

· 药剂与炮制 ·

神曲与酶对化风丹药母发酵过程中毒性成分的影响

曹国琼^{1,2}, 张永萍^{1*}, 徐剑¹, 高莉³, 廖小刚³

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 北京师范大学, 北京 100875;
3. 遵义廖元和堂药业有限公司, 贵州 遵义 563000)

[摘要] 目的:探讨神曲与酶对化风丹药母发酵过程中双酯型生物碱类成分含量的影响。方法:设置 α -淀粉酶组、胃蛋白酶组、胰蛋白酶组、脂肪酶组、混合酶组、原处方组和阴性组,采用HPLC测定发酵4周后7组化风丹药母中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的含量,流动相乙腈-四氢呋喃(25:15,A)-0.1 mol·L⁻¹乙酸铵溶液(每1 L加冰乙酸0.5 mL,B)梯度洗脱(0~22 min,20%~23% A;22~40 min,23%~25% A),检测波长235 nm。结果:发酵4周后,7组药母样品中双酯型生物碱类成分含量均明显降低,各组均未检测到乌头碱,3种双酯型生物碱总和降低率66.67%~81.72%,其中 α -淀粉酶组降低率最高;多重比较显示各组间3种双酯型生物碱类成分含量总和存在明显差异, α -淀粉酶组样品中3种双酯型生物碱类成分含量总和显著低于原处方组,胃蛋白酶组和阴性组均显著高于原处方组,胰蛋白酶组、脂肪酶组、混合酶组与原处方组无显著性差异,阴性组样品中3种双酯型生物碱类成分含量显著高于其他6组。结论:神曲与酶对化风丹药母发酵过程中双酯型生物碱类成分的降解具有一定促进作用, α -淀粉酶促进效果较为显著。

[关键词] 化风丹药母;神曲;发酵;双酯型生物碱;乌头碱;新乌头碱;次乌头碱

[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141229.1040.010.html>

[网络出版时间] 2014-12-29 10:40

Effects of Medicated Leaven and Enzymes on Toxic Ingredients in Fermentation Process of Parent Drug in Huafeng Dan CAO Guo-qiong^{1,2}, ZHANG Yong-ping^{1*}, XU Jian¹, GAO Li³, LIAO Xiao-gang³ (1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. Zunyi Liaoyuanhetang Pharmaceutical Co. Ltd., Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of medicated leaven and enzymes on contents of diester-type alkaloids in fermentation process of parent drug in Huafeng Dan. **Method:** The α -amylase group, pepsin group, trypsin group, lipase group, mixed enzymes group, original prescription group and negative group were set, HPLC was employed to determine contents of three diester-type alkaloids (aconitine, masaconitine and hypaconitine) from parent drug of Huafeng Dan in seven groups after four weeks in fermentation, gradient elution (0-22 min, 20%-23% A; 22-40 min, 23%-25% A) with mobile phase consisted of [acetonitrile-tetrahydrofuran (25:15)] (A) -0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution (contained glacial acetic acid 0.5 mL per 1 L) (B) and detection wavelength of 235 nm. **Result:** After four weeks in fermentation, contents of diester-type alkaloids in all groups were significantly decreased, the content of aconitine was not detected in all groups. Reduction rates of contents of three diester-type alkaloids was between 66.67% and 81.72%, among which the α -amylase group was the lowest. Multiple comparison showed total content of three diester-type alkaloids had significant differences among all groups. Total content of three diester-type alkaloids in the α -amylase group was lower than that in the original prescription group significantly, but it in the pepsin group and the negative group were higher than that in

[收稿日期] 20140611(020)

[基金项目] 国家火炬计划项目(2011GH021909);贵州省重大科技专项[黔科合重大专项字(2011)6019];国家科技部中小企业创新基金项目(10C26215205058);贵州省火炬计划项目[黔科合高字(2010)5002]

[第一作者] 曹国琼,博士,从事中药资源开发与利用,Tel:010-62205282,E-mail:cgqxch1986@126.com

[通讯作者] *张永萍,硕士,教授,从事中药新制剂与新剂型研究,E-mail:zgygpg@126.com

the original prescription group significantly, it in the other six groups was significantly lower than that in the negative group. By comparing with the original prescription group, total content of three diester-type alkaloids in the trypsin group, the lipase group, the mixed enzymes group were no significant difference. **Conclusion:** Medicated leaven and enzymes in fermentation have some promoting effect on degradation of diester-type alkaloids, α -amylase in promoting effect is significant.

[Key words] parent drug of Huafeng Dan; medicated leaven; fermentation; diester-type alkaloids; aconitine; mesaconitine; hypaconitine

化风丹收载于《国家中成药标准汇编》,由紫苏叶、僵蚕、天麻等 21 味中药组成,具有息风镇痉、豁痰开窍的功效,用于治疗风痰闭阻、中风偏瘫、癫痫、面神经麻痹等^[1]。1951 年被列为国务院保护的四大名药之一^[2]。化风丹药母由生川乌、生半夏、生天南星、白附子和郁金加入牛胆汁、神曲混匀后经传统独特的发酵制作而成。

化风丹药母所含药味大多有毒,其中以生川乌的毒性最强。乌头类药材生品毒性较大,临床用量较小,一般需经炮制后方能入药。研究表明双酯型生物碱类是川乌的主要有效成分和毒性成分,最具代表性成分为乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等^[3-4]。神曲中含有多种微生物,如酵母菌、黄曲霉菌、枝孢霉菌等,此外还含有多种酶类,如淀粉酶、蛋白酶等^[5-6]。研究报道微生物发酵有助于降低川乌、附子中有毒生物碱的含量^[7]。微生物可利用中药中的成分代谢分泌蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶、淀粉酶等几十种胞外酶,使细胞壁破裂,减少成分从胞内向胞外扩散的阻力^[8]。

微生物发酵对川乌毒性的降低有促进作用,但关于化风丹药母中神曲的其他成分(淀粉酶、蛋白酶等)对发酵过程中双酯型生物碱类成分含量变化的影响尚未见报道。前期对化风丹药母的含量测定方法、发酵工艺、发酵用牛胆汁等方面进行了研究。本实验在前期研究基础上设计原处方组,选择 α -淀粉酶、胰蛋白酶、脂肪酶、胃蛋白酶及混合上述 4 种酶替代神曲为 5 个不同酶组,不加酶和神曲作为阴性组,以川乌中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱含量为评价指标,探讨神曲和不同种类酶对化风丹药母发酵过程中双酯型生物碱类成分含量的影响,为探索药母快速发酵的新方法提供参考。

1 材料

LC-2010CHT 型高效液相色谱仪(日本岛津), AE240 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多), LRH-150S 型恒温恒湿培养箱(广东医疗器械厂)。胃蛋白酶、脂肪酶(美国 Sigma),胰蛋白酶(美国

Amresco 公司), α -淀粉酶(德国 BR 公司),乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110720-200410,0799-9403,11079-200805),乙腈、四氢呋喃、异丙醇均为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药母的制备和发酵 按化风丹药母处方量称取各药材粉末混匀后等分为 7 组,除 1 组不加神曲和酶作为阴性组外,其余 6 组按原处方神曲比例分别加入 α -淀粉酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶、混合酶(前 4 种酶按 1:1:1:1 混合)、神曲 0.14 g。各加入 pH 6.27 ~ 7.29,密度 1.003 ~ 1.100,胆酸 28.48 ~ 37.24 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的同一批牛胆汁混匀,置于前期优选的发酵工艺(温度 35 $^{\circ}\text{C}$,湿度 60%)条件下发酵,每组重复 3 次。同时取原处方 3 份测定未发酵时化风丹药母中双酯型生物碱的含量。结果未发酵时新乌头碱、次乌头碱、乌头碱平均质量分数分别为 88.37,116.50,15.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,计算 3 种双酯型生物碱总和的平均值 220.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.2 色谱条件 Inertsil ODS-SP C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-四氢呋喃(25:15,A)-0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(每 1 L 加冰乙酸 0.5 mL,B)梯度洗脱(0 ~ 22 min,20% ~ 23% A; 22 ~ 40 min,23% ~ 25% A),流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 235 nm。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取化风丹药母约 2.5 g,置具塞锥形瓶中,加入氨试液 1.5 mL,精密加入异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合液 25 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,加异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合液补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 12.5 mL,于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干,残渣精密加入异丙醇-三氯甲烷(1:1)混合液 1.5 mL 使溶解,滤过,取续滤液,即得。

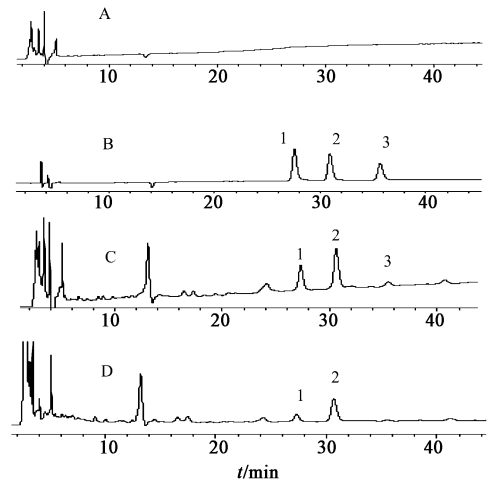
2.4 对照品溶液的制备 精密称取乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品适量,加异丙醇-三氯甲烷(1:1)混合液制成质量浓度分别为 0.129,0.161,0.140 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的

混合对照品溶液。

2.5 阴性样品溶液的制备 称取化风丹药母处方除生川乌以外的其他药材粉末,按化风丹药母制备方法制备阴性样品,按 2.3 项下方法制备,即得。

2.6 样品测定 取未发酵和发酵 4 周的样品按 2.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL ,按 2.2 项下色谱条件测定,见图 1。计算未发酵时化风丹药母中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱平均质量分数分别为 88.37, 116.50, 15.67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,采用 SPSS 17.0 单因素方差分析对其他各组含量均值进行多重比较,结果见表 1。

结果表明发酵 4 周后,7 组药母样品中 3 种双酯型生物碱类成分含量均明显降低,降低率 66.67% ~ 81.72%,以 α -淀粉酶组为最低,阴性组最高;新乌头碱含量最高的是胃蛋白酶组,最低的是



A. 阴性样品;B. 对照品;C. 未发酵样品;D. 发酵 4 周后样品;1. 新乌头碱;2. 次乌头碱;3. 乌头碱

图 1 化风丹药母 HPLC

Fig.1 HPLC of parent drug of Huafeng Dan

表 1 化风丹药母发酵 4 周后各组多重比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Multiple comparison of parent drug of Huafeng Dan in each group after fermentated 4 weeks ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	新乌头碱 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	次乌头碱 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	3 种双酯型生物碱类成分	
			总和/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	减少率/%
α -淀粉酶	0.006 3 \pm 0.000 8 ¹⁾	0.034 0 \pm 0.019 0 ¹⁾	0.040 3 \pm 0.019 8 ¹⁾	81.72
胃蛋白酶	0.017 8 \pm 0.003 3 ²⁾	0.050 4 \pm 0.013 4 ²⁾	0.068 2 \pm 0.016 8 ³⁾	69.07
胰蛋白酶	0.010 7 \pm 0.027 6 ^{1,2)}	0.040 8 \pm 0.012 3 ¹⁾	0.051 5 \pm 0.015 1 ^{1,2)}	76.64
脂肪酶	0.010 8 \pm 0.003 6 ^{1,2)}	0.047 6 \pm 0.016 8 ¹⁾	0.058 4 \pm 0.020 4 ^{1,2)}	73.52
混合酶	0.014 8 \pm 0.009 5 ^{1,2)}	0.047 4 \pm 0.013 6 ¹⁾	0.062 2 \pm 0.023 1 ²⁾	71.79
阴性	0.010 8 \pm 0.007 6 ^{1,2)}	0.062 7 \pm 0.044 0 ²⁾	0.073 5 \pm 0.051 5 ⁴⁾	66.67
原处方	0.010 7 \pm 0.000 7 ^{1,2)}	0.050 1 \pm 0.007 8 ²⁾	0.060 8 \pm 0.007 7 ²⁾	72.43

注:乌头碱质量分数均为 0;^{1), 2), 3), 4)} 表示差异显著性分析取 $\alpha=0.05$ 水平,各指标同一列含有不同数字者为差异显著。

α -淀粉酶组;次乌头碱含量最高的是阴性组, α -淀粉酶组最低,各组均未检测出乌头碱。多重比较结果显示新乌头碱含量 α -淀粉酶组显著低于胃蛋白酶组,但与其他组之间无显著差异;次乌头碱含量胃蛋白酶组、阴性组、原处方组 3 组间无显著差异,但均显著高于其他 4 个组;3 种双酯型生物碱类成分含量总和 α -淀粉酶组显著低于胃蛋白酶组、混合酶组、阴性组和原处方组,但与胰蛋白酶组和脂肪酶组无显著差异。

3 讨论

毒剧中药在临床上对某些疑难病症具有较好的疗效,但经过炮制或炮制不当,不但不能达到治疗疾病的目的,反而还能引起中毒,甚至有生命危险^[9]。川乌的炮制方法有蒸、煮、微波、酵母菌发酵等^[10-12]。发酵是经净制或处理后的药物,在一定温

度和湿度条件下,通过霉菌和酶的作用,使药物发泡、生衣的方法^[13]。该方法与煎、煮、微波等炮制方式的不同点在于前者是在常温、常压条件下进行的生物转化过程,对热敏感的挥发油和维生素等成分具有保护作用,可最大限度地保护中药活性成分。化风丹药母由生川乌、生半夏、生天南星和白附子等中药加入牛胆汁混匀后自然发酵而成。传统的发酵工艺与蒸、煮等川乌炮制方法比较,可有效保留川乌中有效成分,降低川乌中毒性成分,防止有效成分丢失。

本文所有试验组经发酵后,新乌头碱、次乌头碱、乌头碱含量均降低,但各组样品中 3 种双酯型生物碱类成分含量的降低率存在差异。多重比较表明各组间 3 种双酯型生物碱类成分含量总和具有明显差异,阴性组药母中 3 种双酯型生物碱之和均显著

高于其他各组, α -淀粉酶组中3种双酯型生物碱含量之和显著低于原处方组, 而胃蛋白酶组和阴性组则显著高于原处方组, 胰蛋白酶、脂肪酶、混合酶组与原处方组均无显著性差异。表明神曲和酶在发酵过程中对川乌毒性成分降低有一定促进作用, 其中促进作用最强的为 α -淀粉酶。 α -淀粉酶在制药及发酵行业被广泛应用, 这可能是由于在发酵过程中 α -淀粉酶将淀粉水解为小分子物质为微生物生长提供了丰富营养。

阴性组发酵4周后3种双酯型生物碱类成分含量均有降低, 但比其他组稍慢, 这可能是发酵过程中外界环境或药材本身的多种微生物对其综合作用的结果, 提示在不加神曲或酶的情况下, 化风丹药母发酵亦能降低川乌的毒性, 只是发酵时间需要延长。

[参考文献]

[1] 石尚友, 冯华, 邹孔强, 等. 化风丹中天麻素的提取方法研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(2): 50-51.
[2] 颜俊文, 苗加伟, 何海洋, 等. 万胜化风丹、雄黄和朱砂的急性肝肾毒性作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(4): 380-385.
[3] 罗霄, 彭善贵, 文永盛, 等. HPLC测定制川乌中的乌头碱、次乌头碱和新乌头碱[J]. 华西药理学杂志,

2010, 25(4): 472-473.

[4] 吴刚刚, 章小菁, 梁泽华. 川乌炮制品减毒增效的实验研究[J]. 绿色科技, 2011(6): 163-165, 168.
[5] 王秋红, 苏阳, 王荔慧, 等. 六神曲中真菌的分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 122-127.
[6] 王海洋, 高文远, 张丽霞. 六神曲不同的制备工艺对其淀粉酶活力的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2084-2087.
[7] 苏建树, 刘白宁, 田平芳, 等. 微生物发酵对川乌、附子中生物碱含量的影响[J]. 北京化工大学学报, 2010, 37(3): 97-101.
[8] 秦琴. 发酵在中药研究中的应用概况[J]. 中国西部科技, 2010, 9(21): 43-45.
[9] 曹国琼, 张永萍, 徐剑, 等. 乌头的药理与毒理作用及减毒的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(2): 61-64.
[10] 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): 21-24.
[11] 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): 39-42.
[12] 张的风, 朱小华. 川乌炮制工艺研究[J]. 江西中医学报, 2001, 13(3): 113.
[13] 叶定江, 原思通. 中药学炮制辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 2005: 6.

[责任编辑 刘德文]