

工布乌头中三种生物碱 HPLC 法测定优化

王若丁¹, 王 超², 孟凡娟¹, 彭光华³, 兰小中²

(1. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 西藏大学 农牧学院, 西藏 林芝 860000; 3. 西藏自治区质量技术监督局, 西藏 拉萨 850000)

摘要:为优化工布乌头中生物碱的测定方法, 采用 HPLC 法测定工布乌头中新乌头碱、塔拉萨敏和乌头碱的含量。结果表明: 采用 10% 氨水 1 mL、乙醚 20 mL, 浸泡 24 h 后超声处理 30 min 可有效地对工布乌头中生物碱进行定量分析。

关键词:工布乌头; 高效液相色谱; 新乌头碱; 塔拉萨敏; 乌头碱

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)01-0106-04

工布乌头(*Aconitum kongboense* L.) 为多年生草本植物, 属毛茛科(Ranunculaceae) 乌头属(*Aconitum*) 植物, 藏药名为榜那, 为常用藏药, 具有抗炎、抗肿瘤、麻醉止痛、免疫调节及祛风定惊等功效, 主要分布于西藏中部地区, 是具有广阔开发前景的药用资源^[1]。然而乌头属药材中的主要成分乌头碱、新乌头碱和次乌头碱等既是活性成分又是剧毒成分, 人口服 0.2 mg 乌头碱即可出现中毒症状, 因此对含有乌头属药材的成药制剂质量的有效控制尤为重要^[2]。目前, 采用高效液相色谱法测定草乌、川乌和附子等乌头类生物碱已有报道^[3-5], 但对工布乌头的相关报道还较少, 该文以工布乌头为试验材料, 采用高效液相色谱仪对其 3 种主要成分(乌头碱、新乌头碱和塔拉萨敏) 的测定方法进行优化, 以期对工布乌头的药用成分分析和测定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试工布乌头采自西藏浪卡子县, 样品采集地海拔 4 356 m。

所用仪器为 ALigent 1100 型高效液相色谱仪; 试剂有新乌头碱标准品(批号 MUST-11122106)、乌头碱标准品(批号 MUST-

11031101) 和塔拉萨敏标准品(批号 120228), 3 种标准品均购自北京庄萌生物技术有限公司; 甲醇为色谱纯, 氯仿、二氯甲烷、无水乙醚及三乙胺为分析纯, 去离子水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: ALigent C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相: 甲醇-水-氯仿-三乙胺(95:5:2:0.15); 流速为 0.5 mL·min⁻¹; 检测波长为 235 nm; 柱温为室温; 样品经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液进样 20 μL。

1.2.2 标准曲线绘制 精密称取新乌头碱、塔拉萨敏和乌头碱对照品各 5 mg 置于 5 mL 容量瓶中, 加入二氯甲烷溶解并定容至刻度, 配制成浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的混合对照品储备液备用。分别精密量取混合对照品储备液 0.05、0.25、0.50、1.00、1.25 和 1.50 mL 置于 5 mL 容量瓶中, 加二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度分别为 0.01、0.05、0.10、0.20、0.25 和 0.30 mg·mL⁻¹ 的系列混合对照品溶液。

1.2.3 样品制备 精确称取工布乌头根细粉 0.5 g, 置于带塞锥形瓶中, 按表 1 处理方法添加各试剂剂量, 过滤, 残渣用乙醚洗 3 次, 每次 10 mL。合并乙醚液, 低温挥干乙醚, 残渣用二氯甲烷溶解并定容至 5 mL, 最后得供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 回归方程

图 1 为 3 种生物碱标准品的色谱图。对不同浓度的 3 种生物碱标准溶液进行测定, 以峰面积为纵坐标, 以浓度为横坐标, 所得标准曲线见图 2。求得塔拉萨敏、新乌头碱、乌头碱的回归方程

收稿日期: 2013-08-02

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2011BAI13B06)

第一作者简介: 王若丁(1986-), 女, 四川省巴中市人, 在读硕士, 从事植物分子生物学研究。E-mail: guanfachun@163.com。

通讯作者: 兰小中(1973-), 男, 四川省达州市人, 硕士, 副教授, 从事藏药植物资源利用研究。E-mail: lanxiaozhong@163.com。

分别为: $Y_1=56\,782X_1-17.4$, $r=0.999\,8$; $Y_2=70\,234X_2+3\,622.5$, $r=0.999\,6$; $Y_3=72\,305X_3-4.952\,2$, $r=0.999\,5$ 。

表 1 样品制备方法

Table 1 Methods of sample preparation

处理 Treatments	10%氨水/mL Ammonia water	碱化时间/min Alkalization time	乙醚/mL Ether	浸泡前超声时间/min Ultrasound time before soaking	浸泡时间/h Soak time	浸泡后超声时间/min Ultrasound time after soaking
A	1	—	20	—	4	—
B	1	—	20	24	—	—
C	1	—	20	30	24	—
D	1	30	20	30	24	—
E	1	—	20	—	24	30

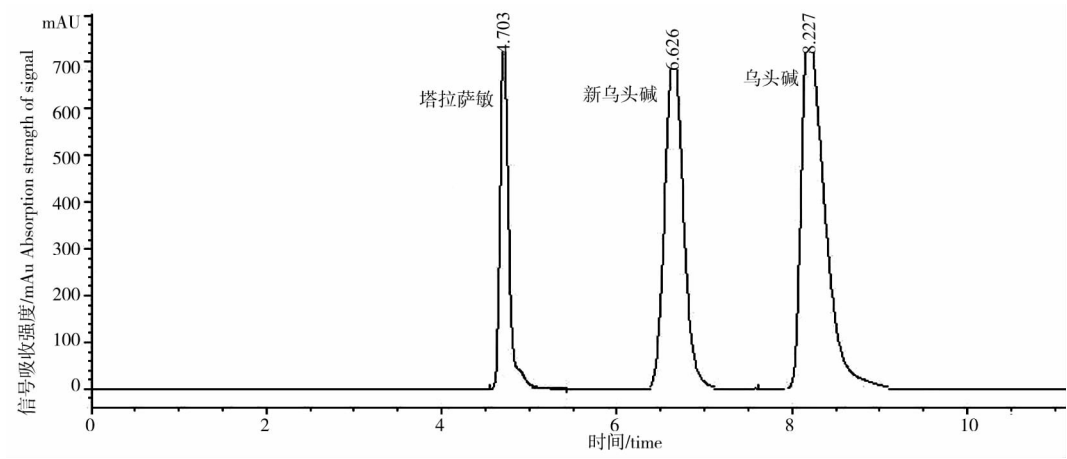


图 1 标准品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard substance

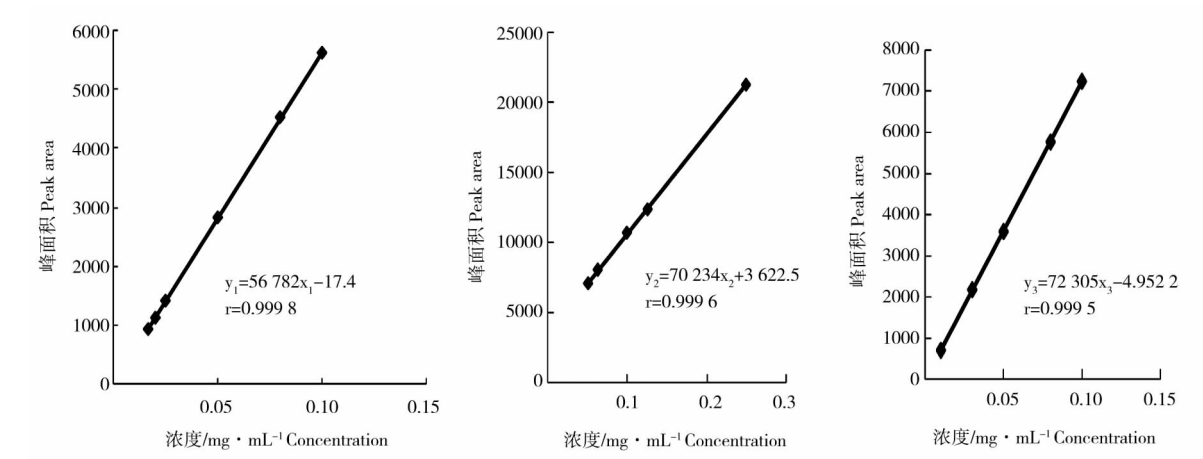


图 2 3 种生物碱标准曲线

Fig. 2 Standard curve of three kinds of alkaloids

结果表明,新乌头碱浓度在 $0.05 \sim 0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,塔拉萨敏和乌头碱在 $0.01 \sim 0.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积具有良好的线性关系。

2.2 样品提取方法优化

由图 2 可知,5 种方法测得工布乌头中 3 种生物碱的含量以新乌头碱最高,塔拉萨敏次之,乌头碱仅在处理 B 和 C 检测出微量,可知工布乌头中含有新乌头碱和塔拉萨敏,可能含有微量的乌头碱或不含有乌头碱。

按外标法以峰面积计算其含量,利用 5 种方法测定的 3 种物质含量见表 2。以处理 B 为对照

进行比较,处理 A 浸泡 4 h 不进行超声,新乌头碱含量下降了 70.9%,塔拉萨敏含量增加了 140%;处理 C 超声后浸泡 24 h,新乌头碱含量下降了 52.7%,塔拉萨敏增加了 68.6%,而处理 E 浸泡 24 h 后超声,新乌头碱含量变化不大,但塔拉萨敏的含量增加了 454%;处理 D 碱化 30 min 后超声浸泡,新乌头碱含量下降了 58.4%,塔拉萨敏增加了 208%。由此可知,浸泡时间、超声处理、碱化处理会对新乌头碱和塔拉萨敏的提取产生很大影响,其中处理 E 提取的新乌头碱和塔拉萨敏的含量最高,分别为 $476 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $45.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

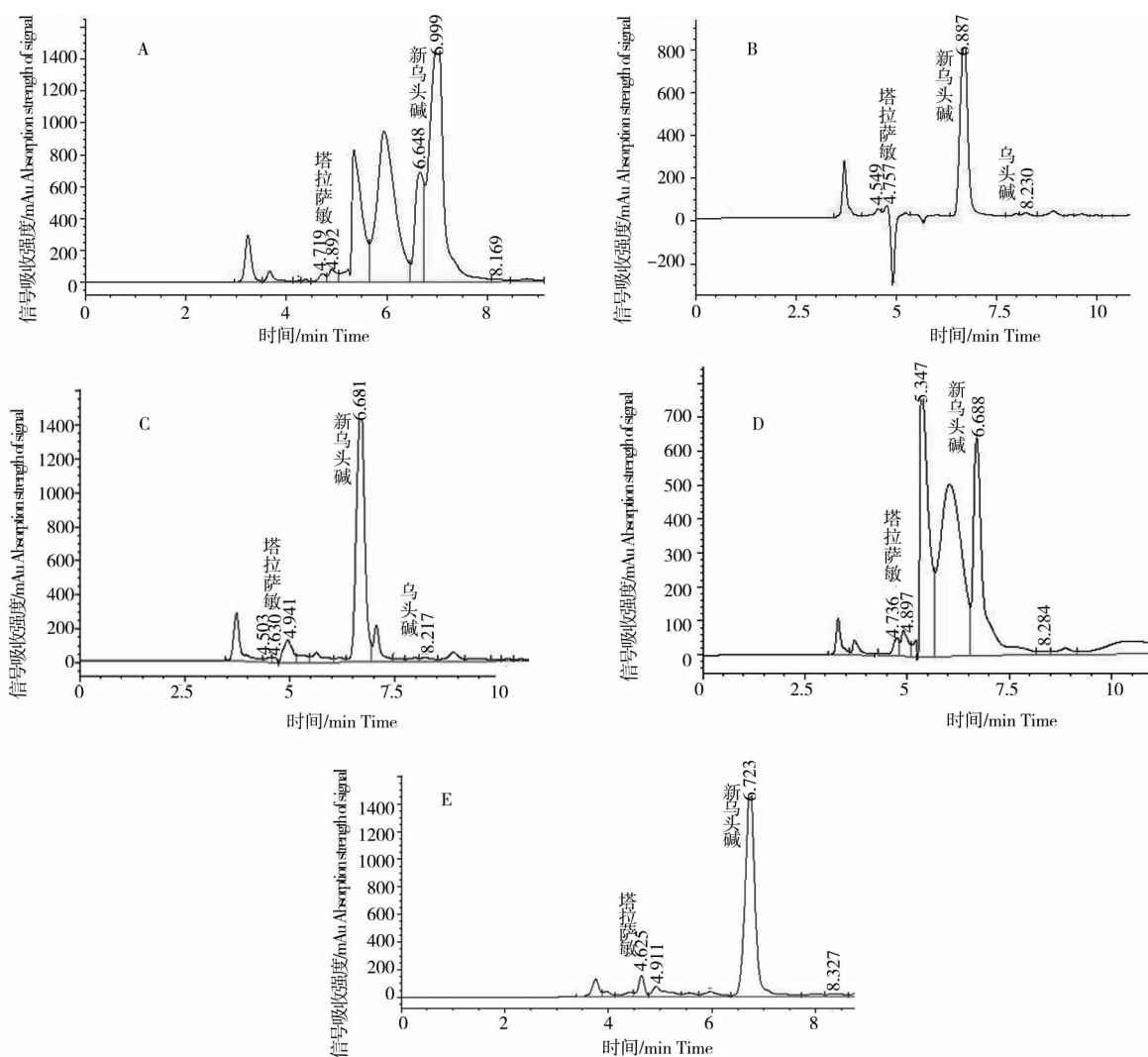


图 3 高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram

表 2 不同方法测定的 3 种物质含量比较
Table 2 The comparison content of three components by different treatments

处理 Treatments	新乌头碱/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Mesaconitine	塔拉萨敏/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Talisamine	乌头碱/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Aconitine
A	138	19.6	—
B(CK)	474	8.16	3.38
C	224	13.7	2.48
D	197	25.2	—
E	476	45.2	—

3 结论与讨论

隋志刚^[6]等采用水提氯仿萃取法、酸提法、酸提乙醚萃取法和氨水乙醚冷浸法对附子中乌头类生物碱进行提取,结果表明氨水冷浸为最有效的提取方法;朱俊访^[7]等用 HPLC 法测定不同地区制川乌不同炮制品中新乌头碱、次乌头碱及乌头碱的含量,采用氨水乙醚浸泡 14 h,甲醇-水-氯仿-三乙胺(体积比 70:30:2:0.1)为流动相,结果表明 3 种生物碱的含量以新乌头碱最高。

由于乌头碱类双酯二萜生物碱的极性较小,易溶于乙醚、氯仿等有机溶剂^[6],所以该试验通过对影响工布乌头中生物碱提取的浸泡时间、超声处理和碱化处理等因素进行分析比较。利用不同

方法测得的工布乌头中 3 种生物碱的含量明显不同,通过对比可知,工布乌头中可能含有微量的乌头碱或不含有乌头碱,与之前的报道相同^[8]。采用不同的处理方法得到的新乌头碱和塔拉萨敏含量相差较大,处理 E 提取到的工布乌头中的新乌头碱和塔拉萨敏含量最高,即用 1 mL 氨水和 20 mL 乙醚浸泡 24 h,超声 30 min。因此可利用该方法对工布乌头进行生物碱的精确测定,该方法对工布乌头的药用开发有重要的实用价值。

参考文献:

[1] 阿萍,王锋鹏. 工布乌头中生物碱成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2002,14(5):37.
[2] 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.
[3] 王瑞,刘芳,孙毅坤. 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.
[4] 吴歆,王斌. HPLC 法测定欣康胶囊中次乌头碱含量[J]. 西北药学杂志,2006,21(1):11.
[5] 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[J]. 中国中药杂志,2006,31(14):1160.
[6] 隋志刚,陈明玉,刘志强,等. 草乌中乌头类生物碱提取方法比较研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(3):531.
[7] 朱俊访,李卓亚,沈志滨,等. HPLC 法测定不同地区制川乌中新乌头碱、次乌头碱及乌头碱的含量[J]. 食品与药品,2008,10(9):44.
[8] 黄学娣,王曙,严晓梁. HPLC-ELSD 测定工布乌头中的塔拉萨敏[J]. 华西药理学杂志,2008,23(2):203.

The Optimization of HPLC Determination for Three Kinds of Alkaloids in *Aconitum kongboense* L.

WANG Ruo-ding¹, WANG Chao², MENG Fan-juan¹, PENG Guang-hua³, LAN Xiao-zhong²

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Agriculture and Animal Husbandry College, Tibet university, Linzhi, Tibet 860000; 3. Tebit Bureau of Quality and Technical Supervision, Lhasa, Tibet 850000)

Abstract: In order to optimize the extracting method of alkaloids in *Aconitum kongboense* L., the content of mesaconitine, talatisamine and aconitine were determined by HPLC. The results showed that 10% ammonia 1 mL, ether 20 mL, soak for 24 h, 30 min after ultrasonic treatment could be used to the quantitative analysis of the alkaloids of *Aconitum kongboense* L..

Key words: *Aconitum kongboense* L.; high performance liquid chromatography (HPLC); mesaconitine; Talatisamine; aconitine