

RP-HPLC同时测定四逆汤中3种双酯型乌头碱的含量

刘晓^{1,2}, 范林乾^{1,2}, 蔡皓^{1,2}, 束雅春^{1,2}, 蔡宝昌^{2,3*}

- (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046;
2. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029;
3. 南京海昌中药集团有限公司, 南京 210061)

[摘要] 目的: 建立 RP-HPLC 同时测定四逆汤中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱 3 种成分的含量。方法: 采用 Thermo Hypersil BDS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇-0.2% 三乙胺水溶液 (冰乙酸调 pH 5.2) (46:54), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 235 nm, 柱温 25 °C。结果: 在 35 min 内乌头碱、次乌头碱和新乌头碱分别达到良好分离; 依次在 0.875 ~ 28 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$), 1.125 ~ 36 mg·L⁻¹ ($r=0.9999$) 和 0.812 ~ 26 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$) 呈良好的线性关系; 3 种成分的加样回收率分别为 94.9%, 100.2%, 99.9%。结论: 方法简单可行, 适用于四逆汤中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱 3 种双酯型乌头碱成分的同时含量测定。

[关键词] 高效液相色谱法; 四逆汤; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0105-04

Simultaneous Determination of Aconitine, Hypaconitine and Mesaconitine in Sini Decoction by RP-HPLC

LIU Xiao^{1,2}, FAN Lin-qian^{1,2}, CAI Hao^{1,2}, SHU Ya-chun^{1,2}, CAI Bao-chang^{2,3*}

- (1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 3. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Corporation, Nanjing 210061, China)

[收稿日期] 20120224(007)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201007010)

[第一作者] 刘晓, 博士, 助理研究员, 从事中药质量控制与汤剂临床煎煮规范化研究, Tel:025-86798281, E-mail:liuxiao04_0@163.com

[通讯作者] * 蔡宝昌, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制与药效物质基础研究, Tel:025-86798281, E-mail:bccai@126.com

- [2] Park W H, Kim S H, Kim C H, et al. A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 4,5-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: isolation and structure determination [J]. Toxicology, 2005, 207: 383.
- [3] 周玲, 谢丽艳, 徐洁, 等. HPLC 同时测定灯盏细辛注射液中 6 种主要成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 196.
- [4] Yue-Fei Wang, Li-Min Hu, Ya-Nan Liu, et al. A rapid method for qualitative and quantitative analysis of major constituents in dengzhanxin injection by LC-DAD-ESI-MS [J]. Chromatographia, 2010, 71: 845.
- [5] 李文莉, 王文涛, 曹湘萍, 等. 高效液相色谱法测定脉络宁注射液中绿原酸的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(3): 210.
- [6] 张军, 居文政, 谈恒山. 高效液相色谱法同时测定脉络宁注射液中 3 种有机酸的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(6): 833.
- [7] 袁波, 李磊, 李发美. RP-HPLC 法测定复方大青叶注射液中绿原酸和咖啡酸的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(2): 121.
- [8] 徐向阳, 张惠, 陈希. HPLC 法测定脉络宁口服液中肉桂酸的含量 [J]. 江苏药学与临床研究, 2003, 11(1): 14.
- [9] 余明艳, 汪水娟, 汪勤, 等. 反相高效液相色谱法测定脉络宁注射液中肉桂酸的含量 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(7): 415.

[责任编辑 顾雪竹]

[Abstract] Objective: To establish an RP-HPLC method for simultaneous determination of aconitine, hypaconitine and mesaconitine in Sini decoction. **Method:** Hypersil C₁₈ was used as chromatographic separation column, and methanol-0.2% triethylamine (pH adjusted to 5.3 with CH₃COOH) was used as the mobile phase. The detection wavelength was set at 230nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was set at 25 °C. **Result:** Aconitine, hypaconitine and mesaconitine were linear in the range of 0.875-28 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 8$), 1.125-36 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$) and 0.812-26 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 8$), respectively. Their average recoveries were 94.9% for aconitine, 100.2% for hypaconitine and 99.9% for mesaconitine, respectively. **Conclusion:** The established method is convenient and can be helpful for the quality control of Sini decoction.

[Key words] HPLC; Sini decoction; aconitine; hypaconitine; mesaconitine

四逆汤由生附子、干姜及炙甘草组成,具有温中祛寒、回阳救逆的功效^[1-2]。药理研究表明该药具有强心、抗休克,增加冠脉血流量的作用,是临床上常用的抗休克方剂之一^[3-6]。该方的君药为生附子,其主要成分为乌头类生物碱,此类生物碱在化学结构上属于双酯类生物碱,毒性极大^[7]。2010年版《中国药典》中四逆汤成方制剂选用的是淡附片,而传统经方四逆汤使用生附子,两种汤剂的双酯型生物碱的含量不同未见报道。本文建立了一种同时测定四逆汤中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱含量的方法,并将该方法应用于传统煎煮工艺条件下的四逆汤和南京中医药大学附属医院提供的临床用四逆汤制剂中3种双酯型乌头碱的同时含量测定。

1 材料

1.1 仪器 安捷伦 1100 Series 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Thermo Hypersil BDS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), YXJ-2 型高速离心机(常州国华电器有限公司), AG-285 型电子天平(瑞典 METTLER 公司), PHS-3C 型 pH 计(上海康仪仪器有限公司)。

1.2 试药 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品均购自成都瑞芬斯生物科技有限公司(纯度均≥98%,质检编号分别为 RFS-W-101115-01, RFS-C-101129-01, RFS-X-101028-014)。生附子购自四川江油,经南京中医药大学刘训红教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根的饮片。淡附片(批号 110217)、炙甘草(批号 110304)、干姜(批号 110224)购自南京海昌中药集团有限公司。甲醇为色谱纯(TEDIA),水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取乌头碱 1.4 mg,次乌头碱 1.2 mg,新乌头碱 1.3 mg,置 5 mL 量瓶中,加 10% 甲醇(盐酸调 pH 至 2)使溶解并稀

释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。分别精密吸取乌头碱储备液 2 mL,次乌头碱 3 mL,新乌头碱 2 mL,于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,得混合对照品溶液,其中化合物浓度为乌头碱 0.056 g·L⁻¹,次乌头碱 0.072 g·L⁻¹,新乌头碱 0.052 g·L⁻¹。

2.2 供试品溶液 临床常用四逆汤制剂由南京中医药大学附属医院提供,为每 1 mL 含有生药量 0.8 g 的汤剂^[3]。传统工艺四逆汤样品:称取生附子 15.0 g,干姜 6.0 g,甘草 6.0 g,加水 600 mL,煎煮 2 次,每次 60 min,煮取 240 mL,制成每 1 mL 含有生药量 0.1 g 的汤剂^[8]。

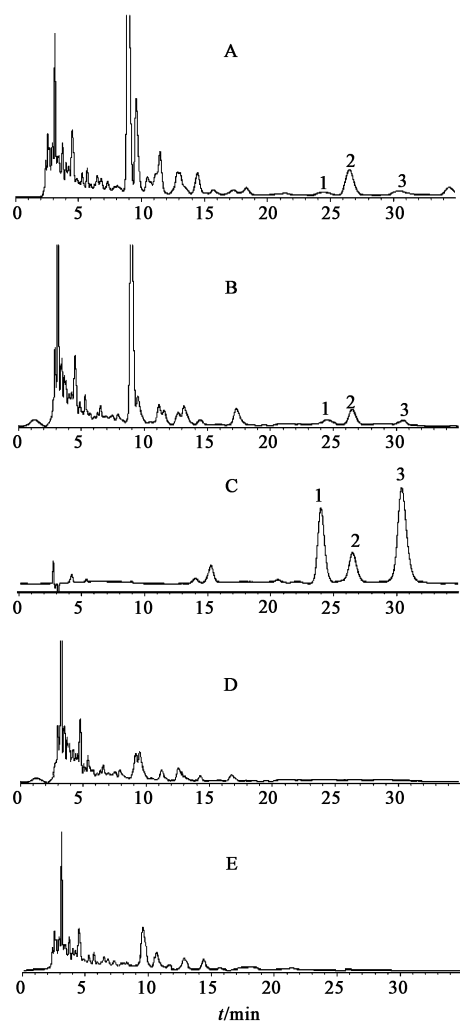
取上述汤剂各 40 mL 于 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清液,用浓氨水调节 pH 9~10。精密量取 30 mL 置分液漏斗中,分别用 35, 30, 25 mL 乙醚萃取,合并乙醚液,挥干溶剂,残渣用甲醇溶解并转移至 1 mL 量瓶中,继续加甲醇至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

2.3 阴性样品溶液 按处方比例称取各味饮片,照“供试品溶液”制备方法制得缺附子的传统四逆汤阴性样品溶液和要求医院制作缺附子的医院制剂阴性样品溶液。

2.4 色谱条件 Thermo Hypersil BDS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 三乙胺水溶液(冰乙酸调 pH 5.2)(46:54),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 235 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL,理论板数按次乌头碱计不低于 3 500。

在实验色谱条件下将样品色谱图与各对照品的标准色谱图进行对照,根据保留时间和光谱图信息对四逆汤中的 3 种成分进行指认,各色谱峰的峰形和分离度较好,可以准确测定其峰面积,并以峰面积进行定量分析,四逆汤样品、对照品溶液及空白的色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取含有乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的混合对照品储备液,用 10% 甲



A. 传统四逆汤; B. 医院制剂; C. 对照品;
D. 缺附子的传统汤剂样品; E. 缺附子的医院剂样品;
1. 新乌头碱; 2. 次乌头碱; 3. 乌头碱

图 1 四逆汤色谱

醇稀释 1, 4, 8, 16, 32, 64 倍, 即得系列对照品溶液。在上述色谱条件下分别进样 10 μL , 记录色谱图。以对照品质量浓度 X ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 为横坐标, 以峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线, 得线性方程式, 结果见表 1。

表 1 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的
回归方程、相关系数、线性范围

化合物	回归方程	r	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
乌头碱	$Y = 8\ 837.6X - 7.630\ 2$	0.999 8	0.875 ~ 28.00
次乌头碱	$Y = 10\ 412X - 9.447\ 1$	0.999 9	1.125 ~ 36.00
新乌头碱	$Y = 11\ 188X - 16.244$	0.999 8	0.812 ~ 26.00

2.6 精密度测定 取混合对照品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 记录各色谱峰峰面积, 乌头碱峰面积 RSD 0.8%, 次乌头碱峰面积 RSD 0.8%, 新

乌头碱峰面积 RSD 0.6%, 仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一份医院制剂样品平行 6 份, 每份 40 mL。按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 各取 10 μL 进样, 测定各色谱峰面积并计算 RSD。测得样品中乌头碱峰面积 RSD 0.9%, 次乌头碱峰面积 RSD 0.5%, 新乌头碱峰面积 RSD 1.6%。

2.8 稳定性试验 将制备好的样品溶液在室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样 10 μL 测定, 测定各色谱峰面积并计算 RSD。样品中乌头碱峰面积 RSD 2.6%, 次乌头碱峰面积 RSD 0.8%, 新乌头碱峰面积 RSD 1.2%。表明样品中乌头碱, 次乌头碱, 新乌头碱在室温条件下 12 h 内稳定。

2.9 加样回收率测定 取医院制剂四逆汤样品 (已知乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的平均含量分别为 1.305, 5.922, 2.925 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 20 mL, 精密量取, 共 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液适量。各样品均按 2.2 下方法制备供试品溶液, 测定回收率。结果见表 2。

2.10 样品的含量测定 制备传统汤剂样品以及收集医院制剂四逆汤制剂样品各 3 批, 按 2.2 条件处理, 2.4 色谱条件下进样 10 μL , 结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱质量浓度分别为传统 1.896, 8.016, 3.216 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 医院制剂 1.305, 5.922, 2.925 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

四逆汤制剂为南京中医药大学附属医院提供, 严格按照 2010 年版《中国药典》四逆汤成方制剂制作 (淡附片 300 g, 炙甘草 300 g, 干姜 200 g)。自制传统汤剂采用的是陈德兴主编的《方剂学》中四逆汤各药味剂量 (生附子 15 g, 干姜 6 g, 甘草 6 g) 自行煎煮得到四逆汤制剂^[9]。乌头碱类双酯型生物碱为四逆汤中主要的毒性成分, 所以临床使用生附子时具有很大的危险性。现代中医临床常用制附子代替生附子入药以降低四逆汤毒性。本文的测定结果显示传统工艺煎煮条件下四逆汤中双酯型乌头碱含量明显高于医院制剂。可见以制附子入药, 可大大降低汤剂毒性和临床使用风险。

由于四逆汤中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱 3 种双酯型生物碱属于毒性成分, 为保证四逆汤临床用药安全, 有必要建立分析方法对其毒性成分含量进行有效监测。现有文献中所报道的测定双酯型生物碱的 HPLC 方法多数都是在强碱性条件下或是应用离子对色谱法^[10], 这两种方法都会对色谱柱造成

表 2 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱加样回收率 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

化合物	样品中 含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
乌头碱	26.1	103.0	125.4	96.4	94.9	1.2
	26.1	103.0	124.2	95.2		
	26.1	103.0	123.7	94.7		
	26.1	103.0	121.8	92.9		
	26.1	103.0	123.4	94.4		
	26.1	103.0	124.6	95.6		
次乌头碱	118.4	145.0	261.3	98.5	100.2	0.9
	118.4	145.0	265.3	101.3		
	118.4	145.0	263.1	99.7		
	118.4	145.0	264.0	100.4		
	118.4	145.0	263.8	100.2		
	118.4	145.0	264.6	100.8		
新乌头碱	58.5	57.0	112.6	94.9	99.9	3.3
	58.5	57.0	117.3	103.1		
	58.5	57.0	116.9	102.4		
	58.5	57.0	116.3	101.4		
	58.5	57.0	113.6	96.7		
	58.5	57.0	116.0	100.9		

不可逆转的严重破坏,且在实际应用过程中重复性较差。本文所建的色谱条件相对温和,在能够满足

分析测定的前提下,更有利于色谱柱的维护和分析方法的普遍推广,可为四逆汤及相关制剂中主要毒性成分的监测提供方法学参考。

[参考文献]

[1] 熊曼琪. 伤寒论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 785.

[2] 季宇彬. 中药复方化学与药理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 2321.

[3] 党万太, 苗维纳, 杨晓放, 等. 基于钙调磷酸酶-活化 T 细胞核因子 3 信号转导通路探究四逆汤治疗心力衰竭的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 201.

[4] 范林乾, 刘晓, 蔡皓, 等. 四逆汤对小鼠常压耐氧和冰水游泳的影响[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2012, 28(1): 80.

[5] 陶江. 四逆汤应用举隅[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(17): 84.

[6] 陈亮, 贾彦焘, 赵成, 等. 四逆汤临床应用体会[J]. 天津中医药, 2005, 22(2): 147.

[7] 刘筱蒿, 吴伟康, 颜建云, 等. 四逆汤煎剂和缓释片剂的毒性比较[J]. 医药产业资讯, 2006, 3(20): 134.

[8] 中国药典. 一部[S]. 2010: 650.

[9] 陈德兴, 朱忠宝. 方剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 82.

[10] 刘秀秀, 晁若冰. 反向离子对色谱法测定附子中生物碱成分[J]. 药学学报, 2006, 41(4): 365.

[责任编辑 顾雪竹]