

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.02.018

藏药肺热普清散中乌头碱的限量检测

马 静¹, 邹 丽^{1△}, 王 曙²

(1. 四川省药品检验研究院·四川省医疗器械检测中心, 四川 成都 611731; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立测定藏药肺热普清散中乌头碱含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Phenomenex ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05 mol/L 醋酸铵-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 235 nm, 柱温为 35℃, 进样量为 10 μL。结果 乌头碱进样量在 0.046~1.440 μg 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 6$, $n=6$), 检测限为 1.2 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$), 平均加样回收率为 99.32%, RSD 为 0.41% ($n=6$)。结论 所建立的方法稳定可靠, 重复性好, 可用于测定肺热普清散中乌头碱的含量。

关键词: 乌头碱; 肺热普清散; 限量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)02-0068-03

Limitation Determination of Aconitine in Feire Puqing Powder

MA Jing¹, ZOU Li¹, WANG Shu²

(1. Sichuan Institute of Drug Control · Sichuan Testing Center of Medical Devices, Chengdu, Sichuan, China 611731; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, China 610041)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of aconitine in Feire Puqing Powder. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.05 mol/L ammonium acetate-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 235 nm, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of aconitine was 0.046-1.440 μg ($r=0.999\ 6$, $n=6$), and the limit of detection (LOD) was 1.2 μg/mL. The RSD s of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0% ($n=6$), and the average recovery of aconitine was 99.32% with an RSD of 0.41% ($n=6$). **Conclusion** The method is stable, reliable and reproducible, which can be used for the content determination of aconitine in Feire Puqing Powder.

Key words: aconitine; Feire Puqing Powder; limit determination; HPLC

肺热普清散(藏文名为洛才更赛), 收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药: 第一册》^[1]中, 主要由天竺黄、红花、力嘎都、丛菴、铁棒锤幼苗等14味藏药组方, 具有清肺、泄热、消炎功效, 可用于治疗小儿肺炎、流感、风热、疟疾等。方中铁棒锤幼苗为铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch 和伏毛铁棒锤 *A. flavum* Hand. Mazz. 的干燥幼苗, 为藏医、羌医和回医民族习用药材, 多用于治疗感冒、瘟疫、热毒、疮疖等^[2-3]。铁棒锤有大毒, 各器官中均含有二萜生物碱, 含量由高到低依次为根、果、茎、叶, 母根和子根毒性虽大, 但疗效显著, 幼苗的毒性稍小, 但疗效稍次^[4]。块根中的总生物碱含量随生长发育期的变化而不同, 其中6~11月的块根中总生物碱含量随生长期的延长而逐渐升高, 10月的含量可达 (9.07 ± 0.92) mg/g^[5-7]。肺热普清散方中所用铁棒锤幼苗而非块根, 说明藏医药前辈已注意到了该类药材的毒性。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法对该制剂中含有双酯型二萜类生物碱中主要成分乌头碱进行含

量限度检测, 克服了薄层色谱鉴别中样品的杂质干扰和斑点不清晰的情况^[8-12]。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-10AT型高效液相色谱仪, 包括SPD-M10Avp型紫外检测器、CLASSVP工作站(日本Shimadzu公司); HWS24型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); XP205DR型十万分之一电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 试剂

肺热普清散(西藏神猴药业有限公司, 批号分别为171101, 171102, 171103, 171201, 171202, 171203); 乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为110720-200410, 含量>98.0%); 醋酸铵、乙腈、四氢呋喃为色谱纯, 乙醇、盐酸、氨水、乙酸乙酯为分析纯, 水为纯净水。

第一作者: 马静, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向为中药的质量控制和研发, (电子信箱)mandy23@163.com。

[△]通信作者: 邹丽, 女, 硕士, 主任药师, 研究方向为中药质量分析, (电子信箱)1312785625@qq.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol/L 醋酸铵(A, 用氨水调pH至10) – 乙腈(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 235 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间(min)	A	时间(min)	A
0 ~ 5	74% → 69%	25 ~ 41	40% → 25%
5 ~ 20	69% → 64%	41 ~ 42	25% → 74%
20 ~ 25	64% → 40%	42 ~ 49	74%

2.2 溶液制备

对照品溶液: 精密称取乌头碱对照品 14.4 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 加异丙醇 – 二氯甲烷(1:1, V/V) 溶液溶解并定容, 摇匀, 制成质量浓度为 0.144 mg/mL 的对照品贮备液; 精密吸取 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加异丙醇 – 二氯甲烷(1:1, V/V) 溶液定容, 摇匀, 制得质量浓度为 14.4 μg/mL 的对照品溶液。

供试品溶液: 取样品 20 g, 用乙醇 200 mL 加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 滤过, 蒸干, 残渣加 2% 盐酸溶液 40 mL 使溶解, 用氨水调 pH 至 5; 经 D₁₀₁ 大孔吸附树脂(柱体积为 50 mL), 依次用水和 10% 乙醇 150 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 再用 85% 乙醇 100 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣加 2% 盐酸溶液 40 mL 溶解, 并转移至分液漏斗中, 用氨水调 pH 至 10, 以乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 40 mL, 合并萃取液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 并转移至 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得。

阴性对照品溶液: 按处方工艺制备不含铁棒锤幼苗的阴性对照样品, 按供试品溶液制备方法制备, 即得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取 2.2 项下 3 种溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果, 理论板数按乌头碱峰计应不低于 2 000; 分离度大于 1.5, 基线

分离良好。色谱图见图 1。

线性关系考察: 取 2.2 项下对照品溶液适量, 加异丙醇 – 二氯甲烷(1:1, V/V) 溶液, 制成质量浓度分别为 4.6, 8.8, 24.0, 48.0, 72.0, 144.0 μg/mL 的系列对照品溶液。精密吸取 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以乌头碱进样量($X, \mu\text{g}$) 为横坐标、峰面积(Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 49\,878X + 8\,166$ ($r = 0.999\,6, n = 6$)。结果表明, 乌头碱进样量在 0.046 ~ 1.440 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限考察: 分别精密量取 2.2 项下对照品溶液适量, 倍比稀释, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以信噪比(S/N) 10:1 和 3:1 时的质量浓度记作定量限和检测限。结果乌头碱的定量限和检测限分别为 5.0 μg/mL 和 1.2 μg/mL。

精密度试验: 取 2.2 项下对照品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果乌头碱峰面积的 RSD 为 1.08% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

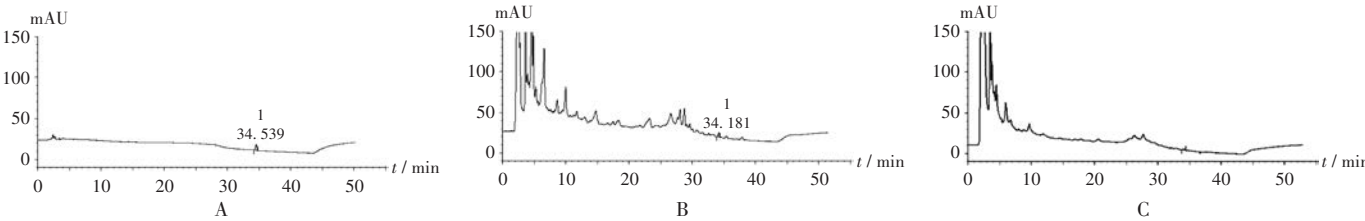
稳定性试验: 精密量取 2.2 项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果乌头碱峰面积的 RSD 为 1.43% ($n = 6$), 表明供试品溶液在室温下放置 10 h 内基本稳定。

重复性试验: 精密称取样品(批号为 171101) 适量, 共 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果乌头碱平均含量的 RSD 为 1.51% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品(批号为 171101) 适量, 共 6 份, 分别加入一定质量浓度的对照品溶液, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 2。

2.4 样品含量测定

取 6 批样品各适量, 分别按 2.2 项下方法制备供试



1. 乌头碱
A 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Aconitine

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表2 加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 2 Results of the recovery test ($n=6$)

取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
10.013 42	0.052 1	0.051 3	0.102 9	99.03	99.32	0.41
10.011 53	0.052 1	0.051 3	0.103 7	100.58		
10.009 87	0.052 1	0.051 3	0.102 3	97.86		
10.017 14	0.052 1	0.051 3	0.103 5	100.19		
10.021 95	0.052 1	0.051 3	0.102 7	98.64		
10.016 26	0.052 1	0.051 3	0.103 2	99.61		

表3 样品中乌头碱含量测定结果(mg/g, $n=3$)
Tab. 3 Results of content determination of aconitine in the
samples(mg/g, $n=3$)

批号	乌头碱	$\bar{X}$
171101	0.004 5	0.004 5
171102	0.003 8	
171103	0.005 2	
171201	0.004 1	
171202	0.004 6	
171203	0.005 0	

品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表3。

健康成人口服0.2 mg乌头碱可发生中毒反应,2.0~4.0 mg即可致死。本试验中,乌头碱的平均含量为0.004 5 mg/g,肺热普清散的用量为每次1袋,每袋1 g,每日2次,故每日服用乌头碱的量为9.0 μ g,远低于乌头碱的中毒剂量,表明在该剂量下常规用药合理、安全。

3 讨论

肺热普清散为藏药,藏药的来源多为民间草药,由于人们对民族医药的认知过少,常忽略个别药材毒副作用的危害,加之我国民族药的有效性、安全性和毒性评价体系不健全,一直影响和制约着民族医药产业的发展。预试验中测定过铁棒锤幼苗中双酯型生物碱(乌头碱、次乌头碱、新乌头碱),但仅检出乌头碱,故本研究中仅对不同来源铁棒锤幼苗药材中的乌头碱进行了含量测定,并制订了肺热普清散中乌头碱的限量。

预试验中也考察了不同流动相,包括0.25 mol/L乙酸铵溶液(用浓氨水调pH至9.5)-乙腈(48:52, V/V)^[13],甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾-醋酸-异丙醇(67:173:4:4, V/V/V/V)^[14],甲醇-0.2 mol/L醋酸铵-冰醋酸(67:33:1, V/V/V)^[15],以及乙腈-四氢呋喃(25:15, V/V)-0.1 mol/L醋酸铵(梯度洗脱)^[16]对结果的影响,但部分主峰与其他杂质峰不能完全分离,或阴性干扰较严重。故对上述流动相条件进行了优

化,以0.05 mol/L乙酸铵溶液(pH 10)-乙腈为流动相进行梯度洗脱时的效果较好,杂质无干扰。

预试验中还考察了不同厂家的色谱柱,包括Shim-pack C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m;日本Shimadzu公司)和Phenomenex C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m;广州菲罗门科学仪器有限公司),结果表明,在不同色谱柱上,基线分离均较好,含量测定结果无明显差异。

综上所述,所建立的方法稳定可靠,重复性好,可用于测定肺热普清散中乌头碱的含量。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药:第1册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1995:79.

[2] 杨智锋,刘建峰,张红,等. 铁棒锤药材质量标准研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(22):1771.

[3] 李满,许强,康建宏,等. 铁棒锤的研究进展[J]. 农业科学研究,2007,28(1):49.

[4] 帝玛尔·丹增彭措,著. 晶珠本草(汉译本)[M]. 毛继祖,译. 上海:上海科学技术出版社,1986:321.

[5] 顾洁,王俊,王鸿,等. 伏毛铁棒锤不同器官生物碱含量动态变化研究[J]. 西北植物学报,2010,30(1):170-174.

[6] 王毓杰,曾陈娟,姚喆,等. 民族药铁棒锤不同药用部位中生物碱含量测定[J]. 中成药,2010,32(8):1390-1393.

[7] 杨长花,王西芳. 秦岭产4种乌头地上部分生物碱含量测定[J]. 西北药学杂志,2008,23(6):364-365.

[8] 贾秀凌,李木子,邱琳,等. 益肾消肿丸中乌头碱限量检查方法和五味子醇甲含量测定研究[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2015,17(11):2296-2299.

[9] 唐凤岚,周梁,王静. 薄层色谱法检查风湿灵片中乌头碱限量[J]. 中国民族民间医药,2013,22(5):25.

[10] 陈震尧,陈金英,姚伟生. 乌芪舒筋通络片中乌头碱限量检测方法研究[J]. 中国药房,2015,26(36):5144-5146.

[11] 赫清雪,王爱武,王楠楠. 3种抗风湿中成药乌头碱限量检查[J]. 中国中医药信息杂志,2012(9):59-60.

[12] 欧丽娜,阳勇,李星颖,等. HPLC法测定藏药榜那中乌头碱的含量[J]. 中国药房,2014,25(19):1769-1771.

[13] 陈燕,易进海,刘云华,等. HPLC法测定藏药材铁棒锤、榜嘎中双酯型生物碱的含量[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2009,11(4):570-573.

[14] 杜连平,王金霞,贺世娟,等. 藏药二十五味肺病胶囊质量标准研究[J]. 食品与药品,2014,16(6):417-421.

[15] 常锦明,宋清宏,曹焯民,等. HPLC法测定不同产地及炮制方法的乌头类药材生物碱含量[J]. 上海中医药杂志,2014,48(7):99-103.

[16] 谷军,王燕萍,马潇. HPLC法同时测定藏药铁棒锤中3种双酯型生物碱的含量[J]. 中国药事,2014,28(6):618-621.

(收稿日期:2021-04-15;修回日期:2021-09-05)