

# 二十五味珊瑚丸中酯型生物碱和硫化汞的含量测定

陈燕<sup>1</sup>, 易进海<sup>1\*</sup>, 刘玉红<sup>1</sup>, 德吉<sup>2</sup>, 扎西<sup>2</sup>, 黄志芳<sup>1</sup>

(1. 四川省中医药科学院, 成都 610041; 2. 西藏自治区藏医院, 拉萨 850000)

[摘要] 目的: 首次建立藏药复方二十五味珊瑚丸中酯型生物碱和硫化汞含量测定方法。方法: 采用 HPLC 测定二十五味珊瑚丸中酯型生物碱。硫氰酸盐法测定硫化汞。Phenomenex Luna C<sub>18</sub>(2) 色谱柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 甲醇-0.05 mol · L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾-醋酸-异丙醇(67:173:4:4); 检测波长: 230 nm; 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。结果: 乌头碱线性方程为  $Y=6.974 \times 10^5 X-28.1$ ,  $r=0.9998$ ; 表明乌头碱在 0.096 ~0.480 μg 范围内进样量与峰面积呈良好线性关系。平均回收率为 93.1%, RSD 为 2.1%。结论: 该法准确、可靠、重复性好, 可有效控制二十五味珊瑚丸中酯型生物碱和硫化汞限量。

[关键词] 二十五味珊瑚丸; 酯型生物碱; 乌头碱; 硫化汞; 高效液相色谱法; 硫氰酸盐法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0044-04

## The Determination of Ester-alkaloids and Mercury Sulfide in Ershiwuweishanhu Pills

CHEN Yan<sup>1</sup>, YI Jin-hai<sup>1\*</sup>, LIU Yu-hong<sup>1</sup>, DE Ji<sup>2</sup>, ZA Xi<sup>2</sup>, HUANG Zhi-fang<sup>1</sup>

(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041;

2. Tibet Medical Hospital of Tibet Autonomous Region, Lasa 850000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC and Thiocyanate methods for the determination of Ester-alkaloids and HgS in Ershiwuweishanhu pills. **Methods:** Phenomenex Luna C<sub>18</sub>(2) (4.6 mm ×150 mm, 5 μm) column was used and the mixture of CH<sub>3</sub>OH—0.05 mol · L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—CH<sub>3</sub>COOH—(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH (67:173:4:4) was used as the mobile phase: The flow rate was at 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was at 230 nm. The column temperature was at 35 °C. **Results:** The calibration curve of aconitine was  $Y=6.974 \times 10^5 X-28.1$  and the linear range was from 0.096 to 0.480 μg ( $r=0.9998$ ). The average recoverys of aconitine was 93.1% with RSD = 2.1%. **Conclusion:** The method is accurate reliable and reproducible. It be used to can control ester-alkaloids and limited HgS in Ershiwuweishanhu pills.

[Key words] ershiwuweishanhu; ester-alkaloids; aconitine; HgS; RP-HPLC; thiocyanate

二十五味珊瑚丸系藏族验方, 为藏药保护品种, 由诃子、木香、藏菖蒲、铁棒锤、麝香、珍珠母、珊瑚等 25 味药材等组成, 收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》第一册, 具有开窍、通络、止痛、调和血压之功效, 临床上用于顽固性头痛、白脉病、脑

炎、头晕目眩、肢体麻木僵硬、神志不清、血压不调、抽风痉挛等病症的治疗<sup>[1]</sup>。本品中铁棒锤, 朱砂是剧毒药材, 其毒性成分酯型生物碱和硫化汞, 两者既是有效成分, 又是毒性成分。为了确保二十五味珊瑚丸的安全性和有效性, 需对本品中酯型生物碱和硫化汞(HgS)的含量进行测定。铁棒锤为毛茛科乌头属铁棒锤 *Aconitum szechenyianum* Gay. 的干燥根, 乌头属植物的主要毒性成分为酯型生物

[收稿日期] 2009-07-28

[通讯作者] \* 易进海, Tel: (028) 85210843; E-mail: yicy64@163.com

碱和乌头碱的限量检查<sup>[2]</sup>, 本品由于空白样品干扰, 无法采用药典方法进行检测。酯型生物碱的主要毒性成分为乌头碱 (aconitine)、次乌头碱 (hypoaconitine) 和新乌头碱 (mesaconitine) 等<sup>[3]</sup>, 其化学结构的共同特征是含有苯甲酰酯基, 可定量地水解生成苯甲酸<sup>[4]</sup>, 因此, 参照《中国药典》2005 版一部制川乌项下提取方法提取本品中酯型生物碱, 将酯型生物碱水解, 以苯甲酸为标识成分, 按乌头碱计作为本品酯型生物碱的含量, 朱砂则参照《中国药典》2005 版一部朱砂和万氏牛黄清心丸项下含量测定方法, 采用硫氰酸盐法制定含量限度, 控制本品的质量。

## 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪: Waters1525 泵, 2487 双通道紫外检测器, Waters 柱温箱, Breeze 液相色谱工作站; Branson 超声清洗仪; 塞多利斯十万分之一电子天平。苯甲酸, 分析纯, 纯度大于 98%。乌头碱 (批号 110720-200409) 由中国药品生物制品检定所提供; 二十五味珊瑚丸 (批号 030314, 021114, 020620, 由西藏自治区藏医院生产); 甲醇为美国 Tedia 色谱纯, 水为超纯水, 其它试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 酯型生物碱的含量测定

**2.1.1 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱为 Phenomenex Luna C<sub>18</sub>(2) (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 流动相: 甲醇-0.05 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾-醋酸-异丙醇 (67 : 173 : 4 : 4); 检测波长: 230 nm; 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。进样量 10 μL。理论板数按苯甲酸峰计算应不低于 2 500。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取乌头碱对照品 4.80 mg, 精密称定, 加 5% 氢氧化钾甲醇溶液 10 mL, 加热回流 1 h, 回收甲醇, 冷却, 加 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 硫酸溶液约 9 mL 调 pH 值至 3 ~ 4, 转入分液漏斗中, 用乙醚 10 mL 分次洗涤容器, 并入分液漏斗中, 振摇, 分取乙醚层, 再用乙醚提取 2 次, 每次 10 mL 合并乙醚液, 低温 (35 °C) 减压回收乙醚, 残渣加甲醇使溶解, 转入 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取本品 10 丸, 研细 (过四号筛), 取约 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加乙醚 50 mL 与氨试液 4 mL, 密塞, 摇匀, 放置过夜, 滤过, 药渣加乙醚 50 mL, 连续振摇 1 h, 滤过, 药渣再

用乙醚洗涤 3 ~ 4 次, 每次 15 mL, 滤过, 洗液与滤液合并, 低温蒸干。残渣加氯仿 2 mL 使溶解, 转入分液漏斗中, 用氯仿 3 mL 分次洗涤容器, 洗液并入分液漏斗中, 用 0.05 mol · L<sup>-1</sup> 的硫酸溶液提取 3 次, 每次 5 mL, 酸液依次用同一氯仿 10 mL 振摇洗涤, 合并酸液, 加氨试液调节 pH 至 9, 再加氯仿提取 4 次, 每次 10 mL, 氯仿液依次用同一水 20 mL 振摇洗涤, 合并氯仿液, 低温蒸干, 残渣加 5% 氢氧化钾甲醇溶液 10 mL, 加热回流 1 h, 回收甲醇, 冷却, 加 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 硫酸溶液约 9 mL 调 pH 至 3 ~ 4, 转入分液漏斗中, 用乙醚 10 mL 分次洗涤容器, 并入分液漏斗中, 振摇, 分取乙醚层, 再用乙醚提取 2 次, 每次约 10 mL 合并乙醚液, 低温 (35 °C) 减压回收乙醚, 残渣加甲醇超声溶解, 分次转至 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

**2.1.4 阴性对照溶液的制备** 取缺铁棒锤药材的空白药粉, 按照供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

**2.1.5 专属性试验** 苯甲酸的最大吸收波长为 230 nm, 在该波长下分别吸取对照品溶液 5 μL、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 结果表明供试品溶液中苯甲酸达到基线分离, 阴性对照在苯甲酸出峰位置上无干扰, 结果见图 1。

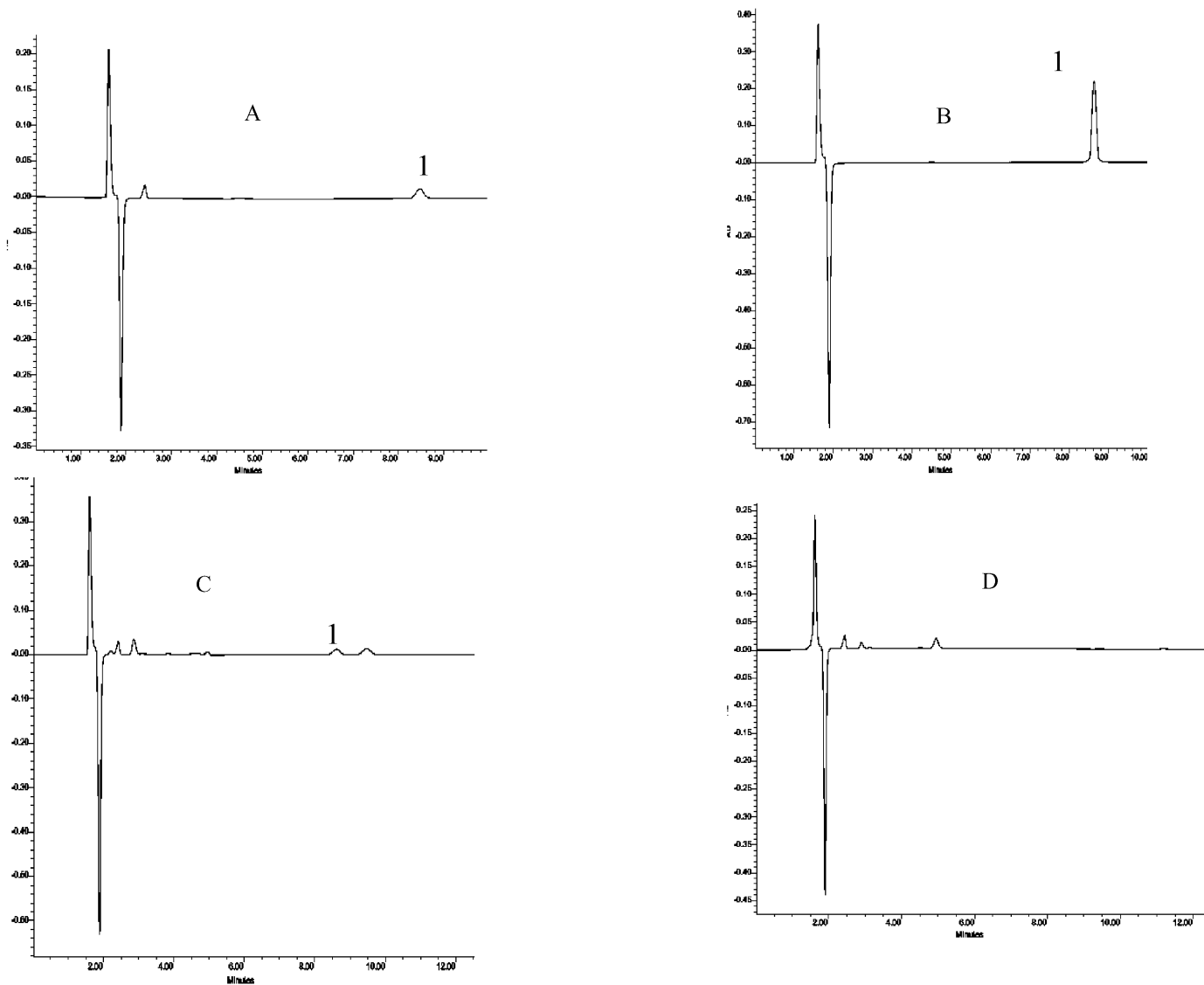
**2.1.6 标准曲线的绘制** 分别精密吸取乌头碱对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μL 进样测定, 以苯甲酸峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为  $Y = 6.97 \times 10^5 X - 28.1$ ,  $r = 0.9998$ ; 表明乌头碱在 0.096 ~ 0.480 μg 范围内进样量与峰面积呈良好线性关系。

**2.1.7 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液 5 μL 连续进样 5 次, 测其峰面积, 计算 RSD 为 0.89%, 表明仪器精密度良好。

**2.1.8 重复性试验:** 取同一批号 020620 样品 5 份, 分别照 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 进样测定苯甲酸的峰面积, 计算样品中酯型生物碱 (以乌头碱计) 质量分数平均为 22.64 μg · g<sup>-1</sup>, RSD 为 2.6%。表明含量测定方法的精密度良好。

**2.1.9 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 (批号: 020620) 10 μL, 于室温 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样测定苯甲酸峰面积, 以样品中酯型生物碱含量计算 RSD 为 0.78%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.1.10 加样回收率试验** 精密称取 6 份已知酯型生物碱 (乌头碱) 含量的样品粉末 (批号: 020620, 含



A. 乌头碱对照品(水解后); B. 苯甲酸; C. 样品; D. 阴性样品; 1. 苯甲酸

图 1 二十五珊瑚丸 HPLC 图

量  $22.64 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 各 2.5 g, 分别精密加入乌头碱对照品溶液 ( $36.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 1.5 mL, 照 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算平均回收率为 93.1%, RSD 为 2.1%。结果见表 1。

表 1 乌头碱加样回收率试验测定结果

样品称量 (g)	样品中乌头碱量 ( $\mu\text{g}$ )	对照品加入量 ( $\mu\text{g}$ )	测出乌头碱量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
2.5376	57.45	55.05	107.82	91.49		
2.4003	54.34	55.05	106.29	94.37		
2.4411	55.27	55.05	106.06	92.26	93.1	2.1
2.5008	56.62	55.05	107.65	92.70		
2.4252	54.91	55.05	107.47	95.47		
2.4317	55.05	55.05	105.72	92.05		

**2.1.11 水解条件的选择:** 以 5% 氢氧化钠甲醇溶液为水解介质, 考察水解时间对测定结果的影响, 照样品测定项下方法操作, 回流水解时间分别为 0.5, 1 和 2 h, 测定样品 (批号: 020620) 中酯型生物碱含量, 分别为  $17.23 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $22.89 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $22.01 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。故选择水解时间为 1 h。

**2.1.12 样品测定** 取二十五味珊瑚丸样品 3 批, 每批 10 丸, 研细 (过四号筛), 取约 5 g, 精密称定, 分别照 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取对照品溶液 5  $\mu\text{L}$ , 供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱

谱仪中, 测定峰面积, 计算样品中酯型生物碱 (以乌头碱计) 含量, 结果见表 2。

表 2 二十五味珊瑚丸中酯型生物碱的测定结果 ( $n=3$ )

批号	酯型生物碱含量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	RSD (%)
030314	29.28	2.0
021114	26.23	2.1
020620	22.64	1.7

## 2.2 朱砂的含量测定

**2.2.1 供试品溶液的制备及测定** 取本品 10 丸, 研细 (过四号筛), 取约 4 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 加稀硝酸 50 mL, 超声处理 10 min, 滤过, 药渣依次用稀硝酸 50 mL 和丙酮 25 mL 洗涤, 在 80 干燥, 连同滤纸一并置入 250 mL 凯氏烧瓶中, 加硫酸 20 mL, 分次加入硝酸钾 6 g, 加热至溶液呈乳黄色, 放冷, 转入 100 mL 量瓶中, 用水 50 mL 分次洗涤烧瓶, 洗液并入溶液中, 加水至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液 80 mL, 置 250 mL 锥形瓶中, 滴加 1% 高锰酸钾至显暗红色, 2 min 内不消失, 再滴加 2% 硫酸亚铁至红色消失后, 加硫酸铁铵指示液 2 mL, 用硫氰酸铵滴定液 ( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 滴定。每 1 mL 硫氰酸铵滴定液 ( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 相当于 5.815 mg 的硫化汞 (HgS)。样品中 HgS 含量测定结果见表 3。

表 3 二十五味珊瑚丸中朱砂(HgS)的测定结果(n=3)

批号	HgS 含量( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	RSD( % )
030314	14.45	1.7
021114	20.50	1.8
020620	19.71	1.6

**2.2.2 空白试验** 取除朱砂外其它药味制备的二十五味珊瑚丸约 4 g, 精密称定, 按供试品的含量测定方法进行测定, 结果表明阴性对照不消耗滴定液, 对样品的测定无干扰。

### 3 讨论

酯型生物碱或乌头碱在成方制剂中含量很低, 若按药典方法进行限量检查或 HPLC 法直接测定乌头碱单体成分的含量, 因空白样品干扰无法进行。本实验是根据乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的化学结构的共同特征是含有苯甲酰酯基, 可定量地水解生成苯甲酸这一特点<sup>[4]</sup>来制定本品中酯型生物碱的限度, 控制成品的质量, 保证临床用药的安全。

传统的酯键水解方法一般是用 5% 氢氧化钠或氢氧化钾溶液进行水解, 本实验选用 5% 氢氧化钾甲醇溶液是因为水解生成的苯甲酸在甲醇中溶解度好。同时在实验过程中发现碱水解优于酸水解, 苯甲酸在酸性条件下不稳定。游离的苯甲酸在较高温度下易升华, 因此在低温下减压回收制备样品。

本品中含有大量的矿物药, 主要化学成分为钙

盐、硅酸盐等, 若不经处理直接消化滴定, 则消化困难, 同时这些金属离子与  $\text{SCN}^-$  反应, 干扰样品中汞的测定, 故需先用稀硝酸处理, 除去金属离子的干扰, 同时减少消化剂的用量。

消化剂加入方式对样品消化效果和消化时间影响很大, 本研究发现由于硝酸钾加热分解, 如果硫酸和硝酸钾一同加入, 消化时间达 3 h, 且样品消化后颜色较深并伴有黑色沉淀。故硝酸钾应分次加入。即第一次加入硫酸 20 mL 和硝酸钾 3 g, 待样品完全炭化后, 再加入 2 g, 消化至棕黄色, 再加入 1 g, 消化至乳黄色, 即得。这时消化效果理想, 消化时间缩短为 2 h。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准藏药第一册[S]. 1995: 155.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 27, 92, 331.
- [3] 王慕邹, 李百龙, 高凤英. 乌头中主要生物碱的高效液相色谱测定[J]. 药学学报, 1983, 18(9): 689.
- [4] 陈幸, 夏文娟, 方娜娜. 对中国药典附子中乌头碱限量检查的商榷[J]. 药物分析杂志, 1995, 15(4): 6.

## 《中国中药杂志》2010 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管, 中国药学会主办, 中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1995 年 7 月, 是创早最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平, 主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路, 内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、科研院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊, 128 页, 2010 年定价每期 15 元, 全年 24 期定价为 360 元。国内刊号 11 - 2272/R, 国际刊号 1101 - 5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公, 如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www.cjcmm.com.cn](http://www.cjcmm.com.cn) 或 [www.中国中药杂志.com](http://www.中国中药杂志.com)。

联系电话: 稿件查询 010 - 64045830 转 602; 主任电话 010 - 64058556; 资源与栽培栏编辑: 010 - 64048925; 制剂栏编辑: 010 - 64040392; 化学栏编辑: 010 - 64040113; 药理栏编辑: 010 - 84022522; 临床栏编辑: 010 - 64059766; 电子杂志制作发行及网上维护: 010 - 64030625。