

超微粉碎与常规粉碎白附子中成分比较

程立平, 毛淑杰, 马志静, 顾雪竹, 钮正睿, 林淑芳, 李先端*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 比较白附子微米药材与其原药材中所含成分, 探讨微米药材在祛除白附子刺激性的同时, 固有物质保留程度。方法: 采用高效液相色谱及薄层色谱实验比较差异。结果: 白附子微米药材与原药材成分色谱峰基本一致, 传统炮制饮片水提取物成分峰较微米药材与原药材明显减少。结论: 白附子经超微粉碎后, 基本保存原成分。药理实验结果证明, 白附子微米药材在明显减轻了白附子毒性、刺激性的同时, 原成分基本保存。

[关键词] 白附子微米药材; 薄层; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0015-04

白附子系天南星科植物独角莲 (*Typhonium giganteum* Engl) 的干燥块茎, 是较常用的温化寒痰药。具有祛风痰、定惊搐等功效。经研究, 白附子化学成分主要有 -谷甾醇、脂肪酸、胆碱等。传统认为有毒, 药典规定内服一般炮制后用。其毒副作用表现有很强的麻辣刺激性, 戟人咽喉。白附子传统炮制工艺是要消除其麻辣刺激性。历代文献记载白附子炮制方法有 10 种之多^[1]。现今主要是白矾煮; 生姜、白矾煮等炮制方法^[2]。由于传统炮制方法复杂, 费工费时, 可引起生产损耗达 25%, 成分流失达 50%。而且有害元素铝离子残留量大, 个别样品铝离子残留量比生品增加达数百倍^[3~4]。

鉴此, 我们研究建立了白附子祛麻辣刺激性新工艺——超微粉碎法^[5]。该制备工艺是通过超微粉碎技术将原药材粉碎为中心粒径达到 11.85 μm , 最大粒径 64 μm , 90% 的粒度在 28 μm 以下。通过药理实验证明该新方法消除了白附子麻辣刺激性, 提高了药效作用, 且无毒副作用^[5]。鉴于已有学者经研究证明, 半夏、天南星、白附子中, “草酸钙针晶” 是其麻辣刺激性物质, 且传统炮制是采用酸、碱通过改变草酸钙针晶的形态而消除其麻辣刺激性的^[6~8]。为此我们首先采用高效液相色谱技术及薄层色谱技术, 结合浸出物等观察指标, 探讨白附子经超微粉碎后保留原成分的程度, 并分析微米中药的

优势, 为搞清超微粉碎消除了白附子麻辣刺激性的机理研究积累资料。现将结果报告如下。

1 仪器与试药

白附子药材: 购于河北安国为河南禹县产。生饮片自切, 简称“生品”。

白附子新工艺制品, 简称“新品”: 将白附子用精密研磨式超微粉碎机粉碎。出料温度为 30 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$, 经 GSL-101BI 激光颗粒分布测量仪测定, 超微粉碎可使白附子中位径达到 11.85 μm , 最大粒径 64 μm , 90% 的粒度在 28 μm 以下^[5]。

白附子老法炮制品, 简称“老品”: 为药典法: 即取净白附子, 分开大小个, 浸泡, 每日换水 2 ~ 3 次, 数日后如起黏沫, 换水后加白矾 (每 100 kg 白附子, 用白矾 2 kg), 泡 1 d 后再进行换水, 至口尝微有麻舌感为度, 取出。将生姜片、白矾粉置锅内加适量水, 煮沸后, 倒入白附子共煮至无白心, 捞出, 除去生姜片, 晾至 6、7 成干, 切厚片, 干燥。每 100 kg 白附子, 用生姜、白矾各 12.5 kg。

仪器 Waters2695 四元泵 HPLC 仪, Waters2996 PDA 检测器。甲醇为色谱纯、水为高纯水; 正丁醇、冰醋酸、石油醚、乙酸乙酯、甲酸、三氯甲烷、异丙醇等均为分析纯; 硅胶 G 层析板 (自制); KQ2200 型超声波清洗器; LD4-2 离心机; 对照品均购于北京生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱比较

2.1.1 氨基酸薄层 取供试品 1 g, 加甲醇 10 mL, 超声处理 20 min, 滤过, 蒸干滤液, 残渣加甲醇溶解至 0.5 mL, 作为供试品溶液。另取丙氨酸、精氨酸、

[收稿日期] 2009-11-07

[基金项目] 国家中医药管理局科学技术研究专项 (04-05Z125)

[通讯作者] * 李先端, Tel: (010) 84036552; E-mail: Maoshujie@163.com

缬氨酸、亮氨酸适量,加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液各 16 μL 、氨基酸对照品溶液各 2 μL ,点于同一硅胶 G(自制板)板上,以正丁醇-冰醋酸-水(3.5 1 1)为展开剂,预饱和 30 min 后,展开 9 cm,取出,晾干。喷 2% 茚三酮乙醇溶液,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,显色,结果见图 1。

2.1.2 腺 呤薄层 取供试品 1 g,加 50% 乙醇 10 mL,超声处理 30 min,滤过,蒸干,残渣加 70% 乙醇溶解至 1 mL,作为供试品溶液。另取腺 呤适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 VIB)试验,吸取供试品溶液各 10 μL 、腺 呤对照品溶液各 2 μL ,点于同一含 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠

硅胶 GF254(自制板)板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-异丙醇-水(8 2 6 0.6)为展开剂,预饱和 20 min 后,展开 9 cm,取出,晾干。在紫外光灯(365 nm)下检视,可见供试品与对照品相同位置处有相同的荧光斑点见图 2。

2.1.3 -谷甾醇薄层 取 2.1.1 项下供试品溶液作为供试品溶液。另取 -谷甾醇适量,加甲醇制成每 1 mL 各含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2005 年版一部附录 B)试验,吸取供试品溶液各 10 μL 、-谷甾醇对照品溶液各 4 μL ,点于同一硅胶 G(自制板)板上,以石油醚-乙酸乙酯-甲酸(8 2 0.02)为展开剂,预饱和 30 min 后,展开 9 cm,取出,晾干。喷以 5% 磷钼酸乙醇溶液,105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点显色清晰,可见供试品与对照品相同位置处有相同颜色的斑点见图 3。

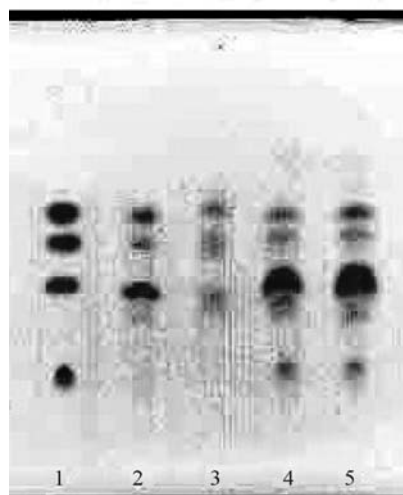


图 1 白附子氨基酸薄层色谱
1. 氨基酸(至下而上:精氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸); 2. 生品; 3. 老法制品; 4. 新法制品; 5. 新法制品

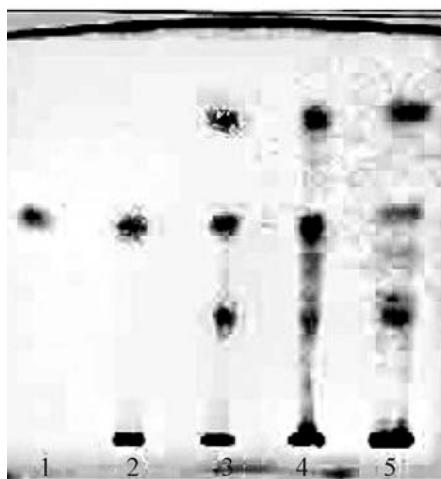


图 2 白附子腺 呤薄层色谱
1. 腺 呤; 2. 老法制品; 3. 生品; 4. 新法制品; 5. 新法制品

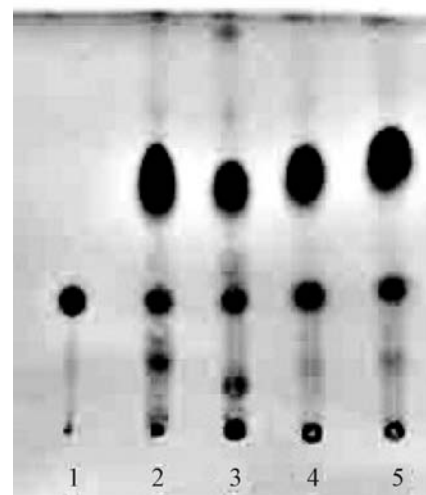


图 3 白附子 -谷甾醇薄层色谱
1. -谷甾醇; 2. 生品; 3. 老法制品; 4. 新法制品; 5. 新法制品

2.2 高效液相色谱比较

2.2.1 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相甲醇-水,梯度洗脱(见表 1),检测波长为 270 nm。

表 1 色谱梯度条件

时间/min	流速/mL·min ⁻¹	甲醇/%	水/%
0	0.8	0	100
5	0.8	0	100
15	0.8	1	99
30	1.0	25	75
40	1.0	90	10
50	1.0	95	5
60	1.0	100	0

2.2.2 供试品溶液制备 取样品粉末 1.0 g,精密称定,加水 10 mL,超声处理(100 W) 30 min,离心(3 000 r·min⁻¹) 10 min,倾出上清液,药渣再加水 10 mL,超声处理 10 min,离心(3 000 r·min⁻¹) 10 min,合并上清液,水浴浓缩至干,残渣用水溶解,转移至 10 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.5 μm)滤过,备用。

2.2.3 供试品溶液测定 精密吸取供试品溶液 20 μL ,依次注入 HPLC 仪,记录色谱图,见图 4,图 5,图 6;分别比较白附子生品以及新法、老法炮制品 HPLC 图的色谱峰,以 7 号峰为参照峰 S,分别计算相对保留时间见表 2,相对峰面积见表 3。

表 2 相对保留时间

样品		峰号										
		1	2	3	4	5	6	7/s	8	9	10	11
生品	RT/min	6.474	7.149	8.799	9.824	15.112	21.272	23.899	27.771	28.219	41.846	44.534
	RRT	0.271	0.299	0.368	0.411	0.632	0.89	1.0000	1.162	1.181	1.751	1.863
新品	RT/min	6.484	7.184	8.797	10.325	15.138	21.264	23.9161	27.765	28.224	41.846	44.534
	RRT	0.271	0.3	0.368	0.432	0.633	0.899	1.0000	1.161	1.18	1.75	1.862
老品	RT/min	—	—	—	—	—	21.183	23.906	—	—	41.853	44.542
	RRT	—	—	—	—	—	0.886	1.0000	—	—	1.751	1.863

表 3 相对峰面积

样品		峰号										
		1	2	3	4	5	6	7/s	8	9	10	11
生品	204 868	287 418	184 595	162 577	1 139 708	626 034	883 587	237 243	879 197	130 462	329 453	
	(0.232)	(0.325)	(0.209)	(0.184)	(1.29)	(0.709)	1.0000	0.268	0.995	0.148	0.373	
新品	330 441	435 531	202 521	112 897	1 402 963	811 754	933 263	259 388	909 218	95 007	291 123	
	(0.354)	(0.467)	(0.217)	(0.121)	(1.503)	(0.87)	(1.0000)	(0.278)	(0.974)	(0.102)	(0.312)	
老品	—	—	—	—	—	139 144	83 977	—	—	96 941	288 881	
	—	—	—	—	—	(1.657)	(1.000 0)	—	—	(1.154)	(3.44)	

注:括号内为该峰的相对保留时间

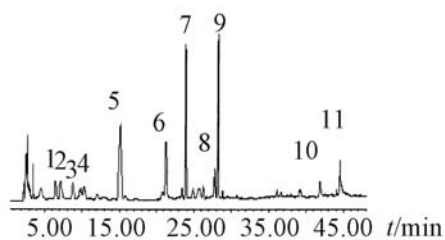


图 4 白附子生品指纹色谱

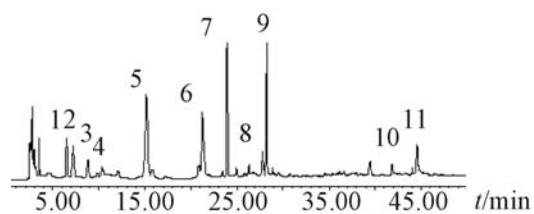


图 5 白附子新工艺制品(新法)指纹色谱

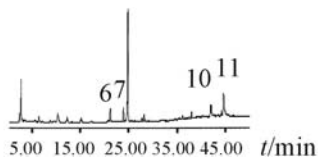


图 6 白附子炮制品(老法)指纹色谱

2.3 浸出物测定(参照药典方法)

2.3.1 乙醇浸出物测定 分别称取不同炮制品粉末(60目)约 3 g,置 250 mL 锥形瓶中,加 95% 乙醇 100 mL,称定重量,静置 1 h 后,连接回流冷凝管,加热至沸腾,并保持微沸 1 h,取下,放冷,再称定重量,用 95% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密吸取滤液 25 mL,置已干燥恒重的蒸发皿中,水浴上蒸发至干,于 105 ℃ 烘箱中干燥 3 h,移置干燥器中,冷却 30 min,精密称定重量,以干燥品计算测试品中醇浸

出物的质量分数(%).结果见表 4。

表 4 不同炮制品浸出物质量分数(n=2) /%

样品	乙醇浸出物	水浸出物
生品	0.40	32.61
新品	1.56	34.08
老品	0.66	43.67

2.3.2 水浸出物测定 分别称取不同炮制品粉末(60目)约 3 g,置 250 mL 锥形瓶中,加水 100 mL,其余同 2.3.1 方法,计算测试品中水浸出物的质量分数(%).结果见表 4。

醇与水的浸出物含量测定结果表明,新工艺制品的浸出物含量较高,说明采用新法炮制的白附子饮片,内含物质保存多,且溶出率增加。

3 讨论

白附子为植物类药材,超微粉碎技术可以将其细胞壁完全打破,使药材的有效成分暴露出来,而不需要通过透壁(膜)释放过程。因此,药物的粒径越细,则其比表面积越大,越有助于药物有效成分的溶出和吸收,可提高药物的利用度。又根据物理学知识,粒径在此范围内的颗粒中药,所含药效学物质基础与原传统中药饮片相比,将不会发生明显的分子结构变化。因此微米中药能在保持传统中药固有的物质基础前提下,提高药效。本文选择白附子所含

氨基酸等成分,对其新工艺制品、老工艺制品与生品进行了同步的薄层比较。从结果可见,氨基酸、腺嘌呤类是新工艺制品与生品含量基本一致,斑点清晰,而老法制品上述成分流失较大,色谱斑点微弱。谷甾醇也是新品保持与生品的一致。水、醇浸出物结果表明,新品的浸出物含量最高。

本文采用高效液相色谱技术,比较了白附子生品、新品、老品水提取物,结果显示白附子生品和新品色谱峰相似,与老品差异较大,老品水提取物的色谱峰明显少于生品和新品。表明其水溶性成分丢失严重,这与文献^[3]报道结果相似。而新品保留了白附子内在成分基本不变。综上结果证明,超微粉碎新法工艺在消除了白附子麻辣刺激性的同时,基本保持原药主要成分,且方法简便、节省了中药材资源,节约了成本。

实验还对甲醇提取物、石油醚提取物进行了色谱峰试验比较,也发现新品和生品的色谱峰较为相似,而与老品明显不同。但由于甲醇提取物、石油醚提取物中成分含量较低,还未得到较好的色谱谱,以

后再深入探讨。

[参考文献]

- [1] 吕文海. 中药炮制学[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 81.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 80.
- [3] 姚三桃, 杨滨. 白附子新老炮制品化学成分比较[J]. 中国中药杂志, 1993, 1(5): 212.
- [4] 王毅, 张静修. 制白附子饮片中铝含量的研究[J]. 中成药, 1992, 14(2): 22.
- [5] 李先端, 程立平, 仝燕, 等. 祛除白附子麻辣刺激性新技术—超微粉碎[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(9): 26.
- [6] 吴皓, 李伟, 韩洪涛, 等. 半夏刺激性成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(12): 725.
- [7] 钟凌云, 吴皓, 张科卫, 等. 生半夏中草酸钙针晶的刺激性作用研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(20): 1706.
- [8] 赫炎, 冯雪峰, 孙洁, 等. 天南星中草酸钙针晶形态炮制前后变化比较[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1015.

欢迎订阅 2010 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》是经中国科技部批准,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物。已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊);“中国中文核心期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊;“中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊(光盘版)优秀期刊”。本刊创刊于1995年10月。本着以提高与普及相结合的办刊方针。主要设置:制剂工艺、化学与分析、药理、临床、综述、基层园地、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量分析、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。

《中国实验方剂学杂志》现为月刊,16开本,130页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价10元,全年120元。国内外公开发行人,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部。邮编:100700,联系人:何希荣,联系电话:(010) 84076882 或 64014411 转 2849; E-mail: czd@ vip. sina. com