

草乌豆腐法炮制工艺研究

赵维良¹, 严爱娟², 黄琴伟¹, 谭春梅¹, 张文婷^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100)

摘要: 目的 探索最佳的豆腐法炮制草乌的工艺参数。方法 采用 $L_{16}(4^3)$ 正交试验方法, 以浸漂时间, 水煮时间和豆腐用量 3 因素, 各设置 4 水平进行 16 次试验, 每次实验结果均以单酯型和双酯型生物碱总量测定数据为评判指标。结果 浸漂时间 4 水平 4 次试验结果的单酯型生物碱含量分别为 0.11%, 0.07%, 0.062% 和 0.048%; 水煮时间 4 次结果的含量分别为 0.081%, 0.066%, 0.074% 和 0.067%; 豆腐用量 4 次结果的含量分别为 0.070%, 0.072%, 0.080% 和 0.073%; 双酯型生物碱 16 次测定结果均 $<0.034\%$ 。3 因素中对单酯型生物碱含量影响大小的次序为浸漂时间 $>$ 水煮时间 $>$ 豆腐用量。在实验条件下, 毒性成分双酯型生物碱均小于中国药典的限度要求, 符合规定, 而毒性成分双酯型生物碱总量随豆腐用量的增加而明显减少。结论 豆腐法炮制草乌的最佳工艺条件为 $A_3B_3C_2$, 即浸漂 6 d, 水煮 5 h, 加豆腐 25%。

关键词: 草乌; 制草乌; 北乌头; 豆腐法炮制; 炮制工艺

中图分类号: R283.3 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)01-0107-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.024

引用本文: 赵维良, 严爱娟, 黄琴伟, 等. 草乌豆腐法炮制工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 107-110.

Study on the Processing Technology for Aconiti Kusnezoffii Radix by Bean Curd

ZHAO Weiliang¹, YAN Aijuan², HUANG Qinwei¹, TAN Chunmei¹, ZHANG Wenting^{1*} (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the best parameters of processing Aconiti Kusnezoffii Radix by bean curd. **METHODS** Orthogonal test [$L_{16}(4^3)$] was adopted to investigate soaking time, decocting time and bean curd proportion on the processing technology, in which sixteen experiments were set up. The monoester alkaloids and diester-alkaloids were measured as the evaluation indexes. **RESULTS** The contents of monoester alkaloids were 0.11%, 0.07%, 0.062% and 0.048% respectively under the four levels of soaking time; 0.081%, 0.066%, 0.074%, 0.067% respectively under the four levels of decocting time; 0.070%, 0.072%, 0.080%, 0.073% respectively under the four levels of bean curd proportion. The contents of diester-alkaloids of the 16 processed samples were all $<0.034\%$. The order of the influence on the content of monoester alkaloids was: soaking time $>$ decocting time $>$ bean curd proportion. Under any of the above conditions, the diester-alkaloids were all less than the limit of Chinese Pharmacopoeia. The contents of diester-alkaloids were reduced clearly with the increase of the amount of bean curd. **CONCLUSION** The best parameters of the processing are as follows: soaking time is 5 d, decocting time is 5 h and bean curd proportion is 25% of medicinal herbs.

KEY WORDS: Aconiti Kusnezoffii Radix; prepared Aconiti Kusnezoffii Radix; Aconitum kusnezoffii; process with bean curd; processing technology

草乌为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根, 收载于历版中国药典一部, 性辛、苦, 热, 有大毒, 功能祛风除湿, 温经止痛, 用于风寒湿痹, 关节疼痛, 心腹冷痛, 寒疝作痛及麻醉止痛。因其有大毒, 内服均需经炮制。其炮制方法众多, 有水煮^[1]、润蒸或润煮相结合^[2]、润后蒸^[3]、润后高压蒸^[4]、醋制^[5]、诃子制^[6], 另尚有甘草制、童尿制、酸奶制^[7]等方法, 而浙江省中药炮制规范^[8-9]采用豆腐制方法, 但该

法迄今未见有详细的工艺研究报道。

本研究以草乌的毒性成分双酯型生物碱乌头碱($C_{34}H_{47}NO_{11}$)、次乌头碱($C_{33}H_{45}NO_{10}$)和新乌头碱($C_{33}H_{45}NO_{11}$)的总量及有效成分单酯型生物碱苯甲酰乌头原碱($C_{32}H_{45}NO_{10}$)、苯甲酰次乌头原碱($C_{31}H_{43}NO_9$)及苯甲酰新乌头原碱($C_{31}H_{43}NO_{10}$)的总量为指标, 以浸漂时间、水煮时间和豆腐用量为考察因素, 采用正交试验设计法对豆腐制草乌的炮制工艺进行优选。

作者简介: 赵维良, 男, 硕士, 主任中药师 Tel: (0571)86452373
(0571)86459425 E-mail: leozhwt@163.com

E-mail: zwl@zjyj.org.cn *通信作者: 张文婷, 女, 主任中药师 Tel:

1 仪器与材料

HP 1100 高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司); Welch XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 上海 Welch Materials 公司); Milli-Q Advantage A 超纯水机(美国 Millipore 公司); Minispin 12000 离心机(德国 Eppendorf 公司); Elmasonic P 超声波清洗仪(德国 Elma 公司); XPE-205 型分析天平(Mettler Toledo); QYJ-440 韩切机(上海康健中药机械制造有限公司); 可倾式反应锅(杭州玉派轻工机械制造有限公司)。

乙腈(色谱纯)、四氢呋喃(色谱纯 Merck), 氨水(分析纯)、三氯甲烷(分析纯)均由上海沃凯生物技术有限公司提供; 乙酸铵(分析纯)、冰醋酸(分析纯)、异丙醇(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯)均购自太仓沪市试剂有限公司; 水为超纯水; 豆腐(食用级, 购于市场)。对照品: 乌头碱(批号: 112019-201601, 含量: 99.2%)、新乌头碱(批号: 110799-200505, 含量: 100%)、次乌头碱(批号: 110798-201307, 含量: 98.4%)、苯甲酰乌头原碱(批号: 111794-201303, 含量: 98.8%)、苯甲酰新乌头原碱(批号: 111795-201303, 含量: 96.3%)、苯甲酰次乌头原碱(批号: 111796-201303, 含量: 97.5%)均来自中国食品药品检定研究院。样品: 草乌产地为临安市昌化镇, 批号: D170509, 由杭州华东中药饮片有限公司提供, 经浙江省食药检院郭增喜主任中药师鉴定为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根。

2 方法和结果

2.1 正交试验设计

根据浙江省中药炮制规范, 豆腐法炮制草乌的步骤为先用清水浸漂, 再加豆腐与水共煮, 取出草乌, 晾至半干, 切片, 干燥, 其中关键因素为浸漂时间、水煮时间和豆腐用量。根据以往的经验 and 本次初试结果, 按使试验样品含量测定的结果分布于中国药典规定的单酯型生物碱上限和下限附近及双酯型生物碱上限以下的要求, 选用浸漂时间(A)、水煮时间(B)和豆腐用量(C)作为考察因素, 每个因素拟定 4 个水平, 见表 1, 采用 L₁₆(4³)正交试验设计对 A、B 及 C 进行优选。

2.2 试验安排及结果

正交试验的炮制品以总单酯型生物碱含量和总双酯型生物碱限量为指标, 参照中国药典 2015 年版一部^[1]收载的“制草乌”项下单酯型含量测定

和双酯型生物碱检查方法进行。实验结果混合对照品和代表性样品的 HPLC 图谱见图 1, 测定结果见表 2~3。

另取同批号生草乌样品, 按同法测定, 结果单酯型生物碱总量为 0.081%, 双酯型生物碱总量为 0.239%。

表 1 L₁₆(4³)正交试验设计

Tab. 1 Design of L₁₆(4³) orthogonal test

水平	因素		
	A 浸漂时间/d	B 煎煮时间/h	C 豆腐用量与原药的百分比/%
1	4	3	0
2	5	4	15
3	6	5	25
4	7	6	35

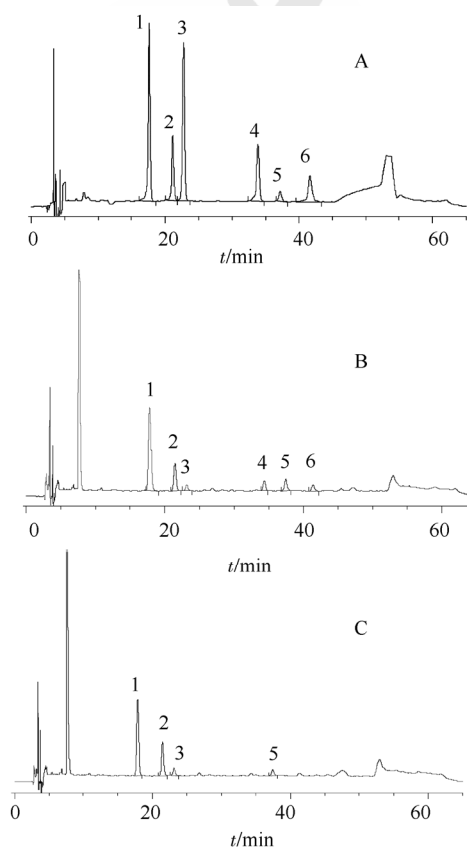


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液(参数为: 浸漂 4 d, 煎煮 3 h, 豆腐用量 0); C-供试品溶液(参数: 浸漂 4 d, 煎煮 4 h, 豆腐用量 15%); 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。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution(soaking time: 4 d, decocting time: 3 h, bean curd proportion: 0 of medicinal herbs); C-sample solution(soaking time: 4 d, decocting time: 4 h, bean curd proportion: 15% of medicinal herbs); 1-benzoylmesaconine; 2-benzoylaconitine; 3-benzoylhypaconitine; 4-mesaconitine; 5-hypaconitine; 6-aconitine.

表 2 L₁₆(4³)正交试验试验安排及计算结果
Tab. 2 Design and results of L₁₆(4³) orthogonal test

实验号	A	B	C	D(空)	E(空)	含量/%	
						单酯型生物碱×10	双酯型生物碱×10
1	1	1	1	1	1	1.000	0.034
2	1	2	2	2	2	0.900	0.008
3	1	3	3	3	3	1.310	0.005
4	1	4	4	4	4	1.020	0.000
5	2	1	2	3	4	0.990	0.027
6	2	2	1	4	3	0.700	0.004
7	2	3	4	1	2	0.740	0.003
8	2	4	3	2	1	0.750	0.000
9	3	1	3	4	2	0.650	0.011
10	3	2	4	3	1	0.560	0.003
11	3	3	1	2	4	0.740	0.003
12	3	4	2	1	3	0.540	0.000
13	4	1	4	2	3	0.600	0.003
14	4	2	3	1	4	0.500	0.000
15	4	3	2	4	1	0.450	0.000
16	4	4	1	3	2	0.360	0.000
I j(单酯)	4.230	3.240	2.800	2.780	2.760	G=11.810 G ² =139.476 CT=8.717	
II j(单酯)	3.180	2.660	2.880	2.990	2.650		
III j(单酯)	2.490	3.240	3.210	3.220	3.150		
IV j(单酯)	1.910	2.670	2.920	2.820	3.250		
Rj(单酯)	9.463	8.800	8.741	8.747	8.781		
Sj	0.746	0.083	0.024	0.030	0.064		

表 3 单酯型含量分析结果
Tab. 3 The anova results of monoester alkaloids

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.746	3	31.129	1)
B	0.083	3	3.449	
C 误差	0.024	3		

注: F₁-0.01(3, 3)=29.5; F₁-0.05(3, 3)=9.28; F₁-0.10(3, 3)=5.39;
1)极显著。
Note: F₁-0.01(3, 3)=29.5; F₁-0.05(3, 3)=9.28; F₁-0.10(3, 3)=5.39;
1)extremely significant.

浸漂时间 4 水平 4 次试验结果的单酯型生物碱含量分别为 0.11%, 0.07%, 0.062%和 0.048%; 水煮时间 4 次结果的含量分别为 0.081%, 0.066%, 0.074%和 0.067%; 豆腐用量 4 次结果的含量分别为 0.070%, 0.072%, 0.080%和 0.073%; 双酯型生物碱 16 次测定结果均<0.034%。豆腐用量 4 水平实验结果, 毒性成分双酯型生物碱总量分别为 0.010%, 0.009%, 0.004%和 0.002%。

2.3 结果分析

2015 版中国药典对单酯型生物碱的含量规定

为 0.020%~0.070%, 对双酯型生物碱的限量规定为≤0.040%。本次实验测定结果, 生草乌单酯型生物碱含量为 0.081%, 双酯型生物碱含量为 0.239%。由表中数据可知, 炮制后剧毒的双酯型生物碱的含量大大降低, 均<0.034%, 单酯型生物碱含量均高于原生品的含量, 在 0.036%~0.131%间。

根据试验结果和方差分析判断, 各因素对单酯型生物碱含量的影响程度为: 浸漂时间>煎煮时间>豆腐用量, 其中浸漂时间有极显著影响, 煎煮时间和豆腐用量影响较小。其含量均与浸漂、水煮时间及豆腐用量呈负相关。在浸漂时间为 4 d 时, 单酯型生物碱的含量最高可达 0.131%, 大大超过 2015 版中国药典对单酯型生物碱的含量规定, 浸漂时间 4 d 及 5 d 的单酯型生物碱含量均超标, 因此, 浸漂时间应选择 6 d, 水煮时间可选择 5 h, 豆腐用量可为 25%。

根据极差分析, 各因素对双酯型生物碱含量的影响为煎煮时间>浸漂时间>豆腐用量, 其中煎煮时间为主要影响因素, 水煮时间及豆腐用量亦

有一定影响,各因素与双酯型生物碱含量均呈负相关。豆腐用量 4 水平实验结果,毒性成分双酯型生物碱总量分别为 0.010%, 0.009%, 0.004%和 0.002%,随豆腐用量的增加而明显减少,本次测得的双酯型生物碱含量均在 2015 版中国药典对双酯型生物碱的限量规定 0.040%限度以下,均符合规定,且数据均较低,个别样品未检出,故不再作方差分析。

3 结论

3 因素中对单酯型生物含量影响大小的次序为漂洗时间>水煮时间>豆腐用量。在实验条件下,毒性成分双酯型生物碱均小于中国药典的限度要求,均符合规定。豆腐法炮制草乌的最佳工艺条件为 $A_3B_3C_2$,即浸漂 6 d,水煮 5 h,豆腐用量 25%。在浸漂时间为 4 d,煎煮时间为 3 h,不加豆腐时即 $A_1B_1C_1$ 条件下炮制,单酯型生物碱的含量最高,但远超过药典限度的上限。毒性成分双酯型生物碱总量随豆腐用量的增加而明显减少。

4 讨论

本次正交试验的设计和结果判断与常规的有所不同,最佳条件是使制得的样品单酯型生物碱上下限范围内较偏高的水平,双酯型生物碱则必须在上限以下,且越低越佳。而常规的正交设计判断标准为得率越高越佳。

浙江传统经验认为豆腐在草乌炮制中能起到更好的解毒作用,根据本实验豆腐用量 4 水平实验结果,毒性成分双酯型生物碱总量随豆腐用量的增加而明显减少,本研究结果有力支持了浙江省中药炮制规范草乌使用豆腐炮制的合理性。

草乌为剧毒药材,毒性成分为双酯型生物碱,经过炮制,制草乌成分转化为单酯型生物碱,单

酯型生物碱为有效成分,毒性极低。中国药典对制草乌单酯型生物碱确定了上下限度,另对双酯型生物碱确定了合理上限,在确保安全的前提下保证临床疗效。根据研究结果,如果减少浸漂或水煮时间,再加豆腐,可在保证双酯型生物碱限量符合要求的情况下,单酯型生物碱的量尚有提高的潜力,如此可进一步提高临床疗效,或在相同疗效的情况下可减少制草乌的用量,以节省资源。故建议中国药典提高单酯型生物碱含量的限度。

REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S]. 2015: 237.
- [2] CAI B C, NIE C X, NANBO H X, et al. Research on the processing of preparing *Aconitum* Chinese Past [J]. Acta Chin Med Pharm(中国医药学报), 1990, 5(3): 30-32.
- [3] 蔡宝昌,何亚维,支敏倩,等.草乌炮制新工艺的研究[J]. 中药材, 1993, 16(5): 21-23.
- [4] LIN H, DENG G H, GONG Y M. Study on modern processing technologies of *Aconiti Kusnezoffii* Radix [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2014, 37(7): 1163-1166.
- [5] DU H, LIU Q Y, LIU X Y, et al. Influence of ester-type *Aconitum* alkaloids on *Radix Aconiti Kusnezoffii* processed by different kinds of vinegar [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2013, 31(10): 2156-2158.
- [6] YANG H X, D Y Z, XIAO Y C, et al. Study of processing *aconitum* with myrobalan [J]. West China J Pharm Sci(华西药科学杂志), 2011, 26(6): 572-576.
- [7] 安秀梅,盛惟,林燕,等.草乌不同炮制方法的功效对比研究[J]. 内蒙古中医药, 2014(7): 89-91.
- [8] 浙江省中药炮制规范[S]. 2005: 73.
- [9] HUANG Q W, GUO Z X, MA L K, et al. Analysis of processing of toxic traditional Chinese medicines in Zhejiang processing Chinese crud drugs 2015 edition [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(6): 786-789.

收稿日期: 2017-09-21

(本文责编: 李艳芳)