

HPLC 法测定藏药材铁棒锤、榜嘎中双酯型生物碱的含量*

□陈 燕 易进海** 刘云华 (四川省中医药科学院 成都 610041)
德 吉 扎 西 (西藏自治区藏医院研究所 拉萨 850000)

摘 要:目的:建立 HPLC 法测定西藏不同产地的铁棒锤、榜嘎中双酯型生物碱的含量方法。方法:色谱柱:Aichrom™ C₁₈(4.6mm×150mm, 5μm);柱温:35℃;流动相:甲醇-0.05mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾-醋酸-异丙醇(67:173:4:4);检测波长:230nm;流速:1.0mL·min⁻¹。结果:乌头碱在 0.09632~0.4816μg(r=0.9998)范围内呈线性。乌头碱加样回收率为 96.3%,RSD 为 1.87%(n=6)。结论:方法可控,结果稳定,为乌头类药材含量测定提供一个参考方法。

关键词:榜嘎 铁棒锤 乌头碱 苯甲酸 双酯型生物碱 HPLC

藏药材铁棒锤、榜嘎分别为毛茛科乌头属铁棒锤(*Aconitum szechenyianum* Gay.)的干燥根和船形乌头(*Aconitum naviculare* Stapf)或甘青乌头[*Aconitum tanguticum* (Maxim.) Stapf]干燥全草,主产于西藏、甘肃南部、青海、四川西部等地,为藏族习用药材,具有活血祛瘀,祛风除湿,止痛消肿的功效。用于腰肌劳损,风湿关节痛等疾病的治疗^[1]。收载于 2005 版药典附录 III 中,其同属植物有川乌和附子等,该属植物的主要毒性成分为二萜双酯型生物碱^[2~3],为了有效控制原药材质量,保证临床用药安全有效,应对其进行限量测定,项目组曾采用现行版药典中制川乌项下的酯型生物碱限量检查方法(比色法)进行测定,操作过程中发现干扰因素多,样品的重复性、稳定性不够理想,对药材限量标准的制定有一定局限性。本文根据酯型生物碱的主要毒性成分为乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)和

新乌头碱(mesaconitine)等双酯型生物碱^[4],其化学结构的共同特征是含有苯甲酰酯基(见图 1),可定量地水解生成苯甲酸^[5],以苯甲酸为标识成分,按乌头碱计作为本品酯型生物碱的含量,制定含量限度,控制本品的质量。

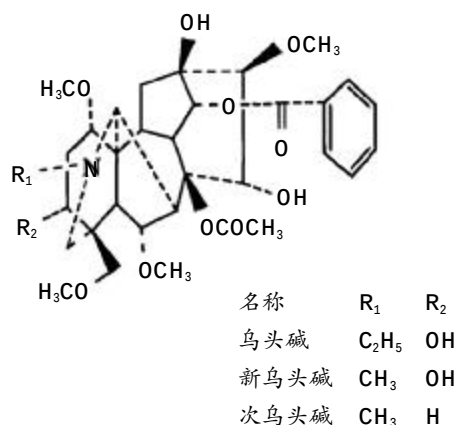


图 1 三种二萜生物碱的结构式

收稿日期:2009-03-12

修回日期:2009-06-18

* 西藏自治区科技厅支持项目:15 种藏药材质量标准研究,负责人:易进海。

** 联系人:易进海,研究员,博士,主要研究方向:中药新药研发, Tel:028-85210843, E-mail:yicy64@163.com。

一、仪器与试药

高效液相色谱仪: Waters1525 泵, 2487 双通道紫外检测器, Waters 柱温箱, Breeze 液相色谱工作站; Branson 超声清洗仪; 塞多利斯十万分之一电子天平。

铁棒锤和榜嘎药材由西藏自治区藏医院提供, 经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为毛茛科乌头属铁棒锤 (*Aconitum zechenyianum* Gay.) 的干燥根和船形乌头 (*Aconitum naviculare* Stapf) 或甘青乌头 [*Aconitum tanguticum* (Maxim.) Stapf] 干燥全草, 乌头碱 (批号 110720-200409) 由中国药品生物制品检定所提供。苯甲酸, 分析纯, 纯度大于 98%。甲醇为美国 Tedia 色谱纯, 水为超纯水, 其它试剂均为分析纯。

二、方法与结果

1. 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为 Aichrom™C₁₈ 分析柱 (4.6mm×150mm, 5μm); 柱温: 35℃; 流动相: 甲醇-0.05mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾-醋酸-异丙醇 (67:173:4:4); 检测波长: 230nm; 流速: 1.0mL·min⁻¹。进样量 10μL。理论板数按苯甲酸峰计算应不低于 2000。在此色谱条件下, 乌头碱对照品、苯甲酸对照品, 铁棒锤、榜嘎药材的 HPLC 图谱见图 2~图 5。

2. 对照品溶液的制备

精密称取乌头碱对照品 6.02mg, 加 5% 氢氧化钾甲醇溶液 10mL, 加热回流 1h, 回收甲醇, 冷却, 加 0.5mol·L⁻¹ 硫酸溶液约 9mL 调 pH 值至 3~4, 转入分液漏斗中, 用乙醚 10mL 分次洗涤容器, 并入分液漏斗中, 振摇, 分取乙醚层, 再用乙醚提取 2 次, 每次 10mL 合并乙醚液, 低温 (35℃) 减压回收乙醚, 残渣加甲醇使溶解, 转入 25mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2mL 置 10mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

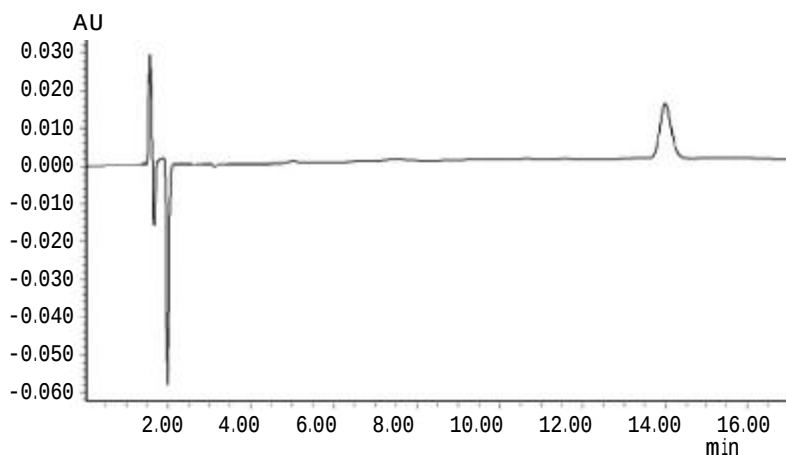


图 2 苯甲酸对照品

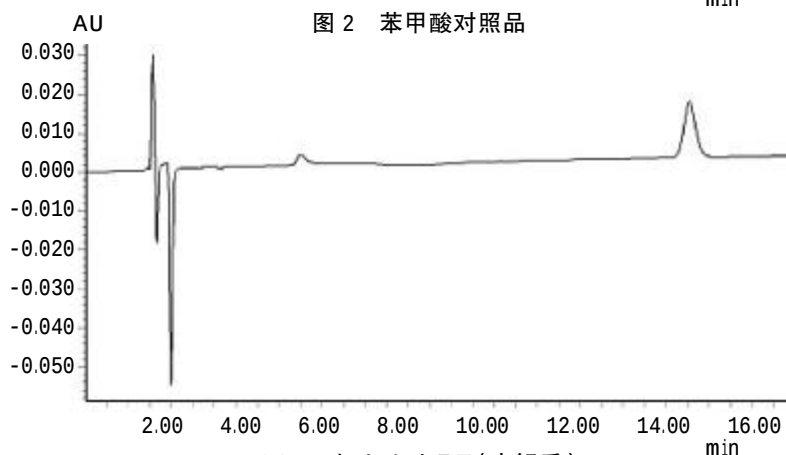


图 3 乌头碱对照品(水解后)

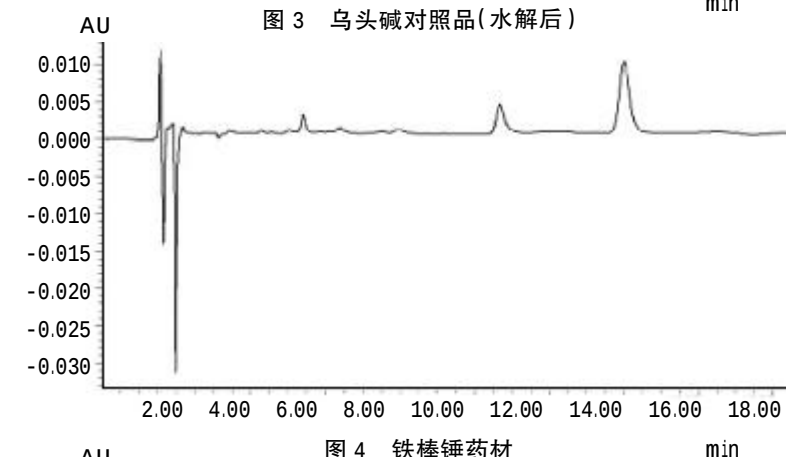


图 4 铁棒锤药材

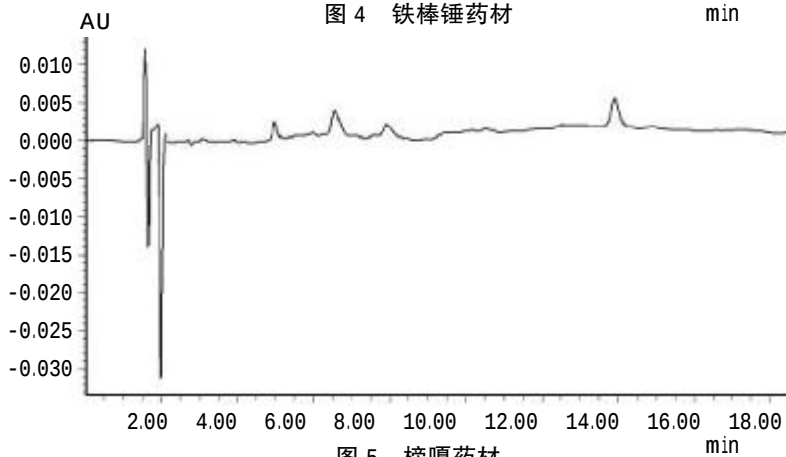


图 5 榜嘎药材

3. 供试品溶液的制备

取药材铁棒锤粗粉约 1g, 船形乌头约 5g, 分别精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加乙醚 50mL 与氨试液 4mL, 密塞, 摇匀, 放置过夜, 滤过, 药渣加乙醚 50mL, 连续振摇 1h, 滤过, 药渣再用乙醚洗涤 3~4 次, 每次 15mL, 滤过, 洗液与滤液合并, 低温蒸干。残渣加 5% 氢氧化钾甲醇溶液 10mL, 加热回流 1h, 回收甲醇, 冷却, 加 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸溶液约 9mL 调 pH 至 3~4, 转入分液漏斗中, 用乙醚 10mL 分次洗涤容器, 并入分液漏斗中, 振摇, 分取乙醚层, 再用乙醚提取 2 次, 每次约 10mL 合并乙醚液, 低温 (35℃) 减压回收乙醚, 残渣加甲醇超声溶解, 分次转至 10mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

4. 标准曲线的绘制

分别精密吸取乌头碱对照品溶液 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μL 进样测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=6.974\times 10^5 X-28.1$, $r=0.9998$; 表明乌头碱在 0.09632~0.4816 μg 范围内进样量与峰面积呈良好线性关系。

5. 精密度试验

精密吸取同一对照品溶液重复进样 5 次, 测其峰面积, 计算 RSD 为 1.04%, 表明仪器精密度良好。

6. 重复性试验

取同一铁棒锤药材粉末 (批号: 01) 5 份, 分别照“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 进样测定乌头碱的峰面积, 计算样品中酯型生物碱 (以乌头碱计) 平均分量为 $0.72\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 1.83%。表明含量测定方法的精密度良好。

7. 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 (批号: 01) 10 μL , 于室温 0、2、4、6、8、24h 进样测定乌头碱峰面积, 计算其 RSD 为 1.26%, 表明供试品溶液在 24h 内稳定。

8. 加样回收率试验

精密称取 6 份已知酯型生物碱含量的铁棒锤药材粉末 (批号: 01, 含量 $0.72\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) 各 0.5g, 分别精密加入乌头碱对照品溶液 ($0.2408\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1.5mL, 照 2.3 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算平均回收率为 96.3%, RSD 为 1.87%。

9. 水解条件的选择

以 5% 氢氧化钠甲醇溶液为水解介质, 考察水解时间对测定结果的影响, 照样测定项下方法操作, 回流水解时间分别为 0.5、1 和 2h, 测定样品 (批

号: 01) 中酯型生物碱含量, 分别为 $0.64\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $0.73\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $0.71\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。故选择水解时间为 1h。

10. 样品含量测定

取不同产地的铁棒锤 8 批、榜嘎 5 批, 分别照“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 用外标两点法计算样品中双酯型生物碱 (以乌头碱计) 含量, 同时, 按《中国药典》2005 版一部制

表 1 不同产地铁棒锤和榜嘎中双酯型生物碱的测定结果

批号	品名 (产地西藏)	双酯型生物碱含量 (HPLC) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	酯型生物碱含量 (UV) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
01	铁棒锤 (山南桑那县)	0.72	11.13
02	铁棒锤 (山南隆孜县)	0.81	11.74
03	铁棒锤 (山南措那县)	0.76	11.42
04	铁棒锤 (堆隆)	0.56	9.38
05	铁棒锤 (加查)	0.61	10.03
06	铁棒锤 (加查)	0.69	10.21
07	铁棒锤 (林芝)	0.49	7.97
08	铁棒锤 (林芝)	0.44	7.63
09	榜嘎 (山南桑那县)	0.19	2.31
10	榜嘎 (山南隆孜县)	0.17	2.16
11	榜嘎 (羊己井)	0.22	3.11
12	榜嘎 (羊己井)	0.11	1.98
13	榜嘎 (墨竹贡卡)	0.08	1.22

川乌项下的紫外-可见分光光度法方法测定铁棒锤和榜嘎中的酯型生物碱含量^[6], 结果见表 1

三、讨论

乌头碱、中乌头碱和次乌头碱等双酯型生物碱作为乌头属植物重要的活性和毒性成分, 在原植物的质量评价方面, 其含量是一个重要的指标, 铁棒锤和榜嘎为藏药成方制剂中常用药材, 其酯型生物碱含量测定方法多采用紫外-可见分光光度法, 酯型生物碱包括单酯型和双酯型生物碱, 两种生物碱毒性相差甚大, 即使相同量的酯型生物碱也会表现出不同的毒性, 双酯型生物碱多数情况是由氨基醇分子中的二个羟基与醋酸及苯甲酸各一分子结合成二元酯, 其分子中的苯甲酰酯键是产生毒性的关键部分^[7-8], 因此乌头属植物的毒性应主要以双酯型生物碱含量为指标。

乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的含量多采用 HPLC 法进行分离测定, 而乌头属植物的双酯型生物碱并非只是这 3 种, 本文将所有双酯型生物碱集中

到一起, 根据其化学结构的共同特征是含有苯甲酰酯键可定量地水解生成苯甲酸这一特点来制定本品中双酯型生物碱的含量限度。本文也曾采用 HPLC 法同时测定乌头碱、次乌头碱和新乌头碱, 试验结果发现由于流动相中含有二乙胺^[9], 检测过程中柱效逐渐降低, 基线漂移, 峰形影响较大, 并且发现榜嘎中的乌头碱含量很低(约 $3.04\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 要同时分别检测三者的含量, 背景噪音干扰大, 检测方法可控性差。

参照 2005 版药典川乌中酯型生物碱的提取方法, 采用氨乙醚冷浸提取样品中生物碱。由于乌头类生物碱在碱性环境下以游离型存在, 能充分溶于有机溶剂而被萃取出来。同时通过 HPLC 检测证明氨-乙醚不能从药材中提出苯甲酸, 显示样品中水解所得的苯甲酸为含有苯甲酰酯基键的双酯型生物碱提供。

试验中发现碱水解优于酸水解, 苯甲酸在酸性条件下不稳定, 游离的苯甲酸在较高温度下易升华,

因此样品提取过程中最后一步采用乙醚而非氯仿, 并注意在低温下减压回收制备样品。

参考文献

- 1 国家药典委员会编. 中华人民共和国卫生部药品标准藏药第一册. 1995:79, 85.
- 2 朱敏, 肖培根. 常用藏药榜嘎的研究, 中药材, 1989, 12(10):17~19.
- 3 孙文基, 沙振方, 王艾兴, 等. 铁棒锤化学成分的研究. 药学学报, 1989, 24(1):71~74.
- 4 王慕邹, 李百龙, 高凤英. 乌头中主要生物碱的高效液相色谱测定. 药学学报, 1983, 18(9):689~690.
- 5 陈幸, 夏文娟, 方娜娜. 对中国药典附子中乌头碱限量检查的商榷. 药物分析杂志, 1995, 15(4):6~8.
- 6 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 2005 年版一部. 北京: 化学工业出版社, 2005:27.
- 7 胡君茹, 姜华. 藏药铁棒锤的化学成分及药理作用研究进展. 甘肃中医, 2006, 19(11):18~19.
- 8 林启寿. 中草药成分化学. 北京: 人民卫生出版社, 1984:160~161.
- 9 孙婷婷, 栾立标. HPLC 法分离测定四逆汤中三种酯型生物碱及其 6 种水解产物. 中国中药杂志, 2006, 31(19):1634~1636.

Determination of diester-alkaloids in Aconitum szechenyanum and Aconitum naviculare by RP-HPLC

Chen Yan, Yi Jinhai, Liu Yuhua,

(Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China)

Deji, Zaxi

(Tibet Medical Hospital of Tibet Autonomous Region, Lasa 850000, China)

Abstract: This study aimed to establish a determination method of diester-alkaloids in Aconitum szechenyanum and Aconitum naviculare. The chromatographic method was carried out on the Aichrom™C₁₈ column using CH₃OH - 0.05mol·L⁻¹ KH₂PO₄ - CH₃COOH - (CH₃)₂CHOH (67:173:4:4) as a mobile phase. The detection wavelength was set at 230nm, with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature of 35℃. The aconitine calibration curves were found to be linear in the range of 0.09632~0.4816μg (r=0.9998). The average recovery of aconitine was 96.3% with RSD=1.87%. This method is simple and reliable, providing a reference standard for the quality control of aconitum alkaloids.

Keywords: Aconitum szechenyanum; Aconitum naviculare; aconitine; benzoic acid; Diester-alkaloids; RP-HPLC

(责任编辑:王 瑀, 责任译审:张立巍)