

UHPLC-MS/MS 法测定天麻胶囊中 6 种生物碱含量

王娟娟, 谭春梅, 张晨辉, 陈碧莲, 方翠芬* (浙江省食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 杭州 310052)

摘要:目的 建立超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-MS/MS)法同时测定天麻胶囊中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱 6 种生物碱的含量。方法 采用 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm); 流动相为甲醇和体积分数 0.1% 甲酸水(含 2.5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵)溶液, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL · min⁻¹, 柱温为 35 °C; 采用电喷雾离子源, 以多反应离子监测模式进行质谱检测。结果 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、次乌头碱和乌头碱分别在 79.38 ~ 3 969 ng · mL⁻¹ ($r = 0.999 9$)、18.60 ~ 929.8 ng · mL⁻¹ ($r = 0.999 8$)、38.20 ~ 1 910 ng · mL⁻¹ ($r = 0.999 9$)、1.264 ~ 252.8 ng · mL⁻¹ ($r = 0.999 3$)、1.196 ~ 239.2 ng · mL⁻¹ ($r = 1.000 0$) 和 1.268 ~ 253.6 ng · mL⁻¹ ($r = 1.000 0$) 内有良好的线性关系。重复性试验结果, 各化合物含量 RSD 为 0.5% ~ 3.2%, 平均回收率为 98.3% ~ 105.3%, RSD 为 1.0% ~ 3.4%。结论 该方法专属性好, 灵敏度高, 准确可靠耐用, 可用于天麻胶囊中 6 种生物碱的含量测定。

关键词: 天麻胶囊; 附子; 生物碱; 超高效液相色谱串联质谱法; 含量测定

doi: 10.11669/cpj.2024.22.010 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)22-2179-08

Determination of Six Alkaloids in Tianma Capsule by UHPLC-MS/MS

WANG Juanjuan, TAN Chunmei, ZHANG Chenhui, CHEN Bilian, FANG Cuifen* (NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an UHPLC-MS/MS method for the determination of six alkaloids in Tianma capsule. **METHODS** Phenomenex Kinetex C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm) column was used for separation. The mobile phase consisted of methanol and 0.1% formic acid (containing 2.5 mmol · L⁻¹ ammonium acetate) solution (gradient elution). The flow rate was 0.3 mL · min⁻¹ and the column temperature was maintained at 35 °C. Electrospray positive ion source was used for mass spectrometry detection by multiple reaction monitoring mode. **RESULTS** The liner range of calibration curve was 79.38 – 3 969 ng · mL⁻¹ ($r = 0.999 9$), 18.60 – 929.8 ng · mL⁻¹ ($r = 0.999 8$), 38.20 – 1 910 ng · mL⁻¹ ($r = 0.999 9$), 1.264 – 252.8 ng · mL⁻¹ ($r = 0.999 3$), 1.196 – 239.2 ng · mL⁻¹ ($r = 1.000 0$) and 1.268 – 253.6 ng · mL⁻¹ ($r = 1.000 0$) for benzoylmesaconine, benzoylhyaconine, mesaconitine, hyaconitine and aconitine. The RSD of repeatability test (content) was 0.5% – 3.2%. The average recoveries was in the range of 98.3% – 105.3%. RSD was 1.0% – 3.4%. **CONCLUSION** The method has good sprecificity, sensitivity and accuracy, and it is suitable for the analysis of six alkaloids in Tianma capsule.

KEY WORDS: Tianma capsule; Aconiti Lateralis Radix Praeparata; alkaloid; UHPLC-MS/MS; assay

天麻胶囊由天麻、羌活、独活、杜仲、牛膝、粉萆薢、附子(制)、当归、地黄和玄参共 10 味药材制成^[1]。其功能为祛风除湿, 舒筋通络, 活血止痛。临床主要用于肢体拘挛, 手足麻木, 腰腿酸痛。天麻胶囊目前执行标准为国家食品药品监督管理局国家药品标准, 标准中仅对天麻、羌活、独活和当归进行了鉴别, 对其他药味未进行质量控制。天麻胶囊处方中附子(制)具有散寒止痛的作用, 附子(制)中同时含有发挥药效作用的单酯型生物碱和具有毒性的双酯型生物碱, 该类成分如果控制

不当, 则严重影响天麻胶囊的有效性以及安全性。

《中国药典》2020 版一部^[2]中, 采用高效液相色谱法对附子中的单酯型生物碱和双酯型生物碱进行测定, 但是该方法样品处理较繁琐, 分析时间长, 且因天麻胶囊中附子生药量较低, 灵敏度无法达到要求。文献中关于附子中生物碱含量测定的报道已有不少^[3-8], 但是样品前处理均较复杂。本研究建立了基于超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-MS/MS)的含量测定方法, 对天麻胶囊中的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次

作者简介: 王娟娟, 女, 硕士 研究方向: 中药质量评价与研究 * 通讯作者: 方翠芬, 女, 硕士, 副主任中药师 研究方向: 中药质量评价与研究 Tel: (0571)87180343

乌头碱和乌头碱进行测定。该方法样品前处理简单、灵敏度高。同时对样品中生物碱的含量限度进行了探讨,以期对天麻胶囊的有效性及安全性进行有效控制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LCMS-8050 型超高效液相色谱-串联四级杆质谱仪(日本 Shimadzu 公司);Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司);XPE205 型电子天平(北京赛多利斯公司)。

1.2 试剂与药物

苯甲酰新乌头原碱(批号:111795-201805,含量 93.1%)、苯甲酰乌头原碱(批号:111794-202006,含量 99.5%)、苯甲酰次乌头原碱(批号:111796-201906,含量 97.2%)、乌头双酯型生物碱对照提取物(批号:112029-201601,新乌头碱含量 31.7%,次乌头碱含量 30.0%,乌头碱含量 31.8%)(中国食品药品检定研究院);甲醇为分析纯;流动相用甲醇和甲酸均为色谱纯;乙酸铵为色谱纯;实验用水为 Milli-Q 系统制备。

天麻胶囊:共收集到来自 23 家生产企业的 101 批样品,企业名称按自编号 A1 ~ A23 命名。

天麻胶囊附子(制)缺味样品:企业提供的按照生产工艺生产的缺附子天麻胶囊样品。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和乌头双酯型生物碱对照提取物适量,精密称定,加体积分数 50% 甲醇溶液(含 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸)分别制成每 1 mL 含苯甲酰新乌头原碱 0.8 μg、苯甲酰乌头原碱 0.2 μg、苯甲酰次乌头原碱 0.4 μg、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱各 0.2 μg 的混合对照品溶液。取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和乌头双酯型生物碱对照提取物适量,精密称定,加体积分数 50% 甲醇溶液(含 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸)分别制成苯甲酰新乌头原碱质量浓度为 79.38 ~ 3 969 ng · mL⁻¹、苯甲酰乌头原碱质量浓度为 18.60 ~ 929.8 ng · mL⁻¹、苯甲酰次乌头原碱质量浓度为 38.20 ~ 1 910 ng · mL⁻¹、新乌头碱质量浓度为 2.045 ~ 204.5 ng · mL⁻¹、次乌头碱质量浓度为 1.935 ~ 193.5 ng · mL⁻¹ 和乌头

碱质量浓度为 2.051 ~ 205.1 ng · mL⁻¹ 的系列溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品 2 粒内容物,研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入体积分数 50% 甲醇溶液(含 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸)50 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,用体积分数 50% 甲醇溶液(含 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸)补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm);流动相:甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(含 2.5 mmol · L⁻¹ 的乙酸铵),梯度洗脱(0 ~ 12 min, 33% A, 12 ~ 25 min, 33% → 45% A),流速为 0.3 mL · min⁻¹,柱温为 35 °C。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式;扫描模式为多反应离子监测(MRM);雾化气流量 3.0 L · min⁻¹;加热气流量 6.0 L · min⁻¹;接口温度 300 °C;接口电压 4.0 kV;DL 管温度 300 °C;加热块温度 400 °C;干燥气流量 14 L · min⁻¹;各化合物检测离子对及相关参数设置见表 1。

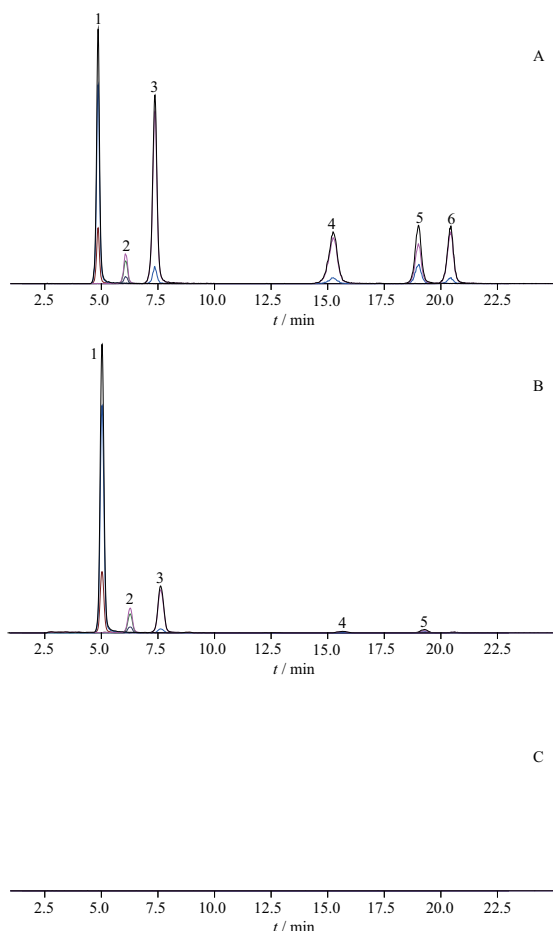
表 1 天麻胶囊中 6 种生物碱质谱测定参数

Tab. 1 MS detection parameters of the six alkaloids in Tianma capsule

Compound	<i>m/z</i> (Precursor ion)	<i>m/z</i> (Product ion)	Dwell time /ms	CE /V
Benzoylmesaconine	590.3	540.3	100	-35
	590.3	558.3	100	-34
Benzoylaconine	604.3	554.3	100	-37
	604.3	572.3	100	-36
Benzoylhypaconine	574.3	542.3	100	-35
	574.3	510.3	100	-40
Mesaconitine	632.3	572.3	100	-35
	632.3	540.3	100	-37
Hypaconitine	616.3	556.3	100	-34
	616.3	524.3	100	-39
Aconitine	646.3	586.3	100	-34
	646.3	554.3	100	-40

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 考察了天麻胶囊中其他药味的干扰。取天麻胶囊缺味样品,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2”项下分析条件进行分析。结果样品中其他药味对各生物碱测定无干扰,方法专属性良好,结果见图 1。



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。

1 - Benzoylmesaconine; 2 - Benzoylaconine; 3 - Benzoylhypaconine; 4 - Mesaconitine; 5 - Hypaconitine; 6 - Aconitine.

图1 混合对照品(A)、天麻胶囊(B)和附子缺味样品(C)超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-MS/MS)色谱图

Fig. 1 UHPLC-MS/MS chromatograms of reference substances (A), sample (B) and sample without Radix Aconiti Lateralis Praeparata (C)

2.3.2 线性关系考察 取“2.1.1”项下配制的系列浓度溶液,按照“2.2”项下方法进样分析,记录各化合物峰面积,以进样量为横坐标 X ,峰面积为纵坐标 Y ,绘制标准曲线,进行线性回归,计算回归方程及相关系数(r)。结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱分别在 $79.38 \sim 3\,969$ 、 $18.60 \sim 929.8$ 、 $38.20 \sim 1\,910$ 、 $1.264 \sim 252.8$ 、 $1.196 \sim 239.2$ 和 $1.268 \sim 253.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系。各化合物线性方程及相关系数见表2。

2.3.3 进样精密度 取“2.1.1”项下混合对照品溶液,连续进样6次,计算苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱和乌头碱

表2 天麻胶囊中6种生物碱的线性关系

Tab. 2 Linear equation and correlation of the six alkaloids in Tianma capsule

Compound	Linear equation	r
Benzoylmesaconine	$Y = 6\,009.6X + 80\,780$	0.999 9
Benzoylaconine	$Y = 3\,721.7X + 26\,429$	0.999 8
Benzoylhypaconine	$Y = 15\,623X + 61\,903$	0.999 9
Mesaconitine	$Y = 11\,077.6X + 11\,640.3$	0.999 3
Hypaconitine	$Y = 14\,970.7X + 6\,459.69$	1.000 0
Aconitine	$Y = 19\,083.7X + 3\,925.26$	1.000 0

峰面积相对标准偏差(RSD),结果各化合物峰面积RSD分别为0.6%、0.6%、1.4%、0.9%、1.5%和1.6%,表明方法精密度良好。

2.3.4 重复性考察 取天麻胶囊,按“2.1.2”项下方法,平行制备样品6份。结果天麻胶囊中苯甲酰新乌头原碱的含量为 $50.97 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,苯甲酰乌头原碱含量为 $9.07 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,苯甲酰次乌头原碱的含量为 $77.30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,新乌头碱含量为 $0.46 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,次乌头碱含量为 $4.09 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,乌头碱含量为 $0.28 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。各化合物RSD均小于3.3%,表明方法重复性良好。

2.3.5 准确度考察 采用加样回收率的方法。根据重复性测定结果,取天麻胶囊,分别加入苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和乌头双酯型生物碱对照品溶液适量,按“2.1.2”项下方法,平行制备样品6份,计算回收率。结果天麻胶囊中各化合物平均回收率在98.3%~105.3%,RSD小于3.4%。表明方法准确性良好,见表3。

2.3.6 稳定性考察 取同一份天麻胶囊供试品溶液,分别在制备0、3、6、9、12、16、18、24 h时进样分析,计算苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和乌头碱在各时间点峰面积的RSD。RSD分别为1.8%、1.3%、2.9%、2.6%、3.4%、3.6%。结果表明,本品在24 h内稳定。

2.3.7 检测限及定量限考察 本实验仅对作为限度检查的新乌头碱、次乌头碱和乌头碱进行检测限及定量限的考察。取线性最低浓度点对照品溶液进样分析,记录各化合物信噪比,以信噪比为3和10时相应的对照品溶液浓度计算检测限及定量限,结果见表4。

2.3.8 样品测定 取天麻胶囊样品,按“2.1.2”项下方法制成供试品溶液,并按“2.2”项下色谱条

件测定含量,结果见表5。《中国药典》2020年版一部附子项下,生物碱的含量限度分别以单酯型生物碱总量和双酯型生物碱的总量制定,故本实验最终按照单酯型生物碱总量和双酯型生物碱总量进行统计分析。单酯型生物碱总量为苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱含量总和,双酯型生物碱总量为新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的含量总和。

表3 天麻胶囊中6个生物碱回收率测定结果。 $n=6$

Tab. 3 Recovery result of the six alkaloids in Tianma capsule. $n=6$

Compound	$m(\text{Original})/\mu\text{g}$	$m(\text{Added})/\mu\text{g}$	$m(\text{Measured})/\mu\text{g}$	Recovery/%	Mean recovery/%	RSD/%
Benzoylmesaconine	12.76	7.94	20.91	102.8	102.1	1.0
	13.15	7.94	21.17	101.0		
	12.85	7.94	21.00	102.6		
	12.80	7.94	20.88	101.8		
	13.05	7.94	21.25	103.4		
	12.88	7.94	20.90	101.0		
Benzoylaconine	2.27	1.86	4.15	101.2	104.5	3.4
	2.34	1.86	4.28	104.2		
	2.29	1.86	4.24	105.0		
	2.28	1.86	4.30	108.7		
	2.32	1.86	4.33	108.0		
	2.29	1.86	4.15	99.7		
Benzoylhypaconine	4.31	3.82	8.33	105.2	103.1	1.5
	4.44	3.82	8.36	102.5		
	4.34	3.82	8.26	102.4		
	4.33	3.82	8.33	105.0		
	4.41	3.82	8.29	101.6		
	4.35	3.82	8.25	102.0		
Mesaconitine	0.115 1	2.134 0	2.241 1	99.6	98.3	1.9
	0.118 7	2.134 0	2.221 5	98.5		
	0.116 0	2.134 0	2.204 6	97.9		
	0.115 6	2.134 0	2.270 5	101.0		
	0.117 8	2.134 0	2.179 1	96.6		
	0.116 2	2.134 0	2.163 5	95.9		
Hypaconitine	1.023 7	2.019 6	3.170 2	106.3	105.3	1.5
	1.055 2	2.019 6	3.191 4	105.8		
	1.031 5	2.019 6	3.178 9	106.3		
	1.027 4	2.019 6	3.185 7	106.9		
	1.047 0	2.019 6	3.145 2	103.9		
	1.033 5	2.019 6	3.111 0	102.9		
Aconitine	0.070 1	2.140 8	2.235 2	101.1	100.8	2.4
	0.072 2	2.140 8	2.235 8	101.0		
	0.070 6	2.140 8	2.165 3	97.9		
	0.070 3	2.140 8	2.317 9	105.0		
	0.071 7	2.140 8	2.208 4	99.8		
	0.070 8	2.140 8	2.203 6	99.6		

2.3.9 数据统计 采用 SPSS 软件对数据进行统计,绘制天麻胶囊中单酯型生物碱和双酯型生物碱箱式图,结果见图2。从图3中可以看出,不同企业单酯型生物碱和双酯型生物碱总量差异均较明显,

表4 天麻胶囊中6个生物碱检测限(LOD)与定量限(LOQ)

Tab. 4 LOD and LOQ of the six alkaloids in Tianma capsule

Compound	ρ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	S/N	LOD $/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	LOQ $/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Mesaconitine	1.263 9	8.23	0.046 1	0.153 6
Hypaconitine	1.196 1	13.08	0.027 4	0.091 4
Aconitine	1.267 9	12.90	0.029 5	0.098 3

同一生产企业不同批次样品间差异也较大。如企业A15,其单酯型生物碱在不同批次间含量差异超3倍。企业A12不同批次间双酯型生物碱含量差异接近4倍。

表5 每粒天麻胶囊中6种生物碱含量测定结果。μg

Tab. 5 Assay results of the six alkaloids in Tianma Capsule samples. μg

No.	Benzoylmesaconine	Benzoylaconine	Benzoylhypaconine	Content of monoester diterpenoid alkaloids	Mesaconitine	Hypaconitine	Aconitine	Content of diester diterpenoid alkaloids
1	5.99	0.86	0.46	7.31	0.186	0.250	0.067	0.503
2	6.28	0.90	0.48	7.59	0.225	0.270	0.077	0.570
3	6.09	0.86	0.46	7.51	0.233	0.260	0.079	0.583
4	4.10	0.57	0.73	5.64	0.017	0.077	0.000	0.098
5	2.22	0.28	0.33	2.91	0.325	0.473	0.072	0.897
6	4.37	0.58	0.65	5.78	0.025	0.201	0.012	0.246
7	4.88	0.72	0.97	6.73	0.025	0.310	0.015	0.358
8	5.42	0.65	0.55	6.79	0.050	0.225	0.020	0.303
9	5.88	0.69	0.59	7.39	0.057	0.230	0.020	0.317
10	5.90	0.72	0.60	7.51	0.052	0.233	0.020	0.316
11	5.06	0.56	0.54	6.32	0.050	0.218	0.022	0.297
12	5.76	0.66	0.62	7.14	0.055	0.265	0.022	0.347
13	4.97	0.61	0.48	6.23	0.072	0.280	0.025	0.391
14	6.16	0.71	0.63	7.65	0.059	0.282	0.025	0.374
15	5.01	0.60	0.48	6.31	0.074	0.300	0.025	0.413
16	5.39	0.68	0.60	6.77	0.067	0.315	0.027	0.413
17	5.88	0.57	0.53	7.11	0.092	0.330	0.030	0.451
18	5.95	0.67	0.57	7.40	0.082	0.344	0.030	0.469
19	4.55	0.53	0.43	5.60	0.064	0.273	0.032	0.376
20	6.03	0.70	0.59	7.48	0.077	0.339	0.032	0.459
21	5.47	0.67	0.53	6.67	0.082	0.347	0.032	0.461
22	5.95	0.70	0.57	7.22	0.089	0.377	0.032	0.496
23	5.38	0.62	0.53	6.56	0.084	0.367	0.035	0.487
24	6.39	0.72	0.60	7.88	0.079	0.339	0.037	0.466
25	5.66	0.67	0.55	7.03	0.097	0.384	0.040	0.533
26	4.03	0.53	0.73	5.36	0.035	0.074	0.012	0.123
27	2.66	0.41	0.29	3.42	0.015	0.035	0.005	0.058
28	0.94	0.29	0.49	1.76	0.000	0.017	0.000	0.018
29	2.58	0.30	0.43	3.31	0.000	0.020	0.000	0.020
30	1.93	0.29	0.38	2.67	0.000	0.042	0.000	0.043
31	1.96	0.30	0.40	2.75	0.000	0.045	0.000	0.046
32	12.66	2.92	9.50	26.38	0.000	0.022	0.000	0.023
33	9.21	2.55	7.13	19.46	0.000	0.047	0.000	0.048
34	5.04	2.28	6.81	14.40	0.000	0.059	0.000	0.061
35	8.01	1.91	5.31	16.30	0.000	0.087	0.000	0.093
36	18.88	2.01	3.84	24.91	0.027	0.116	0.000	0.145
37	20.34	2.29	4.39	27.65	0.042	0.164	0.000	0.210
38	11.68	0.90	1.39	14.56	0.025	0.025	0.000	0.049
39	5.65	1.05	3.28	10.27	0.005	0.032	0.000	0.038
40	4.90	0.87	2.57	8.83	0.007	0.042	0.000	0.052
41	6.15	1.09	3.15	10.72	0.010	0.069	0.000	0.084
42	6.02	1.03	2.46	9.75	0.045	0.310	0.000	0.363
43	1.07	0.16	0.25	1.49	0.000	0.000	0.000	0.000
44	1.38	0.22	0.33	1.96	0.000	0.000	0.000	0.000
45	1.38	0.21	0.34	1.96	0.000	0.000	0.000	0.000
46	1.44	0.22	0.34	2.03	0.000	0.000	0.000	0.000
47	1.51	0.22	0.36	2.16	0.000	0.000	0.000	0.000
48	2.78	0.45	0.65	3.92	0.087	0.012	0.030	0.132
49	3.30	0.53	0.68	4.71	0.092	0.025	0.030	0.153
50	2.77	0.41	0.61	3.83	0.149	0.032	0.040	0.226
51	3.14	0.52	0.77	4.55	0.377	0.025	0.084	0.498
52	2.82	0.43	0.66	3.95	0.305	0.020	0.092	0.420
53	2.98	0.47	0.75	4.37	0.419	0.020	0.092	0.551
54	2.10	0.33	0.44	2.93	0.399	0.017	0.114	0.541

续表 5(continued)

No.	Benzoylmesaconine	Benzoylaconine	Benzoylhypaconine	Content of monoester diterpenoid alkaloids	Mesaconitine	Hypaconitine	Aconitine	Content of diester diterpenoid alkaloids
55	3.05	0.47	0.65	4.23	0.406	0.022	0.129	0.569
56	3.11	0.44	0.52	4.21	0.084	0.387	0.030	0.515
57	3.16	0.46	0.55	4.23	0.089	0.406	0.030	0.537
58	3.51	0.47	0.54	4.68	0.144	0.463	0.040	0.668
59	5.55	0.58	0.68	6.99	0.364	0.781	0.084	1.265
60	5.56	0.58	0.69	6.94	0.406	0.820	0.089	1.343
61	7.19	0.80	0.88	9.10	0.295	1.219	0.092	1.644
62	5.22	0.64	0.65	6.71	0.379	1.053	0.112	1.586
63	9.39	1.02	1.09	11.81	0.396	1.403	0.129	1.980
64	11.62	2.13	3.19	17.48	0.020	0.059	0.012	0.097
65	11.76	1.48	2.97	17.04	0.077	0.173	0.025	0.289
66	11.55	1.50	3.02	17.33	0.074	0.198	0.025	0.323
67	11.57	1.52	3.14	16.70	0.082	0.216	0.025	0.331
68	4.33	0.48	0.67	5.54	0.000	0.015	0.000	0.015
69	6.05	0.79	0.81	7.69	0.146	0.709	0.062	0.918
70	4.87	0.61	0.52	6.11	0.126	0.600	0.064	0.805
71	10.13	1.67	3.04	15.01	0.109	0.835	0.064	1.017
72	13.08	2.25	4.27	19.62	0.112	0.959	0.069	1.138
73	13.75	2.47	4.73	20.96	0.112	1.041	0.069	1.223
74	13.48	2.42	4.62	20.80	0.116	1.088	0.077	1.299
75	13.74	2.34	4.62	20.42	0.114	0.981	0.087	1.169
76	5.96	0.66	0.59	7.35	0.312	1.011	0.158	1.450
77	1.19	0.30	0.65	2.18	0.000	0.144	0.000	0.147
78	4.35	0.75	1.35	6.66	0.047	0.307	0.020	0.384
79	4.38	0.74	1.35	6.54	0.047	0.320	0.020	0.391
80	4.45	0.68	0.94	6.14	0.055	0.339	0.020	0.419
81	3.16	0.55	0.79	4.57	0.077	0.441	0.035	0.563
82	3.59	0.62	0.88	5.08	0.082	0.486	0.037	0.605
83	2.56	0.39	0.57	3.65	0.000	0.010	0.000	0.010
84	2.52	0.39	0.57	3.66	0.000	0.010	0.000	0.010
85	2.52	0.39	0.60	3.56	0.000	0.012	0.000	0.013
86	2.53	0.42	0.60	3.64	0.000	0.012	0.000	0.013
87	2.63	0.43	0.65	3.72	0.000	0.017	0.000	0.017
88	2.75	0.41	0.60	3.76	0.000	0.020	0.000	0.020
89	1.32	0.22	0.47	2.12	0.000	0.022	0.000	0.024
90	1.09	0.18	0.45	1.81	0.000	0.025	0.000	0.026
91	4.66	0.56	0.88	6.33	0.007	0.032	0.000	0.044
92	4.58	2.24	5.98	13.52	0.000	0.037	0.000	0.039
93	5.83	0.70	0.92	7.86	0.020	0.067	0.000	0.091
94	4.09	0.48	0.61	5.37	0.000	0.030	0.000	0.031
95	1.73	0.28	0.28	2.32	0.000	0.000	0.000	0.000
96	1.99	0.36	0.37	2.70	0.000	0.000	0.000	0.000
97	3.09	0.42	0.69	4.18	0.000	0.000	0.000	0.000
98	3.13	0.41	0.72	4.18	0.000	0.000	0.000	0.000
99	3.70	0.46	0.72	4.97	0.017	0.099	0.000	0.119
100	3.75	0.47	0.64	5.04	0.017	0.124	0.000	0.146
101	3.97	0.58	0.90	5.72	0.022	0.077	0.000	0.104

3 结果与讨论

3.1 样品前处理优化

基于待测化合物的结构特点,对甲醇和含有不同比例盐酸的甲醇溶液的提取效率进行了比较,结果含有 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸的甲醇溶液提取效率最

高;同时比较了不同取样量和不同超声时间的提取效果,最终将取样量定为 2 粒(约 0.5 g),超声时间定为 30 min。

3.2 液相色谱-质谱分析条件的优化

本实验比较了不同流动相组成,包括甲醇-0.1%

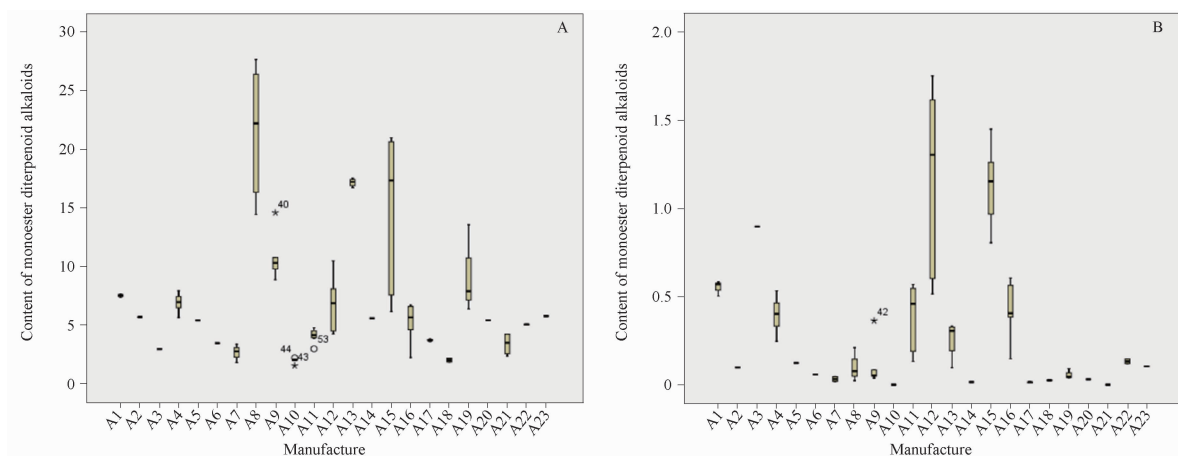


图2 天麻胶囊单酯型生物碱(A)和双酯型生物碱(B)箱式图

Fig. 2 The box plot of content of monoester(A) and diester diterpenoid alkaloids(B) in Tianma Capsule

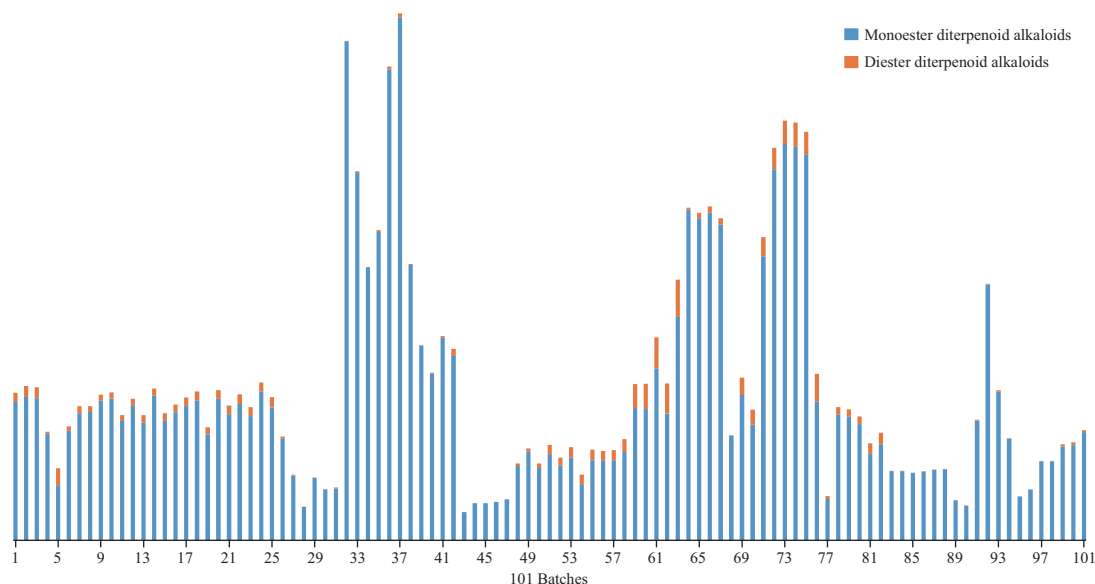


图3 101批天麻胶囊中单酯型生物碱和双酯型生物碱含量统计

Fig. 3 The bargraph of content of monoester and diester diterpenoid alkaloids in Tianma Capsule

甲酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液、甲醇-0.1%甲酸(含 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵)溶液、乙腈-0.1%甲酸(含 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵)溶液的分离效果,结果甲醇-0.1%甲酸(含 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵)溶液分离效果较好,色谱峰峰形佳,出峰时间适宜。

3.3 天麻胶囊中生物碱含量限度的探讨

《中国药典》2020年版一部中,附子各炮制品的单酯型生物碱总量和双酯型生物碱总量限度一致,其中含单酯型生物碱总量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%,含双酯型生物碱以新乌头碱、和乌头碱的总量计,不得过0.020%。天麻胶囊处方中,附子(制)10g,最终制成胶囊1066粒,

每粒天麻胶囊中所含附子(制)生药量为 0.0094 g 。因附子为生粉入药,故单酯型生物碱转移率定为90%,双酯型生物碱为毒性成分,转移率暂定为100%,按照《中国药典》2020年版一部限度折算,天麻胶囊中,含单酯型生物碱总量每粒应不得低于 $0.80\text{ }\mu\text{g}$;含双酯型生物碱总量每粒应不得过 $1.8\text{ }\mu\text{g}$ 。

3.4 样品测定结果分析

附子具有回阳救逆、补火助阳、散寒除湿的功效^[2],其主要成分为双酯型生物碱(如乌头碱、新乌头碱和次乌头碱等)、单酯型生物碱(如苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱等),以及醇胺类(如乌头原碱等)等^[9]。其中双酯型生

物碱具有较明显的强心作用,但是同时也具有很强的毒性,有效剂量接近致毒剂量,服用过量会导致中毒,甚至死亡^[10]。单酯型生物碱具有镇痛和消炎作用,醇胺类化合物镇痛和消炎作用则较弱。生附子中双酯型生物碱含量较高,毒性较大,临床多用其炮制品。生附子经过清洗,浸泡胆巴,蒸煮等步骤,炮制为盐附子、黑顺片、白附片以及淡附片等。在炮制过程中,毒性成分双酯型生物碱水解成为单酯型生物碱,进一步水解成为醇胺类化合物^[11]。

对本次实验所有样品中的单酯型生物碱和双酯型生物碱含量进行统计分析(图3),结果部分企业的天麻胶囊样品中单酯型生物碱总量和双酯型生物碱总量均较高,部分企业则相反。因为附子为生粉入药,不存在提取工艺的差异,因此提示不同企业投料使用的附子饮片质量差异悬殊,间接表明目前市场上附子饮片质量良莠不齐。目前《中国药典》2020年版附子项下只规定了附子中双酯型生物碱的含量上限以及单酯型生物碱的含量下限,由于复杂的加工过程,附子饮片不同批次之间有效成分和有毒成分差别很大,这直接关系着附子的疗效和安全。因此,应尽快制订合理的附子饮片的质量等级标准,区分饮片不同的商品规格,以体现优质优价,引导产业良性发展^[12]。此外,部分企业的天麻胶囊中,双酯型生物碱总量检出量极低,甚至低于检出限。由于双酯型生物碱为毒性成分,饮片生产企业为保证饮片安全,可能存在过度炮制的嫌疑。炮制虽是附子减毒增效的必要手段,但炮制过度则有效成分含量严重降低,影响药效。正如张景岳所言:“制之太过,则但用附子之名耳,效与不效无以应验,今人只知附子之可畏,而不知太熟之无用”。《中国药典》2020年版附子项下对于炮制方法描述较简略,对于蒸煮、泡胆巴等步骤的关键参数未进行规定,不同企业实际炮制过程中工艺各不相同,也进一步导致了市场上附子饮片质量差异较大。

本研究建立了基于UHPLC-MS/MS的含量测定方法,对天麻胶囊中的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱和

乌头碱进行测定。对不同企业生产的101批天麻胶囊进行了测定,结果不同企业天麻胶囊中附子生物碱含量差异较大,质量一致性较差。同时反映了市场上的附子质量良莠不齐,需引起关注。

REFERENCES

- [1] National Food and Drug Administration Standards (国家食品药品监督管理局标准) [S]. WS3-B-0500-91-2004.
- [2] *Ch. P*(2020) Vol I (中国药典2020年版.一部) [S]. 2020: 200-201.
- [3] ZHOU Y, ZHONG L Y, LUO H B, *et al.* A study on the differences of chemical components in the concoction process of “Jianchang Faction” Dried ginger steamed Aconite piece, Sand fried Aconite piece and Rice swill waterbleached Aconite piece based on UPLC-MS/MS [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2023, 48(23): 6387-6395.
- [4] DAI S, ZHU H M, LI S, *et al.* Determination of fourteen alkaloids in different processed products of Aconitilaterialis Radix Praeparata by UPLC-MS/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2022, 44(4): 1198-1203.
- [5] CHEN L H, ZHU W J, WANG P, *et al.* Dissolution behavior of raw Fupian (Aconiti Lateralis Radix Praeparata) and processed Tianxiang (Aconitum carmichaeli Debx.) during decoction process [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2023, 41(8): 254-259.
- [6] ZHANG X Y, WAN F, WU H, *et al.* The effects of different decocting methods on the toxicity rate of Aconitum pieces [J]. *Chin Gen Pract* (中国全科医学), 2021, 24(S2): 178-181.
- [7] JIN X H, WANG J J, HUANG Y C, *et al.* Comparison of processing technology of aconite [J]. *Inn Mong J Tradit Chin Med* (内蒙古中医药), 2022, 41(1): 134-137.
- [8] LIU Y H, LIANG D H, SUN H, *et al.* Simultaneous determination of six different alkaloids in Shenfuqiangxin pills by HPLC-MS/MS [J]. *J Wannan Med Coll* (皖南医学院学报), 2021, 40(1): 18-21.
- [9] WU K H, TANG L Y, WANG Z J, *et al.* Advances in studies on chemical constituents and bioactivities of Aconitum carmichaeli [J]. *Chin Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2014, 20(2): 212-220.
- [10] ZHOU Y P. Pharmacology and toxicity of Radix aconiti lateralis praeparata and its major components [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1983, 18(5): 394-400.
- [11] WANG L, ZHANG X L, WANG X, *et al.* Comparative study on unprocessed Aconiti Radix and unprocessed Aconiti Lateralis Radix by UPLC-MS_n [J]. *J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2017, 37(9): 1640-1647.
- [12] ZAN K, GUO L N, MA S C, *et al.* Research progress in quality control of Radix Aconiti Lateralis Praeparata [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2019, 33(7): 767-773.

(收稿日期:2024-03-06)