

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110524. 1332. 005

· 化学与分析 ·

附片质量标准研究

黄志芳¹, 易进海^{1*}, 陈东安^{1,2}, 刘云华¹, 陈燕¹, 刘玉红¹
(1. 四川省中医药科学院, 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的:研究提高附片的质量标准。方法:按照 2010 年版《中国药典》方法测定附片中总灰分和酸不溶性灰分;采用 RP-HPLC 法测定附片中双酯型生物碱和单酯型生物碱的含量。色谱条件为 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加 0.5 mL 冰醋酸)为 A 相, 乙腈-四氢呋喃(25:15)为 B 相, 梯度洗脱, 检测波长 235 nm。结果:附片中总灰分、酸不溶性灰分含量差异很大;单酯型生物碱总量较为稳定, 而双酯型生物碱总量相差较大, 提示应制定附片中双酯型生物碱的含量幅度范围。结论:本法操作简便、可行, 结果稳定, 为附片质量控制提供参考方法。

[关键词] 附片;总灰分;酸不溶性灰分;酯型生物碱;高效液相色谱法
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)14-0049-04

Study on Quality Standard of Aconiti Lateralis Radix Praeparata Slice

HUANG Zhi-fang¹, YI Jin-hai^{1*}, CHEN Dong-an^{1,2}, LIU Yun-hua¹, CHEN Yan¹, LIU Yu-hong¹
(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;
2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study the quality standard of Aconiti Lateralis Radix Praeparata slice. **Method:** According to Chinese Pharmacopoeia, the total ash and acid insoluble ash were determined in Radix Aconiti Lateralis Praeparata slice. The determination of diester and monoester aconitum alkaloids was carried out by RP-HPLC method. HPLC analysis was performed on an Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column. The mobile phase system was 0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate (0.5 mL glacial acetic acid per 1 000 mL, phase A) and acetonitrile-tetrahydrofuran (25:15, phase B) with gradient elution. The detection wavelength was at 235 nm. **Result:** There were obvious differences in content of total ash and acid-insoluble ash. The range of monoester aconitum alkaloids amounts was relatively narrow, but the range of diester aconitum alkaloids amounts was wider. It suggested that the range of diester aconitum alkaloids amounts should be formulated. **Conclusion:** The method is accurate, reproducible and can be used to enhance the quality control of Aconiti Lateralis Radix Praeparata slice.

[Key words] Aconiti Lateralis Radix Praeparata slice; total ash; acid-insoluble ash; ester aconitum alkaloids; HPLC

[收稿日期] 20110128(003)
[基金项目] 国家重点基础研究发展 973 计划(2009CB522804); 国家科技支撑计划(2011BAI13B05)
[第一作者] 黄志芳, 副研究员, 研究方向: 中药质量与新药, Tel: 028-85210843, E-mail: huangzf74@163.com
[通讯作者] * 易进海, 研究员, Tel: 028-85210843, E-mail: yijinhai@yahoo.com.cn
[网络出版时间] 2011-05-24 13:32
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110524.1332.005.html>

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等功效^[1],是临床常用中药。附子主要毒、效成分为双酯型生物碱^[2],如新乌头碱(mesaconitine)、乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)等,毒性很强,经炮制加工后此类成分可水解转化为苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine)、苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine)和苯甲酰新乌头原碱(benzoylmesaconine)等单酯型生物碱,毒性大大降低,但其药理活性亦随之减弱或消失^[3]。附子炮制品主要有白附片和黑顺片,均经过食用胆巴水浸制、煮、水浸漂等工序。文献报道^[4]附子炮制过程中存在人为加入大量胆巴等不规范的加工方式,致使附片中胆巴残留量超出规范生产产品的 10 余倍,更有甚者使用硫酸镁替代胆巴加工,增加附片质量,以获取更多的经济利益。胆巴,俗称卤水,主要含有大量的氯化镁,对胃有强烈的腐蚀作用,使人体器官的蛋白质凝固,镁离子被吸收后会抑制心血管和神经系统,对人体具有较大毒性^[5],因此有必要控制附片中胆巴残留量,以保证附片用药安全。2010 年版《中国药典》尚没有规定附片中总灰分、酸不溶性灰分的检查,本文测定了附片中总灰分和酸不溶性灰分的含量,可间接检测附片中胆巴残留量或其他人为加入的增重物。

1 仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD 检测器,柱温箱,自动进样器,工作站); KQ-100 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); DZKW-4 恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); 25-10 型箱式电阻炉; 岛津 AUW220D 型 1/10 万天平; Millipore Milli-Q Integral 3 超纯水机。

实验药材购于成都荷花池药材市场、四川新荷花中药饮片有限公司和成都同仁堂等地,由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定。乌头碱(批号 110720-200410,供含量测定用)、次乌头碱(批号 110798-200404,供含量测定用)、新乌头碱对照品(批号 110799-200404,供含量测定用)购自中国药品生物制品检定所。苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱对照品由本实验室从制川乌中分得,其纯度分别为 99.2% ,97.8% ,98.4% ,理化性质和光谱数据分析,鉴定其结构。乙腈、四氢呋喃为美国 Fisher 色谱纯;水为超纯水;其余试剂均

为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总灰分及酸不溶性灰分检查 取附片粉末(过 2 号筛)约 4 g,置炽灼至恒重的坩埚中,称定质量,按《中国药典》2010 年版一部附录 IX K 灰分测定法测定,计算。结果显示附片中总灰分为 1.81% ~ 19.6% ,酸不溶性灰分为 0.03% ~ 1.60% ,含量差异很大。总灰分和酸不溶性灰分含量过高可能是胆巴漂洗不净、退胆不全所致,或人为加入了增重物。根据表 1 测定结果,建议规定附片中总灰分不得过 7.0% ,酸不溶性灰分不得过 0.3% 。

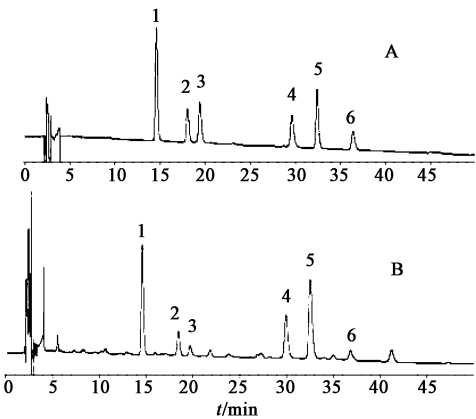
表 1 附片总灰分、酸不溶性灰分测定 %					
样品	总灰分	酸不溶性灰分	样品	总灰分	酸不溶性灰分
白附片 1	2.65	0.06	黑顺片 1	2.89	0.03
白附片 2	1.81	0.07	黑顺片 2	6.56	0.22
白附片 3	9.00	0.05	黑顺片 3	11.78	0.52
白附片 4	19.6	1.60	黑顺片 4	4.82	0.03
白附片 5	1.99	0.03	黑顺片 5	5.15	0.07
白附片 6	7.46	0.14	黑顺片 6	6.04	0.04
白附片 7	6.25	0.16	黑顺片 7	6.02	0.11
白附片 8	7.98	0.46	黑顺片 8	10.65	0.24

2.2 附片中酯型生物碱的含量测定

2.2.1 色谱条件^[1] 色谱柱为 Eclipse XDB C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温 35 ℃,流动相 A 为 0.1 mol·L⁻¹醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加 0.5 mL 冰醋酸),B 相为乙腈-四氢呋喃(25:15)混合溶液,梯度洗脱(程序 0 ~ 48 min,由 85% ~ 74% A,48 ~ 49 min,74% ~ 65% A,维持 9 min),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 235 nm,进样量 10 μL。色谱峰见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 取新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱对照品适量,精密称定,加 0.05% 盐酸甲醇溶液配置成每 1 mL 含新乌头碱 15.648 μg,次乌头碱 34.98 μg,乌头碱 8.032 μg,苯甲酰新乌头原碱 40.88 μg,苯甲酰次乌头原碱 14.98 μg,苯甲酰乌头原碱 11.52 μg 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备^[1] 取附片粉末(过三号筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氨试液 3 mL,放置 30 min,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1) 50 mL,摇匀,称定质量,超声处理(功率 100 W,频率 40 kHz,水温在 25 ℃ 以下) 30 min,放冷,再称定质



A. 对照品;B. 供试品

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 附片 HPLC

量,用异丙醇-乙酸乙酯(1:1)补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,40 ℃ 以下减压回收溶剂至干,残渣精密加入 0.05% 盐酸甲醇溶液 3 mL 使溶解,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 检测限与定量限 在选定的色谱条件下,当信噪比为 3 时,测得新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的检测限为 2.5 ng;当信噪比为 10 时,测得新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的定量限为 8.0 ng。

2.2.5 线性关系考察 取 2.2.2 项下混合对照品溶液,精密吸取混合对照品溶液 2,5,10,15,20 μL,注入液相色谱仪中,以进样量(μg)为横坐标,对照品峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。结果见表 2。

表 2 线性关系试验

名称	线性范围/μg	回归方程	r
苯甲酰新乌头原碱	0.081 76 ~0.817 6	$Y=120\ 3.52X+8.34$	0.999 9
苯甲酰乌头原碱	0.023 04 ~0.230 4	$Y=116\ 3.18X-2.06$	0.999 9
苯甲酰次乌头原碱	0.029 96 ~0.299 6	$Y=105\ 2.23X+3.95$	0.999 9
新乌头碱	0.031 296 ~0.312 96	$Y=123\ 4.46X+4.28$	0.999 9
次乌头碱	0.069 96 ~0.699 6	$Y=119\ 6.96X+2.91$	0.999 9
乌头碱	0.016 064 ~0.160 64	$Y=115\ 2.37X+1.54$	0.999 8

2.2.6 精密度试验 精密吸取供试品溶液(白附片 1)10 μL,注入液相色谱仪,重复进样 5 次,按 2.2.1 项下色谱条件进行检测,记录峰面积,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、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 0.6%,0.8%,0.9%,1.1%,1.5%,0.8%(n=5),表明仪器精密度好。

2.2.7 重复性试验 取同一批药材粉末(白附片 1)约 2 g,共 5 份,精密称定,照 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按 2.2.1 项下色谱条件进行检测,记录峰面积,计算含量。苯甲酰新乌头原碱的平均值为 $1.215 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.4%),苯甲酰乌头原碱的平均值为 $2.379 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.9%),苯甲酰次乌头原碱的平均值为 $1.362 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 2.0%),新乌头碱的平均值为 $6.762 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.9%),乌头碱的平均值为 $2.297 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 2.2%),次乌头碱的平均值为 $7.618 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.8%)(n=5)。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液(白附片 1),于室温 0,1,4,8,24 h 进样测定,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、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 0.7%,1.0%,1.2%,1.3%,1.7%,1.2%(n=5),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量的样品(白附片 1)1 g,共 6 份,精密称定,准确加入与样品中含量等量的对照品,照含量测定项下操作,测定含量,计算回收率。平均回收率为苯甲酰新乌头原碱 98.6%(RSD 1.5%),苯甲酰乌头原碱 96.2%(RSD 1.8%),苯甲酰次乌头原碱 99.7%(RSD 1.9%),新乌头碱 97.9%(RSD 2.1%),乌头碱 95.3%(RSD 2.5%),次乌头碱 101.3%(RSD 1.9%)(n=6)。

2.2.10 样品测定 取附片约 2 g,照 2.2.3 项制备供试品溶液,按 2.2.1 项色谱条件下测定了 16 批附片中 6 种酯型生物碱的含量,结果见表 3。由表 3 可见,白附片和黑顺片中新乌头碱、乌头碱、次乌头碱 3 种双酯型生物碱总量差异较大,而单酯型生物碱的总量相对稳定。

3 讨论

附子加工炮制一般经过胆巴水浸泡、水漂等工序,不规范的加工方法,如漂洗时间不够,人为灌注胆巴或其他增重物等,易导致退胆不全,使附片中胆巴含量超标。由表 1 结果可见,附片中总灰分、酸不溶性灰分含量差异很大,含量过高者可能是胆巴漂洗不净、退胆不全所致,或人为加入了增重物,因此,制定附片中总灰分和酸不溶性灰分的限量检查,对控制附片的质量具有重要意义。根据本文测定结

表 3 各批附片中 6 种酯型生物碱的质量分数($n=2$)								$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
样品及编号	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱	双酯型生物碱 总含量	苯甲酰新 乌头原碱	苯甲酰 乌头原碱	苯甲酰次 乌头原碱	单酯型生物 碱总含量
白附片 1	6.762×10^{-5}	2.297×10^{-5}	7.618×10^{-5}	1.668×10^{-4}	1.215×10^{-4}	2.379×10^{-5}	1.362×10^{-5}	1.589×10^{-4}
白附片 2	1.904×10^{-5}	5.473×10^{-6}	4.406×10^{-5}	6.857×10^{-5}	1.893×10^{-4}	2.712×10^{-5}	2.601×10^{-5}	2.425×10^{-4}
白附片 3	5.823×10^{-6}	7.879×10^{-6}	1.137×10^{-4}	1.274×10^{-4}	9.347×10^{-5}	3.369×10^{-5}	4.953×10^{-5}	1.767×10^{-4}
白附片 4	2.124×10^{-5}	8.047×10^{-6}	7.196×10^{-5}	1.012×10^{-4}	6.853×10^{-5}	1.448×10^{-5}	1.712×10^{-5}	1.013×10^{-4}
白附片 5	9.307×10^{-5}	2.713×10^{-5}	1.836×10^{-4}	3.038×10^{-4}	1.152×10^{-4}	2.184×10^{-5}	2.668×10^{-5}	1.637×10^{-4}
白附片 6	—	—	7.527×10^{-5}	7.527×10^{-5}	9.021×10^{-5}	1.872×10^{-5}	5.611×10^{-5}	1.650×10^{-4}
白附片 7	1.662×10^{-4}	3.387×10^{-5}	1.865×10^{-4}	3.866×10^{-4}	5.898×10^{-4}	7.627×10^{-5}	6.623×10^{-5}	7.323×10^{-4}
白附片 8	3.612×10^{-5}	1.574×10^{-5}	1.496×10^{-4}	2.015×10^{-4}	1.336×10^{-4}	3.092×10^{-5}	4.184×10^{-5}	2.064×10^{-4}
黑顺片 1	—	—	1.477×10^{-5}	1.477×10^{-5}	4.912×10^{-5}	1.108×10^{-5}	3.824×10^{-5}	9.844×10^{-5}
黑顺片 2	2.486×10^{-5}	8.514×10^{-6}	3.258×10^{-5}	6.595×10^{-5}	2.267×10^{-4}	3.486×10^{-5}	1.467×10^{-5}	2.762×10^{-4}
黑顺片 3	3.648×10^{-6}	3.314×10^{-6}	6.385×10^{-5}	7.081×10^{-5}	1.513×10^{-4}	3.694×10^{-5}	6.642×10^{-5}	2.547×10^{-4}
黑顺片 4	1.046×10^{-5}	8.007×10^{-6}	1.335×10^{-4}	1.520×10^{-4}	1.562×10^{-4}	3.715×10^{-5}	7.081×10^{-5}	2.642×10^{-4}
黑顺片 5	—	2.976×10^{-6}	7.468×10^{-5}	7.766×10^{-5}	8.456×10^{-5}	2.713×10^{-5}	5.746×10^{-5}	1.692×10^{-4}
黑顺片 6	—	—	4.282×10^{-5}	4.282×10^{-5}	1.138×10^{-4}	3.187×10^{-5}	6.781×10^{-5}	2.135×10^{-4}
黑顺片 7	1.002×10^{-5}	7.474×10^{-6}	1.313×10^{-4}	1.488×10^{-4}	1.576×10^{-4}	4.349×10^{-5}	7.328×10^{-5}	2.744×10^{-4}
黑顺片 8	—	3.162×10^{-6}	9.983×10^{-5}	1.030×10^{-4}	1.407×10^{-4}	4.517×10^{-5}	1.111×10^{-4}	2.970×10^{-4}

注:— 低于定量限。

果,建议规定附片中总灰分不得过 7.0% ,酸不溶性灰分不得过 0.3% 。

参照 2010 年版《中国药典》方法^[1],对附片加氨试液 3 mL 后,立即加异丙醇-乙酸乙酯(1:1)与放置 30 min 后再加异丙醇-乙酸乙酯(1:1)进行比较,结果显示,放置 30 min 后再加提取溶剂,其单酯型和双酯型生物碱的含量提高约 20%。分析原因为附片含淀粉较多,加氨试液浸润 30 min,使其充分溶胀,再加提取溶剂,有利于生物碱溶出。

2010 年版《中国药典》规定附片含双酯型生物碱总量不得过 0.020%,含单酯型生物碱总量不得少于 0.010%,根据本文的测定方法和结果,建议规定附片含双酯型生物碱总量应为 0.005% ~ 0.025%,含单酯型生物碱总量不得少于 0.010%。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:177.

[2] 李志勇,李彦文,孙建宁,等. 乌头类植物药三种双酯型生物碱研究进展[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2009,18(2):87.

[3] 孙兰,周海燕,赵润怀,等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱[J]. 中草药, 2009, 40 (1):131.

[4] 陈彦琳,杜杰,梁焕,等. 道地药材附子炮制加工规范化探讨[J]. 中国现代中药,2009,11(7):42.

[5] 杭静. 常见的化学性食物中毒的判断及预防[J]. 中国实用医药,2006,1(9):68.

[责任编辑 蔡仲德]