

复方硫酸软骨素片中6种乌头碱类成分的含量测定及质量评价[△]

章璐璐^{1*}, 叶佳², 朱雪梅¹, 杨恩慈^{2#} (1. 浙江中医药大学附属温州市中医院临床药学部, 浙江温州 325029; 2. 温州市食品药品检验科学研究院药械中心, 浙江温州 325038)

中图分类号 R917;R284

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2026)19-2544-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.19.10



摘要 **目的** 建立同时测定复方硫酸软骨素片中6种乌头碱类成分含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法,并对不同批次样品进行质量评价,为该制剂的质量控制提供参考。**方法** 采用Agilent SB-C₁₈色谱柱分离,以0.2%甲酸(氨水调pH至7.5)-乙腈为流动相进行梯度洗脱,流速为0.3 mL/min,柱温为35℃,进样量为1 μL;质谱采用AJS ESI⁺离子源、多反应监测模式,以外标法定量;并进行方法学考察。应用所建UPLC-MS/MS法对来自3家生产企业的64批样品中6种乌头碱类成分(包括乌头碱、次乌头碱、新乌头碱3种双酯型生物碱和苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱3种单酯型生物碱)的含量进行测定;采用描述性统计分析、Kruskal-Wallis *H*检验、主成分分析(PCA)和Spearman秩相关分析分别评价乌头碱类成分的含量分布、不同生产企业间样品差异及成分之间的相关性。**结果** 6种乌头碱类成分在各自质量浓度范围内线性关系良好(*r*均大于0.99);精密性、重复性、稳定性考察的RSD均小于5%,方法的检测限和定量限分别不高于0.003 ng/mL和0.01 ng/mL;平均加样回收率为96.43%~102.30%,RSD为0.35%~4.92%。64批样品中单酯型生物碱类成分的总量(均值为0.034 9 mg/片)明显高于双酯型生物碱类成分总量(均值为0.002 2 mg/片),其中苯甲酰新乌头原碱含量最高(均值为0.031 0 mg/片),其余5种成分含量均较低,且批间变异较大;不同生产企业样品间各成分含量差异无统计学意义(*P*>0.05),PCA未显示明显聚类趋势,部分成分之间存在显著相关性(*P*<0.05)。**结论** 所建UPLC-MS/MS方法可同时快速、准确地测定复方硫酸软骨素片中上述6种乌头碱类成分的含量;多批次样品质量评价可为该制剂的质量控制提供参考。

关键词 复方硫酸软骨素片;乌头碱类成分;超高效液相色谱-串联质谱法;含量测定;附子;质量评价

Content determination of six *Aconitum* alkaloids and quality evaluation in Compound chondroitin sulfate tablets

ZHANG Lulu¹, YE Jia², ZHU Xuemei¹, YANG Enci² (1. Dept. of Clinical Pharmacy, Wenzhou TCM Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Wenzhou 325029, China; 2. Medical Device Center, Wenzhou Research Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Wenzhou 325038, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of the contents of six *Aconitum* alkaloids in Compound chondroitin sulfate tablets, and to perform quality evaluation of samples from different batches, thereby providing a reference for the quality control of this preparation. **METHODS** Chromatographic separation was performed on an Agilent SB-C₁₈ column using gradient elution with 0.2% formic acid (adjusted to pH 7.5 with ammonia) and acetonitrile as the mobile phases. The flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 1 μL. Mass spectrometric analysis was performed using an AJS ESI⁺ ion source in multiple reaction monitoring mode, with quantification by the external standard method. Method validation was performed. The established UPLC-MS/MS method was applied to determine the contents of the six *Aconitum* alkaloids in 64 batches of samples from three manufacturers, including three diester-type alkaloids (aconitine, hypaconitine, and mesaconitine) and three monoester-type alkaloids (benzoylaconine, benzoylhypaconine, and benzoylmesaconine). Descriptive statistics, the Kruskal-Wallis *H* test, principal component analysis (PCA), and Spearman's rank correlation analysis were used to evaluate the content distribution of *Aconitum* alkaloids, differences among samples from different manufacturers, and correlations among the components. **RESULTS** Good linearity was observed for the six *Aconitum* alkaloids over their respective concentration ranges, with correlation coefficients (all *r*>0.99). The relative standard deviations (RSDs) for precision, repeatability, and stability were all less than 5%. The limits of detection and quantification were no higher than 0.003 ng/mL and 0.01 ng/mL, respectively. The mean recoveries ranged from 96.43% to 102.30%, with RSDs ranging from 0.35% to 4.92%. Among the 64 batches of samples, the total content of monoester-type alkaloids (mean value of 0.034 9 mg/tablet) was markedly higher than that of diester-type alkaloids (mean value of 0.002 2 mg/tablet). Benzoylmesaconine showed the highest content, with a mean value of 0.031 0 mg/tablet, whereas the other five components

[△]基金项目 国家中医药管理局全国老药工传承工作室建设项目 (No. 国中医药人教函[2024]255号);温州市基础性公益科研项目 (No. Y20240390)

* 第一作者 主管中药师,硕士。研究方向:药物分析及制剂质量评价。E-mail:jesial@126.com

通信作者 主管药师,硕士。研究方向:药物分析及制剂质量评价。E-mail:yangenci2011@163.com

were present at relatively low levels and showed considerable inter-batch variation. No statistically significant differences were observed in the contents of the six components among samples from different manufacturers ($P>0.05$). PCA showed no obvious clustering trend, and significant correlations were observed among some components ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The established UPLC-MS/MS method enables the rapid and accurate simultaneous determination of the above-mentioned six *Aconitum* alkaloids in Compound chondroitin sulfate tablets. The quality evaluation of multiple batches of samples provides a reference for the quality control of this preparation.

KEYWORDS Compound chondroitin sulfate tablets; *Aconitum* alkaloids; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method; content determination; *Aconitum carmichaelii*; quality evaluation

复方硫酸软骨素片是一种中药复方制剂,由硫酸软骨素钠、白芍浸膏、附子浸膏及甘草浸膏组成,临床常用于风湿、类风湿性关节炎及肩周炎等疾病的治疗,兼具抗炎、镇痛及促进软骨代谢的作用^[1]。其中,附子浸膏是以毛茛科乌头属植物乌头(*Aconitum carmichaelii* Debx.)的子根加工品为原料提取制备而得^[2];该浸膏投料量较大^[3],其散寒除湿、温经止痛的功效为复方硫酸软骨素片疗效的重要支撑^[4]。然而,附子浸膏所含的乌头碱类双酯型二萜生物碱(如乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等)既是关键药效成分,也是其主要毒性物质^[5-6]。该类成分的治疗剂量与中毒剂量极为接近,安全窗口狭窄。据文献报道,口服乌头碱0.2 mg即可引发中毒,2~4 mg可致死亡,临床因炮制不当或超量使用导致的中毒事件屡发^[5,7]。附子经炮制加工后,其所含双酯型生物碱可转化为毒性较低的单酯型生物碱(如苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱等),这是附子炮制减毒的核心机制^[8-9]。

鉴于乌头碱类成分显著的毒性风险,国内外药品监管机构对含乌头类药材制剂的质量控制均提出了严格要求。现行《中国药典》及国家药品标准虽对部分制剂设立了乌头碱限量检查项,但现有方法多采用薄层色谱法,存在灵敏度低、专属性差或仅控制单一乌头碱类成分等问题^[10-11]。复方硫酸软骨素片中的乌头碱限量检查亦沿用薄层色谱法,以乌头碱为对照品,通过展开后目测比较斑点大小,进行定性、半定量分析^[3]。2025年版《中国药典》(一部)采用高效液相色谱法测定附子中乌头碱类成分的含量^[2],但复方硫酸软骨素片处方成分复杂,采用该法测定时易受样品中其他成分干扰,难以实现目标成分的有效分离。因此,建立能够同时准确定量多种乌头碱类成分(尤其是毒性最强的双酯型生物碱类成分)的分析方法,对于科学评估含乌头碱类成分制剂的安全性、完善其质量标准具有重要意义。

超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)法兼具高分离效率、高灵敏度与高特异性,尤其适用于复杂基质中痕量毒性成分的精准分析^[12]。鉴于此,本研究建立了能同时测定复方硫酸软骨素片中6种乌头碱类成分的UPLC-MS/MS法,并采用该方法对64批样

品进行含量测定,同时结合多元统计方法对不同批次样品中乌头碱类成分的含量分布、不同生产企业间样品差异及成分之间的相关性进行评价,以期为该制剂中乌头碱类成分的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括:Agilent 1290/6495 LC-MS型液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(美国Agilent公司)、XS205DU型十万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)、CF16RX II型离心机(日本HITACHI公司)、Milli-Q Integral 5型超纯水器(德国Millipore公司)、SK5200HP型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)、Multi Reax EU型全能型振荡器(德国Heidolph公司)。

1.2 主要药品与试剂

对照品:乌头碱(批号 MUST-22041410,纯度 98.61%)、次乌头碱(批号 MUST-23030319,纯度 98.59%)、苯甲酰新乌头原碱(批号 MUST-22102410,纯度 98.37%)、苯甲酰次乌头原碱(批号 MUST-22121912,纯度 99.94%)、苯甲酰乌头原碱(批号 MUST-22102110,纯度 99.69%)均购自成都曼思特生物科技有限公司;新乌头碱(批号 110799-201608,含量 98.5%)购自中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯,甲酸为质谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

64批次复方硫酸软骨素片来源于3家企业(公司代号分别为A、B、C)。其中,A公司样品36批(编号S1~S36),生产时间为2021年8月至2023年3月;B公司样品23批(编号S37~S59),生产时间为2021年10月至2023年3月;C公司样品5批(编号S60~S64),生产时间为2022年12月至2023年2月。

2 方法与结果

2.1 实验条件

2.1.1 色谱条件

以Agilent SB-C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.8 μm)为色谱柱,采用0.2%甲酸(用氨水调节pH值至7.5,A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min,30%B→75%B;10~11 min,75%B→90%B;11~12 min,90%B→30%B;12~15 min,30%B);流速为0.3 mL/min;柱温为35℃;进样量为1 μL。

2.1.2 质谱条件

采用AJS ESI⁺离子源,以多反应监测模式检测;干燥气温度为200℃,流速为17 L/min;雾化气压力为30 psi;鞘气温度为350℃,流速为11 L/min;喷嘴电压为0 V(+);毛细管电压为4 000 V(+);碎裂电压为380 V。定性定量离子及碰撞能详见表1。

表1 定性定量离子及碰撞能

成分名称	分子式	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)		碰撞能/eV	
			定量	定性	定量	定性
乌头碱	C ₃₃ H ₄₇ NO ₁₁	646.32	586.2	104.9	40	76
次乌头碱	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	616.31	556.3	104.9	36	60
新乌头碱	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	632.31	572.4	104.9	36	76
苯甲酰新乌头原碱	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀	604.31	104.8	76.8	64	80
苯甲酰次乌头原碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	574.30	542.3	104.9	36	76
苯甲酰新乌头原碱	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	590.30	105.1	558.3	60	40

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备溶液的制备

称取上述6种乌头碱类成分对照品各适量,置于10 mL容量瓶中,加异丙醇-二氯甲烷(1:1, *V/V*)混合溶液溶解并定容,摇匀,即得各对照品储备溶液(质量浓度分别为苯甲酰新乌头原碱1.412 6 mg/mL、苯甲酰次乌头原碱1.952 8 mg/mL、苯甲酰乌头原碱1.956 6 mg/mL、新乌头碱1.110 1 mg/mL、次乌头碱2.013 2 mg/mL、乌头碱2.159 6 mg/mL)。

2.2.2 标准系列溶液的制备

分别精密吸取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的对照品储备溶液1.2、0.2、0.2、0.1、0.1、0.1 mL,置于同一10 mL容量瓶中,用乙腈定容,摇匀;精密吸取1 mL,置于20 mL容量瓶中,用乙腈定容,作为混合对照品中间溶液。分别精密吸取混合对照品中间溶液1、1、0.5、0.1、0.1 mL,用乙腈定容至10、200、250、100、200 mL的容量瓶中,作为标准系列溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取样品40片,去除糖衣后,精密称定,研细,精密称适量(约20片),置于150 mL锥形瓶中,分别精密加入20 mL乙腈及1 mL氨试液,称定质量,冷水中超声提取30 min,用乙腈补足减失的质量,以8 000 r/min离心5 min,取上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤后,精密吸取滤液1 mL,置于50 mL容量瓶中,用乙腈定容,即得。

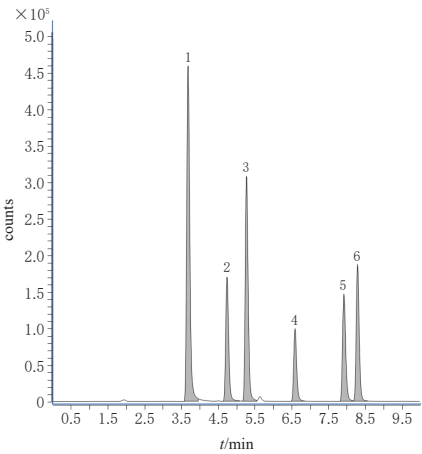
2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察

取“2.2.2”项下最高质量浓度的标准系列溶液,按“2.1”项下实验条件进行分析。结果显示,6种乌头碱类成分均能良好地分离,且空白溶剂无干扰。6种乌头碱类成分的典型离子流图见图1。

2.3.2 标准曲线绘制和线性范围考察

取“2.2.2”项下标准系列溶液,按“2.1”项下实验条件进行测定,以各成分定量离子对的峰面积(*y*)对其质量



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:乌头碱;6:次乌头碱。

图1 6种乌头碱类成分的典型离子流图

浓度(*x*, ng/mL)进行线性回归,所得回归方程、线性范围及*r*值见表2。

表2 6种乌头碱类成分线性关系考察及精密度、稳定性、重复性实验结果

成分名称	回归方程	线性范围(ng/mL)	<i>r</i>	精密度的	重复性的	稳定性的
				RSD/%	RSD/%	RSD/%
乌头碱	<i>y</i> =5 276.794 48 <i>x</i> +311.429 766	0.539 9~107.978 0	0.999 9	4.54	4.59	4.66
次乌头碱	<i>y</i> =6 043.242 932 <i>x</i> +546.882 499	0.503 3~100.660 4	0.999 9	1.97	4.92	4.31
新乌头碱	<i>y</i> =5 590.014 100 <i>x</i> -194.760 917	0.279 6~55.392 0	0.999 9	1.40	4.14	0.11
苯甲酰乌头原碱	<i>y</i> =3 387.931 342 <i>x</i> +11.393 528	0.991 4~198.283 4	0.999 9	1.52	4.62	4.83
苯甲酰次乌头原碱	<i>y</i> =5 141.733 733 <i>x</i> +1 637.916 684	0.976 4~195.282 8	0.999 9	3.07	3.84	4.50
苯甲酰新乌头原碱	<i>y</i> =1 409.995 733 <i>x</i> +232 636.958 704	4.237 8~847.555 9	0.995 4	2.85	4.20	3.67

2.3.3 精密度考察

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品中间溶液1 mL,置于10 mL容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,即得混合对照品溶液。取该溶液,按“2.1”项下实验条件重复测定6次,计算峰面积。结果显示,各成分峰面积的RSD均小于5%(*n*均为6),表明仪器精密度良好。结果见表2。

2.3.4 重复性考察

取样品(S61),按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下实验条件进行测定,以外标法计算样品含量。结果显示,各成分含量的RSD均小于5%(*n*均为6),表明该方法重复性良好。结果见表2。

2.3.5 稳定性考察

取样品(S61),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下实验条件进行测定,计算峰面积。结果显示,各成分峰面积的RSD均小于5%(*n*均为6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。结果见表2。

2.3.6 加样回收率试验

取样品(S61)100片,去除糖衣后,精密称定,研细,精密称取适量(约10片),共6份,分别置于150 mL锥形瓶中,加入“2.2.1”项下各对照品储备溶液适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下实验条件进行测定,以各成分峰面积计算回收率。结果显示,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、苯甲酰新乌头原碱的平均加样回收率分别为98.81%、101.98%、99.54%、98.79%、102.30%、96.43%，对应 RSD 分别为 0.35%、4.89%、4.68%、2.69%、4.92%、3.41% (n 均为 6)，表明该方法准确度良好。

2.3.7 检测限和定量限测定

分别精密量取“2.2.1”项下各对照品储备溶液适量，置于同一 100 mL 容量瓶中，用乙腈定容，配制成各待测成分质量浓度均为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液。精密吸取该溶液 0.5 mL，置于 100 mL 容量瓶中，用乙腈定容；再以所得溶液同法稀释 1 次，即得质量浓度为 0.25 ng/mL 的混合标准二次稀释溶液。精密吸取该混合标准二次稀释溶液 3 mL，置于 250 mL 容量瓶中，用乙腈定容，得质量浓度为 0.003 ng/mL 的检测限考察溶液；另精密吸取该混合标准二次稀释溶液 1 mL，置于 25 mL 容量瓶中，用乙腈定容，得质量浓度为 0.01 ng/mL 的定量限考察溶液。按“2.1”项下实验条件测定，以信噪比 (S/N) ≈ 3 和 $S/N \approx 10$ 分别作为检测限和定量限的判定依据^[13]。结果表明，0.003 ng/mL 溶液的 $S/N > 3$ ，0.01 ng/mL 溶液的 $S/N > 10$ ，故本方法的检测限和定量限分别不高于 0.003 ng/mL 和 0.01 ng/mL 。

2.4 各生产企业样品含量测定及参考限度分析

取 64 批样品，分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下实验条件进行测定，以外标法计算样品含量，结果见表 3。结果显示，双酯型生物碱类成分以乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的总量计，含量范围为 0.000 2~0.005 3 mg/片 ；单酯型生物碱类成分以苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱总量计，含量范围为 0.024 4~0.293 4 mg/片 。

表3 64批复方硫酸软骨素片中6种乌头碱类成分测定结果(mg/片)

编号	双酯型生物碱				单酯型生物碱			
	乌头碱	次乌头碱	新乌头碱	总计	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱	总计
S1	0.000 5	0.000 7	0.000 5	0.001 7	0.000 8	—	0.036 5	0.037 3
S2	0.000 4	0.000 7	0.000 5	0.001 7	0.000 9	—	0.030 9	0.031 8
S3	0.000 4	0.001 0	0.000 7	0.002 1	0.001 2	—	0.029 5	0.030 7
S4	0.000 4	0.000 9	0.000 7	0.002 0	0.001 1	—	0.028 3	0.029 4
S5	0.000 2	0.000 7	—	0.000 9	0.009 8	0.000 1	0.028 6	0.038 5
S6	0.000 1	0.000 6	—	0.000 8	0.009 3	0.000 1	0.029 6	0.039 0
S7	0.000 2	—	—	0.000 2	0.009 6	0.000 1	0.026 2	0.035 9
S8	0.000 2	—	—	0.000 2	0.009 8	0.000 1	0.025 0	0.035 0
S9	0.000 2	—	—	0.000 2	0.009 4	0.000 1	0.025 5	0.035 0
S10	0.000 2	—	—	0.000 2	0.009 7	0.000 1	0.024 9	0.034 6
S11	0.000 2	0.000 6	—	0.000 7	0.005 1	0.000 1	0.022 8	0.028 0
S12	0.000 1	0.000 5	0.000 4	0.001 1	0.005 0	0.000 1	0.024 4	0.029 5
S13	0.000 1	0.000 6	0.000 4	0.001 1	0.005 1	0.000 1	0.023 0	0.028 1
S14	0.000 1	0.000 6	0.000 4	0.001 2	0.004 7	0.000 1	0.023 4	0.028 1
S15	0.000 1	0.003 6	0.000 4	0.004 2	0.004 5	0.000 1	0.025 8	0.030 4
S16	—	0.003 5	0.001 0	0.004 5	0.005 6	0.000 1	0.026 2	0.031 9
S17	—	0.003 7	0.001 1	0.004 8	0.005 4	0.000 1	0.027 4	0.032 9
S18	—	0.003 4	0.001 2	0.004 6	0.005 2	0.000 1	0.025 8	0.031 1

—：未检出。

续表3

编号	双酯型生物碱				单酯型生物碱			
	乌头碱	次乌头碱	新乌头碱	总计	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱	总计
S19	—	0.003 1	0.000 9	0.004 1	0.005 6	0.000 1	0.023 5	0.029 2
S20	—	0.001 6	0.000 4	0.002 1	0.002 8	—	0.022 2	0.025 0
S21	—	0.002 5	0.001 1	0.003 6	0.006 4	0.000 1	0.286 9	0.293 4
S22	0.000 1	0.002 3	0.000 6	0.003 0	0.005 5	0.000 1	0.025 3	0.030 8
S23	0.000 4	0.002 1	0.000 5	0.003 0	0.006 1	0.000 1	0.026 3	0.032 4
S24	0.000 4	0.002 1	0.000 5	0.003 1	0.005 6	0.000 1	0.026 6	0.032 3
S25	0.000 4	0.000 8	0.000 5	0.001 7	0.005 8	0.000 1	0.027 0	0.032 9
S26	0.000 3	0.000 7	0.000 1	0.001 2	0.006 1	0.000 1	0.024 4	0.030 5
S27	0.000 3	0.000 8	0.000 1	0.001 2	0.006 7	0.000 1	0.027 6	0.034 4
S28	0.000 2	0.000 9	0.000 1	0.001 2	0.001 2	—	0.025 0	0.026 2
S29	0.000 2	0.000 8	0.000 1	0.001 1	0.001 1	—	0.025 7	0.026 8
S30	0.000 2	0.000 8	0.000 6	0.001 6	0.001 0	—	0.025 5	0.026 5
S31	0.000 2	0.001 0	0.000 6	0.001 8	0.001 0	—	0.027 3	0.028 2
S32	—	0.001 0	0.000 8	0.001 8	0.001 0	—	0.030 0	0.030 1
S33	—	0.001 1	0.000 7	0.001 8	0.001 0	—	0.031 9	0.032 9
S34	0.000 2	0.000 8	0.000 1	0.001 1	0.001 1	—	0.025 1	0.026 2
S35	0.000 4	0.002 5	0.000 4	0.003 3	0.005 1	0.000 2	0.047 3	0.052 6
S36	0.000 4	0.000 6	—	0.001 0	0.001 9	—	0.030 0	0.031 9
S37	0.000 4	0.003 0	0.000 9	0.004 2	0.002 2	—	0.024 8	0.027 0
S38	0.000 4	0.002 9	0.000 8	0.004 1	0.002 4	—	0.023 3	0.025 8
S39	0.000 4	0.002 1	0.000 5	0.003 0	0.001 6	—	0.029 3	0.030 9
S40	0.000 4	0.002 0	0.000 5	0.002 9	0.001 4	—	0.028 3	0.029 7
S41	0.000 4	0.000 7	0.000 1	0.001 2	0.000 6	—	0.029 7	0.030 4
S42	0.000 4	0.000 7	0.000 1	0.001 2	0.000 6	—	0.029 0	0.029 6
S43	0.000 4	0.002 6	0.000 7	0.003 6	0.002 1	—	0.025 5	0.027 6
S44	0.000 4	0.000 2	0.000 1	0.000 7	0.000 3	—	0.026 5	0.026 9
S45	0.000 4	0.000 2	0.000 1	0.000 6	0.000 3	—	0.025 7	0.026 0
S46	0.000 4	0.002 9	0.000 8	0.004 0	0.002 4	—	0.030 8	0.033 2
S47	0.000 4	0.000 9	0.000 1	0.001 4	0.000 9	—	0.026 1	0.027 0
S48	0.000 4	0.002 9	0.000 9	0.004 2	0.002 4	—	0.027 0	0.029 5
S49	0.000 1	0.002 4	0.000 6	0.003 1	0.005 5	0.000 1	0.024 6	0.030 2
S50	0.000 1	0.002 3	0.000 6	0.003 0	0.005 8	0.000 1	0.027 2	0.033 1
S51	0.000 1	0.002 2	0.000 6	0.002 9	0.006 0	0.000 1	0.024 9	0.030 9
S52	0.000 4	0.002 0	0.000 5	0.002 9	0.006 0	0.000 1	0.026 0	0.032 1
S53	0.000 4	0.000 8	0.000 1	0.001 2	0.005 3	0.000 1	0.023 3	0.028 6
S54	0.000 4	0.000 8	0.000 1	0.001 3	0.005 6	0.000 1	0.027 2	0.032 9
S55	0.000 2	0.000 8	0.000 1	0.001 1	0.002 6	—	0.021 8	0.024 4
S56	0.000 2	0.000 9	0.000 1	0.001 2	0.003 0	—	0.026 2	0.029 2
S57	—	0.001 0	0.000 7	0.001 8	0.002 7	—	0.029 6	0.032 3
S58	—	0.003 0	0.000 8	0.003 8	0.002 5	—	0.028 3	0.030 8
S59	0.000 4	0.001 6	0.000 4	0.002 4	0.001 2	—	0.025 7	0.026 8
S60	—	0.004 0	0.001 2	0.005 3	0.006 5	0.000 1	0.025 2	0.031 8
S61	—	0.004 0	0.001 1	0.005 1	0.006 6	0.000 1	0.027 2	0.033 9
S62	0.000 2	0.000 8	0.000 6	0.001 6	0.001 2	—	0.025 6	0.026 9
S63	0.000 2	0.000 8	0.000 6	0.001 6	0.001 3	—	0.030 2	0.031 5
S64	0.000 4	—	—	0.000 4	0.000 2	—	0.026 3	0.026 5

参考 2025 年版《中国药典》(一部)附子饮片项下附片(黑顺片、白附片)“检查”中有关双酯型和单酯型生物碱的限度要求(含双酯型生物碱以新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的总量计,不得过 0.020%;含单酯型乌头碱以苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱的总量计,不得少于 0.010%)^[2],结合复方硫酸软骨素片的处方投料量对上述限度进行折算。按每 1 000 片含附子 250 g(即每片含附子 0.25 g)折算,双酯型生物碱

(以新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的总量计)的参考限度为不得过0.05 mg/片,单酯型生物碱(以苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰乌头原碱的总量计)的参考限度为不得少于0.025 mg/片。此外,依据现行复方硫酸软骨素片在国家药品标准中的乌头碱薄层限量检查条件^[3],对乌头碱单一成分限量进行折算,其参考限度约为0.041 7 mg/片。以各样品实测值与上述3项参考限度逐一比对,可评价复方硫酸软骨素片中乌头碱类成分的质量控制符合情况。

最终测定结果显示,64批样品中双酯型生物碱总量均低于0.05 mg/片,乌头碱单一成分含量均低于0.041 7 mg/片;单酯型生物碱总量除S55批样品略低于0.025 mg/片外,其余63批样品均高于该参考限度。

2.5 多批次样品含量特征及统计分析

采用SPSS 24.0、GraphPad Prism 10.1.2软件对64批复方硫酸软骨素片样品中6种乌头碱类成分的含量进行统计分析。其中,采用描述性统计分析评价乌头碱类成分的含量分布,采用Kruskal-Wallis *H*检验评价不同生产企业间样品差异,采用主成分分析(principal component analysis, PCA)及Spearman秩相关分析评价成分之间的相关性。

2.5.1 描述性统计分析

计算并统计上述6种乌头碱类成分含量的均值、标准差、最小值、最大值及RSD,并分别统计A、B、C3家生产企业样品中上述6种成分含量的均值与标准差。结果显示,64批样品中单酯型生物碱类成分的总量(均值为0.034 9 mg/片)明显高于双酯型生物碱类成分总量(均值为0.002 2 mg/片),其中苯甲酰新乌头原碱含量最高(均值为0.031 0 mg/片),其余5种成分含量均较低,部分成分在个别批次中未检出。6种乌头碱类成分的RSD介于68.09%~106.90%,显示出较大的批间变异。按生产企业分层统计发现,除A生产企业有1批样品(S21)中的苯甲酰新乌头原碱含量达0.286 9 mg/片,导致A企业样品该成分的均值略高、标准差明显偏大外,其余成分含量在各企业间的均值相近。

2.5.2 Kruskal-Wallis *H*检验

由于Shapiro-Wilk检验显示部分成分含量数据不符合正态分布($P<0.05$),故本研究采用Kruskal-Wallis *H*非参数检验比较3家生产企业样品在6种乌头碱类成分含量上的差异,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果显示,6种乌头碱类成分含量在3家生产企业间的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.5.3 PCA

对6种乌头碱类成分的含量数据进行PCA。分析前对数据进行Z-score标准化,提取特征值大于1的主成分。结果显示,前2个主成分的累计方差贡献率为68.23%,能较好反映样品中乌头碱类成分的主要变异信息。载荷结果显示,主成分1主要受次乌头碱、新乌头

碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱等成分影响,而乌头碱在主成分1中呈现相反的载荷方向,苯甲酰新乌头原碱对主成分1的贡献相对较小;主成分2主要体现在苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱与新乌头碱、次乌头碱之间的载荷方向差异,而乌头碱和苯甲酰新乌头原碱在主成分2中的载荷较低。得分图(图2A)显示,3家生产企业的样品相互交错,未呈现明显聚类,表明基于6种乌头碱类成分含量特征不能明显区分不同生产企业的样品。

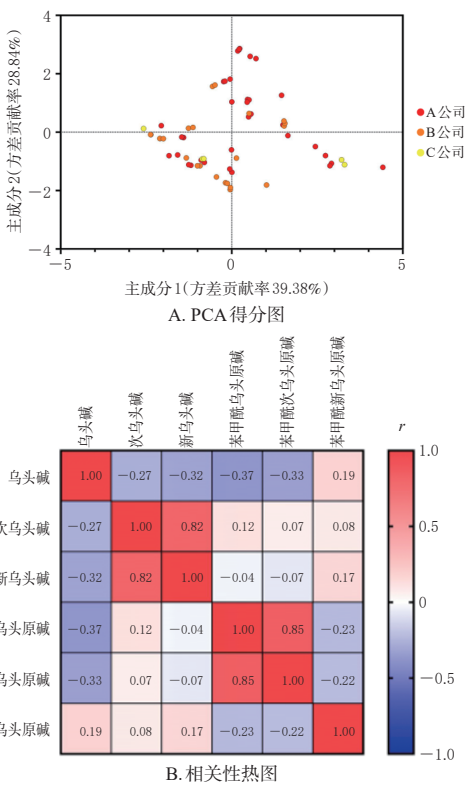


图2 样品PCA及成分相关性分析结果

2.5.4 成分相关性分析

由于Shapiro-Wilk检验显示部分成分含量数据不符合正态分布($P<0.05$),不满足Pearson相关分析对双变量正态分布的要求,故本研究采用Spearman秩相关系数对6种乌头碱类成分进行两两相关性分析,并绘制相关性热图(图2B)。结果显示,6种乌头碱类成分之间存在不同程度的相关性。其中,次乌头碱与新乌头碱呈极强正相关($r=0.815\ 9, P<0.001$),苯甲酰乌头原碱与苯甲酰次乌头原碱亦呈极强正相关($r=0.851\ 2, P<0.001$),表明上述成分在样品中的变化趋势高度一致。乌头碱与次乌头碱($r=-0.273\ 9, P=0.028\ 5$)、新乌头碱($r=-0.320\ 1, P=0.009\ 9$)、苯甲酰乌头原碱($r=-0.374\ 3, P=0.002\ 3$)及苯甲酰次乌头原碱($r=-0.334\ 7, P=0.006\ 9$)均呈弱至中度负相关,提示乌头碱与上述成分的含量变化趋势相反。其余成分之间的相关性均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

复方硫酸软骨素片处方组成复杂,基质干扰成分较多,而目标乌头碱类成分结构相近、含量较低,常规分析方法常存在分离效果欠佳、灵敏度不足或专属性不强等问题。本研究建立的UPLC-MS/MS方法可同时快速、准确地测定6种目标成分,并成功应用于64批样品分析,表明该方法适用于复方制剂中乌头碱类成分的检测,也为复杂中药制剂中微量成分的多指标监测提供了方法参考。

64批样品测定结果显示,6种目标成分在不同批次样品间存在一定波动,提示复方制剂中乌头碱类成分的残留或转化可能受原料质量、炮制程度、生产工艺及过程控制等多种因素影响。与理论参考限度比较结果表明,所有样品的双酯型生物碱总量及乌头碱单一成分含量均符合相应参考限度要求,而单酯型生物碱总量仅个别批次未达到参考限度,说明虽然多数样品中乌头碱类成分的质量控制得较好,但批次间仍存在一定差异。该结果亦表明,在该类制剂的质量评价中,仅考察乌头碱单一成分尚不足以全面反映样品的质量特征,需结合双酯型和单酯型生物碱总量进行综合评价,更有助于识别潜在质量风险。

PCA结果显示,前2个主成分可概括样品中乌头碱类成分的主要变异信息,不同企业样品在得分图中相互交错,结合Kruskal-Wallis *H* 检验未发现6种成分含量在不同企业样品间存在显著差异,提示当前复方硫酸软骨素片中乌头碱类成分的含量差异未表现出明显的企业间聚类趋势,可能更多表现为批次间差异。因此,在该制剂的质量控制过程中,应重点关注不同批次样品间乌头碱类成分组成及含量变化,而不宜依据企业来源进行质量判别。该结果提示,在后续质量控制研究中,可进一步关注附子浸膏原料质量及生产过程对成品乌头碱类成分波动的影响,为建立全过程质量控制策略提供参考。载荷分析和相关性分析进一步表明,不同乌头碱类成分在样品中的变化模式并不一致,其中乌头碱与其余双酯型及部分单酯型生物碱类成分呈负相关。结合已有研究推测,上述变化模式可能与原料差异^[14]、炮制及制备过程中双酯型生物碱的分步水解和进一步转化^[15-16]等因素有关,因此成品中各成分含量之间未必呈现简单的一一对应关系。上述结果提示,在附子相关制剂的质量评价中,单一指标的变化并不能完全反映乌头碱类成分的整体变化趋势,采用双酯型与单酯型乌头碱多成分联合监测更有利于发现批次间的质量差异,从而更全面地反映附子源性成分的变化特征。

综上,本研究通过建立UPLC-MS/MS法并对国内3家注册生产企业的64批复方硫酸软骨素片进行实测后发现,样品中单酯型生物碱类成分总体高于双酯型生物碱,其中苯甲酰新乌头原碱为主要成分;不同批次样品中乌头碱类成分含量存在一定波动,但总体未表现出明显的企业间差异。上述结果表明,采用多成分同步测定

有助于更全面地表征复方硫酸软骨素片中附子源性成分的质量特征,可为其质量控制提供实验依据。然而,本研究仅测定了样品中6种目标成分的含量,尚未结合原料来源、炮制参数和生产工艺开展全过程质量追踪,也未对含量异常的批次进行溯源分析。后续研究计划在扩大样本量的基础上,整合原料、工艺及临床应用信息,进一步完善对该类制剂质量与安全性的综合评价。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈海,吕超,陈际洋,等. 复方硫酸软骨素联合依托考昔治疗肩周炎的临床研究[J]. 中国合理用药探索, 2022, 19(4): 82-86.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2025年版. 北京:中国医药科技出版社, 2025: 207.
- [3] 国家药典委员会. 国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准:第九册[M]. 北京:国家药品监督管理局, 2002: 198-199.
- [4] 金红婷,沈彦,肖鲁伟,等. 乌头类中药在骨科临床的应用研究[J]. 中国骨伤, 2008, 21(12): 943-945.
- [5] 杨武斌,王平. 乌头碱药理作用及毒性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 427-429.
- [6] 李君,顾艳丽,祖文,等. 蒙药那如-3味的醇提工艺优化[J]. 中国药房, 2021, 32(16): 1988-1994.
- [7] 郑冬律. 急性乌头碱中毒死亡1例[J]. 中国法医学杂志, 2018, 33(6): 651, 654.
- [8] 杨超,邓曦,周娟. 附子不同炮制品中6个乌头碱成分含量测定方法的建立及临床用药分析[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(23): 2641-2647.
- [9] 蓝鲜艳,周畅均,毛敏,等. 附子不同炮制品的相关差异及临床合理选用探讨[J]. 中成药, 2021, 43(4): 994-997.
- [10] 岳云飞,张丽英,刘永成. 改进复方硫酸软骨素片中乌头碱限量检查方法的建议[J]. 中国药品标准, 2011, 12(1): 13-14.
- [11] 田友清,丁平,支荣荣. 《中国药典》2020年版一部含乌头碱制剂质量控制探讨[J]. 中国药品标准, 2023, 24(2): 122-129.
- [12] 蔡安瑞,李琼,武晓剑,等. 乌头碱的水解过程以及检测方法的研究进展[C]/第九届中国化妆品学术研讨会论文集(下). 上海:中国香料香精化妆品工业协会, 2012: 184-189.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 2025年版. 北京:中国医药科技出版社, 2025: 676-682.
- [14] Miao L L, Zhou Q M, Peng C, et al. Discrimination of the geographical origin of the lateral roots of *Aconitum carmichaelii* using the fingerprint, multicomponent quantification, and chemometric methods[J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4124.
- [15] 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.
- [16] 龚义明,邓广海,郑显辉,等. 生附子煎煮过程中生物碱含量变化及水解机理[J]. 中国药业, 2017, 26(4): 9-15.

(收稿日期:2026-04-06 修回日期:2026-08-24)

(本文责编:胡晓霖)