

RP-HPLC-ELSD 同时测定附子地上部分中 新乌头碱和次乌头碱的含量

刘少静, 杨黎彬, 赵宁, 王小库, 韩祿

(西安医学院 药学院, 陕西 西安 710021)

摘 要: 采用反相高效液相色谱-蒸发光散射监测器 (RP-HPLC-ELSD) 测定附子地上部分中新乌头碱和次乌头碱的含量。色谱柱为 Kromasil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 乙二胺水溶液 (体积比为 60:40), 柱温为室温, 流速 1 mL/min, 漂移管温度 89.0 °C, 气体流量 2.60 L/min。结果表明, 新乌头碱和次乌头碱均得到较好分离, 均在 12.5~400 μg/mL 呈现良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 100.0% (RSD = 0.3%), 99.53% (RSD = 0.5%)。RP-HPLC-ELSD 法具有准确度高, 简便快捷, 干扰少, 重现性好的优点, 可用于附子地上部分中双酯型生物碱的测定。

关键词: 附子地上部分; 新乌头碱; 次乌头碱; 反相高效液相色谱-蒸发光散射监测器

中图分类号: R 917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3206(2011)06-1109-03

Determination of mesaconitine and hypaconitine in the aerial part of radix aconiti lateralis praeparata by RP-HPLC-ELSD

LIU Shao-jing, YANG Li-bin, ZHAO Ning, WANG Xiaoku, HAN Lu

(School of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Abstract The content of mesaconitine and hypaconitine in the aerial part of radix aconiti lateralis praeparata by RP-HPLC-ELSD. Two constituents were analyzed simultaneously with a Kromasil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) by isocratic elution using acetonitrile-0.1% ethylenediamine (60:40) as the mobile phase. The column was maintained at room temperature. The flow rate was 1 mL/min. The detector drift tube was kept at 89 °C, the nebulizing gas flow rate was 2.6 L/min. Excellent chromatographic separation was achieved for mesaconitine and hypaconitine. The linear ranges of the two constituents were both 12.5~400 μg/mL. The extraction recoveries were 100.0% (RSD = 0.3%), 99.53% (RSD = 0.5%), respectively. The method has the advantages of accuracy, simplicity, and precision, it is suitable for quantitative analysis of mesaconitine and hypaconitine in radix aconiti lateralis praeparata.

Key words aerial part of radix aconiti lateralis praeparata; mesaconitine; hypaconitine; RP-HPLC-ELSD

附子为毛茛科植物乌头的子根加工品, 其性大热, 味辛、甘, 有毒, 入心、脾、肾经, 具有回阳救逆、补火助阳等功效^[1-3], 是临床常用的重要中药。药理研究表明, 附子具有显著的止痛、利尿、抗心力衰竭、抗休克等作用^[3-5]。附子的传统用药部位为根和根茎, 地上部分弃之不用, 造成严重浪费, 因此, 有必要对附子地上部分有效化学成份进行研究, 变废为宝。附子中常见的有效成分为乌头碱、新乌头碱、次乌头

碱等生物碱^[6-7]。本研究建立了灵敏准确的 RP-HPLC-ELSD 法, 对附子地上部分中的新乌头碱、次乌头碱进行定量分析, 为附子地上部分的开发利用提供科学依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

附子地上部分 (汉中洋县, 由西安医学院药学院生药教研室冯永辉副教授鉴定); 乌头碱 (纯度

收稿日期: 2011-04-06 修改稿日期: 2011-04-18

基金项目: 西安医学院 2008 年度博士科研启动基金项目 (2008DOC02)

作者简介: 刘少静 (1984-), 女, 陕西长安人, 西安医学院助教, 硕士, 主要从事天然产物研究工作, 电话: 13474503935,

E-mail: liushaojinglm@163.com

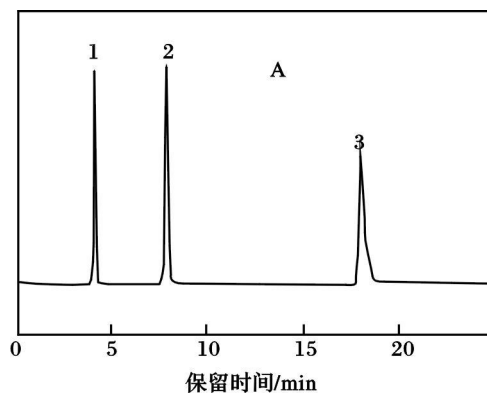
通讯联系人: 杨黎彬, E-mail: yangliyabin@sina.com

98%); 次乌头碱 (纯度 99%); 新乌头碱 (纯度 99%); 乙腈, 色谱纯; 浓氨水、甲醇、乙二胺均为分析纯; 超纯水。

Waters 1525 型高效液相色谱仪; 2000ES 蒸发光散射检测器; FA 1004B 电子天平; SB-5200DT 超声波清洗器; KLZ 艾柯超纯水机。

1.2 溶液制备

1.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取新乌头碱和次乌头碱对照品适量, 至 10 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 制得新乌头碱和次乌头碱浓度均为 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品母液。精密吸取一定量母液, 加乙腈定容配制成系列浓度的混合对照品溶液。新乌头碱和次乌头碱浓度均为 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。



1.2.2 供试品溶液的制备 取过 40 目筛的附子地上部分药材粉末约 1.0 g, 精密称定, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 加入浓氨水 2 mL, 润湿 0.5 h, 再加入甲醇 50 mL, 密塞, 静置过夜。超声 (功率 200 W, 工作频率 40 kHz) 提取 30 min, 过滤, 再以 10 mL 甲醇分次洗涤药渣, 过滤, 合并滤液和洗液, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干, 乙腈溶解残渣, 并定容至 20 mL, 摇匀。过 0.45 μm 微孔有机滤膜, 即得供试品溶液。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 乙二胺水溶液 (60:40); 柱温为室温; 流速为 1.0 mL/min; 蒸发光散射检测器漂移管温度 89 $^{\circ}\text{C}$, 气体流量 2.60 L/min。色谱图见图 1。

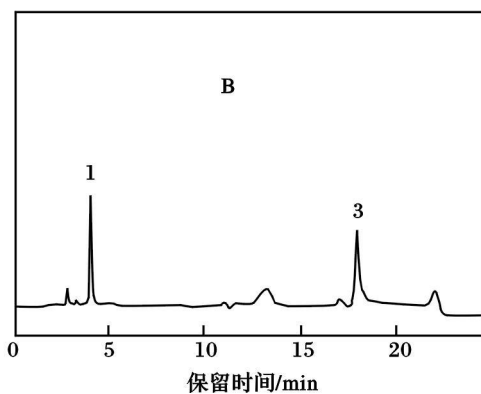


图 1 混合对照品及样品 HPLC 色谱图;

Fig 1 HPLC chromatograms of radix aconitine

A. 对照品; B. 供试品; 1. 新乌头碱; 2. 乌头碱; 3. 次乌头碱

2 结果与讨论

2.1 线性关系的考察

精密吸取系列混合对照品溶液各 10 μL , 按照色谱条件进样测定。以进样浓度 x 为横坐标, 峰面积 y 为纵坐标作图, 进行线性回归, 得回归方程, 结果见表 1。

表 1 2 种生物碱的标准曲线方程及线性范围 ($n=6$)

Table 1 The standard curves and linear ranges of the two alkaloids ($n=6$)

标准品	线性方程	线性关系	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
新乌头碱	$y = 9.699x + 403.85$	0.999 5	12.5 ~ 400
次乌头碱	$y = 7.5197x - 1.8219$	0.999 9	12.5 ~ 400

2.2 方法精密度

精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 按照色谱条件连续进样 6 次。结果表明, 新乌头碱和次乌头碱的相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.65%, 0.84%, 该方法精密度良好。

2.3 方法重复性

精密称取同一附子样品 6 份, 各 1.00 g 制备供试品溶液 6 份, 按照色谱条件分别进样 10 μL , 测得新乌头碱和次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.06%, 1.64%, 结果表明, 该方法重复性良好。

2.4 试样稳定性

精密吸取同一供试品溶液 10 μL , 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定峰面积值, 结果新乌头碱和次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.58%, 1.67%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 加样回收率

精密称取已知含量的附子地上部分药材 0.50 g 共 3 份, 分别准确加入一定量的新乌头碱和次乌头碱的标准品, 按照制备样品溶液, 分别进样 10 μL , 测得 2 个成分回收率的平均值及 RSD 值, 见表 2。

表 2 加样回收率实验结果 (n=3)

Table 2 The results of the average recovery (n=3)

成分	样品中的含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
新乌头碱	2 995	3.0	5.99	99.92		
	3 055	3.0	6.08	100.34	100.01	0.31
	2 935	3.0	5.92	99.75		
次乌头碱	1 780	1.78	3.53	99.16		
	1 816	1.78	3.60	100.11	99.53	0.51
	1 744	1.78	3.50	99.32		

由表 2 可知, 样品中的新乌头碱和次乌头碱的平均加样回收率分别为 100.01% (RSD=0.31%), 99.53% (RSD=0.51%)。

2.6 样品含量测定

制备供试品溶液 3 份, 分别进样 10 μ L, 按照色谱条件测定, 结果见表 3。

表 3 附子地上部分中 2 种生物碱含量测定结果 (n=3)

Table 3 Contents of two alkaloids in aerial part of radix aconiti lateralis praeparata (n=3)

成分	含量 / (mg \cdot g ⁻¹)		
	1	2	3
新乌头碱	5.91	5.87	6.20
次乌头碱	3.56	3.64	3.48

3 批样品测定结果表明, 附子地上部分中新乌头碱含量较高, 平均为 5.99 mg/g, 次乌头碱含量平均为 3.56 mg/g。

2.7 色谱条件的优化

2.7.1 流动相 由于乌头类生物碱的碱性较强, 为防止分离过程出现拖尾现象, 需在流动相中加入一定改性剂以达到改善色谱峰形和提高分离度的目的。经考察, 最终确定乙腈-0.1% 乙二胺水溶液作为流动相。

2.7.2 漂移管温度和气体流量 这是 ELSD 检测器的 2 个重要参数, 温度过低, 溶剂挥发不完全; 温度过高, 导致分析样品部分挥发而使检测器响应下降。雾化气流速过低, 会形成大量微滴, 导致尖峰信号或噪音信号; 雾化气流速过高, 引起微滴大量下降, 导致信号响应降低。经考察, 最终确定漂移管温度为 89.0 $^{\circ}$ C, 雾化气流量为 2.60 L/min。

2.8 提取工艺

附子地上部分中乌头碱含量极低, 未检出。新乌头碱、次乌头碱含量均较高, 分别为 5.99、3.56 mg/g, 表明附子地上部分可作为这 2 种生物碱的一个很好的提取来源。

以新乌头碱和次乌头碱的提取率为指标, 本实验考察了提取溶剂及其用量、冷浸时间、超声时间等因素对实验结果的影响, 优选出的最佳提取方法为:

1.00 g 药材以 2 mL 浓氨水润湿 0.5 h, 再加 50 mL 甲醇浸泡过夜, 超声提取 30 min。

3 结论

采用反相高效液相色谱-蒸发光散射监测器 (RP-HPLC-ELSD) 测定附子地上部分中新乌头碱和次乌头碱的含量。色谱柱为 Kromasil C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.1% 乙二胺水溶液 (体积比为 60:40), 柱温为室温, 流速 1 mL/min, 漂移管温度 89.0 $^{\circ}$ C, 气体流量 2.60 L/min。结果表明, 新乌头碱和次乌头碱均得到较好分离, 均在 12.5~400 μ g/mL 呈良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 100.01% (RSD=0.31%), 99.53% (RSD=0.51%)。RP-HPLC-ELSD 法具有准确度高, 简便快捷, 干扰少, 重现性好的优点, 可用于附子地上部分中双酯型生物碱的测定。

参考文献:

- [1] 简晖, 董宁霞, 郑晗, 等. 附子中 3 种双酯型生物碱的定量分析 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1413-1414.
- [2] 苏建树, 刘白宁, 田平芳, 等. 微生物发酵对川乌、附子中生物碱含量的影响 [J]. 北京化工大学学报, 2010, 37(3): 97-101.
- [3] 赵镭, 唐星. 附子总生物碱的提取纯化工艺 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(7): 433-437.
- [4] 项杰, 王阳雪, 侯大兵, 等. 反相高效液相色谱法测定附子有效成分含量的方法研究 [J]. 四川大学学报, 2006, 43(1): 165-169.
- [5] 刘岚, 范智超, 张志琪. HPLC 同时测定成药中 4 种乌头类生物碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2): 236-239.
- [6] 王瑞, 刘芳, 孙毅坤, 等. 不同附子炮制品中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量的 HPLC 测定 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(10): 1361-1363.
- [7] 邓雅琼, 刘荣华, 邵峰, 等. 反相高效液相色谱法测定附子中乌头碱等 3 种成分的含量 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1038-1039.