

## HPLC 测定复脉灵胶囊中乌头碱、 新乌头碱、次乌头碱的含量

任欣欣<sup>1</sup>, 李兴华<sup>2</sup>, 叶莎<sup>3</sup>, 马小亚<sup>2</sup>, 雷建林<sup>2</sup>, 李万静<sup>1</sup>, 段宗明<sup>1\*</sup>

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院心内科, 西安 710004;

2. 西安交通大学医学院第二附属医院药剂科, 西安 710004;

3. 西安交通大学医学院第二附属医院干保科, 西安 710004)

**[摘要]** 目的:建立复脉灵胶囊中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的含量测定方法。方法:采用 HPLC,流动相甲醇-0.5% 的三乙胺(70:30), Aglient TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 235 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温室温。结果:乌头碱的进样量在 0.080 8 ~ 0.808 0 μg 具有良好的线性关系( $r=0.999 6$ ), 平均回收率 98.40%, RSD 2.84%; 新乌头碱的进样量在 0.866 ~ 4.330 μg 具有良好的线性关系( $r=0.999 7$ ), 平均回收率 98.04%, RSD 2.05%; 次乌头碱的进样量在 0.089 ~ 0.890 μg 具有良好的线性关系( $r=0.999 8$ ), 平均回收率 98.71%, RSD 2.34%。结论:方法操作简便、灵敏度高、结果准确,可作为复脉灵胶囊的含量测定方法。

**[关键词]** 复脉灵胶囊; 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0131-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013180131

## Determination of Aconitine, Mesaconitine and Hypaconitine in Fumailing Capsules by HPLC

REN Xin-xin<sup>1</sup>, LI Xing-hua<sup>2</sup>, YE Sha<sup>3</sup>, MA Xiao-ya<sup>2</sup>, LEI Jian-lin<sup>2</sup>, LI Wan-jing<sup>1</sup>, DUAN Zong-ming<sup>1\*</sup>

(1. Department of Cardiovascular, Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University,

Xi'an 710004, China; 2. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Medical College,

Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 3. Department of Cadre sickroom,

The Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for the determination of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in Fumailing Capsules. **Method:** The aconitine, mesaconitine and hypaconitine in the capsules was determined by HPLC on the Aglient TC-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at room temperature. The mobile phase was consisted of methanol-0.05% triethylamine (70:30). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at 235 nm. **Result:** The content of aconitine had a good linearity in the range of 0.080 8-0.808 0 μg ( $r=0.999 6$ ), the average recovery was 98.40%, RSD was 2.84%. The content of mesaconitine had a good linearity in the range of 0.866-4.330 μg ( $r=0.999 7$ ), the average recovery was 98.04% and RSD was 2.05%. The content of hypaconitine had a good linearity in the range of 0.089-0.890 μg ( $r=0.999 8$ ), the average recovery was 98.71%, and RSD was 2.34%; **Conclusion:** This method was simple, reproducible and accurate, and it can be used for determination of Fumailing Capsules.

**[Key words]** Fumailing Capsules; aconitine; mesaconitine; hypaconitine; HPLC

**[收稿日期]** 20121202(005)

**[基金项目]** 陕西省科技攻关项目[2008K16-04(8)]

**[第一作者]** 任欣欣,在读硕士生,从事缓慢性心律失常的中药治疗研究, Tel:15349241702, E-mail:402486585@qq.com

**[通讯作者]** \* 段宗明,主任医师,从事缓慢性心律失常的临床诊断及治疗, Tel:029-87679346, E-mail:Duanzongming@xjtu.edu.cn

复脉灵胶囊(陕药管制字[2001]第 1422 号)是西安交通大学医学院第二附属医院院内制剂,由麻黄、附子、细辛、炙甘草、人参、桂枝、熟地黄、黄芪、丹参、生姜、大枣共 11 味中药制成,具有补益心肾、温阳复脉的功效,主治窦性心动过缓、房室传导阻滞等缓慢性心律失常。附子是复脉灵胶囊方中的君药,能增强心肌收缩力,加快心率,有显著的抗缓慢性心律失常作用<sup>[1]</sup>。其所含的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等双酯型生物碱,既是有效成分,又是毒性成分<sup>[2]</sup>,人口服 0.2 mg 乌头碱即可出现恶心、呕吐、头晕、眼花、呼吸困难、神志不清、心律紊乱等中毒现象<sup>[3-4]</sup>,因此,严格控制剂中双酯型生物碱的含量意义重大。本实验采用高效液相色谱法测定复脉灵胶囊中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的含量,为复脉灵胶囊的质量标准研究提供依据。

## 1 材料

Waters 510 型高效液相色谱仪(Waters 510 高效液相色谱泵, Waters 486 检测器,美国 Waters 公司),N2000 色谱数据工作站(浙江大学智达信息工程有限公司),RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),HH-2 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司),TG-332A 型微量天平(湘仪天平仪器厂),AEG-220G 型电子天平(日本岛津公司)。

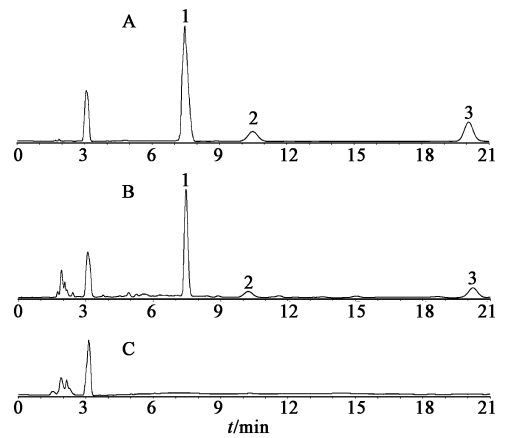
麻黄 *Ephedra sinica* Stap., 细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag, 炙甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., 人参 *Panax ginseng* C. A. Mey., 桂枝 *Cinnamomum cassia* Presl, 熟地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch., 黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao, 丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge., 生姜 *Zingibel officinale* Rosc., 大枣 *Ziziphus jujuba* Mill, 均购自陕西药材市场,经西安交通大学医学院第二附属医院药剂科王晴辉主管药师鉴定。复脉灵胶囊(陕西省西安市西安交通大学医学院第二附属医院制剂室生产),乌头碱对照品(批号 110720-200410),新乌头碱对照品(批号 110799-200505),次乌头碱对照品(批号 110798-200805),均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱 HPLC 法检测

**2.1.1 色谱条件** 流动相甲醇-0.5% 的三乙胺(70:30),Aglient TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 235 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量

20 μL,柱温室温。在此色谱条件下,3 种乌头碱均与其他组分能达到较好分离。色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性;

1. 新乌头碱; 2. 乌头碱; 3. 次乌头碱

图 1 复脉灵胶囊 HPLC

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取乌头碱对照品、新乌头碱对照品和次乌头碱对照品适量,分别置于 25, 10, 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,得 40.4 mg·L<sup>-1</sup> 乌头碱对照品溶液, 216.5 mg·L<sup>-1</sup> 新乌头碱对照品溶液, 89.0 mg·L<sup>-1</sup> 次乌头碱对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取复脉灵胶囊内容物(约 50 g),恒重干燥,精密称定,加适量浓氨水湿润过夜,乙醚索氏提取 6 h,乙醚液低温旋转蒸发至干,残渣加甲醇约 0.5 mL,将其全部条状点于 0.3% 羧甲基纤维素钠溶液为黏合剂的硅胶 GF<sub>254</sub> 薄板上,样品旁边点适量乌头碱、新乌头碱、次乌头碱混合对照品溶液,以氯仿-乙醚(1:2.5)为展开剂,在 25% 氨水蒸汽饱和和下展开<sup>[5-6]</sup>,取出室温晾干,置于紫外灯下定位,将与对照品相应位置的 3 种样品色谱条带分别刮下,用甲醇把样品从硅胶上洗脱下来,离心,分离上清液并挥干,残渣再加甲醇分别定容至 1 mL 量瓶中。

**2.1.4 阴性对照溶液制备** 用除附子外的其余 10 味药材按处方比例制成空白对照胶囊,按 2.1.3 项下供试品溶液的制备方法分别制备阴性对照溶液。

**2.1.5 线性关系考察** 分别精密量取乌头碱对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 于 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度;分别精密量取新乌头碱对照品溶液 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 mL 于 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度;分别精密量取次乌头碱对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度。分别依次吸取上述浓度的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条

件进行测定,以进样量为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ ),分别进行线性回归,得回归方程为 $Y_{\text{乌头碱}} = 780\,483X - 17\,340$  ( $r = 0.999\,6$ ),表明乌头碱进样量在 $0.080\,8 \sim 0.808\,0\ \mu\text{g}$ 线性关系良好; $Y_{\text{新乌头碱}} = 559\,000X + 64\,258$  ( $r = 0.999\,7$ ),表明新乌头碱进样量在 $0.866 \sim 4.330\ \mu\text{g}$ 线性关系良好; $Y_{\text{次乌头碱}} = 10^6X + 4\,009.7$  ( $r = 0.999\,8$ ),表明次乌头碱在进样量 $0.089 \sim 0.890\ \mu\text{g}$ 线性关系良好。

**2.1.6 精密度试验** 分别精密吸取乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品溶液,重复进样6次,结果乌头碱、新乌头碱、次乌头碱峰面积RSD分别为 $0.98\%$ ,  $1.63\%$ ,  $1.25\%$ ,表明仪器精密度良好。

**2.1.7 稳定性试验** 分别精密吸取乌头碱、新乌头碱、次乌头碱供试品溶液,于 $0, 2, 4, 6, 12, 24\ \text{h}$ 进行测定,结果乌头碱、新乌头碱、次乌头碱峰面积RSD分别为 $1.01\%$ ,  $1.92\%$ ,  $1.77\%$ ,表明供试品溶液在 $0 \sim 24\ \text{h}$ 内稳定性良好。

**2.1.8 重复性试验** 按**2.1.3**项下方法平行制备同一批复脉灵胶囊供试品溶液6份,按**2.1.1**项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算含量,结果乌头碱平均含量为 $0.105\,0\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD  $1.27\%$ ,新乌头碱平均含量为 $2.812\,0\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD  $2.72\%$ ,次乌头碱平均含量为 $0.314\,8\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD  $1.85\%$ ,表明本方法的重复性良好。

**2.1.9 加样回收率试验** 取6份已知含量的复脉灵胶囊内容物(约 $40\ \text{g}$ ),恒重干燥,精密称定,分别加入一定浓度的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品溶液,挥干,按**2.1.3**项下供试品溶液的制备方法制备,按**2.1.1**项下色谱条件进行测定,结果见表1。

**2.2 样品含量测定** 取3批复脉灵胶囊,按上述方法制备和测定,结果见表2。

### 3 讨论

复脉灵胶囊方中的君药附子是毛茛科植物乌头的子根加工品,其性大热,味辛、甘,入心、脾、肾,通行十二经,有毒,具有回阳救逆、温里助阳、祛寒止痛等功效<sup>[7]</sup>。新乌头碱、乌头碱、次乌头碱为毛茛科乌头属植物中常见的3种双酯二萜类生物碱,是附子的主要活性成分,但它们毒性剧烈,且治疗剂量与中毒剂量接近,如炮制方法不当、入药量过大或违反配伍禁忌等,均可引起中毒反应,经规范炮制加工工艺、严格控制剂量及合理配伍入药后,其有效成分及毒性成分含量明显降低<sup>[8-9]</sup>,为保证临床用药安全有效,检测复脉灵胶囊中双酯型生物碱的含量是非常必要的。

表1 乌头碱新乌头碱次乌头碱加样回收率试验

成分	样品含量 / $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 / $\%$	平均回 收率/ $\%$	RSD / $\%$
乌头碱	4.200 2	4.040 0	8.102 1	96.58	98.40	2.84
	4.202 9	4.040 0	8.085 4	96.10		
	4.199 8	4.040 0	8.268 8	100.72		
	4.196 8	4.040 0	8.355 2	102.93		
	4.204 4	4.040 0	8.101 0	96.45		
	4.201 5	4.040 0	8.145 4	97.62		
新乌头碱	0.112 8	0.102 1	0.213 0	98.24	98.04	2.05
	0.112 9	0.102 1	0.210 8	96.05		
	0.112 8	0.102 1	0.213 8	99.01		
	0.112 7	0.102 1	0.216 1	101.35		
	0.112 9	0.102 1	0.212 4	97.60		
	0.112 8	0.102 1	0.210 7	96.01		
次乌头碱	12.516 8	12.714 2	25.549 9	102.51	98.71	2.34
	12.524 8	12.714 2	24.862 4	97.04		
	12.515 4	12.714 2	24.879 7	97.25		
	12.506 6	12.714 2	25.071 9	98.83		
	12.529 2	12.714 2	24.791 8	96.45		
	12.520 6	12.714 2	25.260 1	100.20		

表2 样品含量测定( $n=3$ )

批次	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱
1	0.105 2	2.820 9	0.313 2
2	0.105 3	2.821 0	0.313 4
3	0.105 0	2.820 6	0.312 9

在供试品溶液的制备中,若制备的样品未经薄层分离直接进行液相色谱测定,因中药复方制剂成分较多、干扰峰多,且乌头碱、次乌头碱含量较低,与附近杂质峰未能达到较好分离,影响测定结果,故经薄层色谱法进行分离后再用高效液相色谱法进行含量测定。曾借鉴药典中附子的含量测定项下供试品溶液的制备方法,及附子鉴别项下的薄层色谱展开条件<sup>[7]</sup>,从复脉灵胶囊中提取生物碱并进液相测定,但实验结果不理想,可能与复方制剂中其他药材对待测成分的干扰有关。

经查阅相关文献<sup>[10-12]</sup>,选用甲醇- $0.5\%$ 三乙胺-乙腈- $0.5\%$ 氨水溶液、甲醇-水-氯仿-三乙胺流动相体系,分别按不同组分比例进行测定。结果表明乙腈- $0.5\%$ 氨水溶液体系效果差,甲醇- $0.5\%$ 三乙胺-甲醇-水-氯仿-三乙胺体系效果相当,但氯仿对十八烷基键合固定相有一定的破坏性,最终选用甲醇-

# HPLC 测定不同商品规格桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量

刘威<sup>1,2</sup>, 李红娟<sup>1</sup>, 张帅<sup>1</sup>, 萧伟<sup>1\*</sup>, 张振秋<sup>2\*</sup>

(1. 江苏康缘药业股份有限公司博士后工作站, 江苏 连云港 222001;

2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 建立高效液相色谱法比较桂枝不同商品规格化学成分差别, 探讨中药材商品规格与药材化学成分的相关性。方法: 采用 Waters-Symmetry-RP-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 275 nm, 柱温 30 ℃。结果: 香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛线性范围分别为 0.001 32 ~ 0.132 μg ( $r=0.999\ 5$ ), 0.001 08 ~ 0.108 μg ( $r=0.999\ 6$ ), 0.002 57 ~ 0.257 μg ( $r=0.999\ 6$ ), 0.141 4 ~ 1.448 μg ( $r=0.999\ 7$ ); 平均加样回收率分别为 97.8% (RSD 1.5%), 97.2% (RSD 1.1%), 100.6% (RSD 1.3%), 99.6% (RSD 1.7%)。不同规格桂枝药材中香豆素、肉桂醇、肉桂酸与桂皮醛含量差别较大。结论: 方法准确, 重复性好, 简便易行, 可有效地评价桂枝药材的质量, 为桂枝药材的商品流通和开发研究提供可靠的依据。

**[关键词]** 桂枝; 香豆素; 肉桂醇; 肉桂酸; 桂皮醛; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0134-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013180134

**[收稿日期]** 20130106(007)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09504-004)

**[第一作者]** 刘威, 博士, 高级实验师, 从事药物分析研究, Tel: 15998519256, E-mail: liuwei01@126.com

**[通讯作者]** \* 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药制剂的开发研究, Tel: 0518-85521933, E-mail: wzhhz-nj@tom.com;

\* 张振秋, 教授, 博士生导师, 从事药物分析研究, Tel: 0411-87586058, E-mail: zhang zhenqiu@sina.com

0.5% 三乙胺(70:30)为流动相。

## [参考文献]

- [1] 沈映君. 中药药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000:382.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986:228.
- [3] 石军民. 中药乌头的合理使用[J]. 中国当代医药, 2010,12(27):92.
- [4] 许廷生, 梁秀兰, 卢壮. 乌头类药物中毒的防治[J]. 河南中医杂志, 2005,25(6):65.
- [5] 王宝琴. 中成药质量标准与标准物质研究[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994:132.
- [6] 王莉, 王华. 偏正颗粒的制备及质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008,11(6):726.
- [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, 2010:177.
- [8] 陈东安, 易进海, 黄志芳, 等. 附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):64.
- [9] 汪星, 孙卫, 张铁军, 等. 乌头类有毒中药配伍减毒增效的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):327.
- [10] 丘振文, 罗丹冬, 王沛坚. HPLC 法测定舒痹宁颗粒中次乌头碱、新乌头碱的含量[J]. 中药新药与临床药理杂志, 2008,19(4):304.
- [11] 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.
- [12] 刘秀秀, 晁若冰. HPLC 控制参附注射液及附子中 3 种双酯型生物碱[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(2):153.

[责任编辑 顾雪竹]