

三七伤药片中6种乌头类生物碱含量测定及化学计量学分析

朱靖^{1,2}, 赵振霞², 苏建², 刘永利^{2*} (1. 河北医科大学, 石家庄 050017; 2. 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: 采用高效液相色谱法, 建立三七伤药片中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱与苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱6种生物碱类成分的含量测定方法, 并根据测定结果进行化学计量学分析。方法: 采用混合型阳离子交换反相吸附树脂(MCX)固相萃取小柱对供试品进行纯化, 高效液相色谱法测定, 使用COSMOSIL C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以甲醇-乙腈-0.1%磷酸为流动相, 梯度洗脱, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 柱温为25 °C, 检测波长为232 nm。采用SIMCA软件对结果进行处理, 运用主成分分析法分析影响产品差异的关键因素。结果: 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱与苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、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(RSD)分别为101.8%(1.6%)、100.6%(1.4%)、97.8%(1.1%)、100.8%(1.5%)、101.0%(1.6%)、100.7%(0.8%)。17批次样品测定结果显示不同批次之间6种生物碱含量存在较大差异; 单酯型生物碱的含量是影响产品之间差异的关键因素。结论: 所建立的方法准确可靠、灵敏度高, 可用于三七伤药片中生物碱类成分的含量测定, 为三七伤药片质量控制方法的建立提供依据。

关键词: 高效液相色谱; 三七伤药片; 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; 化学计量学; 主成分分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)10-1149-011

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.10.007

Determination and Chemometric Analysis of Six Aconitum Alkaloids in Sanqi Shangyao Tablets

Zhu Jing^{1,2}, Zhao Zhenxia², Su Jian², Liu Yongli^{2*} (1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. 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 a HPLC method for the determination of six alkaloids including aconitine, hypaconitine, mesaconitine and benzoylaconine, benzoylhypaconine, benzoylmesaconine in Sanqi Shangyao Tablets, and carry out chemometric analysis according to the research results. **Methods:** The sample was purified by solid-phase extraction using a mixed cationic exchange adsorption resin(MCX) column and determined

基金项目: 国家药典委员会2018年度药品标准提高工作(中药)(编号 2018Z019); 河北省“三三三人才工程”人才培养资助项目(编号 A202005016)

作者简介: 朱靖 Tel: (0311) 69086055; E-mail: zhujinggy1998@163.com

通信作者: 刘永利 Tel: (0311) 69086006; E-mail: liuyongli2008@126.com

by HPLC. The analysis was performed on COSMOSIL C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase with gradient elution and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 25 °C and the detection wavelength was 232 nm. SIMCA software was used to process the results, and principal component analysis (PCA) was used to study the key factors affecting product difference. **Results:** Aconitine, hyaconitine, mesaconitine and benzoyleaconine, benzoylhyaconine, benzoylmesaconine showed good linear relationships ($r=0.9999$), with average recoveries (RSD) of 101.8% (1.6%), 100.6% (1.4%), 97.8% (1.1%), 100.8% (1.5%), 101.0% (1.6%), 100.7% (0.8%), respectively. The determination results of 17 batches of samples showed significant differences in the content of six alkaloids among different batches. The content of monoester alkaloids is the key factor affecting product difference. **Conclusion:** The established method is accurate and reliable with a high sensitivity, which can be used for content determination of alkaloid constituents in Sanqi Shangyao Tablets and can provide a basis for the establishment of quality control method for Sanqi Shangyao Tablets.

Keywords: HPLC; Sanqi Shangyao Tablet; aconitine; hyaconitine; mesaconitine; benzoyleaconine; benzoylhyaconine; benzoylmesaconine; chemometrics; principal component analysis

三七伤药片由三七、制草乌、雪上一枝蒿、冰片、骨碎补、红花、接骨木、赤芍八味药组成，主要功效为舒筋活血、散瘀止痛，适用于跌打损伤、风湿瘀阻、关节痹痛等症^[1]。方中制草乌为草乌的炮制加工品，草乌为毛茛科植物北乌头的干燥块根；雪上一枝蒿为毛茛科植物短柄乌头的干燥块根。北乌头与短柄乌头为我国最早有记载的药用有毒植物，所含的主要成分均为二萜类双酯型生物碱，包括新乌头碱（Mesaconitine, MA）、次乌头碱（Hyaconitine, HA）、乌头碱（Aconitine, AC），具有较强的心脏和肝脏毒性。草乌经过炮制加工后，可水解为相应的单酯型生物碱，包括苯甲酰新乌头原碱（Benzoylmesaconine, BMA）、苯甲酰乌头原碱（Benzoyleaconine, BAC）、苯甲酰次乌头原碱（Benzoylhyaconine, BHA），毒性大大降低，治疗指数提高，常作为主要的药效成分^[2-3]，但也有因炮制或用药不当引起中毒甚至死亡的报道^[4-8]；且雪上一枝蒿并非炮制加工品，二者在三七伤药片的制备工艺中均为原粉入药，也无煎煮减毒的过程。因此，有必要建立三七伤药片中双酯型生物碱与单酯型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。

固相萃取技术（SPE）具有速度快、溶剂用量少，且操作简便等优点，适用于多成分复方制剂的定量分析^[9-10]。混合型阳离子交换反相吸附树脂（MCX）固相萃取小柱是净化和富集碱性化合物

的强有力工具^[11-12]。本研究参照相关文献^[13-17]，结合《中华人民共和国药典》中制草乌的含量测定方法，采用MCX固相萃取小柱对供试品进行纯化，高效液相色谱法测定，建立了同时测定三七伤药片中6种生物碱类成分的定量分析方法。采用SIMCA软件对结果进行处理，运用主成分分析法分析影响产品之间差异的关键因素，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（美国Waters公司，配备四元泵和DAD检测器）；Ultimate 3000高效液相色谱仪（美国Thermo公司，配备四元泵和DAD检测器）；Agilent 1260高效液相色谱仪（美国Agilent公司，配备四元泵和UV检测器）；KQ-400KDE型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Mettler XPE26型电子天平（瑞士梅特勒公司，0.001 mg）；Mettler XS105型电子天平（瑞士梅特勒公司，0.01 mg）；Milli-Q型超纯水净化系统（美国Millipore公司）。

1.2 试剂

对照品：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），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), 以上对照品均购自中国食品药品检定研究院; 17批次三七伤药片样品购自药店, 详细信息于后文叙述; 混合型阳离子交换反相吸附树脂固相萃取柱(艾杰尔Cleanert PCX 150 mg, 6 mL; 安捷伦Bond Elut Plexa PCX 200 mg, 6 mL; 沃特斯Oasis MCX 150 mg, 6 mL); 甲醇、乙腈(色谱纯, Merck, Germany), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱选用COSMOSIL C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 甲醇(A)-乙腈(B)-0.1%磷酸水溶液(C)为流动相, 梯度洗脱(0~10 min, 30%A、7%B、63%C; 10~70 min, 30%A→38%A、7%B、63%C→55%C), 柱温为25℃, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为232 nm, 进样量为15 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取乌头双酯型生物碱对照提取物26.003 mg、苯甲酰新乌头原碱10.792 mg、苯甲酰乌头原碱7.415 mg、苯甲酰次乌头原碱5.602 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 供试品溶液的制备

取本品20片, 糖衣片除去糖衣, 精密称定, 研细, 取约0.9 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(转速为每分钟6000转) 20 min; 精密量取上清液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, 150 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、纯乙腈各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, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备

按三七伤药片处方比例与制备工艺, 制备缺制草乌与雪上一枝蒿的阴性样品, 按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

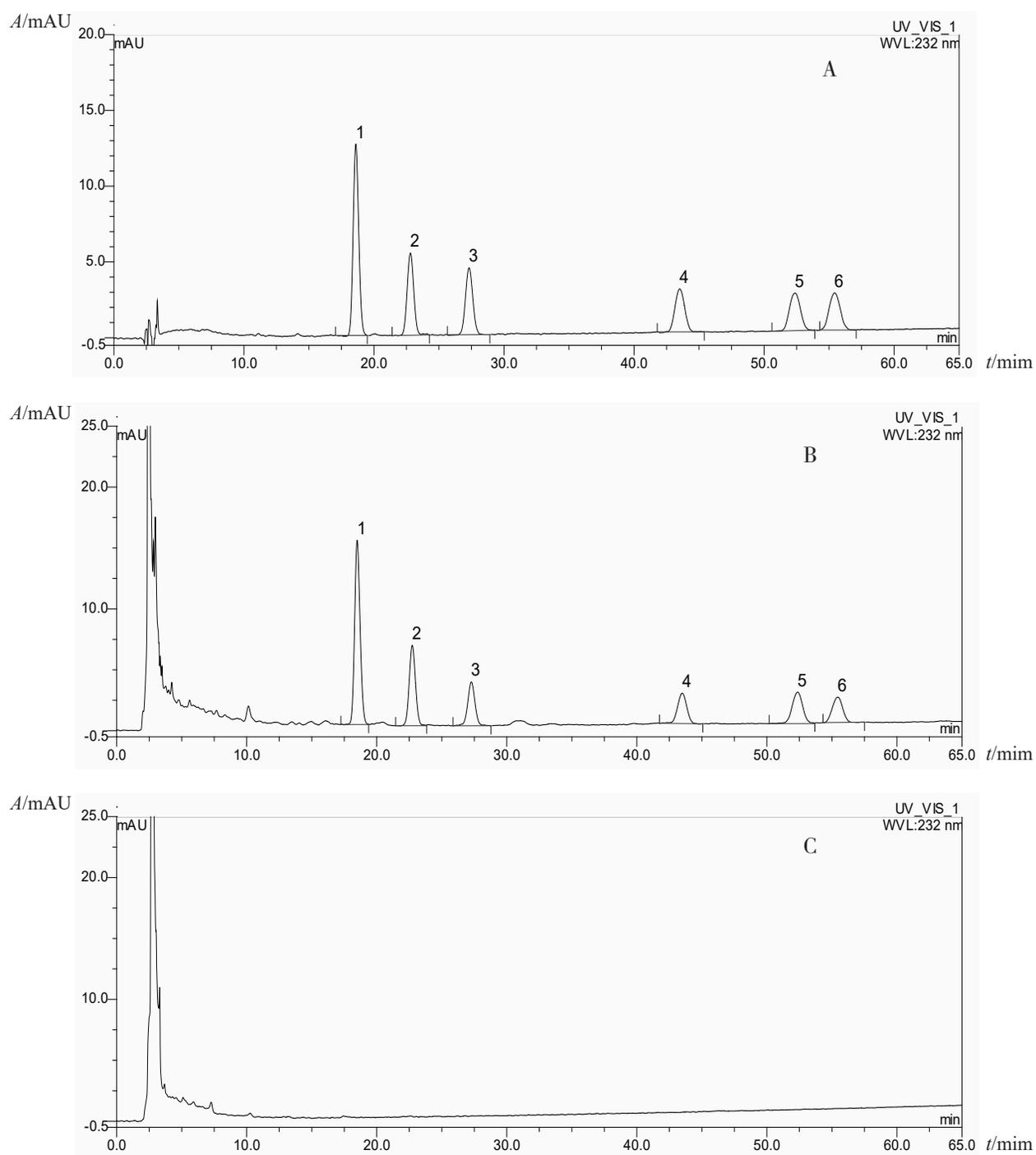
分别取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进样15 μL进行分析, 记录色谱图, 见图1。供试品色谱图中, 分别显示与对照品BMA、BAC、BHA、MA、HA和AC保留时间一致的色谱峰, 待测成分色谱峰峰形良好, 与相邻峰分离度大于1.5, 且阴性样品色谱图中无相应的色谱峰, 说明除制草乌、雪上一枝蒿外的其他药味不干扰待测成分的测定, 方法专属性良好。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

用乙腈-浓氨试液(90:10)配制BMA、BAC、BHA、MA、HA和AC浓度依次为112.5、107.8、61.67、96.80、91.61、97.11 μg·mL⁻¹的混合对照品储备液; 精密吸取0.2、0.5、1、5、10、20、50 mL, 分别置于100 mL量瓶中, 加乙腈-浓氨试液(90:10)定容至刻度, 摇匀, 即得系列浓度的混合对照品溶液。精密吸取本项中配制的系列浓度的混合对照品溶液及混合对照品储备液各15 μL, 分别注入高效液相色谱仪, 按“2.1”项下的色谱条件测定, 以对照品进样量(ng)为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表1, 表明各成分在各自线性范围内线性关系良好。

另取约0.9 g的缺制草乌与雪上一枝蒿的阴性样品, 加入一定浓度的混合对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法制备成计算方法检出限与定量限的供试溶液。按“2.1”项下的色谱条件进样测定, 当信噪比(S/N)为3:1时, 计算方法的检出限, 当信噪比(S/N)为10:1时, 计算方法定量限, 结果见表1。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 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 三七伤药片 HPLC 色谱图

表1 各成分线性关系以及方法的检出限和定量限

待测成分	回归方程	r	线性范围 /ng	检出限 /ng	定量限 /ng
苯甲酰新乌头原碱	y=1449x-2338	0.9999	8.438~1688	4.219	12.66
苯甲酰乌头原碱	y=1303x-3924	0.9999	8.090~1618	4.045	12.14
苯甲酰次乌头原碱	y=1304x-2922	0.9999	4.625~925.1	2.313	6.938
新乌头碱	y=1316x-3766	0.9999	7.260~1452	3.630	10.89
次乌头碱	y=1333x-3249	0.9999	6.871~1374	3.435	10.31
乌头碱	y=1241x-3790	0.9999	7.283~1457	3.642	10.93

2.4.2 精密度试验

吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液15 μL,按“2.1”项下色谱条件进样,连续进样6次,记录各成分峰面积积分值,并计算RSD,结果BMA、BAC、BHA、MA、HA和AC的RSD值分别为0.6%、0.4%、0.3%、0.3%、0.6%和0.5%,结果表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验

精密吸取“2.2.2”项下制备的批号为20190813的供试品溶液各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BMA、BAC、BHA、MA、HA和AC的RSD值分别为0.3%、0.4%、0.7%、0.8%、0.8%、0.7%,结果表明试验制得的供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.4 重复性试验

取批号为20190813的三七伤药片样品,除去糖

衣,研细,分别取0.45、0.90、1.35 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BMA、BAC、BHA、MA、HA和AC含量分别为90.58、10.56、11.77、3.404、7.110、49.25 μg·g⁻¹,RSD分别为0.7%、1.9%、1.6%、1.6%、1.2%、0.8%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验

取已知含量的三七伤药片(批号:20190813)样品,除去包衣,研细,精密称取9份,每份约0.45 g,每3份为一组,分别加入用0.2 mol·L⁻¹盐酸溶液配制的低、中、高3个浓度的对照品溶液25 mL,按“2.2.2”项下方法分别制备供试溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算回收率,结果见表2,表明本方法回收率较好。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

成分	称样量/g	样品含量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
苯甲酰新乌头原碱	0.4518	40.925	21.489	62.537	100.58	100.7	0.8
	0.4526	40.997	21.489	62.936	102.10		
	0.4520	40.943	21.489	62.800	101.72		
	0.4538	41.106	42.977	84.194	100.26		
	0.4529	41.02	42.977	84.073	100.17		
	0.4515	40.8973	42.977	84.194	100.74		
	0.4527	41.006	64.466	105.612	100.22		
	0.4528	41.015	64.466	105.536	100.08		
	0.4540	41.124	64.466	105.685	100.15		

续表 2

成分	称样量/g	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
苯甲酰乌头原碱	0.4518	4.7712	2.4582	7.2265	99.88	100.8	1.5
	0.4526	4.7797	2.4582	7.2643	101.07		
	0.4520	4.7733	2.4582	7.2932	102.51		
	0.4538	4.7924	4.9164	9.7861	101.57		
	0.4529	4.7829	4.9164	9.7687	101.41		
	0.4515	4.7681	4.9164	9.7768	101.88		
	0.4527	4.7807	7.3747	12.264	101.48		
	0.4528	4.7818	7.3747	12.017	98.11		
	0.4540	4.7945	7.3747	12.116	99.27		
苯甲酰次乌头原碱	0.4518	5.3184	2.7182	8.0619	100.93	101.0	1.6
	0.4526	5.3278	2.7182	8.1762	104.79		
	0.4520	5.3207	2.7182	8.0332	99.79		
	0.4538	5.3419	5.4364	10.807	100.53		
	0.4529	5.3313	5.4364	10.849	101.50		
	0.4515	5.3148	5.4364	10.843	101.68		
	0.4527	5.3290	8.1546	13.457	99.67		
	0.4528	5.3301	8.1546	13.518	100.40		
	0.4540	5.3443	8.1546	13.467	99.61		
新乌头碱	0.4518	3.0680	15.696	18.5812	98.84	97.8	1.1
	0.4526	3.0687	15.696	18.681	99.47		
	0.4520	3.0683	15.696	18.503	98.34		
	0.4538	3.0704	31.391	33.924	98.29		
	0.4529	3.0690	31.391	33.363	96.51		
	0.4515	3.0680	31.391	33.368	96.52		
	0.4527	3.0769	62.782	64.364	97.62		
	0.4528	3.0786	62.782	63.774	96.68		
	0.4540	3.0775	62.782	64.760	98.25		
次乌头碱	0.4518	6.4092	14.854	21.424	101.09	100.6	1.4
	0.4526	6.4106	14.854	21.292	100.19		
	0.4520	6.4099	14.854	21.602	102.28		
	0.4538	6.4142	29.707	36.717	102.00		
	0.4529	6.4114	29.707	36.729	102.05		
	0.4515	6.4092	29.707	36.202	100.29		
	0.4527	6.4277	59.415	64.774	98.20		
	0.4528	6.4313	59.415	65.465	99.36		
	0.4540	6.4291	59.415	65.960	100.19		

续表 2

成分	称样量/g	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
乌头碱	0.4518	44.391	15.745	60.263	100.80		
	0.4526	44.4001	15.745	60.457	101.98		
	0.4520	44.396	15.745	60.361	101.40		
	0.4538	44.426	31.490	77.020	103.51		
	0.4529	44.406	31.490	77.248	104.30	101.8	1.6
	0.4515	44.391	31.490	76.563	102.17		
	0.4527	44.519	62.980	106.97	99.17		
	0.4528	44.544	62.980	107.76	100.37		
	0.4540	44.529	62.980	109.07	102.47		

2.5 样品测定

采用所建立的方法对收集到的17批次三七伤

药片样品进行6种生物碱成分的含量测定, 结果见表3。

表3 三七伤药片含量测定结果

生产厂家	批号							$\mu\text{g}\cdot\text{片}^{-1}$	
		BMA	BAC	BHA	MA	HA	AC	单酯型生物碱	双酯型生物碱
企业1	20190501	63.7	28.4	41.6	未检出	未检出	2.7	133.7	2.7
企业2	20190813	30.7	3.8	4.2	1.0	2.0	15.2	38.7	18.2
	20190815	11.8	2.3	2.4	0.6	1.7	12.8	16.5	15.1
企业3	171003	6.0	0.8	1.7	未检出	未检出	0.8	8.5	0.8
企业4	190607	10.3	6.0	2.1	未检出	1.6	2.9	18.4	4.5
	191003	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
企业5	20190805	19.0	16.4	2.6	未检出	未检出	未检出	38.0	未检出
	20191003	27.0	14.4	3.8	未检出	0.4	未检出	45.2	0.4
	20191224	69.5	18.3	8.1	未检出	0.7	未检出	95.9	0.7
	20200104	35.3	19.6	5.0	未检出	未检出	未检出	59.9	未检出
企业6	1810024	24.8	8.1	1.8	未检出	0.7	未检出	34.7	0.7
	1812025	26.8	9.3	2.1	未检出	0.6	未检出	38.2	0.6
	1912035	10.1	7.8	0.4	未检出	0.4	未检出	18.3	0.4
企业7	20181201	6.7	3.7	0.6	未检出	未检出	未检出	11.0	未检出
	20181202	7.7	4.2	0.9	未检出	未检出	未检出	12.8	未检出
企业8	181001	8.2	24.5	1.4	未检出	未检出	未检出	34.1	未检出
企业9	180102	23.1	22.9	2.1	未检出	0.9	2.4	48.1	3.3

2.6 限度制定及化学计量学分析

本品所含的制草乌与雪上一支蒿都含有一定量毒性生物碱类成分, 用药过程的安全性问题不容忽视, 所以有必要对其用药进行风险分析, 毒性制剂进行风险分析需对其毒性指标成分制定合理的限度。炮制可以达到减毒增效的作用, 不同的炮制方法和煎煮方式可使双酯型乌头碱迅速水解, 单酯型乌头碱和无酯的醇胺类乌头原碱则逐渐增加^[18-19]。含双酯结构的乌头碱既有药理活性, 同时也存在极强的毒性, 须经炮制后转化为单酯型生物碱^[4], 后者与双酯型乌头碱药效相同但毒性降低, 值得注意的是, 当炮制时间过长, 单酯型生物碱会转化为醇胺类的乌头原碱, 从而使有效成分降低^[20-21]。因此, 需要对毒性较强的双酯型生物碱进行严格的限量控制, 主要的药效成分单酯型生物碱控制其适当的含量范围, 才能达到既控制药物毒性, 又保证临床疗效的目的^[22-23]。

本文参照《中华人民共和国药典》2020年版制草乌中单、双酯型生物碱的含量、文献中有关雪上一支蒿含有乌头类生物碱的报道^[24-25]以及自测10批雪上一支蒿中单、双酯型生物碱的含量(雪上一支蒿中单、双酯型生物碱的含量测定方法已经过方法学验证)为依据制定限度。三七伤药片中制草乌与雪山一支蒿均为原粉入药, 按照转移率90%进行折算, 双酯型生物碱总限量为每片不得过27.9 μg , 单酯型生物碱总量应为14.31~45.26 μg , 因此, 暂定三七伤药片中双酯型生物碱的总量不得过30 $\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$, 单酯型生物碱的总量范围为15~60 $\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$ 。文献报道乌头碱中毒量一般为1~2 mg^[26], 本制剂按照拟定的双酯型生物碱总量限度计算, 每次摄入量约为90 μg , 远低于中毒剂量, 可保障用药的安全性。本研究拟定的限度同时符合欧洲药品管理局(EMA)于2018年发布的“质量标准指南: 草药物质、草药制剂和草药产品或传统草药产品的检验程序和可接受标准(第3修订版草案)”[Guideline on Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Herbal Substances, and Herbal Preparations for Herbal and Medicinal Products/

Traditional Herbal Medicinal Products (Draft Revision 3)]^[27], 说明制定的限度标准合理有效, 可用于相关制剂的质量评价与用药安全分析。

17批次三七伤药片中生物碱含量测定结果显示, 双酯型生物碱含量范围为0~18.2 $\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$, 均低于拟定的限度, 符合规定; 单酯型生物碱含量范围为0~133.7 $\mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$, 含量差异较大, 且有6批次样品不符合拟定限度, 推测可能与制草乌的炮制程度有关。单酯型生物碱含量低于拟定限度的4批次样品, 因药效成分含量较低, 很可能达不到应有的治疗效果; 2批次样品单酯型生物碱含量高于拟定的限度, 虽说单酯型生物碱毒性较小, 但也并非无毒, 所以直观分析结果显示本制剂存在一定的用药安全风险。

将17批次三七伤药片中6种生物碱成分的含量、单酯型生物碱总量与双酯型生物碱总量测定结果组成17×6阶矩阵导入SIMCA 14.1软件, 进行无监督的PCA, 提取2个主成分, 得到模型解释率参数R2X为0.873, 预测能力参数Q2为0.507, 表明提取的主成分可解释87.3%的原始变量, 模型的预测能力为50.7%。17批三七伤药片样品的PCA得分图(Scores图, 图2)显示, 由于不同批次样品之间生物碱的含量存在一定差异, 根据含量多少, 可将样品大致分为3类。

结合变量载荷图(Loading图, 图3)可知, 单酯型生物碱总量和BAC在主成分1上的因子载荷量较大, 双酯型生物碱总量和AC在主成分2上的因子载荷量较大, 分别是影响主成分1和主成分2得分的重要因素。因此, 企业1的异常点主要与单酯型生物碱的含量有关, 企业2的异常点主要与双酯型生物碱的含量有关。另外, 不符合规定的6批样品: 企业1(20190501)、企业5(20191224)及企业3(171003)、企业4(191003)、企业7(20181201、20181202), 落在了对立的一、三象限, 结合变量载荷图可知分别是由于单酯型生物碱的含量偏高或偏低引起的, 说明单酯型生物碱的含量是影响不同产品之间差异的关键因素。

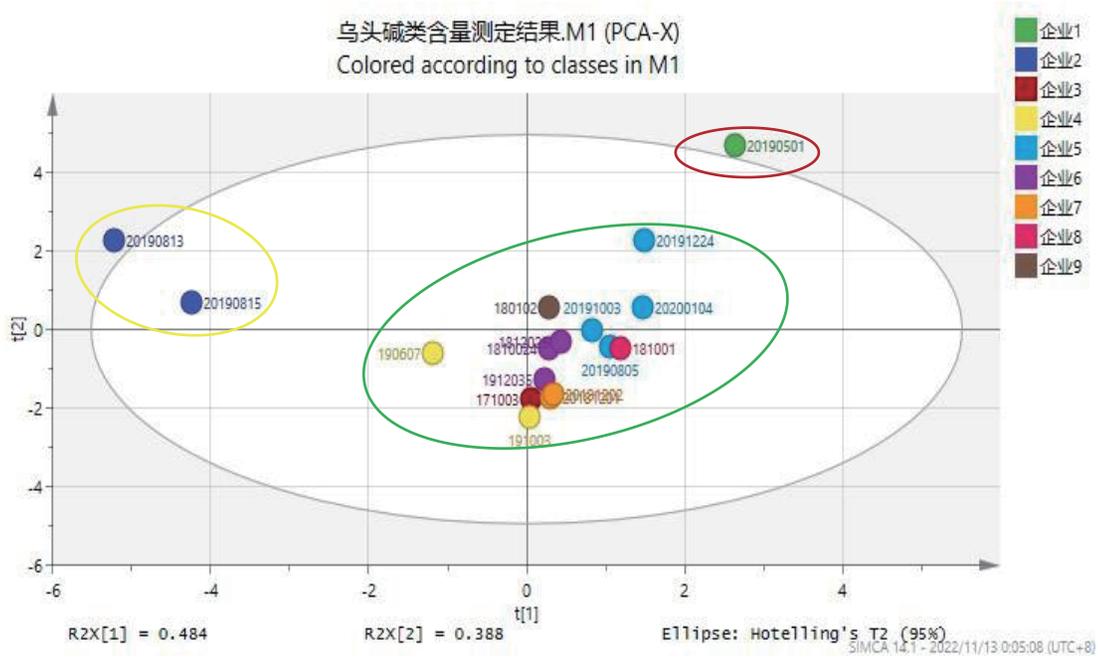


图2 不同生产企业三七伤药片主成分分析图

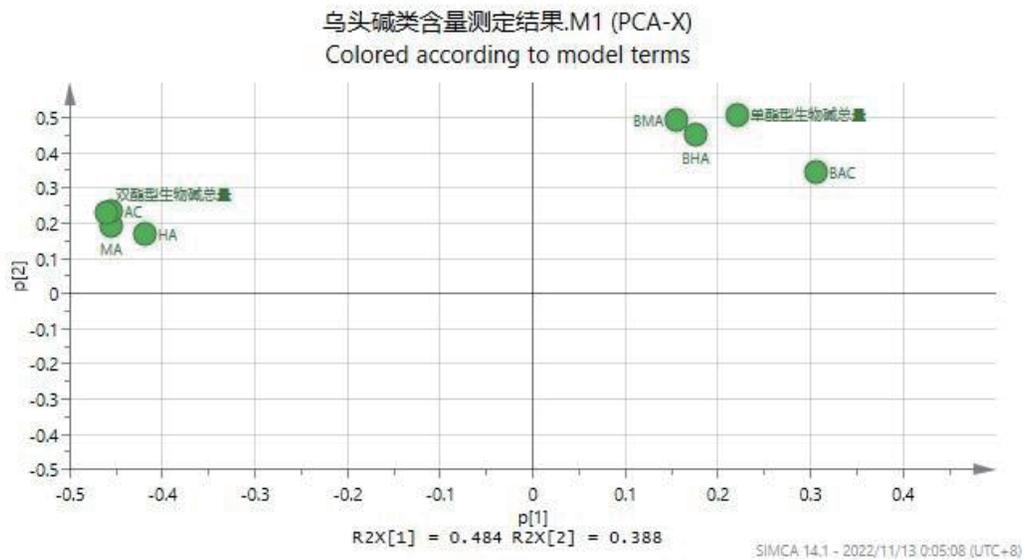


图3 不同生产企业三七伤药片载荷图

3 讨论

3.1 流动相的选择

《中华人民共和国药典》高效液相色谱法测定制川乌、制草乌中乌头类生物碱成分时，流动相多以乙腈-四氢呋喃（25：15）为流动相A，0.1 mol·L⁻¹醋酸铵溶液为流动相B，梯度洗脱，其中四氢呋喃末端吸收严重，基线常难以保持平稳，本试验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与梯度条件的探索，结果以甲醇-乙腈-0.1%磷酸水作为流动相，各待测峰分离度好，检测过程中基线平稳，故确定为本试验的流动相。

3.2 供试品溶液制备方法的选择

由于乌头类生物碱在许多溶剂中易发生转化，因此在选择供试品溶液制备方法前，笔者首先

对乌头类生物碱在以下溶剂中的稳定性进行了考察。结果6种成分在乙腈溶液中至少3个月稳定,在 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液与乙腈-浓氨试液(90:10)中至少7天稳定,在甲醇、乙醇中稳定性均差,放置1小时后乌头碱峰面积降低近3%,故选择乙腈、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、乙腈-浓氨试液(90:10)为溶剂制备供试品溶液。在供试品溶液制备方法选择上,笔者也试验了液-液萃取法,但由于测定成分在样品中含量较低,提取、萃取、浓缩至干及定容的每一步操作都可能给测定带来误差,方法的重复性较差;固相萃取法可集萃取、浓缩、定容于一体,减少测定误差,更适用于含量较低成分的分离纯化。对固相萃取技术所用提取溶剂(乙腈-浓氨、异丙醇-乙酸乙酯、 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液)及固相萃取上样方法(提取液浓缩蒸干后酸水溶解上样、酸水溶液离心后直接上样)等都进行了考察,结果表明采用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液提取效率较高,且酸水溶液离心后直接上样操作简单,故作为本试验净化供试品溶液的提取溶剂。虽然乌头生物碱在高温时不稳定,易水解,但在研究过程中,笔者比较了 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温与 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水温超声提取的含量测定结果,无明显差别,均可保证测定结果的准确性,而水温 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下较 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下易于控制,故本试验选择水温 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下超声提取。

3.3 回收率试验

由于本方法中双酯型生物碱为限量成分,制剂中一般含量较低,所以加入对照品的量是以制定的 $30 \mu\text{g} \cdot \text{片}^{-1}$ 的标准限度为依据进行折算的。

3.4 结果分析

直观分析与化学计量学的结果均显示不同批次三七伤药片样品中6种乌头类生物碱的含量存在较大差异,由于此类成分具有“毒效双性”,含量的差异不仅会对疗效产生影响,还会给用药的安全性带来一定的隐患,应引起监管部门及相关生产企业的重视。中成药不同批次之间含量测定结果差异较大的原因很多,可能与中药材来源、质量有关,也可能与制剂生产工艺的稳定性有关。从笔者对乌头类药材的相关研究中,也可看出雪上一支蒿样品中上述6种成分的含量差异较小,而制草乌样品中各成分的含量差异较大,推断所用制草乌饮片中乌头碱类成分含量的高低可能是影响三七伤药片质量

波动的主要因素。作为炮制中药“制草乌”的主要药效成分,药材炮制程度也是影响含量差异的关键因素^[28],有待进一步的考察研究。

3.5 小结

本试验采用HPLC建立了同时测定三七伤药片中6种生物碱成分的含量测定方法,对固相萃取技术所用溶剂及方法都进行了优化,方法简便易行,灵敏度高,专属性强,对色谱柱、仪器以及固相萃取小柱的耐用性均进行了考察,6种成分测定结果的RSD值均小于3%,说明方法的耐用性良好。在研究过程中对其系列制剂三七伤药胶囊、颗粒分别进行考察,方法同样适用,可为系列制剂制定统一的质量标准提供参考。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020: 505.
- [2] 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.
- [3] 杨苗苗,杨霖,李孝栋,等. 乌头安全有效性研究进展及其临床应用前景[J]. 药学研究, 2018, 37(3): 125.
- [4] 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.
- [5] 张新渐,王洪云,刘淑萍,等. 雪上一支蒿的化学成分研究[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(13): 13.
- [6] 胡增美,黄露,侯佳华,等. 中药中生物碱类化学成分毒性作用研究进展[J]. 中南药学, 2022, 20(3): 633.
- [7] 黄茜,孙明丽,李腾飞,等. 乌头生物碱镇痛作用及机制研究进展[J]. 神经药理学报, 2017, 7(3): 21.
- [8] Li LY, Zhang LM, Liao TT, et al. Advances on Pharmacology and Toxicology of Aconitine[J]. Phytother Res, 2021, 26(7): 981.
- [9] 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.
- [10] 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.

- [11] 管珂, 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.
- [12] 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酊中3种乌头类生物碱含量[J]. 中国药业, 2021, 30(2): 59.
- [13] 汪剑飞. HPLC法测定不同厂家三七伤药片中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱[J]. 中成药, 2013, 35(4): 717.
- [14] 毕晓伟, 张璐璐, 张艳. 一测多评法同时测定三七伤药片中6种活性成分[J]. 中国药师, 2018, 21(8): 1490.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 张先灵, 秦语欣, 王蕾, 等. 生川乌片炮制过程中生物碱含量随炮制时间变化的规律研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(7): 1673.
- [19] 魏旭雅, 邱子栋, 陈金龙, 等. 有毒乌头类中药炮制与配伍减毒机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3695.
- [20] 黄志芳, 唐小龙, 罗恒, 等. HPLC-Q-TOF-MS分析附子的化学成分及煎煮过程中的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 57.
- [21] 张意涵, 杨昌林, 黄志芳, 等. 附子煎煮过程中13种生物碱含量的动态变化规律研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 16.
- [22] 熊亮, 彭成, 缪璐琳, 等. 基于“毒-效整合分析思路”探讨有毒中药附子的物质基础[J]. 世界中医药, 2017, 12(11): 2568.
- [23] Yang MB, Ji XY, Zuo Z, et al. Relationships between the Toxicities of Radix Aconiti Lateralis Preparata (FuZi) and the Toxicokinetics of Its main Diester-Diterpenoid Alkaloids [J]. Toxins (Basel), 2018, 10(10): 391.
- [24] 王洪云. 雪上一支蒿中二萜生物碱研究进展[J]. 中国中医药咨讯, 2010, 2(11): 160.
- [25] 王勇, 刘淑莹, 刘志强, 等. 雪上一支蒿中乌头碱类生物碱的电喷雾串联质谱分析[J]. 分析化学研究报告, 2003, 31(2): 139.
- [26] 杨振林. 部分中药中毒机制及其特效解救药[J]. 河北医学, 2008, 14(10): 1257.
- [27] 孙昱, 萧惠来. 对EMA草药质量标准指南(第3修订版草案)的思考[J]. 药物评价研究, 2019, 42(10): 1920.
- [28] 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.

(收稿日期 2023年5月10日 编辑 王雅雯)