

# RP-HPLC 法测定附子中酯型生物碱含量

冯自立<sup>1,2</sup>, 马锋旺, 李新生<sup>2</sup>

(1. 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; 2. 陕西理工学院生物系陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723001)

**摘要** 建立反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定陕西汉中产附子中酯型生物碱含量的方法。使用Hypersil ODS C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇0.05%三乙胺(体积比65:35), 流速1.0 ml/min, 检测波长240 nm, 结果乌头碱、新乌头碱、次乌头碱可以完全分离, 准确测定。该方法准确度高, 可应用于附子中生物碱的含量测定, 对附子质量评价及建立指纹图谱具有参考价值。

**关键词** 附子; 酯型生物碱; RP-HPLC

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-00629-01

附子为毛茛科植物乌头(*Aconitum Carmichaeli* Debx.)的子根, 其主要功效为强心、降压、消炎及抗癌<sup>[1]</sup>等, 是传统医学临床治病“回阳救逆”要药。附子主产于四川、陕西、云南<sup>[2]</sup>等地, 陕西汉中是全国第二大产区。酯型生物碱是附子的主要药用成分, 主要包括乌头碱、新乌头碱、次乌头碱。笔者研究利用RP-HPLC方法对附子鲜样中3种酯型生物碱进行了测定, 该方法简便准确, 重现性好, 可为附子GAP生产及药材的质量控制提供合理依据。

## 1 材料与方

**1.1 药品与试剂** 附子(采于陕西南郑附子规范化栽培基地, 经陕西理工学院李新生教授鉴定为毛茛科植物乌头的子根, 鲜品切片经60℃直接干燥)。甲醇、二氯甲烷、三乙胺(色谱纯, 天津市登封化学试剂厂), 乙醚(分析纯, 市售), 乌头碱(acorinine)、新乌头碱(mesacorinine)和次乌头碱(hypacorinine)对照品(中国药品生物制品检定所, 纯度99.5%)。

**1.2 仪器** 美国Agilent<sub>1100</sub>高效液相色谱仪, Agilent<sub>1100</sub>紫外可见光检测器, Agilent<sub>1100</sub>色谱工作站。KS120D超声波清洗器(宁波金达超声波仪器厂), FA2004N电子天平(上海精密科学仪器有限公司), HHS6恒温水浴箱(上海科伟仪器有限公司), 中药小型粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司), TTL10A超纯水器(北京同泰联科技有限公司), 德国SIGMA3k30高速离心机。

## 2 结果与分析

**2.1 色谱条件选择** 色谱柱为美国Agilent ODS C<sub>18</sub>色谱柱

(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇0.05%三乙胺(体积比65:35), 流速1.0 ml/min, 紫外检测波长240 nm, 柱温30℃。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取乌头碱3.0 ng、新乌头碱3.10 ng、次乌头碱3.20 ng标准品于10 ml量瓶中, 加二氯甲烷溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用, 即得对照品溶液。

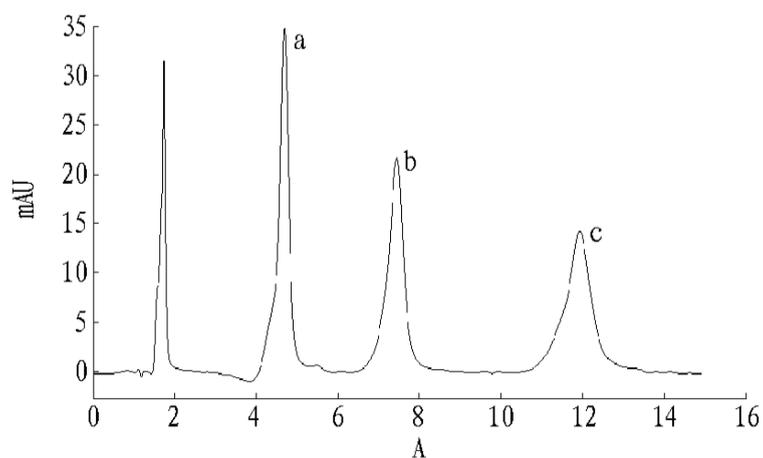
**2.3 供试品溶液的制备** 取干燥后的附子切片, 粉碎, 精密称定4 g, 置具塞锥形瓶中, 用10%氨水润湿后, 加乙醚40 ml, 超声提取30 min, 静置过夜, 以6000 r/min离心, 取上清液, 在45℃恒温水浴中挥干, 残留物用二氯甲烷定量转溶于10 ml量瓶中并稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm微孔滤膜过滤得供试品溶液备用。

**2.4 标准曲线的制作** 分别精密吸取乌头碱、新乌头碱和次乌头碱对照品混合溶液2.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 μl, 在上述色谱条件下重复进样3次, 测定峰面积。以峰面积(y)对进样量(x)进行线性回归, 得到3种生物碱线性回归方程(表1), 对照品及样品色谱图见图1。

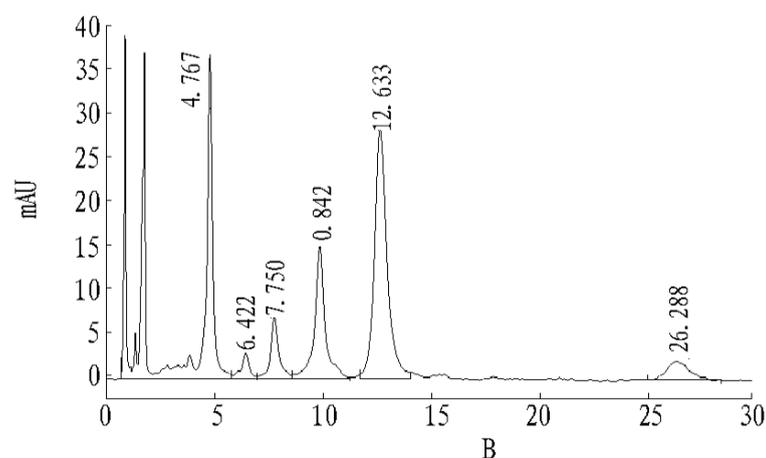
表1 3种生物碱线性回归结果

生物碱种类	范围 μg	回归方程	r
乌头碱	0.03 ~ 3.00	$y = 139.857x - 56.872$	0.9980
新乌头碱	0.02 ~ 3.10	$y = 133.673x - 42.041$	0.9995
次乌头碱	0.28 ~ 3.20	$y = 135.082x - 27.510$	0.9992

**2.5 方法的专属性** 在选定的色谱条件下, 混合对照品溶液、附子供试品溶液的色谱图如图1。



a. 新乌头碱



b. 乌头碱

c. 次乌头碱

图1 对照品(A)与样品溶液(B)的RP-HPLC色谱图

**2.6 精密度试验** 取对照品和样品溶液10 μl, 在以上色谱

条件下, 重复进样6次, 测定峰面积, 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的RSD分别为0.51%、0.53%、0.55%。

**2.7 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液10 μl, 分别在

基金项目 陕西省教育厅重点资助项目(2002AA2Z3217)。

作者简介 冯自立(1979-), 男, 陕西汉中, 在读硕士, 讲师, 从事药用植物质量评价与分析研究。

收稿日期 2006-11-01

(下转第631页)

(上接第629页)

1、3、6、9、12、24 h 测定峰面积,乌头碱峰面积值的RSD为0.91%,新乌头碱峰面积值的RSD为0.78%,次乌头碱峰面积值的RSD为1.05%,表明样品溶液在24 h内稳定性良好。

**2.8 重现性试验** 取同一批药材5份,分别按样品测定方法操作,测定峰面积,计算含量,乌头碱的RSD为1.42%,新乌头碱的RSD为1.39%,次乌头碱的RSD为1.55%。

**2.9 加样回收率试验** 精密称取已知含量的样品1 g,精密加入高、中、低3种浓度的对照品,测定样品含量,计算回收率。乌头碱、新乌头碱、次乌头碱平均回收率分别为102.0%、100.1%、99.1%,RSD分别为1.55%、1.03%、0.96%。

表2 附子样品中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的含量 %

批次	乌头碱含量	新乌头碱含量	次乌头碱含量
060728	0.547	0.633	0.723
060729	0.498	0.647	0.766
060730	0.551	0.632	0.754
060801	0.532	0.609	0.729
060802	0.544	0.628	0.745
060810	0.516	0.639	0.734

**2.10 样品含量测定** 精密吸取供试品溶液10  $\mu$ l进样以外

标法计算6批附子样品中3种酯型生物碱的含量(表2)。

### 3 讨论

(1) 附子的主要药用化学成分是酯型生物碱,其中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱含量较高,且性质稳定,所以选择测定这3个成分的含量做为质量控制的指标。

(2) 取标准品溶液,在TU1221-紫外-可见分光光度计上在170~380 nm区间进行光谱扫描,结果乌头碱标准品在240 nm处有最大吸收峰,故选用240 nm为检测波长。

(3) 分别对样品超声10、20、30、40、50、60 min,发现30 min即可提取完全,所以提取时间选择30 min。

(4) 该试验的流动相系统为甲醇0.05%三乙胺(体积比65:35),在此条件下,分离效果良好, $t_R$ 值适宜,所用试剂毒性小、价格便宜,该方法适合企业生产中的质量控制。

### 参考文献

- [1] 王慕,李百龙,高凤英.乌头中主要生物碱的高效液相色谱测定[J].药学学报,1983,18(9):689-694.
- [2] 童玉懿.乌头类生药生物碱的高效液相色谱法测定[J].中国中药杂志,1990,15(2):42.
- [3] 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.