

HPLC法测定雪上一枝蒿中 2种生物碱的含量

耿家玲¹, 孟芹¹, 沈勇², 付敏³

(1. 云南省食品药品检验所, 昆明 650011; 2. 昆明植物研究所, 昆明 650204; 3. 昆明市中医医院, 昆明 650011)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定雪上一枝蒿药材中雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素的含量。方法: 色谱柱为 C_{18} 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (1000 mL 水中加三乙胺 0.1 mL, 并用 25% 磷酸调节 pH 至 7.3) (30:70), 检测波长 203 nm。结果: 雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素均在 0.0816~4.0800 μ g ($r=0.99999$) 范围内线性关系良好, 平均回收率分别为 98.51%, 98.15%。结论: 为进一步研究其质量控制方法提供参考。

关键词: 雪上一枝蒿; 雪上一枝蒿甲素; 雪上一枝蒿庚素; HPLC

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0387-04

HPLC determination of two alkaloids in
Aconitum brachypodum DielsGENG Jia-ling¹, MENG Qin¹, SHEN Yong², FU Min³

(1. Yunnan Institute for Food and Drug Control Kunming 650011, China; 2. Kunming Institute for Plant Study, Kunming 650204, China;

3. Kunming hospital of Chinese medicine Kunming 650011, China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of bullatine A and bullatine G in *Aconitum brachypodum*. **Methods** Using a C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), acetonitrile-water (pH 7.3) (30:70) as the mobile phase and UV detection wavelength at 203 nm. **Results** There was a good linear relationship with a range of 0.0816–4.0800 μ g ($r=0.99999$) for two biochemistries, the average recovery for bullatine A was 98.51%, for bullatine G was 98.15%. **Conclusion** This method can be applied to the determination of bullatine A and bullatine G in *Aconitum brachypodum*.

Key words *Aconitum brachypodum*; bullatine A; bullatine G; HPLC

雪上一枝蒿系毛茛科植物雪上一枝蒿 (*Aconitum brachypodum* Diels) 的干燥块根, 具有活血、镇痛、抗炎等作用, 是云南地区民间习用的药材, 收载于 1996 年版《云南药品标准》。主要分布在云南东北部及西北部的东川、昭通、丽江等地。据文献报道^[1], 云南东川产雪上一枝蒿块根含雪上一枝蒿甲素、乙素、丙素、丁素、庚素、乌头碱及次乌头碱等多种生物碱。这些生物碱既是雪上一枝蒿的主要活性成分, 同时也是毒性成分。以雪上一枝蒿为原料开发了一系列药品 (如雪上一枝蒿总碱片、雪上一枝蒿总碱注射液、骨痛灵酊等) 已用于临床。但是, 对雪上一枝蒿药材及其制剂的质量控制研究不多, 仅限于紫外分光光度法测定总生物碱和 HPLC 法测定其中的雪上一枝蒿甲素。在提取、分离雪上一枝蒿药材的化学成分中发现, 除雪上一枝蒿甲素外, 雪上

一枝蒿庚素也是雪上一枝蒿药材中含量较高的一种化合物。为了能更准确的控制药材质量, 本文以雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素为指标成分进行了定量检测, 比较了不同产地药材的含量差异, 以便为进一步研究其质量控制方法提供参考。

1 仪器与试剂

HP-1100 型高效液相色谱仪 (HP-1100 四元泵、VWD 紫外检测器、G1313A 自动进样器、在线真空脱气机、智能柱温箱、HP 化学工作站); 雪上一枝蒿甲素对照品 (批号: 895-20001) 由中国药品生物制品检定所提供, 雪上一枝蒿庚素对照品由昆明植物研究所提供 (鉴定依据: 比旋度、紫外光谱、质谱、氢谱、碳谱; 纯度检查方法: 三维液相色谱法; 纯度大于 99%); 雪上一枝蒿药材按 1996 年版《云南药品标准》的有关规定鉴定为雪上一枝蒿 (*Aconitum*

brachypodum Diels)的干燥块根。流动相中乙腈为色谱纯,水为超纯水;其余溶剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水 (1000 mL 水中加三乙胺 0.1 mL,并用 25% 磷酸调节 pH 至 7.3) (30:70);检测波长 203 nm;柱温 30 °C;进样 10 μL。色谱图见图 1。雪上一枝蒿甲素的保留时间为 8.8 min,雪上一枝蒿庚素的保留时间为 12.9 min。

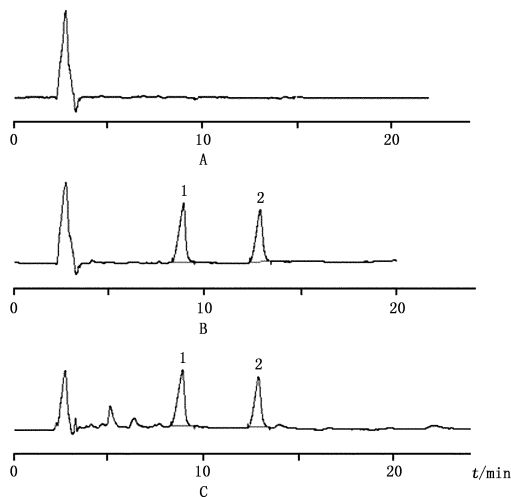


图 1 溶剂 (A)、雪上一枝蒿甲素及雪上一枝蒿庚素对照品 (B)、雪上一枝蒿药材 (C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of solvent (A), bulbine A and bulbine G chemical reference substances (B) and *Aconitum brachypodum* Diels (C)
1 雪上一枝蒿甲素 (bulbine A) 2 雪上一枝蒿庚素 (bulbine G)

3 溶液制备

3.1 对照品溶液 精密称取在 80 °C 干燥至恒重的雪上一枝蒿甲素及雪上一枝蒿庚素对照品各 16.32 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 0.1632 mg·mL⁻¹ 对照品混合液 (A)。精密量取对照品混合液 (A) 5 mL 置 10 mL 量瓶中,即得 0.0816 mg·mL⁻¹ 对照品混合液 (B)。

3.2 供试品溶液 精密称取药材细粉 (过二号筛) 1.1 g 加氨试液 1 mL 使湿润,精密加入三氯甲烷 25 mL,称定重量,加热回流 2 h 取出,放冷,再称定重量,用三氯甲烷补足减失的重量,摇匀,滤过,取滤液 5 mL 置水浴上蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,摇匀,滤过,取滤液过 0.45 μm 微孔滤

膜,既得。

4 线性关系考察

取对照品混合液 (A) 25 20 15 μL 和对照品混合液 (B) 20 10 5 1 μL 进样,记录色谱图。进样量分别为 4.0800, 3.2640, 2.4480, 1.6320, 0.8160, 0.4080, 0.0816 μg 以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素的标准曲线回归方程分别为:

$$Y = 676.10X - 11.82 \quad r = 0.99999$$

$$Y = 623.18X - 21.58 \quad r = 0.99999$$

雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素均在 0.0816 ~ 4.0800 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

5 精密度试验

取“3.1”项下的对照品混合溶液 (B) 10 μL,连续进样 6 次,测定雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素的峰面积, RSD (n = 6) 分别为 0.4%, 0.5%。

6 稳定性试验

取配好的供试品溶液,室温下放置,分别在 0, 1, 2, 3, 6, 10, 21 h 时测定峰面积,结果,雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素在 21 h 内稳定, RSD (n = 7) 分别为 0.4%, 0.4%。

7 重复性试验

取云南东川产雪上一枝蒿药材粉末 (20080701),按“3.2”项下方法制备供试品溶液,分别测定含量,结果雪上一枝蒿甲素的平均含量为 0.39%, RSD = 0.9%;雪上一枝蒿庚素的平均含量为 0.34%, RSD = 0.7% (n = 6)。

8 回收率试验

精密量取浓度为 0.2118 mg·mL⁻¹ 的雪上一枝蒿甲素和 0.1925 mg·mL⁻¹ 的雪上一枝蒿庚素对照品混合液 10 mL,6 份,分置 6 个锥形瓶中,水浴蒸干;精密称取 6 份已知含量 (药材粉末 20080701,雪上一枝蒿甲素的含量为 0.39%;雪上一枝蒿庚素的含量为 0.34%) 的药材粉末 0.55 g 依次加入上述 6 个锥形瓶中,按“3.2”项下的方法操作,按上述色谱条件测定,计算回收率。结果:雪上一枝蒿甲素的平均回收率 = 98.51%, RSD = 1.6%;雪上一枝蒿庚素的平均回收率 = 98.15%, RSD% = 1.3% (n = 6),结果见表 1。

表 1 回收率试验测定结果 (n= 6)

Tab 1 Results of accuracy

取样 (sample) /g	样品含量 (content) /mg		加入对照品量 (amount added) /mg		测得量 (found) /mg		回收率 (recovery) %	
	甲素 (bullatine A)	庚素 (bullatine G)	甲素 (bullatine A)	庚素 (bullatine G)	甲素 (bullatine A)	庚素 (bullatine G)	甲素 (bullatine A)	庚素 (bullatine G)
0.5507	2.148	1.872	2.118	1.925	4.245	3.769	99.00	98.55
0.5521	2.153	1.877	2.118	1.925	4.287	3.783	100.76	99.01
0.5512	2.150	1.874	2.118	1.925	4.189	3.763	96.27	98.13
0.5525	2.155	1.878	2.118	1.925	4.216	3.797	97.31	99.69
0.5503	2.146	1.871	2.118	1.925	4.228	3.750	98.30	97.61
0.5511	2.149	1.874	2.118	1.925	4.255	3.720	99.43	95.90

9 提取方法考察

取云南东川产雪上一枝蒿药材粉末 (20080701), 提取方法如表 2, 其余照“3. 2”项下方法操作, 结果见表 2。

表 2 不同提取方法测定结果 (% , n= 2)

Tab 2 Results of different extractions

提取方法 (different extractions)	雪上一枝蒿甲素 (bullatine A)	雪上一枝蒿庚素 (bullatine G)
超声处理 30 min (ultrasonic extraction 30 min)	0.22	0.30
超声处理 50 min (ultrasonic extraction 50 min)	0.26	0.32
加热回流 1 h (heating flux 1 h)	0.35	0.35
加热回流 2 h (heating flux 2 h)	0.39	0.35
加热回流 3 h (heating flux 3 h)	0.39	0.34
超声 5 min 冷浸过夜, 再超声 5 min (ultrasonic and cold dip)	0.28	0.33

10 样品测定

照“3. 2”项下方法操作, 测定 8 批样品中雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素的含量, 结果见表 3。

11 讨论

11.1 用紫外二极管阵列检测器在 200~ 500 nm 波长扫描可得各待测组分色谱峰的色谱图, 雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素均在 200 nm 附近有吸收, 考虑到末端吸收的影响, 选择 203 nm 为本实验的检测波长。结果, 药材中雪上一枝蒿甲素的出峰时间为 8.8 min, 雪上一枝蒿庚素的出峰时间为 12.9 min, 在三维图谱中, 该两处峰的纯度角度均小于其纯度域值, 证明没有其他杂质的干扰。

11.2 试验中以雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素为考察指标, 对供试品溶液的制备进行了方法学研究: 提取溶剂曾用乙醇和甲醇提取, 发现提取的杂质较多; 后改用乙醇提取, 蒸干乙醇液, 用 1.5% 盐酸

表 3 8 批样品的含量测定结果 (% , n= 2)

Tab 3 Results of two biochemistries in Aconitum brachypodum Diels

产地 (producing area)	批号 (Lot No.)	雪上一枝蒿甲素 (bullatine A)	雪上一枝蒿庚素 (bullatine G)
云南东川新桥 (Dongchuanxinqiao Yunnan)	20070201	0.51	0.31
云南东川法则 (Dongchuanfazze Yunnan)	20070501	0.76	0.58
云南东川法则 (Dongchuanfazze Yunnan)	20080701	0.39	0.34
云南东川 (Dongchuan Yunnan)	20081001	0.64	0.50
云南东川 (Dongchuan Yunnan)	20081002	0.65	0.38
云南昭通 (Zhaozhong Yunnan)	20081101	未检出 (not detected)	0.17
四川 (Sichuan)	20070801	未检出 (not detected)	0.40
四川 (Sichuan)	20071001	未检出 (not detected)	未检出 (not detected)

溶解残渣, 用三氯甲烷提取, 弃去三氯甲烷液, 水层用氨试液调节 pH 至 9, 三氯甲烷提取, 蒸干三氯甲烷液, 残渣加甲醇溶解。此方法杂质较少, 但提取率低。采用文献方法^[2]加入氨试液后三氯甲烷提取, 提取方法比较了超声、回流、冷浸。结果, 以加热回

流 2 h 提取率高, 且杂质较少。氨试液的加入量对提取率无明显影响, 氨试液加入量以湿润为宜, 否则, 后续处理较为麻烦。加入三氯甲烷 25 mL 已能充分提取出药材中的雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素。

11.3 流动相还考察了①磷酸盐缓冲液(取磷酸氢二钠 1.97 g 磷酸二氢钾 0.22 g 加水溶解并稀释至 1000 mL, 用 80% 的磷酸溶液调节 pH 至 7.3) - 甲醇 (28: 72)^[2]; ②乙腈 - 水 (1000 mL 水中加 0.1 mL 磷酸, 0.1 mL 三乙胺) (30: 70)。方法①在较高有机相浓度中用了缓冲盐, 会缩短色谱柱的使用寿命; 雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素属弱生物碱类, 曾考虑用离子化的方法使之从色谱柱上洗脱下来, 所以方法②流动相的 pH 偏酸, 约在 3.2 左右, 但无论如何调节流动相的比例, 均不能使雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素有效分离。最终确定本文流动相分离效果好, 且不使用缓冲盐, 既能获得良好的峰形, 又能延长色谱柱的使用寿命。

11.4 曾选用 Agilent SB C₁₈、Agilent Extend C₁₈、Phenomenex C₁₈、依利特 ODS2 C₁₈、汉邦 Kromasil C₁₈ 等, 结果, 国产依利特、汉邦柱在流动相 pH 大于 6 时分离效果不理想。

11.5 本实验对雪上一枝蒿药材中的雪上一枝蒿甲素和雪上一枝蒿庚素进行了含量测定, 8 批药材的测定结果表明其含量差别很大。说明生态环境、采收时间、采收方法和存储条件等都可能对其含量产生影响。

参考文献

- 1 HAN Dong-tie(韩东铁). Study the chemical composition and pharmacology in *Aconitum brachypodum* Diels(雪上一枝蒿的化学成分与药理作用研究概况). *Yanbian Univ Med J* (延边大学医学学报), 2007 30(3): 223
- 2 GAO Shao-yang(高邵阳), YU Ping(喻萍), CHEN Wu-yuan(陈武元), *et al* RP-HPLC determination of bulatine A in *Aconitum brachypodum* Diels (RP-HPLC法测定雪上一枝蒿中雪上一枝蒿甲素的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005 25(11): 1382

(本文于 2010 年 1 月 14 日收到)

赛默飞世尔科技对德国二恶英食品安全危机作出响应

2011 年 1 月 12 日, 赛默飞世尔科技宣布其位于德赖艾希的全球食品安全响应中心正在监测德国的二恶英危机。在此事件中, 动物饲料可能已经遭到包括有毒化学物质的工业脂肪的污染。同时, 赛默飞世尔科技还通告了生产商和食品安全实验室, 赛默飞世尔现有可以检测食品和动物饲料中二恶英的方法。在德国, 大约 3000 吨遭二恶英污染的动物饲料添加剂近期被发放销售。

二恶英是在燃烧过程(例如垃圾焚烧)中形成的一组有毒化学物质。众所周知, 这类物质的长期暴露会增加致癌的可能性。欧盟委员会设定了食品中二恶英的最高水平并于近期提出了更加严格的检测限。由于近期德国食品危机的影响, 已经关闭了 4500 多家农场, 欧盟委员会的官员也提倡更加严格的法规和更加严厉的处罚, 这些无疑为食品生产商施加了更大的压力, 使他们需要使用更加灵敏的检测仪器。

有关赛默飞世尔科技检测食品安全和动物饲料中二恶英的方法的更多信息, 请访问: www.thermo-scientific.com/fsrc