

附桂骨痛片中乌头双酯型生物碱的检查 高效液相色谱法

参考——中国药典（2025 年版）

一、背景

附桂骨痛片为中成药，由附子（制）、制川乌、肉桂、党参、当归、炒白芍、淫羊藿、醋乳香组成；具有温阳散寒，盖气活血，消肿止痛的功效。附子与川乌均来自毛茛科乌头属，乌头属植物主要的药用成分为二萜类生物碱，具有镇痛、局麻、抗炎等药理活性，但该类成分具有一定毒性，主要表现为心肌毒性、神经毒性等，严重时可引起死亡，因此需要对附桂骨痛片中的乌头双酯型生物碱（新乌头碱、次乌头碱、乌头碱）进行限量检查。

二、原理

将附桂骨痛片除去糖衣后研细，经乙腈-浓氨试液混合溶液超声提取，滤液减压回收至干，净化富集，采用梯度洗脱条件，用紫外-可见光检测器检测，通过保留时间定性。

三、试剂与材料

- 3.1 水：符合 GB/T 6682 的一级水；
- 3.2 甲醇：色谱纯；
- 3.3 乙腈：色谱纯；
- 3.4 四氢呋喃：色谱纯；
- 3.5 浓氨水：含 NH_3 应为 25 %~28 % (g/g)，分析纯；
- 3.6 盐酸：分析纯；
- 3.7 磷酸：色谱纯；
- 3.8 磷酸二氢钾：色谱纯；
- 3.9 乙腈-浓氨试液：分别移取 90 mL 乙腈（3.3）和 10 mL 浓氨水（3.5），混匀，备用；
- 3.10 0.1 mol/L 盐酸溶液：取盐酸（3.6）0.84 mL，加水（3.1）稀释至 100 mL，混匀，备用；
- 3.11 0.1 %磷酸溶液：取磷酸（3.7）0.1 mL，加水（3.1）稀释至 100 mL，混匀，备用；
- 3.12 乙腈-0.1 %磷酸溶液混合溶液：分别移取 30 mL 乙腈（3.3）和 70 mL 0.1 %磷酸溶液

(3.11), 混匀, 备用;

3.13 流动相 A: 分别移取 250 mL 乙腈 (3.3) 和 150 mL 四氢呋喃 (3.4), 混匀, 超声 10 min 后备用;

3.14 流动相 B: 称取 4.08 g 磷酸二氢钾 (3.8), 加 1 L 水 (3.1) 使之溶解; 再加入磷酸 (3.7) 1 mL, 混匀, 超声 10 min 后备用;

3.15 乌头双酯型生物碱对照提取物: 已标示新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的含量;

3.16 附桂骨痛片: 市售, 实验前除去糖衣。

四、仪器与设备

4.1 高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 C0 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站;

4.2 分析天平: 精确到 0.0001 g;

4.3 涡旋振荡器;

4.4 超声波清洗机;

4.5 移液器: 200 μ L、1000 μ L;

4.6 容量瓶: 10 mL、50 mL、1000 mL, 棕色带刻度;

4.7 具塞锥形瓶;

4.8 减压回收装置;

4.9 固相萃取柱: 以混合型阳离子交换反相吸附剂为填充剂, 150 mg, 容量为 6 mL;

4.10 离心管: 15 mL、50 mL;

4.11 一次性针头注射器;

4.12 0.22 μ m 有机针式过滤器。

五、测定步骤

5.1 对照提取物溶液和灵敏度溶液的配制

5.1.1 取乌头双酯型生物碱对照提取物 (3.15) 适量, 精密称定, 加乙腈 (3.3) 制成每 1 mL 含新乌头碱、次乌头碱和乌头碱各 0.2 mg 的溶液, 即得对照提取物储备液。

5.1.2 精密量取上述对照提取物储备液 (5.1.1) 5 mL, 置于 50 mL 容量瓶中, 加 0.1 % 磷酸溶液 (3.11) 稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 含新乌头碱、次乌头碱和乌头碱各 20 μ g 的溶液, 即得对照提取物溶液。

5.1.3 将对照提取物溶液（5.1.2）用 0.1 %磷酸溶液（3.11）稀释 100 倍，制成每 1 mL 含新乌头碱、次乌头碱和乌头碱各 0.2 μ g 的溶液，即得灵敏度溶液。

5.2 供试品溶液和供试品加标溶液的制备

5.2.1 取附桂骨痛片 10 片，除去糖衣，研细，精密称定，称取 1.32 g，置于具塞锥形瓶（4.7）中，加乙腈-浓氨试液混合溶液（3.9）25 mL 超声处理 30 分钟，滤过，滤液于 40 $^{\circ}$ C 以下减压回收溶剂至干，残渣加 0.1 mol 盐酸溶液（3.10）10 mL 使溶解，滤过，滤液加在预先依次用乙腈（3.3）、水（3.1）各 6 mL 洗脱的固相萃取柱（4.9）上，依次以 0.1 mol 盐酸溶液（3.10）、甲醇（3.2）、乙腈（3.3）各 5 mL 洗脱，待洗脱液流尽后，放置 5 分钟，用乙腈-浓氨试液混合溶液（3.9）10 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40 $^{\circ}$ C 以下减压回收溶剂至干，残渣精密加入乙腈-0.1 %磷酸溶液混合溶液（3.12）3 mL 使溶解，滤过，取续滤液，即得供试品溶液，待上机测定。

5.2.2 取附桂骨痛片 10 片，除去糖衣，研细，精密称定，称取 1.32 g，置于具塞锥形瓶（4.7）中，加乙腈-浓氨试液混合溶液（3.9）25 mL，再加入 150 μ L 对照提取物储备液（5.1.1），后续步骤同供试品溶液的制备过程（5.2.1），即得供试品加标溶液，待上机测定。

5.3 色谱条件

a) 色谱柱: C_{18} , 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m 或者相当的色谱柱;

b) 流动相: 以乙腈-四氢呋喃混合溶液（3.13）为流动相 A，磷酸二氢钾溶液（3.14）为流动相 B；按下表进行梯度洗脱：

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	15	85
38	26	74
39	35	65
49	35	65

注：按照此梯度洗脱表运行存在系统压力无法平衡，基线不稳的情况，故设置每次进样前平衡 10min。

c) 流速: 1.0 mL/min;

d) 进样量: 10 μ L;

e) 洗针液: 90 %甲醇水溶液;

f) 柱温: 25 $^{\circ}$ C;

g) 检测器及检测波长: 检测器为紫外-可见光检测器，检测波长为 232 nm。

六、测定结果

6.1 对照提取物溶液的测定

按照上述色谱条件（5.3）进行采集，对照提取物溶液（5.1.2）的色谱图如图 1 所示，积分结果如表 1 所示。

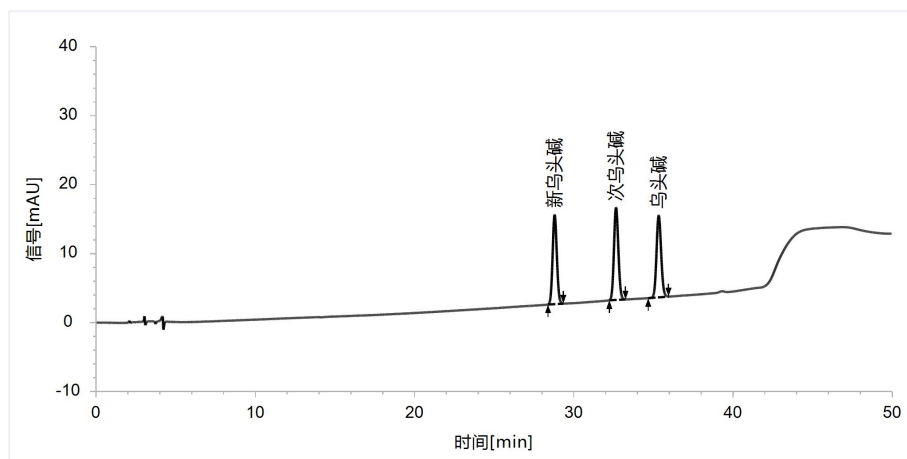


图 1 对照提取物溶液的色谱图

表 1 对照提取物溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU. s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
新乌头碱	28.792	240.143	12.996	55757	—	1.11
次乌头碱	32.650	258.779	13.451	66155	7.75	1.11
乌头碱	35.333	241.695	11.932	70282	5.16	1.11

由表 1 中数据可知，乌头碱峰的理论塔板数为 70282，满足《中国药典（2025 年版）》中规定的理论塔板数按乌头碱峰计算应不低于 60000 的要求；3 种化合物的分离度 ≥ 5.16 ，均可以达到基线分离；拖尾因子均为 1.11，均具有良好的峰形。

将对照提取物溶液（5.1.2）连续进样 7 针进行重复性测试，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

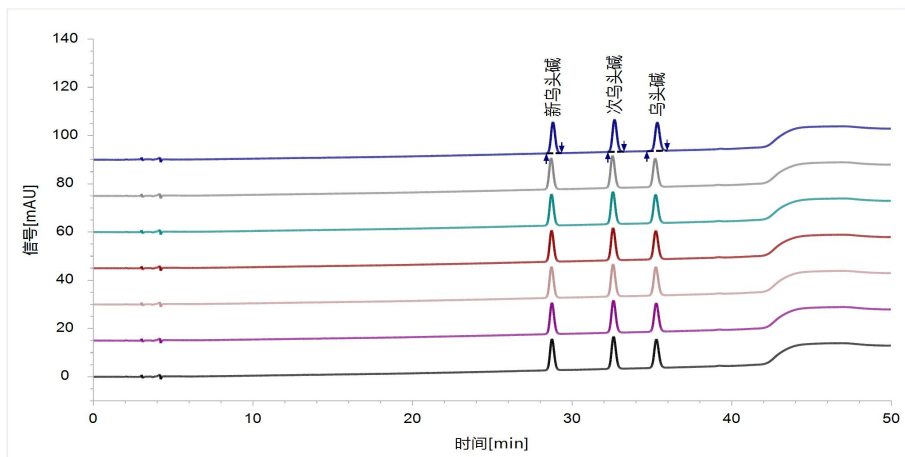


图 2 对照提取物溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 对照提取物溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	项目	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
新乌头碱	保留时间 (min)	28.733	28.733	28.700	28.708	28.708	28.683	28.792	28.722	0.12
	峰面积 (mAU.s)	240.287	240.601	240.535	240.565	240.760	240.511	239.430	240.384	0.18
次乌头碱	保留时间 (min)	32.592	32.583	32.558	32.567	32.558	32.533	32.650	32.577	0.11
	峰面积 (mAU.s)	257.347	259.072	257.672	257.791	258.562	257.499	257.892	257.976	0.24
乌头碱	保留时间 (min)	35.275	35.267	35.242	35.242	35.225	35.200	35.333	35.255	0.12
	峰面积 (mAU.s)	239.833	241.341	241.009	241.217	240.081	241.012	241.695	240.884	0.28

由表 2 中数据可知,对照提取物溶液连续进样 7 针进行重复性测试,其中新乌头碱保留时间的 RSD 为 0.12 %,峰面积的 RSD 为 0.18 %;次乌头碱保留时间的 RSD 为 0.11 %,峰面积的 RSD 为 0.24 %;乌头碱保留时间的 RSD 为 0.12 %,峰面积的 RSD 为 0.28 %,均具有良好的定性定量重复性。

6.2 仪器灵敏度的测定

按照上述色谱条件(5.3)进行采集,灵敏度溶液(3 种化合物的浓度均为 0.2 $\mu\text{g/mL}$)的色谱图如图 3 所示,计算结果见表 3。

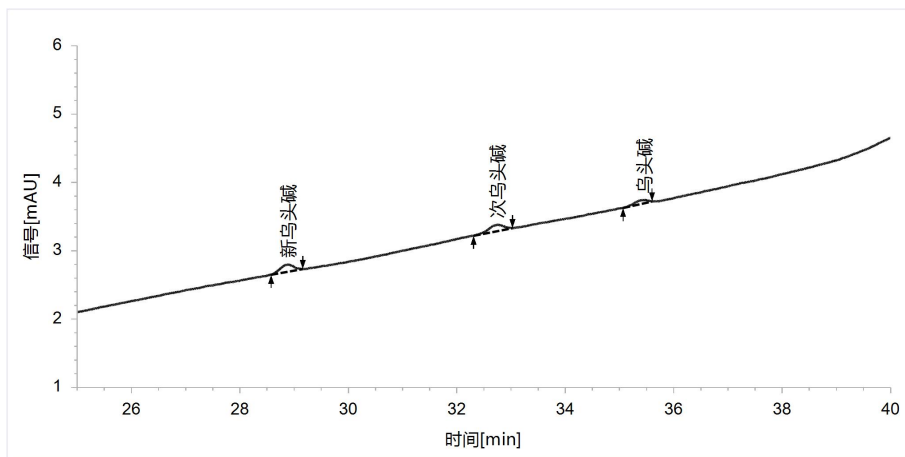


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
新乌头碱	0.2	0.105	0.013	8.1	0.080	0.247
次乌头碱	0.2	0.095	0.013	7.3	0.082	0.274
乌头碱	0.2	0.047	0.013	3.6	0.167	0.556

由表 3 中数据可知，3 种化合物的仪器检出限范围为 $0.080 \mu\text{g/mL} \sim 0.167 \mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限范围为 $0.247 \mu\text{g/mL} \sim 0.556 \mu\text{g/mL}$ 。

6.3 检查

按照色谱条件（5.3），对空白溶液和供试品溶液进行采集，色谱图如图 4~图 5 所示，积分结果见表 4。

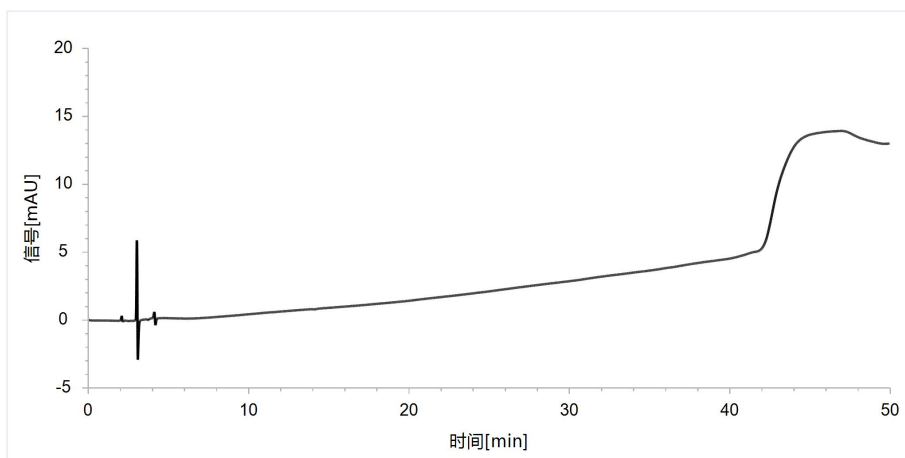


图 4 空白溶液的色谱图

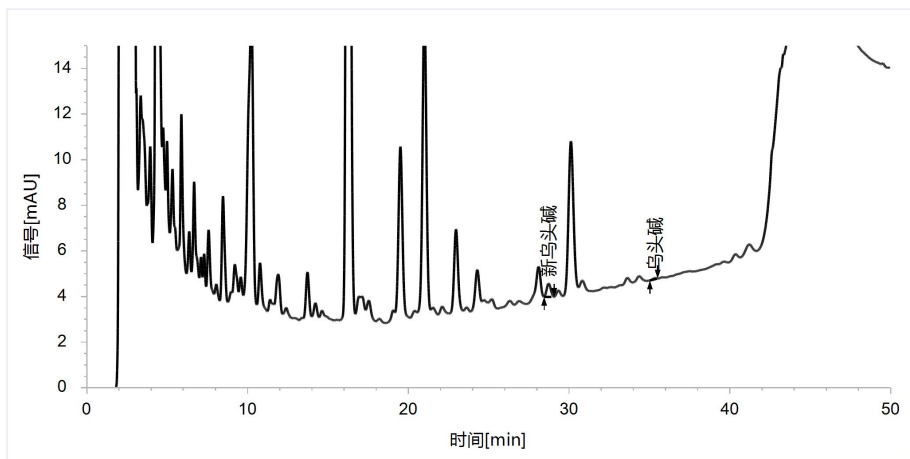


图 5 供试品溶液的色谱图

表 4 供试品溶液色谱图积分结果表

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU. s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
新乌头碱	28.733	10.342	0.590	57066	—	1.06
次乌头碱	—	—	—	—	—	—
乌头碱	35.358	0.829	0.054	110200	6.46	0.95
峰面积合计 (mAU. s)				11.171		

从表 4 中数据可知，附桂骨痛片供试品溶液中新乌头碱、乌头碱的峰面积之和为 11.171mAU. s，满足《中国药典（2025 年版）》中，与对照提取物 3 个色谱峰保留时间相对应的色谱峰的峰面积之和不得大于对照提取物色谱图中乌头碱色谱峰的峰面积（240.884mAU. s）的要求。

按照色谱条件（5.3），对供试品加标溶液（5.2.2）进行采集，供试品溶液和供试品加标溶液的叠加色谱图如图 6 所示，采用单点定量法对供试品加标溶液的回收率进行计算，计算结果如表 5 所示。

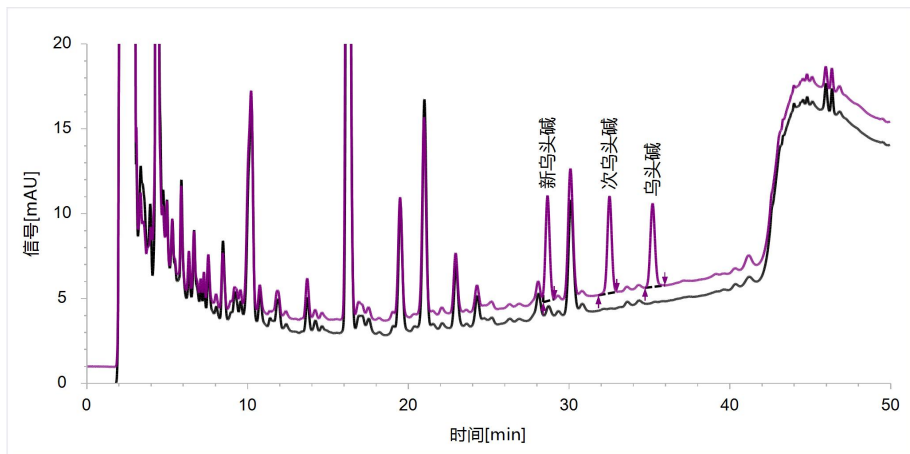


图 6 供试品溶液和供试品加标溶液的叠加色谱图

表 5 供试品加标溶液加标回收率结果表

目标物	样品含量 ($\mu\text{g/mL}$)	溶液加标量 (μg)	加标溶液实测含量 ($\mu\text{g/mL}$)	加标回收率 (%)
新乌头碱	0.864	30	9.422	85.6
次乌头碱	—	30	8.580	85.8
乌头碱	—	30	8.298	83.0

由表 5 中数据可知，加标回收实验中，3 种化合物的加标回收率范围均 $\geq 83.0\%$ 。

七、结论

本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪进行附桂骨痛片中乌头双酯型生物碱的检查。本实验以乙腈-四氢呋喃混合溶液和磷酸二氢钾溶液作为流动相，采用梯度洗脱条件，实验结果表明：乌头碱峰的理论塔板数为 70282，满足《中国药典（2025 年版）》中规定的理论塔板数按乌头碱峰计算应不低于 60000 的要求；3 种化合物的分离度 ≥ 5.16 ，均可以达到基线分离；拖尾因子均为 1.11，均具有良好的峰形；对照提取物溶液连续进样 7 针进行重复性测试，其中 3 种化合物保留时间的 RSD 范围为 $0.11\% \sim 0.12\%$ ，峰面积的 RSD 范围为 $0.18\% \sim 0.28\%$ ，均具有良好的定性定量重复性；附桂骨痛片供试品溶液中新乌头碱、乌头碱的峰面积之和为 11.171 mAU.s，满足《中国药典（2025 年版）》中，与对照提取物 3 个色谱峰保留时间相对应的色谱峰的峰面积之和不得大于对照提取物色谱中乌头碱色谱峰的

峰面积 (240.884 mAU.s) 的要求; 加标回收实验中, 3 种化合物的加标回收率均 $\geq 83.0\%$ 。因此, 使用悟空 K2025 高效液相色谱仪进行附桂骨痛片中乌头双酯型生物碱的检查, 完全满足《中国药典 (2025 年版)》中的要求。

附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit</u> 泵单元
1	62 MPa 二元高压输液泵 (内置溶剂托盘)
2	流动相瓶 (肖特瓶, 1 L)
3	脱气机
4	四通道溶剂选择阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector</u> 进样器
1	自动进样器
2	样品瓶 (2 mL, 含瓶盖)
3	脱气组件
4	100 μ L 定量环
C)	<u>Column Oven</u> 柱温箱
1	色谱柱恒温箱 (室温以下 10 $^{\circ}$ C 至 85 $^{\circ}$ C)
2	色谱柱: Kromasil 100-5-C ₁₈ , 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m
D)	<u>Detector</u> 检测器
1	紫外-可见光检测器
E)	<u>Workstation</u> 工作站
1	Wookinglab 色谱工作站 (00.03.58.05)

附 2: 悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)



报告人: 王文霞

联系方式: 15562662085