

小活络丸中乌头类生物碱成分含量测定方法的建立

赵振霞, 苏建, 曹春琪, 王璐, 刘永利* (河北省药品医疗器械检验研究院, 河北省中药质量评价与标准研究重点实验室, 石家庄 050227)

摘要 目的: 建立小活络丸中生物碱成分乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱与苯甲酰新乌头原碱的含量测定方法, 以完善其质量标准。方法: 采用高效液相色谱法, 选择PICKERING C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇、乙腈和0.1%磷酸水为流动相, 梯度洗脱, 流速1.0 mL·min⁻¹, 柱温25 °C, 检测波长232 nm, 进样量15 μL。结果: 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱及苯甲酰新乌头原碱分别在各自范围内线性关系良好 ($r=0.9999$), 平均加样回收率分别为99.8% (RSD=0.8%)、99.9% (RSD=1.0%)、100.6% (RSD=1.4%)、100.8% (RSD=1.5%)、100.9% (RSD=1.5%)、100.6% (RSD=0.8%)。5批样品中上述6个成分含量范围分别为0.5~2.9、5.4~27.4、0.5~10.5、18.8~24.6、18.8~30.2及142.4~181.6 μg·g⁻¹。结论: 所建立的同时测定6个生物碱含量的测定方法可准确测定小活络丸中生物碱成分的含量, 有助于提高小活络丸的质量标准。

关键词: 小活络丸; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 苯甲酰新乌头原碱; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)07-0798-10

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.07.009

Establishment of Content Determination Method of Aconitum Alkaloids in Xiaohuoluo Pills

Zhao Zhenxia, Su Jian, Cao Chunqi, Wang Lu, Liu Yongli* (Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Hebei Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Evaluation and Standard Research, Shijiazhuang 050227, China)

Abstract Objective: To establish the method for determination of aconitine, hyaconitine, mesaconitine, benzoylaconine, benzoylhyaconitine and benzoylmesaconine in Xiaohuoluo Pills, in order to improve its quality standard. **Methods:** HPLC was performed on PICKERING C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phases composed of methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ in gradient elution mode. The column temperature was 25 °C, the detection wavelength was 232 nm and the injection volume was 15 μL. **Results:** Aconitine, hyaconitine, mesaconitine, benzoylaconine, benzoyl hyaconitine and benzoylmesaconine showed good linear relationships in their respective ranges ($r>0.9999$), average sample recoveries were 99.8% (RSD=0.8%), 99.9% (RSD=1.0%), 100.6% (RSD=1.4%), 100.8% (RSD=1.5%), 100.9%

基金项目: 河北省市场监督管理局科研计划项目川乌、附子及其制剂中毒性成分质量控制方法研究 (编号 2021YJ01)

作者简介: 赵振霞 Tel: 13623213609; E-mail: 347749757@qq.com

通信作者: 刘永利 Tel: 13932166206; E-mail: liuyongli2008@126.com

(RSD=1.5%), 100.6% (RSD=0.8%) respectively. The content ranges of six ingredients in 5 batches of samples were 0.5-2.9, 5.4-27.4, 0.5-10.5, 18.8-24.6, 18.8-30.2 and 142.4-181.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The established method for simultaneous determination of 6 alkaloids could accurately determine the content of aconitum alkaloids in Xiaohuoluo Pills, which is helpful to improve the quality standard of Xiaohuoluo Pills.

Keywords: Xiaohuoluo Pills; aconitine; hypaconitine; mesaconitine; benzoylaconine; benzoylhypaconine; benzoylmesaconine; content determination

小活络丸为传统中成药, 始载于宋代《太平惠民和剂局方》, 原名活络丹, 《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)1963年版一部以“小活络丹”名称收载, 1977年版《中国药典》修改为“小活络丸”, 此后历版药典均以“小活络丸”收载。小活络丸由胆南星、制川乌、制草乌、地龙、乳香(制)、没药(制)6味中药组成, 临床常用于风寒湿邪闭阻、痰瘀阻络所致的痹病^[1]。方中制川乌、制草乌为毛茛科乌头类中药材, 为我国最早有记载的药用有毒植物之一, 其中所含的二萜类双酯型生物碱, 包括新乌头碱、次乌头碱、乌头碱, 有大毒, 主要对神经和心血管系统造成严重伤害^[2-3]。例如成人口服乌头碱0.2 mg即可引起中毒, 3~5 mg可致死。乌头属植物作为临床用药时, 常因炮制或用药不当引起中毒甚至死亡^[4-6]。此类药材经过炮制加工后, 可水解为相应的二萜类单酯型生物碱, 包括苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱, 其活性存在, 毒性降低, 治疗指数提高, 常作为主要的药效成分应用于临床^[7]。制川乌、制草乌温经散寒、祛风除湿, 通痹止痛, 为君药, 但《中国药典》2020年版一部小活络丸质量标准中仅收载有乌头碱的TLC限量检查项, 难以全面控制方中毒性药味的质量, 因此, 建立小活络丸中二萜类生物碱含量的测定方法, 并控制其范围, 对保证临床疗效和用药安全具有重要意义。

HPLC法具有高效、灵敏, 操作简便, 准确性高等优点, 为了保证产品临床疗效及安全, 本研究参照相关文献^[8-12], 结合《中国药典》中制川乌、制草乌的含量测定方法, 以苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱作为指标成分, 建立同时测定小活络丸中6个生物碱类成分的含量测定方法, 保证了

临床用药的安全性与有效性, 为产品的质量控制和质量评价提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters e2695高效液相色谱仪, 配备四元泵和DAD检测器(Waters公司); Mettler XPE26型电子天平(梅特勒公司, 0.001 mg); Mettler XS105DU型电子天平(梅特勒公司, 0.01 mg); KQ-400KDE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q型超纯水净化系统(Millipore公司)。

1.2 试剂

乌头双酯型生物碱对照提取物(批号112029-201601, 供含量测定用, 含量以新乌头碱31.7%, 次乌头碱30.0%, 乌头碱31.8%计)及对照品苯甲酰新乌头原碱(批号111795-201604, 含量以94.0%计)、苯甲酰乌头原碱(批号111794-201705, 含量以99.1%计)、苯甲酰次乌头原碱(批号111796-201906, 含量以97.2%计)均购自中国食品药品检定研究院。

5批小活络丸样品均购自药店(企业1, 共1批, 批号210401; 企业2, 共1批, 批号210603; 企业3, 共3批, 批号200901、200902、200903); 甲醇、乙腈(色谱纯, Merck公司); 水为超纯水, 自制; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

选用PICKERING C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱; 以甲醇为流动相A, 乙腈为流动相B, 0.1%磷酸为流动相C, 梯度洗脱程序见表1, 流速1.0 mL·min⁻¹; 柱温25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长232 nm; 进样量15 μL 。

表1 梯度洗脱程序

时间 /min	比例 /%		
	流动相 A	流动相 B	流动相 C
0 ~ 10	30	7	63
10 ~ 50	30 → 45	7	63 → 48

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液

精密称取乌头双酯型生物碱对照提取物30.276 mg及对照品苯甲酰新乌头原碱30.125 mg、苯甲酰乌头原碱10.134 mg、苯甲酰次乌头原碱10.005 mg，置同一100 mL量瓶中，加乙腈制成混合对照品储备液；精密量取混合对照品储备液5 mL，置50 mL量瓶中，加乙腈-浓氨试液（90：10）稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.2 供试品溶液

取本品适量，剪碎，取约3 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入0.2 mol·L⁻¹盐酸溶液25 mL，密塞，称量，超声处理（功率400 W，频率40 kHz）30 min（水温40℃以下），放冷，再称量，用0.2 mol·L⁻¹盐酸溶液补足减失的量，摇匀，离心（转速6000 r·min⁻¹）20 min；精密量取续滤液15 mL，置于处理好的固相萃取柱（以混合型阳离子交换反相吸附剂为填充剂的固相萃取柱，500 mg，6 mL，用前依次用乙腈、水各6 mL洗脱）上，依次以0.05 mol·L⁻¹盐酸溶液、乙腈各10 mL洗脱，弃去洗脱液，放置5 min，继用乙腈-浓氨试液（90：10）5 mL洗脱，洗脱液收集于5 mL量瓶中，并定容至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性样品溶液

按小活络丸处方比例与制备工艺，制备缺制川乌与制草乌的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制

备阴性样品溶液。

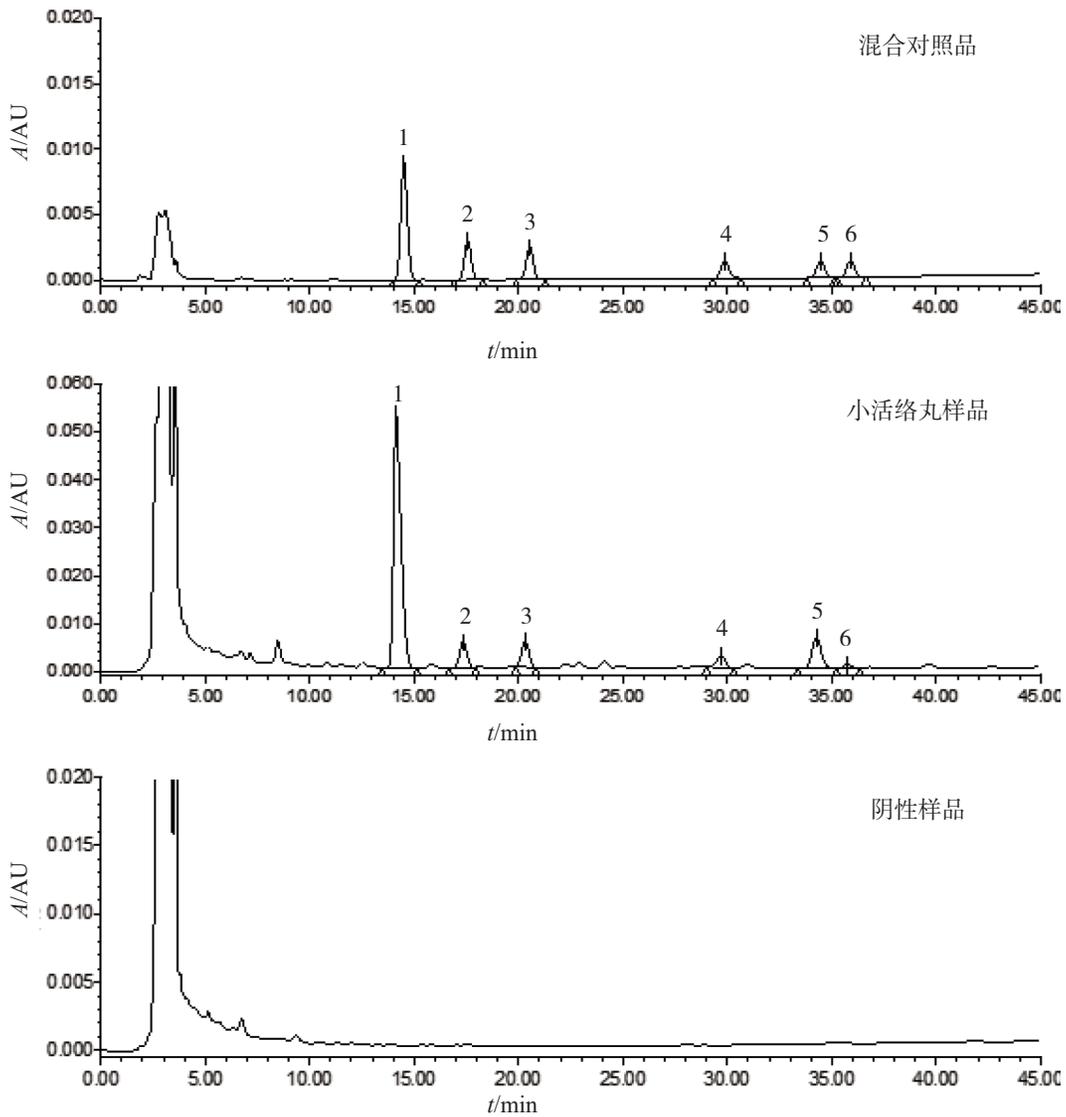
2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液，分别按“2.1”项下色谱条件，分别进样测定，记录色谱图，见图1。在样品色谱图中，分别显示与对照品苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱与乌头碱保留时间一致的色谱峰；阴性样品色谱图中无相应的色谱峰，说明除制川乌、制草乌外的其他药味不干扰待测成分的测定，方法专属性良好。

2.3.2 线性关系考察

用乙腈-浓氨试液（90：10）分别配制苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱与乌头碱质量浓度依次为272.567、108.322、105.183、91.813、86.889、92.102 μg·mL⁻¹的对照品储备液，分别稀释为系列浓度的对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以对照品进样量（*x*，ng）为横坐标，峰面积积分值（*y*）为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表2，表明各成分在各自线性范围内线性关系良好。另取“2.2.1”混合对照品溶液逐级稀释，按“2.1”项下色谱条件进样测定，当信噪比为3：1时测得检测限，当信噪比为10：1时测得定量限，结果见表2。



1. 苯甲酰新乌头原碱; 2. 苯甲酰乌头原碱; 3. 苯甲酰次乌头原碱; 4. 新乌头碱; 5. 次乌头碱; 6. 乌头碱。

图1 混合对照品、样品及阴性样品 HPLC 色谱图

表2 各成分线性关系、检测限和定量限

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 /ng	检测限 /ng	定量限 /ng
苯甲酰新乌头原碱	$y = 1455.9x - 8345.2$	0.9999	40.885~4088.5	2.0443	4.0885
苯甲酰乌头原碱	$y = 1265.8x - 3585.3$	0.9999	16.248~1624.8	1.6248	3.2497
苯甲酰次乌头原碱	$y = 1301.5x - 3455.3$	0.9999	15.777~1577.1	1.5777	3.1555
新乌头碱	$y = 1345.4x - 8115.3$	0.9999	13.772~1377.2	1.3772	2.7544
次乌头碱	$y = 1398.5x - 8363.7$	0.9999	13.033~1303.3	1.3033	2.6067
乌头碱	$y = 1315.9x - 8133.4$	0.9999	13.815~1381.5	1.3815	2.7631

2.3.3 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液15 μL ，分别按“2.1”项下色谱条件连续进样6次，记录各成分峰面积积分值，并计算RSD。结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱峰面积的RSD分别为0.8%、0.5%、0.3%、0.7%、0.6%和0.5%，结果表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验

精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液各15 μL ，分别在配制后0、2、4、8、12、18、24 h按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录各成分峰面积积分

值，计算RSD。结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱峰面积的RSD分别为0.5%、0.4%、1.2%、0.8%、0.5%、0.7%，结果表明试验制得的供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.5 重复性试验

取小活络丸样品（批号210603）适量，剪碎，分别取1.5、3.0、4.5 g各3份，精密称定，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录各成分峰面积积分值，计算含量及其RSD，结果见表3，表明该方法重复性良好。

表3 重复性试验结果

编号	称样量/g	含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)					
		苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱
1	1.5016	141.335	18.9275	19.0867	5.9221	10.2633	1.8041
2	1.5029	142.887	18.7849	18.7068	5.8871	10.1647	1.7949
3	1.5021	144.776	18.6432	18.5546	5.8567	10.5849	1.8054
4	3.0015	143.221	18.9948	18.6878	5.8498	10.3258	1.7938
5	3.0022	142.339	18.6637	19.2547	5.8954	10.2679	1.7835
6	3.0025	142.667	19.0109	18.9987	5.9034	10.3349	1.7454
7	4.5023	143.239	18.2985	18.6542	5.9543	10.1759	1.8067
8	4.5071	140.668	18.9847	18.3324	5.9849	10.0237	1.7935
9	4.5010	140.225	18.5237	18.7894	5.7657	10.1287	1.7845
平均 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)		142.373	18.7591	18.7850	5.8910	10.2522	1.7902
RSD/%		1.0	1.4	1.6	1.1	1.6	0.8

2.3.6 加样回收率试验

取小活络丸样品（批号210603）适量，剪碎，精密称取9份，每份约1.5 g，每3份为1组，分别加入用0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液配制的低、中、高3个浓度的混合对照品溶液25 mL，按“2.2.2”项下方法分别制备供试溶液。由于本方法中双酯型生物碱

（新乌头碱、次乌头碱、乌头碱）为限量成分，样品中一般含量较低，所以加入对照品的量以限量为依据进行折算。按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算回收率，结果见表4，表明本方法回收率较好。

表 4 加样回收率试验结果

成分	取样量 /g	样品中含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 (n=9) /%	RSD/ %
苯甲酰 新乌头原碱	1.5012	213.730	106.294	320.214	100.18	100.6	0.8
	1.5024	213.901	106.294	322.435	102.11		
	1.5012	213.730	106.294	321.741	101.61		
	1.5034	214.044	212.588	427.185	100.26		
	1.5036	214.072	212.588	427.023	100.17		
	1.5029	213.972	212.588	428.134	100.74		
	1.5033	214.029	318.883	533.615	100.22		
	1.5004	213.616	318.883	533.076	100.18		
	1.5028	213.958	318.883	533.329	100.15		
苯甲酰 乌头原碱	1.5012	28.161	13.962	42.106	99.88	100.8	1.5
	1.5024	28.184	13.962	42.293	101.05		
	1.5012	28.161	13.962	42.473	102.51		
	1.5034	28.202	27.923	56.554	101.54		
	1.5036	28.206	27.923	56.649	101.86		
	1.5029	28.193	27.923	56.534	101.50		
	1.5033	28.201	41.885	70.705	101.48		
	1.5004	28.146	41.885	69.239	98.11		
	1.5028	28.191	41.885	69.770	99.27		
苯甲酰 次乌头原碱	1.5012	28.200	14.063	42.394	100.93	100.9	1.5
	1.5024	28.223	14.063	42.899	104.36		
	1.5012	28.200	14.063	42.231	99.77		
	1.5034	28.241	28.126	56.512	100.52		
	1.5036	28.245	28.126	56.792	101.50		
	1.5029	28.232	28.126	56.830	101.68		
	1.5033	28.239	42.189	70.285	99.66		
	1.5004	28.185	42.189	70.542	100.40		
	1.5028	28.230	42.189	70.254	99.61		

续表 4

成分	取样量 /g	样品中含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 (n=9) /%	RSD/ %
新乌头碱	1.5012	8.844	7.885	16.814	101.09		
	1.5024	8.851	7.885	16.751	100.19		
	1.5012	8.844	7.885	16.903	102.21		
	1.5034	8.856	15.771	24.942	102.00		
	1.5036	8.858	15.771	24.953	102.05	100.6	1.4
	1.5029	8.854	15.771	24.673	100.30		
	1.5033	8.856	31.542	39.829	98.20		
	1.5004	8.839	31.542	40.178	99.36		
	1.5028	8.853	31.542	40.454	100.19		
次乌头碱	1.5012	15.390	7.4625	22.824	99.62		
	1.5024	15.403	7.4625	22.954	101.19		
	1.5012	15.390	7.4625	22.912	100.80		
	1.5034	15.413	14.925	30.199	99.07		
	1.5036	15.415	14.925	30.209	99.12	99.9	1.0
	1.5029	15.408	14.925	30.563	101.54		
	1.5033	15.412	29.850	44.985	99.07		
	1.5004	15.382	29.850	45.005	99.24		
	1.5028	15.407	29.850	45.083	99.42		
乌头碱	1.5012	2.6874	7.9103	10.626	100.36		
	1.5024	2.6896	7.9103	10.584	99.80		
	1.5012	2.6874	7.9103	10.715	101.48		
	1.5034	2.6914	15.8205	18.399	99.29		
	1.5036	2.6917	15.8205	18.403	99.31	99.8	0.8
	1.5029	2.6905	15.8205	18.533	100.14		
	1.5033	2.6912	31.641	34.257	99.76		
	1.5004	2.6860	31.641	34.033	99.07		
	1.5028	2.6903	31.641	33.983	98.90		

2.4 样品测定

取5批小活络丸样品,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液($n=2$);分别精密吸取上述5批

样品溶液和“2.2.1”项下制备的混合对照品溶液各15 μL ,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按照外标法计算含量,结果见表5。

表5 小活络丸含量测定结果

生产 企业	批号								$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
		苯甲酰新 乌头原碱	苯甲酰乌 头原碱	苯甲酰次 乌头原碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	单酯型生 物碱总量	双酯型生 物碱总量	
企业1	210401	149.5	24.6	30.2	0.5	5.4	0.5	204.3	6.4	
企业2	210603	142.4	18.8	18.8	5.9	10.3	1.8	180.0	18.0	
企业3	200901	181.6	23.3	20.4	10.5	27.4	2.9	225.3	40.8	
	200902	176.7	22.5	21.3	9.8	25.4	2.5	220.5	37.7	
	200903	179.5	23.9	19.2	10.2	26.8	2.7	222.6	39.7	

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

HPLC法测定乌头类生物碱虽已有较多文献报道,但在流动相的选择上多采用乙腈-四氢呋喃缓冲盐的系统^[13-14],其中四氢呋喃末端吸收严重,基线常难以保持平稳,且四氢呋喃易对仪器及色谱柱易造成损伤^[15],所以在试验过程中对流动相进行重新选择,对流动相组成较为简单的甲醇-0.1%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-异丙醇4种流动相体系进行考察,并对梯度洗脱程序进行摸索,结果以甲醇-乙腈-0.1%磷酸水作为流动相,采用本研究的梯度洗脱程序,各待测成分峰分离度好,检测过程中基线平稳,周围无杂质峰干扰,保留时间合理,故确定为本试验的流动相。

本试验过程中考察了色谱柱的规格型号[Boston Green ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)和PICKERING C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)]、柱温(20、25、30 $^{\circ}\text{C}$)、流速(0.8、1.0、1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)等条件对6个待测成分的影响,以各成分与相邻色谱峰的分度度和峰形为指标进行选择,最终选择PICKERING MGII C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)色谱柱、柱温25 $^{\circ}\text{C}$,流速1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 进行试验。

3.2 提取溶剂的选择

中成药含量测定的难点之一就是供试品溶液的制备,制备条件的差异会对测定结果产生较大影响。本研究测定成分为乌头类生物碱成分,待测组分含量较低,需净化处理。MCX固相萃取柱是净化和富集碱性化合物的强有力工具^[16-18],特别是有机碱类,因此本试验在供试品溶液制备过程中采用固相萃取技术。

应用固相萃取技术最关键的就是提取溶剂的选择,在本试验过程中对提取溶剂的种类(乙腈、异丙醇、乙酸乙酯和盐酸溶液)与浓度(0.05、0.1、0.2、0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液)进行考察,发现采用浓度为0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液作为提取溶剂,有利于乌头类生物碱成分的提出,可使测定结果更加稳定。有文献^[19-20]报道,乌头类生物碱在炮制和提取过程易发生转化,因供试品溶液制备过程复杂,涉及多种溶剂,为避免待测成分因溶剂选择不当造成测定结果不准确,对6个乌头类生物碱在甲醇、乙醇、乙腈、乙腈-浓氨溶液及不同浓度盐酸溶液中的稳定性进行考察,经试验,乌头类生物碱在乙腈溶液中至少3个月稳定;在0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液与乙腈-浓氨溶液(90:10)中至少7 d稳定;在甲醇、乙醇中稳定性均较差,放置1 h后各成分峰面积平均降低近3%。根据以上测定结果,选择乙腈、0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

盐酸溶液、0.05 mol·L⁻¹盐酸溶液、乙腈-浓氨溶液(90:10)为溶剂制备供试品溶液。

本研究建立的供试品溶液制备方法尽可能地避免使用非必要的有机试剂,并对固相萃取技术的步骤进行了优化,使方法更加简便,且具有较强的可操作性,用于小活络丸的质量控制,便于标准的执行。

3.3 样品测定结果分析

从对收集到的5批小活络丸样品含量测定结果可看出,作为主要药效成分的单酯型生物碱在样品之间含量差异较小;但对于毒性较大的双酯型生物碱,不同企业的样品之间含量存在较大差异,且含量最高的1批样品其单次用量已接近中毒剂量,存在用药安全隐患。另外,从对6个生物碱成分含量测定结果的具体数值可看出,毒性较大的双酯型生物碱中含量最高的为次乌头碱,平均含量约为乌头碱的10倍,进一步印证了现行标准《中国药典》中仅以乌头碱的限量检查作为小活丸的安全性控制指标是不够的。

3.4 方法评价

本研究中建立的HPLC法同时测定小活络丸中6个生物碱类成分的含量,方法简便、专属性强,且同时对单酯型和双酯型生物碱进行控制,更有利于对乌头属药味的质量控制,不仅可以保证临床用药的有效性,对于安全性的控制更是意义重大,为产品质量标准的建立和质量评价提供参考。

本试验建立方法以不用或少用毒性试剂为原则,更符合现代分析技术的要求。绿色HPLC分析方法的开发旨在减少或消除对人体健康和环境有害的试剂或其他化学物质的使用,从而在不影响分析性能的情况下使分析过程更加高效和环保,近年来已经成为药物分析领域的重要课题,将绿色分析方法纳入国家标准是实现绿色分析化学的重要手段^[21-22]。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020: 602.
- [2] 李双,黎锐,曾勇,等. 川乌的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2433-2443.
- [3] 陈良妮,程雪梅,陈勇,等. 川乌药理作用、毒性、质量控制方法研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(3):

722-729.

- [4] 叶协滔,钟凌云,杨明,等. 不同炮制方法对川乌抗痛风性关节炎及心脏毒性作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 121-127.
- [5] 李谦,过立农,郑健,等. 乌头属药用植物的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1129-1149.
- [6] 胡增美,黄露,侯佳华,等. 中药中生物碱类化学成分的毒性作用研究进展[J]. 中南药学, 2022, 20(3): 633-641.
- [7] 郑琴,陆浩伟,郝伟伟,等. 乌头类双酯型生物碱水解转化规律及含量计算方法研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(9): 652-656.
- [8] 霍彬科,黄安军. HPLC法测定强筋健骨丸中3种乌头原碱的含量[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(4): 483-486.
- [9] 刘世欣,陈良妮,程雪梅,等. 固相萃取辅助UPLC-MS/MS同时测定肾康宁胶囊中乌头类生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(2): 302-311.
- [10] 朱定姬,卢敏萍,黄克建,等. 在线固相萃取结合液相色谱-线性离子阱多级质谱法同时检测生物样品中7种乌头类生物碱[J]. 色谱, 2016, 34(3): 249-257.
- [11] 荆文光,程显隆,郭晓晗,等. 中药及天然药物质量分析样品前处理技术研究进展[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(9): 1487-1504.
- [12] 黄志芳,易进海,陈东安,等. 制川乌HPLC特征图谱研究和6种酯型生物碱的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 217-221.
- [13] 毕健丽,陈婷,金文芳,等. SPE-HPLC测定川乌炮制过程中6个乌头类生物碱动态变化及其毒性分析[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(8): 1389-1398.
- [14] 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.
- [15] 赫清雪. 含乌头类生物碱药物的质量分析与评价[D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
- [16] Ding JY, Liu XX, Xiong DM, et al. Simultaneous Determination of Thirteen Aminoalcohol-Diterpenoid Alkaloids in the Lateral Roots of *Aconitum Carmichaeli* by Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *Planta Med*, 2014, 80(8/9): 723-731.
- [17] 咎珂,李耀磊,周颖,等. UPLC-MS/MS法测定大蓟

- 中7个吡咯里西啶生物碱的含量及初步风险评估[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(10): 1690-1696.
- [18] 庞小莲, 刘吉成, 林生, 等. 超高效液相色谱串联质谱法同时测定走川骨刺酮中3种乌头类生物碱含量[J]. 中国药业, 2021, 30(2): 59-62.
- [19] 李萌, 张根衍, 潘桂湘, 等. 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.
- [20] 黄志芳, 唐小龙, 刘云华, 等. 附子提取液的稳定性研究[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(2): 181-183.
- [21] 鲁静, 石上梅. 绿色分析化学与中药检测方法[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(4): 580-587.
- [22] 张秋菊, 曹林波, 王硕. 绿色分析化学在检验检测机构中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(21): 2682-2685.

(收稿日期 2022年9月28日 编辑 郑丽娥)