

长在 334 nm 处,秦皮乙素在 344.4 nm 处。综合考虑发现在 344.4 nm 处秦皮甲素和秦皮乙素的峰形均较好且无干扰,故选取 344.4 nm 作为检测波长。

麝香酮是麝香的主要活性成分之一,在参考文献[11-13]方法的基础上,选用文中 GC 条件对麝香酮进行测定,结果较为理想。《中国药典》一部“麝香”项下药材所指为天然麝香且规定含麝香酮不能低于 2.0%。本制剂中所用麝香为人工麝香,经测定,其质量分数均值为 2.3%,符合药典要求。

实验结果表明,HPLC 法同时测定八味秦皮丸中秦皮甲素和秦皮乙素以及 GC 法测定八味秦皮丸中麝香酮的方法简便、准确、重现性良好,能够为本品的质量控制提供方法学基础。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 藏药第一册. 1995: 241.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:633-642.
- [3] 刘丽梅,陈琳,王瑞海,等. 秦皮化学成分的研究[J]. 中草药

2001,32(12):1073-1074.

- [4] 刘丽梅,王瑞海,陈琳,等. 秦皮化学成分的研究[J]. 中草药, 2003,34(10):889-890.
- [5] 方莲花,吕扬,杜冠华. 秦皮的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008,33(23):2732-2736.
- [6] 朱秀媛,徐桂芳,程雨时,等. 麝香的药理研究 II. 麝香及其有效成分的抗炎作用[J]. 药理学, 1988,23(6):406-410.
- [7] 孙荣,王任卿,于晓,等. 麝香的化学与药理研究进展[J]. 齐鲁药事, 2005,24(5):296-297.
- [8] 柳雪枚,李虹奇,肖宣,等. 天然麝香抗炎蛋白质的研究 I. Mu-a-1 的分离纯化及其部分性质的鉴定[J]. 动物学报, 1992,38(3):302-308.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:254.
- [10] 季申,王柯. HPLC 法测定秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素的含量[J]. 中成药, 1997,19(10):40-41.
- [11] 冉萍,喻强,罗佳. 气相色谱法测定小儿醒脑片中麝香酮的含量[J]. 儿科科学杂志, 2005,11(2):52-53.
- [12] 唐洪梅,黄樱华,李得堂,等. 气相色谱法测定人工麝香中麝香酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007,13(9):4-5.
- [13] 周锐,王辉. 气相色谱法测定麝香祛痛搽剂中麝香酮的研究[J]. 时珍国医国药, 2010,21(7):1813-1814.

HPLC 法测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱

李智勇¹, 邓亚利², 孙冬梅¹

(1. 广东省中医研究所 广东 广州 510095; 2. 华南农业大学制药工程系 广东 广州 510642)

摘要:目的 建立癌痛巴布剂(草乌、生天南星、赤芍、乳香、生姜,等)中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的定量测定方法。方法 色谱柱 Elipse CDB-C₁₈ (4.6mm×150mm 5μm)键合硅胶柱;流动相 乙腈-0.2%冰乙酸(加三乙胺调节 pH 值为 6.25) (29:71);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30℃;检测波长 235 nm。采用 HPLC 法测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱。结果 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱分别在进样量 53.6~321.6 ng、145.2~871.2 ng、326.4~1598.4 ng 范围内线性关系良好, *r* 均为 1,在 8 h 内稳定性良好。平均加样回收率分别为 99.26% (RSD 为 1.83%)、99.71% (RSD 为 1.52%)、97.82% (RSD 为 1.15%) (*n*=6)。结论 该方法准确、简便、快速,可以用于定量测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱。

关键词:癌痛巴布剂; HPLC; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱

中图分类号:R927.2

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2011)06-0988-04

Determination of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in Aitong Cataplasms by HPLC

LI Zhi-yong¹, DENG Ya-li², SUN Dong-mei¹

收稿日期:2010-12-44

基金项目:广东省中医药局建设中医药强省科研经费资助项目(2008220)

作者简介:李智勇(1977—),男,主管中药师,医学博士,主要从事中药制剂及质量标准研究工作。Tel: (020) 83501292, E-mail: aalyz@

163.com

(1. Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China; 2. The Pharmaceutical Engineering Department of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

ABSTRACT: AIM To develop an HPLC method for determining aconitine, mesaconitine and hypaconitine in Aitong Cataplast (Aconiti kusnezoffii Radix, Arisaematis Rhizoma, Paeoniae Radix rubra, Olibanum, Zingiberis Rhizoma recens, etc). **METHODS** HPLC was used for the determination of aconitine, mesaconitine and hypaconitine. The column was Elipse CDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm); the mobile phase was acetonitrile-0.2% acetic acid (29: 71) (adjusted by triethylamine pH value at 6.25); the detection wavelength was set at 235 nm; the flow rate was 1.0 mL/min. **RESULTS** Aconitine, mesaconitine and hypaconitine showed a good linear relationship in the ranges of 53.6-321.6 ng ($r=1$), 145.2-871.2 ng ($r=1$) and 326.4-1 598.4 ng ($r=1$), respectively, and their average recoveries were 99.26%, 99.71% and 97.82%, also with RSDs of 1.83%, 1.52%, 1.15% ($n=6$), respectively. **CONCLUSION** This method is accurate, simple, reliable and can be used for the determination of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in Aitong Cataplast.

KEY WORDS: Aitong Cataplast; HPLC; aconitine; mesaconitine; hypaconitine

癌痛巴布剂是在中医药“内病外治”理论的指导下,将传统中医药和现代经皮给药理论相结合而研发的一种治疗癌痛的中药复方经皮给药制剂。癌痛巴布剂由草乌、生天南星、赤芍、乳香、生姜等药物组成,原为广东省第二中医院临床实践应用于治疗各种恶性肿瘤所致疼痛的经验处方,具有温经通络、消瘤止痛的功效,主要用于寒凝经脉、瘀血阻滞引起的癌症疼痛。本实验采用 HPLC 同时测定癌痛巴布剂中君药草乌的主要有效成分乌头碱、次乌头碱、新乌头碱,为癌痛巴布剂的质量控制和保障临床用药安全提供参考依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国);VWD 检测器;电子天平 BP-211D (Sartorius 德国)。癌痛巴布剂(批号:090916、090917、090918)(自制)。乌头碱对照品(aconitine)(110720-200410)、次乌头碱对照品(hypaconitine)(798-9403)、新乌头碱对照品(mesaconitine)(799-9403),均购自中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Elipse CDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm 5 μm);流动相 乙腈-0.2% 冰乙酸(加三乙胺调节 pH 值为 6.25) (29: 71);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 235 nm;柱温 30 ℃。

2.2 对照品溶液的配制 精密称取乌头碱对照品、次乌头碱对照品、新乌头碱对照品适量,加 0.01 mol/L 盐酸甲醇溶液制成每 1 mL 含乌头碱 26.8 μg、次乌头碱 72.6 μg、新乌头碱对照品 163.2 μg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 3 片,除去盖衬,剪碎,混匀,精密称取约 0.5 片癌痛巴布剂,置具塞锥形瓶中,加无水乙醇 50 mL,超声处理 30 min,过滤,药渣再加入无水乙醇 50 mL,超声处理 30 min,过滤,合并,滤液挥干,残渣加 10 mL 0.6 mol/L 的盐酸转入分液漏斗中,加入乙醚萃取 3 次(20 mL, 10 mL, 10 mL),取酸水层,加氨试液调 pH 值至 9,加乙醚萃取 3 次(10 mL, 10 mL, 10 mL),合并乙醚溶液,蒸干,加 0.01 mol/L 的盐酸甲醇溶液溶解,转入 25 mL 量瓶中并定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 按癌痛巴布剂的制备工艺制备缺草乌的阴性对照制剂,并按供试品溶液制备方法制成草乌阴性样品溶液,按 2.1 项色谱方法测试,结果供试品中其他杂质峰亦不干扰各待测成分的测定,且分离理想,空白无干扰。见图 1~3。

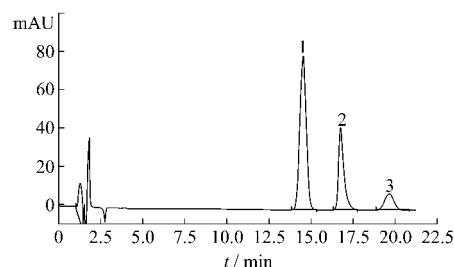


图1 新乌头碱、次乌头碱、乌头碱对照品 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of aconitine, mesaconitine and hypaconitine

1. 次乌头碱(mesaconitine) 2. 新乌头碱(hypaconitine) 3. 乌头碱(aconitine)

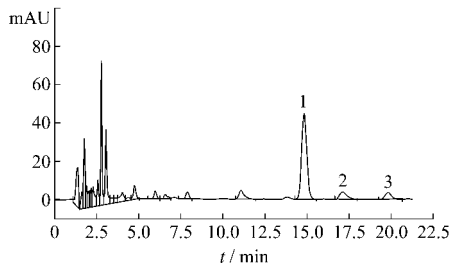


图2 癌痛巴布剂 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of Aitong Cataplasms

1. 次乌头碱(mesaconitine) 2. 新乌头碱(hypoconitine) 3. 乌头碱(aconitine)

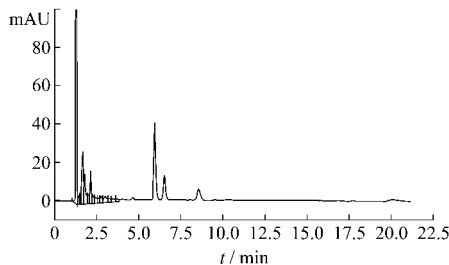


图3 阴性样品 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of negative sample

2.4.2 线性关系考察 精密吸取上述乌头碱、次乌头碱、新乌头碱混合对照品溶液 2、4、6、8、10、12 μ L 进行色谱测定,按上述色谱条件测定峰面积,并以峰面积(Y)对进样量(X)进行回归,得标准曲线:乌头碱: $Y=1.173\ 9X+1.833\ 1$, $r=1$;次乌头碱: $Y=1.265\ 1X+1.521$, $r=1$;新乌头碱: $Y=1.272\ 4X+$

$5.026\ 9$, $r=1$,表明乌头碱在 53.6~321.6 ng 进样量范围内线性关系良好,次乌头碱在 145.2~871.2 ng 进样量范围内线性关系良好,新乌头碱在 326.4~1 598.4 ng 进样量范围内线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 精密吸取上述乌头碱、次乌头碱、新乌头碱混合对照品溶液 10 μ L,重复进样 5 次,测得峰面积积分值 RSD 分别为 0.43%、0.11%、0.10%。

2.4.4 稳定性试验 取癌痛巴布剂(批号:090916)按样品制备方法制成供试品液,分别在 0、2、4、6、8 h 不同时间间隔进样 10 μ L 测定,测得乌头碱、次乌头碱、新乌头碱峰面积积分值, RSD 分别为 0.76%、0.62%、0.46%,表明乌头碱、次乌头碱、新乌头碱在 8 h 内均稳定。

2.4.5 重复性试验 按拟定的测定方法,对同一批样品(批号:090916)分别制备供试液,共平行制备 5 份,测得峰面积并计算供试品中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱量,结果 RSD 分别为 1.93%、1.81%、1.44%,表明重复性良好。

2.4.6 回收率试验 取已测定的样品(批号 090916,每片平均含乌头碱 0.83 mg,次乌头碱 0.87 mg,新乌头碱 7.54 mg,每片平均质量为 11.583 6 g),分别精密加入一定量的乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品,按供试品制备与测定方法,以 2.1 项色谱条件测定,平行做 6 组,结果见表 1。

表 1 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱加样回收率测定结果($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery test of aconitine, mesaconitine and hypoconitine ($n=6$)

对照品	取样量/g	样品中原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
乌 头 碱	2.806 7	0.202 0	0.217 0	0.415 8	98.55	99.26	1.83
	2.789 4	0.200 7	0.217 0	0.420 6	101.33		
	2.803 3	0.201 7	0.217 0	0.417 2	99.30		
	2.793 7	0.201 0	0.217 0	0.409 6	96.12		
	2.810 1	0.202 2	0.217 0	0.418 5	99.68		
次 乌 头 碱	2.798 6	0.201 4	0.217 0	0.419 6	100.57	99.71	1.52
	2.806 7	0.211 2	0.217 8	0.426 5	98.84		
	2.789 4	0.209 9	0.217 8	0.421 8	97.28		
	2.803 3	0.211 0	0.217 8	0.430 2	100.65		
	2.793 7	0.210 3	0.217 8	0.429 3	100.57		
新 乌 头 碱	2.810 1	0.211 5	0.217 8	0.428 2	99.50	97.82	1.15
	2.798 6	0.210 6	0.217 8	0.431 6	101.46		
	2.806 7	1.826 9	1.817 9	3.582 4	96.57		
	2.789 4	1.815 7	1.817 9	3.619 0	99.20		
	2.803 3	1.824 7	1.817 9	3.600 9	97.70		
乌 头 碱	2.793 7	1.818 5	1.817 9	3.580 4	96.92	97.36	99.19
	2.810 1	1.829 2	1.817 9	3.599 0	97.36		
	2.798 6	1.821 7	1.817 9	3.624 8	99.19		

2.4.7 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L,注入液相色谱仪,测定,即得。结果见表 2。

表 2 癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱测定结果 ($n=3$)

Tab.2 Determination of aconitine, mesaconitine and hyp-aconitine in Aitong Cataplast ($n=3$)

批号	乌头碱/ (mg/片)	次乌头碱/ (mg/片)	新乌头碱/ (mg/片)	乌头总碱/ (mg/片)	平均/ (mg/片)	RSD /%
	0.844 5	0.870 6	7.550 5	9.265 6		
090916	0.827 3	0.883 0	7.484 9	9.195 2	9.245 0	0.47
	0.821 7	0.884 6	7.568 0	9.274 3		
	0.843 7	0.872 6	7.490 6	9.206 9		
090917	0.836 4	0.885 1	7.579 5	9.301 0	9.257 1	0.51
	0.823 3	0.902 1	7.538 1	9.263 5		
	0.855 2	0.867 2	7.533 0	9.255 4		
090918	0.825 1	0.879 9	7.551 4	9.256 4	9.278 1	0.42
	0.851 5	0.883 7	7.587 4	9.322 6		

3 讨论

3.1 测定指标的选择 癌痛巴布剂为临床实践应用于治疗各种恶性肿瘤所致疼痛的经验方剂,草乌为君药之一,其中所含乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、N-脱酸刺乌头碱、滇乌头碱等双酯型二萜生物碱是其镇痛麻醉的主要活性成分,以乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的量最高^[1-4]。由于酸性染料比色法供试品溶液处理繁杂,并且最终需要进行脱水处理,否则将会对测定结果产生影响^[5-7]。因此本试验通过建立癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的 HPLC 测定方法,为癌痛巴布剂的质量控制和临床用药提供了依据。

3.2 提取方法的选择 乌头碱类成分在碱性条件下不稳定,尤其不适宜采用碱性溶剂例如甲醇、氨水浸泡等进行处理,本试验曾采用纯水、含水甲醇和不同浓度的乙醇作为溶剂进行提取,结果显示,加热后易使供试品膏体溶化,不易滤过,结果显示,宜采用无水乙醇超声处理提取,采用酸提碱沉法进行纯化处理制备供试品;经过方法学考察显示,加无水乙醇超声处理 2 次,每次 30 min,乌头碱总碱的量即不再

增加。在酸水溶解除杂过程中,曾采用加氨试液调 pH 值至 8 后以乙醚萃取,但由于乌头总碱多处于离子状态而不易被萃取出来,又由于乌头碱在过强碱性条件下不稳定,故将 pH 调至 9,效果较好。

3.3 流动相的选择 文献报道^[8-11]乌头碱定量测定多以甲醇和乙酸铵、三乙胺等调节 pH 值后为流动相,一般不易使乌头碱、次乌头碱、和新乌头碱分离,或是色谱峰易产生拖尾、塌峰等现象,本研究采用乙腈-0.2% 冰乙酸(加三乙胺调节 pH 值为 6.25)为流动相,经过调节不同的比例,结果在比例为 29:71 时即可使三者完全分离,峰形良好,并且阴性无干扰。

参考文献:

- [1] 陈信义,李 峨,侯 丽,等.乌头类生物碱研究进展与应用前景评述[J].中国中医药信息杂志,2004,11(10):922-923.
- [2] 李志勇,李彦文,孙建宁,等.乌头类植物药三种双酯型生物碱研究进展[J].中央民族大学学报:自然科学版,2009,(2):87-91
- [3] 李文兰,于莹莹,赵 培,等.乌头总生物碱贴片抗炎镇痛药效学研究[J].天然产物研究与开发,2008,20:339-342
- [4] 王华灵,韩培秀,徐世明.乌头碱对癌症疼痛的治疗效果[J].中国中西医结合杂志,1994,14(4):219.
- [5] 陈其华,范丽霞.中成药中乌头总碱的酸性染料比色测定法[J].中国中药杂志,1991,16(8):476-477.
- [6] 杜 倩,潘金火,严国俊,等.复方川乌止痛贴剂中酯型生物碱及总生物碱的含量测定[J].时珍国医国药,2008,(1):158-160.
- [7] 李文兰,王艳萍,李宇彬,等.应用 AB-8 大孔树脂纯化新乌头碱和乌头总碱[J].中国天然药物,2006,(5):355-359.
- [8] 刘玉兰,刘世坤,裴 奇,等.高效液相色谱法测定附子中 3 组分的含量[J].中国药房,2006,(16):1255-1256.
- [9] 叶震强,张辉珍.高效液相色谱法测定附子中次乌头碱的含量[J].时珍国医国药,2006,(2):197-198.
- [10] 项 杰,王阳雪,侯大兵,等.反相高效液相色谱法测定附子有效成分含量的方法研究[J].四川大学学报:自然科学版,2006,43(1):165-166.
- [11] 王 瑞,孙毅坤,王 耘,等.高效液相色谱法测定附子及其炮制品中三种双酯型生物碱[J].现代生物医学进展,2007,(7):1078-1080.