

HPLC 法测定不同产地附子中主要成分的含量

秦利芬, 杨玉琴

(昆明医科大学附属儿童医院药剂科, 云南 昆明 650228)

摘要:目的 考察不同产地的西南附子中新乌头原碱、次乌头原碱和乌头原碱的含量。方法 采用 HPLC 进行测定, 色谱柱为 Diamonsil C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为四氢呋喃-乙腈(15:25); 流动相 B 为醋酸铵溶液(0.1 mol/L), 检测波长 λ=235 nm; 流速 1 ml/min; 柱温 25 ℃。结果 不同产地的西南附子样品中生物碱类成分的含量有着明显差异, 新乌头碱的含量以贵州小河的最高为 0.17%, 贵州兴义的最低为 0.06%; 次乌头碱的含量以四川江油的最高为 0.28%, 贵州花江的最低为 0.13%; 乌头碱的含量以云南腾冲与贵州水口寺的最高为 0.04%, 四川江油与贵州龙里的最低为 0.01%。结论 西南附子中三种乌头碱的总含量以四川江油和云南腾冲产者最高。另外, HPLC 测定法简单、易行, 可为附子的产区扩大研究提供科学依据。

关键词: 西南附子; 新乌头原碱; 次乌头原碱; 乌头原碱; HPLC

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2018.08.019

文章编号: 1006-1959(2018)08-0062-03

Determination of Main Components in Aconite from Different Habitats by HPLC

QIN Li-fen, YANG Yu-qin

(Department of Pharmacy, Children's Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650228, Yunnan, China)

Abstract: Objective To investigate the content of new aconitine, sub aconitine and aconitine in Aconitum monkshood from different habitats. Methods The chromatographic column is determined by HPLC, the column is Diamonsil C18 column (150mm×4.6 mm, 5μm), the mobile phase A is tetrahydrofuran acetonitrile (15:25), the mobile phase B is ammonium acetate solution (0.1mol/L), the detection wavelength is λ=235 nm, the velocity is 1 ml/min, and the column temperature is 25℃. Results The contents of alkaloids in the samples from different habitats were significantly different. The content of neoaconine was 0.17% in Guizhou Xiaohé and 0.06% in Guizhou Xingyi. The content of sanaconine was Sichuan Jiangyou. The highest was 0.28%, and the lowest in Guizhou Huajiang was 0.13%; the content of aconitine was 0.04% in Yunnan Tengchong and Guizhou Shuikou Temple, and the lowest in Sichuan Jiangyou and Guizhou Longli was 0.01%. Conclusion The total content of three aconitines in Aconite in the southwest is highest in Sichuan Jiangyou and Yunnan Tengchong. In addition, the HPLC assay is simple and easy to perform, which can provide scientific basis for the expansion of aconite production areas.

Key words: Aconite; New aconitine; Subaconitine; Aconitine; HPLC

附子为毛茛科植物乌头的子根的加工品。具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛之功效, 为回阳救逆之要药^[1]。研究表明, 附子的主要化学成分乌头碱是其有效成分^[2]。有效成分含量的多少直接影响其处方制剂的临床疗效, 然而不同的产地对其有效成分含量有一定影响。根据系统分析结果, 除四川江油县为附子的传统产区外, 在全国的适宜产区还包含四川、贵州、云南、陕西、湖南、湖北、甘肃、广西、江西、安徽等 10 个省区的 336 个县市^[3]。本文以附子为对象, 以新乌头原碱、次乌头原碱和乌头原碱的含量为指标进行研究, 比较不同产地的西南附子中三种生物碱的含量。为西南附子质量评价奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Aglient 1100 高效液相色谱仪, 包括四元泵、在线脱气机、自动进样器, 和 DAD 检测器,

HP1100/ WIND3D 英文工作站 (美国安捷伦公司); 0.45 μm 微孔滤膜 (天津市津腾实验设备有限公司)。AE240 双量程电子分析天平, 可根据需要进行调整为万分之一和十万分之档 (梅特勒-托利多上海有限公司)。

1.2 试剂 对照品均购于中国药品生物制品检定所; 附子药材均采自西南三省, 经贵阳中医学院生药教研室王祥培教授鉴定为毛茛科植物乌头的子根; 甲醇和乙腈为色谱纯 (德国默克公司); 水为娃哈哈纯净水; 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C18 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为四氢呋喃-乙腈(15:25); 流动相 B 为醋酸铵溶液(0.1 mol/L), 洗脱程序为见表 1; 检测波长 λ=235 nm; 流速 1 ml/min; 柱温 25 ℃; 进样量 10 μl^[4]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取新乌头碱、次乌头碱和

基金项目: 贵阳市科学技术计划项目(编号: 20096)

作者简介: 秦利芬(1985.2-), 女, 云南昆明人, 硕士, 主管药师, 研究方向: 新药研发与质量控制

表 1 洗脱程序

时间(min)	流动相(A%)	流动相(B%)
0~48	15→26	85→74
48~48.1	26→35	74→65
48.1~58	35	65
58.1~65	35→15	65→85

乌头碱对照品适量,置 25 ml 容量瓶中,加异丙醇-二氯甲烷(1:1)混合溶液制成浓度为(新乌头碱:0.2820 mg/ml,次乌头碱:0.2817 mg/ml,乌头碱:0.0802 mg/ml)的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 按照 2010 版药典附子项下供试品溶液的制备方法进行制备,即得。

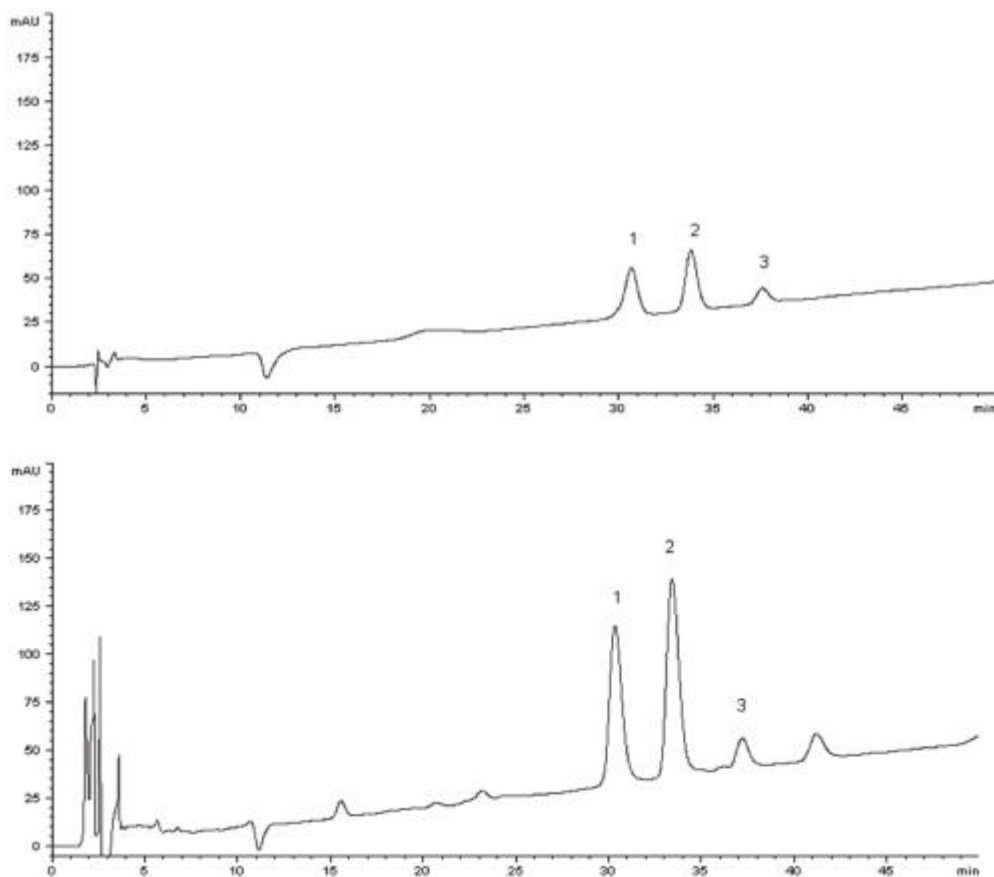
2.3 系统适用性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μ l,按 2.1 项下色谱条件进样。结果:样品中三种乌头碱与其他成分完全分离,且分离度大于 1.5,理论塔板数按苯甲酰新乌头碱计算大于 3000,见图 1。

2.4 样品含量测定 精密称取不同产地的附子样品,按照中国药典(2010 版)附子项下供试品溶液的制备方法进行制备,即得。照 2.1 项下色谱条件测定,计算含量。结果见表 2、图 2~图 3。

3 讨论

由图 2 知:不同产地的西南附子样品中生物碱类成分的含量有着明显差异,新乌头碱的含量以贵州小河的最高为 0.17%,贵州兴义的最低为 0.06%;次乌头碱的含量以四川江油的最高为 0.28%,贵州花江的最低为 0.13%;乌头碱的含量以云南腾冲与贵州水口寺的最高为 0.04%,四川江油与贵州龙里的最低为 0.01%。这可能与各地不同的气候因素有关。采用 spss19.0 单因素方差分析及 SNK 多重比较法对不同来源的附子中三种乌头碱的总含量进行比较分析,结果见图 3,三种乌头碱总含量高低为:四川江油=云南腾冲>贵州小河=贵州八公里=贵州水口寺>贵州毕节>贵州龙里=贵州花江>贵州兴义。四川江油与云南腾冲两者之间的总含量差异无统计学意义,同为最高,二者类似的原因可能是两地的气候和海拔比较相似,而整个贵州地区的都偏低可能与贵州常年的阴雨天气有关。因为植物有效成分的形成和积累与其生态环境中水质、土壤、光照和气候等有密切关系^[6]。

目前,人们认可的附子产区为传统产区四川江油。而本实验对西南不同产地的附子进行含量分析,结果提示,云南腾冲与四川江油的附子两者之间的

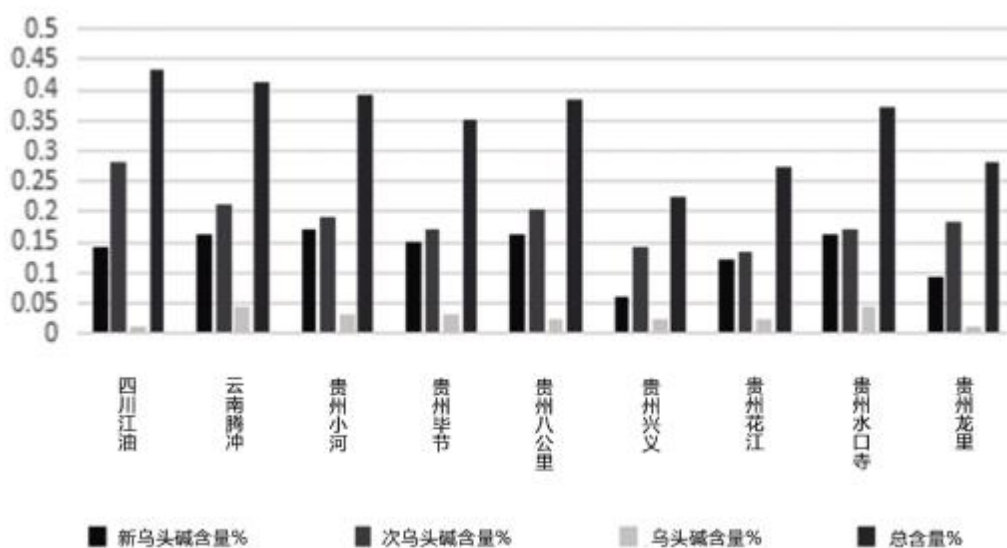


注:A.混合对照品;B.样品;1.新乌头原碱;2.次乌头原碱;3.乌头原碱

图 1 附子 HPLC 图谱

表 2 不同产地的西南附子测定结果(n=3)

药材来源	新乌头碱含量(%)	次乌头碱含量(%)	乌头碱含量(%)	总含量(%)
四川江油	0.14	0.28	0.01	0.43
云南腾冲	0.16	0.21	0.04	0.41
贵州小河	0.17	0.19	0.03	0.39
贵州毕节	0.15	0.17	0.03	0.35
贵州八公里	0.16	0.2	0.02	0.38
贵州兴义	0.06	0.14	0.02	0.22
贵州花江	0.12	0.13	0.02	0.27
贵州水口寺	0.16	0.17	0.04	0.37
贵州龙里	0.09	0.18	0.01	0.28

图 2 不产地的附子中三种乌头碱的含量分析柱形图
总含量

产地	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
Student-Newman-Keuls ^a						
贵州兴义	3	.2195				
贵州花江	3		.2729			
贵州龙里	3		.2844			
贵州毕节	3			.3495		
贵州水口寺	3			.3682	.3682	
贵州八公里	3				.3799	
贵州小河	3				.3885	
云南腾冲	3					.4147
四川江油	3					.4316
Sig.		1.000	.245	.066	.111	.094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

^a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

图 3 不同产地的附子中三种乌头碱的总含量 SNK 多重比较图

总含量差异无统计学意义,同为最高;其他不同产地的附子中,各生物碱的含量有着明显的差异,可按对附子中各种生物碱的不同需求选择不同的产地。此结果可为更深层次的研究附子提供科学依据。

参考文献:

- [1]黄兆胜.中药学[M].北京:人民卫生出版社,2002:225.
- [2]张智琳.浅析四逆汤类方治疗心力衰竭的特点[J].中华中医药杂志,2005,2(4):225-227.
- [3]赵润怀,王继永,孙成忠,等.基于 TCMGIS-I 的道地药材附

子产地适宜性分析[J].中国现代中药杂志,2006,8(7):4-8.

[4]国家药典委员会.中国药典. I 部[S].北京:化学工业出版社,2010:178.

[5]何晓曦,孔令提,张泽生,等.不同产地和不同采收期荷叶中生物碱的含量变化[J].天然产物研究与开发,2013,25(5):652-655,661.

收稿日期:2018-2-9;修回日期:2018-2-22

编辑/成森