

附子理中丸 3 种剂型中 16 个活性成分日服用总量的比较

宋志前, 王淳, 甘嘉荷, 宁张弛, 马新玲, 梁东蕊, 万晓莹, 刘振丽*
(中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**对比服用附子理中丸大蜜丸、浓缩丸和片剂后 16 个活性成分的总量。**方法:**按文献所载工艺制备附子理中丸大蜜丸、片剂和浓缩丸。采用 RRLC-QqQ-MS 分析 16 个活性成分的含量,色谱条件为 Accucore RP-MS 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 15%~55% B; 3~9 min, 55% B; 9~12 min, 55%~80% B; 12~12.01 min, 80%~100% B; 12.01~13 min, 100% B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 30℃;质谱条件为电喷雾离子源,正、负离子切换模式检测,多反应监测模式(MRM)扫描。由于不同剂型中 16 个成分含量差异悬殊,因此通过归一化法处理,以综合评分比较每日服用 3 种剂型后 16 个活性成分的总量差异。**结果:**3 种剂型制备工艺中制附子均为原粉入药,因此 6 个生物碱成分含量无显著差异;大蜜丸中干姜、党参、炒白术和炙甘草也为原粉入药,而浓缩丸和片剂经过提取、浓缩等热处理过程,因此 10 个相应成分在大蜜丸中含量显著高于浓缩丸和片剂($P<0.01$);浓缩丸和片剂比较,干姜和白术渗漉时乙醇体积分数不同、党参和甘草提取溶剂种类不同等,显示 10 个成分也存在显著差异。当综合考虑制备工艺、处方和服用量时,则日服用大蜜丸、浓缩丸和片剂 16 个成分的总量分别为 18.764, 17.530, 5.676 mg,归一化处理后的综合评分分别为 0.605 4, 0.717 5 和 0.312 4,说明浓缩丸评分最高。**结论:**由于制备工艺、处方和服用量的不同,附子理中丸大蜜丸、浓缩丸和片剂日服用量中 16 个活性成分的总量明显不同。

[关键词] 附子理中丸; 大蜜丸; 片剂; 浓缩丸; 归一化算法; 日服用量; 制备工艺
[中图分类号] R22;R28;R94;O657.7;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)19-0017-08
[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190849
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190101.1122.012.html>
[网络出版时间] 2019-01-04 13:41

Comparison of Total Daily Doses of 16 Active Components in Three Dosage Forms of Fuzi Lizhongwan

SONG Zhi-qian, WANG Chun, GAN Jia-he, NING Zhang-chi, MA Xin-ling,
LIANG Dong-rui, WAN Xiao-ying, LIU Zhen-li*
(Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the total daily doses of 16 active components in big honeyed pills, concentrated pills and tablets of Fuzi Lizhongwan. **Method:** Three dosage forms of Fuzi Lizhongwan were prepared according to the process described in the literature. RRLC-QqQ-MS was employed to analyze the contents of 16 active ingredients with mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution-0.1% formic acid acetonitrile solution for gradient elution, the separation was performed on a Accucore RP-MS column (2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm) with a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹ and the column temperature at 30℃, the mass spectrometry condition was electrospray ion source, positive and negative ion switching mode for detection, multi-reaction monitoring mode (MRM) for scanning. The contents of 16 active ingredients were calculated, and the normalization arithmetic method was used for comparing the total daily doses of these active ingredients in three dosage forms of Fuzi Lizhongwan. **Result:**

[收稿日期] 20181030(004)
[基金项目] 中央级科研院所自主选题(YZ-1542)
[第一作者] 宋志前,副主任技师,从事中药药效物质基础及质量评价工作,E-mail:SZQ@qq.com
[通信作者] *刘振丽,博士,研究员,从事中药药效物质基础及质量评价工作,Tel:010-64089020,E-mail:zhenli_liu@sina.com

Processed products of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* were used as raw powder in preparation process of the three dosage forms, so there was no significant difference in the contents of six alkaloids in the three dosage forms, while the contents of other 10 active ingredients from *Zingiberis Rhizoma*, *Codonopsis Radix*, *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* were significantly higher in big honeyed pills than those in concentrated pills or tablets ($P < 0.01$), due to the differences in the extracting solvents (ethanol and water) and ethanol concentration, the contents of other 10 active ingredients between concentrated pills and tablets were also significant differences. The total daily doses of these 16 active components were 18.764, 17.530, 5.676 mg in big honeyed pills, concentrated pills and tablets, respectively. The concentrated pills exhibited the highest normalization arithmetic score of 0.717 5 compared with 0.605 4 and 0.312 4 separately in big honeyed pills and tablets, it was mainly owing to the maximum amount of raw material per day in concentrated pills. **Conclusion:** The total daily doses of 16 active ingredients in the three dosage forms of Fuzi Lizhongwan are significantly different caused by preparation process, prescription and dosage.

[**Key words**] Fuzi Lizhongwan; big honeyed pills; tablets; concentrated pills; normalization arithmetic method; daily dose; preparation process

中成药是中药的一种呈现形式,许多传统的经典方剂被开发成中成药以便于患者服用,在临床使用率很高。大蜜丸是经典方剂最常见的传统剂型,但存在服用量大、容易污染等问题,故很多这类药物经现代化剂型改造后,制成片剂、浓缩丸等现代剂型。因此,在历版《中国药典》收录的成方制剂中,存在很多同方不同剂型的情况,但这些药物的功能主治描述一致,且各剂型同时在临床中使用。

附子理中丸出自《太平惠民和剂局方》,由制附子、干姜、党参、炒白术和炙甘草组成,具有温中健脾的功效,是临床治疗脾胃虚寒、呕吐、脘腹冷痛最常用方剂之一。有研究采用 LC-MS 和 GC-MS 对附子理中丸大蜜丸中的化学成分组成及含量进行分析^[1-2]。附子理中丸传统剂型为大蜜丸、水蜜丸,经剂型改造后制成片剂、浓缩丸,其中前 3 种剂型收载于 2015 年版《中国药典》^[3],但目前 4 个剂型均在临床使用,描述功效一致。影响方剂整体疗效的因素很多,如物质基础、生理病理状态、辅料等,其中物质基础是决定因素。复方成分复杂,制备过程中受热提取、浓缩等影响可引起一些不稳定成分含量和结构的变化^[4-6]。附子理中丸大蜜丸、浓缩丸和片剂的制备工艺存在差异,提取工艺除制附子外,其余 4 味中药均不相同。与全部为原粉入药的大蜜丸比较,片剂和浓缩丸提取、浓缩和干燥等制备工艺可能会对其中的活性成分产生影响。值得注意的是,除了制备工艺之外,3 种剂型的处方和每日服用量也不相同。

药品服务于临床,成人每日服用成品中活性成分的总量是值得关注的问题。本实验按文献[1,7]

方法制备附子理中丸大蜜丸、片剂和浓缩丸 3 种剂型的成品。选取与附子理中丸功效相关的 16 个活性成分作为检测指标,包括制附子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、乌头碱和次乌头碱,党参中的腺苷,甘草中的甘草苷、甘草素、甘草酸、甘草次酸和异甘草素,干姜中的 6-姜辣素,炒白术中的白术内酯 I, II, III,采用 RRLC-QqQ-MS 建立了多成分同时定量的方法,研究制备工艺对同方不同剂型附子理中丸中活性成分的影响,对比这 3 种剂型成人每日服用量中 16 个活性成分的总量差异,为临床用药提供依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(包括 G1322A 型脱气机, G1311A 型四元泵, G1313A 型自动进样器, G1316A 型恒温箱)和 6410AQqQ 型质谱仪(美国 Agilent 公司), CP225D 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯公司), ZP5B 型旋转式压片机(上海天凡药机制造厂), YQD-1 型全自动制丸机(广州扬鹰医疗器械有限公司)。

饮片黑顺片(产地四川,批号 01103922)购于北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司;干姜(产地四川,批号 150821011),党参(产地山西,批号 151012008),炒白术(产地浙江,批号 131026001)和炙甘草(产地新疆,批号 130101012)均购于北京仟草中药饮片有限公司;各饮片均经北京中医药大学刘春生教授鉴定,黑顺片为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 的子根的加工品;干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎;党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* 的干燥根;炒白术为

菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* 的干燥根茎;甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎。蜂蜜(枣花蜂蜜,产地湖北武汉,批号 20151122)购于北京华润超市,腺苷、甘草苷、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱、甘草次酸和 6-姜辣素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110879-200202, 111610-201005, 110799-200404, 110720-200410, 110798-200404, 110723-200109 和 111833-201102, 纯度依次为 99.7%, 93.7%, 98%, 98%, 98%, 99.3%, 98.6%), 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、甘草素、异甘草素和甘草酸对照品(成都曼思特生物技术有限公司,批号分别为 MUST-14062208, MUST-14052315, MUST-14032209, MUST-14050922, MUST-11041605 和 MUST-14081812, 纯度依次为 98%, 98%, 98%, 99%, 98%, 98%);白术内酯 I, II, III 对照品(上海田源生物技术有限公司,批号分别为 130215, 130216 和 130216, 纯度均为 98%);水为超纯水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同剂型附子理中丸的制备 首先制备炼蜜。将蜂蜜放入锅中,持续加热,待温度达 116~118℃,呈现浅黄色有光泽的匀称小泡,呈鱼眼泡状,且用手捻之多有粘性,两手指张开时无长白丝出现,滴水不散时,即成炼蜜。

2.1.1 附子理中丸大蜜丸^[3] 按照处方比例,分别称取黑顺片 100 g,干姜 100 g,党参 200 g,白术 150 g 和甘草 100 g,粉碎,过五号筛,得到细粉,混匀,备用。与等量(650 g)炼蜜趁热混匀,得成品 1.294 kg,备用。

2.1.2 附子理中丸浓缩丸^[7] 按照处方比例,分别称取黑顺片 100 g,甘草 40 g,粉碎,过五号筛,得到细粉,备用;干姜 100 g,党参 200 g,白术 150 g,粉碎,过二号筛,得到粗粉,以 70% 乙醇 3.5 L 为溶剂,按照 2015 年版《中国药典》附录流浸膏剂与浸膏剂项下的渗漉法,浸渍 24 h 后进行渗漉,将渗漉液浓缩后得到浸膏,备用;取甘草饮片 60 g,分别加 10, 8, 8 倍量水煎煮,每次煎煮 2 h,合并煎液,滤过,将滤液水浴浓缩至稠膏状;将上述浸膏、甘草浸膏与黑顺片、甘草的细粉采用泛制法制丸,得成品 418 g,备用。

2.1.3 附子理中丸片剂^[3] 按处方比例,分别称取黑顺片 100 g,粉碎过五号筛,得细粉,备用;取党

参 200 g 和甘草 100 g,加 8 倍量水煎煮 2 次,每次 2 h,合并煎液,滤过,滤液水浴浓缩成稠膏;取干姜 100 g 和白术 150 g,粉碎,过二号筛,得粗粉,加 60% 乙醇 3 L 进行渗漉,收集渗漉液,减压回收乙醇,水浴浓缩成稠膏,与上述细粉和稠膏混匀,干燥,粉碎成细粉,制成颗粒,加入 1% 硬脂酸镁作为润滑剂,采用压片机制成附子理中片,片约重 0.35 g,得 1 491 片,备用。

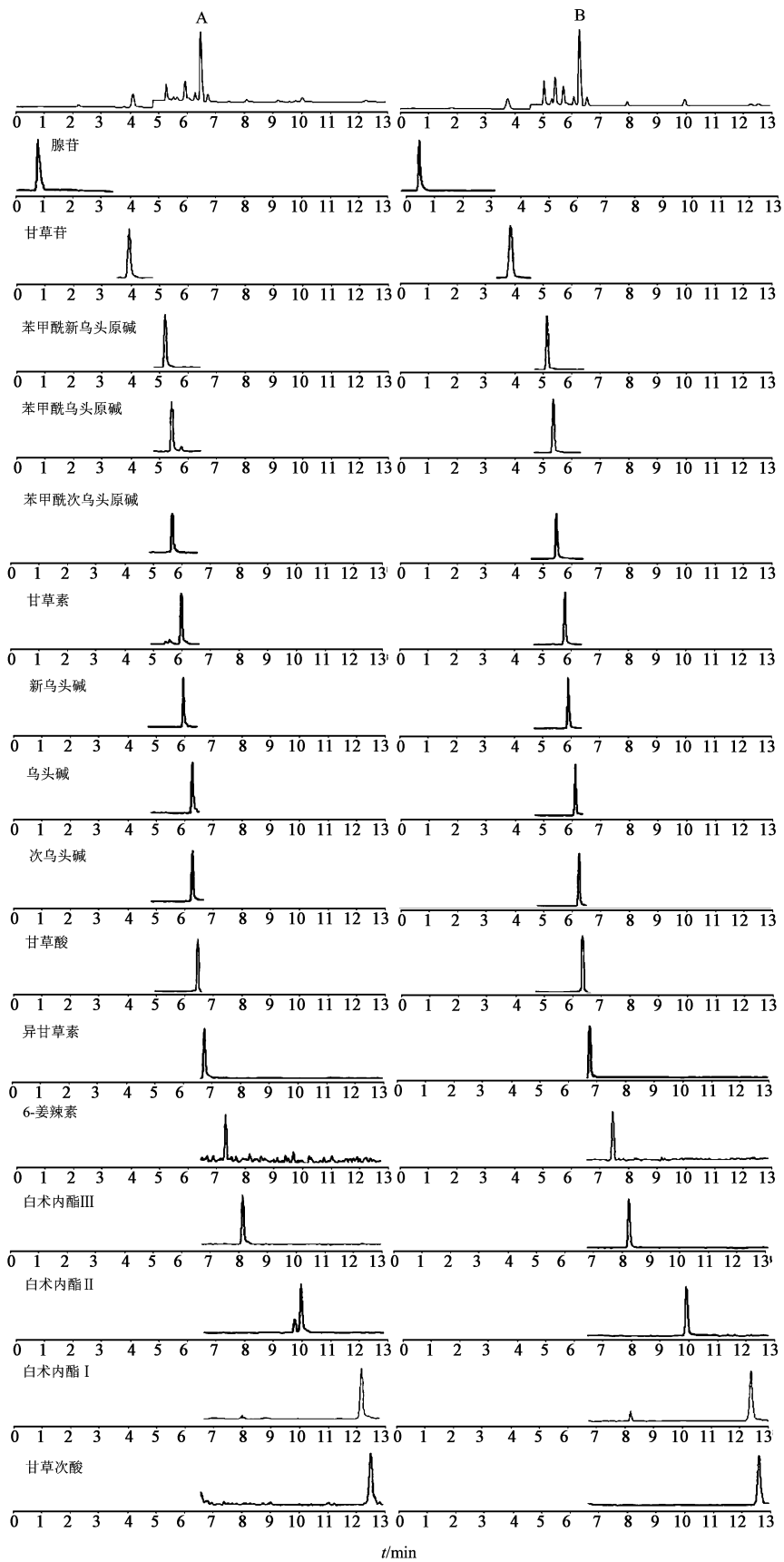
2.2 RRLC-QqQ-MS 分析条件

2.2.1 色谱条件 Accucore RP-MS 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 15%~55% B; 3~9 min, 55% B; 9~12 min, 55%~80% B; 12~12.01 min, 80%~100% B; 12.01~13 min, 100% B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 30℃。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),毛细管电压 4 kV,雾化气压力 310 kPa,干燥气温度 300℃,干燥气流速 11 L·min⁻¹。采集模式为多反应监测模式(MRM),正、负离子切换扫描方式,各化合物的 MRM 参数见表 1。RRLC-QqQ-MS 图谱见图 1。

表 1 附子理中丸中 16 个活性成分的 MRM 参数
Table 1 MRM parameters of 16 active components in Fuzi Lizhongwan

成分	离子模式	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碎裂电压/V	碰撞能量/eV	<i>t_R</i> /min
腺苷	正	268.1	136.0	80	50	0.831
甘草苷	负	417.0	255.2	100	10	4.087
苯甲酰新乌头原碱	正	590.3	105.0	160	45	5.283
苯甲酰乌头原碱	正	604.3	105.0	95	50	5.541
苯甲酰次乌头原碱	正	574.3	542.3	115	40	5.665
甘草素	正	257.1	137.0	105	20	5.994
新乌头碱	正	632.2	572.3	100	45	6.052
乌头碱	正	646.3	586.3	105	45	6.287
次乌头碱	正	616.3	556.3	115	40	6.292
甘草酸	正	823.5	453.4	160	10	6.468
异甘草素	正	257.1	137.0	105	20	6.735
6-姜辣素	正	317.2	217.3	145	16	7.542
白术内酯Ⅲ	正	249.2	231.1	55	12	8.107
白术内酯Ⅱ	正	233.2	151.1	95	10	10.047
白术内酯Ⅰ	正	231.1	185.0	85	16	12.014
甘草次酸	正	471.4	317.2	45	20	12.372



A. 供试品; B. 混合对照品

图 1 附子理中丸大蜜丸中 16 个成分的 RRLC-QqQ-MS

Fig. 1 RRLC-QqQ-MS chromatograms of 16 components in big honeyed pills of Fuzi Lizhongwan

2.3 对照品溶液的制备 分别取腺苷,甘草苷,苯甲酰新乌头原碱,苯甲酰乌头原碱,苯甲酰次乌头原碱,甘草素,新乌头碱,乌头碱,次乌头碱,甘草酸,异甘草素,6-姜辣素,白术内酯Ⅲ,白术内酯Ⅱ,白术内酯Ⅰ,甘草次酸的对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成质量浓度为 120.0,1 008.0,92.4,53.0,64.8,68.0,204.0,5.9,18.5,130.0,161.0,149.0,102.0,149.0,136.0,52.0 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。分别精密吸取上述 16 个对照品溶液适量,混合,加甲醇制成质量浓度依次为 0.060 0,5.040 0,0.462,0.088 4,0.324 0,0.680 0,0.029 1,0.006 6,0.092 4,13.028 0,0.115 0,5.952 0,0.408 0,0.496,0.340 0,0.130 0 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,于4℃冰箱储存备用。

2.4 供试品溶液的制备 取附子理中丸大蜜丸适

量,剪碎;分别取浓缩丸或片剂适量,研细。分别取大蜜丸约 0.2 g,浓缩丸粉末约 0.05 g,片剂粉末约 0.05 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,25℃以下超声处理 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取 **2.3** 项下混合对照品溶液适量,分别按 1,10,20,30,40,50 倍稀释成系列质量浓度的混合对照品溶液,按 **2.2** 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,得各成分回归方程和线性范围。将对照品质量浓度不断稀释,当信噪比(S/N)分别为 3,10 时,得检测限(LOD)和定量限(LOQ)。见表 2。

表 2 附子理中丸中 16 种活性成分的线性关系考察

Table 2 Investigation of linear relationship of 16 active components in Fuzi Lizhongwan

成分	标准曲线	<i>r</i>	线性范围/μg·L ⁻¹	LOD/μg·L ⁻¹	LOQ/μg·L ⁻¹
腺苷	<i>Y</i> = 3 997.6 <i>X</i> + 6.104 9	0.999 8	1.200 ~ 60.00	0.145	0.483
甘草苷	<i>Y</i> = 845.15 <i>X</i> + 16.684	0.999 8	100.8 ~ 5 040	0.785	2.615
苯甲酰新乌头原碱	<i>Y</i> = 19 238 <i>X</i> + 56.656	0.999 8	9.240 ~ 462.0	0.128	0.427
苯甲酰乌头原碱	<i>Y</i> = 24 844 <i>X</i> + 17.108	0.999 8	1.768 ~ 88.40	0.082	0.274
苯甲酰次乌头原碱	<i>Y</i> = 24 181 <i>X</i> + 68.046	0.999 8	6.480 ~ 324.0	0.018	0.058
甘草素	<i>Y</i> = 9 009.3 <i>X</i> + 189.09	0.999 8	13.60 ~ 680.0	0.814	2.713
新乌头碱	<i>Y</i> = 12 767 <i>X</i> + 2.703 5	0.999 9	0.582 4 ~ 29.12	0.035	0.115
乌头碱	<i>Y</i> = 19 072 <i>X</i> + 0.894 6	0.999 9	0.132 9 ~ 6.646	0.007	0.024
次乌头碱	<i>Y</i> = 22 114 <i>X</i> + 10.135	0.999 8	1.848 ~ 92.40	0.022	0.072
甘草酸	<i>Y</i> = 2 047.9 <i>X</i> + 1 118.8	0.999 8	260.56 ~ 13 028	0.372	1.238
异甘草素	<i>Y</i> = 30 198 <i>X</i> + 64.962	0.999 8	2.300 ~ 115.0	0.105	0.350
6-姜辣素	<i>Y</i> = 5.544 3 <i>X</i> + 2.660 5	0.999 7	119.04 ~ 5 952	8.349	27.830
白术内酯Ⅲ	<i>Y</i> = 2 813.0 <i>X</i> + 19.492	0.999 8	8.160 ~ 408.0	0.435	1.450
白术内酯Ⅱ	<i>Y</i> = 3 922.7 <i>X</i> + 9.700 9	0.999 8	9.920 ~ 496.0	0.388	1.292
白术内酯Ⅰ	<i>Y</i> = 2 041.5 <i>X</i> + 6.922 7	0.999 9	6.800 ~ 340.0	0.425	1.417
甘草次酸	<i>Y</i> = 5 718.0 <i>X</i> - 1.575 7	0.999 9	2.600 ~ 130.0	0.135	0.452

2.5.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液适量,按 **2.2** 项下条件连续进样 6 次,结果腺苷,甘草苷,苯甲酰新乌头原碱,苯甲酰乌头原碱,苯甲酰次乌头原碱,甘草素,新乌头碱,乌头碱,次乌头碱,甘草酸,异甘草素,6-姜辣素,白术内酯Ⅲ,白术内酯Ⅱ,白术内酯Ⅰ,甘草次酸峰面积的 RSD 分别为 2.4%,2.5%,2.1%,3.0%,2.2%,2.4%,2.7%,2.9%,2.6%,2.8%,2.2%,2.9%,2.2%,2.7%,2.0%,2.8%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取附子理中丸大蜜丸约 0.2 g,共 6 份,精密称定,按 **2.4** 项下方法制备供试

品溶液,按 **2.2** 项下条件测定,计算腺苷,甘草苷,苯甲酰新乌头原碱,苯甲酰乌头原碱,苯甲酰次乌头原碱,甘草素,新乌头碱,乌头碱,次乌头碱,甘草酸,异甘草素,6-姜辣素,白术内酯Ⅲ,白术内酯Ⅱ,白术内酯Ⅰ,甘草次酸的平均质量分数(以生药量计)分别为 1.747,2 557,62.48,7.675,6.467,127.9,3.592,2.387,28.15,4 785,20.52,641.8,212.6,42.21,245.3,2.258 μg·g⁻¹,RSD 分别为 3.7%,1.8%,3.2%,4.0%,3.3%,1.4%,3.3%,3.5%,2.7%,2.2%,4.4%,0.3%,3.0%,3.2%,4.8%,1.2%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 取附子理中丸大蜜丸约 0.2 g,精密称定,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,在制备后 0,2,4,6,8,10,12,24 h 按 2.2 项下条件测定,结果腺苷,甘草苷,苯甲酰新乌头原碱,苯甲酰乌头原碱,苯甲酰次乌头原碱,甘草素,新乌头碱,乌头碱,次乌头碱,甘草酸,异甘草素,6-姜辣素,白术内酯Ⅲ,白术内酯Ⅱ,白术内酯Ⅰ,甘草次酸峰面积的 RSD 分别为 3.1%,3.3%,3.1%,3.8%,3.4%,3.1%,4.0%,3.7%,3.2%,3.0%,3.1%,4.4%,3.8%,2.6%,3.6%,3.8%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.5 加样回收率试验 取附子理中丸大蜜丸约 0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,共 9 份,等分为 3 组,分别精密加入低、中、高 3 个质量浓度的腺苷,甘草苷,苯甲酰新乌头原碱,苯甲酰乌头原碱,苯甲酰次乌头原碱,甘草素,新乌头碱,乌头碱,次乌头碱,甘草酸,异甘草素,6-姜辣素,白术内酯Ⅲ,白术内酯Ⅱ,白术内酯Ⅰ,甘草次酸对照品溶液(对照品加入量与样品中待测定成分质量之比分别为 0.5:1,1:1 和 1.5:1),每个质量浓度平行 3 份,按 2.4 项下方法制备样品溶液,按 2.2 项下条件测定,计算回收率。结果腺苷,甘草苷,苯甲酰新乌头原碱,苯甲酰乌头原碱,苯甲酰次乌头原碱,甘草素,新乌头碱,乌头碱,次乌头碱,甘草酸,异甘草素,6-姜辣素,白术内酯Ⅲ,白术内酯Ⅱ,白术内酯Ⅰ,甘草次酸的平均加样回收率分别为 93.18%,97.46%,98.12%,96.91%,100.54%,94.59%,92.51%,93.62%,97.34%,100.69%,92.66%,92.28%,90.77%,97.60%,99.66%,97.28%,RSD 分别为 5.3%,4.3%,4.1%,4.2%,3.9%,4.4%,4.7%,4.4%,3.6%,4.0%,2.8%,3.4%,3.4%,1.2%,4.0%,3.3%。

2.6 样品测定及成分总量对比 分别取附子理中丸大蜜丸、浓缩丸和片剂供试品,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.2 项下条件测定。为直观比较制备工艺对成分的影响,故以生药量为单位表示各成分含量,见表 3。参照各剂型使用说明书,按成人每日服用量计(按最大量计算),大蜜丸为每日 3 次,1 次 1 丸,每丸 9 g,则每天服用成品量为 27 g。浓缩丸为每日 3 次,1 次 12 丸,每 8 丸 3 g,则每天服用成品量为 13.5 g。片剂为每日 3 次,每次 8 片,每片 0.35 g,则每天服用成品量为 8.4 g。再根据各成分在不同剂型中的含量,可计算出成人每日服用量中各个成分的量,见表 4。但由于 16 个成分含量相

差上百倍,如果直接计算总和,则含量低的成分在总量中所占比例非常小,其影响力可能被含量高的成分掩盖,从而使得最终结论可能有失偏颇。因此,按各成分等权重将 16 个成分的含量进行归一化处理^[8],计算综合评分(M),以 M 为评价指标,对上述 3 种剂型成品每日服用量中 16 个活性成分的总量进行对比,见表 4。

$$M = \frac{A}{16 \times \sqrt{\sum_{i=1}^3 A_i^2}} + \frac{B}{16 \times \sqrt{\sum_{i=1}^3 B_i^2}} + \frac{C}{16 \times \sqrt{\sum_{i=1}^3 C_i^2}} + \frac{D}{16 \times \sqrt{\sum_{i=1}^3 D_i^2}} + \cdots + \frac{P}{16 \times \sqrt{\sum_{i=1}^3 P_i^2}}$$

式中 $A, B, C, D \cdots \cdots P$ 分别为附子理中丸 3 个剂型每日服用量中腺苷、甘草苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱等 16 个活性成分的质量, i 表示剂型数量。

3 讨论

3.1 待测成分的选择 2015 年版《中国药典》在附子理中丸大蜜丸和片剂含量测定项下,分别限定了甘草苷和甘草酸的最低含量标准。制附子为附子理中丸的君药,其多种生物碱成分既为有效成分,也是有毒成分^[9],因此,有必要建立这些成分的含量测定方法。本文选取测定的 16 种成分,均具有一定的药理活性。附子中的 3 种双酯型生物碱和 3 种单酯型生物碱可以通过改善腹腔巨噬细胞 Ia 的表达而发挥强心作用,并可增强免疫系统功能^[10],也是 2015 年版《中国药典》中制附子项下规定的含量测定指标成分^[4]。甘草中的黄酮类和三萜类成分具有广泛的药理活性,如抗炎^[11]、降糖^[12]等,甘草素、甘草苷、甘草酸、异甘草素和甘草次酸是其质量控制的主要标记物。白术中的白术内酯类成分具有抗炎、抗氧化和调节胃肠功能的作用^[13-14],白术内酯Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ是其主要成分。党参中的腺苷和干姜中的 6-姜辣素具有抗氧化和抗炎等作用^[15-16],亦是方中的重要活性成分。本实验建立了 16 个活性成分的含量测定方法,为更全面地分析附子理中丸大蜜丸、浓缩丸和片剂的质量提供了有效途径。

3.2 RRLC-QqQ-MS 的条件优化^[17-18] 预试验对比了甲醇-水和乙腈-水 2 种流动相系统,并考察添加体积分数为 0.05%,0.1%,0.2% 的甲酸或乙酸对分离效果的影响。结果发现乙腈的噪音低于甲醇。当流动相中甲酸体积分数为 0.1% 时,待分析成分离子化程度最高,故选择了 0.1% 甲酸乙腈溶液和 0.1% 甲酸水溶液作为流动相。正、负 2 种

表 3 附子理中丸 3 种剂型成品中 16 个化学成分的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Contents of 16 components in three dosage forms of Fuzi Lizhongwan($\bar{x} \pm s, n = 3$)				$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
成分	大蜜丸	浓缩丸	片剂	
腺苷	1.751 ± 0.048 3	1.454 ± 0.039 5 ¹⁾	1.100 ± 0.029 8 ^{1,2)}	
甘草苷	2.542 ± 44.94	1.826 ± 22.83 ¹⁾	817.7 ± 12.17 ^{1,2)}	
苯甲酰新乌头原碱	61.52 ± 0.777 5	61.79 ± 1.440	62.80 ± 1.741	
苯甲酰乌头原碱	7.669 ± 0.212 8	7.733 ± 0.163 0	7.916 ± 0.176 0	
苯甲酰次乌头原碱	6.542 ± 0.155 5	6.440 ± 0.135 4	6.574 ± 0.140 6	
甘草素	128.4 ± 4.116	78.94 ± 1.695 ¹⁾	30.11 ± 0.624 9 ^{1,2)}	
新乌头碱	3.569 ± 0.115 0	3.489 ± 0.076 0	3.706 ± 0.112 5	
乌头碱	2.350 ± 0.061 1	2.413 ± 0.071 2	2.405 ± 0.063 7	
次乌头碱	28.04 ± 0.713 6	27.99 ± 0.685 6	27.97 ± 0.616 5	
甘草酸	4.799 ± 51.40	2.523 ± 26.94 ¹⁾	1.737 ± 20.61 ^{1,2)}	
异甘草素	20.41 ± 0.331 5	20.01 ± 0.546 8	11.93 ± 0.263 9 ^{1,2)}	
6-姜辣素	640.9 ± 19.54	416.8 ± 7.646 ¹⁾	297.5 ± 6.584 ^{1,2)}	
白术内酯Ⅲ	210.7 ± 4.127	121.8 ± 2.823 ¹⁾	134.7 ± 3.214 ^{1,2)}	
白术内酯Ⅱ	42.18 ± 0.698 5	27.59 ± 0.560 7 ¹⁾	29.88 ± 0.805 2 ^{1,2)}	
白术内酯Ⅰ	244.8 ± 6.036	149.9 ± 4.068 ¹⁾	180.4 ± 3.835 ^{1,2)}	
甘草次酸	2.263 ± 0.048 4	1.272 ± 0.026 3 ¹⁾	1.140 ± 0.033 7 ^{1,2)}	

注:与大蜜丸相比¹⁾ $P < 0.01$;与浓缩丸相比²⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 成人每日服用附子理中丸 3 种剂型后 16 个活性成分总量的对比

Table 4 Comparison of total daily doses of 16 active components in three dosage forms of Fuzi Lizhongwan						
成分	日服用量/ μg			综合评分/分		
	大蜜丸	浓缩丸	片剂	大蜜丸	浓缩丸	片剂
腺苷	7.31	9.39	3.54	0.036 8	0.047 3	0.017 8
甘草苷	5 304.02	5 897.37	1 316.22	0.041 2	0.045 8	0.010 2
苯甲酰新乌头原碱	128.36	199.56	101.09	0.031 1	0.048 4	0.024 5
苯甲酰乌头原碱	16.00	24.98	12.74	0.031 0	0.048 4	0.024 7
苯甲酰次乌头原碱	13.65	20.80	10.58	0.031 6	0.048 1	0.024 5
甘草素	267.91	254.95	48.47	0.044 9	0.042 7	0.008 1
新乌头碱	7.45	11.27	5.97	0.031 5	0.047 7	0.025 3
乌头碱	4.90	7.79	3.87	0.030 7	0.048 8	0.024 2
次乌头碱	58.51	90.40	45.02	0.031 3	0.048 4	0.024 1
甘草酸	10 013.37	8 148.44	2 795.98	0.047 4	0.038 6	0.013 2
异甘草素	42.59	64.63	19.20	0.033 4	0.050 7	0.015 0
6-姜辣素	1 337.27	1 346.12	478.87	0.042 7	0.043 0	0.015 3
白术内酯Ⅲ	659.46	590.06	325.23	0.043 7	0.039 1	0.021 6
白术内酯Ⅱ	132.02	133.66	72.14	0.041 0	0.041 5	0.022 4
白术内酯Ⅰ	766.18	726.19	435.57	0.041 9	0.039 7	0.023 8
甘草次酸	4.72	4.11	1.84	0.045 2	0.039 4	0.017 6

扫描模式对比显示,甘草苷在负离子模式、其余 15 种成在正离子模式下响应最好,因此采取正、负离子切换扫描模式。实验中对所有成分的 MRM 条件进行了优化。通过对照品溶液确定了检测成分的母离子和子离子,并优化了这 2 种离子的碎裂电压和碰撞电能。供试品溶液制备方法考察了提取方式(回流、超声),提取溶剂(甲醇,70% 甲醇和 50% 甲醇),溶剂用量(25,50,75 mL)和提取时间(0.5,1.0,1.5 h),确定了最佳的供试品溶液制备方法。

3.3 制备工艺对成分含量的影响和每日服用成品中成分含量的对比分析 3 种剂型中制附子均为原粉直接入药,因此 3 种剂型中制附子的 6 个生物碱含量(以生药量计)无显著差异,见表 3。由于大蜜丸各药味均为原粉入药,而浓缩丸和片剂经过提取、浓缩等热处理过程,因此,干姜、党参、炒白术和炙甘草中的 10 个成分,除异甘草素在大蜜丸与浓缩丸

1.5 h),确定了最佳的供试品溶液制备方法。

3.3 制备工艺对成分含量的影响和每日服用成品中成分含量的对比分析 3 种剂型中制附子均为原粉直接入药,因此 3 种剂型中制附子的 6 个生物碱含量(以生药量计)无显著差异,见表 3。由于大蜜丸各药味均为原粉入药,而浓缩丸和片剂经过提取、浓缩等热处理过程,因此,干姜、党参、炒白术和炙甘草中的 10 个成分,除异甘草素在大蜜丸与浓缩丸

之间无显著差异,其他成分在大蜜丸中的含量均显著高于浓缩丸和片剂($P < 0.01$)。浓缩丸和片剂比较,干姜和白术均采用渗滤提取,但浓缩丸采用的乙醇体积分数为 70%,而片剂则选择了 60% 乙醇,后续成型工艺也存在差异,这也使得浓缩丸中 6-姜辣素含量显著高于片剂($P < 0.01$),但片剂中 3 个白术内酯类成分的含量却显著高于浓缩丸($P < 0.01$);党参在浓缩丸中采用乙醇提取,而在片剂中采用水提取,显示腺苷在浓缩丸中的含量显著高于片剂($P < 0.01$);甘草在浓缩丸中部分采用水提取、部分原粉入药,而在片剂中则全部采用水提取,故浓缩丸中甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草酸和甘草次酸的含量都显著高于片剂($P < 0.01$)。结果提示不同提取溶剂和乙醇体积分数能引起 3 种剂型活性成分含量显著差异。遇光遇热不稳定的成分,在制备工艺复杂的浓缩丸和片剂中,容易受到影响而显著降低。说明提取溶剂种类、溶剂浓度以及温度等均能引起 3 种剂型中活性成分含量的差异。

由 3 个剂型成人每日服用量中各成分的质量可知,以来自甘草的成分甘草苷和甘草酸为最高,源于甘草中这 2 个成分的含量较高。大蜜丸、浓缩丸和片剂日服用成品中 16 个成分的总量分别为 18.764,17.530,5.676 mg,归一化处理后综合评分值分别为 0.605 4,0.717 5 和 0.312 4,显示浓缩丸评分最高。除了制备工艺的影响之外,还与各剂型处方和服用量不同密切相关。经计算,成人每日服用成品以原料制附子计,大蜜丸、浓缩丸和片剂分别为 2.1,3.2,1.6 g,显示浓缩丸的生药量最高。因此,在进行同方不同剂型对比时,除了制备工艺的影响,处方和服用量也是应该纳入考察的因素,同时成人每日服用成品中活性成分的含量也可作为有价值的考察指标。本研究重点关注了同方不同剂型的中成药因制备工艺、处方和服用量不同所引起的成分含量差异,但中成药的质量同样受到原料、厂家生产设备等的影响,并且体外成分并不能说明体内吸收情况,吸收入血的成分才可能是发挥治疗作用的成分,后续还需进行更深入的研究,以确定同方不同剂型的作用特点。

[参考文献]

[1] LIU H, JUAN S U, YANG X, et al. A novel approach to characterize chemical consistency of traditional Chinese medicine Fuzi Lizhong pills by GC-MS and RRLC-Q-TOFMS[J]. Chin J Nat Med, 2011, 9(4): 267-273.
[2] 任培培, 孙国祥, 孙丽娜. 附子理中丸多波长融合 HPLC 指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2009, 29

(3): 411-415.
[3] 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, 2015: 1013-1015.
[4] 匡青芬, 侯大斌, 孙鸿, 等. 煎煮时间对附子水煎液总生物碱和 6 种酯型生物碱含量的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(8): 1707-1710.
[5] Hikino H, Hikino Y, Yosioka I. Studies on the constituents of atractylodes. IX. Structure and autoxidation of atractylon [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1964, 12: 755-760.
[6] 郝延军, 桑育黎, 李宝林, 等. 苍术酮的常温稳定性研究[J]. 中成药, 2007, 29(6): 895-896.
[7] 卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准中药成方制剂. 第 7 册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 21-22.
[8] 董运苗, 王淳, 宋志前, 等. 黑顺片中 6 种酯型生物碱提取方法对比研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1495-1502.
[9] GUO N, YANG D, Ablajan K, et al. Simultaneous quantitation of seven alkaloids in processed Fuzi decoction by rapid resolution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2013, 36(12): 1953-1958.
[10] 马健, 陆平成, 牧野充弘, 等. 乌头碱对小鼠腹腔巨噬细胞 Ia 抗原表达影响的研究[J]. 中国药理学通报, 1997, 13(4): 55-58.
[11] Gaur R, Kumar S, Trivedi P, et al. Liquiritigenin derivatives and their hepatoprotective activity[J]. Nat Prod Commun, 2010, 5(8): 1243-1246.
[12] Gaur R, Yadav K S, Verma R K, et al. *In vivo* anti-diabetic activity of derivatives of isoliquiritigenin and liquiritigenin [J]. Phytomedicine, 2014, 21 (4): 415-422.
[13] Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of an atractylodes lancea rhizome extract and a volatile component β -eudesmol on gastrointestinal motility in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1): 530-536.
[14] LI X, LIN J, HAN W, et al. Antioxidant ability and mechanism of rhizoma *Atractylodes macrocephala* [J]. Molecules, 2012, 17(11): 13457-13472.
[15] Nile S H, Park S W. Chromatographic analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory activities of ginger extracts and its reference compounds[J]. Ind Crop Prod, 2015, 70: 238-244.
[16] Hitoglou S, Hatzistilianou M, Gougoustamou D, et al. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [J]. Clin Rheumatol, 2001, 20(6): 411-416.
[17] 甘嘉荷, 王淳, 宋志前, 等. 炼蜜用量对附子理中丸中 9 种生物碱类成分药代动力学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 90-96.
[18] 宋志前, 甘嘉荷, 董运苗, 等. 附子理中丸中制附子的 6 种生物碱成分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 55-60.

[责任编辑 刘德文]