

附子中生物碱含量与在胆巴液中浸泡时间变化规律的研究

周林^{1,2}, 李飞^{1*}, 任玉珍², 杜杰², 陈彦琳², 梁焕², 白宗利², 张晓莉³

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国药材公司中药质量控制技术
国家工程实验室, 北京 100195; 3. 四川江油中坝附子科技发展有限公司, 四川 江油 621700)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法检测在胆巴溶液中浸泡不同时间的附子中 6 种生物碱的含量, 分析附子中生物碱成分随浸泡时间的变化规律。方法: 采用 Waters sunfire C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 235 nm, 流动相乙腈-四氢呋喃 (25:15) 和 0.1 mol · L⁻¹ 醋酸铵溶液 (每 1 000 mL 加冰醋酸 0.5 mL), 梯度洗脱。结果: 泥附子洗净后在胆巴溶液中浸泡, 新乌头碱、次乌头碱、乌头碱和苯甲酰新乌头原碱的含量逐渐降低, 浸泡 20 d 后, 成分变化趋于平缓。浸泡 20 d 样品与生品比较, 其降低率分别为 60.39%, 73.84%, 72.57% 和 88.46%。结论: 泥附子洗净后在胆巴溶液中浸泡, 能达到防止腐烂的目的, 浸泡 20 d 以后胆附子质量稳定, 同时双酯型和单酯型生物碱总量均流失 70% 左右, 为保证临床用药的安全和有效, 有必要改进泥附子产地加工方法。

[关键词] 附子; 胆巴溶液; 新乌头碱; 次乌头碱; 乌头碱; 苯甲酰新乌头原碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0044-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100044

Study on Amount Variation of Alkaloids Components with Marinated Time in Aconiti Lateralis Radix Praeparata

ZHOU Lin^{1,2}, LI Fei^{1*}, REN Yu-zhen², DU Jie², CHEN Yan-lin²,

[收稿日期] 20130507(016)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201107008)

[第一作者] 周林, 学士, 执业药师, 从事中药炮制研究工作, Tel: 010-61252955, E-mail: zhoulin415@163.com

[通讯作者] * 李飞, 硕士研究生导师, 教授, 从事中药炮制研究工作, Tel: 010-84738616, E-mail: lf668@sina.com

3 讨论

本文采用响应面法优化栀子苷的吸附条件, 确定最大吸附量 247 mg · g⁻¹。热力学和动力学研究表明 SP825 型大孔树脂的吸附过程为自发放热反应, 在一定温度范围内降温有利于吸附, 吸附动力学过程符合拟二级方程, 线性相关性较好 $R^2 > 0.99$, 能真实地反映栀子苷在大孔树脂上的吸附过程, 吸附控速步骤为液膜扩散过程, 试验结果对优化栀子苷的分离纯化工艺有一定指导作用。

[参考文献]

[1] Montgomery D C. Design and analysis of experiments [M]. 6th International edition. New York: John Wiley and Sons, 2005: 22.
[2] 魏瑞霞, 陈金龙, 陈连龙, 等. 2-噻吩乙酸在 3 种树脂上的吸附行为研究[J]. 高分子学报, 2004, 8(4): 471.

[3] 陈国华. 应用物理化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 120.
[4] 秦丽红, 张凤宝, 张国亮. NTS 在大孔吸附树脂上的吸附动力学及机理 [J]. 化学工业与工程, 2007, 24(3): 245.
[5] Metwally E. Kinetic studies for sorption of some metal ions from aqueous acid solutions onto TDA impregnated resin [J]. J Radioanal Nucl Chem, 2006, 270(3): 559.
[6] 郭卓, 袁悦. 介孔碳 CMK-3 对苯酚的吸附动力学和热力学研究 [J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(2): 289.
[7] 李海燕, 汪东风, Siaka D, 等. 球状壳聚糖树脂对茶多酚的吸附热力学和动力学研究 [J]. 茶叶科学, 2009, 29(4): 313.
[8] 王秀芳, 田勇, 钟国英, 等. 氯霉素在活性炭上的吸附平衡与动力学 [J]. 高校化学工程学报, 2010, 24(1): 162.

[责任编辑 刘德文]

LIANG Huan², BAI Zong-li², ZHANG Xiao-li³

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. China National Corp. of Traditional and Herbal Medicine & National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Medical Sciences, Beijing 100195, China;

3. Sichuan Jiangyou Zhongba T&S Development Co. Ltd of Aconite Lateralis Praeparata, Jiangyou 621700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the variations of different soaking marinated time on the alkaloids in aconite root, and the content of 6 alkaloids in different soaking marinated time samples of aconite root was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). **Method:** The content of alkaloids in aconite root was determined by HPLC with Waters Sunfire C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-tetrahydrofuran (25:15) and 0.1 mol · L⁻¹ ammonium acetate solution (adding glacial acetic acid 0.5 mL into 1 000 mL solution) with the flow rate was 0.8 mL · min⁻¹. Detection wavelength was set at 235 nm. Column temperature was fixed at 30 °C. **Result:** The content of mesaconitine, hypaconitine, aconitine and benzoylmesaconine in mud aconite decreased gradually when it was soaking in the Danba solution. After 20 days, compared with it before processing, the content of four compounds in processed aconite fell by 60.39%, 73.84%, 72.57% and 88.46% respectively. **Conclusion:** It can prevent mud aconite decaying when it was soaking in Danba solution. After 20 days, the quality of processed aconite was stable, and both of the content of diester-type alkaloids and monoester-type alkaloids fell by about 70%. In order to ensure the clinical medication safety and effectively, it is necessary to improve the processing method of mud aconite.

[Key words] aconite; Danba solution; mesaconitine, hypaconitine; aconitine; benzoylmesaconine

附子^[1]于6月下旬至8月上旬采挖,除去母根、须根及泥沙,习称“泥附子”。因附子在夏至季节采收后极易腐烂,须进行产地加工以防止腐烂^[2]。张山雷在《本草正义》^[3]中说“此物善腐”,《四川省彰明县概况》^[4]中记载“售腌须速,过夜吐水,即就腐烂”。附子产地加工的方法最早出现在宋代《本草图经》^[5],采用酿醋腌制附子防腐;到明末时期用盐腌制防腐,最早见于明代《景岳全书》^[6]中“土人腌以重盐”、“腌者大咸”;此方法盛行于清代,如《本草害利》^[7]、《本草从新》^[8]、《外科证治全生集》^[9]、《本经逢原》^[10]等中均有记载;民国时期至今则演变为胆巴腌制防腐。现行药典制备附子饮片时均有“泥附子洗净,浸入食用胆巴的水溶液中数日^[11]”的加工程序。有研究表明,附子在胆巴溶液中浸泡,其胆巴含量(以氯化钙计)随浸泡时间的变化规律符合指数函数,在20天后达到25%~30%^[11],而生物碱类成分随浸泡时间的变化情况尚无文献报道。我们以《中国药典》^[1]2010年版附子项下含量测定方法,检测置于胆巴溶液浸泡不同时间的附子样品中双酯型生物碱和单酯型生物碱类成分含量,分析生物碱在胆巴溶液中的变化规律,为客观评价及改进附子产地加工方法提供科学依据。

1 材料

2695-2998型HPLC〔沃特世科技(上海)有限公司〕,DENVER型1/10万电子分析天平(北京赛多利斯仪器系列有限公司),KQ-251DA型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈、四氢呋喃为色谱纯(Fisher公司),异丙醇、乙酸乙酯、冰醋酸、醋酸铵、三氯甲烷为分析纯(北京化学试剂公司)。

各对照品购于中国食品药品检定研究院,乌头碱(批号110720-200410)、次乌头碱(批号110798-200404)、新乌头碱(批号110799-200404)、苯甲酰次乌头原碱(批号111796-200901)、苯甲酰乌头原碱(批号111794-200901)、苯甲酰新乌头原碱(批号111795-200901)。

附子药材购于四川江油中坝附子科技发展有限公司,经中国食品药品检定研究院张继研究员鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根。

附子在胆巴溶液中浸泡后习称“胆附子”,泥附子净制切片干燥后为生附片(子)。

将江油产泥附子洗净后,置于胆巴溶液中浸泡,分别于第9,12,16,20,25,27,34,41,48,55,63,70,77,87,107天取样,作为在胆巴溶液中浸泡不同时间

间的胆附子样品备用。

2 方法与结果

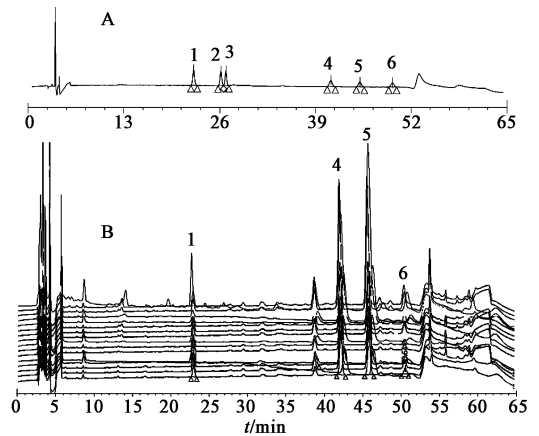
2.1 3 种双酯型生物碱和 3 种单酯型生物碱的含量测定^[1,12-13]

2.1.1 对照品溶液的制备 取各对照品适量,精密称定,用异丙醇-三氯甲烷(1:1)溶液溶解,配制质量浓度分别为苯甲酰新乌头原碱 0.048 66 g·L⁻¹、苯甲酰乌头原碱 0.068 34 g·L⁻¹、苯甲酰次乌头原碱 0.039 67 g·L⁻¹、新乌头碱 0.122 4 g·L⁻¹、次乌头碱 0.163 2 g·L⁻¹、乌头碱 0.044 64 g·L⁻¹的对照品储备液,储存于 4 ℃ 冰箱待用。

2.1.2 供试品溶液的制备 取附子各炮制品粉末(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)混合溶液 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz,水温在 25 ℃ 以下)30 min,放冷,再称定质量,用异丙醇-乙酸乙酯(1:1)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(1:1)混合溶液 3 mL 溶解,滤过,取续滤液,即得。

2.2 样品含量测定 按 2010 年版《中国药典》中附子项下的含量测定方法,分别精密量取对照品和各供试品溶液 10 μL 注入色谱仪,测定,按外标法计

算各供试品中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量。结果见表 1,图 1。附子不同浸泡时间样品平行取样 2 份,每份样品均平行处理 2 份供试品溶液,结果以平均值表示。最后计算各浸泡样品较未浸泡样品(浸泡时间为 0 d)的双酯型生物碱和单酯型生物碱总量的降低率。



A. 混合对照品;B. 浸泡不同时间样品
1. 苯甲酰新乌头原碱;2. 苯甲酰乌头原碱;3. 苯甲酰次乌头原碱;
4. 新乌头碱;5. 次乌头碱;6. 乌头碱;

图 1 胆附子 HPLC

表 1 胆巴溶液中浸泡不同时间的附子中生物碱成分的含量(n=2)

浸泡时间 /d	双酯型生物碱				单酯型生物碱			
	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	双酯型碱总量	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	单酯型碱总量
0	0.056 8	0.090 6	0.017 5	0.165 0	0.013 0	-	-	0.013 0
9	0.060 5	0.059 2	0.011 6	0.131 3	0.004 5	-	-	0.004 5
12	0.052 0	0.052 0	0.009 8	0.113 9	0.003 7	-	-	0.003 7
16	0.029 8	0.032 0	0.006 4	0.068 1	0.002 0	-	-	0.002 0
20	0.022 5	0.023 7	0.004 8	0.050 9	0.001 5	-	-	0.001 5
25	0.033 7	0.030 2	0.005 1	0.069 0	0.003 0	-	-	0.003 0
27	0.028 3	0.027 1	0.004 3	0.059 7	0.003 5	-	-	0.003 5
34	0.029 2	0.028 9	0.004 8	0.062 8	0.002 5	-	-	0.002 5
41	0.016 4	0.015 7	0.003 5	0.035 6	0.003 0	-	-	0.003 0
48	0.016 5	0.014 5	0.002 4	0.033 4	0.002 9	-	-	0.002 9
55	0.020 4	0.020 0	0.003 1	0.043 5	0.003 4	-	-	0.003 4
63	0.020 6	0.018 9	0.004 6	0.044 0	0.002 6	-	-	0.002 6
70	0.019 3	0.017 5	0.003 4	0.040 2	0.002 9	-	-	0.002 9
77	0.027 1	0.027 6	0.004 6	0.059 2	0.004 2	-	-	0.004 2
87	0.027 0	0.026 8	0.004 4	0.058 2	0.004 6	-	-	0.004 6
107	0.017 1	0.017 8	0.003 2	0.038 1	0.003 0	-	-	0.003 0

注:“-”表示未检测出。

3 讨论

泥附子洗净后在胆巴液中浸泡使3种双酯型类生物碱和3种单酯型类生物碱含量均降低。附子在胆巴溶液中浸泡前20 d,新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的含量随时间延长逐渐下降,在20 d时降低率分别达到60.39%,73.84%,72.57%,20 d后,新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的含量变化不大。生附子和胆附子中,苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰乌头原碱含量甚微,基本检测不到,主要是以苯甲酰新乌头原碱为主。附子在胆巴溶液中浸泡前20 d,苯甲酰新乌头原碱的含量逐渐降低,20 d时其降低率达到88.46%。20 d后苯甲酰新乌头原碱含量变化趋于平缓。

泥附子洗净后在胆巴液中浸泡使双酯型生物碱总量和单酯型生物碱总量降低。浸泡9 d的样品与生附子比较,双酯型生物碱总量降低20.42%,单酯型生物碱总量降低65.38%,单酯型生物碱降低率大于双酯型生物碱。其后,两类成分的含量随浸泡时间延长逐渐降低,到20 d时双酯型生物碱降低率达到69.15%,单酯型生物碱降低率达到88.46%。浸泡20~107 d胆附子中成分变化不明显,且单酯型生物碱降低率和双酯型生物碱降低率趋于一致,表明浸泡20 d后的胆附子质量基本稳定,证明《四川省彭明县概况》^[4]中记载附子“用胆腌足二十日”的要求具有一定的科学性。

附子用胆巴溶液浸泡可以达到防腐的目的,但造成了指标性成分的流失。据实验观察,泥附子净制切片后制成的生附片和经过胆巴溶液浸泡9 d以后的样品,均能防止其在高温高湿的环境腐烂,达到防腐的目的。但泥附子洗净后在胆巴溶液中浸泡20 d以上时,单酯型生物碱和双酯型生物碱流失约在70%左右。虽然双酯型生物碱含量降低使附子毒性减小,但大量的成分流失也会影响药效。证明清代《本草从新》^[14]“土人以盐腌之,欲减其力”和《药笼小品》^[14]“土人以盐腌之,其性愈减”的论述是有一定科学依据的。

现代科学技术条件下,附子腐烂问题可利用先进技术或设备解决。学者^[15-17]对附子采用室内自然堆放、麻袋覆盖、沙藏、冷藏等方法贮藏进行比较研究,发现低温可以明显抑制附子贮藏物质的分解,可延长贮藏期,并且以冷藏处理时,总生物碱含量下降最为缓慢。本实验中泥附子净制切片的干燥品也可以达到防止腐烂的目的,为避免附子中生物碱因在胆巴溶液中浸泡而流失,改进加工方法,采用现代

科学技术和方法解决附子易腐烂的问题具有可行性,但需对不经胆巴浸泡的生附子的炮制方法进行研究,为临床提供低毒高效的附子饮片,以保证临床用药的安全和有效。

[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,2010:177.
- [2] 黄勤挽,周子渝,王瑾,等. 附子炮制历史沿革研究[J]. 中国实验方剂学杂志 2011,17(23):269.
- [3] 浙江省中医药管理局《张山雷医集》编委会. 张山雷医集[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:314.
- [4] 四川省彭明县概况[M]. 民国30年(1941年),石印本:40.
- [5] 胡乃长等辑注. 本草图经(辑复本)[M]. 福州:福建科学技术出版社,2005:92.
- [6] 张介宾. 景岳全书[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:737.
- [7] 吴仪洛. 本草从新[M]. 北京:人民卫生出版社,1990:72.
- [8] 凌奂. 本草害利[M]. 北京:中医古籍出版社,1982:66.
- [9] 王洪绪. 外科证治全生集[M]. 北京:中国中医药出版社,1996:71.
- [10] 张璐. 本经逢原[M]. 北京:中国中医药出版社,1996:87.
- [11] 周林,李飞,方士杰,等. 附子中胆巴含量随浸泡时间的变化趋势研究[J]. 中华中医药学刊 2013,30(11):2046.
- [12] 周林,任玉珍,李飞,等. 不同炮制方法对附子生物碱类成分的影响[J]. 安徽中医学报 2012,31(5):71.
- [13] 黄志芳,易进海,唐小龙,等. 乌头类药材酯型生物碱含量测定方法的优化[J]. 中国实验方剂学杂志 2013,19(14):101.
- [14] 彭静山. 药笼小品[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1983:71.
- [15] 徐敏,张岳峰,侯大斌,等. 附子贮藏过程中相关生化指标的变化分析[J]. 中国中药杂志 2008,33(22):2704.
- [16] 舒晓燕,赵祥升,侯大斌. 附子不同贮藏条件下相关品质的变化分析[J]. 中药材 2009,32(1):29.
- [17] 邓文伟,侯大斌,蒋荡. 烘箱烘烤对附子中酯型生物碱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志 2012,18(19):44.

[责任编辑 顾雪竹]