

# 附子中新乌头碱的含量测定

贾金艳, 彭小冰, 沈洲卿, 杨卫平\*  
(贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002)

**摘要:**目的 建立以高效液相色谱法测定附子中新乌头碱含量的方法。方法 采用 Welchrom - C<sub>18</sub>色谱柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 以甲醇 - 水 - 三乙胺 (75: 25: 0.033) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 233 nm, 柱温为 30℃。结果 新乌头碱在 0.046 4~0.324 8 μg 范围内呈良好线性关系,  $r=0.999\ 9$ , 平均回收率为 100.7%,  $RSD=2.19\%$ 。结论 该方法操作简便、准确、重复性好, 可用于附子中新乌头碱的含量测定。

**关键词:** 附子; 新乌头碱; 高效液相色谱法

**中图分类号:** R284.2    **文献标识码:** B    **文章编号:** 1008-0805(2010)05-1102-01

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum camichaeli* Debx 子根的加工品, 具有回阳救逆、补火助阳、逐风寒湿邪的功效<sup>[1]</sup>。附子的主要成分是乌头类生物碱, 可分为单酯类、双酯类和胺基醇类生物碱。其中以双酯型类生物碱如乌头碱、次乌头碱、新乌头碱成分毒性较大, 但又同时是附子的药性成分。历代医家都非常重视附子的毒性及其用量<sup>[2]</sup>。为保证用药的安全性, 本文在参考有关文献的基础上<sup>[3-4]</sup>, 对附子生品中的新乌头碱进行含量测定, 希望能够为其在质量控制方面提供一定的依据。

**1 仪器与试剂**

**1.1 仪器** 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, HS10260D 超声洗洁器, XS205 电子天平 (十万分之一), JN1003 电子天平 (千分之一)。

**1.2 试剂** 新乌头碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 110799-200404); 甲醇为色谱纯; 三乙胺、乙醚为分析纯; 盐酸、氨水; 纯净水。

**2 方法与结果**

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Welchrom - C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相为甲醇 - 水 - 三乙胺 (75: 25: 0.033); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 233 nm; 柱温: 30℃。进样量: 5 μL 在该色谱条件下, 新乌头碱与杂峰分离良好。结果见图 1~2。

**2.2 溶液的配制**

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取新乌头碱对照品适量, 配制成 0.116 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 再精密吸取此对照品溶液, 0.408、1.216、2.024、2.832 mL 分别定容于 5 mL 容量瓶中。

**2.2.2 样品溶液的制备** 精密称取生附子粉末 (40 目) 约 1.4 g 置于具塞三角锥形瓶中, 加入浓氨水 2 mL 浸润 0.5 h 再加 75 mL 乙醚摇匀, 放置过夜, 超声 (功率 500 W, 工作频率 40 kHz) 提取 15 min 过滤, 再以 25 mL 乙醚分次洗涤药渣, 过滤, 合并滤液和洗液, 45℃ 水浴挥干, 0.037% 盐酸甲醇溶液溶解残渣, 并定容至 25 mL 摇匀, 临用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试样品溶液。

**2.3 标准曲线的绘制** 取“2.2.1”项下制得的对照品溶液, 均进样 5 μL 在 233 nm 处检测, 以峰面积值 (A) 对进样量 (C) 进行线性回归, 得回归方程为:  $A=8\ 625\ 582\ C-142\ 311\ 5$ ,  $r=0.999\ 9$  ( $n=7$ ), 结果表明, 在 0.046 4~0.324 8 μg 范围内新乌头碱峰面积与进样量呈良好的线性关系。

**2.4 精密度实验** 精密吸取同一供试样品溶液 5 μL 注入高效液相色谱仪, 重复进样 6 次, 测得新乌头碱的峰面积,  $RSD=$

1.52%。结果表明仪器精密度良好。

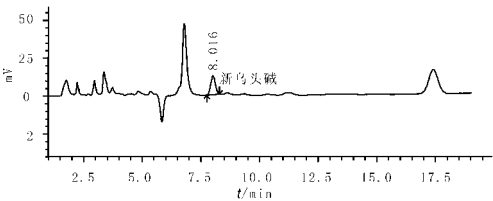


图 1 附子样品 HPLC 图

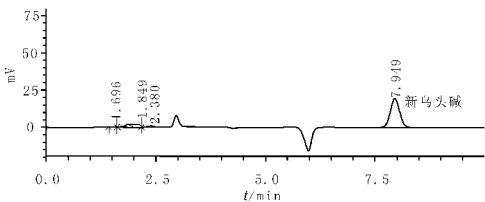


图 2 新乌头碱对照品 HPLC 图

**2.5 稳定性实验** 精密吸取放置 0、2、4、6、8 h 的样品溶液 5 μL 分别注入高效液相色谱仪, 测得相应的峰面积,  $RSD=2.19\%$ 。结果表明, 供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

**2.6 重复性实验** 精密称取同一药材 6 份按“2.2.2”项下供试品的制备方法制备, 分别吸取上述样品溶液 5 μL 注入高效液相色谱仪, 测其峰面积并计算含量,  $RSD=2.06\%$ 。

**2.7 加样回收率实验** 精密称取已知含量样品 (约 0.7g) 9 份, 分别精密加入新乌头碱对照品溶液适量使其中新乌头碱含量为样品中新乌头碱含量的 80% (3 份)、100% (3 份)、120% (3 份)。按“2.2.2”项制备, 按上述色谱条件测定, 并计算新乌头碱含量及  $RSD$  值。结果见表 1。

表 1 回收率实验结果

| 重量<br><i>m</i> / g | 样品中新乌<br>头碱含量 <i>m</i> / mg | 对照品量<br><i>m</i> / mg | 测得量<br><i>m</i> / mg | 回收率<br>(%) | 平均回率<br>(%) | <i>RSD</i><br>(%) |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------|------------|-------------|-------------------|
| 0.706              | 0.2416                      | 0.19                  | 0.4370               | 102.8      |             |                   |
| 0.699              | 0.2392                      | 0.19                  | 0.4281               | 99.4       | 100.4       | 2.05              |
| 0.700              | 0.2395                      | 0.19                  | 0.4278               | 99.1       |             |                   |
| 0.705              | 0.2412                      | 0.24                  | 0.4882               | 102.9      |             |                   |
| 0.702              | 0.2402                      | 0.24                  | 0.4762               | 98.3       | 101.1       | 2.18              |
| 0.706              | 0.2416                      | 0.24                  | 0.4868               | 102.2      |             |                   |
| 0.707              | 0.2419                      | 0.29                  | 0.5387               | 102.3      |             |                   |
| 0.694              | 0.2375                      | 0.29                  | 0.5217               | 98.0       | 100.7       | 2.34              |
| 0.706              | 0.2416                      | 0.29                  | 0.5367               | 101.8      |             |                   |
| <i>n</i> = 9       |                             |                       |                      |            |             |                   |

**2.8 样品含量测定** 对生附子、白附片、黑附子 3 种药材分别按“样品溶液的制备”方法处理, 依法测定。结果见表 2。

收稿日期: 2009-05-22    修订日期: 2009-09-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划课题 (NaCB512606)

作者简介: 贾金艳 (1982-), 女 (汉族), 河北唐山人, 现为贵阳中医学院在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事中药质量控制与新药研发工作。

\* 通讯作者简介: 杨卫平 (1956-), 女 (汉族), 贵州贵阳人, 现任贵阳中医学院教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药学研究工作。

| 表 2 样品含量测定结果 |     |      |                          |
|--------------|-----|------|--------------------------|
| 编号           | 品名  | 产地   | 平均含量 /mg·g <sup>-1</sup> |
| 1            | 生附子 | 四川江油 | 0.342 2                  |
| 2            | 白附片 | 四川   | 0.017 04                 |
| 3            | 黑附子 | 四川   | 0.004 131                |

3 讨论

通过对 3 种不同炮制方法所制成的附子中新乌头碱的含量测定可知,不同炮制方法的附子中新乌头碱的含量差别较大,其中生附子中新乌头碱的含量较高。

本实验中曾进行了流动相系统的优化研究,比较了乙腈-0.03% 乙二胺(46:54),乙腈-0.03% 乙二胺(40:60),乙腈-0.03% 乙二胺(42:58),乙腈-0.2% 冰醋酸<三乙胺调 pH6.25>(37:63),甲醇-水-三乙胺(70:30:0.1),甲醇-水-三乙胺(70:30:0.04),甲醇-水-三乙胺(90:10:0.04),甲醇-水-三乙胺(80:20:0.08),甲醇-水-三乙胺(75:25:0.1),甲醇-水-三乙胺(72:28:0.037),甲醇-水-三乙胺(74:26:0.035),甲醇-水-三乙胺(75:25:0.033)等流动相系统的出峰效果,以最后一种对新乌头碱的检测效果最佳,在此色谱条件下,新乌头碱与杂峰分离良好、峰形亦佳,故选用此流动相。

在样品的提取方法上,我们对直接超声提取及放置过夜后超声提取两种提取方法的提取效果进行了对比研究,结果发现放置过夜后超声提取对新乌头碱的提取率最高,且通过加样回收率实

验说明放置过夜后超声提取方法对新乌头碱的提取可靠,同时,发现超声提取时间对新乌头碱的含量有显著影响。以超声 15 min 的提取率最高(再增加提取时间其含量无明显升高,故选 15 min)。

在定容溶剂的考察上,我们分别对二氯甲烷和盐酸-甲醇溶液的效果进行了对比研究,结果发现用盐酸-甲醇溶液定容时供试液的稳定性较好。对于盐酸-甲醇溶液的浓度,查文献资料及试验验证后,采用 0.037%。

采用高效液相色谱法测定附子中新乌头碱的含量此方法具有简便、可靠、重现性较好的优点。但由于采用手动进样器,且无在线脱气系统,其结果容易受流动相、空气湿度、温度、操作人等诸多因素影响。因此应注意高效液相色谱的规范化操作,保证实验测定的准确性和稳定性。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典, 1部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 132

[2] 江京莉, 周远鹏. 附子的药理作用和毒性[J]. 中成药, 1991, 13(12): 37

[3] 王 瑞, 刘 芳, 孙毅坤, 等. 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] 边宝林, 司 南, 王宏洁, 等. 附子单煎以及与浙贝母合煎后乌头碱、次乌头碱、新乌头碱含量等有毒成分的含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006 12(4): 9

丹参对糖尿病肾病大鼠肾脏水通道蛋白-2表达的影响

胡 波<sup>1</sup>, 范红伟<sup>2</sup>, 王燕午<sup>3</sup>, 陈冰雪<sup>1</sup>, 王振国<sup>3</sup>, 李俊勇<sup>1</sup>, 李 锋<sup>4\*</sup>

(1. 中国人民解放军白求恩医学院, 河北 石家庄 050081; 2. 河北省石家庄市第四医院 050011;  
3. 中国人民解放军第 260 医院, 河北 石家庄 050041;  
4. 中国人民解放军第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032)

**摘要:**目的 探讨肾脏水通道蛋白-2(AQP-2)的表达与糖尿病肾病大鼠尿液代谢异常及丹参防治作用的机制。方法 60只健康 SD 大鼠分为正常组(10只), 剩余 50只采用高糖高脂饲料刺激加小剂量 STZ 诱导糖尿病大鼠模型成功 30只, 随机分为模型组、对照组、观察组 每组各 10只; 免疫组织化学检测 AQP-2 在各组大鼠肾脏中的分布及蛋白质的表达; RT-PCR 方法检测各组大鼠 AQP-2 mRNA 的表达, 并以  $\beta$ -actin 相对定量。结果 肾脏免疫组化显示, AQP-2 主要在肾脏的集合管表达。在 4 组动物的肾脏 AQP-2 蛋白质[相对阳性面积: 正常组(0.119±0.035), 模型组(0.188±0.027), 对照组(0.158±0.036), 观察组(0.154±0.033)]和 mRNA[正常组(0.51±0.004), 模型组(0.81±0.059), 对照组(0.78±0.090), 观察组(0.70±0.027)]的表达上观察组较模型组均下调( $P<0.01$ )。结论 在糖尿病模型大鼠肾脏组织中 AQP-2 表达增多, AQP-2 的增多可能参与了糖尿病多尿的形成。丹参对水通道蛋白的表达有下调作用, 这可能是其利尿作用的机制, 也是其防治糖尿病肾病的基础。

**关键词:** 糖尿病肾病; 水通道蛋白; 丹参; 链脲佐菌素

**中图分类号:** R284 **文献标识码:** B **文章编号:** 1008-0805(2010)05-1103-02

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最常见的微血管并发症,是糖尿病患者主要的死亡原因之一。DN 的基本病变是细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)在肾小球、肾小管积聚导致肾小球基底膜增厚和系膜基质增多,出现结节型与弥漫型肾小球硬化。本研究观察丹参对 STZ

实验性糖尿病大鼠 AQP-2 蛋白水平和基因水平的表达、尿蛋白排泄率的改变,旨在探讨 AQP-2 的表达改变与糖尿病肾病水液代谢异常的关系以及丹参的调节效应,为 DN 的预防、治疗提供实验依据。

1 材料

实验动物选用 4 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠[第四军医大学实验动物中心提供,合格证号: SCXK(军)2002-005] 60 只, 体重为(165±12.5)g, SPF 级饲养环境, 环境温度为 20~25℃, 12/12 h 昼夜规律, 按每笼 5 只喂养。

2 方法

2.1 动物分组及糖尿病模型的建立 随机将大鼠分为 2 组: 正常组 10 只; 糖尿病造模组(DM) 50 只; 正常组进食普通饲料。糖尿病模型组进食高糖高脂饲料, 即普通饲料中加入 10% 的猪油、

收稿日期: 2009-04-01 修订日期: 2009-10-09  
基金项目: 陕西省科技攻关项目 [Na 2005K10-G1(5)]  
作者简介: 胡 波 (1979-), 男 (汉族), 河北石家庄人, 现为白求恩医学院内科教研室讲师, 硕士学位, 主要从事糖尿病肾病研究工作。  
\* 通讯作者简介: 李 锋 (1963-), 男 (汉族), 陕西西安人, 现任第四军医大学西京医院中医科主任医师, 博士学位, 主要从事中药防治肾病研究工作。