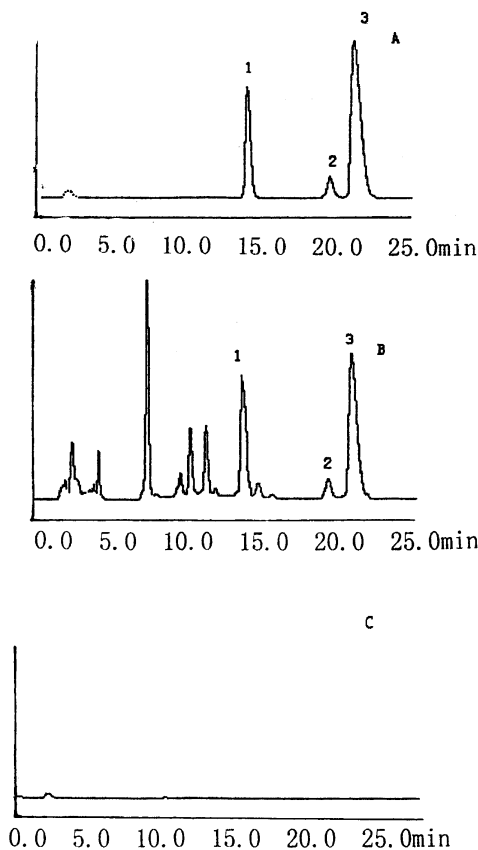


图 1 标准溶液(A), 样品溶液(B), 空白溶剂(C)白色谱图, 1: 新乌头碱(15.711 min), 2: 乌头碱(20.868 min), 3: 次乌头碱(24.751 min)

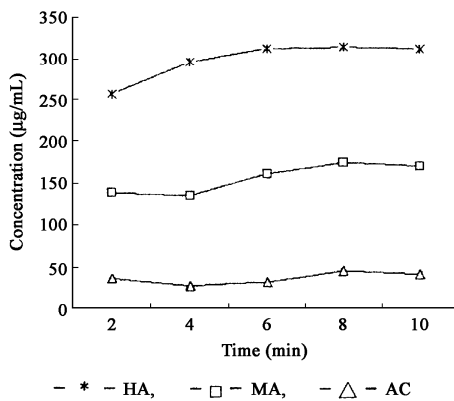


图 2 超声时间对生物碱含量的影响

峰面积, 计算回收率。结果见表 3。

表 3 3 种生物碱的回收率 (n = 3)

生物碱	含量 (mg)	加入量 (mg)	总含量 (mg)	回收量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
新乌头碱(MA)	0.895 2	0.448 7	1.323 6	0.428 4	95.47	3.65
乌头碱(AC)	0.295 7	0.218 4	0.518 6	0.222 9	102.05	2.65
次乌头碱(HA)	1.950 8	0.260 4	2.219 8	0.269 0	103.29	3.85

3.9 样品测定 用本文建立的方法测定市场上购买的五批白附片药材中脂溶性生物碱的含量, 新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的平均含量分别为 3.480%, 0.772%, 6.855%, 其中次乌头碱的含量最高。不同

批次白附片药材中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的含量如下表 4。

表 4 不同批次白附片中生物碱含量

白附片批次	含量 (%)		
	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱
1	3.455	0.764	6.784
2	3.395	0.785	6.956
3	3.515	0.770	6.864
4	3.451	0.759	6.742
5	3.584	0.782	6.929

4 讨论

由于本实验提取的是碱性成分, 药材粉末的碱化程度会影响到提取率, 因此, 本试验用氨水饱和的乙醚提取脂溶性生物碱, 白附片药材粉末碱化后加氨水饱和的乙醚, 超声使药材分散, 易于溶剂渗透, 再放置过夜, 使得提取效率提高。

超声时间影响到脂溶性生物碱的提取效率, 本实验比较了在同一频率及温度条件下的超声时间, 发现超声 8 min 后, 脂溶性生物碱的提取可以达到最高效率, 因此本实验选择 8 min 为提取超声时间。

本文建立的方法可同时测定白附片中的 3 种脂溶性生物碱成分, 其中乌头碱是白附片中的最主要的毒性成分, 因此对白附片的质量控制和成分研究有重要意义。

[参考文献]

- [1] 刘道平. 炮制对附子中化学成分的影响[J]. 山东医药工业, 2001, 20(2): 25.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2000. 29.
- [3] 陈巧玲. 川乌、草乌、附子及其复方制剂中乌头类生物碱的含量测定研究概况[J]. 华西药学杂志, 1999, 14(2): 114-116.
- [4] 赵英永, 崔秀明, 张文斌, 等. RP-HPLC 法测定草乌中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱[J]. 中草药, 2006, 37(6): 940-942.
- [5] 刘秀秀, 晁若冰. 反相离子对色谱法测定附子中生物碱成分[J]. 药学学报, 2006, 41(4): 365-369.
- [6] H. T. Feng, Sam F. Y. Li. Determination of five toxic alkaloids in two common herbal medicines with capillary electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 973: 243-247.
- [7] Z. H. Wang, J. Wen, J. B. Xing. Quantitative determination of diterpenoid alkaloids in four species of Aconitum by HPLC [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 40: 1031-1034.