

Determination of Hyoscyamine in Hindu Datura by RP-HPLC

Baoyi Xiong¹, Pengpeng Chen¹, Kun Xu², Ailing Hui¹, Zeyu Wu¹, Wencheng Zhang¹

¹Engineering Research Center of Bio-Process from Ministry of Education, School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei Anhui

²Anhui Dexinjia Biological Medicine Co. Ltd., Fuyang Anhui

Email: 1429439950@qq.com

Received: Apr. 16th, 2019; accepted: Apr. 30th, 2019; published: May 9th, 2019

Abstract

Objective: A method for the rapid determination of the content of hyoscyamine in Hindu datura was established by high-phase liquid chromatography. **Method:** SGE protecol C18 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm) column was used with acetonitrile-0.03 mol/L ammonium acetate solution (1:4, v/v) as mobile phase. Ammonium acetate solution contained triethylamine (0.02%), tetrahydrofuran (0.3%), and adjusted to pH = 6 by adding acetic acid. The detection wavelength was 216 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30°C, and the injection volume was 20 μ L. **Results:** The concentration of hyoscyamine in the range of 62.5 μ g/mL~1000 μ g/mL showed a good linear relationship with the peak area, and the correlation coefficient was R = 0.998. The method significantly shortened the retention time of hyoscyamine, and the RSD of precision, stability and repeatability were all <2.0%, the average recovery rate was 98.97%, and the RSD was 0.39%. **Conclusion:** The method is accurate and reproducible, and can be used for rapid determination of the content of hyoscyamine in Hindu datura.

Keywords

RP-HPLC, Hindu Datura, Hyoscyamine, Content Determination

RP-HPLC法测定洋金花中莨菪碱的含量

熊宝仪¹, 陈朋朋¹, 许 坤², 惠爱玲¹, 吴泽宇¹, 张文成¹

¹合肥工业大学食品与生物工程学院、农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥

²安徽德信佳生物医药有限公司, 安徽 阜阳

Email: 1429439950@qq.com

收稿日期: 2019年4月16日; 录用日期: 2019年4月30日; 发布日期: 2019年5月9日

摘要

目的: 通过高相液相色谱法建立一种快速测定洋金花中莨菪碱含量的方法。方法: 采用SGE protecol C18 (5 μm , 4.6 \times 250 mm)色谱柱, 以乙腈-0.03 mol/L醋酸铵溶液(1:4, v/v)为流动相, 其中醋酸铵溶液中含有三乙胺(0.02%), 四氢呋喃(0.3%), 加入乙酸调pH = 6, 检测波长为216 nm, 流速1.0 mL/min, 柱温30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量20 μL 。结果: 洋金花中莨菪碱的浓度在62.5 $\mu\text{g/mL}$ ~1000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积呈现良好的线性关系, 相关系数R = 0.998, 该方法显著缩短莨菪碱的保留时间, 并且精密度、稳定性、重复性的RSD均<2.0%, 平均加样回收率为98.97%, RSD为0.39%。结论: 本方法准确, 重复性好, 能够用于洋金花中莨菪碱含量的快速测定。

关键词

RP-HPLC, 洋金花, 莨菪碱, 含量测定

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

洋金花为茄科植物白花曼陀罗(*Datura metel* L.)的干燥花, 又名曼陀罗花、闹洋金等[1]。现代医学研究表明洋金花具有平喘止咳、解痉止痛等药用价值和功效[2], 在中医药学中被广泛应用。莨菪碱, 又称天仙子碱, 是洋金花中主要的活性成分之一, 其结构与东莨菪碱(见图1)极其相似, 两者均有解痉、散瞳、抗胆碱、镇痛、镇静等功能[3]。

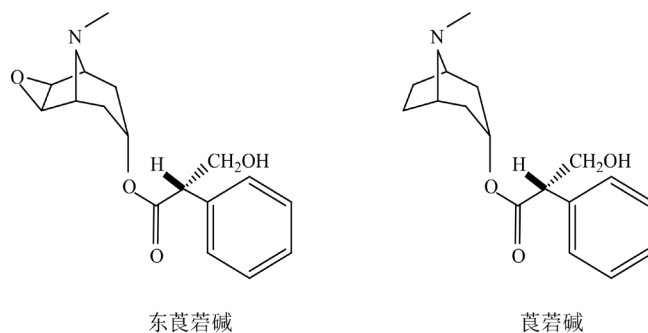


Figure 1. The chemical structures of scopolamine and hyoscyamine

图1. 东莨菪碱与莨菪碱的化学结构式

高效液相色谱法因其分析速度快、高灵敏度等优良特性, 在测定目标物质含量方面受到广泛青睐[4]。目前的研究中有关莨菪碱的定量测定以 HPLC 法为主, 马相锋等[5]对洋金花中莨菪碱含量的测定采用 CAPCELL PAK C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 以 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(含 0.0025 mol/L 庚烷磺酸钠)-乙腈(84:16) (调节 pH 至 5.00)为流动相, 结果显示, 样品中莨菪碱的保留时间较长, 约为 31.87 min。李岩等[6]的研究中, 以乙腈-0.1%三氟乙酸水(14:86)为流动相检测天仙子药材中莨菪碱含量, 其保留时间也较长, 约为 21 min。

本研究以乙腈-0.03 mol/L 醋酸铵溶液(1:4, v/v)为流动相对洋金花中莨菪碱含量进行测定, 结果表明莨菪碱的分离效果较好, 其保留时间约为 8 min。本方法有效地缩短了分析时间, 为洋金花的质量控制提供科学依据。

2. 仪器与材料

主要仪器: 高相液相色谱仪(Agilent1260, 美国安捷伦公司), 中药粉碎机(ML-800, 苏州摩菱机械设备有限公司), 真空干燥箱(DZF-6050, 上海一恒科学仪器有限公司)。

主要材料: 洋金花(安徽德信佳生物医药有限公司洋金花种植基地); 莨菪碱标准品(纯度 > 98%, 由安徽德信佳生物医药有限公司提供); 除乙腈为色谱纯外, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

3. 试验方法

3.1. 色谱条件

流动相为乙腈-30 mmol/L 醋酸铵溶液(含 0.02%三乙胺, 0.3%四氢呋喃, 用冰醋酸调节 pH 值至 6.0) (1/4, V/V), 检测波长为 216 nm, 色谱柱: SGE protocol C18 (5 μm , 4.6 \times 250 mm), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL [7]。

3.2. 样品溶液的制备

精密称取从洋金花中提取的莨菪碱 0.1 g 于 50 mL 容量瓶中, 加色谱级甲醇定容至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL 溶液于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得供试品溶液。

3.3. 标准品溶液的制备

精密称取 25 mg 莨菪碱标准品至 25 mL 容量瓶中, 用色谱级乙腈定容, 震荡摇匀直到全部溶解, 即得 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的莨菪碱标准品溶液。

3.4. 线性关系考察

以 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的莨菪碱标准液贮备液为母液, 进行等倍梯度稀释, 得到质量浓度分别为 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 的莨菪碱标准溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜处理后, 依照上述色谱条件依次进样, 以峰面积值 Y 为纵坐标, 以质量浓度值 X 为横坐标, 绘制标准曲线, 得到莨菪碱标准品的线性回归方程。

3.5. 精密度实验

精密量取 3.3 项下莨菪碱质量浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液, 按照上述色谱条件连续进样 6 次, 每次进样 20 μL 。计算峰面积的 RSD 值。

3.6. 稳定性试验

精密称取 1 g 干燥的洋金花干粉, 按 3.2 项下的方法制备样品溶液, 分别在室温下放置 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 后, 在上述色谱条件下依次进样检测, 每次进样 20 μL 。计算样品溶液中莨菪碱的含量并求 RSD 值。

3.7. 重复性试验

精密称取 6 份 1 g 干燥的洋金花干粉, 按 3.2 项下的方法制备样品溶液, 在上述色谱条件下依次进样检测, 每次进样 20 μL 。计算样品溶液中莨菪碱的含量并求 RSD 值。

3.8. 加样回收率试验

精密称取 6 份 1 g 干燥的洋金花干粉, 按 3.2 项下的方法制备样品溶液, 测定每份中莨菪碱的含量, 然后在每份样品中分别加入适量的莨菪碱标准品(将标准品配制成一定浓度溶液, 按照添加量加入合适的体积), 按照上述色谱条件依次进样检测, 每次进样 20 μL 。计算样品溶液中莨菪碱的含量并求 RSD 值。

4. 实验结果

4.1. 莨菪碱标准曲线

按照上述色谱条件, 分别测定各个浓度下的标准品溶液, 将所得数据分析处理, 绘制出如图 2 所示的莨菪碱标准曲线, 其线性回归方程: $Y = 16.618 X - 19.799$, $R^2 = 0.9996$ 。

由图 2 可知, 莨菪碱在 62.5 $\mu\text{g/mL}$ ~1000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系。在此色谱条件下莨菪碱的出峰时间约为 8 min, 拖尾因子 $T = 0.981$, 峰形良好。莨菪碱标准品色谱图如图 3 所示。

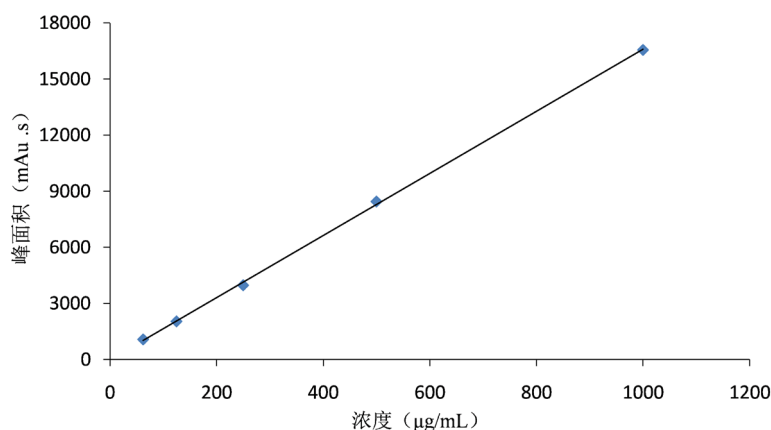


Figure 2. Standard curve of hyoscyamine
图 2. 莨菪碱标准曲线图

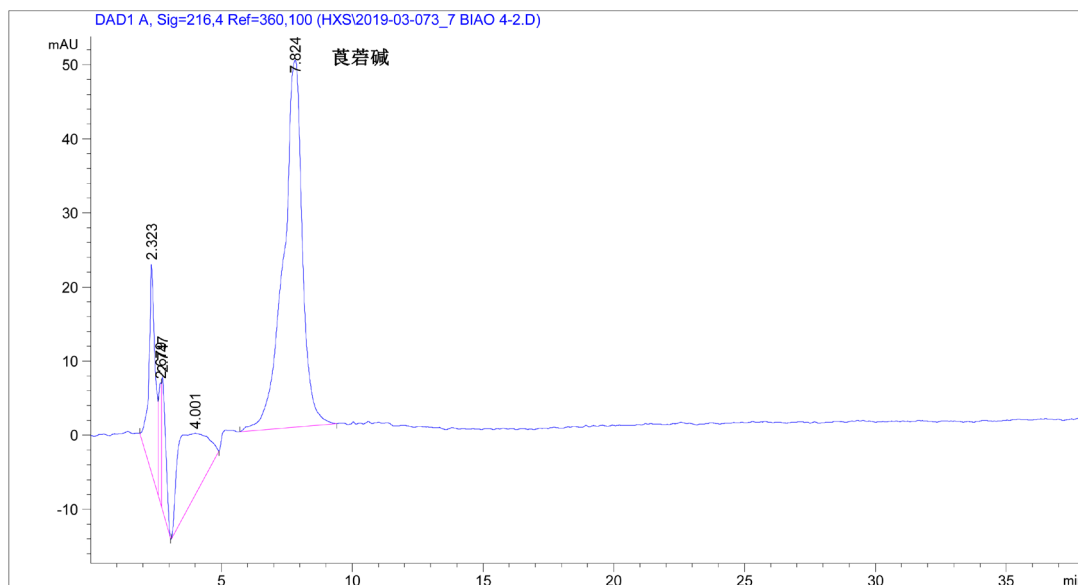


Figure 3. Standard chromatogram of hyoscyamine
图 3. 莨菪碱标准色谱图

4.2. 精密度、稳定性、重复性、加样回收试验结果

在精密度试验中莨菪碱峰面积的 RSD 值为 0.50%，表明仪器精密度良好；在稳定性试验中莨菪碱含量的 RSD 值为 1.82%，表明样品溶液在 24 h 内稳定；在重复性试验中莨菪碱含量的 RSD 值为 1.93%，表明该方法重复性良好；加样回收试验结果见表 1，莨菪碱回收率为 98.97%，RSD 为 0.39% (n = 6)，表明回收率满足测定要求。

Table 1. Results of recovery rate of hyoscyamine

表 1. 莨菪碱的加样回收率考察结果

样品量/g	样品中莨菪碱含量/mg	莨菪碱加入量/mg	莨菪碱测得量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
1.021	0.380	0.200	0.578	99.66		
1.043	0.390	0.200	0.583	98.81		
1.013	0.375	0.200	0.570	99.13	98.97	0.39
1.006	0.370	0.200	0.562	98.60		
1.066	0.398	0.200	0.590	98.66		
1.008	0.371	0.200	0.565	98.95		

5. 结论

本研究基于高相液相色谱法建立一种快速测定洋金花中莨菪碱含量的方法，并通过方法学验证，实验结果表明，莨菪碱的保留时间约为 8 min，其分离效果良好，精密度、稳定性、重复性和回收率均符合要求，可用于洋金花中莨菪碱含量的快速测定。

基金项目

2016 年安徽省科技重大专项项目(16030801111)。

参考文献

- [1] 井佳楠, 吕邵娃, 王秋红, 等. 洋金花化学成分和药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(19): 3513-3521.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [3] 付传香. 洋金花中东莨菪碱的提取分离及其旋光稳定性的研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
- [4] 付晖, 单伟光, 粟晓黎, 等. 有毒中药洋金花研究近况及检测方法补充报道[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(10): 1822-1834.
- [5] 马相锋, 吴人杰, 张扬, 林斌, 李洪玉. RP-HPLC 法同时测定洋金花中东莨菪碱和阿托品的含量[J]. 现代医院, 2011, 11(6): 5-7.
- [6] 李岩, 孟庆勇, 赵欣, 孙婷, 李晓静, 程雪梅, 王长虹. HPLC 法测定天仙子东莨菪碱和莨菪碱的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(1): 64-66.
- [7] 李红红, 陈朋朋, 付传香, 等. HPLC 法同步测定洋金花中东莨菪碱和莨菪碱的含量[J]. 安徽化工, 2018, 44(5): 92-94.