

# HPLC同时测定乌七祛风散片中4种生物碱的含量

毛坤军, 潘以琳, 李富强, 白钢钢, 李祥\*, 陈建伟  
(南京中医药大学, 南京 210046)

**[摘要]** 目的: 建立乌七祛风散片(制草乌、三七、断节参、雪上一枝蒿、防风等9味中药组成)中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和次乌头碱的HPLC测定方法。方法: 色谱条件, Hanbon-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相[乙腈-四氢呋喃(25:15)](A)-0.1 mol·L<sup>-1</sup>醋酸铵溶液(每1 000 mL加冰醋酸0.5 mL)(B), 流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温30℃, 检测波长232 nm。结果: 4种生物碱分离良好, 各成分质量浓度与峰面积在测定范围内均呈良好的线性关系( $r > 0.999 0$ ), 加样回收率分别为101.10% (RSD 2.1%), 101.09% (RSD 2.2%), 102.04% (RSD 1.6%), 97.83% (RSD 2.7%), 最低检测限分别为3.4, 1.7, 2.2, 0.8 ng。结论: 该HPLC方法稳定可靠、简便易行, 可用于同时测定乌七祛风散片中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和次乌头碱含量。

**[关键词]** 乌七祛风散片剂; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 次乌头碱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0074-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220074

## Simultaneous Determination of Four Alkaloids in Wuqi Qufengsan Tablets by HPLC

MAO Kun-jun, PAN Yi-lin, LI Fu-qiang, BAI Gang-gang, LI Xiang\*, CHEN Jian-wei  
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of benzoylmesaconine, benzoylaconine, benzoylhypaconitine and hypaconitine in Wuqi Qufengsan tablets. **Method:** The assay was performed on a Hanbon-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase consisted of acetonitrile-tetrahydrofuran (25:15, phase A) -0.1 mol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate (containing 0.5 mL glacial acetic acid per 1 000 mL, phase B) with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature was 30℃, and the detection wavelength was at 235 nm. **Result:** Excellent chromatographic separation was achieved for four studied alkaloids with good linearity ( $r > 0.999 0$ ), the average recoveries were 101.10% (RSD 2.1%), 101.09% (RSD 2.2%), 102.04% (RSD 1.6%), 97.83% (RSD 2.7%). The limits of detection were 3.4, 1.7, 2.2 and 0.8 ng respectively. **Conclusion:** This method was simple, accurate and reproducible, it can be used to determine the content of benzoylmesaconine, benzoylaconine, benzoylhypaconitine and hypaconitine in Wuqi Qufengsan tablets.

**[Key words]** Wuqi Qufengsan tablets; benzoylmesaconine; benzoylaconine; benzoylhypaconitine; hypaconitine

乌七祛风散片是由制草乌、三七、断节参、雪上一枝蒿、防风等9味中药按一定比例粉碎成细粉,过

筛,混匀后制成的中药片剂,具有驱风除湿、舒筋活络、消肿定痛的作用,临床上主要用于关节疼痛、静

**[收稿日期]** 20140210(016)

**[第一作者]** 毛坤军, 硕士, 从事中药学研究, Tel:18252066781, E-mail:maokunjun2012@163.com

**[通讯作者]** \*李祥, 教授, 从事中药学研究, Tel:025-85811512, E-mail:lixiang\_8182@163.com

脉炎、跌打损伤。本方由虎力散基础演变而来,经过长期临床用药经验增加药味而得。处方中,制草乌为君药,其主要活性成分为乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱。现代药理学研究证实,乌头生物碱具有抗炎、免疫抑制、麻醉止痛等作用;同时也具有较强毒性,对神经系统、消化系统、心血管系统均有毒害作用,人口服0.2 mg 乌头碱即可出现恶心、头晕、神志不清、心律紊乱等中毒现象<sup>[1-2]</sup>。故2010年版《中国药典》对制草乌中生物碱的含量具有严格的限量范围,为保证用药的安全有效,对含草乌的复方制剂也均制定了该类生物碱的HPLC含量测定方法<sup>[3]</sup>。目前,乌七祛风散片对该类生物碱化合物的含量评价主要以酸碱滴定法测定总生物碱含量,但总生物碱的含量并不能反应出不同类型生物碱之间毒性和药效的差异,也不能准确的对其进行质量控制,故有必要建立一种同时测定双酯型乌头碱及单酯型乌头碱含量的方法,这样既能控制其毒性,保证临床用药的安全性,又确保了其临床疗效。本试验所建立的HPLC同时测定乌七祛风散片剂中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和次乌头碱含量的方法,经方法学验证,稳定可靠、简便易行,可为乌七祛风散片剂的质量标准研究提供依据。

## 1 材料

**1.1 仪器** 2695型高效液相色谱仪(包括Waters 2489型PDA检测器,Empower工作站,美国Waters公司),AG285型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

**1.2 试药** 次乌头碱(批号110798-201106),苯甲酰乌头原碱(批号11794-201102),苯甲酰次乌头原碱(批号111796-201002),苯甲酰新乌头原碱(批号11795-201102)对照品均购自中国食品药品检定研究院;不同批号乌七祛风散片均购自先声药店;乙腈、四氢呋喃均购自Merck公司,甲醇、乙酸铵、冰乙酸、乙醚、三氯甲烷、异丙醇和氨水为北京化工厂产品,水为去离子重蒸水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Hanbon-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相[乙腈-四氢呋喃(25:15)](A)-0.1 mol·L<sup>-1</sup>乙酸铵溶液(每1 000 mL加冰乙酸0.5 mL)(B),梯度洗脱(0~48 min,15%~26% A;48~48.1 min,26%~35% A;48.1~58 min,35% A;58~65 min,35%~15% A),柱温30℃,体积流

量1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长232 nm,进样量20 μL。

### 2.2 溶液制备

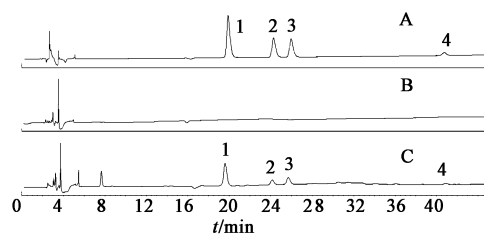
**2.2.1 混合对照品溶液制备** 精密称取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和次乌头碱对照品适量,用三氯甲烷-异丙醇(1:1)配制成质量浓度分别为422.5,125.8,157.2,25.5 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品液。

**2.2.2 供试品溶液制备** 乌七祛风散片研成粉末,过60目筛,精密称取3.0 g,置200 mL锥角瓶中,加浓氨水3 mL,润湿30 min,精密量取乙醚100 mL,冷浸18 h后过滤,残渣用乙醚洗3次,每次20 mL,滤液放置水浴锅中蒸干(水浴锅温度不得高于40℃)后,用三氯甲烷-异丙醇(1:1)溶解,转移至10 mL量瓶,精密定容到10 mL,摇匀,即得供试品溶液。

**2.2.3 阴性样品溶液制备** 依据处方量制备缺制草乌的阴性样品,按2.2.2项下方法制成阴性样品溶液,摇匀,备用。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性考察** 按照2.1项下色谱条件,吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各20 μL,分别注入高效液相色谱仪,结果见图1。表明其他各味药不干扰供试品溶液中4种生物碱的测定。



1. 苯甲酰新乌头原碱;2. 苯甲酰乌头原碱;  
3. 苯甲酰次乌头原碱;4. 次乌头碱

图1 混合对照品(A)、阴性样品(B)和乌七祛风散片(C)的HPLC

**2.3.2 线性关系考察** 分别精密吸取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、次乌头碱混合对照品溶液0.5,1.0,2.5,5.0,10.0 mL至10 mL量瓶中,用三氯甲烷-异丙醇(1:1)定容到10 mL,离心后取20 μL注入高效液相,按2.1项下色谱条件进行分析,以峰面积Y对进样量X进行回归计算,回归方程见表1。

**2.3.3 精密度试验** 取适宜浓度的混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样6次,记录各自的峰面积并计算其RSD。结果显示,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、次乌头碱

表 1 4 种生物碱的线性范围和线性关系

成分	线性范围/ $\mu\text{g}$	线性关系	$r$
苯甲酰新乌头原碱	0.425 5 ~ 8.450 0	$Y = 1\ 334\ 837X + 23\ 228$	0.999 9
苯甲酰乌头原碱	0.125 8 ~ 2.516 0	$Y = 1\ 165\ 498X + 5\ 750.9$	0.999 6
苯甲酰次乌头原碱	0.157 2 ~ 3.144 0	$Y = 1\ 156\ 868X + 773.8$	0.999 7
次乌头碱	0.025 5 ~ 0.510 0	$Y = 316\ 138X + 6\ 677$	0.999 6

的 RSD 分别为 0.4% ,0.5% ,0.9% ,1.0% 。表明精密度良好,能满足定量测定要求。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一供试品(批号 20130710)溶液,按 2.1 项下色谱条件分别于 0,2,4,6,8,10,12,16 h 进样 20  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、次乌头碱 RSD 分别为 0.6% ,0.8% ,1.0% ,2.3% 。表明 4 种生物碱在三氯甲烷-异丙醇溶液中 16 h 内稳定。

**2.3.5 重复性试验** 取同一批次(批号 20130710)样品 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,离心后取 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相,记录各自的峰面积并计算其 RSD。结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、次乌头碱的 RSD 分别为 1.6% ,2.9% ,2.1% ,2.8% ,表明方法重复性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 取已知含量的样品(批号 20130710)6 份,每份 3.0 g,按 1:1 的比例加入适量对照品,按 2.2.2 项下方法进行供试品溶液的制备,按 2.1 项下色谱条件测定,计算其回收率,4 种生物碱加样回收试验数据平均值结果见表 2。

**2.3.7 最低检测限** 将混合对照品溶液逐渐稀释,注入 HPLC 分析,当 S/N 等于 3 时即为最低检测限,本色谱条件下苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、次乌头碱的最低检测限分别为 3.4,1.7,2.2,0.8 ng。

**2.3.8 样品测定** 称取不同批次样品约 3.0 g,每批平行 3 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件下测定,外标法计算含量,结果见表 3。

表 2 乌七祛风散片剂中 4 种成分加样回收率试验( $n=6$ )

成分	称取量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
苯甲酰新乌头原碱	3.004 6	1.152 9	1.160 0	2.325 7	101.10	2.1
苯甲酰乌头原碱	3.004 6	0.283 9	0.280 0	0.567 0	101.09	2.2
苯甲酰次乌头原碱	3.004 6	0.426 1	0.430 0	0.864 9	102.04	1.6
次乌头碱	3.004 6	0.049 3	0.047 5	0.095 7	97.83	2.7

表 3 5 批乌七祛风散片剂样品中 4 种生物碱平均含量测定( $n=3$ )

批号	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			
	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	次乌头碱
20130606	0.344 3	0.142 1	0.127 7	0.015 7
20130708	0.363 8	0.132 9	0.121 2	0.016 5
20130710	0.383 7	0.094 5	0.141 8	0.016 4
20130723	0.329 9	0.148 2	0.126 7	0.014 5
20130724	0.291 7	0.122 3	0.127 7	0.016 0

### 3 讨论

**3.1 提取条件的选择** 采用单因素变量法,分别对提取方法(冷浸、超声提取)、提取溶剂[无水乙醇,异丙醇-三氯甲烷(1:1),乙醚]、提取溶剂用量(50,100,150 mL)、加入氨水的量(2,3,4 mL)和提取时间(12,18,24 h)等因素进行了考察,以获得最佳的

提取效率。结果显示,冷浸提取比超声提取的好,可能是超声过程易产生热量,而双酯型生物碱在 40  $^{\circ}\text{C}$  以上易分解;乙醚为提取溶剂、加入氨水量 3 mL 时可获得较高的提取效率;冷浸时间考察结果显示,冷浸 18 h 提取效率达到最高,提取溶剂 100 mL 时提取效率可达最大。故选择 100 mL 乙醚加入 3 mL 浓氨水冷浸 18 h 作为供试品溶液制备方法。

**3.2 流动相及检测波长的选择** 比较了乙腈-四氢呋喃(25:15)-0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵溶液<sup>[5]</sup>,甲醇-三乙胺<sup>[6]</sup>和乙腈-乙酸水<sup>[6]</sup>3 种洗脱剂,发现后两种柱压较高,对柱子损害较大,而前者的分离效果较好,故选择乙腈-四氢呋喃(25:15)-0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵溶液作为洗脱剂。经 HPLC 全波长扫描发现,4 种生物碱的最大吸收波长为 231.9 nm,故选择 232 nm 作为检测波长。

**3.3 定容溶剂的选择** 实验过程中比较了甲醇、异丙醇-三氯甲烷(1:1)<sup>[7]</sup>、二氯甲烷3种溶剂定容,结果表明在甲醇中溶解度较差易降解<sup>[8]</sup>,在二氯甲烷中由于其易挥发也不稳定,而在异丙醇-三氯甲烷(1:1)中稳定性较好,故选择其作为定容溶剂。

**3.4 指标成分选择依据** 方中君药制草乌含有3种双酯型毒性成分乌头碱,新乌头碱,次乌头碱,本实验目的是同时测定3种单酯型生物碱和3种双酯型生物碱,以保证乌七祛风散片剂的用药安全有效。但此HPLC条件下乌头碱和新乌头碱最低检测限分别为1.6和2.9 ng,经反复更换洗脱剂及其比例,又经过LC-MS检测,均未检测到乌头碱和新乌头碱,可能供试品溶液中不存在乌头碱和新乌头碱,或者两者含量低于最低检测限无法检测,故选择次乌头碱含量作为双酯型生物碱的总量计。

#### 4 小结

《中国药典》2010年版一部规定制草乌中双酯型生物碱总含量不得过0.040%,单酯型生物碱总含量应为0.020%~0.070%。本实验测得不同批次乌七祛风散片中双酯型生物碱平均质量分数在0.0007%~0.0014%,单酯型生物碱平均质量分数为0.039%~0.056%,折成单味药制草乌计双酯型生物碱平均质量分数在0.0018%~0.0036%,单

酯型生物碱总质量分数在0.099%~0.1426%,其双酯型生物碱在规定范围内,但不同批次之间含量差异较大,故有必要对其生物碱含量制定含量限度,以保证乌七祛风散片剂用药的安全有效。

#### [参考文献]

- [1] 凌珊,龚千锋.草乌的研究进展[J].江西中医学院学报,2011,23(3):90.
- [2] 石军民.中药乌头的合理使用[J].中国当代医药,2010,27(12):92.
- [3] 朱俏军,王彬辉,陈莘莘,等.HPLC测定五味麝香丸中乌头类生物碱的含量[J].中华中医药学刊,2012,30(7):1673.
- [4] 满玉清,董宁霞,周灵芝,等.附子中双酯型生物碱的提取条件考察[J].药学研究,2013,32(3):134.
- [5] 刘军玲,班永生,蒲婧哲.高效液相色谱法测定风湿骨痛丸中双酯型生物碱的限度[J].安徽医药,2013,17(7):1112.
- [6] 龙项,胡还甫.高效液相色谱法测定不同产地夏天无药材中5种生物碱含量[J].中国医院药学杂志,2013,33(13):1104.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:220.
- [8] 李丽敏,王欣美,季申.RP-HPLC测定镇痛活络酊中3种乌头类生物碱含量[J].中成药,2008,30(12):1785.

[责任编辑 顾雪竹]