

## 初匀速法预测制川乌的有效期

王芳<sup>1,2</sup>, 李旻<sup>1</sup>, 薛鑫<sup>1</sup>, 张普照<sup>1</sup>, 伍振峰<sup>1,2</sup>, 李凤琴<sup>1</sup>, 郑琴<sup>1\*</sup>, 杨明<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 2. 成都中医药大学, 成都 610075)

**[摘要]** **目的:** 采用化学动力学方法预测制川乌有效期。**方法:** 采用 HPLC 测定苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱含量, 流动相乙腈(A)-40 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵溶液(B) 梯度洗脱(0~45 min, 30%~45% A; 45~65 min, 45%~50% A; 65~75 min, 50%~55% A; 75~80 min, 55%~65% A; 80~85 min, 65% A), 检测波长 240 nm。采用初匀速法对制川乌药材进行加速试验并预测其有效期, 考察不同温度下制川乌药材中双酯型生物碱和单酯型生物碱含量变化情况。**结果:** 制川乌在室温条件下贮存期 0.69 年。**结论:** 高温不利于制川乌的稳定, 初匀速法可为制川乌药材有效期的建立提供参考。

**[关键词]** 初匀速法; 有效期; 制川乌; 双酯型生物碱; 单酯型生物碱

**[中图分类号]** R283.1; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0012-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100012

## Forecast on Shelf Life of Aconiti Radix Cocta by Initial Average Rate Test

WANG Fang<sup>1,2</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, XUE Xin<sup>1</sup>, ZHANG Pu-zhao<sup>1</sup>, WU Zhen-feng<sup>1,2</sup>,  
LI Feng-qin<sup>1</sup>, ZHENG Qin<sup>1\*</sup>, YANG Ming<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

**[Abstract]** **Objective:** To predict shelf life of Aconiti Radix Cocta and provide basis for assessing its quality. **Method:** Contents of benzoyleaconine, benzoylhypaconitine, benzoylmesaconine, aconitine, hypaconitine and mesaconine were determined by HPLC, with acetonitrile (A) -40 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate (B) (0-45 min, 30%-45% A; 45-65 min, 45%-50% A; 65-75 min, 50%-55% A; 75-80 min, 55%-65% A; 80-85 min, 65% A) as mobile phase by gradient eluting, detection wavelength was set at 240 nm. Initial average rate

**[收稿日期]** 20140116(002)

**[基金项目]** 国家科技部公益性行业专项(201007011)

**[第一作者]** 王芳, 讲师, 在读博士, 从事中药药剂学研究, Tel: 0791-87118645, E-mail: cat689apple@163.com

**[通讯作者]** \* 杨明, 教授, 博士生导师, 从事中药新型给药系统与新药开发研究, Tel/Fax: 0791-87118108, E-mail: Yangming16@126.com;

\* 郑琴, 教授, 硕士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: zhengqin912006@163.com

[7] 赵文彬, 谢建新, 刘金荣, 等. 用均匀设计法优选苦杏仁油的超声提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4): 303.

[8] 黄晓玲, 郑兆广, 封亮, 等. 正交试验优化板蓝根总生物碱的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 66.

[9] 徐德然, 王康才, 王峥涛, 等. 丹参中丹参素、原儿茶醛来源的初步研究[J]. 中国天然药物, 2005, 3

(3): 148.

[10] 叶勇. 丹参有效成分分离的研究进展[J]. 药品评价, 2005, 2(2): 146.

[11] 毛声俊, 侯世祥, 唐昌炯, 等. 丹参素在加温加速条件下的含量变化规律研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 220.

[责任编辑 刘德文]

test was adopted to predict shelf life, contents change of diester alkaloids and monoester alkaloids in *Aconiti Radix Cocta* under different temperature were investigated. **Result:** Shelf life of *Aconiti Radix Cocta* had been determined as 0.69 years. **Conclusion:** High temperature was not conducive to stability of *Aconiti Radix Cocta*, initial average rate test could provide a reference for establishing validity of herbs.

[ **Key words** ] initial average rate test; shelf life; *Aconiti Radix Cocta*; diester alkaloids; monoester alkaloids

中药饮片质量是确保中药临床用药安全性和有效性的关键。炮制加工及贮藏等环节均可影响中药饮片的质量<sup>[1]</sup>。现今我国对中药材及其饮片的贮存管理尚无相关国家标准,亦无保质期要求,导致很多保存年限过久的饮片依然在市场上流通和使用,故尽快制订科学合理的饮片保质期势在必行。目前,关于中药饮片有效期的研究尚不多见,仅限于当归<sup>[2]</sup>、薄荷<sup>[3]</sup>、丁香<sup>[4]</sup>、荆芥<sup>[5]</sup>、厚朴<sup>[6]</sup>、补骨脂<sup>[7]</sup>等。

制川乌为毛茛科植物乌头干燥母根的炮制加工品,含有二萜类双酯型生物碱(包括乌头碱、次乌头碱、新乌头碱)及苯甲酰乌头原碱类生物碱(苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱)等药效组分,具有祛风除湿、温经止痛的功效。国内外对制川乌的研究多集中于配伍、有效成分及药理药效等方面,有关其贮藏品质变化及有效期预测尚未见报道。本实验以制川乌为研究对象,通过初均速温度加速试验考察不同温度和时间段药材中双酯型生物碱和单酯型生物碱的含量变化情况,推算贮藏温度下速率常数,预测有效期,为制川乌的贮藏养护提供参考。

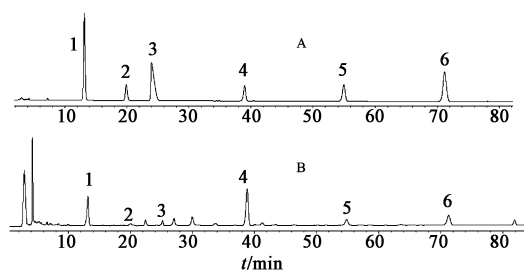
## 1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),BSA-224S-CW 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),DHG-9053A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。制川乌饮片购于四川省绵阳市神农中药饮片有限责任公司,经江西中医药大学刘荣华教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 干燥母根的炮制品;乌头碱、次乌头碱和新乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110720-200410, 110798-200404, 110799-200404),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(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为 MUST-10050502, MUST-10050501, MUST-10050503),乙腈为色谱纯,水为自制双蒸水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件 Welch Xtimate C<sub>18</sub> 色谱柱

(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-40 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵溶液[加氨溶液调 pH(10.0 ± 0.5), B] 梯度洗脱(0 ~ 45 min, 30% ~ 45% A; 45 ~ 65 min, 45% ~ 50% A; 65 ~ 75 min, 50% ~ 55% A; 75 ~ 80 min, 55% ~ 65% A; 80 ~ 85 min, 65% A), 柱温 30 °C, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 240 nm, 进样量 20 μL。理论塔板数按苯甲酰新乌头原碱计算不低于 5 000, 见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; 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. 乌头碱; 6. 次乌头碱

图 1 制川乌 HPLC

**2.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品适量,加 0.05% 盐酸甲醇溶液定容于 10 mL 量瓶中,摇匀,配制成 43.6, 105.6, 92.2, 50.6, 51.2, 43.6 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品母液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取制川乌粉末(过 3 号筛)5 g,置具塞锥形瓶中,加氨试液 2 mL,搅拌均匀,润湿 30 min,精密加入乙酸乙酯-异丙醇(1:1)50 mL,摇匀,称定质量,超声处理(100 W, 40 kHz)30 min,放冷,称定质量,加上上述溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,40 °C 减压回收溶剂至干,残渣加 0.05% 盐酸甲醇溶液使溶解并定容至 5 mL,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品溶液 1, 2, 10, 20, 30, 40, 50 μL, 按 2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标

准曲线,结果见表 1。

表 1 制川乌中各药效成分的线性关系考察

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}$
苯甲酰新乌头碱	$Y = 2\,242.9X - 8.320\,5$	1.000 0	0.092 ~ 4.610
苯甲酰乌头碱	$Y = 1\,206.2X - 5.922\,1$	0.999 9	0.044 ~ 2.180
苯甲酰次乌头碱	$Y = 1\,808.1X - 8.118$	1.000 0	0.106 ~ 5.280
新乌头碱	$Y = 1\,260.3X - 0.431\,1$	1.000 0	0.049 ~ 2.030
乌头碱	$Y = 1\,477.1X - 10.141$	0.999 7	0.051 ~ 2.530
次乌头碱	$Y = 2\,940.9X + 35.322$	0.999 7	0.056 ~ 2.496

**2.4.2 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 5 次,结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 3.68% ,3.61% ,3.60% ,3.53% ,3.60% ,3.53% ,表明仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性试验** 取同批样品粉末 5 份,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱含量的 RSD 分别为 4.83% ,4.63% ,4.88% ,4.72% ,4.29% ,4.87% 。

**2.4.4 稳定性试验** 精密量取供试品溶液,分别于制备后 0,3,12,15 h 按 2.1 项下色谱条件测定,结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 2.45% ,2.28% ,2.45% ,2.80% ,2.40% ,2.20% ,表明供试品溶液在 15 h 内稳定。

**2.4.5 加样回收试验** 精密称取已知苯甲酰新乌头原碱、苯甲酸乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱含量的样品粉末 1 g,共 6 份,精密加入混合对照品溶液(苯甲酰新乌头原碱、

苯甲酸乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱质量浓度分别为 0.237 5,0.045 6,0.104 2,0.011 9,4.682,0.065 8  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算平均回收率分别为 95.05% ,98.61% ,96.44% ,98.95% ,97.31% ,99.49% ,RSD 分别为 4.45% ,4.24% ,2.95% ,3.47% ,2.94% ,2.90% 。

**2.5 制川乌的有效期预测**

**2.5.1 室温下峰面积的测定** 精密称取制川乌适量,共 3 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定 6 种生物碱的峰面积。

**2.5.2 初匀加速试验<sup>[3,7-8]</sup>** 将已分装好的 9 份制川乌粉末置恒温干燥箱[(恒温  $\pm 0.2$ )  $^{\circ}\text{C}$ ]中,分别于 75,80,85,90,95,100,105,110,115  $^{\circ}\text{C}$  进行加速试验。每个温度放一组,各组测定时间依次为 1,2,4,8,16,32,64,128,256 h,在规定时间内取出制川乌,立即冷却至室温,每组精密称取 3 份样品,按 2.3 项下方法制成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,以室温下各生物碱含量为 100% ,计算各温度下成分的含量变化,采用初均速法预测制川乌有效期,结果见表 2,3。

**2.5.3 数据处理** 根据 Arrhenius 定律,分别以表 2,3 中  $\ln V$  对  $1/T$  进行线性回归,根据回归方程计算室温下初均速 ( $V_{25^{\circ}\text{C}}$ ) 及其置信区间,由公式  $t_{0.9,25^{\circ}\text{C}} = (100\% \sim 90\%) / V_{25^{\circ}\text{C}}$  计算有效期及其置信区间<sup>[4]</sup>。以单酯型生物碱回归方程为  $\ln V = -20\,406/T + 56.961$  ( $r = 0.963\,1$ ),标准误差 ( $s$ ) = 2.148,  $|r| > r_{0.01,7} = 0.918$ ,线性关系显著;当  $\alpha = 0.1, f = 7, t_{1-\alpha/2,7} = 1.894\,6, \ln V_{25^{\circ}\text{C}} = -20\,406/298.15 + 56.961 \pm t_{1-\alpha/2,7} \times s, t_{0.9,25^{\circ}\text{C}} = (100\% \sim 90\%) / V_{25^{\circ}\text{C}}$ ,上限 67.2 年,下限 1.29 年。以双酯型

表 2 制川乌以单酯型生物碱为指标的加速试验

$T/^{\circ}\text{C}$	$1/(T+273.15)/\text{K}^{-1}$	$t/\text{h}$	单酯型生物碱/ $\%$	初均速 ( $V$ )/ $\text{h}^{-1}$	$\ln V$
115	$2.576\,3 \times 10^{-3}$	1	208.567 4	$91.432\,6 \times 10^{-3}$	4.515 6
110	$2.609\,9 \times 10^{-3}$	2	219.351 4	$40.324\,2 \times 10^{-3}$	3.696 9
105	$2.644\,5 \times 10^{-3}$	4	235.198 4	$16.200\,4 \times 10^{-3}$	2.785 0
100	$2.677\,9 \times 10^{-3}$	8	236.629 7	$7.921\,2 \times 10^{-3}$	2.069 5
95	$2.716\,3 \times 10^{-3}$	16	211.359 7	$5.540\,0 \times 10^{-3}$	1.711 9
90	$2.753\,7 \times 10^{-3}$	32	180.140 5	$3.745\,6 \times 10^{-3}$	1.320 5
85	$2.792\,1 \times 10^{-3}$	64	220.755 6	$1.238\,1 \times 10^{-3}$	0.213 6
80	$2.831\,7 \times 10^{-3}$	128	304.438 1	$0.119\,5 \times 10^{-3}$	-2.124 4
75	$2.872\,3 \times 10^{-3}$	256	203.999 3	$0.375\,0 \times 10^{-3}$	-0.980 8

表3 制川乌以双酯型生物碱为指标的加速试验

$T/^\circ\text{C}$	$1/(T+273.15)/\text{K}^{-1}$	$t/\text{h}$	双酯型生物碱/%	$V/\text{h}^{-1}$	$\ln V$
115	$2.5763 \times 10^{-3}$	1	130.9308	$130.9308 \times 10^{-3}$	4.8746
110	$2.6099 \times 10^{-3}$	2	93.9066	$46.9533 \times 10^{-3}$	3.8491
105	$2.6445 \times 10^{-3}$	4	107.0502	$26.7626 \times 10^{-3}$	3.2870
100	$2.6779 \times 10^{-3}$	8	165.4229	$20.6779 \times 10^{-3}$	3.0290
95	$2.7163 \times 10^{-3}$	16	141.0795	$8.8175 \times 10^{-3}$	2.1767
90	$2.7537 \times 10^{-3}$	32	183.6211	$5.7375 \times 10^{-3}$	1.7470
85	$2.7921 \times 10^{-3}$	64	53.08755	$0.8295 \times 10^{-3}$	-0.1869
80	$2.8317 \times 10^{-3}$	128	15.89555	$0.1242 \times 10^{-3}$	-2.0859
75	$2.8723 \times 10^{-3}$	256	64.31544	$0.2512 \times 10^{-3}$	-1.3813

生物碱回归方程为  $\ln V = -223.074/T + 64.454$  ( $r = 0.9682$ ),  $s = 2.4135$ ,  $|r| > r_{0.01,7} = 0.929$ , 线性关系显著; 当  $\alpha = 0.1$ ,  $f = 7$ ,  $t_{1-\alpha/2,7} = 1.8946$ ,  $\ln V_{25^\circ\text{C}} = -223.074/298.15 + 64.454 \pm t_{1-\alpha/2,7} \times s$ ,  $t_{0.9,25^\circ\text{C}} = (100\% \sim 90\%) / V_{25^\circ\text{C}}$ , 上限 40.91 年, 下限 0.69 年。综上所述, 暂定制川乌的有效期 0.69 年。

### 3 讨论

常温下双酯型生物碱在水中即可发生水解, 在甲醇或乙腈中约 7 d 亦会有新峰产生<sup>[9]</sup>, 经多次预试验, 最终选择酸性甲醇稀释样品, 可防止供试品溶液继续水解并保持良好的长期稳定性(2 个月内无变化)。为保证样本均一性, 采用制川乌粗粉进行稳定性试验, 制川乌药材粉碎成粗粉后, 比表面积增大, 成分降解速率增加, 推断制川乌饮片贮存期应大于制川乌粉。

《中国药典》2010 年版规定, 制川乌应在通风处干燥贮藏, 防蛀, 即要求储藏温度达  $10 \sim 30^\circ\text{C}$ <sup>[10]</sup>。为预测制川乌有效期, 本文采用初匀速温度加速试验法考察制川乌有效期, 数据显示制川乌中单酯型生物碱及双酯型生物碱降解速率对数与开尔文温度的倒数线性关系显著, 说明采用初匀速法预测其有效期是可行的。

二萜类双酯型生物碱及苯甲酰乌头原碱类生物碱是制川乌的主要药效组分。基于 2010 年版《中国药典》, 本文分别选择了双酯型生物碱和单酯型生物碱总含量变化为制川乌有效期评价指标, 推算制川乌的有效期限分别为 0.69, 1.29 年。说明以不同成分作为检测指标时, 制川乌的预测有效期是不同的。现代药理学证明<sup>[11]</sup> 二萜类双酯型生物碱虽毒性极强, 但较单酯型生物碱具有显著的散寒镇痛、麻醉、抗炎、降压等作用, 因而双酯型生物碱含量不仅与制

川乌毒性大小关系密切, 且与其药效强弱密切相关, 故最终初步预测制川乌饮片贮藏有效期为 0.69 年, 但实际有效期尚待室温留样观察证实。

### 【参考文献】

- [1] 肖永庆, 张村, 王永炎, 等. 构建饮片质量保障体系, 确保中药临床疗效[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2178.
- [2] 谢京晶, 赵静, 李绍平, 等. 基于化学成分变化的当归药材保质期预测[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16): 1997.
- [3] 王金梅, 李昌勤, 康文艺, 等. 初匀速法测定中药薄荷有效期[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(25): 3185.
- [4] 张志国, 曹臣, 欧阳荣, 等. 丁香有效期的研究[J]. 中国现代中药, 2007, 9(11): 19.
- [5] 李昌勤, 王金梅, 康文艺, 等. 经典恒温法测定荆芥饮片有效期[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3173.
- [6] 吕达, 斯金平, 童再康, 等. 厚朴贮存年限与厚朴酚类含量关系的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2087.
- [7] 魏金凤, 薛志平, 康文艺, 等. 初匀速法预测补骨脂药材的有效期[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3176.
- [8] 殷恭宽, 马宝忠, 孙扬, 等. 物理药学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 376.
- [9] 郑琴, 陆浩伟, 杨明, 等. 乌头类双酯型生物碱水解转化规律及含量计算方法研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 46(9): 652.
- [10] 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: 37.
- [11] 王英豪. 从化学、药理学和炮制的角度探讨附子、川乌和草乌的传统应用[J]. 光明中医, 2009, 24(9): 1805.

[责任编辑 刘德文]