

HPLC法测定藏药榜嘎中大麦芽碱的含量^Δ

卿大双^{1,2*},王欣^{1,2},覃瑶³,姚林才^{1,2},王思平⁴,杨勇⁵,罗维早^{2,3#}(1.成都中医药大学药学院,成都610072;2.重庆市中药研究院,重庆400065;3.太极集团有限公司,重庆401147;4.重庆市中医院,重庆401121;5.福安药业集团庆余堂制药有限公司,重庆401121)

中图分类号 R927.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0367-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.27

摘要 目的:建立测定藏药榜嘎中大麦芽碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Gemini-NX C₁₈,流动相为乙腈-0.25 mol/L乙酸铵溶液(氨水调pH至9.5)(梯度洗脱),流速为1 ml/min,检测波长为230 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:大麦芽碱检测质量浓度线性范围为3.276~819 μg/ml($r=0.9995$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为96.21%~104.04%(RSD=1.23%, $n=9$)。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于藏药榜嘎中大麦芽碱含量的测定。

关键词 榜嘎;高效液相色谱法;大麦芽碱;含量测定

Content Determination of Hordenine in Zang Medicine Herba Aconiti by HPLC

QING Dashuang^{1,2}, WANG Xin^{1,2}, QIN Yao³, YAO Lincal^{1,2}, WANG Siping⁴, YANG Yong⁵, LUO Weizao^{2,3}(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China; 2. Chongqing Institute of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 3. Taiji Group Co., Ltd., Chongqing 401147, China; 4. Chongqing Hospital of TCM, Chongqing 401121, China; 5. Qingyutang Pharmaceutical Co., Ltd., Fuan Pharmaceutical Group, Chongqing 401121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of hordenine in Zang medicine Herba Aconiti. METHODS: HPLC was performed on the column of Gemini-NX C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.25 mol/l Ammonium acetate solution(ammonia water to adjust the pH to 9.5, gradient elution, at flow rate of 1 ml/min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of hordenine was 3.276-819 μg/ml($r=0.9995$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 96.21%-104.04%(RSD=1.23%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, stable and reproducible, and can be used for the content determination of hordenine in Zang medicine Herba Aconiti.

KEYWORDS Herba Aconiti; HPLC; Heteratisine; Content determination

藏药榜嘎为毛茛科植物船盔乌头 *Aconitum naviculare* Stapf或甘青乌头 *A. tanguticum* (Maxim) Stapf的干燥全草^[1],具有生肌收口、燥湿、清热解毒的功效,是常用的藏药材之一。本研究对该药材采用高效液相色谱(HPLC)法建立了以大麦芽碱为指标成分的含量测定方法,并对方法学进行了全面的验证,进而对12批榜嘎药材进行了含量测定。本研究将为榜嘎药材的鉴定、资源的合理利用及相关质量标准的提升提供理论支撑。

1 材料

1.1 仪器

LC-2010CHT型HPLC仪(包括二极管阵列检测器)、AW220型电子天平(日本Shimadzu公司);Delta320型pH计(瑞士Mettler-Toledo公司);SB-5200D型超声清洗仪(宁波新艺超声设备有限公司)。

1.2 试剂

大麦芽碱对照品由笔者提取,经氢谱、碳谱鉴定结构,并

^Δ 基金项目:2015年版《中国药典》一部科研立项课题(No.M 25)

* 硕士研究生。研究方向:中药化学。E-mail:1028290340@qq.com

通信作者:研究员,博士生导师。研究方向:中药化学与新剂型。电话:023-89029026。E-mail:loweizao@163.com

经HPLC仪测定纯度为99.99%;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

12批榜嘎药材(编号:1~12)均采购于甘肃兰州黄河药材市场,经重庆市中药研究院生药所瞿显友研究员鉴定为真品。

2 方法与结果^[2-4]

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Gemini-NX C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.25 mol/L乙酸铵溶液(B,氨水调pH至9.5)^[4],梯度洗脱(0~15 min, 10%→15% A; 15~17 min, 15%→90% A; 17~32 min, 90% A; 32~34 min, 90%→10% A; 34~49 min, 10% A);流速:1 ml/min;检测波长:230 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。在上述色谱条件下,理论板数以大麦芽碱峰计不少于9 000,分离度为4.477,各成分基线分离良好。色谱见图1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取大麦芽碱对照品适量,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成每1 ml含0.081 9 mg大麦芽碱的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取药材样品粉末约3 g(过2号筛),精密称定,加入6 ml氨水浸润,静置15 min,加35 ml氯仿,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理35 min,滤过,药渣用氯仿洗涤3

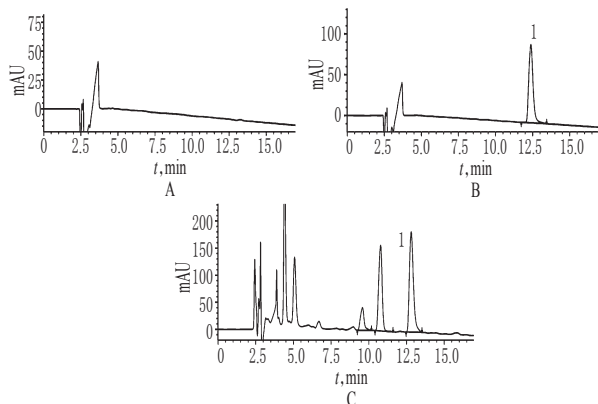


图1 高效液相色谱图

A.空白对照;B.对照品;C.供试品;1.大麦芽碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank control; B. substance reference; C. test samples; 1. hordenine

次,每次25 ml,合并氯仿液,在50℃下挥干,残渣置于10 ml 瓶中,用甲醇溶解并定容,即得。

2.2.3 空白对照溶液 以甲醇作为空白对照溶液。

2.3 线性关系考察

精密称取大麦芽碱对照品适量,加甲醇制成质量浓度为0.819 mg/ml 对照品溶液,分别稀释0、5、10、25、50、100、250倍,制成系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以大麦芽碱质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=20\ 000\ 000x+105\ 460.964\ 2$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明,大麦芽碱检测质量浓度线性范围为3.276~819 μg/ml。

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,大麦芽碱峰面积的RSD=0.08%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:11)适量,分别于放置0、2、4、8、12、16、20、24 h时进样测定,记录峰面积。结果,大麦芽碱峰面积的RSD=0.89%($n=8$),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:11)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,大麦芽碱峰面积的RSD=1.84%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

取已知含量样品(编号:11)适量,每份1.5 g,共9份,分别加入高、中、低质量的大麦芽碱对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算大麦芽碱含量并计算加样回收率,结果见表1。

2.8 样品含量测定

取12批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算大麦芽碱含量,结果见表2(所有含量均按干燥品计算)。

3 讨论

现代药理研究表明,藏药榜嘎其具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等多种药理活性^[5]。在《部颁标准》和《中国药典》约有

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.53	0.258 06	0.796 30	102.68		
0.52	0.258 06	0.795 40	103.41		
0.52	0.258 06	0.791 40	102.01		
0.53	0.516 12	1.062 90	101.69		
0.53	0.516 12	1.072 80	103.69	101.33	1.23
0.54	0.516 12	1.081 60	104.04		
0.52	0.787 50	1.308 00	99.53		
0.52	0.787 50	1.289 50	98.76		
0.52	0.787 50	1.275 60	96.21		

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of contents determination of samples($n=3$)

编号	大麦芽碱,%	编号	大麦芽碱,%
1	0.016	7	0.016
2	0.015	8	0.011
3	0.105	9	0.036
4	0.008	10	0.029
5	0.014	11	0.009
6	0.018	12	0.039

41个品种处方中含有榜嘎,约占藏药成方制剂的20%。但在2011年版《部颁标准·藏药分册》和2012年版《藏药标准》中,榜嘎除性状、性味、功能与主治、用法与用量和贮藏外,缺乏作为现代药品质量标准标志的活性或毒性成分的定性定量检测,极大地阻碍了榜嘎的系统开发及合理运用。据文献报道,生物碱为榜嘎抗炎镇痛的主要活性成分^[6],虽然很多学者对榜嘎的化学成分进行了研究,已初步分离得到了22个生物碱^[7],却也尚未建立具有活性成分定性定量检测的药材质量标准。榜嘎由于生长环境多变、质量差异大、活性成分变异大^[8],可能导致其成药效果降低。因此,对其活性成分的控制尤为重要。基于此,本研究针对共有生物碱进行研究,并以大麦芽碱作为指标成分建立了榜嘎药材的含量测定方法。

笔者曾考察了乙腈-碳酸氢铵、乙腈-乙酸铵、乙腈-四氢呋喃-乙酸铵等流动相系统,经反复多次试验,结果以乙腈-0.25 mol/L 乙酸铵(氨水调pH至9.5)为流动相系统,大麦芽碱色谱峰分离度及峰形最好,故选其作为流动相。并且,取大麦芽碱对照品溶液在190~700 nm 波长范围内扫描,发现其最大紫外吸收在230 nm 波长左右,故确定检测波长为230 nm。另外,试验中对供试品溶液制备方法进行了考察,以大麦芽碱的提取率为指标,分别考察了提取方法(超声、冷浸)、提取溶剂[乙醚、氯仿、甲醇-盐酸(100:0.5, V/V) 乙酸乙酯-异丙醇(1:1, V/V)]、提取溶剂用量(25、35、45 ml)、提取时间(25、35、45 min),结果表明,以35 ml 氯仿超声处理35 min,大麦芽碱的提取率最高。

综上所述,本方法操作简便、稳定、重复性好,可用于藏药榜嘎中大麦芽碱含量的测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:285.
- [2] Aneja R, Pelletier SW. The diterpene alkaloids: the pyrolysis and absolute configuration of heteratisine[J]. *Tetrahedron Letters*, 1965, 6(2):215.
- [3] 王海坝, 蒋山好, 杨培明, 等. 甘青乌头的生物碱[J]. *天然产物研究与开发*, 2002, 14(4):13.
- [4] 欧丽娜, 阳勇, 李星颖, 等. HPLC法测定藏药榜嘎中乌头

HPLC法测定旋覆花药材中旋覆花素和去乙酰旋覆花素的含量^Δ

马立满*, 刘震, 尚明英#, 刘广学, 徐风, 蔡少青(北京大学药学院生药学研究室, 北京 100191)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0369-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.28

摘要 目的:建立测定旋覆花药材中旋覆花素和去乙酰旋覆花素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Zorbax SB-C₁₈,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为25℃,检测波长为210 nm,进样量为10 μl。结果:旋覆花素和去乙酰旋覆花素的检测质量浓度线性范围分别为0.000 2~0.005、0.000 1~0.001 7 μg/ml($r=0.999 8$ 、 $0.999 4$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为99.63%~103.56%、95.98%~101.21%,RSD分别为1.26%、1.84%($n=9$)。结论:该方法操作简便,结果准确、可靠,可用于评价旋覆花药材的质量。

关键词 旋覆花;旋覆花素;去乙酰旋覆花素;含量测定;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Inulicin and Deacetylinulicin in Inulae Flos by HPLC

MA Liman, LIU Zhen, SHANG Mingying, LIU Guangxue, XU Feng, CAI Shaoqing(Division of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method of simultaneous determination of inulicin and deacetylinulicin in Inulae Flos. METHODS: HPLC was performed on the column of Zorbax SB-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the column temperature was 25℃, the detection wavelength was 210 nm, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.000 2-0.005 μg/ml($r=0.999 8$) for inulicin and 0.000 1-0.001 7 μg/ml($r=0.999 4$) for deacetylinulicin; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 99.63%-103.56% (RSD=1.26%, $n=9$) and 95.98%-101.21% (RSD=1.84%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and can be used for the quality evaluation of Inulae Flos.

KEYWORDS Inulae Flos; Inulicin; Deacetylinulicin; Content determination; HPLC

旋覆花为菊科植物日本旋覆花(*Inula japonica* Thunb.)或欧亚旋覆花(*I. britannica* L.)的干燥头状花序,具有降气、消痰、止呕、行水的功效,主要用于风寒咳嗽、痰饮蓄结、喘咳痰多、心下痞硬等证^[1]。旋覆花素为旋覆花的特征性有效成分,具有明显的抗肿瘤、抗炎、抗溃疡、利尿、镇咳等作用^[2-9];另有文献报道,去乙酰旋覆花素也具有抗炎活性^[6]。欧亚旋覆花、湖北旋覆花、线叶旋覆花等旋覆花属植物中旋覆花素、槲皮素、1β-羟基-土木香内酯等成分的含量测定已有研究^[7-13],然而旋覆花商品药材的质量评价仅见本课题组前期发表的一篇高效液相色谱(HPLC)指纹图谱研究^[14],未见其有效成分的含量测定报道。因此,笔者建立HPLC法测定旋覆花药材中旋覆花素和去乙酰旋覆花素的含量,旨在为旋覆花药材的质量评价提供更为合理、可靠的方法。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括G1379A型在线真空脱气机、G1312A型二元梯度泵、G1313A型自动进样器、G1316A型柱温箱、G1315B型二极管阵列检测器(美国Agilent公司);CP225D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);CP114型万分之一电子天平(美国Ohaus公司);KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RT-02A型小型粉碎机(北京弘荃翔和机械技术有限公司);Milli-Q型超纯水制备仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

收集全国范围内的旋覆花药材12批(批号:7178、7197、7204、7218、7219、7220、7221、7222、7223、7224、7367、7368,经尚明英副教授鉴定为菊科植物日本旋覆花的干燥头状花序),同批号样品保存在北京大学药学院生药学标本室。旋覆花素和去乙酰旋覆花素对照品为本课题组从日本旋覆花的干燥头状花序中分离得到,其结构通过核磁共振氢谱(¹H NMR)、核

碱的含量[J].中国药房,2014,25(19):1769.
[5] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第一册[S].北京:中国医药科技出版社,1995:85.

Δ基金项目:国家药品标准提高暨2015年版《中国药典》科研任务项目

*硕士研究生。研究方向:天然药物化学。E-mail:maliman88@163.com

#通信作者:副教授,博士。研究方向:生药学。电话:010-82802534。E-mail:myshang@bjmu.edu.cn

[6] 梁敬钰,薛姣,刘静涵,等.乌头属植物二萜生物碱研究进展[J].海峡药学,2009,21(2):1.

[7] 罗明,李春,林丽美,等.藏药榜嘎化学成分和药理作用的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,21(7):1644.

[8] 陈燕,易进海,刘云华,等.HPLC法测定藏药材铁棒锤、榜嘎中双酯型生物碱的含量[J].中国民族医药杂志,2009,11(6):47.

(收稿日期:2015-10-19 修回日期:2015-11-20)

(编辑:张静)