

小金丸中制草乌单酯型生物碱类成分的含量测定

任桂林¹, 韩丽^{1*}, 王小平^{1,2}, 梅明¹, 何婧¹, 唐宜轩¹, 张定堃¹, 杨明^{1,3}

(1. 成都中医药大学 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 成都 611137;

2. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000;

3. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:通过比较不同厂家及批号小金丸中单酯型生物碱类成分的含量,为该制剂的临床用药安全提供参考。方法:建立小金丸中制草乌单酯型生物碱类成分(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HPLC含量测定方法,流动相乙腈-20 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠(用三乙胺调节pH 6.5)(47:53),检测波长235 nm。比较4个厂家生产的8批样品中3种生物碱类成分含量。结果:3种生物碱类成分线性范围均为4~60 mg·L⁻¹,加样回收率分别为98.42%,101.79%,102.13%。3种单酯型生物碱总质量分数最高达214.718 μg·g⁻¹,最低值18.452 μg·g⁻¹。结论:不同厂家和同一厂家不同批次样品中3种生物碱的含量存在较大差异,可能与原材料质量、制剂工艺及生产设备等因素有关。

[关键词] 制草乌; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 小金丸

[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0123-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210123

Determination of Monoester-alkaloids from Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta in Xiaojin Wan

REN Gui-lin¹, HAN Li^{1*}, WANG Xiao-ping^{1,2}, MEI Ming¹, HE Jing¹,

[收稿日期] 20140221(012)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81274098)

[第一作者] 任桂林,硕士,从事中药新技术、新工艺研究,Tel:18010618161,E-mail:1007866178@qq.com

[通讯作者] *韩丽,教授,硕士生导师,从事中药新制剂、新技术、新剂型研究,Tel:028-61800127,E-mail:hanliyx@163.com

含钩藤碱含量相差不大。

钩藤叶入药在《广西本草选集》中有记载:用钩藤全株5钱~1两,水煎服,可治疗感冒风热,高烧抽搐,高血压,头晕,头痛,目眩;用全株1斤水煎代茶饮,可解断肠草中毒^[10]。有些地区用钩藤叶与蛇莓等捣烂敷于患处治疗关节痛。说明钩藤叶入药古来有之,钩藤叶作为药用部位入药将成为钩藤用药趋势。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:240.

[2] 莫志贤,许丹丹. 钩藤临床运用的新进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(5):684.

[3] 霍青,赵婧,李运伦,等. 钩藤临床应用研究概况[J]. 山东中医药杂志,2010,29(6):426.

[4] 汪冰. 新药资源钩藤叶的基础研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2006.

[5] 张峻,杨成金,吴大刚,等. 钩藤的化学成分研究[J]. 中草药,1998,29(10):649.

[6] 叶齐,齐荔红. 钩藤的主要成分及生物活性研究进展[J]. 西北药学杂志,2012,27(5):508.

[7] 林晓亮. 毛钩藤叶的药学鉴定及药理学研究[D]. 广州:南方医科大学,2007.

[8] 胡岚岚,汤建林. HPLC-ELSD测定中药钩藤中钩藤碱的含量[J]. 重庆医学,2013,42(10):1089.

[9] 杨秀娟,洪燕龙,吴飞,等. HPLC测定钩藤中和异钩藤碱的方法学探讨[J]. 中国中药杂志,2013,38(5):720.

[10] 广西壮族自治区革命委员会卫生局. 广西本草选编. 上册[M]. 桂林:广西人民出版社,1974:886.

[责任编辑 刘德文]

TANG Yi-xuan¹, ZHANG Ding-kun¹, YANG Ming^{1,3}

(1. State Key Laboratory Breeding Base of Research and Utilization of Traditional Chinese Medicine (TCM) Resources System, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Jiangxi College of TCM, Fuzhou 344000, China; 3. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Objective: To compare monoester-alkaloids content of different batches of Xiaojin Wan from different manufacturers and provide a reference for clinical drug safety of this preparation. **Method:** Determination of monoester-alkaloids from *Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta* in Xiaojin Wan was established, including benzoylmesaconine, benzoylaconine and benzoylhypacoitine; mobile phase was consisted of acetonitrile-20 mmol·L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate (adjusted pH to 6.5 with triethylamine) (47:53), detection wavelength was set at 235 nm. The content of these three components in 8 batches of Xiaojin Wan from four manufacturers was compared. **Result:** Linear ranges of these three components were 4-60 mg·L⁻¹, recoveries were 98.42%, 101.79% and 102.13%, respectively. Total content of these three components was up to 214.718 μg·g⁻¹ with the lowest value of 18.452 μg·g⁻¹. **Conclusion:** There is a big difference among 3 kinds of monoester-alkaloids from different manufacturers and different batches of the same manufacturer, which may be related to quality of raw materials, preparation process, production equipment and other factors.

[Key words] *Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta*; benzoylmesaconine; benzoylaconine; benzoylhypacoitine; Xiaojin Wan

小金丸为清代王洪绪《外科证治全生集》收录的经典名方,由麝香、制草乌、木鳖子、枫香脂、地龙、五灵脂、乳香、没药、当归、京墨共 10 味药组成^[1],功效散结消肿、化痰止痛,主要用于治疗痰气凝滞所致的瘰疬、癭瘤、乳岩、乳癖等证,是目前临床治疗乳腺疾病的首选中成药^[2]。制草乌辛、苦、热,有毒,祛风除湿、温经止痛,常用于治疗风寒湿痹,关节疼痛,心腹冷痛,寒疝作痛等,其主要成分——生物碱类具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、强心等作用^[3],在小金丸中与其他药味配伍用于治疗乳腺疾病。目前,小金丸的生产厂家众多,但存在一些不良反应^[4],主要是由于药物粉体性质的差异导致实际生产工艺中药物混合不均匀,致使药物含量不均匀而引起的。为了更好地控制该制剂中有毒成分的含量,保证药物含量的均匀度,有必要对小金丸中有毒药物制草乌进行含量均一度测定,可选择制草乌中单酯型生物碱类成分为检测指标。2010 年版《中国药典》仅对小金丸中乌头碱的限量进行检查,并未检测其含量。本实验拟采用 HPLC 测定不同厂家及同一厂家不同批次小金丸中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱的含量,建立该制剂中制草乌单酯型生物碱类成分含量测定的检测方法,并完善小金丸的质量标准,为该药物的质量控制提供参考。

1 材料

LC-10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津), YF-103 型高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司), FST-III-10 型精密超纯水机(上海富诗特), AB265-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), AR2140 型 1/万电子天平(奥豪斯国际贸易有限公司)。

十二烷基硫酸钠(天津市福晨化学试剂厂), 苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110720-200410, 110798-200404, 110799-200404), 乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。制草乌饮片购自四川科伦天然药物有限公司,批号 130301,经成都中医药大学标本中心卢先明教授鉴定为毛茛科植物草乌 *Aconitum kusnezoffii* 的炮制品,选取 4 个生产厂家的小金丸,各随机选择 1~3 个批次的样品,共 8 批,见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Wondasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠(用三乙胺调节 pH 6.5) (47:53), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 235 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.2 试液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,加甲

表1 小金丸样品信息情况

No.	生产企业	批号	规格
1	九寨沟天然药业集团有限责任公司	121001	每100丸重3g
2	吉林省银诺克药业有限公司	20120302	每100丸重6g
3	吉林省银诺克药业有限公司	20120701	每100丸重6g
4	吉林省银诺克药业有限公司	20111201	每100丸重6g
5	西安自力中药集团有限公司	20121001	每10丸重6g
6	西安自力中药集团有限公司	20121003	每10丸重6g
7	西安自力中药集团有限公司	20120704	每10丸重6g
8	成都九芝堂金鼎药业有限公司	121001	每100丸重3g

醇制成每1 mL含苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱均为0.1 mg的混合对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 取小金丸样品,研碎,过四号筛,精密称取约3 g,置具塞锥形瓶中,加入氨试液4.5 mL,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液50 mL,称定质量,超声处理(300 W, 40 kHz, <25 ℃)30 min,放冷,加上述混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液40 mL,于<40 ℃减压回收溶剂至干,残渣加乙醚溶解,滤过,减压回收溶剂至干,残渣精密加入混合溶液2 mL使溶解,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 称取处方量除制草乌外的其他药材,按小金丸的制备工艺制成阴性对照样品,按2.2.2项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线的绘制 精密量取混合对照品溶液1,3,6,9,12,15 mL,分别置于25 mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按2.1项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱与苯甲酰次乌头原碱的回归方程分别为 $Y = 1\ 198.3X + 330.68$ ($R^2 = 0.999\ 6$), $Y = 1\ 004.7X + 333.24$ ($R^2 = 0.999\ 3$), $Y = 1\ 259.2X + 288.7$ ($R^2 = 0.999\ 6$),线性范围均为4~60 mg·L⁻¹。

2.3.2 精密度试验 精密吸取2.2.1项下对照品溶液10 μL,按2.1项下色谱条件重复进样5次,计算苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱与苯甲酰次乌头原碱峰面积的RSD分别为0.79%,0.64%,0.98%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一批号小金丸供试品溶液,室温密闭放置,分别于制备后0,4,8,16,24 h按2.1项下色谱条件测定,计算苯甲酰新乌头原碱、苯

甲酰乌头原碱与苯甲酰次乌头原碱含量的RSD分别为2.15%,2.43%,1.95%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.4 重复性试验 取小金丸样品(批号20120302)5份,按2.2.2项下方法平行制备5份供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,计算苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱与苯甲酰次乌头原碱质量分数分别为5.686,25.762,14.096 μg·g⁻¹,RSD分别为2.64%,1.98%,1.87%,表明本方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取6份已知含量的小金丸粉末,每份1.5 g,各加入一定量的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱对照品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,结果见表2。

2.4 样品测定 取不同批号的小金丸样品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,计算各样品中单酯型生物碱含量,结果见表3。

3 讨论

2010年版《中国药典》收载的小金丸^[5]仅对制草乌中乌头碱进行限量检查,未对有效部位生物碱类成分进行含量限定。在查阅文献资料基础上^[6],本文建立了小金丸中制草乌所含3种单酯型生物碱的HPLC含量测定方法,并对8批样品进行含量测定,结果表明3种单酯型生物碱总质量分数最高达214.718 μg·g⁻¹,最低值18.452 μg·g⁻¹。按2010年版《中国药典》规定的制草乌中单酯型生物碱总量折算,小金丸中单酯型生物碱总质量分数23.5~82.08 μg·g⁻¹,8批样品中只有2批(九寨沟121001,银诺克20120302)在以饮片含量限度换算的范围内,1批(九芝堂121001)低于换算的含量限度范围,其余5批均超过含量限度范围。在小金丸处方中,制草乌既是有效成分也是有毒成分,制草乌中单酯型生物碱的含量对小金丸产品质量会产生很大的影响,含量不达标造成治疗效果减弱,含量超标可能会造成中毒等不良反应。

原材料、生产工艺参数、生产设备性能等因素均可造成产品质量存在差异。同一厂家不同批次小金丸样品中制草乌单酯型生物碱的含量具有明显差异,说明在原材料、生产设备及工艺参数一致的情况下,制剂是否混合均匀是影响小金丸质量的主要问题。在现行标准中,还未规定小金丸中原材料的含量测定项,同时对产品中原材料的品质优劣状况缺乏科学的评价方法,对生产工艺中制剂混合不均缺

表 2 小金丸中指标成分含量测定的加样回收率试验

被测成分	称样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
苯甲酰新乌头原碱	1.503	8.557 8	9	17.368 9	97.90	98.42	2.44
	1.520	9.326 6	9	18.065 4	97.10		
	1.512	8.906 4	9	17.584 3	96.42		
	1.507	8.551 9	9	17.379 3	98.08		
	1.518	8.780 9	9	17.589 2	97.87		
	1.509	8.614 9	9	17.898 4	103.15		
苯甲酰乌头原碱	1.503	39.157 9	40	80.925 4	104.42	101.79	2.27
	1.520	37.554 7	40	78.927 8	103.43		
	1.512	38.739 5	40	78.452 0	99.28		
	1.507	38.520 5	40	79.543 2	102.56		
	1.518	39.598 8	40	79.057 3	98.65		
	1.509	39.569 9	40	80.537 9	102.42		
苯甲酰次乌头原碱	1.503	20.944 1	20	41.360 8	102.08	102.13	2.32
	1.520	22.384 5	20	42.095 6	98.56		
	1.512	21.855 0	20	42.270 5	102.08		
	1.507	20.812 0	20	41.479 2	103.34		
	1.518	22.860 2	20	43.064 9	101.02		
	1.509	22.233 8	20	43.369 4	105.68		

表 3 不同厂家、不同批号的

小金丸样品含量测定 ($n=3$)

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

生产企业	批号	苯甲酰	苯甲酰	苯甲酰	单酯型
		新乌头 原碱	乌头 原碱	次乌头 原碱	生物碱 总量
九寨沟	121001	-	41.077	16.742	57.820
银诺克	20120302	5.694	25.915	13.926	45.535
银诺克	20120701	14.255	-	123.122	137.377
银诺克	20111201	5.415	100.980	108.324	214.718
西安自力	20121001	-	64.226	53.662	117.888
西安自力	20121003	3.441	14.309	73.685	91.435
西安自力	20120704	11.689	-	112.848	124.537
九芝堂	121001	-	-	18.452	18.452

注：“-”表示未检出。

[参考文献]

- [1] 罗忠萍,周玉霞.小金丸的临床应用研究进展[J].中国实用医药,2009,4(32):227.
- [2] 张征,张佳丽.小金丸及小金胶囊致 45 例不良反应分析[J].中国药物警戒,2012,9(4):242.
- [3] 图雅,张贵君,刘志强,等.蒙药草乌的研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(7):1581.
- [4] 李滔,管涛,胡欣,等.小金丸不良反应报告 19 例分析[J].药物不良反应杂志,2005,7(3):223.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:506.
- [6] 张智圆,沈志滨,季宇彬.HPLC 同时测定制草乌中三种生物碱质量比[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2010,26(1):2.

[责任编辑 刘德文]

乏有力的解决措施,因此,建立小金丸中原材料的有效成分含量测定方法具有重要指导意义。