

不同炮制方法对附子 6 种酯型生物碱含量的影响

唐小龙^{1,2}, 易进海^{1*}, 夏燕莉¹, 黄志芳¹, 陈燕¹, 刘玉红¹

(1. 四川省中医药科学院, 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] **目的:**探究干热烘制和湿热蒸制对附子 6 种酯型生物碱含量的影响。**方法:**控制温度和时间,采用干热高温烘制法和湿热高压蒸制法对附子进行炮制加工,以 HPLC 测定不同炮制品中 6 种酯型生物碱的含量。**结果:**附子炮制对 6 种酯型生物碱含量有显著影响,双酯型生物碱显著降低或消失,单酯型生物碱显著增加。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、次乌头碱和乌头碱进样量分别在 0.032 184 ~ 3.218 4 μg ($r=0.999\ 9$), 0.030 016 ~ 3.001 6 μg ($r=0.999\ 9$), 0.031 320 ~ 3.132 0 μg ($r=0.999\ 9$), 0.030 744 ~ 3.074 4 μg ($r=0.999\ 9$), 0.030 912 ~ 3.091 2 μg ($r=0.999\ 9$), 0.031 920 ~ 3.192 0 μg ($r=0.999\ 9$) 有良好的线性关系;平均回收率分别为 100.03% (RSD 1.35%), 99.99% (RSD 1.96%), 98.16% (RSD 1.01%), 100.68% (RSD 1.03%), 99.27% (RSD 0.55%), 102.81% (RSD 0.91%)。**结论:**该炮制方法简便可控,减毒存效,为附子炮制加工提供新的参考方法。

[关键词] 附子; 炮制; 酯型生物碱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0096-05

[doi] 10.11653/syfy2013210096

Effect of Different Processing Methods on Content of Six Ester-type Alkaloids in Radix Aconite Lateralis

TANG Xiao-long^{1,2}, YI Jin-hai^{1*}, XIA Yan-li¹, HUANG Zhi-fang¹, CHEN Yan¹, LIU Yu-hong¹

(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of the processing methods of the heating and the steaming on the content of six ester-type alkaloids in Radix Aconite Lateralis. **Method:** By using the processing methods of the high temperature-heating and the high pressure-steaming to control the temperature and time, six ester-type alkaloids in the different processed products of Radix Aconite Lateralis were determined. **Result:** There is a significant difference on the content of six ester-type alkaloids between the crude and the processed Radix Aconite Lateralis. It is significantly reduced or disappeared on the content of diester-type alkaloids and increased on monoester-type alkaloids. The linear ranges of benzoylmesaconine, benzoylaconine, benzoylhypaconine, mesaconitine, hypaconitine and aconitine were 0.032 184-3.218 4 μg ($r=0.999\ 9$), 0.030 016-3.001 6 μg ($r=0.999\ 9$), 0.031 320-3.132 0 μg ($r=0.999\ 9$), 0.030 744-3.074 4 μg ($r=0.999\ 9$), 0.030 912-3.091 2 μg ($r=0.999\ 9$), 0.031 920-3.192 0 μg ($r=0.999\ 9$) and the average recoveries were 100.03%, 99.99%, 98.16%, 100.68%, 99.27%, 102.81% and RSDs were 1.35%, 1.96%, 1.01%, 1.03%, 0.55%, 0.91% respectively. **Conclusion:** These processing methods are simple and controllable and can provide new references on processing radix aconite lateralis.

[Key words] Radix Aconite Lateralis; processing; ester-type alkaloids; HPLC

[收稿日期] 20111121(012)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB522804)

[第一作者] 唐小龙, 硕士在读, 从事中药化学成分与质量标准研究, Tel:028-85210843, E-mail:594195569@qq.com

[通讯作者] * 易进海, 研究员, 从事中药化学成分与质量标准研究, Tel:028-85210843, E-mail:yijinhai@yahoo.com.cn

附子为毛茛科多年生草本植物乌头子根的加工品,始载于《神农本草经》,味辛甘,性大热,有毒,归心、肾、脾经,为有毒中药的代表,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效^[1],被历代医家视为补火助阳之要药,也被誉为“回阳救逆第一品药”。附子主要毒性成分为双酯型生物碱,如乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)、新乌头碱(mesaconitine)等^[2]。附子经炮制后此类成分可水解转化为苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine)、苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine)和苯甲酰新乌头原碱(benzoylmesaconine)等单酯型生物碱,或进一步转化为乌头原碱(aconine)、次乌头原碱(hypaconine)和新乌头原碱(mesaconine)等醇胺类生物碱,毒性大大降低^[3-7]。附子炮制始见于汉代,从汉代至唐代几百年间,附子都采用直接干热法解毒,如炮、烧、煨、炒、焙、烘等;宋代发展到用液体辅料及药汁煮或蒸制;清代开始采用胆巴水浸制、煮、漂、蒸等方法^[8-9]。2010年版《中国药典》附子沿用胆巴的炮制方法,文献报道^[10-14]该炮制工艺繁琐,方法复杂,可控性差,有效成分损失严重,总生物碱成分损失超过80%,存在炮制过度之嫌。本实验采用干热高温烘制和湿热高压蒸制的现代加工方法炮制附子,研究探讨干热高温和湿热高压对附子中6种酯型生物碱含量的影响,为附子加工炮制提供新的参考方法。

1 材料

Agilent 1200型高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD检测器,柱温箱,自动进样器,工作站), Sigma3K15型高速冷冻离心机,岛津AUW220D型1/10万电子天平, CQ-250型超声波清洗仪(上海船舶电子设备厂), Millipore Milli-Q Integral 3型超纯水机。

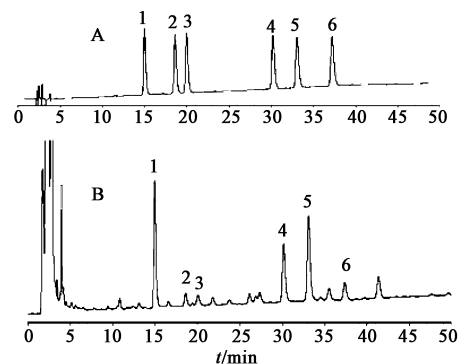
药材购于四川江油道地产区,经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为毛茛科多年生草本植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根。乌头碱(批号 110720-200410)、次乌头碱(批号 110798-200404)、新乌头碱(批号 110799-200404)对照品购自中国药品生物制品检定所,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱对照品由本实验室从制川乌中分得,其纯度分别为 99.2%, 97.8%, 98.4%, 经理化性质和光谱数据分析,鉴定其结构。乙腈、四氢呋喃为美国 Fisher 色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 炮制加工方法与样品制备 取新鲜生附子,除去母根、须根及泥沙,习称为“泥附子”,选择个大、均匀的泥附子,洗净,切片,晒干,即为生附片。取生附片分别于 200 °C 干热高温烘制 7.5, 15, 30, 60 min,即为干热炮制熟附片。取生附片加适量水润透,分别于 120 °C 湿热高压蒸制 20, 60, 90, 120 min, 105 °C 蒸制 20, 60 min, 晒干,即为湿热蒸制熟附片。

2.2 HPLC 测定附子 6 种酯型生物碱的含量

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加 0.5 mL 冰醋酸), B 相为乙腈-四氢呋喃(25:15)混合溶液, 梯度洗脱(0~48 min, 85%~74% A; 48~49 min, 74%~65% A; 维持 9 min)。流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 235 nm, 柱温 35 °C, 进样量 50 μL。对照品溶液及供试品溶液的色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 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 熟附片 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 取新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱对照品适量,精密称定,加 0.05% 盐酸甲醇溶液配置成每 1 mL 含新乌头碱 0.153 72 mg、次乌头碱 0.154 56 mg、乌头碱 0.159 6 mg、苯甲酰新乌头原碱 0.160 92 mg、苯甲酰次乌头原碱 0.156 6 mg、苯甲酰乌头原碱 0.150 08 mg 的混合对照品溶液 I。精密吸取上述混合对照品溶液 1 mL, 加 0.05% 盐酸甲醇溶液稀释至 10 mL, 摇匀, 即得混合对照品溶液 II。

2.2.3 供试品溶液的制备 取附子样品粉末(过三号筛)约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 0.05 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 50 mL, 摇匀, 超声处理

(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 摇匀, 于 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。取上清液, 即得。

2.2.4 检测限与定量限 在选定的色谱条件下, 当信噪比为 3 时, 测得苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱的检测限为 4 ng; 新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的检测限为 5 ng; 当信噪比为 10 时, 测得苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和

苯甲酰次乌头原碱的定量限为 13 ng, 新乌头碱、次乌头碱和乌头碱的定量限为 15 ng。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 I 5, 10, 15, 20 μL 和混合对照品溶液 II 2, 5, 10, 15, 20 μL, 注入液相色谱仪中, 以进样量 (μg) 为横坐标, 对照品峰面积 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线。结果见表 1。

表 1 6 种酯型生物碱线性关系

成分	线性范围/μg	线性方程	r
苯甲酰新乌头原碱	0.032 184 ~ 3.218 4	$Y = 1\ 136.97X - 4.54$	0.999 9
苯甲酰乌头原碱	0.030 016 ~ 3.001 6	$Y = 1\ 175.89X - 1.03$	0.999 9
苯甲酰次乌头原碱	0.031 320 ~ 3.312 0	$Y = 1\ 171.84X + 0.01$	0.999 9
新乌头碱	0.030 744 ~ 3.074 4	$Y = 1\ 240.75X - 6.13$	0.999 9
次乌头碱	0.030 912 ~ 3.091 2	$Y = 1\ 234.75X + 0.75$	0.999 9
乌头碱	0.031 920 ~ 3.192 0	$Y = 1\ 128.57X + 8.72$	0.999 9

2.2.6 精密度试验 精密吸取供试品溶液 (S₁) 50 μL, 注入液相色谱仪, 重复进样 6 次, 按 2.2.1 项下色谱条件进行检测, 记录峰面积, 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、次乌头碱、乌头碱峰面积的 RSD 分别为 0.73%, 0.98%, 1.45%, 0.29%, 0.36%, 1.75%, 表明仪器精密度好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S₁), 于室温 0, 1, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 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、次乌头碱、乌头碱峰面积的 RSD 分别为 1.54%, 1.81%, 1.58%, 0.28%, 0.36%, 1.79%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 重复性试验 取同一批附子粉末 (S₁) 约 2 g, 共 6 份, 精密称定, 照 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液各 50 μL, 注入液相色谱仪, 按 2.2.1 项下色谱条件进行检测, 记录峰面积, 计算含量。苯甲酰新乌头原碱的平均含量为 $6.20 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.54%); 苯甲酰乌头原碱的平均含量为 $1.20 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.89%); 苯甲酰次乌头原碱的平均含量为 $1.69 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.66%); 新乌头碱的平均含量为 $3.98 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 0.30%); 次乌头碱的平均含量为 $1.44 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 0.36%); 乌头碱的平均含量为 $5.75 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 1.98%)。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量的样品 (S₁) 1 g, 共 6 份, 精密称定, 准确加入与样品中含量约等量的对照品, 照含量测定项下操作, 测定含量, 计算

回收率, 结果见表 2。

表 2 6 种酯型生物碱加样回收率试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
苯甲酰新乌头原碱	0.062 1	0.061 7	0.124 5	101.10	100.03	1.35
	0.062 4	0.061 7	0.123 1	98.36		
	0.062 5	0.061 7	0.124 5	100.52		
苯甲酰乌头原碱	0.062 4	0.061 7	0.123 6	99.19		
	0.062 4	0.061 7	0.125 3	101.88		
	0.062 5	0.061 7	0.123 7	99.15		
苯甲酰次乌头原碱	0.012 0	0.012 0	0.024 1	100.73	99.99	1.96
	0.012 1	0.012 0	0.024 3	102.22		
	0.012 1	0.012 0	0.023 9	97.98		
新乌头碱	0.012 1	0.012 0	0.023 9	98.17		
	0.012 1	0.012 0	0.024 3	102.15		
	0.012 1	0.012 0	0.023 9	98.67		
次乌头碱	0.016 9	0.017 0	0.033 6	98.34	98.16	1.01
	0.017 0	0.017 0	0.033 7	98.30		
	0.017 0	0.017 0	0.033 6	97.63		
乌头碱	0.017 0	0.017 0	0.034 0	99.77		
	0.017 0	0.017 0	0.033 5	96.77		
	0.017 0	0.017 0	0.033 7	98.12		
新乌头碱	0.398 5	0.400 0	0.800 2	100.44	100.68	1.03
	0.400 6	0.400 0	0.801 7	100.29		
	0.401 3	0.400 0	0.803 6	100.55		

续表2

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
次乌头碱	0.4006	0.4000	0.7971	99.13	99.27	0.55
	0.4009	0.4000	0.8084	101.89		
	0.4013	0.4000	0.8085	101.8		
	1.4417	1.4500	2.8761	98.92		
	1.4494	1.4500	2.8950	99.70		
	1.4521	1.4500	2.9022	100.01		
	1.4494	1.4500	2.8852	99.03		
	1.4504	1.4500	2.8789	98.52		
乌头碱	1.4520	1.4500	2.8935	99.42	102.81	0.91
	0.0581	0.0580	0.1184	103.98		
	0.0584	0.0580	0.1181	102.88		
	0.0585	0.0580	0.1181	102.84		
	0.0584	0.0580	0.1175	101.90		
	0.0584	0.0580	0.1185	103.66		
	0.0585	0.0580	0.1174	101.58		

2.2.10 含量测定 取附子粉末约2g,按照**2.2.3**项方法制备供试品溶液,**2.2.1**项色谱条件测定附

子中6种酯型生物碱的含量,结果见表3。

3 讨论

生物碱是附子的主要毒、效成分,附子含量测定主要集中在6种酯型生物碱,剧毒性双酯型生物碱性质不稳定,在受热过程中先水解成单酯型生物碱,进而水解成乌头原碱类生物碱,使附子毒性大大降低。2010年版《中国药典》附子采用胆巴炮制方法,如生附子用食用胆巴水浸泡、煮透、水漂、切片、再水漂、染色、蒸制、干燥即为黑顺片,经过多次反复的水浸泡、漂洗等处理,炮制工艺繁琐,方法复杂,可控性差,有效成分损失严重^[9-13]。附子炮制过程中生物碱的减少主要在于胆巴水泡(损失31.6%)、漂片(损失33.6%)、水解(损失16.9%),生物碱总量减少了81.3%,又因为浸泡时间、温度、漂洗程度等不同,不同批次附片成分含量相差可高达10倍^[15]。本实验应用制药工业干热灭菌和湿热灭菌的技术方法,采用干热高温烘制和湿热高压蒸制炮制附子,使剧毒性双酯型生物碱含量显著降低,由于没有经过水浸泡、煮、漂洗等处理,故避免了总生物碱等水溶性有效成分的流失,且炮制工序简便可行,工艺条件准确可控,适合于工业化生产。

表3 6种酯型生物碱含量测定(n=3)

×10⁻⁵ g·g⁻¹

No.	炮制方法	苯甲酰 新乌头碱	苯甲酰 乌头碱	苯甲酰 次乌头碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	单酯型生物 碱总量	双酯型 生物碱总量
S ₁	生附片	6.20	1.20	1.69	39.8	144	5.75	9.09	189.55
S ₂	200℃/7.5 min	14.7	0.439	10.1	3.18	29.6	-	25.239	32.78
S ₃	200℃/15 min	21.8	0.752	29.2	-	8.57	-	51.752	8.57
S ₄	200℃/30 min	77.4	21.2	28.8	-	3.45	-	127.4	3.45
S ₅	200℃/60 min	44.0	9.55	12.1	-	3.08	-	65.65	3.08
S ₆	120℃/20 min	82.9	19.0	19.6	-	-	-	121.5	-
S ₇	120℃/60 min	102.0	24.6	28.6	-	-	-	155.2	-
S ₈	120℃/90 min	90.8	18.9	48.6	-	-	-	158.3	-
S ₉	120℃/120 min	73.6	17.5	28.5	-	-	-	119.6	-
S ₁₀	105℃/20 min	20.4	1.17	9.39	1.31	23.6	-	30.96	24.91
S ₁₁	105℃/60 min	26.1	3.81	24.5	-	1.08	-	54.41	1.08

注: - 未检出。

由表2中S₂~S₅看出,附子在200℃干热烘制,双酯型生物碱含量迅速降低,单酯型生物碱先增后降,30min达到高峰。药典规定附片含双酯型生物碱总量不得过0.020%,含单型生物碱总量不少于0.010%,本实验仅200℃烘制7.5min未达到药典要求,其他均符合药典规定。

由表2中S₆~S₁₁看出,附子在120℃湿热蒸制,双酯型生物碱迅速消失,单酯型生物碱含量显著增加,先增后降,60~90min达到高峰。105℃高压蒸制,酯型生物碱变化趋势较为缓和,随着蒸制时间增加,双酯型生物碱显著降低,单酯型生物碱显著增加,但明显<120℃的蒸制效果。上述方法仅

五味子醋制前后指纹图谱的分析比较

朱明贵¹, 李丽², 肖永庆^{1,2*}, 于定荣², 麻印莲², 顾雪竹²

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立五味子指纹图谱测定方法, 分析比较五味子醋制前后物质基础的变化。方法: 采用 HPLC, 以乙腈-15 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (pH 2.0) 为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 210, 254 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 分别测定生、醋五味子指纹图谱。结果: 五味子醋制前后指纹图谱有明显的差异, 其中以 5-羟甲基糠醛含量变化最显著。结论: 建立的方法可以较好地体现出五味子醋制前后物质基础的差异, 为五味子饮片的质量评价标准提供了科学依据, 也为进一步揭示五味子炮制原理的科学内涵奠定了基础。

[关键词] 五味子; 指纹图谱; 醋制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0100-05

[doi] 10.11653/syjf2013210100

Analysis and Comparison of Fingerprint of Fructus Schisandrae Chinensis after Vinegar Processing

ZHU Ming-gui¹, LI Li², XIAO Yong-qing^{1,2*}, YU Ding-rong², MA Yin-lian², GU Xue-zhu²

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

[收稿日期] 20130501(006)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业专项(201007012-1)

[通讯作者] * 肖永庆, 首席研究员, Tel: 010-84040221, E-mail: x. heqi@163. com

105 °C 湿热蒸制 20 min 未达到药典要求, 其他均符合药典规定。

虽然本实验干热高温烘制法和湿热高压蒸制法能显著降低附子双酯型生物碱的含量, 质量符合药典规定, 炮制工艺简便可行, 且避免了胆巴炮制有效成分的流失, 但其药效和毒性尚需进一步深入研究。

[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] 李志勇, 李彦文, 孙建宁, 等. 乌头类植物药 3 种双酯型生物碱研究进展[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2009, 18(2): 87.
- [3] 孙兰, 周海燕, 赵周怀, 等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱[J]. 中草药, 2009, 40(1): 131.
- [4] 李娅萍, 田颂九, 王国荣. 乌头类药物的化学成分及分析方法概况[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 659.
- [5] 魏巍, 李绪文, 周洪玉, 等. 3 种乌头原碱的 NMR[J]. 吉林大学学报: 理学版, 2010, 48(1): 127.
- [6] 朱桢禄, 邢蜀林, 李谷霞, 等. 附子不同程度的水解对

性及药理作用的影响[J]. 重庆中医药, 1984, 13(3): 43.

- [7] 李志勇, 张硕峰, 畅洪昇, 等. 不同炮制时间附子饮片双酯型生物碱含量变化与饮片安全的相关性研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1086.
- [8] 张振东, 杨又华. 附子炮制历史沿革[J]. 中药材, 1993, 16(6): 28.
- [9] 王龙虎, 杜杰, 周海燕, 等. 附子炮制研究进展[J]. 中国现代中药, 2007, 9(8): 28.
- [10] 王立岩, 张大方, 曲晓波, 等. 附子炮制前后有效部位强心作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(5): 596.
- [11] 郑露露. 附子炮制中的成分流失[J]. 中药通报, 1983, 8(2): 26.
- [12] 赵纳, 侯大斌, 刘向宏. 不同炮制方法对附子中乌头总碱和双酯型生物碱含量的影响[J]. 中药材, 2011, 34(1): 39.
- [13] 王宁, 张慧伟. 论附子的炮制[J]. 中成药, 1990, 12(2): 15.
- [14] 吴荣祖. 附子减毒与增效-中药附子传统加工工艺创新研究[J]. 药品评价, 2005, 2(5): 380.

[责任编辑 顾雪竹]