

3 讨论

3.1 提取条件的优化:通过正交设计实验考察了乙醇浓度、温度、时间和料液比4个因素对有效成分转移率的影响,结果发现当乙醇为90%,提取温度为90℃,料液比为1:10时,提取3h为最优。在此条件下提取3次后4种三萜酸有效成分转移率均在96.2%以上,能够满足测定要求。

3.2 水洗涤对测定效果的影响:在供试液制备中曾将提取液直接进行HPLC分析测定,结果发现,由于大量水溶性杂质的存在严重干扰了2 α -羟基齐墩果酸和2 α -羟基熊果酸色谱峰的分离,增加测定结果不确定性。通过洗涤可以去除水溶性杂质的干扰,使得基线飘逸得到改善,测定效果准确性增强。对洗涤前后样品中4种三萜酸定量测定结果表明,洗涤过程不会造成成分损失。

3.3 本实验建立的枇杷叶中4种三萜酸RP-HPLC

测定方法,具有操作简单、快速、准确的优点,为枇杷叶质量控制提供了一个可靠的测定方法,同时也为枇杷叶在治疗糖尿病和抗癌方面的研究提供了一个定量分析方法。

参考文献:

- [1] Judy W V, Siva P. Antidiabetic activity of a standardized extract (Glucosol TM) from *Lagerstroemia speciosa* leaves in type I diabetics a dose-dependence study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 87(4): 115.
- [2] Taniguchia S, Imayoshi Y, Kobayashi E. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(3): 315.
- [3] 胡长平,陈龙胜,忻 畅. 反相高效液相色谱法测定枇杷叶中的科罗素酸 [J]. 色谱, 2006, 24(5): 492.
- [4] 罗晓清,郭小仪,俞学炜. RP-HPLC法测定枇杷叶中熊果酸和齐墩果酸的含量 [J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(5): 50.
- [5] 任秀莲,魏琦峰,周春山. 沉淀吸附法提取苦丁茶中的熊果酸 [J]. 中南大学学报, 2004, 35(4): 599.

附子中3种双酯型生物碱的定量分析

简 晖^{1,2},董宁霞¹,郑 晗¹,冯育林^{1,2},龚千锋^{1,2*},杨世林^{1,2}

(1. 江西中医学院,江西 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,江西 南昌 330004)

摘 要:目的 建立附子中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的定量测定方法。方法 采用反相高效液相色谱法,选择Hypersil ODS2色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),以40 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈为流动相梯度洗脱,检测波长235 nm。结果 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱均得到较好分离,分别在0.170~85.0、0.319~159.5、0.218~109 μ g呈良好的线性关系,平均回收率为102.1%(RSD=1.84%)、97.7%(RSD=1.92%)、96.4%(RSD=2.51%)。结论 该方法简便、灵敏、准确,可用于附子的质量控制。

关键词:附子;乌头碱;次乌头碱;新乌头碱;高效液相色谱

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)09-1413-02

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 根的加工品,具有回阳救逆、补火助阳等功效^[1],是临床常用的重要中药。附子生品有大毒,其中所含的二萜双酯型生物碱既是有效成分,又是毒性成分^[2],为保证临床用药的安全有效,须严格控制附子中此类生物碱的量。附子所含的二萜双酯型生物碱中,较重要和量较高的有乌头碱、次乌头碱、新乌头碱^[3],本实验采用高效液相色谱法同时测定这3种双酯型生物碱的量,操作简便,准确度高,对附子的质量控制和药效评价具有重要意义。

1 仪器与材料

Dionex U3000(T-3X00 柱温箱,PDA-3000

检测器,P-3400A 分析泵,WPS 自动进样器),KQ-100 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈、甲醇为色谱纯,乙酸铵、乙醚、氯仿等试剂均为分析纯。盐附子购于四川江油恒源药业集团有限公司,经本院生药教研室赖学文教授鉴定为正品附子。乌头碱对照品(批号110720-200410)、新乌头碱对照品(批号110799-200404)、次乌头碱对照品(批号110798-200404)购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Hypersil ODS2 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:40 mmol/L 乙酸铵溶液-

乙腈(B),梯度洗脱:0~16 min 63%A,15~45 min 63%~57%A;体积流量1.0 mL/min;检测波长235 nm;柱温25℃。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取乌头碱1.70 mg、次乌头碱3.19 mg和新乌头碱2.18 mg,置于同一10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备:取盐附子细粉约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加乙醚20 mL与氨试液2 mL,密塞,摇匀,放置过夜,超声提取10 min,滤过,药渣再用乙醚洗涤3次,每次10 mL,滤过,洗液与滤液合并,低温蒸干。残渣用甲醇溶解,并定容至2 mL,摇匀。临用前用0.45 μm微孔滤膜滤过。

2.4 线性关系考察:精密量取对照品溶液1、10、50、100、200、500 μL分别置于6个1 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,分别进样20 μL,按上述色谱条件进行测定。以峰面积(Y)对进样浓度(X)进行回归处理,得到乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的回归方程分别为: $Y=0.3439X+4.571\times10^3$ ($r=0.9994$), $Y=0.4873X-2.025\times10^{-3}$ ($r=0.9998$), $Y=0.3941X+5.862\times10^{-3}$ ($r=0.9995$);3者的线性范围分别为:0.170~85、0.319~159.5、0.218~109 μg/mL。

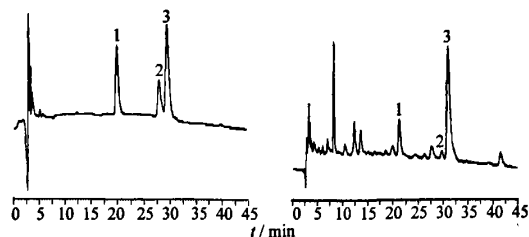
2.5 精密度试验:精密吸取对照品溶液,连续进样6次,每次进样20 μL。乌头碱、新乌头碱、次乌头碱峰面积的RSD分别为0.73%、0.68%、0.81%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0、4、8、16、24 h进样测定。结果乌头碱、新乌头碱、次乌头碱质量分数的RSD分别为1.27%、1.24%、1.19%,表明溶液在24 h内基本稳定。

2.7 重现性试验:取同一批附子药材6份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果样品中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱质量分数的RSD分别为1.85%、1.90%、1.79%。

2.8 加样回收试验:精密称取已知乌头碱、新乌头碱、次乌头碱质量分数的盐附子细粉6份,每份约0.5 g,精密称定。分别精密加入“2.2”项下对照品溶液0.5 mL,按“2.3”项下方法进行制备,测定回收率。结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的平均回收率分别为102.1%(RSD=1.84%)、97.7%(RSD=1.92%)、96.4%(RSD=2.51%)。

2.9 样品测定:将“2.3”项下供试品溶液及稀释10倍的对照品溶液分别进样20 μL测定,记录色谱图(图1),计算供试品溶液中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的量,结果见表1。



1-新乌头碱 2-乌头碱 3-次乌头碱
1-mesaconitine 2-aconitine 3-hypoaconitine

图1 对照品(A)及样品(B)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and samples (B)

表1 样品中3种双酯型生物碱的测定结果(n=4)

Table 1 Determination of three diester diterpenoid alkaloids in samples (n=4)

批号	质量分数/(μg·g ⁻¹)		
	乌头碱	次乌头碱	新乌头碱
20070919	4.032 6	47.435 8	13.677 9
20071213	3.981 5	46.655 4	14.869 1
20080308	4.240 5	49.167 0	14.440 3

3 讨论

3.1 提取条件的考察:以乌头碱、次乌头碱、新乌头碱3种双酯型生物碱的总量为指标,采用正交试验考察了药材粒度、提取溶剂、溶剂用量、超声时间等因素对试验结果的影响,结果表明提取溶剂、冷浸时间对结果有显著影响,其余因素影响甚微。优选出的最佳提取条件为药材粉碎成细粉,加10倍量乙醚和1倍量氨试液,放置过夜后,超声提取10 min。

3.2 检测波长的选择:将混合对照品溶液进样分离后,利用PDA检测器扫描其全波长吸收光谱,发现乌头碱、次乌头碱、新乌头碱最大吸收波长均在230~240 nm。对此波长范围进行重点考察,选择230、232、235、238、240 nm 5个检测波长,比较其光谱图。结果表明,235 nm波长下的峰高最高,且噪声小,具有较高的灵敏度,故选择235 nm作为检测波长。

3.3 流动相的选择:目前附子中双酯型生物碱的测定多采用反相离子对色谱法,以表面活性剂SDS作为离子对试剂,但SDS的价格较贵,且会吸附在硅胶键合相上较难除去,严重污染色谱柱。本实验以乙酸铵溶液-乙腈作为流动相系统,梯度洗脱,乌头碱、次乌头碱、新乌头碱均能得到较好分离,并且减轻了其对色谱柱的损害。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 刘芳,于向红,李飞,等. HPLC测定附子及其炮制品中3种双酯型生物碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14), 1160-1162.
- [3] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003.

附子中3种双酯型生物碱的定量分析

作者：[简晖](#)，[董宁霞](#)，[郑晗](#)，[冯育林](#)，[龚千锋](#)，[杨世林](#)
作者单位：[简晖, 冯育林, 龚千锋, 杨世林\(江西中医学院, 江西, 南昌, 330006; 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西, 南昌, 330004\)](#)，[董宁霞, 郑晗\(江西中医学院, 江西, 南昌, 330006\)](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(9)
被引用次数：7次

参考文献(3条)

1. [中华人民共和国药典\(一部\)](#) 2005
2. [刘芳; 于向红; 李飞](#) [HPLC测定附子及其炮制品中3种双酯型生物碱的含量](#) [期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2006(14)
3. [匡海学](#) [中药化学](#) 2003

本文读者也读过(10条)

1. [董宁霞](#), [郑晗](#), [龚千锋](#) [附子中三种双酯型生物碱的定量分析](#) [会议论文]-2008
2. [侯大斌](#), [赵祥升](#), [王惠](#), [许源](#), [HOU Da-bin](#), [ZHAO Xiang-sheng](#), [WANG Hui](#), [XU Yuan](#) [附子不同组织中生物碱含量的测定](#) [期刊论文]-[西南科技大学学报](#) 2009, 24(1)
3. [张丽](#), [李锦](#), [王玉明](#), [刘昆](#) [HPLC法测定附子配伍前后乌头类生物碱含量](#) [期刊论文]-[天津中医药大学学报](#) 2010, 29(4)
4. [贾金艳](#), [彭小冰](#), [沈洲卿](#), [杨卫平](#) [附子中新乌头碱的含量测定](#) [期刊论文]-[时珍国医国药](#) 2010, 21(5)
5. [冯自立](#), [马锋旺](#), [李新生](#) [RP-HPLC法测定附子中酯型生物碱含量](#) [期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2007, 35(3)
6. [邓雅琼](#), [刘荣华](#), [邵峰](#), [卢锋](#), [DENG Ya-qiong](#), [LIU Rong-Hua](#), [SHAO Feng](#), [LU Feng](#) [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](#) [期刊论文]-[时珍国医国药](#) 2009, 20(5)
7. [曾亦斌](#), [张宇燕](#), [杨洁红](#), [万海同](#), [李金辉](#) [优化附子生物碱提取工艺的实验研究](#) [期刊论文]-[中国中医急症](#) 2011, 20(3)
8. [岳玲](#) [附子中乌头碱限量检查方法改进](#) [期刊论文]-[中成药](#) 2002, 24(10)
9. [余葱葱](#), [郭力](#), [彭成](#) [不同煎煮时间的附子毒效组分与毒性成分质量控制研究](#) [会议论文]-2008
10. [王瑞](#), [孙毅坤](#), [王耘](#), [乔延江](#), [WANG Rui](#), [SUN Yi-kun](#), [WANG Yun](#), [QIAO Yan-jiang](#) [高效液相色谱法测定附子及其炮制品中三种双酯型生物碱](#) [期刊论文]-[现代生物医学进展](#) 2007, 7(7)

引证文献(7条)

1. [刘少静](#), [杨黎彬](#), [赵宁](#), [王小库](#), [韩禄](#) [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](#) [期刊论文]-[应用化工](#) 2011(6)
2. [刘少静](#), [王小库](#), [朱改改](#), [杨黎彬](#) [RP-HPLC同时测定附子地上部分中新乌头碱和次乌头碱的含量](#) [期刊论文]-[安徽医药](#) 2011(9)
3. [黄志芳](#), [唐小龙](#), [刘云华](#), [陈燕](#), [刘玉红](#), [易进海](#) [附子提取液的稳定性研究](#) [期刊论文]-[华西药学杂志](#) 2012(2)
4. [黄志芳](#), [易进海](#), [陈燕](#), [刘云华](#), [刘玉红](#) [附子配伍和汤剂pH对6种酯型生物碱含量的影响](#) [期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2012(8)
5. [唐忠](#) [附子化学成分分析及药理作用探讨](#) [期刊论文]-[中国中医药咨讯](#) 2011(16)
6. [王晓芬](#), [朱英](#) [附子化学成分分析及药理作用的研究进展](#) [期刊论文]-[海峡药学](#) 2010(11)
7. [赵翡翠](#), [李杰](#) [我国乌头属药用植物中生物碱分析方法的研究进展](#) [期刊论文]-[中药材](#) 2010(8)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200809044.aspx