

制川乌炮制过程中生物碱类成分的时量变化关系

涂瑶生^{1,2}, 全智慧^{1*}, 孙冬梅², 张建军², 赵自明²

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广东省中医研究所, 广州 510095)

[摘要] 目的: 建立川乌炮制过程中生物碱类成分的时间含量变化关系方程。方法: 采用加压蒸制法制备制川乌样品, 通过 HPLC 测定各样品中 6 种生物碱类成分的含量, 并对其含量-时间变化趋势进行曲线拟合, 推算最佳炮制时间。结果: 川乌在 111 °C (0.05 MPa) 下炮制 15 ~ 150 min, 制川乌中单酯型生物碱类成分时量变化关系曲线拟合回归方程为 $C = 0.273 + 0.236 \times \ln t$ ($R^2 = 0.753, F = 48.818, P < 0.01$), 双酯型生物碱类成分则为 $C = 0.115 \times t^{-0.005}$ ($R^2 = 0.850, F = 90.660, P < 0.01$)。结论: 建立的方法为快速炮制川乌及预测川乌炮制时间提供了有力的理论支撑。

[关键词] 制川乌; 炮制工艺; 方程; 客观性评价

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0025-05

Changes in Relationship between Alkaloids Content and Time in Processing Process of Aconiti Radix Cocta

TU Yao-sheng^{1,2}, QUAN Zhi-hui^{1*}, SUN Dong-mei², ZHANG Jian-jun², ZHAO Zi-ming²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Guangdong Provincial Institute Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** To establish variation relationship equation between alkaloids content and time in processing process of Aconiti Radix. **Method:** Aconiti Radix Cocta samples were prepared by pressurized steaming method, the content of six kinds of alkaloids in each sample was determined by HPLC, and optimum processing time was estimated by curve fitting of their content-time trend. **Result:** After Aconiti Radix was processed 15-150 min at 111 °C (0.05 MPa), fitting regression equation of variation relationship curve between diester alkaloids

[收稿日期] 20120925(003)

[基金项目] 广东省中医药局科研课题(20121241)

[第一作者] 涂瑶生, 博士, 研究员, 从事中药制剂研究, Tel: 020-83501292, E-mail: tuyaos@21cn.com

[通讯作者] *全智慧, 博士, 从事中药制剂研究, Tel: 020-83501292, E-mail: sophie1985@126.com

固体分散体后溶出度均有所改善, 以 PVPK30 为载体时所得固体分散体的溶出度和溶出速度提高显著。

[参考文献]

- [1] 臧志和, 曹雨萍, 钟玲. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报, 2007, 26(7): 758.
- [2] 赵宇新. 芦丁分解速度与加热温度的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 101.
- [3] 钟玲, 臧志和, 吴敏, 等. 芦丁在不同介质中平衡溶解度的测定[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 874.

- [4] 何燕, 聂金媛, 徐孟文, 等. 落新妇苷固体分散体的制备及理化鉴别[J]. 中成药, 2010, 32(10): 1695.
- [5] 陈戈, 陈鹰, 史琼枝, 等. 固体分散载体技术改善多西他赛的体外溶出特性[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(14): 1186.
- [6] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 12.
- [7] 黄智龙, 李玲, 何宇新. 小叶杜鹃总黄酮固体分散体制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 18.

[责任编辑 仝燕]

content in *Aconiti Radix Cocta* with processing time was $C = 0.273 + 0.236 \times \ln t$ ($R^2 = 0.753$, $F = 48.818$, $P < 0.01$), monoester alkaloids was $C = 0.115 \times t^{-0.005}$ ($R^2 = 0.850$, $F = 90.660$, $P < 0.01$)。 **Conclusion:** This established method provided a theoretical support about fast processing *Aconiti Radix* and estimating processing time of *Aconiti Radix*.

[**Key words**] *Aconiti Radix Cocta*; processing technology; equation; objective evaluation

川乌主产于四川、陕西、湖北等地,以四川为道地产区,6月下旬至8月上旬采挖,除去子根、须根及泥沙,晒干。其性味辛、苦、热,有大毒,归心、肝、脾经,具有祛风除湿、温经止痛的功效,用于治疗风寒湿痹、关节疼痛、心腹冷痛等症^[1]。

川乌毒性很大,应用前必须要经过严格的炮制加工。虽然相关的炮制规范较多,但制川乌在临床发生的中毒现象还是特别频繁^[2],究其原因,发现其毒性成分的治疗窗比较窄^[3]。2010年版《中国药典》对制川乌中生物碱的含量进行限量要求,但炮制工艺仍采用煮沸4~6h,或蒸6~8h,至口尝微有麻舌感为度^[1]的传统经验法,因此有必要对其炮制工艺进行进一步的规范,为制川乌饮片的生产提供科学依据。本实验通过考察111℃(0.05MPa)条件下不同炮制时间点川乌中生物碱含量的变化,建立时量变化关系曲线的拟合方程,为阐明制川乌炮制过程中主要化学成分的变化规律提供实验依据。

1 材料

e2695型高效液相色谱仪(美国沃特世科技有限公司),XS205型电子分析天平(德国梅特勒-托利多国际贸易有限公司),MILLI PORE Advantage A10型自动纯水机(美国密理博公司),LDZX-40AI型立式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),DHG9203A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),DZF-6210型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),DMF-6B型手提式高速中药粉碎机(浙江温岭市铭大药材机械设备有限公司)。

苯甲酰新乌头原碱(简称I)、苯甲酰次乌头原碱(简称II)、苯甲酰乌头原碱(简称III)对照品(均购自成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为B-009-110316, B-016-110316, B-010-110316),新乌头碱(简称IV)、次乌头碱(简称V)、乌头碱(简称VI)对照品(均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为799-9403, 798-9202, 110720-200410),乙腈、四氢呋喃为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

川乌药材由广东一方制药有限公司提供,产地

四川绵阳,经广东省中医研究所孙冬梅主任中药师鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根。

2 方法与结果

2.1 乌头碱类含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相[乙腈-四氢呋喃(25:15)](A)-[0.1 mol·L⁻¹乙酸铵溶液(每1L加冰乙酸0.5 mL)](B)梯度洗脱(0~35 min, 15%~26% A; 35~45 min, 26%~35% A; 45~58 min, 35% A; 58~65 min, 35%~15% A),流速0.8 mL·min⁻¹,检测波长235 nm,柱温25℃。

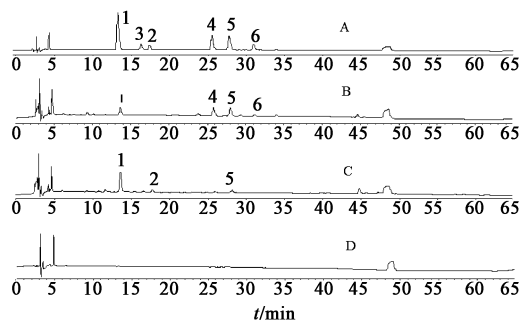
2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取I, II, III, IV, V, VI对照品适量,依次加异丙醇-三氯甲烷(1:1,下同)混合溶液配置成质量浓度分别1.256, 0.530, 0.538, 1.52, 1.52, 0.55 g·L⁻¹的对照品溶液;依次精密移取I, II, III, IV, V, VI对照品浓溶液2.5, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0 mL,置于10 mL量瓶中,加异丙醇-三氯甲烷混合溶液稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取川乌样品粉末(过三号筛)约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氨试液3 mL,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1,下同)混合溶液50 mL,称定质量,超声处理(300 W, 40 kHz, 25℃)30 min,放冷,再称定质量,用异丙醇-乙酸乙酯混合溶液补足减失的质量,摇匀,滤过。精密量取续滤液25 mL,40℃以下减压回收溶剂至干,残渣精密加入异丙醇-三氯甲烷混合溶液5 mL溶解,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 精密吸取混合对照品溶液1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 μL进样,记录峰面积,以峰面积对进样量做回归分析,得标准曲线分别为 $Y_I = 2 \times 10^6 X + 0.466$ ($R^2 = 0.9999$), $Y_{II} = 10^6 X - 555.6$ ($R^2 = 0.9996$), $Y_{III} = 2 \times 10^6 X + 8076$ ($R^2 = 0.9999$), $Y_{IV} = 1707X - 21008$ ($R^2 = 0.9999$), $Y_V = 1574X + 2872$ ($R^2 = 0.99997$), $Y_{VI} = 1741X + 0.342$ ($R^2 = 0.99996$),线性范围分别为314.0~2198.0, 53.8~376.6, 53.0~371.0, 152.0~

1 064.0, 152.0 ~ 1 064.0, 55.0 ~ 385.0 ng。

2.1.5 样品测定 取按 2.1.3 项下供试品溶液,照 2.1.1 项下色谱条件进行分析,见图 1,计算各指标成分含量。



A. 对照品; B. 生川乌; C. 0.05 MPa 蒸制 30 min;

D. 阴性; 1. 苯甲酰新乌头原碱; 2. 苯甲酰次乌头原碱;

3. 苯甲酰乌头原碱; 4. 新乌头碱; 5. 次乌头碱; 6. 乌头碱

图 1 川乌及其他炮制品 HPLC

2.2 川乌炮制成分的变化关系

2.2.1 制川乌样品的制备 将川乌药材按大小分档,按比例分配并随机分组,每组取样(100 ± 10)g,平行 3 次。先用 40 °C 温水浸泡 1 d,至内无干心,取出,于 111 °C (0.05 MPa) 分别蒸制 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 min 后取出,晾至六成干,切片,60 °C 烘干,即得。

2.2.2 川乌蒸制过程成分变化趋势分析 按 2.1.1 项下方法测定 2.2.1 项下各样品中 6 种生物碱成分的含量,将 I, II, III (简称此 3 种成分为单酯型生物碱类成分) 含量进行合并,另将 IV, V, VI (简称此 3 种成分为双酯型生物碱类成分) 含量进行合并,绘制两类成分的时间-含量关系图,见图 2。

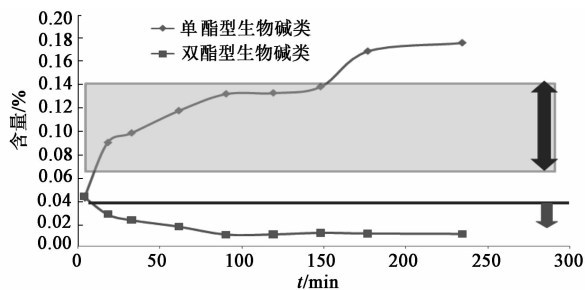


图 2 川乌在 111 °C (0.05 MPa) 下蒸制后生物碱类成分的含量变化

2010 年版《中国药典》规定,川乌中双酯型生物碱类成分的总量应为 0.05% ~ 0.17%,制川乌中单酯型生物碱类成分的总量应为 0.070% ~ 0.15%,双酯型生物碱类成分的总量不 > 0.04% [1]。此批生川乌中双酯型生物碱类成分质量分数 0.052%,符合相关规定。浸泡充分后单酯型生物碱类成分质量

分数变为 0.043%,双酯型生物碱类成分质量分数 0.045%。由图 2 可知,于 111 °C (0.05 MPa) 下蒸制川乌时,双酯型生物碱类成分在蒸制开始时于高温高压下相关化学成分含量变化较大,15 min 时已达相关要求,之后随时间呈逐渐下降趋势,于 90 min 开始进入稳定期,15 ~ 240 min 其含量一直符合规定;单酯型生物碱类成分在蒸制开始时于高温高压下含量变化较大,15 min 时已达相关要求,15 ~ 90 min 呈上升趋势,90 ~ 150 min 进入稳定期,之后又开始上升,15 ~ 150 min 其含量符合规定。综合考虑两类成分的变化趋势,确定在 111 °C (0.05 MPa) 下蒸制川乌时,最佳蒸制时间范围 15 ~ 150 min。

制川乌减毒增效的主要环节为双酯型生物碱成分转化为毒性较小的单酯型生物碱类成分,炮制后毒性会降低为原来的 1/200 [4]。乌头碱类成分的水解动力学符合一级反应方程,升高反应温度均能加速其水解过程 [5]。由图 2 可知,15 min 内生物碱类成分含量变化较大,因为川乌在高温高压下瞬间发生剧烈反应,15 min 后双酯型生物碱类成分较少,随之双酯型生物碱成分转化为单酯型生物碱成分的反应也趋于缓和。

2.2.3 制川乌生物碱类成分时量关系

2.2.3.1 数据分析 以时间为横坐标,两类生物碱成分含量为纵坐标,对川乌两类成分在炮制中的时量关系曲线进行拟合。分别采用直线、对数、倒数、二次方程、三次方程、复合曲线、幂指数、S 型曲线、等比曲线、指数曲线和 Logistic 共 11 种曲线模型进行估计,根据决定系数 (R^2)、聚类结果、回归系数及方程最简单原则等进行曲线选择;采用 linear 或 nonlinear 程序,对回归系数进行重新计算,线性回归进行 F 检验及 t 检验,非线性回归方程采用 F 检验和 95% 可信区间进行假设检验,方程均保留常数项,采用 SPSS 15.0 进行统计。

2.2.3.2 单酯型生物碱 按 2.2.3.1 项下方法对数据进行分析,见表 1。

由表 1 可知,炮制后制川乌中单酯型生物碱类成分时量变化关系以二次、三次、对数、幂指数曲线的 R^2 较大,且经系统聚类归为一类(图 3),上述曲线均可作为首选回归模型。但由于三次、二次曲线回归方程回归参数较多,且回归系数较小 (≤ 0.001),经 t 检验无显著性差异 ($P > 0.05$),故不予考虑;对数曲线的 R^2 , F 及系数 1 的 t 值均 > 幂指数曲线相应的统计值,故最后选择以对数曲线进行曲线拟合,确定回归方程为 $C = 0.273 + 0.236 \times \ln t$

表 1 0.05 MPa(111 °C) 炮制后制川乌中单酯型生物碱类成分时量变化关系曲线拟合估计与参数

方程	模型汇总		常数项		系数 1		系数 2		系数 3	
	R ²	F	系数	t	系数	t	系数	t	系数	t
直线	0.697	36.820 ²⁾	0.939	16.383 ²⁾	3.822 × 10 ⁻³	6.068 ²⁾				
对数曲线	0.753	48.818 ²⁾	0.273	1.942 ³⁾	0.236	6.987 ²⁾				
倒数曲线	0.662	31.304 ²⁾	1.436	29.977 ²⁾	-8.427	-5.595 ²⁾				
二次曲线	0.765	24.375 ²⁾	0.803	9.570 ²⁾	8.967 × 10 ⁻³	3.526 ²⁾	-3.165 × 10 ⁻⁵	-2.076 ³⁾		
三次曲线	0.765	15.196 ²⁾	0.786	5.238 ²⁾	0.010	1.216 ³⁾	-4.818 × 10 ⁻⁵	-0.413 ³⁾	6.630 × 10 ⁻⁸	0.143 ³⁾
复合	0.666	31.922 ²⁾	0.943	18.981 ²⁾	0.010	1727.907 ²⁾				
幂指数	0.733	43.855 ²⁾	0.529	7.818 ²⁾	2.035 × 10 ⁻³	6.622 ²⁾				
S 型曲线	0.651	29.905 ²⁾	0.050	116.854 ²⁾	-0.073	-5.469 ²⁾				
等比曲线	0.666	31.922 ²⁾	0.045	86.285 ²⁾	3.270 × 10 ⁻⁵	5.650 ²⁾				
指数曲线	0.666	31.922 ²⁾	0.943	18.981 ²⁾	3.270 × 10 ⁻⁵	5.650 ²⁾				
Logistic	0.666	31.922 ²⁾	1.061 × 10 ⁻⁴	18.981 ²⁾	9.967 × 10 ⁻³	1727.907 ²⁾				

注: ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01, ³⁾剔除项(表 2 同)。

(R² = 0.753, F = 48.818, P < 0.01), 常数项无显著性差异, 但为保证方程的精密度, 保留常数项。时量散点图见图 4。

2.2.3.3 双酯型生物碱类 按 2.2.3.1 项下方法对数据进行分析, 见表 2。

由表 2 可知, 111 °C (0.05 MPa) 炮制后制川乌中双酯型生物碱类成分时-量变化关系采用 11 种曲线模型进行拟合, 其中以二次、三次、对数、幂指数、倒数曲线的 R² 较大, 经系统聚类法归为一类(图 5), 可作为首选回归模型。由于二次、三次曲线的回归方程回归参数较多, 且系数及 t 值较小, 故不予考虑; 其他几个曲线中幂指数曲线的 R², F, 系数 1

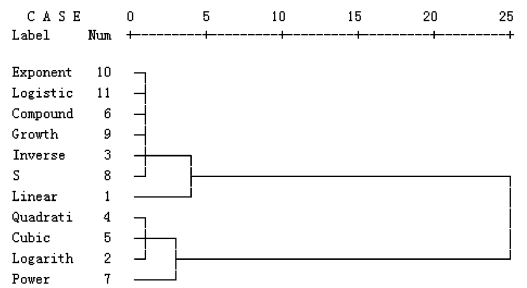


图 3 单酯型生物碱类成分 11 种回归方程 R² 系统聚类分析

中 t 值的绝对值均最大, 故选择以幂指数进行曲线拟合。得回归方程为 C = 0.115 × t^{-0.005} (R² =

表 2 0.05 MPa(111 °C) 炮制后制川乌中双酯型生物碱类成分时量变化关系曲线拟合估计与参数

方程	模型汇总		常数项		系数 1		系数 2		系数 3	
	R ²	F	系数	t	系数	t	系数	t	系数	t
直线	0.698	37.062 ²⁾	0.283	13.603 ²⁾	-1.390 × 10 ⁻³	-6.088 ²⁾				
对数曲线	0.849	89.777 ²⁾	0.547	13.678 ²⁾	-0.091	-9.475 ²⁾				
倒数曲线	0.832	79.440 ²⁾	0.093	7.616 ²⁾	3.435	8.913 ²⁾				
二次曲线	0.890	60.795 ²⁾	0.366	17.584 ²⁾	-4.539 × 10 ⁻³	-7.187 ²⁾	1.937 × 10 ⁻⁵	5.117 ²⁾		
三次曲线	0.698	37.849 ²⁾	0.369	9.901 ²⁾	-4.700 × 10 ⁻³	-2.281 ¹⁾	2.178 × 10 ⁻⁵	0.752 ³⁾	-9.667 × 10 ⁻⁹	-0.084 ³⁾
复合	0.735	44.301 ²⁾	0.287	9.642 ²⁾	0.010	877.756 ²⁾				
幂指数	0.850	90.660 ²⁾	1.151	4.726 ²⁾	-4.840 × 10 ⁻³	-9.522 ²⁾				
S 型曲线	0.783	57.575 ²⁾	0.023	31.628 ²⁾	0.177	7.588 ²⁾				
等比曲线	0.735	44.301 ²⁾	0.034	32.368 ²⁾	-8.000 × 10 ⁻⁵	-6.656 ²⁾				
指数曲线	0.735	44.301 ²⁾	0.287	9.642 ²⁾	-8.000 × 10 ⁻⁵	-6.656 ²⁾				
Logistic	0.735	44.301 ²⁾	3.484 × 10 ⁻⁴	9.642 ²⁾	0.010	877.756 ²⁾				

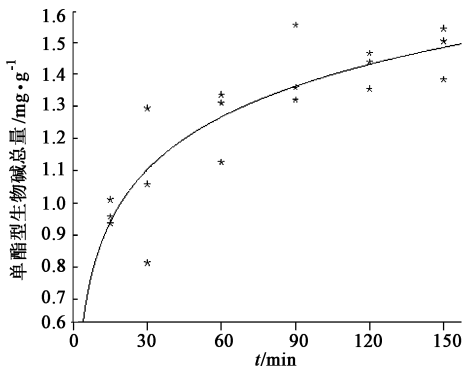


图4 单酯型生物碱类成分时间-含量变化散点

0.850, $F = 90.660$, $P < 0.01$), 常数项具有显著性差异; 系数1具有显著性差异。生物碱时量散点图见图6。

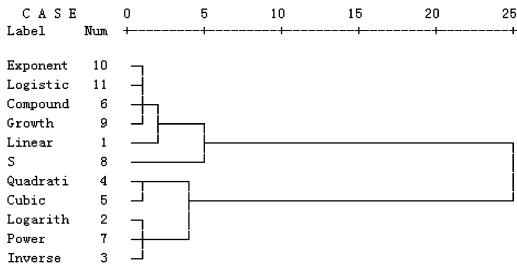


图5 双酯型生物碱类成分11种回归方程

R^2 系统聚类分析

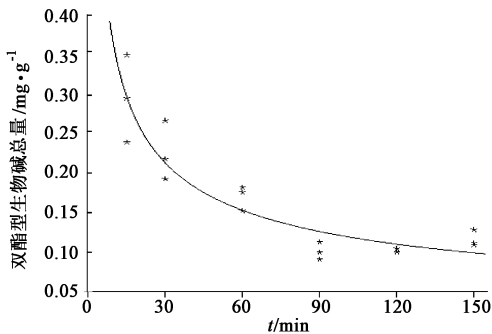


图6 双酯型生物碱类成分时量变化散点

3 讨论

历代医家分别采取水漂、火制、蒸煮及辅料去毒等不同方法对川乌进行炮制,据文献记载约有70余

种炮制方法^[6],但目前仍以水煮、蒸制等为主,少数应用高压蒸制或微波炮制等^[7-8]。与煮制相比,蒸制时,可根据需求对温度(压力)进行控制,不受限于100℃,在高温(高压)炮制下时间明显缩短,同时节省了人力物力。

目前,已有考察川乌炮制过程中成分含量变化的研究,但尚不全面,且深度有待加强^[9]。鉴于川乌在111℃时含量变化较稳定,且在炮制15~150min时生物碱含量符合《中国药典》2010年版规定的范围,故选择这个区间,对两组成分建立相应的曲线拟合回归方程。同时结合生川乌含量测定结果,以回归方程推算炮制时间,避免了最后根据人口尝的传统经验法进行炮制终点的主观性判断,为制川乌的标准化、规范化生产及质量评价提供实验依据。

[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,2010:36.
- [2] 曹小玉,彭成. 1990年以来川乌研究文献的定量分析[J]. 时珍国医国药,2005,16(3):189.
- [3] 侯家玉,方泰惠. 中药药理学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:114.
- [4] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:293.
- [5] 张毅,翁代群,王海军,等. 乌头碱的水解动力学研究[J]. 中草药,2009,40(S1):120.
- [6] 邢跃文. 川乌炮制和毒性的关系[J]. 中国民间疗法,2004,12(3):43.
- [7] 邓广海,林华. 川乌高压蒸制工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):21.
- [8] 区炳雄,龚又明,林华,等. 川乌微波炮制工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):39.
- [9] 周庆华,李秋红,曲丽莉,等. 何首乌炮制动力学方程建立的研究[J]. 中医学报,2005,33(3):7.

[责任编辑 全燕]