

颠茄草的质量标准提升

刘勇¹, 刘雅琳¹, 江雪¹, 王金淼¹, 冯庆梅¹, 高慧敏², 李振国³,
许二平¹, 代丽萍^{1*}, 王智民^{1,2*}

(1. 河南中医药大学 河南省豫产道地药材综合开发利用工程技术研究中心,
河南省仲景方药现代研究重点实验室, 郑州 450046;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 3. 河南省食品药品检验所, 郑州 450012)

[摘要] 目的: 针对颠茄草的现行标准较低且缺项的问题, 对颠茄草的质量标准进行提高。方法: 以东莨菪内酯、硫酸阿托品、硫酸天仙子胺为对照品, 以乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液(17:4:2)为展开剂, 采用薄层色谱法对颠茄草进行定性鉴别; 按2020年版《中华人民共和国药典》(四部)通则相关方法对颠茄草的水分、总灰分和醇溶性浸出物进行测定; 采用高效液相色谱法(HPLC)测定颠茄草中硫酸天仙子胺和氢溴酸东莨菪碱的含量, 流动相选择乙腈-54 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(14:86), 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长210 nm。结果: 薄层色谱图中斑点清晰、分离度好、专属性强; 硫酸天仙子胺和氢溴酸东莨菪碱分别在0.024 7~0.789 6 g·L⁻¹($r=0.999\ 9$), 0.003 9~0.124 0 g·L⁻¹($r=0.999\ 9$)与峰面积呈良好线性关系, 平均加样回收率分别为100.29%(RSD 1.6%), 99.04%(RSD 1.4%); 拟定水分不得过13.0%, 总灰分不得过13.0%, 醇溶性浸出物不得少于10.0%; 鉴于氢溴酸东莨菪碱含量较低且变异范围大, 拟定硫酸天仙子胺质量分数不得少于0.098%。结论: 建立的方法操作简便、专属性强、重复性好, 可用于提升颠茄草的质量控制标准。

[关键词] 颠茄草; 质量标准; 薄层色谱法(TLC); 高效液相色谱法(HPLC); 硫酸天仙子胺; 氢溴酸东莨菪碱; 醇溶性浸出物

[中图分类号] R22;R28;O657.7;R931 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)02-0175-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211747

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210525.1038.002.html>

[网络出版日期] 2021-05-26 10:21

Improvement on Quality Standard of Belladonnae Herba

LIU Yong¹, LIU Ya-lin¹, JIANG Xue¹, WANG Jin-miao¹, FENG Qing-mei¹, GAO Hui-min²,
LI Zhen-guo³, XU Er-ping¹, DAI Li-ping^{1*}, WANG Zhi-min^{1,2*}

(1. Henan Key Laboratory for Modern Research on Zhongjing's Herbal Formulae, Engineering Research
Center for Comprehensive Development and Utilization of Authentic Medicinal Materials from Henan,

Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Henan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450012, China)

[Abstract] **Objective:** To improve the current standard of Belladonnae Herba in the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. **Method:** Taking hyoscyamine sulfate, atropine sulfate and scopoletin as reference substances, and ethyl acetate-methanol-concentrated ammonia (17:4:2) as developing solvent, thin layer chromatography (TLC) was applied in the qualitative identification of Belladonnae Herba. The moisture, total

[收稿日期] 20210401(004)

[基金项目] 国家药典委员会国家药品标准提高项目(2019Z014)

[第一作者] 刘勇, 在读硕士, 从事中药化学和质量评价研究, E-mail: lyq952738@163.com

[通信作者] * 代丽萍, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药品质评价与物质基础, E-mail: zzdai@163.com;

* 王智民, 博士, 研究员, 从事中药化学和质量评价研究, Tel: 010-84014128, E-mail: zmwang@icmm.ac.cn

ash and ethanol-soluble extract of *Belladonnae Herba* were determined based on the general principles in the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia* (volume IV). The contents of hyoscyamine sulfate and scopolamine hydrobromide were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with mobile phase of acetonitrile-54 mmol·L⁻¹ phosphate buffer solution (14:86), flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength at 210 nm. **Result:** The spots in the TLC were clear with good separation and specificity. Hyoscyamine sulfate and scopolamine hydrobromide showed a good linearity with peak area in the range of 0.024 7-0.789 6 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) and 0.003 9-0.124 0 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), the average recoveries of these two ingredients were 100.29% (RSD 1.6%) and 99.04% (RSD 1.4%), respectively. The limits for moisture, total ash in *Belladonnae Herba* should be less than 13.0% and the limit for the ethanol-soluble extract should be more than 10.0%. Due to the low content and wide variation of scopolamine hydrobromide, the content of hyoscyamine sulfate should not be less than 0.098%. **Conclusion:** The established method is simple, specific and reproducible, which can be used to improve the quality control standard of *Belladonnae Herba*.

[Keywords] *Belladonnae Herba*; quality standard; thin layer chromatography (TLC); high performance liquid chromatography (HPLC); hyoscyamine sulfate; scopolamine hydrobromide; ethanol-soluble extract

颠茄草为茄科颠茄属植物颠茄 *Atropa belladonna* 的干燥全草^[1]。原产于欧洲,在我国山东、湖南、河南等省有引种栽培^[2]。其主要用于胃痉挛、胃、十二指肠溃疡病,胆绞痛,输尿管结石等引起的腹痛;胃炎及胃痉挛引起的呕吐和腹泻;迷走神经兴奋导致的多汗、流涎、心率慢、头晕等^[3-5]。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中以颠茄为原料的药物有颠茄片、颠茄酊及麝香镇痛膏等^[6-8]。颠茄草药效成分为莨菪烷类生物碱,主要包括莨菪碱(*L*-天仙子胺)和东莨菪碱等,其中莨菪碱会在储藏、加工、提取过程中逐渐转化为消旋生物碱阿托品^[9-10]。阿托品在颠茄草中含量极低,但阿托品和莨菪碱的相对分子质量相同,薄层色谱比移值也相同,二者难以通过2020年版《中国药典》(一部)“颠茄草”鉴别项下的薄层色谱法(TLC)进行区分;虽然可以通过以手性柱为基础的高效液相色谱法(HPLC)或者核磁共振(NMR)加以区分,但检测成本十分高昂,因此,颠茄流浸膏中非法添加硫酸阿托品的现象偶有发生^[11]。

据报道,不同生境、农业投入品、采收和初加工方法,以及不同批次药材中根、茎、叶的占比等对颠茄草质量影响很大^[12-14]。而2020年版《中国药典》中颠茄草的质量标准仅规定了性状、鉴别(理化、显微和TLC鉴别),检查(杂质、水分)和含量测定(酸碱滴定法);且含量测定项下的供试品溶液制备方法操作繁琐,使用了大量有毒、有害试剂(乙醚、三氯甲烷等),采用的含量测定方法准确度低、专属性差,难以有效控制颠茄草的质量。本实验在对颠茄草中主要药效成分莨菪烷类生物碱含量进行分析

的基础上,选择硫酸天仙子胺和氢溴酸东莨菪碱为质量控制指标,通过系统的方法学考察和复核,建立二者的HPLC含量测定方法,并建立以东莨菪内酯、硫酸阿托品、硫酸天仙子胺为对照品的TLC,此外,还对检查项进行了补充和修订,以期后续版本《中国药典》的颠茄草质量标准修订提供数据支撑。

1 材料

UltiMate 3000型高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),e2695型高效液相色谱仪[美国沃特世科技有限公司,包括2998型光电二极管阵列检测器(PDA)],YP50001型电子天平(上海衡际科学仪器有限公司),BT25S型1/10万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],ALC-210.4型电子天平(河南博金仪器有限公司),PHS-3C型pH检测仪(杭州奥立龙仪器有限公司),Milli-Q型超纯水系统(德国默克密理博公司)。

对照品硫酸阿托品(批号100040-201613,纯度96.7%),东莨菪内酯(批号110768-200504,纯度>98%),硫酸天仙子胺(批号111982-201401,纯度97%),氢溴酸东莨菪碱(批号100049-201009,纯度91.7%),氢溴酸山莨菪碱(批号100051-201607,纯度99.3%)均购自中国食品药品检定研究院;水为超纯水,甲醇、乙腈、三乙胺、磷酸二氢钾均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。28批颠茄草于2018—2020年前往山东、江西、河南、湖南等主产地收集,经河南中医药大学中药鉴定与资源学科代丽萍教授鉴定为茄科植物颠茄 *A. belladonna* 的干燥全草,样品来源信息见表1。

表1 颠茄草的来源信息及指标成分含量(n=2)

Table 1 Sample information of Belladonnae Herba and its index component content (n=2)

No.	来源	采集日期	硫酸天仙子胺	氢溴酸东莨菪碱	两者总量	No.	来源	采集日期	硫酸天仙子胺	氢溴酸东莨菪碱	两者总量
1	湖南省永州市新田县骥村镇	2018-06	0.094	0.007	0.101	15	湖南省永州市新田县骥村镇	2019-06	0.109	0.008	0.117
2	湖南省永州市新田县视头镇	2018-06	0.098	0.006	0.104	16	湖南省永州市新田县毛里乡	2019-06	0.105	0.006	0.111
3	湖南省永州市新田县龙泉镇	2018-06	0.097	0.005	0.102	17	湖南省永州市新田县视头镇	2019-06	0.163	0.012	0.175
4	湖南省永州市新田县毛里乡	2018-06	0.134	0.014	0.148	18	湖南省永州市新田县冷水井乡	2019-09	0.127	0.010	0.137
5	河南省信阳市新县浒湾乡	2018-07	0.102	0.010	0.112	19	湖南省永州市新田县新圩镇	2020-06	0.174	0.008	0.182
6	河南省信阳市新县沙窝镇	2018-07	0.090	0.009	0.099	20	湖南省永州市新田县视头镇	2020-06	0.210	0.012	0.222
7	河南省信阳市新县酒店乡	2018-07	0.162	0.019	0.181	21	湖南省永州市新田县毛里乡	2020-06	0.147	0.018	0.165
8	山东省烟台市牟平1	2018-10	0.127	0.005	0.132	22	湖南省永州市新田县龙泉镇	2020-06	0.167	0.015	0.182
9	山东省烟台市牟平2	2018-10	0.234	0.012	0.246	23	湖南省永州市宁远县鲤溪乡	2020-06	0.154	0.005	0.159
10	陕西省安康市旬阳县	2018-07	0.128	0.013	0.141	24	湖南省永州市宁远县梅村	2020-06	0.190	0.018	0.208
11	黑龙江牡丹江市穆棱市穆棱镇	2018-06	0.134	0.008	0.143	25	河南省信阳市新县浒湾乡	2020-06	0.101	0.008	0.109
12	江西省九江市彭泽县芙蓉镇	2019-06	0.085	0.007	0.092	26	江西省九江市彭泽县棉船镇	2020-06	0.165	0.008	0.173
13	江西省九江市彭泽县棉船镇	2019-06	0.136	0.010	0.146	27	江西省九江市彭泽县芙蓉镇	2020-06	0.075	0.004	0.079
14	湖南省永州市新田县新圩镇	2019-06	0.129	0.009	0.138	28	河北省衡水市武邑县清凉店镇	2020-06	0.189	0.004	0.193

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别

2.1.1 供试品溶液与对照品溶液的制备 取颠茄草粉末(过2号筛,下同)2 g,加浓氨试液与乙醇等量混合溶液4 mL,加二氯甲烷20 mL,超声15 min(功率500 W,频率40 kHz),滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取对照品硫酸天仙子胺、硫酸阿托品、东莨菪内酯适量,分别加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为对照品溶液。

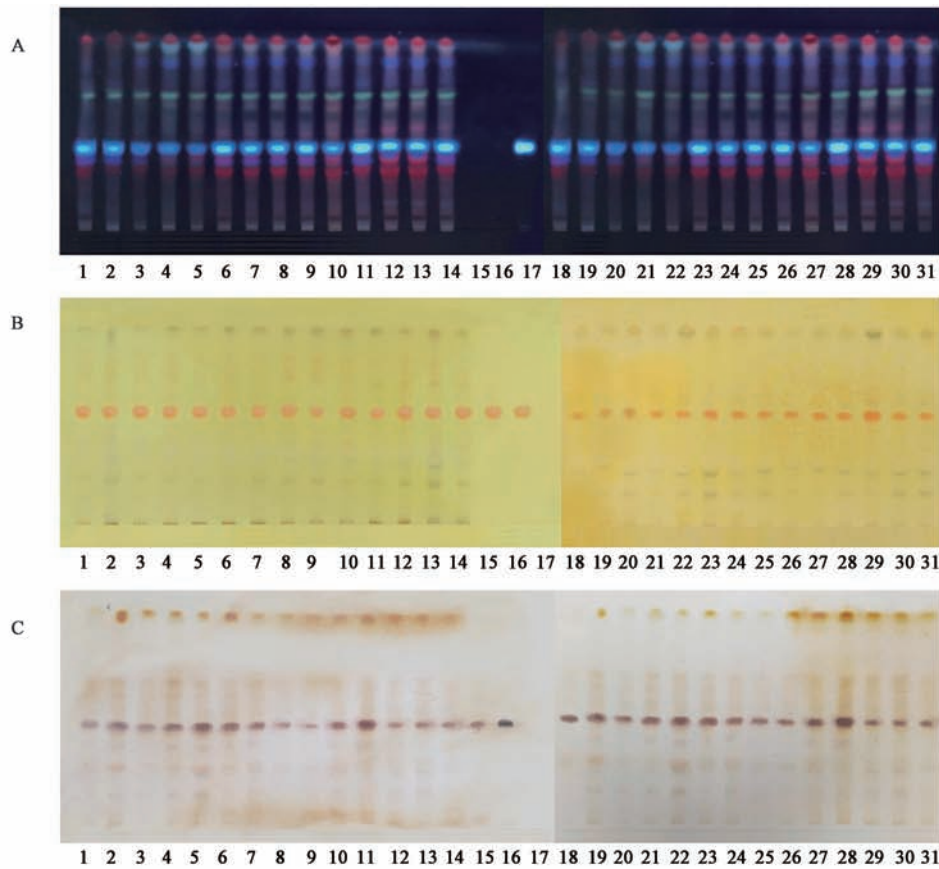
2.1.2 检测条件 按2020年版《中国药典》(四部)TLC(通则0502)试验,吸取上述供试品溶液10 μL,硫酸天仙子胺、硫酸阿托品对照品溶液各5 μL及东莨菪内酯对照品溶液2 μL,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液(17:4:2)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视东莨菪内酯;喷以稀碘化铋钾溶液,在105 °C加热至斑点显色清晰,检视硫酸天仙子胺。供试品色谱中,在与对照品硫酸天仙子胺相应的位置上,显相同颜色斑点。再喷以10%亚硝酸钠溶液,放置5~15 min,供试品色谱中在与硫酸天仙子胺对照品相应的位置上应由橘红色变为红棕色或棕色;不得出现与硫酸阿托品一致的灰色或灰蓝色。见图1。与2020年版《中国药典》原标准相比,本实验优化了样品的提取溶剂、展开剂,修订了对照品的品种(硫酸天仙子胺、硫酸阿托品、东莨菪内酯)。结果表明该

TLC简单、快捷、专属性强,可对颠茄草进行专属性鉴别。

2.2 检查 依据2020年版《中国药典》(四部)水分测定法(通则0832),灰分测定法(通则2302),浸出物测定法(通则2201,用85%乙醇热浸法)进行测定,见表2。结果28批颠茄草含水量在6.69%~11.65%,平均值9.19%。2020年版《中国药典》规定颠茄草水分不得过13.0%,全部符合规定,不建议修改。《日本药典》《欧洲药典》分别以根、叶入药,规定总灰分分别不得超过6%和16.0%^[15-16];历版《中国药典》以全草入药,缺少总灰分项。28批颠茄草总灰分在6.41%~14.86%,平均值10.62%。若以平均值上浮20%为考量标准,总灰分按13.0%时,有5批不合格(18%)。由于药效成分的含量较低,为全面提升标准,结合药效成分的理化性质设置醇溶性浸出物项,其范围7.84%~19.65%,平均值12.79%。以平均值的80%为考量标准,醇溶性浸出物不得少于10.0%,则有4批不合格(14%)。

2.3 硫酸天仙子胺和氢溴酸东莨菪碱含量测定

2.3.1 色谱条件 采用ChromCore™ 120 C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-54 mmol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(称取磷酸二氢钾7.3 g置1 L量瓶中,加入三乙胺溶液0.8 mL,加水定容至刻度)(14:86),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30 °C,进样量20 μL,检测波长210 nm。理论板数按硫酸天仙子胺峰计算不低于2 000。



1~14,18~31. 颠茄草样品,依次对应表1中编号1~28;15. 硫酸天仙子胺;16. 硫酸阿托品;17. 东莨菪内酯;A. 紫外光灯(365 nm);B. 稀碘化铈钾溶液显色;C. 10%亚硝酸钠溶液显色

图1 颠茄草的TLC

Fig. 1 TLC of Belladonnae Herba

表2 颠茄草水分、总灰分、醇溶性浸出物的测定 (n=2)

Table 2 Determination of moisture, total ash and ethanol-soluble extract of Belladonnae Herba (n=2) %

No.	水分	总灰分	醇溶性浸出物	No.	水分	总灰分	醇溶性浸出物
1	10.41	9.34	7.84	15	11.30	9.57	15.36
2	9.20	12.56	11.80	16	8.11	9.51	11.76
3	10.22	12.61	8.35	17	7.65	6.41	13.18
4	8.45	10.62	11.56	18	7.77	10.21	11.25
5	9.28	10.15	10.66	19	9.61	8.74	16.60
6	8.88	12.35	9.38	20	9.06	6.90	19.65
7	9.18	14.86	9.34	21	9.27	13.31	15.59
8	9.40	9.46	13.70	22	9.22	14.46	12.76
9	9.60	8.64	16.58	23	8.17	9.97	12.03
10	8.78	9.22	12.26	24	9.00	14.19	13.71
11	9.12	9.92	17.50	25	6.69	13.32	15.38
12	9.34	8.94	13.74	26	8.75	10.50	12.23
13	10.22	10.14	11.24	27	9.33	12.06	10.93
14	11.65	8.72	11.42	28	9.59	10.80	12.31

2.3.2 对照品溶液的制备 分别取各对照品适量,精密称定,用50%乙醇溶解配制成含 $0.30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸天仙子胺和 $0.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢溴酸东莨菪碱的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取颠茄草粗粉约1.5 g,置50 mL具塞锥形瓶中,精密称定,精密加入浓度为 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸50 mL,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)30 min,待冷却后,补足质量,摇匀,用滤纸过滤,精密量取续滤液10 mL,用浓氨水调节pH 10.0,用二氯甲烷萃取6次,每次10 mL,合并萃取液,减压回收至干,残渣使用50%乙醇复溶并转移至2 mL量瓶中,加50%乙醇定容,摇匀,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3.4 线性范围、检测限(LOD)和定量限(LOQ)考察 取氢溴酸东莨菪碱、硫酸天仙子胺对照品适量,精密称定,置25 mL量瓶中,用50%乙醇溶解制成混合对照品储备液。吸取该储备液适量,分别制备得到6个系列质量浓度的混合对照品溶液,按2.3.1项下条件测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度

为横坐标,绘制标准曲线。以信噪比(S/N)=3为基准,确定LOD;以S/N=10为基准,确定LOQ。得氢溴酸东莨菪碱、硫酸天仙子胺线性回归方程分别为 $Y=369.16X-0.06$ ($r=0.999\ 9$), $Y=391.28X-0.31$ ($r=0.999\ 9$),线性范围分别为 $0.003\ 9\sim 0.124\ 0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.024\ 7\sim 0.789\ 6\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,LOD分别为 $0.8, 1.4\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,LOQ分别为 $0.003\ 8, 0.005\ 0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见图2。

2.3.5 精密度试验 取同一批次(样品编号9)颠茄草粗粉,按2.3.3项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,在1 d内连续进样6次,考察仪器的日内精密度。结果显示,硫酸天仙子胺、氢溴酸东莨菪碱峰面积的RSD分别为0.2%,0.3%,表明仪器的日内精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一批次(样品编号9)颠茄草粗粉,按2.3.3项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,分别于制样后0,2,4,6,8,10,12,20,24 h按2.3.1项下色谱条件测定,计算硫酸天

仙子胺、氢溴酸东莨菪碱峰面积的RSD分别为0.7%,2.7%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.7 重复性试验 取同一批次(样品编号9)颠茄草粗粉6份,精密称定,按2.3.3项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,记录峰面积,计算硫酸天仙子胺、氢溴酸东莨菪碱平均质量分数分别为2.337 8, 0.120 8 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别为1.0%,1.3%,表明该方法的重复性良好。

2.3.8 加样回收试验 取已知指标成分含量的颠茄草(样品编号9)粗粉9份,每份约0.75 g,精密称定,分别按样品中质量-对照品质量(1:0.5,1:1,1:1.5)加入各对照品,按2.3.3项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,计算各待测成分的平均回收率及RSD,结果显示颠茄草中硫酸天仙子胺和氢溴酸东莨菪碱的平均加样回收率分别为100.29%,99.04%,RSD分别为1.6%,1.4%,表明该方法的准确度良好。见表3。

表3 颠茄草中指标成分含量测定的加样回收试验

Table 3 Recovery test for determination of index components in Belladonnae Herba

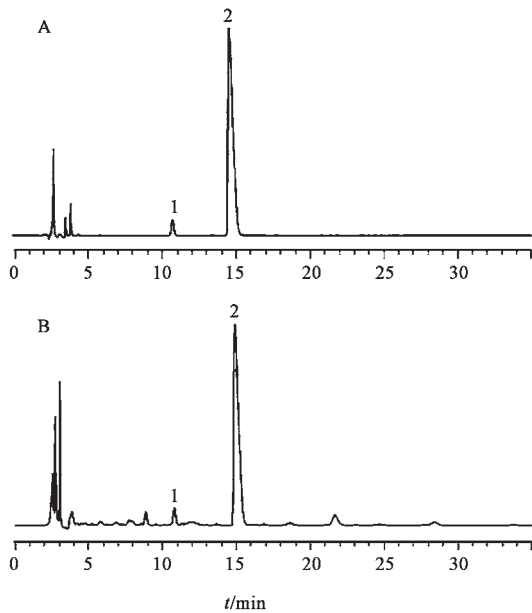
成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
硫酸天仙子胺	0.750 0	1.585 0	0.789 2	2.384 1	101.25	100.29	1.6
	0.750 5	1.586 1	0.789 2	2.374 2	99.86		
	0.750 2	1.585 5	0.789 2	2.349 9	96.86		
	0.750 0	1.585 0	1.399 8	2.977 2	99.46		
	0.750 7	1.586 5	1.399 8	3.011 4	101.79		
	0.750 5	1.586 1	1.399 8	2.975 4	99.25		
	0.750 5	1.586 1	2.228 0	3.834 0	100.89		
	0.750 2	1.585 5	2.228 0	3.833 1	100.88		
	0.750 7	1.586 5	2.228 0	3.866 4	102.33		
	氢溴酸东莨菪碱	0.750 0	0.081 9	0.040 4	0.121 5		
0.750 5		0.082 0	0.040 4	0.121 5	97.77		
0.750 2		0.081 9	0.040 4	0.121 5	98.02		
0.750 0		0.081 9	0.067 1	0.147 6	97.91		
0.750 7		0.082 0	0.067 1	0.147 6	97.76		
0.750 5		0.082 0	0.067 1	0.149 4	100.45		
0.750 5		0.082 0	0.137 9	0.220 5	100.44		
0.750 2		0.081 9	0.137 9	0.220 5	100.51		
0.750 7		0.082 0	0.137 9	0.220 5	100.44		

注:样品中量以干燥品计,即称样量需扣除水分9.60%。

2.3.9 样品测定 取表1中各批样品粉末适量,每个样品平行2份,按2.3.3项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,计算各样品中2个指标成分的含量(以干燥品计),见表1和图2。结果

显示,硫酸天仙子胺的质量分数在0.075%~0.234%,平均值0.137%;氢溴酸东莨菪碱的质量分数在0.004%~0.019%,均值0.010%;2种药效成分的总量处于0.079%~0.246%,均值0.146%。鉴于药效成分

氢溴酸东莨菪碱含量较低且变异范围大,以硫酸天仙子胺的含量进行控制更为合理,若以硫酸天仙子胺质量分数的平均值下浮20%,质量分数以0.109%计,则有9批样品不合格(32%);因此,按所有批次样品80%的合格率,质量分数以0.098%计,建议颠茄草中硫酸天仙子胺质量分数不得少于0.098%。



A. 混合对照品;B. 供试品;1. 氢溴酸东莨菪碱;2. 硫酸天仙子胺

图2 颠茄草的HPLC

Fig. 2 HPLC of Belladonnae Herba

3 讨论

3.1 TLC鉴别

3.1.1 供试品溶液制备方法的考察 2020年版《中国药典》中颠茄草的TLC鉴别以浓氨试液、三氯甲烷为提取溶剂,故提取溶剂考察了浓氨试液、三氯甲烷系统,无水乙醇、浓氨试液、二氯甲烷系统。结果表明与三氯甲烷比较,以无水乙醇、浓氨试液、二氯甲烷系统为提取溶剂时,TLC中主要斑点与浓氨试液、三氯甲烷系统提取的基本一致。其中,二氯甲烷毒性较三氯甲烷低。因此,选择无水乙醇、浓氨试液、二氯甲烷系统为提取溶剂。

3.1.2 对照品的考察 考察了硫酸天仙子胺、硫酸阿托品、氢溴酸东莨菪碱、氢溴酸山莨菪碱、东莨菪内酯5个对照品。供试品与对照品东莨菪内酯在365 nm下对照良好,与对照品硫酸天仙子胺在稀碘化铋钾溶液105 °C显色后对照良好,与对照品硫酸天仙子胺在10%亚硝酸钠溶液显色5~15 min后对照良好,与对照品硫酸阿托品在10%亚硝酸钠显色5~15 min后颜色(供试品显红棕色或棕色,硫酸阿托品显灰色或灰蓝色)差别明显;与对照品氢溴酸

山莨菪碱、氢溴酸东莨菪碱在相对应位置上斑点未检出或者显示微弱。按2020年版《中国药典》TLC,增大点样量至20 μL,展开、显色后,供试品溶液中氢溴酸山莨菪碱、氢溴酸东莨菪碱相对应位置上斑点仍未检出或者显示微弱(含量低的缘故),证实2020年版《中国药典》氢溴酸东莨菪碱的TLC鉴别不理想,故选用特征性和专属性好的硫酸天仙子胺、硫酸阿托品和东莨菪内酯作为对照品进行鉴别。

3.1.3 展开剂及点样量的考察 展开剂考察了乙酸乙酯-甲醇-浓氨水(17:2:1,2020年版《中国药典》采用),乙酸乙酯-甲醇-浓氨水(17:2:2),乙酸乙酯-甲醇-浓氨水(17:3:2)和乙酸乙酯-甲醇-浓氨水(17:4:2)。结果表明上述4种展开剂都能将主斑点较好分离。结合分离效果及比移值,展开剂选为乙酸乙酯-甲醇-浓氨水(17:4:2)。此外,考察了样品的点样量,供试品溶液10 μL,硫酸天仙子胺和硫酸阿托品对照品溶液各5 μL,东莨菪内酯对照品溶液2 μL时点样效果较好。考察了3个不同厂家的薄层板对方法的耐用性,表明该方法对3个不同厂家的薄层板都适用。

3.2 HPLC含量测定 颠茄草中与功效相关的成分为东莨菪碱和天仙子胺(L-莨菪碱)。为了确定其含量情况,首先建立了HPLC同时测定氢溴酸东莨菪碱、硫酸天仙子胺含量的方法,对28批颠茄草进行测定,结果表明氢溴酸东莨菪碱和硫酸天仙子胺的含量在28批样品中波动范围较小,故选择此二者为质控指标。提取溶剂分别考察了1,2 mol·L⁻¹盐酸及甲醇,结果表明2种盐酸溶液对氢溴酸东莨菪碱、硫酸天仙子胺的提取均较完全;此外,考察了提取时间(30,45 min),萃取数(1,3,4,6,8次),定容溶剂(无水乙醇,80%乙醇,60%乙醇,50%乙醇,甲醇,80%甲醇,60%甲醇,50%甲醇),综合考虑,最终确定2.3.3项下的供试品溶液制备方法。

综上所述,基于本文研究的结果,对后续版本《中国药典》的颠茄草质量标准提出以下修订建议:①TLC鉴别项修订对照品种(硫酸天仙子胺、硫酸阿托品和东莨菪内酯),供试品提取溶剂和展开剂;且规定在10%亚硝酸钠溶液显色5~15 min后供试品色谱中不得出现与对照品硫酸阿托品一致的灰色或灰蓝色斑点;②检查项下杂质检查与2020年版《中国药典》一致,增加总灰分标准不得过13.0%;③增加醇溶性浸出物不得少于10.0%;④含量测定项由酸碱滴定法修改为HPLC测定硫酸天仙子胺的

含量;以干燥品计,颠茄草含硫酸天仙子胺 $[(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4]$ 不得少于0.098%。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:395.
- [2] 尹健,熊建伟,陈利军,等. 豫南地区颠茄草害虫及其天敌种类的初步调查[J]. 河南农业科学,2008,37(1):69-71.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,1996:839.
- [4] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京:化学工业出版社,2002:402-406.
- [5] 刘灿黄,张继,康帅,等. 颠茄草的生药学研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(9):1589-1592.
- [6] 张文婷,马临科,黄琴伟,等. 中国药典2015年版颠茄草类制剂修订情况及操作要点[J]. 中国现代应用药学,2016,33(5):623-625.
- [7] 强玮,王亚雄,张巧卓,等. 颠茄托品烷生物碱合成途径基因表达分析与生物碱积累研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(1):52-58.
- [8] 郭双,刘佳,卢克欢,等. 诱导子对颠茄毛状根有效成分及代谢关键酶基因表达的影响[J]. 中草药,2018,49(4):897-902.
- [9] 陈发奎. 常用中草药有效成分含量测定[M]. 北京:人民卫生出版社,1997.
- [10] 王慕邹. 常用中草药高效液相色谱分析[M]. 北京:科学出版社,1999:392.
- [11] 黄伟,张文婷,赵维良,等. 颠茄流浸膏真伪鉴别及含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志,2012,32(1):151-154.
- [12] 庄果,王宇卿,熊伟,等. RP-HPLC法同时测定颠茄草5个部位中2种成分[J]. 中成药,2017,39(12):2560-2563.
- [13] 吴玉婷,吕伟旗,汤晟凌. 6省13个产地颠茄草中2种成分测定及相关性分析[J]. 中成药,2019,41(7):1618-1623.
- [14] 张文婷,张春阳,黄伟,等. 湖南产颠茄草不同生长期8个成分的动态变化及不同部位分布特征[J]. 中草药,2016,47(22):4072-4075.
- [15] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan. Japanese Pharmacopoeia [M]. 17th edition. Tokyo: the Ministry of Health, Labor and Welfare, 2020:2973.
- [16] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia [M]. 10.0 edition. Strasbourg: European Directorate for Quality Medicines, 2019:1336.

[责任编辑 刘德文]