

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2020.04.003

乌头类药材及其中成药乌头碱类化合物的含量测定*

徐冰¹ 张玉修² 曹胜男¹ 孙建楠^{1△}(¹ 济宁医学院公共卫生学院, 济宁 272013; ² 济宁市中医院, 济宁 272027)

摘要 **目的** 建立乌头类药材及其中成药乌头碱类化合物含量的测定方法, 为中成药质量安全评价提供依据。**方法** 以单因素实验对影响超声提取法萃取效率的提取溶剂、超声时间和提取温度等因素进行优化。采用高效液相色谱法测定乌头类两种中药和三种中成药的乌头碱类化合物。**结果** 确定了超声提取法的最佳萃取条件。根据建立的高效液相色谱法, 乌头碱和新乌头碱分别在 3.8 ~ 60.8 μg/ml 和 5.6 ~ 89.6 μg/ml 浓度范围内与峰面积呈现良好的线性相关 ($r_{\text{乌头碱}} = 0.9998$; $r_{\text{新乌头碱}} = 0.9994$); RSD 值均小于 5.21%, 加标回收率在 97.53% ~ 103.28%。**结论** 所建立的方法准确可靠, 将其分别用于市售川乌、附子、附子理中丸、桂附地黄丸和伤湿止痛膏中乌头碱和新乌头碱含量分析, 乌头碱及新乌头碱含量处在安全范围内, 符合药典标准。

关键词 高效液相色谱法; 乌头碱类化合物; 中成药

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2020)08-238-05

Content assessment of aconitines compounds in Aconitum and related proprietary Chinese medicine

XU Bing¹, ZHANG Yuxiu², CAO Shengnan¹, SUN Jiannan^{1△}(¹ School of Public Health, Jining Medical University, Jining 272013, China;² Jining Traditional Chinese Medicine Hospital, Jining 272027, China)

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of aconitines compounds in Aconitum and related proprietary Chinese medicine, and to provide a method for safety evaluation of proprietary Chinese medicine. **Methods** The extraction solvent, ultrasonic time and extraction temperature were optimized by single factor experiment. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine aconitine in two kinds of Traditional Chinese Medicines and three kinds of Chinese patent medicines. **Results**

The optimum extraction conditions for ultrasonic extraction were determined. According to the established HPLC method, the aconitine and mesaconitine exhibited good linearities ($r_{\text{aconitine}} = 0.9998$; $r_{\text{mesaconitine}} = 0.9994$) in the concentration range of 3.8 ~ 60.8 μg/ml and 5.6 ~ 89.6 μg/ml, separately. The values of RSD were both lower than 5.21%, and the spiked recoveries were in the range of 97.53% ~ 103.28%. **Conclusion**

The established method is proved to be accurate and reliable. And this method has been used to evaluate the quantities of aconitine and mesaconitine in common Traditional and proprietary Chinese medicine including *Radix Aconiti*, *Aconitum Carmichaeli* Debx, *Fuzi Lizhong pills*, *Guifu Dihuang pills* and *Shangshi Zh- itong plaster*. The results indicate that the contents of aconitine and mesaconitine are in the safety range, which also meet the standard of Chinese Pharmacopoeia 2015.

Keywords: HPLC; Aconitine substance; Proprietary Chinese medicine

乌头碱, 新乌头碱等二萜类生物碱是乌头类药

材的主要的药效成分, 具有镇痛消炎的良好功效^[1-4], 但毒性很强, 用药不当易造成中毒^[5]。经炮制后, 其中的乌头碱类化合物可转化为单酯型生物碱, 单酯型生物碱具有良好的药理活性, 且毒性

* [基金项目] 济宁医学院博士基金 (JY2015BS05); 济宁医学院大学生创新创业项目 (cx2019082)

△ [通信作者] 孙建楠, E-mail: sunjn@mail.jnmc.edu.cn

远远低于双酯型生物碱^[6],所以乌头类药材常不直接药用,而是将其炮制之后降低毒性。

目前,中成药乌头碱类成分的检测主要使用高效液相色谱法^[7-10]。该方法检测灵敏度高,对于微量检测有着重要作用;重复性好,应用广泛,常用于大批量检测。本实验采用超声提取结合高效液相色谱法方法,对市售乌头类中药和中成药中的乌头碱类物质进行测定,为安全用药提供依据和参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SHIMADZU LC-20AT 双泵高效液相色谱仪(日本岛津公司);GZY-P20-B 超纯水仪(湖南科尔顿水务有限公司);FA2104N 电子天平(上海菁海仪器有限公司);FW-100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);SB25-12DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂及样品

乌头碱对照品(批号 140303,北京恒元天启标准品有限公司);新乌头碱对照品(批号 AB664W,天津一方科技有限公司);川乌,附子(济宁广联医药公司),附子理中丸(批号 19013455、18011765,北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂),桂附地黄丸(批号 190313、181201,北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂),伤湿止痛膏(批号 191209、181101,湖南杏林春药业有限公司)。

2 方法与结果

2.1 乌头碱、新乌头碱的提取

2.1.1 标准品储备液制备 准确称取乌头碱和新乌头碱固体标准品,以甲醇作为溶剂,溶解、定容至 10ml,制得浓度分别为 3.8 μ g/ml 和 5.6 μ g/ml 的乌头碱和新乌头碱标准储备液。

2.1.2 样品处理 根据药材和中成药不同的形态分别处理。附子和川乌为块状干药材,直接用粉碎机粉碎,全部过 60 目筛备用;附子理中丸为大蜜丸,将其剪碎,研钵研细备用;桂附地黄丸为黑棕色浓缩丸,研钵研细备用;伤湿止痛膏为片状橡胶膏,除去盖衬,剪成小块备用。

2.1.3 供试液的制备 取按照 2.1.2 项处理的样品 2g 左右,精密称定,置锥形瓶中,加入 25ml pH=2 的盐酸水溶液,确保没过样品上端,用保鲜膜封住锥形瓶口防止溶剂在超声过程中挥发,于 25

℃下超声 60min,对提取液进行过滤,过滤后弃去固体,滤液室温(30℃)下过夜挥至近干,残渣以流动相比例混合溶液复溶至 2ml,用于随后的 HPLC 分析。

2.1.4 影响萃取效率的单因素实验 为了获得最佳萃取效率,本实验以附子样品为基质,对可能影响萃取效率的多个因素,包括提取溶剂的种类、超声时间和超声温度等进行了优化,确定了最佳的提取条件。

1)提取溶液。本研究分别用甲醇、乙腈、pH=2 的盐酸水溶液、pH=10 的三乙胺水溶液进行超声提取,控制超声时间为 45min,超声温度为 25℃,酸性条件下提取效果最优。见图 1。

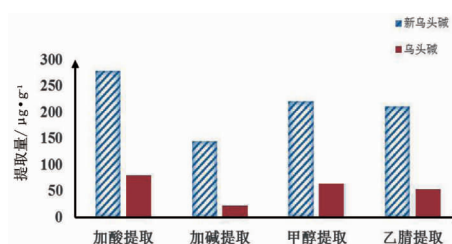


图 1 提取溶剂的优化

2)超声时间。超声时间会影响萃取效率,本实验分别考察了超声 15min、30min、45min、60min 时的萃取效率,提取效果随着超声时间的延长而增加^[11],结果显示为 60min 为最优超声时间。见图 2。

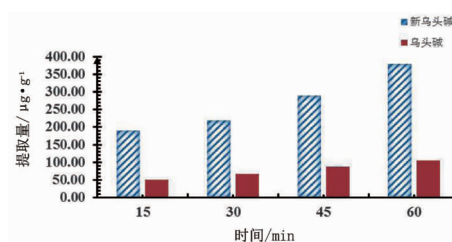


图 2 超声时间的优化

3)提取温度。本实验探究了提取温度对萃取效率的影响。结果表明,25℃为最佳提取温度(见图 3)。这可归因于待测物质对热不稳定,超声温度过高易导致分解^[12]。

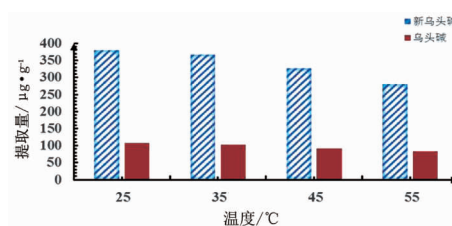


图 3 提取温度的优化

2.2 乌头碱、新乌头碱含量的测定

2.2.1 测定波长的选择 以标准溶液进液相分析,以 SPD-M20A 检测器对乌头碱和新乌头碱在 200 ~ 700 nm 范围内进行全波段扫描,发现乌头碱(图 4a)和新乌头碱(图 4b)均在 196nm、230nm 处出现两个较大吸收峰,考虑到 196nm 处产生紫外吸收的物质较多,易对样品测定产生较大基质干扰,最终选择 230nm 为乌头碱和新乌头碱的检测波长。

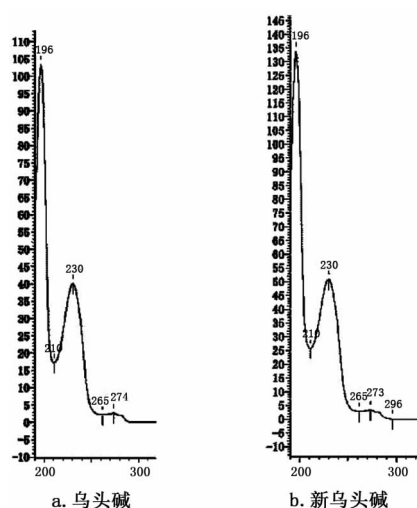
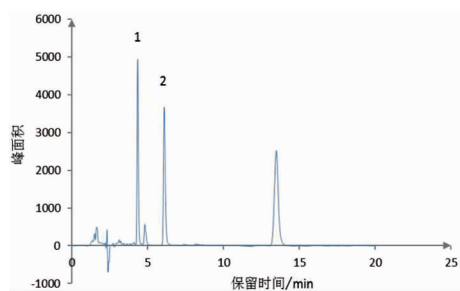


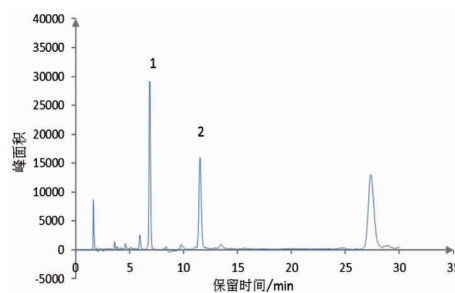
图 4 乌头碱和新乌头碱标准溶液紫外-可见光谱扫描图

2.2.2 色谱条件的优化 仅以标准溶液进样时,乙腈和 0.03% 三乙胺水溶液 (pH = 8) 以体积比 85 : 15 (v/v) 的混合溶液能将新乌头碱与乌头碱二者较好地分离。但应用于实际样品时,因中药材成分复杂,分离效果不理想。因此更换流动相比比例,选择乙腈和 0.03% 三乙胺水溶液 (pH = 8) 以体积比 60 : 40 (v/v) 的混合溶液为流动相时,样品能实现较好的分离。见图 5、6。



注:1 为新乌头碱,2 为乌头碱

图 5 85% 乙腈色谱图



注:1 为新乌头碱,2 为乌头碱

图 6 60% 乙腈色谱图

2.2.3 检出限和线性关系考察 吸取乌头碱、新乌头碱浓度分别为 3.8 μg/ml、5.6 μg/ml 的混合标准溶液,稀释至合适浓度,按照 1.1 色谱条件上机测定,以三倍信噪比所对应的浓度为检出限。见表 1。

以甲醇为溶剂,分别配制乌头碱浓度为 3.8 μg/ml, 7.6 μg/ml, 15.2 μg/ml, 30.4 μg/ml, 60.8 μg/ml, 新乌头碱浓度为 5.6 μg/ml, 11.2 μg/ml, 22.4 μg/ml, 44.8 μg/ml, 89.6 μg/ml 的混合标准溶液。以 1.1 描述的仪器条件进 HPLC 检测,记录峰面积。以标准品的浓度为横坐标 (μg/ml),以峰面积为纵坐标,得到线性方程(表 1)。

表 1 检出限及线性关系

标准品名称	检出限 / μg · ml ⁻¹	回归方程	线性范围 / μg · ml ⁻¹	r
乌头碱	0.69	y = 15717x + 471.07	3.8 ~ 60.8	0.9998
新乌头碱	0.12	y = 8264.9x - 4261.8	5.6 ~ 89.6	0.9994

2.2.4 日内精密度 吸取乌头碱浓度为 15.2 μg/ml, 新乌头碱浓度为 22.4 μg/ml 的混合标准溶液 10 μl, 在 24h 内,每隔 1h 进样 1 次,连续进样 6 次,计算 6 次峰面积的平均值及 RSD 值。见表 2。

2.2.5 日间精密度 选取配制好的乌头碱浓度为 3.8 μg/ml, 新乌头碱浓度为 5.6 μg/ml 的混合标准溶液,两星期内选取 3d,每天平行测定 3 次,计算三日峰面积的平均值及 RSD 值,见表 2。

表 2 精密度

	日间精密度 RSD/%	日内精密度 RSD/%
乌头碱	5.1	5.2
新乌头碱	4.6	4.7

2.2.6 稳定性 取按照 2.1.3 制备的桂附地黄丸样品供试液,按照确定的色谱条件,分别在 0、2、4、6、8、10、12、24h 测定各成分的峰面积,记录各化合物的峰面积并计算相对标准偏差。乌头碱和新乌

头碱峰面积的 RSD 值为 4.8% 和 4.5%。供试液可在 1d 内保持基本稳定。

2.2.7 重复性 取 5 份同一批次桂附地黄丸样品,按照 2.1.3 方法制备供试液,将供试液进 HPLC 分析,记录峰面积并计算 RSD 值。乌头碱和新乌头碱峰面积的 RSD 值分别为 4.6% 和 4.2%。

2.2.8 加标回收率 依据桂附地黄丸(批号 181201)中乌头碱和新乌头碱含量的 80%,100%,120%,加适量对照品到桂附地黄丸样品中,按照 2.1.2 和 2.1.3 的步骤进行提取,每个样品平行进样 3 次,计算加标回收率。乌头碱和新乌头碱在低、中、高 3 个浓度范围内,加标回收率均控制在 99.84%~103.28%,该方法准确可靠。见表 3。

表 3 加标回收率

目标物质	样品量 /g	加入量 /μg	测得量 /μg	样品中量 /μg	回收率	精密度
乌头碱	2.014	10.67	24.21	13.33	101.97%	0.90%
		10.67	24.35	13.33	103.28%	
		10.67	24.16	13.33	101.50%	
	2.0172	13.35	26.37	13.35	97.53%	1.30%
		13.35	26.62	13.35	99.40%	
		13.35	26.71	13.35	100.07%	
	2.0127	15.99	29.45	13.32	100.88%	0.68%
		15.99	29.67	13.32	102.25%	
		15.99	29.58	13.32	101.69%	
新乌头碱	2.014	50.32	113.65	62.9	100.85%	0.52%
		50.32	113.29	62.9	100.14%	
		50.32	113.14	62.9	99.84%	
	2.0172	62.9	125.76	62.9	99.94%	0.09%
		62.9	125.87	62.9	100.11%	
		62.9	125.81	62.9	100.02%	
	2.0127	75.48	138.49	62.9	100.15%	0.12%
		75.48	138.36	62.9	99.97%	
		75.48	138.32	62.9	99.92%	

2.2.9 实际样品分析 将购买的川乌和附子两种中药,两个批次的 3 种常见含附子类药材的中成药,按照样品处理步骤处理后,进 HPLC 分析,每个样品测定 3 次,利用 3 次峰面积平均值计算每种药物中乌头碱和新乌头碱的含量,检测结果如表 4、5 所示。

表 4 中药材中乌头碱及新乌头碱测定结果(μg/g)

样品名称	乌头碱	新乌头碱
川乌	211.34	405.16
附子	109.10	388.04

表 5 中成药中乌头碱及新乌头碱测定结果(μg/g)

中成药	批号	乌头碱	新乌头碱
附子理中丸	19013455	4.5	11.2
	18011765	4.7	12.1
桂附地黄丸	181201	6.0	32.1
	190313	6.5	28.9
伤湿止痛膏	191209	2.1	5.2
	181101	2.2	4.6

2.3 用药安全分析

查阅《中华人民共和国药典》(2015 版)可知,制川乌中所允许存在的双酯型生物碱最大浓度为 0.40mg/g,根据小鼠灌胃的 LD50 推算,双酯型生物碱 LD50 为 1.01mg/kg,若以一个 60kg 体重的成年人的服用剂量计算,结果显示附子理中丸、桂附地黄丸未超过服用剂量;通过伤湿止痛膏摄入的乌头碱含量也低于 LD50 的剂量,但是没有经过炮制的川乌、附子含量较高,不宜直接服用。

3 结论

本实验建立的超声提取结合高效液相色谱法,能准确测定原药材和相关中成药中乌头碱与新乌头碱含量。所建立的方法准确、高效、可靠,可为中成药类的用药安全和质量评估提供依据和参考。

参考文献:

- [1] 张卫东,韩公羽,梁华清,等.国内外对中药附子成分与活性的研究[J].药学实践杂志,1996,14(2):91-95.
- [2] 荣宝山,韩雪梅,麻春杰,等.《金匱要略》中预防乌头类方剂中毒方法浅谈[J].中华中医药杂志,2016,31(4):1454-1456.
- [3] Sun B, Wu SM, Li L, et al. A metabolomic analysis of the toxicity of Aconitum sp. Alkaloids in rats using gas chromatography/mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectr, 2009, 23(1): 1221-1228. DOI: 10.1002/rcm.3992.
- [4] Oyama T, Isono T, Suzuki Y, et al. Anti-nociceptive effects of aconiti tuber and its alkaloids[J]. America J Chin Medi, 1994, 22(2): 175-182. DOI: 10.1142/S0192415X94000218.
- [5] 彭劲,刘莉萍,金永日,等. RP-HPLC-ELSD 测定草乌中准噶尔乌头碱的含量[J].中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 80-83. DOI: 10.13422/j.cnki.sylx.2016110080.

(下转第 247 页)

10. 1016/j. carbpol. 2008. 10. 031.
- [10] Prasad K, Mehta G, Meena R, et al. Hydrogel-forming agar-graft-PVP and κ -carrageenan graft-PVP blends: rapid synthesis and characterization [J]. J Appl Polym Sci, 2006, 102 (4): 3654-3663. DOI: 10. 1002/app. 24145.
- [11] Prasad K, Kaneko Y, Kadokawa J. Novel gelling systems of κ -, ι - and λ -carrageenans and their composite gels with cellulose using ionic liquid [J]. Macromol Biosci, 2009, 9 (4): 376-382. DOI: 10. 1002/mabi. 200800179.
- [12] 陈召红, 刘皈阳, 魏亚超. 脂质体包封率测定方法研究进展 [J]. 解放军药理学学报, 2011, 27 (1): 79-82.
- [13] Narayani R, Panduranga Rao K. Preparation characterization and in vitro stability of hydrophilic gelation microspheres using a gelation-methotrexate conjugate [J]. Int J Pharmaceut, 1993, 95: 85-91. DOI: 10. 1016/0378-5173(93)90393-T.
- [14] 张建新, Rochas C, Rinaudo M. Kappa-卡拉胶和琼脂糖及其共凝胶的性质与温度的关系 [J]. 华东化学学院学报, 1990, 16 (3): 322-328.
- [15] 张建新, Rochas C, Rinaudo M. 琼脂糖和卡拉胶在凝胶中的相互作用 [J]. 华东化学学院学报, 1990, 16 (4): 386-391.
- [16] 桑璐媛. 环糊精对 K-卡拉胶凝胶特性的影响及其应用研究 [D]. 郑州: 河南工业大学, 2017.
- [17] Chen SC, Wu YC, Mi FL, et al. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery [J]. J Control Release, 2004, 96 (2): 285-300. DOI: 10. 1016/j. jconrel. 2004. 02. 002.
- [18] 薛巍, 张渊明. 生物医用水凝胶 [M]. 广州: 暨南大学出版社, 2012.
- [19] 张波, 王慧云, 全先高, 等. 5-氟尿嘧啶的囊泡制备及体外释放研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22 (25): 42-45.

(收稿日期 2020-02-20)

(本文编辑: 石俊强)

(上接第 241 页)

- [6] 刘菊, 张惠霞, 张红伟, 等. HPLC 法同时测定痹通药酒中 4 种生物碱成分 [J]. 中成药, 2017, 39 (12): 26-32. DOI: 10. 3969 /j. issn. 1001-1528. 2017. 12. 045.
- [7] 史煜华, 黄文康, 黄琴伟, 等. SPE-HPLC 测定风湿骨痛片中 6 种生物碱类物质的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35 (12): 1797-1800. DOI: 10. 13748/j. cnki. issn1007-7693. 2018. 12. 009.
- [8] 张聿梅, 何轶, 李耀磊, 等. 高效液相色谱与 QDA 质谱联用同时测定附子理中丸中 6 个单酯及双酯型生物碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (7): 1248-1253. DOI: 10. 13422/j. cnki. syfix. 2016110080.
- [9] 咎珂, 旺杰次仁, 鲁静, 等. HPLC 测定蒙药材草乌叶中 4 种双酯型二萜生物碱含量 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (4): 766-771. DOI: 10. 19540/j. cnki. cjcmm. 20180104. 08.
- [10] 何凤艳, 何轶, 戴忠, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定骨刺片中 7 个生物碱的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (10): 1810-1816.
- [11] 李艳芝, 刘树玲, 刘文杰, 等. 蒲公英黄酮类成分超声辅助半仿生提取及含量测定 [J]. 济宁医学院学报, 2020, 43 (1): 5-9. DOI: 10. 3969/J. issn. 1000-9760. 2020. 01. 002.
- [12] 李萌, 张根衍, 潘桂湘. 乌头类生物碱稳定性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16 (1): 52-55. DOI: 10. 13194/j. issn. 1673-842x. 2014. 01. 019.

(收稿日期 2019-12-30)

(本文编辑: 石俊强)

欢迎投稿 欢迎订阅