

HPLC-MS 法测定附桂骨痛胶囊中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱

索志荣¹, 秦海燕², 徐敏², 侯大斌²

1. 西南科技大学 分析测试中心, 四川 绵阳 621010

2. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010

摘要: **目的** 建立测定附桂骨痛胶囊中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的 HPLC-MS 分析方法。**方法** 采用 HPLC-MS, 色谱柱为 Polaris C₁₈-A 柱 (50 mm×2.0 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (90:10), 体积流量 0.2 mL/min, 质谱检测采用电喷雾电离源, 正离子方式检测。**结果** 新乌头碱、乌头碱和次乌头碱分别在 0.464~3.944 μg/mL ($r=0.999\ 6$)、81.6~816 ng/mL ($r=0.999\ 4$)、0.482~6.748 μg/mL ($r=0.999\ 7$) 线性关系良好, 平均回收率分别为 98.8% (RSD 3.1%)、98.1% (RSD 3.3%)、98.4% (RSD 3.3%) ($n=6$)。**结论** 该方法是一种快速、灵敏、准确的分析方法, 可以为附桂骨痛胶囊的质量控制提供科学依据。

关键词: 附桂骨痛胶囊; 新乌头碱; 乌头碱; 次乌头碱; HPLC-MS

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-1982-03

Determination of mesaconitine, aconitine, and hypaconitine in Fugui Gutong Capsula by HPLC-MS

SUO Zhi-rong¹, QIN Hai-yan², XU Min², HOU Da-bin²

1. Analytical and Testing Center, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

2. College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

Abstract: **Objective** To establish an HPLC-MS method for determining mesaconitine, aconitine, and hypaconitine in Fugui Gutong Capsula. **Methods** The separation was performed using HPLC-MS method with Polaris C₁₈-A column (50 mm × 2.0 mm, 5 μm) with the mobile phase of CH₃OH-H₂O (90:10) at flow rate of 0.2 mL/min. The detection was done by positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. **Results** The linear ranges were 0.464—3.944 μg/mL ($r=0.999\ 6$) for mesaconitine, 81.6—816 ng/mL ($r=0.999\ 4$) for aconitine, and 0.482—6.748 μg/mL ($r=0.999\ 7$) for hypaconitine, respectively. The average recoveries were 98.8% (RSD = 3.1%) for mesaconitine, 98.1% (RSD = 3.3%) for aconitine, and 98.4% (RSD = 3.3%) for hypaconitine, respectively ($n=6$). **Conclusion** A rapid, sensitive, and accurate method for the determination of mesaconitine, aconitine, and hypaconitine in Fugui Gutong Capsula is set up. The study may provide a scientific basis for the quality control of Fugui Gutong Capsula.

Key words: Fugui Gutong Capsula; mesaconitine; aconitine; hypaconitine; HPLC-MS

附桂骨痛胶囊是由附子(制)、制川乌、肉桂、党参、当归、白芍(炒)、淫羊藿等组成的常用中成药,具有温阳散寒、益气活血、消肿止痛等功效,主要用于阳虚寒湿型颈椎及膝关节增生性关节炎等的治疗。作为复方重要组份的附子(制)和制川乌均含有碱性很强的双酯型生物碱,其中乌头碱成人致死量为 2~5 mg,从染毒至死亡只需 8~4 h^[1],乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的小鼠 iv 给药的 LD₅₀ 分别为 0.12~0.27、0.1~0.13、0.47 mg/kg^[2],每年

由于服用含有附子的制剂而发生中毒的事件较多,因此对其中双酯型生物碱的检测和控制就非常重要。《中国药典》2010 年版就对附子理中丸及桂附理中丸等含有附子的制剂中乌头碱的最低量进行了控制^[3]。但一些企业为了通过质检就减少成药中附子药材的加入量甚至不加,导致成药的疗效降低。因此,只有建立含有附子的制剂中生物碱的定量检测方法才是对其质量控制必要且有效的方法。目前,对于附桂骨痛胶囊的质量控制只有用比色法测定总

收稿日期: 2010-12-23

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重大专项课题 (2006BAE01A01-12); 西南科技大学博士研究基金项目 (08zx7110); 西南科技大学青年基金项目 (09zx3129)

作者简介: 索志荣 (1973—), 男, 陕西省渭南人, 副教授, 博士, 主要从事分析化学的教学、科研工作, 已发表相关论文 50 余篇。

Tel: (0816)2419263 13981115850 E-mail: suozhirong@163.com

生物碱的量以及用 HPLC 法分别测定淫羊藿苷和芍药苷的量^[4-7],而对于其中双酯型生物碱的测定未见文献报道。本实验采用 HPLC-MS 对附桂骨痛胶囊中新乌头碱、乌头碱和次乌头碱 3 种双酯型生物碱同时进行测定,为评价和控制附桂骨痛胶囊的质量提供科学依据。

1 仪器与材料

新乌头碱、乌头碱和次乌头碱对照品由中国药品生物制品检定所提供,质量分数均大于 99.5%;3 批附桂骨痛胶囊(批号分别为 20071202、20080501、20081102)均为贵州家诚药业有限责任公司产品;甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

Varian 1200 HPLC/MS 液相色谱-质谱联用仪(带紫外检测器),优普超纯水制造系统(上海优普实业有限公司),KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取附桂骨痛胶囊内容物粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液 4 mL 充分润湿,加乙醚 40 mL 超声处理 50 min,滤过,并用乙醚洗涤

滤渣 3 次,每次 10 mL,收集、合并所有滤液,旋转蒸发挥发干溶剂,用甲醇溶解残渣,转移并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀。取适量用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得附桂骨痛胶囊供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品新乌头碱 2.32 mg、乌头碱 1.36 mg 和次乌头碱 2.41 mg,分别置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,得新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的单一成分对照品储备液。其他不同质量浓度的对照品溶液由储备液稀释得到。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Polaris C₁₈-A 柱(50 mm×2.0 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(90:10),体积流量 0.2 mL/min,温度 25 °C,检测波长 240 nm。

2.4 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源(ESI),雾化气压力 344.75 kPa,雾化针电压 5.85 kV,干燥气温度 250 °C,干燥气压力 144.795 kPa,喷雾屏蔽板电压 600 V,毛细管电压 60 V,检测器电压 1.2 kV,采用单离子扫描模式(SIM)。新乌头碱、乌头碱和次乌头碱选择的离子分别为 632.3、646.3、616.3。同 1 次进样,质谱检测和紫外检测色谱图见图 1。

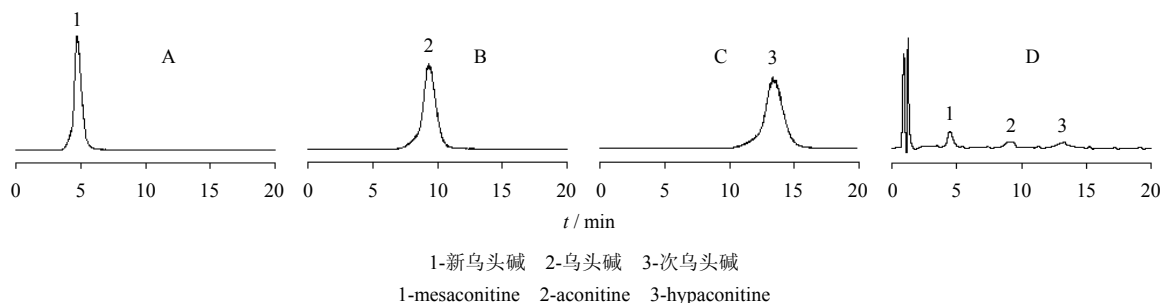


图 1 3 种生物碱质谱检测(A、B、C)和紫外检测(D)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of three alkaloids using MS detection (A, B, and C) and ultraviolet detection (D)

2.5 线性关系考察

精密移取“2.2”项所配的新乌头碱、乌头碱和次乌头碱储备液一定量于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释,配成新乌头碱质量浓度分别为 0.464、1.160、1.856、2.552、3.248、3.944 μg/mL,乌头碱质量浓度分别为 81.600、217.600、353.600、489.600、680.000、816.000 ng/mL 及次乌头碱质量浓度分别为 0.482、1.446、2.410、3.374、4.338、6.748 μg/mL 的混合对照品溶液,将上述混合对照品溶液分别平行测定 3 次(均进样 10.0 μL),以峰面积平均值对质量浓度进行线性回归,新乌头碱、乌头碱和次乌

头碱的回归方程和相关系数(r)分别为:新乌头碱 $Y=3.42 \times 10^4 X+3.07 \times 10^5$ ($r=0.9996$),乌头碱 $Y=3.90 \times 10^4 X+3.22 \times 10^5$ ($r=0.9994$),次乌头碱 $Y=6.11 \times 10^4 X+1.07 \times 10^6$ ($r=0.9997$),表明新乌头碱、乌头碱和次乌头碱分别在 0.464~3.944 μg/mL、81.6~816 ng/mL、0.482~6.748 μg/mL 线性关系良好。

2.6 精密度考察

取供试品溶液(批号 20080501),连续进样 6 次,测定,新乌头碱、乌头碱和次乌头碱峰面积积分值的 RSD 分别为 2.0%、2.4%、2.3%。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液(批号 20080501)在 8 h 之内每隔 1 h 进样考察,结果新乌头碱、乌头碱和次乌头碱峰面积积分值的 RSD 分别为 2.4%、2.9%、2.8%。

2.8 重现性试验

准确称量同一批号的样品(批号 20080501),制备供试品溶液,进样测定,新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的质量分数的 RSD 分别为 2.7%、2.8%、2.7%。

2.9 加样回收率试验

精密称取附桂骨痛胶囊样品(批号 20080501)粉末约 0.5 g,共 6 份,每份分别准确加入新乌头碱对照品储备液 200 μL 、乌头碱对照品储备液 80 μL 和次乌头碱对照品储备液 30 μL ,制备供试品溶液,进样测定。新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的平均加样回收率分别为 98.8%、98.1%、98.4%;RSD 分别为 3.1%、3.3%、3.3%。

2.10 样品测定

取 3 批样品,分别制备供试品溶液,各进样 10 μL 进行测定,用回归方程计算新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的质量分数。结果见表 1。

表 1 样品测定结果 ($n=3$)
Table 1 Determination of samples ($n=3$)

批 号	新乌头碱/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	乌头碱/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	次乌头碱/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
20071202	12.64	2.46	17.85
20080501	18.56	4.25	30.71
20081102	19.10	4.57	32.06

3 讨论

3.1 提取条件的选择

考察了各种生物碱提取方法:①药典法,取样品粉末 1.0 g 置具塞锥形瓶中,加乙醚 50 mL,振荡 10 min,加氨试液 10 mL,振荡 30 min,放置 1~2 h,分离乙醚层,蒸干,加无水乙醇 2 mL 使其溶解,定容到 10 mL 量瓶中,作为供试品溶液;②取样品粉末 1.0 g,加浓氨试液 4 mL 润湿,加乙醚 40 mL,超声处理 50 min,滤过,并用乙醚洗涤 3 次,每次 10 mL,收集、合并所有滤液,用旋转蒸发器挥发干溶剂,加入甲醇溶解残渣,定容到 10 mL 量瓶中,作为供试品溶液;③取样品粉末 1.0 g,滴加浓氨水 4 mL 浸润,再加入 40 mL 二氯甲烷,超声处理 50 min,滤过,浓缩,用二氯甲烷定容到 10 mL 量瓶中;④取样品粉末 1.0 g,加 95%乙醇 50 mL,加热

回流 2 h,回收溶剂,残渣用 20 mL, pH 2~3 的盐酸溶液溶解,用 10 mL 氯仿萃取 3 次,除去氯仿层,用 NaOH 溶液调节水溶液的 pH 值至 9~10,再用氯仿萃取 3 次,蒸干氯仿,用甲醇定容到 10 mL 量瓶中,作为供试品溶液;⑤取样品粉末 1.0 g,滴加浓氨水 4 mL 浸润,加入 95%乙醇 40 mL,超声处理 50 min,以下步骤与处理④相同。结果显示方法②提取效率最高。

3.2 检测条件的优化

由于质谱采用单离子扫描模式,样品中其他物质不会对待测成分产生干扰,并且色谱的分离度对检测影响不大,待测成分保留时间太长反而峰形变宽,灵敏度降低,故本实验采用 50 mm 的短柱在甲醇-水(90:10)条件下进行分离。同时,用 3 种生物碱混合对照品采用直接连续进样的方式,对质谱检测条件同时进行了优化。

3.3 质谱检测和紫外检测器的比较

图 1-A~D 分别为含 4.64 $\mu\text{g/mL}$ 新乌头碱、2.72 $\mu\text{g/mL}$ 乌头碱和 4.82 $\mu\text{g/mL}$ 次乌头碱的混合对照品溶液进样 10 μL 的质谱检测和紫外检测的 HPLC 色谱图。可以看出,在此质量浓度下,在紫外检测器上 3 种生物碱几乎没有响应,而在质谱上响应较强,可以得到准确检测。附桂骨痛胶囊样品溶液中此 3 种成分的质量浓度均小于此混合对照品溶液,因此用紫外检测法根本不能检测出其中 3 种生物碱,用质谱检测则很好地解决了这一问题。

参考文献

- [1] 陈冀胜,郑 硕. 中国有毒植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [2] 周远鹏,江京莉. 附子的研究-VI. 附子中乌头碱及其有关化合物的药理作用 [J]. 中药药理与临床, 1992, 8(5): 45-49.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 郑来丽,田平芳,李永生,等. 分光光度法测定附桂骨痛复方中总生物碱的含量 [J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2009, 36(4): 80-83.
- [5] 白 娟,丁元刚,肖 黎,等. 高效液相色谱法测定附桂骨痛胶囊中淫羊藿苷的含量 [J]. 解放军药学报, 2007, 23(5): 380-381.
- [6] 刘焕莉,范丽娟. 无糖附桂骨痛颗粒芍药苷含量测定的研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(7): 60-62.
- [7] 王永林,孙 挺,陶 玲,等. 用高效液相色谱法测定附桂骨痛颗粒中芍药甙量 [J]. 贵阳医学院学报, 2000, 25(1): 22-23.