

HPLC法测定八角枫药材不同药用部位中L(-)-八角枫碱的含量

王其勇*,许亚玲[#](贵州省食品药品检验所,贵阳 550004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)27-3877-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.27.45

摘要 目的:建立测定八角枫药材不同药用部位(茎、根茎、须根及支根)中L(-)-八角枫碱含量的方法,为八角枫药材的开发利用提供参考。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Thermo C₁₈,流动相为甲醇-磷酸缓冲液(22:78, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为259 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:L(-)-八角枫碱的进样量线性范围为0.020 62~0.257 80 μg($r=0.999\ 9$);定量限为1.7 ng,检测限为0.5 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率为97.38%~98.86%(RSD=0.6%, $n=6$)。不同药用部位中L(-)-八角枫碱含量,须根>支根>根茎>茎。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好、专属性强,适用于测定八角枫药材不同药用部位(茎、根茎、须根及支根)中L(-)-八角枫碱的含量。

关键词 高效液相色谱法;八角枫;L(-)-八角枫碱;不同药用部位

Content Determination of L(-)-Anabesine in Different Medicinal Parts of *Alangium chinense* by HPLC

WANG Qiyong, XU Yaling(Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of L(-)-Anabesine in different medicinal parts (stem, rhizome, fibrous root, rootlet) of *Alangium chinense*, and provide reference for its development and utilization. METHODS: HPLC was performed on the column of Thermo C₁₈ with mobile phase of methanol-phosphate buffer solution (22:78, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 259 nm, column temperature was 30 ℃; the injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range of L(-)-Anabesine was 0.020 62-0.257 80 μg ($r=0.999\ 9$); the limit of quantitation was 1.7 ng, limit of detection was 0.5 ng; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recovery was 97.38%-98.86% (RSD=0.6%, $n=6$). The content of L(-)-Anabesine in different medicinal parts was the fibrous root>the rootlet>the rhizome>the stem. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reproducible and specific, and suitable for the content determination of L(-)-Anabesine in different medicinal parts (stem, rhizome, fibrous root, rootlet) of *A. chinense*.

KEYWORDS HPLC; *Alangium chinense*; L(-)-Anabesine; Different medicinal parts

八角枫收载于2003年版《贵州省中药材及民族药材质量标准》,为八角枫科植物八角枫 *Alangium chinense* (Lour.) Harms 及瓜木 *Alangium platani folium* (Sieb. Et Zucc.) Harms 的干燥细须根(白龙须)或干燥支根(白金条)^[1],而2015年版《中国药典》未收载该药材。八角枫药材生于280~1 800 m 的山地或疏林中,喜温暖潮湿气候,分布于河南、陕西、甘肃、西

藏南部、云南、四川、湖南、湖北、广西、广东、江西、江苏、浙江、福建、台湾、贵州等省区,全年均可采挖^[2]。其在贵州全省均有分布,为贵州省少数民族用药,具有祛风通络、散瘀镇痛、麻醉及松弛肌肉等功效^[3-5],可用于治疗风湿疼痛、麻木瘫痪、心力衰竭、劳损腰痛、跌打损伤等证。其须根含生物碱(即八角枫碱),是松弛肌肉的主要活性成分,也是其毒性的主要来源^[6-8]。八角

中国中药杂志,1999,24(4):222.

[3] 张琳,杨中林.水提法与醇提法对骨碎补中总黄酮含量的影响比较[J].江苏药学与临床研究,2004,12(3):30.

[4] 伍奕,蒋晓煌,蒋孟良,等.骨碎补中柚皮苷含量测定方法的优化研究[J].湖南中医药大学学报,2010,30(3):48.

[5] 方婧,杨洪军,付梅红,等.微波协助提取在中药饮片含量测定中的应用(4):微波法与药典法测定骨碎补中柚皮苷含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):75.

[6] 高军,刘富春.正交试验优选枳实中柚皮苷的提取工艺[J].中国药房,2014,25(35):3 291.

[7] 李园园,石磊,张振巍,等.混合均匀设计结合响应面法优选枳壳六妙口服液中药材的提取工艺[J].中国药房,

2013,24(39):3 685.

[8] 高颖,房德敏,王巨存,等.苏氏接骨胶囊中骨碎补和菟丝子的质量控制[J].中国医院药学杂志,2010,30(4):333.

[9] 张红旭,郭辉.HPLC法测定骨碎补酊中柚皮苷含量[J].西北药学杂志,2006,21(2)63.

[10] 岳春华,李顺祥.从骨碎补中制备新北美圣草苷和柚皮苷对照品的研究[J].中草药,2008,39(4):529.

[11] 李遇伯,孟繁浩,潘晓峰,等.HPLC同时测定骨碎补药材中新北美圣草苷和柚皮苷的含量[J].药物分析杂志,2006(6):808.

[12] 吕勇均,邱宗荫.中药骨碎补提取物质量标准研究[J].中国药业,2007,16(23):26.

[13] 陈洁.薄层-紫外分光光度法测定骨碎补中柚皮苷的含量[J].中医正骨杂志,2007,19(3):76.

(收稿日期:2015-12-19 修回日期:2016-07-16)

(编辑:刘 柳)

* 副主任药师。研究方向:药物分析。电话:0851-86807025.

E-mail: qiyoo_king@sina.com

[#] 通信作者:主任药师。研究方向:药物分析。电话:0851-86808035. E-mail: 499929857@qq.com

枫药材传统以须根入药,其他部位(支根、根茎、茎等)几乎不用,这对资源造成了极大的浪费。如果其他部位也含有八角枫碱,那么这些部位就能和须根一样入药使用,从而提高八角枫药材的使用率。笔者查阅相关文献^[9-14],发现除须根外,均未有其他部位的分析研究以及有效成分测定的报道。因此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)对八角枫药材不同药用部位进行测定,以期八角枫药材的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000型HPLC仪,配有四元梯度泵、在线脱气装置、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、变色龙色谱处理系统(美国Thermo Fisher Scientific公司);240型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 试剂

L(-)-八角枫碱对照品[阿法埃莎(天津)化学有限公司,批号:10110058,纯度:94.0%];甲醇(美国Tedia公司)为色谱纯,三氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司)、庚烷磺酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、冰乙酸(天津市富宇精细化工有限公司)、磷酸二氢钾(天津市致远化学试剂有限公司)为分析纯,水为自制超纯水。

1.3 药材

本试验共收集到10批样品(样品信息见表1),均产于贵州省毕节地区织金县,并由贵阳中医学院陈德媛研究员鉴定为八角枫 *Alangium chinense* (Lour.) Harms 的干燥细须根、支根、根茎、茎。

表1 八角枫药材10批样品信息

Tab 1 Information of 10 batches of samples of *A. chinense*

样品批号	药材部位	样品批号	药材部位
20100607	须根	20111123	根茎
20120601	支根	20111014	根茎
20110126	根茎	20120502	根茎
20110818	根茎	20120426	茎
20111228	根茎	20120313	茎

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-磷酸缓冲液(0.2 g 庚烷磺酸钠、2.0 g 磷酸二氢钾、0.3 ml 磷酸置于1 000 ml 量瓶中,加水定容,摇匀)(22:78, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:259 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取*L*(-)-八角枫碱对照品10.97 mg,置于100 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得对照品贮备液。精密量取上述贮备液5 ml,置于50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为10.31 μg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品粉末(过四号筛)适量,约0.5 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶中,精密量取酸性甲醇溶液(取甲醇30 ml,用5%乙酸溶液稀释至100 ml)25 ml,称定质量,置水浴上回流提取30 min,放冷,用酸性甲醇溶液补足减失的质量,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取“2.2.2”项下酸性甲醇溶液作为阴性对照溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照

溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以*L*(-)-八角枫碱峰计为6 500;保留时间为13.32 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

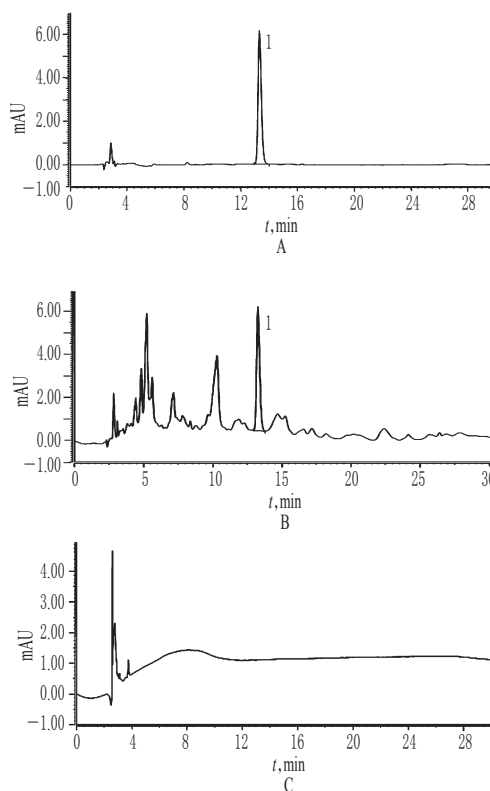


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.*L*(-)-八角枫碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.negative control; 1.*L*(-)-Anabasin

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下对照品溶液2、5、10、15、20、25 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得*L*(-)-八角枫碱的回归方程为 $y=966\ 993.714\ 6x+544.252\ 9$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,*L*(-)-八角枫碱的进样量线性范围为0.020 62~0.257 80 μg。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限为1.7 ng;当信噪比为3:1时,得检测限为0.5 ng。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,*L*(-)-八角枫碱峰面积的RSD=0.4%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:20120601)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,*L*(-)-八角枫碱峰面积的RSD=0.2%($n=7$),表明供试品溶液在室温下12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20120601)粉末适量,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,记录峰面积并计算平均含量。结果,*L*(-)-八角枫碱的平均含量为1.254 4 mg/g, RSD=1.2% (*n*=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取样品(批号:20120601)粉末适量,共6份,每份约0.25 g,精密称定,置于100 ml锥形瓶中,精密加入一定质量的*L*(-)-八角枫碱对照品,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,记录峰面积并计算加样回收率,结果详见表2。

表2 加样回收率试验结果(*n*=6)
Tab 2 Results of recovery test(*n*=6)

取样量,g	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,%
0.250 3	0.314 0	0.309 4	0.615 6	97.49	98.0	0.6
0.250 8	0.314 6	0.309 4	0.616 4	97.57		
0.250 0	0.313 6	0.309 4	0.614 9	97.38		
0.250 9	0.314 7	0.309 4	0.618 1	98.07		
0.250 4	0.314 1	0.309 4	0.618 6	98.43		
0.250 5	0.314 2	0.309 4	0.620 1	98.86		

2.10 样品含量测定

分别取10批样品各适量,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,记录峰面积并计算*L*(-)-八角枫碱的含量,结果详见表3。

表3 样品含量测定结果(*n*=2,%)

Tab 3 Results of content determination of sample(*n*=2,%)

样品批号	药用部位	<i>L</i> (-)-八角枫碱含量	RSD
20100607	须根	0.95	0
20120601	支根	0.13	1.2
20110126	根茎	0.034	1.4
20110818	根茎	0.040	0
20111228	根茎	0.030	0
20111123	根茎	0.032	1.6
20111014	根茎	0.037	0
20120502	根茎	0.033	0
20120426	茎	0.016	3.2
20120313	茎	0.018	0

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

取甲醇、三氯甲烷以及酸性甲醇溶液各适量,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。结果,酸性甲醇溶液作为提取溶剂时,色谱峰峰形较好,主峰与相邻峰的分度度>1.5,且*L*(-)-八角枫碱的含量最高。因此,本试验选择酸性甲醇溶液为提取溶剂。

3.2 各部位八角枫碱的含量比较

八角枫药材所含生物碱以*L*(-)-八角枫碱为主,通过本试验表明该药材各部位均含有*L*(-)-八角枫碱,含量依次为须根>支根>根茎>茎,其中须根为0.95%,支根为0.13%,根茎为0.030%~0.040%,茎为0.016%~0.018%。但是,须根是毒性最大的部位,会引起中毒情况,因此可降低须根的使用量,而增加支根和根茎的用量,这既可保证疗效,又可减少使用该药材而导致的中毒情况^[15]。

3.3 合理的开发利用

目前,对八角枫药材须根的研究报道较多,比如对水杨苷、生物碱的含量测定,毒理以及临床应用等,但是对其他部

位(支根、根茎、茎等)的研究报道较少,这与八角枫药材的传统用药方式有关。该药材主要以野生为主,传统以须根入药,其余部位几乎很少使用。近年来,八角枫药材在贵州省中成药中的应用逐渐增多,随着使用量的增加,其野生资源也越来越少,而单用其他部位入药又达不到相应的疗效,造成其他部位药材使用率较低,形成资源浪费。因此,打破用药常规,合理的利用支根、根茎等药用部位,将各部位配合使用以缓解须根资源不足很有必要。八角枫药材在贵州以野生为主,四季均可采挖,不同产区及采收期收集的药材其质量会有不同,由于本试验收集的样品有限,给出的试验数据未能全面反映该药材的质量情况,因此进一步对生长环境、采收季节、产地加工等影响药材质量的因素进行考察很有必要。

综上所述,本方法操作简便、结果准确、重复性好、专属性强,适用于测定八角枫药材不同药用部位(茎、根茎、须根及支根)中*L*(-)-八角枫碱的含量。

参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:11.
- [2] 鲍家科.贵州省中药及民族药材质量原植(动)物彩色图鉴:上[M].贵阳:贵州科技出版社,2009:8.
- [3] 全国中草药汇编组.全国中草药汇编:上[M].北京:人民卫生出版社,1982:14.
- [4] 南京中医药大学.中药大辞典:上册[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2006:32-34.
- [5] 浙江医科大学.八角枫碱肌肉松弛作用的研究[J].新医学杂志,1974(10):45.
- [6] 杨仓良.毒药本草[M].北京:中国中医药出版社,1993:172.
- [7] 张昌华,王登文,许小明,等.八角枫中毒死亡1例[J].法医学杂志,2008,24(2):155.
- [8] 张长银,张礼俊,胡永良,等.小鼠急性八角枫中毒的病理学观察[J].法医学杂志,2009,25(5):329.
- [9] 刘毅,张丽艳,张永萍,等.高效液相色谱法测定黔产民族药材八角枫中毒藜碱的含量[J].中国医院药学杂志,2009,29(11):962.
- [10] 石钺,杨帅,李开通.高效液相色谱法测定风湿定胶囊中毒藜碱的含量[J].中国医院药学杂志,2009,29(1):87.
- [11] 梁从庆,李书渊,房志坚.HPLC法测定风湿定片中中毒藜碱的含量[J].中药新药与临床药理,2004,15(4):268.
- [12] 张化为,崔春利,宋道,等.风湿定胶囊中毒藜碱限量测定[J].陕西中医,2007,28(9):1 232.
- [13] 戚宝婵,康强,李子,等.HPLC法测定养阴清肺丸中芍药苷的含量[J].中国药房,2012,23(32):3 053.
- [14] 许亚玲,罗曼,周兰,等.RP-HPLC法测定小建中片中桂皮醛的含量[J].中国药房,2012,23(32):3 044.
- [15] 王其勇,许亚玲,钟宏波.八角枫不同药用部位的高效液相指纹图谱测定[J].贵州农业科学,2015,43(2):133.

(收稿日期:2015-10-29 修回日期:2016-07-07)

(编辑:刘 柳)