

乌头类药材及中毒案例未知品中酯型生物碱的检出及测定

张文婷(杭州 310004 浙江省药品检验所)

摘要 目的: 建立乌头类主要毒性成分新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的检出方法和含量测定方法。方法: 以 TLC 法和 HPLC 法双重鉴定各药材及未知品中酯型生物碱的存在并测定其含量。结果: TLC 法能有效检出新乌头碱、乌头碱和次乌头碱, HPLC 法可进一步确证各酯型生物碱的存在并测定 TLC1/500 点样量的乌头碱含量。结论: 该方法操作简单、快速、准确, 可作为乌头类药材及中毒案例未知品的鉴定与含量测定方法。

关键词 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 检出; 含量测定

Checking and measuring double-ester alkaloids in aconites medicinal materials and in unknowing materials poisoning cases

Zhang Wenting(*Institute of Drug Control Zhejiang Province, Hangzhou 310004*)

ABSTRACT PURPOSE: Establish the methods to detect and measure new-aconitine, aconitine and hypoaconitine, which are the mostly toxic components of aconites. **METHOD:** The existence and contents of double-ester alkaloids in every medicinal materials and unknowing materials were carried out by TLC and HPLC. **CONSEQUENCE:** TLC was good to separate new-aconitine, aconitine and hypoaconitine. HPLC can detect the existence of apiece double-ester alkaloids and can measure 1/500 of the quantity by TLC. **Conclusion:** checking and measuring by TLC and HPLC are simple rapid and accurate method for the assay of aconites medicine materials.

KEY WORDS aconitine, new-aconitine, hypoaconitine, checking, measuring

《中国药典》所载的乌头类药材有草乌(毛茛科植物北乌头 *Aconitum Kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根)、川乌(毛茛科植物乌头 *A. Carmichaeli* Debx. 的干燥母根)、附子(毛茛科植物乌头 *A. Carmichaeli* Debx. 的子根加工品)和雪上一支蒿(毛茛科植物短柄乌头 *A. Brachypodium* Diels 的干燥块根), 具祛风除湿, 温经止痛作用, 但由于他们所含的酯型生物碱具剧毒, 因此, 在使用药材及炮制饮片时, 必须控制其含量限度。近年来, 使用民间偏方造成乌头类中毒导致死亡的人数不断增加, 由于使用者多制成酒剂或粉末, 给鉴定和公安办案带来一定的难度, 另外, 现版中国药典为分光光度法测定单味药材中的总酯型生物碱量, 对于复方中药中含有乌头类

药味的制剂仅用 TLC 法比较斑点的大小来判断乌头碱是否超限, 尚无一个有效的方法及指标来确定其酯型生物碱中主要毒性成分分离方法及含量情况, 因此, 有必要制订切实可行的鉴定和检测手段, 严格控制乌头类酯型生物碱的限度, 以防止类似的事件发生。乌头类药材含有的酯型生物碱主要为新乌头碱、乌头碱和次乌头碱, 本文针对该三成分对各药材及未知品制订 TLC 鉴定和 HPLC 法检测方法, 以供药品生产企业、饮片加工企业和专业检测部门参考。

1 仪器和试剂

SS1V 液相色谱仪, SS1205 检测器, DAD 检测器。

岛津 UV-260 紫外分光光度计。

草乌^{1#}、制草乌^{1#}由浙江中医学院实验药厂提供;草乌^{2#}、制草乌^{2#}由杭州胡庆余堂制药厂提供;川乌、附子、雪上一支蒿由浙江省药品检验所标本室提供;新乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品由中国药品生物制品检定所提供;未知药酒由衢县公安局提供;外用样品和内服样品由余杭市公安局提供。

甲醇为色谱纯,其他为分析纯;TLC板自制。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴定 取药材粉末约1g,精密称定,加氨试液润湿,加氯仿30ml静置过夜,超声处理20分钟,滤过,以10ml氯仿分两次洗涤滤渣和滤器,合并滤液,蒸干,残留物加氯仿溶解并定容至1ml,作为供试药材溶液。另精密量取未知药酒和外用样品各30ml,蒸去乙醇,加氨试液0.5ml,用氯仿提取三次(20、20、10ml),合并提取液,蒸干,残留物加氯仿使溶解并定容至1ml作为供试样品溶液。再精密称取新乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品,用氯仿制成每1ml中各含1mg的混合溶液作为对照品溶液。照薄层色谱法(中国药典2000年版一部附录VIB)试验,吸取上述溶液各5μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以苯-醋酸乙酯-二乙胺(10:8:1)为展开剂,或以环己烷-醋酸乙酯-二乙胺(8:1:1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以稀碘化铋钾溶液。结果见图1、2。

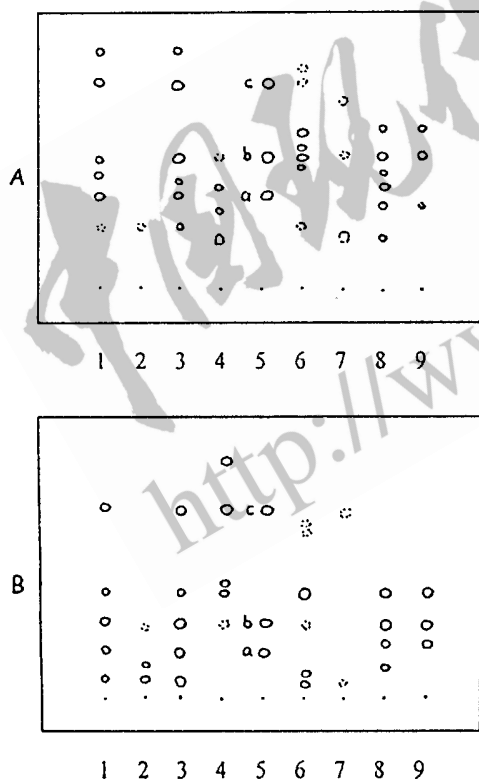


图1 乌头类薄层色谱图

A 苯-醋酸乙酯-二乙胺(10:8:1) B 环己烷-醋酸乙酯-二乙胺(8:1:1)

1. 草乌^{1#} 2. 制草乌^{1#} 3. 草乌^{2#} 4. 制草乌^{2#}
5. 对照品(a 新乌头碱 b 乌头碱 c 次乌头碱)
6. 川乌 7. 雪上一支蒿 8. 外用样品 9. 药酒

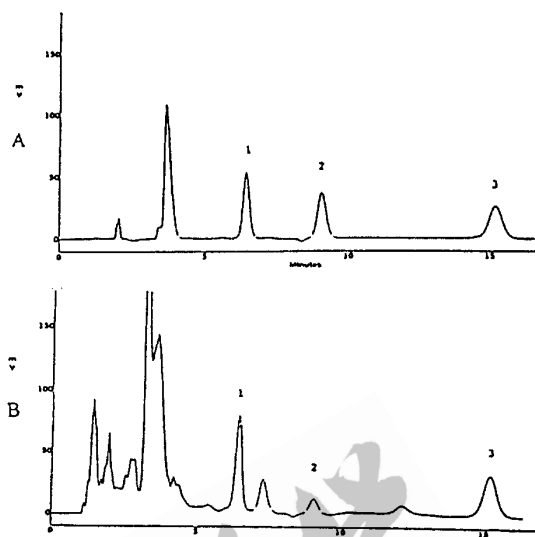


图2 草乌HPLC图谱

A 对照品 B 草乌

1. 新乌头碱 2. 乌头碱 3. 次乌头碱

2.2 含量检测

2.2.1 色谱分析条件与系统适用性试验 十八烷基硅烷键合硅胶为填料;甲醇-氯仿-水-二乙胺(74:1:25:0.1)为流动相;检测波长230nm;流速1ml/min;柱温为室温。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取新乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品适量,用氯仿制成每1ml中各含0.1mg的混合溶液作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 供试品溶液制备同TLC法。

2.2.4 测定波长选择 取对照品溶液,置紫外分光光度计进行光谱扫描,结果显示,在230nm波长处有最大吸收,故选择该波长为测定波长。

2.2.5 线性关系考察 精密量取对照品溶液0.2、5、10、15、20μl,分别注入液相色谱仪,测定峰面积。结果显示在0.02~2.0μg范围内,新乌头碱、乌头碱和次乌头碱呈良好的线性关系。新乌头碱 $Y = 76478X - 48852$, $R = 0.996$; 乌头碱 $Y = 74987X - 12355$, $R = 0.999$; 次乌头碱 $Y = 78333X - 8320$, $R = 0.999$ 。

2.2.6 精密度考察 精密量取对照品溶液10μl,注入液相色谱仪,重复进样5次,测定峰面积,结果显示,新乌头碱平均峰面积为86563.4, $RSD = 1.7\%$ ($n = 5$); 乌头碱为79765.3, $RSD = 1.3\%$ ($n = 5$); 次乌头碱为,82175.6, $RSD = 2.0\%$ ($n = 5$)。

2.2.7 重复性试验 精密称取草乌粉末(浙江省中医学院实验药厂)5份,依上述方法制备供试品溶液并测定,结果显示新乌头碱含量为131.15μg/g, $RSD = 1.2\%$ ($n = 5$); 乌头碱含量为7.61μg/g, $RSD = 1.0\%$ ($n = 5$); 次乌头碱含量为103.30μg/g, $RSD = 2.0\%$ ($n = 5$)。

2.2.8 回收率试验 精密称取草乌粉末适量,加入各对照品适量,同法制备并测定,结果显示新乌头碱回收率为100.97%, $RSD = 1.2\%$ ($n = 5$); 乌头碱回收率为100.56%,

RSD= 1.3% (n= 5); 次乌头碱回收率为 101.13%, RSD= 1.2% (n= 5), 见表 1、表 2、表 3。

表 1 新乌头碱回收率试验结果

编号	样品含量 μg	加入新 乌头碱量 μg	测得新 乌头碱量 μg	回收率 %	平均 回收率 %
1	133.50	30	163.31	99.37	RSD= 1.2% (N= 5)
2	127.78	30	157.78	100.00	
3	134.59	30	165.27	102.28	
4	132.96	30	163.38	101.40	
5	137.48	30	168.02	101.78	

表 2 乌头碱回收率试验结果

编号	样品含量 μg	加入乌 头碱量 μg	测得乌 头碱量 μg	回收率 %	平均 回收率 %
1	7.75	30	38.40	102.18	RSD= 1.3% (N= 5)
2	7.41	30	36.99	98.60	
3	7.81	30	37.82	100.04	
4	7.72	30	37.93	100.70	
5	7.98	30	38.36	101.27	

表 3 次乌头碱回收率试验

编号	样品含量 μg	加入新 乌头碱量 μg	测得新 乌头碱量 μg	回收率 %	平均 回收率 %
1	105.15	31.5	137.49	102.67	RSD= 1.2% (N= 5)
2	100.65	31.5	132.77	101.97	
3	106.01	31.5	137.43	99.76	
4	104.73	31.5	136.41	100.57	
5	108.29	31.5	140.01	100.70	

2.2.9 供试品测定 精密量取各供试品溶液适量, 注入液相色谱仪, 测定, 结果见表 4。

表 4 供试品测定结果

样品名称	新乌头碱含量 μg/g	乌头碱含量 μg/g	次乌头碱含量 μg/g
草乌 1 [#]	131.2	7.6	103.3
草乌 2 [#]	446.9	19.2	78.3
制草乌 1 [#]	2.8	6.1	4.3
制草乌 2 [#]	-	6.9	-
川乌	7.8	12.4	-
附子	10.2	-	-
雪上一支蒿	1.1	12.6	12.2
药酒	-	373.6	-
外用样品	-	348.5	-
内服样品	-	-	-

3 讨论

3.1 由上述实验结果可见, TLC 法能有效分离新乌头碱、乌头碱和次乌头碱, 但是, 如果仅用一个展开系统展开, 可能引起误判, 两个展开系统可相互确证乌头类酯型生物碱的存在, 减少其他成分干扰的可能性。在实验过程中, 如果存在可疑斑点, 还可采用加样(供试品溶液与对照品溶液混合点样)试验, 以确认该斑点的存在。

3.2 HPLC 法可作进一步的确认, 并可检识较低含量或样品量较少时生物碱的存在(TLC 检出量为 10μg, HPLC 检出进样量约 20ng)。HPLC 法测定如配合 DAD 检测器可确定并证实样品中与对照品相应峰的一致性及峰的纯度, 也为含量测定提供可靠的数据。HPLC 法测定乌头类酯型生物碱的含量, 方法简便, 可为将来科学控制乌头类加工品提供依据, 同时也可含乌头类中药成方制剂制订限量提供参考。

参考文献

1 童立懿. 乌头类生药生物碱的高压液相色谱法测定. 中国中药杂志, 1990, 15(2): 42.
2 童立懿. 民间用草乌类生药中一些生物碱的鉴别与含量测定. 中国中药杂志, 1991, 16(1): 43.