

HPLC同时测定成药中 4种乌头类生物碱含量^{*}

刘岚, 范智超, 张志琪^{**}

(陕西师范大学药用植物资源与天然产物化学教育部重点实验室, 西安 710062)

摘要 目的: 建立一种同时测定含有乌头属药材的成药中乌头类生物碱宋果灵、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱含量的 HPLC 方法。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水-氯仿-三乙胺 (70: 30: 1: 0.15) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温为室温 (25 °C), 检测波长 234 nm。结果: 宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的线性范围分别为 0.1~1.5 μg ($r=0.9996$), 0.1~2.0 μg ($r=0.9995$), 0.1~3.0 μg ($r=0.9996$), 0.1~2.5 μg ($r=0.9997$)。本法应用于中成药万通筋骨片、附子理中丸、藏药安神丸和蒙药嘎日迪五味丸中 4 种乌头类生物碱的同时测定, 宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的平均回收率分别为 95.7%~105.2%, 96.0%~102.1%, 93.7%~99.2%, 96.8%~99.2%; RSD 分别为 1.4%~2.3%, 1.0%~1.8%, 0.85%~2.2%, 0.82%~1.4%。结论: 本法简便、快速、准确, 灵敏度高, 可为含有乌头属药材的成药药品质量控制提供参考标准。

关键词: 宋果灵; 新乌头碱; 乌头碱; 次乌头碱; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2010)02-0236-04

HPLC simultaneous determination of four aconitine alkaloids in patent medicine^{*}

LU Lan, FAN Zhi-chao, ZHANG Zhi-qi^{**}

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry,

Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of aconitine alkaloids in patent medicine contained *Aconitum* L. herbal drugs. **Method** The separation was performed on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and methanol-water-chloroform-triethylamine (70: 30: 1: 0.15) as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. UV detection was set at 234 nm and column temperature was room temperature (25 °C). **Results** The standard calibration curves of songorine, mesaconitine, aconitine and hypaconitine were linear in the ranges of 0.1~1.5 μg ($r=0.9996$), 0.1~2.0 μg ($r=0.9995$), 0.1~3.0 μg ($r=0.9996$) and 0.1~2.5 μg ($r=0.9997$), respectively. This method was applied to simultaneous determination of four aconitine alkaloids in Wantongjingu tablets and Fuzilzhong pills as Chinese patent medicine, Anshen pills as Sitsang medicine and Gariduwuwei pills as Mongolia medicine. The average recoveries of method in the four patent medicines were 95.7%~105.2%, 96.0%~102.1%, 93.7%~99.2% and 96.8%~99.2%, and RSD were 1.4%~2.3%, 1.0%~1.8%, 0.85%~2.2% and 0.82%~1.4%, respectively. **Conclusion** This method is simple, quick, accurate and with high sensitivity. It provides a reference standard for the quality control of patent medicine contained *Aconitum* L. herbal drugs.

Key words songorine, mesaconitine, aconitine, hypaconitine, HPLC

川乌、草乌、附子、铁棒锤、雪上一枝蒿等乌头属药材具有抗炎、抗肿瘤、麻醉止痛、免疫调节、调节心血管系统及其他作用^[1,2], 常作为君药药味用于中

(藏、蒙)药制剂中。乌头属药材的主要成分是二萜类生物碱, 包括乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、宋果灵等, 它们既是活性成分又是剧毒成分^[1,3,4], 人口服

* 国家自然科学基金资助项目 (20575039); 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20050718011)

** 通讯作者 Tel (029) 28530393; E-mail: zqzhang@snnu.edu.cn

0.2 mg 乌头碱即可出现中毒症状,因此含有乌头属药材的成药制剂质量控制显得尤为重要。采用高效液相色谱法测定乌头类生物碱的方法虽有不少报道^[5-9],但大多是测定单一成分或某一制剂的测定,同时测定几种成药中 4 种乌头类生物碱含量的方法未见报道。本文为含有乌头属药材的成药药物品质评价及临床安全用药提供了科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (包括 1525 二元梯度泵、7725 进样器、Waters 柱温箱、PDA2996 二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站)。

对照品乌头碱 (110720-200410)、新乌头碱 (110799-200404) 和次乌头碱 (798-9403) 购于中国药品生物制品检定所; 宋果灵自铁牛七 (*Aconitum szechenyianum* Gay.) 药材中提取分离, 经元素分析, R、TOF-MS、¹H NMR、¹³C NMR、DEPT 谱及 X-ray 晶体衍射分析表征鉴定, 纯度大于 99%。

万通筋骨片 (规格: 基片重 0.28 g)、附子理中丸 (规格: 每丸重 9 g)、安神丸 (规格: 每丸重 0.3 g)、嘎日迪五味丸 (规格: 每 10 粒重 1 g) 均为市售品。

甲醇为 Fisher 色谱纯; 氯仿、二氯甲烷、三乙胺为分析纯, 购于西安化学试剂厂; 水为 Millipore 超纯水。

2 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 大连依利特分析仪器有限公司; 流动相: 甲醇-水-氯仿-三乙胺 (70: 30: 1: 0.15); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 234 nm; 柱温: 室温 (25 °C)。

3 溶液制备

3.1 供试品溶液 将药品除去包衣, 研磨成粉, 准确称取 1.0 g 置于具塞试管中, 加入氨水 0.4 mL 润湿, 摇匀, 加乙醚 10 mL 冷浸 18 h 抽滤, 残渣用 15 mL 乙醚分 3 次洗涤, 合并乙醚液, 低温旋转蒸发至干, 残渣用 1.0 mL 二氯甲烷溶解, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得万通筋骨片、附子理中丸和嘎日迪五味丸的供试品溶液; 安神丸滤液再以二氯甲烷稀释 5 倍为安神丸供试品溶液。

3.2 阴性样品溶液 按万通筋骨片处方, 制成缺制川乌和制草乌的模拟制剂, 按供试品溶液的制备方法同法制成阴性样品溶液。

3.3 系列混合对照品溶液 精密称取对照品宋果灵、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱各 10 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加二氯甲烷溶解定容至刻度, 配制成分

有各化合物均为 1.0 μg·μL⁻¹ 的混合对照品储备液, 备用。分别精密量取混合对照品储备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度分别为 0.01、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 μg·μL⁻¹ 的系列混合对照品溶液。

4 方法学考察

4.1 线性范围考察 分别精密吸取系列混合对照品溶液各 10 μL, 在上述色谱条件下进样测定, 色谱图见图 1-A。以峰面积为纵坐标, 进样量 (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得宋果灵、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的回归方程分别为:

$$Y = 2.277 \times 10^5 X + 2.283 \times 10^4 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 2.562 \times 10^6 X + 5.639 \times 10^5 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 3.104 \times 10^6 X + 6.542 \times 10^5 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 2.047 \times 10^6 X + 4.453 \times 10^5 \quad r = 0.9997$$

宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的检测限分别为 0.05、0.02、0.03、0.04 μg, 线性范围分别为 0.1 ~ 1.5、0.1 ~ 2.0、0.1 ~ 3.0、0.1 ~ 2.5 μg。

4.2 精密度试验 精密吸取浓度为 0.10 μg·μL⁻¹ 的混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 5 次, 宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的峰面积平均值 ($n = 5$) 的 RSD 分别为 1.7%、1.6%、0.62%、1.0%。

4.3 重复性试验 精密称取样品粉末 3 份, 按“3.1”项下方法操作, 进样 10 μL 测定 ($n = 3$)。结果嘎日迪五味丸中宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的平均含量分别为: 1.043、0.166、0.196、0.006 mg·g⁻¹; RSD 分别为 0.72%、1.2%、0.88%、2.6%。表明本法具有较好的重复性。

4.4 稳定性试验 在本试验条件下, 取同一供试品溶液分别在室温放置不同时间 (0.3、6、12 h) 同法测定。结果 ($n = 4$) 安神丸中宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的峰面积平均值的 RSD 分别为 0.91%、1.0%、0.76%、0.006; 万通筋骨片中宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的峰面积平均值的 RSD 分别为 0.63%、0.73%、0.53%、0.41%; 附子理中丸中宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的峰面积平均值的 RSD 分别为 0.93%、1.12%、1.1%; 嘎日迪五味丸中宋果灵、新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的峰面积平均值的 RSD 分别为 0.79%、0.81%、0.51%、0.97%。结果表明, 4 种样品的供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

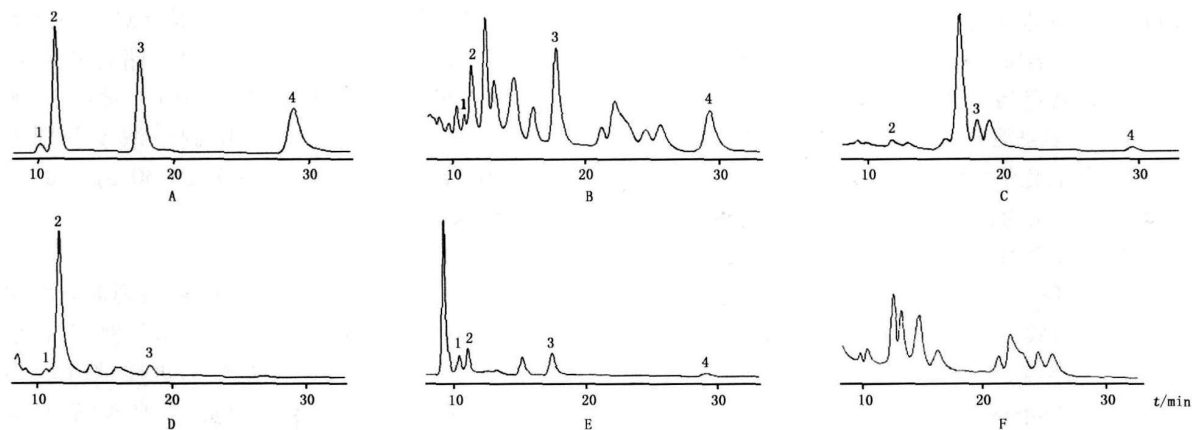


图 1 对照品 (A)、万通筋骨片 (B)、附子理中丸 (C)、安神丸 (D)、嘎日迪五味丸 (E) 和阴性样品 (F) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of chemical reference substances (A), W antongjingu tablets (B), Fuzilizhong pills (C), Anshen pills (D), Garidiwuwei pills (E) and negative control sample (F)

1 宋果灵 (songorine) 2 新乌头碱 (mesaconitine) 3 乌头碱 (aconitine) 4 次乌头 (hypaconitine)

5 样品测定

精密吸取各供试品溶液 10 μL 分别进样测定,

色谱图见图 1-B, C, D, E。按外标法以峰面积计算其含量, 结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{RSD} < 3\%$, $n = 3$)

Tab 1 Determination results of samples ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{RSD} < 3\%$, $n = 3$)

样品 (samples)	宋果灵 (songorine)	新乌头碱 (mesaconitine)	乌头碱 (aconitine)	次乌头碱 (hypaconitine)
万通筋骨片 (W antongjingu tablets)	0.511	0.173	0.312	0.224
附子理中丸 (Fuzilizhong pills)	未检出 (not detected)	0.011	0.173	0.001
安神丸 (Anshen pills)	0.635	3.255	0.155	未检出 (not detected)
嘎日迪五味丸 (Garidiwuwei pills)	1.043	0.166	0.196	0.006

6 加样回收率试验

准确称取已测知含量的样品适量, 加入浓度为 $0.40 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液 1.0 mL (即 0.4

mg), 按“3.1”项下方法操作处理, 取 10 μL 进样分析, 结果见表 2。

表 2 回收率实验 ($n = 3$)

Tab 2 The recovery test

样品 (sample)	宋果灵 (songorine)		新乌头碱 (mesaconitine)		乌头碱 (aconitine)		次乌头碱 (hypaconitine)	
	回收率 (recovery) %	RSD %	回收率 (recovery) %	RSD %	回收率 (recovery) %	RSD %	回收率 (recovery) %	RSD %
万通筋骨片 (W antongjingu tablets)	105.2	1.9	100.4	1.8	99.2	0.96	96.8	1.4
附子理中丸 (Fuzilizhong pills)	95.7	1.4	102.1	1.4	93.7	2.2	96.8	0.87
安神丸 (Anshen pills)	102.1	2.3	96.0	1.8	97.6	1.4	97.9	1.0
嘎日迪五味丸 (Garidiwuwei pills)	101.8	1.6	98.7	1.0	98.7	0.85	99.2	0.62

7 讨论与小结

7.1 提取条件的选择 中药成分的提取多采用煎煮法、有机溶剂加热回流提取法、冷浸渗漉法。曾采用 6 倍量酸性乙醇溶液 [无水乙醇 - pH 3.0 醋酸 (85:15 v/v)] 回流提取 1 h, 共提 3 次^[10], 结果表明该法对成药中的生物碱提取不完全, 且操作较烦琐。参阅一些文献后改用乙醚浸提, 提取时间分别

采用 16, 18, 24 h, 发现浸提 16 h 效果较差, 24 h 与 18 h 相当, 因此选择浸提 18 h。由于乙醚挥发性较强, 故应选用具塞大试管做提取容器, 以减小提取时溶剂损失造成的误差。

7.2 流动相的选择 曾选用乙腈 - $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 9.5 的碳酸氢铵缓冲液进行线性梯度洗脱^[10], 但该方法不能对成药中的二萜类生物碱进行很好的

分离,而且测定耗时;也曾试过甲醇-水-氯仿-二乙胺(70:30:2:0.5)^[11],结果只对附子理中丸有较好的分离效果;后又采用甲醇-水-氯仿-三乙胺(70:30:1:0.1)^[12],结果色谱峰拖尾较严重;最后选定甲醇-水-氯仿-三乙胺(70:30:1:0.15)做流动相,分离效果较好。因流动相为碱性溶剂,对十八烷基键合固定相有一定的破坏性,所以每次测试完毕后,须用水和甲醇将色谱柱和泵等系统冲洗干净。

7.3 测定波长的选择 文献报道^[8,9,11]乌头类生物碱在230~240 nm下有较大吸收,经对比发现234 nm下测定效果最佳,基线也较稳定,因此选择该波长下进行检测。

7.4 溶剂的选择 经对甲醇、乙醇、乙腈和二氯甲烷等溶剂试验,结果表明乌头碱在二氯甲烷中较稳定,与文献^[6,9,12]报道一致。因此本文选用二氯甲烷做定容溶剂。

参考文献

- 1 FU Hua-lin (符华林). General situation in studies on the medicinal plant of *Aconitum* L. of our country (我国乌头属药用植物的研究概况). *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27 (2): 149
- 2 SHEN Ying-jun (沈映君). Pharmacology of Chinese Traditional Medicine (中药药理学). Beijing (北京): People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 2000 382
- 3 LI Ya-ping (李娅萍), TIAN Song-jiu (田颂九), WANG Guo-rong (王国荣). General situation in study on chemical constituents and analytical methods of aconitine medicament (乌头类药物的化学成分及分析方法概况). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26 (10): 659
- 4 XU Ting-sheng (许廷生), LIANG Xiu-lan (梁秀兰), LU Zhuang (卢壮). Prevention and cure of the toxic aconitine medicament (乌头类药物中毒的防治). *Henan Tradit Chin Med* (河南中医), 2005 25 (6): 65
- 5 CHEN Li-yu (陈丽宇), DU Xiao-ying (杜小英), ZU Gui-ying (祖桂英). Determination of aconitine in *Haimabushenkoufuye* (海马补肾口服液)中乌头碱含量测定. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002 33 (2): 132
- 6 WU Xin (吴歆), WANG Bin (王斌). HPLC determination of hypaconitine in *Xinkang capsules* (HPLC法测定欣康胶囊中次乌头碱含量). *J Northwest Pharm* (西北药学杂志), 2006 21 (1): 11
- 7 YI Jin-hai (易进海), CHEN Yan (陈燕). Determination of ester-alkaloids in *Shiwuweiupeng capsules* by RP-HPLC (RP-HPLC测定十五味乳鹏胶囊中酯型生物碱的含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002 24 (8): 586
- 8 NE Jing (聂晶), TIAN Song-jiu (田颂九), HANG Tai-jun (杭太俊), et al HPLC separation and determination of aconitine alkaloids in *Kangfuxin capsules* (高效液相色谱法分离测定康复新胶囊中乌头类生物碱含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2001 21 (6): 421.
- 9 SUN Yi-kun (孙毅坤), ZHAO Hui-ping (赵惠萍), ZHOU Fu-rong (周富荣). HPLC determination of hypaconitine in *Fekang ointment* (HPLC测定肺康膏中次乌头碱的含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1999 21 (12): 626
- 10 KANG Xue-qin (康雪琴), FAN Zhi-chao (范智超), ZHANG Zhi-qi (张志琪). Study on the optimum extracting conditions of total alkaloids and aconitine in *Aconitum saxchenianum* Gay (铁牛七生物碱提取工艺研究). *J Chin Med Mater* (中药材), 2007, 30 (6): 715
- 11 ZHU Rui-long (朱瑞龙), JING Ming (景明), CHAI Guo-ling (柴国林), et al HPLC determination of aconitine alkaloids in *Fuzhizhongwan* (HPLC测定附子理中丸中双酯型乌头碱含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1996 18 (10): 13
- 12 BAI Wei (白炜), ZHOU Xue-mei (周雪梅), XU Hong (旭红), et al. Determination of aconitine in *Mongolia medicine Garidi-5* (蒙药嘎日迪-5中乌头碱的含量测定). *J China Folk Med* (中国民族民间医药杂志), 2000, 46: 300

(本文于2009年4月16日修改回)