

不同炮制方法对川乌双酯型生物碱含量的影响

梁泽华¹, 尹丽娜², 杨燕¹, 熊耀康^{1*} (1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要:目的 研究炮制方法对川乌双酯型生物碱含量的影响。方法 将生川乌分别通过药典法、黑豆法和米醋法进行炮制, 以 RP-HPLC 结合梯度洗脱的色谱方法为检测手段, 比较分析不同川乌炮制方法对双酯型生物碱(主要为乌头碱、次乌头碱)含量的影响。结果 3 种炮制方法均可显著降低生川乌中乌头碱、次乌头碱的含量。所建立的色谱方法可定量分析炮制品中双酯型生物碱。结论 不同炮制方法对生川乌均能起到减毒作用。

关键词: 川乌; 炮制方法; 双酯型生物碱; 高效液相色谱法; 梯度洗脱

中图分类号: R283.3 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2009)04-0288-04

The Effect of the Processing Methods on the Content of Diacrylate Alkaloids of *Radix Aconiti*

LIANG Zehua¹, YIN Lina², YANG yan¹, XIONG Yaokang^{1*} (1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of the processing methods on the content of diacrylate alkaloids of *Radix Aconiti* (RA). **METHODS** The RA was processed, using Ch. P, Black Bean and Vinegar law methods. RP-HPLC with gradient elution was established for determining the content of diacrylate alkaloids (mainly aconitine, hypaconitine). **RESULTS** Three processing methods

基金项目: 浙江省中医药管理局(2006C001)和浙江中医药大学校级重点(1710052)资助项目

作者简介: 梁泽华, 女, 博士研究生 Tel: 13858042221 E-mail: z_h_liang@126.com * **通讯作者:** 熊耀康, 男, 教授
E-mail: xiongyaokang@tom.com

can significantly reduce the contents of aconitine and hypaconitine. Chromatographic methods established can be applied to the quantitative analysis of the diacrylate alkaloids of processed products. **CONCLUSION** The described processing methods can reduce the content of diacrylate alkaloids of RA.

KEY WORDS: *Radix Aconiti*; processing methods; diacrylate alkaloids; HPLC; gradient elution

川乌为常用中药,是毛茛科植物乌头(*Aconitumcarmichaeli* Debx.)的干燥母根^[1],具有回阳救逆、温中补肾、散寒止痛等功效。川乌生品有大毒,其中所含的双酯型生物碱乌头碱、次乌头碱等既是有效成分,又是毒性成分,且治疗量与中毒量接近,经加工炮制后此类成分转化为单酯型生物碱,从而减小毒性^[2]。因此,炮制过程中应严格控制双酯型生物碱的转化程度,防止炮制不充分,有毒成分含量偏高,用药不安全;而炮制太过,有效成分流失严重,则影响疗效。中国药典^[1]虽然对制川乌的酯型生物碱和总生物碱进行限度控制,但检测方法的专属性较低。

为兼顾川乌炮制过程中的安全性和有效性,本研究以新建立的 RP-HPLC 检测川乌中的双酯型生物碱(主要测定乌头碱、次乌头碱),对 3 种经典炮制方法,包括中国药典^[1]收载的方法(简称药典法)和文献方法(简称黑豆法^[3]和米醋法^[4]),以及炮制时间进行考察和评价。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-10AT VP 双泵高效液相色谱仪(日本岛津),SPD-10AT VP 紫外检测器(日本岛津)。

1.2 试药

生川乌由长河同春堂药店提供,经浙江中医药大学黄真教授鉴定为毛茛科植物乌头的干燥母根;乌头碱和次乌头碱对照品(中国药品生物制品检定所,色谱纯度>98%,乌头碱批号:1107202200410,次乌头碱批号:079829403);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 川乌的炮制

2.1.1 未炮制品 直接取生川乌洗净,晾晒,切片,干燥,粉碎备用(1号样品)。

2.1.2 药典法 采用中国药典^[1]收载的方法并略作改进进行炮制,即取生川乌,洗净,用水浸泡 12 h,取出,分别加水煮 2 h(2号样)和 3 h(3号样),取出,晾晒至六成干,切片,干燥,粉碎备用。

2.1.3 黑豆法 采用文献中的方法^[3]略作改进进行炮制,既取生川乌,洗净,用水浸泡 12 h,取出,加

黑豆、甘草、生姜(川乌每 100 kg,用甘草 5 kg,黑豆 10 kg,生姜 10 kg),分别加水煮 2 h(4号样)和 3 h(5号样),取出,除去黑豆、甘草、生姜,晾晒至六成干,切片,干燥,粉碎备用。

2.1.4 米醋法 采用《中药炮制学》^[4]中使用的方法略作改进,既取生川乌,洗净,用水浸泡 48 h,每天换水 2 次,取出。先将生姜一定量加水煮开 10 min,取汁,然后将米醋、生姜汁(川乌每 50 kg,米醋 1.25 kg,生姜 1.25 kg)与浸泡后川乌分别加水共煮 45 min(6号样)和 90 min(7号样),取出,晾晒至六成干,切片,干燥,粉碎备用。

2.2 样品中双酯型生物碱的 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件 参考文献的方法^[5-6]并略作改进,色谱柱为 platisil ODS(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相:乙腈(A)-0.05 mol·L⁻¹醋酸胺(pH10.5)(B),梯度洗脱:0~10 min,60%→52%A;10~15 min,52%A;15~16 min,52%→68%A;16~25 min,68%A;25~26 min,68%→90%A;26~30 min,90%A;柱温:30℃,流速:1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 240 nm。

2.2.2 对照品储备液的制备 精密称取乌头碱和次乌头碱对照品适量,置同一量瓶中,加乙腈溶解稀释至刻度,得到乌头碱(0.105 mg·mL⁻¹)、次乌头碱(0.470 mg·mL⁻¹)的混合标准溶液,冷藏备用。

分别精密称取乌头碱和次乌头碱对照品适量,置量瓶中,加乙腈溶解稀释至刻度,得到乌头碱(0.142 mg·mL⁻¹)、次乌头碱(0.283 mg·mL⁻¹)的标准溶液,冷藏备用。

2.2.3 供试品溶液的制备^[5] 精密称取川乌中粉约 1 g,置于磨口三角瓶中,加入 10% 氨溶液 1 mL,搅拌均匀,加入 25 mL 乙醚,超声 30 min 后再补加 5 mL 乙醚,放置过夜,过滤,分别用 15 mL 乙醚洗涤 3 次滤渣,合并醚液,挥干,残渣用乙腈溶解并定容为 5 mL,冷藏备用。

2.2.4 线性试验 精密移取混合对照品储备液适量,稀释适当倍数得到下列浓度(按乌头碱计)的溶液:0.53,2.10,4.21,8.42,12.62,16.83,21.04 μg·mL⁻¹。精密取 20 μL 续滤液,按“2.2.1”项下色谱条件测定。以峰面积(Y)为纵坐标,浓度(X)

为横坐标,进行回归,得回归方程:乌头碱 $Y = 6\,869.1X + 130.22 (r = 0.999\,9)$,线性范围为 $0.53 \sim 21.04\,\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;次乌头碱 $Y = 6\,091.1X + 1\,735.3 (r = 0.999\,9)$,线性范围为 $2.35 \sim 94\,\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.5 仪器精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 $20\,\mu\text{L}$,在“2.2.1”色谱条件下,连续进样 5

表 1 乌头碱、次乌头碱回收率($n=6$)

Tab 1 Recovery for the assay of aconitine and hyaconitine($n=6$)

	称样量/mg	样品含药量/ μg	加入量/ μg	测得总量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
乌头碱	503.2	1.46	1.42	2.82	96.01	97.71	1.99
	510.5	1.48	1.42	2.85	96.29		
	509.3	1.48	1.42	2.87	97.64		
	511.1	1.48	1.42	2.91	101.01		
	513.6	1.49	1.42	2.89	98.87		
	505.3	1.47	1.42	2.84	96.42		
次乌头碱	503.2	28.18	28.36	55.57	96.59	99.06	1.53
	510.5	28.59	28.36	56.79	99.45		
	509.3	28.52	28.36	57.05	100.61		
	511.1	28.62	28.36	56.65	98.84		
	513.6	28.76	28.36	57.27	100.55		
	505.3	28.30	28.36	56.18	98.31		

2.2.7 稳定性试验 称取样品 1 份,按“2.2.3”项操作,在“2.2.1”色谱条件下,分别在 0,2,4,8,12,24,36 h 进样,结果乌头碱,次乌头碱的 RSD 分别为 1.38%,1.82%。

2.2.8 最低检测限的确定 将混合对照品稀释到合适的浓度,使峰高约为噪音的 3 倍,结果乌头碱,

次,记录峰面积,结果乌头碱,次乌头碱 RSD 分别为 1.44%,1.66%,均小于 2% 符合要求。

2.2.6 回收率试验 精密称取已知含量的 7 号样品约 500 mg,共 6 份,每份分别加入乌头碱,次乌头碱对照品适量,按“2.2.3”项操作,在“2.2.1”色谱条件下测定,计算乌头碱,次乌头碱回收率。结果见表 1。

次乌头碱检测限分别为 $0.053\,\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.024\,\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.9 样品含量测定 取“2.2.3”项下制备供试样品溶液各 $20\,\mu\text{L}$,按“2.2.1”色谱条件测定峰面积,计算含量,结果见表 2,混合对照品及供试品色谱图见图 1。

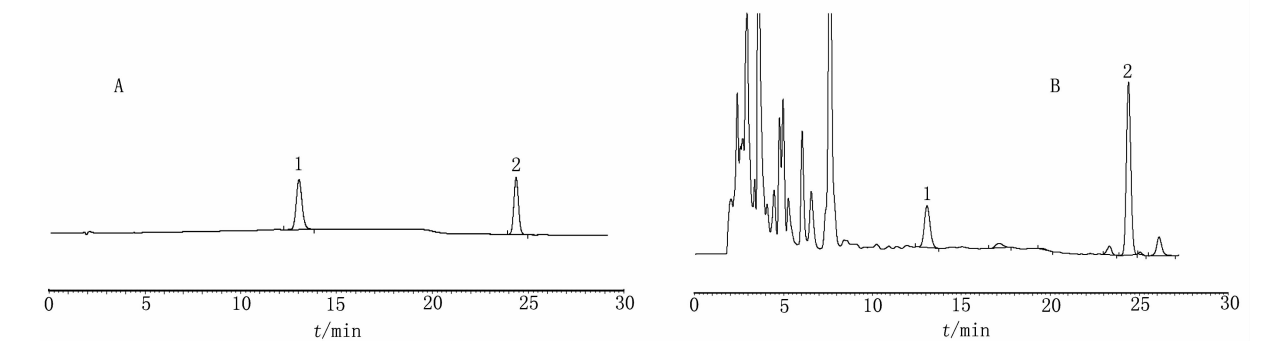


图 1 混合对照品(A)和制川乌样品(B)HPLC 色谱图
1 - 乌头碱;2 - 次乌头碱

Fig 1 HPLC chromatograms of standard reference(A) and *Radix Aconiti Preparata* sample(B)

1 - aconitine;2 - hyaconitine

3 讨论

由表 2 可知,与生川乌比较,3 种炮制方法及炮制工艺(炮制时间)对川乌中双酯型生物碱——乌头碱和次乌头碱的含量均有不同程度影响,炮制时间越长,生物碱含量越低。药典法炮制品中乌头碱和乌头碱含量与和黑豆法的相近,可能与 2 种方法

的水煮时间一致有关。米醋法乌头碱、次乌头碱的含量明显高于药典法和黑豆法,其中样 2 乌头碱和次乌头碱含量分别为样 6 的 5 倍和 2 倍。炮制时间对双酯型乌头碱含量的影响可能较大,米醋法中虽然加入米醋、生姜汁,但由于煎煮炮制时间较短,双酯型乌头碱的下降程度较另 2 种方法为低。目前,

中国药典对制川乌的酯型生物碱进行限量(0.15%),但测定方法的专属性较低,究竟制川乌中乌头碱和次乌头碱的含量以多少为宜,炮制时采用何种炮制方法更能兼顾制川乌的安全性和有效性,可能需要进一步的体内试验来确定。

乌头中生物碱的分析方法较多,有滴定法^[7]、薄层扫描法^[8]、高效液相色谱法^[5-6]、毛细管电泳法^[9]及气相色谱法等,其中以 HPLC 应用最为广泛。当分别采用甲醇-乙腈-水(67:2:38,内含 6 mmol 十二烷基磺酸钠,0.02 mol · L⁻¹磷酸二氢钠,pH 4.5)的离子对 HPLC 色谱系统^[10]和以甲醇-三乙胺系统(pH 6.0)为流动相的色谱系统时,乌头碱与次乌头碱均能得到良好分离,但峰形较宽,柱效较低。而采用乙腈-0.05 mol · L⁻¹醋酸铵(pH 10.5)进行梯度洗脱,乌头碱与次乌头碱不但分离良好,而且柱效高,与文献已报道等度洗脱方法比较^[6],梯度洗脱法出峰快、峰形对称,实验方便快捷。

REFERENCES

- [1] Ch. P(2005) Vol I (中国药典 2005 年版.一部)[S]. 2005; 26.
- [2] ZHANG Y M, LU J, JIANG Y, et al. HPLC determination of Aconitum alkaloid and their hydrolysis products in *Radix Aconiti* and its preparata [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2005, 25(7): 807-812.

- [3] CHAN T Y, TAM H P, LAI C K, et al. A multidisciplinary approach to the toxicologic problems associated with the use of herbal medicines[J]. Ther Drug Monit, 2005, 27(1): 53-57.
- [4] XU C J. Science of processing Chinese medicinal herbs(中药炮制学) [M]. Shanghai: Shanghai Science Press, 1985: 154.
- [5] ZHENG H S, FENG N P. HPLC determination of aconitine and hypaconitine in prepared Chuan wu and Cao wu [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2005, 25(1): 34-36.
- [6] ZHAO Y Y, CUI X M, DAI Y, et al. Determination of active ingredients in *Radix Aconiti* Kusnezoffii by HPLC [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2007, 42(11): 815-818.
- [7] HE J, ZHU L, FENG J F. Comparison on determination of total alkaloids from *Radix Aconiti* lateralis preparata by titration and UV [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2003, 6(17): 20-22.
- [8] QU F L, DING Q L, ZHANG J B, et al. Determination of Meaconitine in Tongdean capsules by TLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2000, 17(5): 390-391.
- [9] SUN A M, CHEN D H, BI P X. Determination of the aconitine alkaloids in traditional Chinese medicine Chuan wu and Cao wu by high performance capillary electrophoresis(HPCE) [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 1999, 1(1): 67-69.
- [10] PENG B, YANG H Y, LIU S R. Studies on separation and determination of three main Alkaloids in the traditional Chinese medicine *Radix Aconiti* (Chuan Wu) and *Radix Aconiti* lateralis preparata slice (Fu Pian) by RP-Ion Pair HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 1995, 15(6): 13-16.

收稿日期: 2008-03-24