

RP-HPLC 法测定藏药细果角茴香中原阿片碱的含量^{*}

文怀秀^{1,2}, 邵赞^{1*}, 陶燕铎¹, 梅丽娟¹

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 目的: 建立一种藏药细果角茴香中原阿片碱含量的 HPLC 测定方法。方法: 采用 Thermo C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.3% 三乙胺 (64:36) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 285 nm。结果: 原阿片碱进样量在 0.24~1.20 μg 范围内呈现良好的线性关系 ($r=0.9999$), 平均加样回收率 ($n=5$) 为 99.98% (RSD=1.6%), 2 个地点的药材中原阿片碱的含量分别达到 2.37%, 0.10%。结论: 此法便捷、准确, 重复性好, 为藏药细果角茴香的研究及其质量控制提供了一定的参考。

关键词: 反相高效液相色谱; 细果角茴香; 原阿片碱; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0137-03

RP-HPLC determination of protopine in Tibet medicine *Hypocoum leptocarpum* Hook. f et Thoms^{*}

WEN Huai-xiu^{1,2}, SHAO Yun^{1*}, TAO Yan-duo¹, MEI Li-juan¹

(1 Northwest Institute of Plateau Biology Academy of Chinese Science Xining 810001, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences Beijing 100049, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method to determine the content of protopine in *Hypocoum leptocarpum* Hook. f et Thoms. **Method** The analysis was performed on a Thermo C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluting with a mixture of methanol and 0.3% triethylamine (64:36) as mobile phase with UV detection at 285 nm. **Result** The linear range of protopine was 0.24–1.20 μg ($r=0.9999$), and the average recovery ($n=5$) was 99.98% (RSD=1.6%). The contents of two samples were up to 2.37%, 0.10%, respectively. **Conclusion** This method is accurate and repeatable, and can be used for the quality control of *Hypocoum leptocarpum* Hook. f et Thoms.

Key words RP-HPLC; *Hypocoum leptocarpum* Hook. f et Thoms; protopine content determination

藏药细果角茴香为罂粟科角茴香属细果角茴香 (*Hypocoum leptocarpum* Hook. f et Thoms) 的干燥全草^[1], 生长于海拔 4.300 km 以下的草原、草甸、砂砾地上。藏药称“巴尔巴达”, 味苦性凉, 清血热、温热和毒热^[2], 《西藏常用中草药》称其有解热镇痛、消炎解毒之功效, 可治伤风感冒、头痛、四肢关节疼痛、胆囊炎, 并解食物中毒^[3]。《陕甘宁青中草药选》中称: 细果角茴香能治流感、咽喉肿痛、目赤等症^[3]。现代分析化学和天然产物化学研究发现: 细果角茴香中含多种生物碱成分, 如: 原阿片碱、隐品碱、别隐品碱、血根碱等^[3]。其中原阿片碱 (protopine, 又称延胡索丙素) 所占比重较大, 有促进胆汁分泌、扩张支气管、抗疟及终止早期妊娠等作用^[4,5]。国内

已有学者采用高效液相色谱法测定多种中药材中原阿片碱的含量^[6,7], 但对藏药细果角茴香的研究尚少见报道, 故本文采用反相高效液相色谱法建立了细果角茴香药材中原阿片碱的含量测定方法, 将为细果角茴香的进一步研究开发及其质量控制体系的建立提供一定的科学依据和数据参考。

1 仪器与试剂

Waters 2996 DAD 检测器; Waters 515 高效液相色谱输液泵; Waters Empower 色谱工作站; Waters 色谱柱恒温箱; L×J-2 型离心沉淀机 (涟水电讯电机厂); RE-52 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); DZKW-C 型电子恒温水浴锅 (北京化玻联医疗器械公司)。

* 中国科学院知识创新领域前沿项目 (编号: CXLY-2002-9)

** 通讯作者 Tel: (0971) 6117264 E-mail: ywen2486@126.com

对照品原阿片碱购自中国药品生物制品检定所(批号: 110853-200201); 试验用药材分别采自青海省海南州兴海县及海东地区平安县, 经中科院西北高原生物研究所梅丽娟副研究员鉴定为罂粟科植物细果角茴香(*Hypecoum leptocarpum* Hook f et Thoms); 无水乙醇、乙醚、无水硫酸钠、氯化钠为分析纯, 甲醇为色谱纯, 实验用水为新鲜娃哈哈纯净水。

2 色谱条件

色谱柱为 Thermo C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇 - 0.3% 三乙胺 (64: 36), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 285 nm, 灵敏度: 1.5000 AUFS。

3 线性关系考察

精密称定原阿片碱对照品适量, 加甲醇配制成浓度为 0.06 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液。分别吸取对照品溶液 4 8 12 16 20 μL 在上述色谱条件下进样, 依次测得峰面积值, 求得回归方程:

$$A = 2.026 \times 10^{10} X - 7.403 \times 10^5 \quad r = 0.9999$$

原阿片碱进样量在 0.24 ~ 1.20 μg 之间呈现良好的线性关系。

4 精密度测定

分别吸取原阿片碱对照品溶液 10 μL, 在“2”项色谱条件下重复进样 5 次, 测得峰面积, 求得原阿片碱 RSD 为 1.9%。

5 重复性试验

称取细果角茴香(采自兴海)药材样品粗粉(过 20 目筛) 5 份, 每份 1.0 g 精密称定, 分别以“8”项下方法制备供试品溶液, 分别吸取 10 μL 进样, 求得样品中原阿片碱的含量分别为 2.32%, 2.25%, 2.33%, 2.31%, 2.38%; 其 RSD 为 2.0%。

6 稳定性试验

分别于对照品溶液及供试品溶液配制后 0, 2, 6, 10, 14, 18, 24 h 进样测定原阿片碱的峰面积积分值。结果对照品和样品中原阿片碱峰面积积分值的 RSD 分别为 0.9% 和 1.7%, 表明对照品溶液和供试品溶液在 24 h 内稳定。

7 加样回收率试验

取已测知原阿片碱含量的样品(采自兴海)粗粉 5 份, 各精密称取 0.5 g 分别加入 0.06 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液 1 mL, 按“8.1”项下方法制得供试溶液, 分别进样 10 μL, 测得峰面积, 求得原阿片碱的平均加样回收率 ($n = 5$) 为 99.98%, RSD 为 1.6%。

8 样品含量测定

8.1 供试品溶液制备

全草粗粉(过 20 目筛) 1.0 g 精密称定, 各加入无水乙醇 50 mL, 水浴回流提取 2 次(每次 1 h), 过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 残渣以 30 mL 水溶解, 用乙醚提取 4 次, 每次 50 mL, 合并乙醚层, 减压浓缩至约 40 mL, 以饱和氯化钠溶液提取 4 次, 每次 30 mL, 弃去水层, 合并乙醚层, 以无水硫酸钠(约 15 g)滤过, 蒸干, 残渣以甲醇溶解, 过滤, 定容至 50 mL 待用。

8.2 含量测定 取“8.1”项下制备的供试品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 精密吸取 10 μL 以“2”项下色谱条件进样, 测定峰面积值, 计算得样品中原阿片碱的含量。结果: 采自兴海县(海拔 3.350 km)和平安县(海拔 2.510 km)的药材中原阿片碱的含量分别为 2.37% 和 0.10%; 色谱图见图 1。

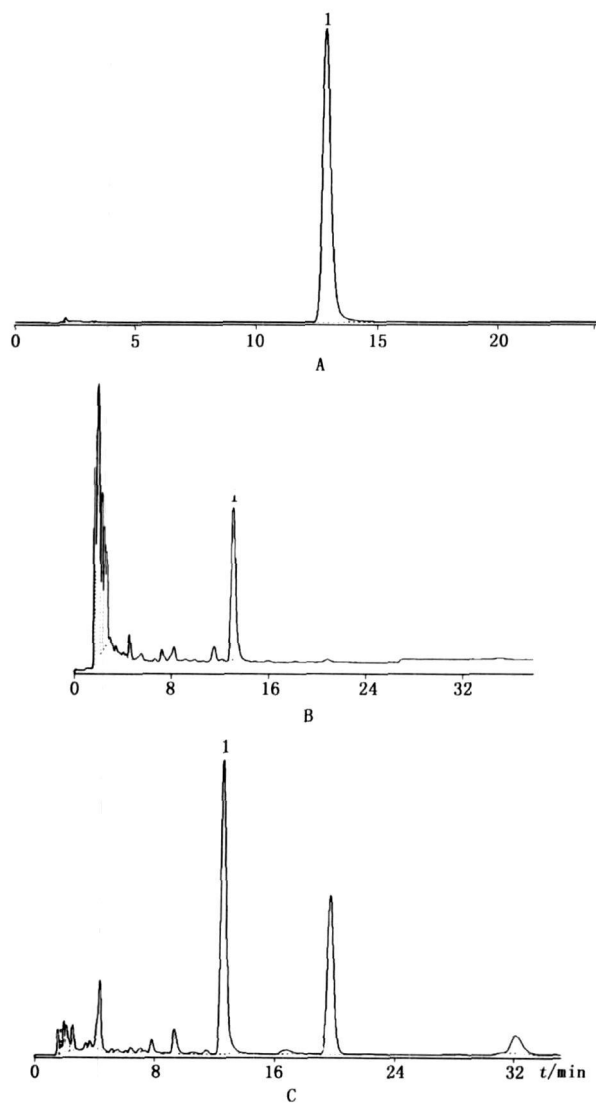


图 1 对照品(A)、平安县药材样品(B)、兴海县药材样品(C)色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance(A), Ping'an county sample(B), Xinghai county sample(C)

1. 原阿片碱 (protopine)

3 讨论

原阿片碱在罂粟科夏天无、延胡索等植物中均存在^[8,9],但对其在细果角茴香中的含量研究尚少见报道,本文采用反相高效液相色谱法建立了细果角茴香中原阿片碱的含量测定方法,此法便捷、准确、易操作,可用于细果角茴香及其制剂的质量控制。

青藏高原拥有大量的特色生物资源,其中含有丰富的药用活性成分,就本实验的结果而言,产自青海省海南州兴海县的细果角茴香药材中原阿片碱的含量高达 2.37%,若将该资源进行进一步开发利用,不但能够使大量细果角茴香野生资源免遭浪费,也可以为扩大原阿片碱等生物碱类药物的药源及创制新药提供一定的条件。

参考文献

- 1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences (中国科学院西北高原生物研究所). *Flora Qinghaiica* (青海植物志). Vol 1(第一卷). Xining(西宁): Qinghai People's Publishing House(青海人民出版社), 1997: 393
- 2 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences (中国科学院西北高原生物研究所). *Tibetan Medicine Records*(藏药志). Xining(西宁): Qinghai People's Publishing House(青海人民出版社), 1991: 177
- 3 Jiangsu New Medical College (江苏新医学院). *Traditional Chinese Medicine Dictionary*(中药大辞典). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 1986: 1483

- 4 DENG Min(邓敏), SONG Xiuyuan(宋秀媛), WANG Jiafu(王家富). Progress in studies on pharmacological effect of protopine(普洛托品的药理作用研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2001, 32(3): 275
- 5 YU Rongmin(于荣敏), WANG Chunsheng(王春盛), SONG Liyan(宋丽艳). Progress on the study of chemical constituents and pharmacological action for the plants of Papaveraceae(罂粟科植物的化学成分及药理作用研究进展). *Shanghai J Tradit Chin Med*(上海中医杂志), 2007, 38(7): 59
- 6 XIE Caijuan(谢彩娟), ZHANG Zhiqi(张志琪), ZHANG Fuqiang(张富强), *et al*. RP-HPLC simultaneous determination of tetrahydropalmatine and protopine in *Rhizoma Corydalis*(RP-HPLC法同时测定延胡索药材中延胡索乙素和原阿片碱). *Shaanxi Normal Univ(Nat Sci Ed)* (陕西师范大学学报 自然科学版), 2005, 33(1): 82
- 7 FU Yue(傅悦), LIU Yuzhao(陆羽照). HPLC determination of protopine in Zibu Weitong capsules(高效液相色谱法测定紫楼胃痛胶囊中原阿片碱含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(5): 592
- 8 LIU Hong(刘泓), YANG Yali(杨亚莉), FAN Bin(范斌). HPLC determination of protopine and tetrahydropalmatine in *Rhizoma Corydalis*(高效液相色谱法测定延胡索药材中原阿片碱及延胡索乙素的含量). *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2007, 13(7): 9
- 9 LIXiaomeng(李小蒙), LIU Ying(刘映), LIAO HuaWei(廖华卫). Determination of protopine and tetrahydropalmatine in *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers by HPLC(HPLC测定夏天无中原阿片碱和延胡索乙素含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24(3): 208

(本文于 2007年 10月 8日收到)