

HPLC法测定藏药榜那中乌头碱的含量[△]

欧丽娜^{1,2*}, 阳勇², 李星颖², 覃瑶^{2,3}, 丁刚², 阿萍⁴, 罗维早^{2#}(1.成都中医药大学药学院, 成都 610072; 2.重庆市中药研究院, 重庆 400065; 3.太极集团有限公司, 重庆 401147; 4.西藏自治区食品药品检验所, 拉萨 850000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1769-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.13

摘要 目的: 建立测定榜那药材中乌头碱含量的方法, 确定其限量。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 YMC triart C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.25 mol/L 乙酸铵溶液(加入 15 mmol/L 十二烷基硫酸钠, 再以浓氨水调 pH 为 9.5)=48:52(V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为 35 ℃。结果: 乌头碱的质量浓度在 2.10~1 051.00 μg/ml 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD≤2%; 高、中、低量度的平均加样回收率分别为 99.2%、99.1% 和 99.1%, RSD 分别为 0.9%、1.0% 和 0.3% (n 均为 3)。结论: 该方法简便、灵敏、重复性好, 适用于榜那药材的质量控制。

关键词 铁棒锤; 高效液相色谱法; 乌头碱; 含量测定

Content Determination of Aconitine in Tibetan Medicine Radix Aconiti

OU Li-na^{1,2}, YANG Yong², LI Xing-ying², QIN Yao^{2,3}, DING Gang², A Ping⁴, LUO Wei-zao²(1.College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China; 2.Chongqing Institute of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 3.Taiji Group Co., Ltd., Chongqing 401147, China; 4.Tibet Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Lasa 850000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of aconitine in Tibetan medicine Radix Aconiti, and to determine its limited quantity standard. METHODS: HPLC method was used. The separation was carried out on YMC triart C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.25 mol/L ammonium acetate (containing 15 mmol/L SDS, pH adjusted to 9.5 with ammonium hydroxide, 48:52, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 230 nm and the column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear ranges of aconitine were 2.10-1 051.00 μg/ml ($r=0.999\ 9$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were not more than 2%. The average recoveries of the three measure (high measure, middle measure and low measure) were 99.2% (RSD=0.9%, $n=3$), 99.1% (RSD=1.0%, $n=3$) and 99.1% (RSD=0.3%, $n=3$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and reproducible, and can be used for the quality control of Tibetan medicine Radix Aconiti.

KEYWORDS Radix Aconiti; HPLC; Aconitine; Content determination

榜那为常用藏药, 民间及临床的应用均取其消炎、镇痛及麻醉等功效, 用于腰肌劳损、风湿关节痛等疾病的治疗^[1]。部颁标准以“铁棒锤”一名收录, 并规定本品基源为毛茛科植物伏毛铁棒锤 *Aconitum flavum* Hand.-Mazz 和铁棒锤 *A. pendulum* Busch. 的干燥块根。另外, 西藏自治区藏医院和西藏自治区藏药厂所用的榜那均为西藏山南等地所产的工布乌头 *A. kongboense* Lauener 的块根。由于在 2010 年版《中国药典》中未记载该药材, 在部颁标准^[2]中也只有部分简单的规定, 标准极不完善, 因此为了有效地控制药材质量, 本试验在参考文献^[3-10]的基础上, 采用高效液相色谱(HPLC)法对不同来源的榜那药材中乌头碱的含量进行了测定。

△ 基金项目: 国家药品标准提高暨 2015 版药典科研立项(No.M25); 重庆市 GLP 中心能力提升建设项目(No.CSTC, 2012pt-kyys10001); 重庆市中药新产品开发研究能力提升建设项目(No.CSTC, 2012pt-kyys10004)

* 硕士研究生。研究方向: 中药质量标准。电话: 023-89029026。E-mail: 13438940256@163.com

通信作者: 研究员, 博士。研究方向: 中药化学及新剂型。电话: 023-89029026。E-mail: loweizao@163.com

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 型 HPLC 仪(日本岛津公司); AUW220D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); Delta 320 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110720-200410); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

20 批榜那药材采集或购买于不同地区, 均经江西中医药大学钟国跃研究员鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: YMC triart C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.25 mol/L 乙酸铵溶液(加入 15 mmol/L 十二烷基硫酸钠, 再以浓氨水调 pH 为 9.5)=48:52(V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 35 ℃; 进样量: 10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取乌头碱对照品适量,加甲醇-盐酸(100:0.5, V/V)的混合液溶解,制成每1 ml含乌头碱1 051.00 μg 的对照品溶液。再用甲醇-盐酸(100:0.5, V/V)的混合液逐级稀释成系列质量浓度的对照品溶液(乌头碱的质量浓度分别为1 051.00、525.50、210.20、105.10、52.55、10.51、2.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

2.2.2 供试品溶液 取本品粉末(过二号筛)约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-盐酸(100:0.5, V/V)的混合液25 ml,密塞,称定质量,超声处理(功率:250 W,频率:40 kHz)30 min,冷却,再称定质量,用上述溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 专属性试验

取空白溶剂[甲醇-盐酸(100:0.5, V/V)混合液]、对照品溶液与供试品溶液各适量,按上述色谱条件进样测定。结果表明,空白溶剂在乌头碱出峰位置处没有干扰峰,对照品和供试品峰的纯度均在0.99以上,说明此方法专属性好。色谱见图1。

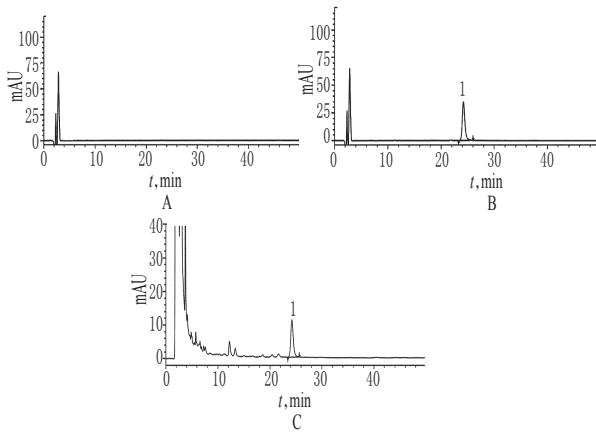


图1 高效液相色谱图

A.空白溶剂;B.乌头碱对照品;C.供试品;1.乌头碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A.blank solvent;B.aconitine control;C.test sample;1.aconitine

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下系列质量浓度的对照品溶液适量,依次进样,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以对照品的质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得乌头碱的回归方程为 $y=11\ 615x+9\ 054.1$ ($r=0.999\ 9$, $n=7$)。结果表明,乌头碱的质量浓度在2.10~1 051.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取质量浓度为105.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的乌头碱对照品溶液适量,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示, $RSD=0.4\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

分别取同一份供试品溶液和对照品溶液各适量,分别于0、2、4、8、12、16、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,供试品溶液和对照品溶液中乌头碱峰面积积分值

的RSD分别为0.5%和0.1%(n 均为7),表明供试品溶液和对照品溶液至少在24 h内稳定。

2.7 重复性试验

取同一批榜那药材粉末适量,共6份,精密称定,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,样品中乌头碱的平均百分含量为0.082%, $RSD=2.0\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已测得乌头碱含量的同一批榜那药材粉末9份,每份约1 g,精密称定,分别加入乌头碱对照品溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=3$)

称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1.001 8	0.821 5	0.660 0	1.473 9	98.9		
1.001 3	0.821 1	0.660 0	1.476 9	99.4	99.1	0.3
1.000 6	0.820 5	0.660 0	1.473 9	99.0		
1.003 1	0.822 5	0.834 0	1.641 0	98.1		
1.001 9	0.821 6	0.834 0	1.648 2	99.1	99.1	1.0
1.001 3	0.821 1	0.834 0	1.656 4	100.2		
1.001 2	0.821 0	0.986 0	1.789 4	98.2		
1.000 9	0.820 7	0.986 0	1.804 0	99.7	99.2	0.9
1.001 0	0.820 8	0.986 0	1.804 0	99.7		

2.9 定量限与检测限测定

准确制备乌头碱对照品溶液,逐级稀释至一定质量浓度并按上述色谱条件进样测定,计算定量限和检测限。结果显示,其定量限为1.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($RSD=1.2\%$, $n=3$);检测限为0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($RSD=1.6\%$, $n=3$)。

2.10 样品含量测定

取20批不同来源的榜那药材粉末各1 g,精密称定,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中乌头碱的含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者考察了乙腈-碳酸氢铵溶液、乙腈-乙酸铵溶液、乙腈-四氢呋喃-乙酸铵溶液等流动相系统,经反复多次试验,结果以乙腈-0.25 mol/L 乙酸铵溶液(加入15 mmol/L 十二烷基硫酸钠,再以浓氨水调pH为9.5)为流动相系统,乌头碱色谱峰分离度最好,故选其作为流动相。

3.2 检测波长的选择

取乌头碱对照品溶液在波长190~700 nm范围内扫描,发现其最大紫外吸收在230 nm波长左右,故确定检测波长为230 nm。

3.3 供试品溶液制备方法的考察

试验中对供试品溶液的制备方法进行了考察。以提取出来的乌头碱含量为指标,分别考察了提取方法(超声、冷浸)、

表2 20批榜那药材中乌头碱的含量测定结果($n=3$)Tab 2 Content determination of aconitine in 20 batches of Radix Aconiti ($n=3$)

编号	基原	来源/产地	收集/采收时间	乌头碱百分含量, %
1	工布乌头	西藏工布江达县	2011-08-25	0
2	工布乌头	西藏林周至当雄途中	2011-09-07	0
3	-	西藏林芝奇正藏药厂	2011-08-23	0
4	铁棒锤	西藏昌都地区藏医院	2011-08	0
5	-	西藏山南	2013-05-07	0
6	-	西藏那曲	2013-05-07	0
7	-	西藏那曲	2013-05-07	0
8	-	西藏山南	2013-05-07	0
9	-	西藏林芝奇正藏药厂	2011	0
10	-	青海通天河藏药有限公司	2013-12	0
11	-	西藏自治区藏药厂	2013-12	0
12	铁棒锤	青海金河藏药厂	2011-08-04	0.105
13	铁棒锤	青海西宁九康市场	2011-08-04	0.731
14	伏毛铁棒锤	甘肃合作市夏河县	2011-07-29	0.150
15	伏毛铁棒锤	青海互助县北山	2011-08-02	0.091
16	铁棒锤	青海贵德县拉吉山岔口处	2011-08-06	0.077
17	铁棒锤	青海玉树县巴塘村	2011-08-12	0.088
18	伏毛铁棒锤	西藏墨竹工卡县	2011-08-25	0.120
19	伏毛铁棒锤	西藏丁青县	2011-09-09	0.065
20	-	西藏林芝奇正藏药厂	2012	0.089
\bar{x} , %				0.168

注:“-”不详

note:“-”means not quite clear

提取溶媒[甲醇、乙醇、乙腈、甲醇-盐酸(100:0.5, V/V)混合液]、提取溶媒用量(15、25、50 ml)和提取时间(15、30、60 min)。结果表明,两种提取方法所提取出来的乌头碱含量比较接近,但超声提取的乌头碱含量相对略高,从节省成本和时间上考虑,最终选择超声提取法;以甲醇-盐酸(100:0.5, V/V)混合液作为溶媒提取的乌头碱含量要比甲醇、乙醇、乙腈高许多,且乌头碱成盐后比较稳定,故选择甲醇-盐酸(100:0.5, V/V)混合液为提取溶媒;以15 ml溶媒提取乌头碱的含量相对较低,以25、50 ml溶媒提取所得乌头碱的含量相差不大,说明25 ml溶媒即可提取完全;超声提取时间以30 min所得乌头碱含量较高,故选择超声30 min。

3.4 对照品的选择

不同产地榜那药材之间的成分差异较大,但大部分药材中都含有有毒的乌头碱成分。因此,为了保证用药的安全性,本试验选择了乌头碱来作指标成分,控制其限量。从用药安全性以及含量测定结果综合考虑,暂定榜那药材中乌头碱的百分含量不能超过0.2%。

综上所述,本方法简便、灵敏、重复性好,适用于榜那药材的质量控制。

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[S]. 1995: 79.
- [2] Wang ZH, Wen J, Xing JB, *et al.* Quantitative determination of diterpenoid alkaloids in four species of Aconitum by HPLC[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(4): 1 031.
- [3] 张聿梅, 谢黔峰, 鲁静, 等. 草乌药材标准修订研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 940.
- [4] 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): 1 390.
- [5] 廖琦, 杨继家, 张艺, 等. 民族药铁棒锤砂炒炮制品的质量标准研究[J]. 中国药房, 2013, 24(11): 1 007.
- [6] 陈燕, 易进海, 刘云华, 等. HPLC法测定藏药材铁棒锤、榜嘎中酯型生物碱的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2009(6): 47.
- [7] 张国红, 由会玲, 刘云肖. 乌头生物碱含量测定方法现状[J]. 河北中医药学报, 2005, 15(1): 45.
- [8] 李路娥, 罗群, 王跃华. 乌头碱检测方法综述[J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2005, 24(1): 15.
- [9] 付雪艳, 董琳, 张义伟, 等. HPLC法测定铁棒锤中乌头碱的含量[J]. 科协论坛: 下半月, 2007(8): 456.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录36.

(收稿日期: 2013-12-22 修回日期: 2014-02-25)

全国医疗纠纷人民调解工作现场会在天津召开

本刊讯 2014年5月5日, 全国医疗纠纷人民调解工作现场会在天津召开。国务院副总理刘延东同志和中央政法委书记孟建柱同志对这次会议高度重视, 分别作出重要批示, 提出明确要求。会议总结交流了医疗纠纷人民调解工作经验, 现场参观了天津市医疗纠纷人民调解委员会和部分医院, 对进一步推进医疗纠纷人民调解工作进行了部署。国家卫生计生委主任李斌、中央综治办主任陈训秋、司法部部长吴爱英出席会议并讲话, 司法部副部长郝赤勇出席会议。会议由国家卫生计生委副主任马晓伟主持。

会议通报了近年来全国医疗纠纷人民调解工作进展情

况。自2010年以来, 各地认真落实《中华人民共和国人民调解法》和《关于加强医疗纠纷人民调解工作的意见》的要求, 积极推进医疗纠纷人民调解工作, 健全了综治、公安、司法行政、卫生计生、保监等部门协同参加的医疗纠纷预防和处置工作机制, 建立以人民调解为主要模式的第三方医疗纠纷化解机制, 取得显著成效。据统计, 截至目前, 全国共建立医疗纠纷人民调解组织3 396个, 人民调解员2.5万多人, 55%的医疗纠纷人民调解委员会有了政府财政支持。2013年共调解医疗纠纷6.3万件, 调解成功率达88%, 有力地维护了医患双方合法权益, 维护了社会和谐稳定。