

正交试验法优选附子高压蒸制工艺

方莉², 林华^{1*}, 邓广海¹, 龚又明¹

(1. 广东省中医院药学部, 广州 510120; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的: 优选附子的高压蒸制工艺。方法: 以双酯型生物碱含量、总生物碱含量及外观质量为综合评价指标, 对高压蒸制时间、压力及软化方式 3 个因素进行考察, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选附子的高压蒸制工艺。结果: 附子最佳高压蒸制工艺为 $A_2B_2C_2$, 即附子经润湿法处理后, 0.10 MPa 压力下蒸制 150 min。结论: 该优选的工艺简便、易行、可控, 可作为代替附子传统炮制工艺的新方法。

[关键词] 附子; 高压蒸制; 正交设计; 双酯型生物碱; 单酯型生物碱; 总生物碱

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)23-0020-05

Optimization of High Pressure Steaming Process of *Aconitum carmichaelii* by Orthogonal Test

FANG Li², LIN Hua^{1*}, DENG Guang-hai¹, GONG You-ming¹

(1. Department of Pharmacy, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize high pressure steaming process of *Aconitum carmichaelii*. **Method:** Orthogonal test was used to optimize high pressure steaming process of *A. carmichaelii* with appearance quality, the content of diester diterpenoid alkaloids and total alkaloid as comprehensive evaluation index, high pressure steaming time, pressure and softening way were selected as factors. **Result:** Optimum high pressure steaming technology was $A_2B_2C_2$, that of treated by wetting method, steamed 150 min at 0.10 MPa. **Conclusion:** This optimized process was simple, practical and easy to control, it could be used as a new method to replace traditional processing technology of *A. carmichaelii*.

[Key words] *Aconitum carmichaelii*; high pressure steaming; orthogonal design; diester diterpenoid alkaloids; monoester alkaloid; total alkaloid

附子为温中回阳救逆之要药,其功效被历代医家所首肯。但附子生品有大毒,所含的乌头碱等酯型生物碱既是有效成分,又是毒性成分,且安全范围较小,有效的炮制可使双酯型生物碱水解为单酯型生物碱,达到降毒存效的效果。若炮制不及,则毒性

太大,若炮制太过,则药效不存。目前还没有能同时控制附子毒性和保证疗效的炮制工艺规范,同时未能表明附子安全性和有效性的科学、量化的质量标准,造成各地附子炮制品的质量相差很大^[1]。2010年版《中国药典》中附子的制法为常压蒸法和煮法相结合^[2],该方法耗时耗能,需炮制人员凭借经验来判断炮制终点,可控性较低,且炮制过程中有效成分损失严重。传统炮制工艺是在产地进行洗净、泡胆巴、煮、剥皮、切片、漂片、蒸片、烤片等处理,在此过程中,附子中生物碱流失高达 81.3%,其中泡胆巴 31.6%,漂片 33.6%,蒸片 16.1%^[3]。高压蒸制法由于其操作简单、可控、省时,且去毒效果好,已成为现代研究的热点。本研究参考川乌高压炮制工

[收稿日期] 20120803(005)
[基金项目] 广东省科技厅课题 (2009B030801300)
[第一作者] 方莉, 硕士, 从事中药质量控制和安全性评价研究, Tel: 15920450369, E-mail: 244395389@qq.com
[通讯作者] * 林华, 硕士, 主任中药师, 从事中药质量控制和安全性评价研究, Tel: 13600468665, E-mail: lh33895380@163.com

艺^[4],采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对高压蒸制的主要因素进行考察,多指标综合优选附子的高压蒸制工艺,旨在建立一个省时高效的附子炮制方法。

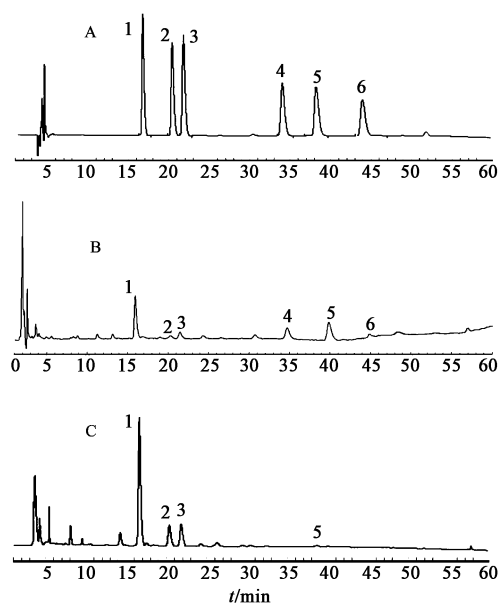
1 材料

Agilent-1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦),BS210S 型电子天平(北京赛多利斯公司),苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱对照品(中国药品生物制品检定所,纯度均 $\geq 98.0\%$,批号分别为 111795-200901,111794-200901),乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰次乌头原碱对照品由(成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98.0\%$,批号分别为 W-006-110321, X-011-110425, C-023-110822, B-016-110916),乙腈、四氢呋喃为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水,附子药材(康美药业股份有限公司,经广东省中医院主任中药师林华鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥子根盐制品,即盐附子)。

2 方法与结果

2.1 6 种酯型生物碱的含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB- C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m),流动相乙腈-四氢呋喃 25:15(A)-0.1% $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 乙酸铵(1 L 加冰乙酸 0.5 mL)(B),流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 235 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,理论塔板数 6 种生物碱均不低于 3 000。见图 1。



A. 混合对照品;B. 生附子;C. 高压蒸制附子;

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 附子 HPLC

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取新乌头碱 2.37 mg,乌头碱 2.04 mg,次乌头碱 1.61 mg,苯甲酰新乌头原碱 4.02 mg,苯甲酰乌头原碱 3.04 mg,苯甲酰次乌头原碱 3.19 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入 0.05% 盐酸-甲醇溶液,稀释至刻度,摇匀,得混合对照品 a 溶液,精密移取该溶液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,用 0.05% 盐酸-甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,得混合对照品 b 溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 分别取附子生品及其炮制品粉末(50 目)1.0,2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入氨试液 3 mL 与异丙醇-乙酸乙酯(1:1)混合溶液 50 mL,摇匀,称定质量,放置 16 h,连续超声 30 min,冷却,称定质量,用混合溶液补足减失质量,摇匀,滤过,精密移取续滤液 25 mL,40 $^{\circ}\text{C}$ 以下减压回收溶剂至干,残渣精密加入 0.05% 的盐酸-甲醇溶液 5 mL 溶解,摇匀,过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取混合对照品 a 溶液 2,4,6,8,10,12,16,20 μ L,混合对照品 b 溶液 1,2,4,6,8,10 μ L,按照上述色谱条件,测定,以各生物碱对照品的进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得标准曲线。为了更准确地测定含量,绘制高、低 2 个质量浓度的标准曲线,得回归方程见表 1。

2.1.5 精密度试验 精密吸取含 6 种生物碱的混合对照品 b 溶液,重复进样 5 次,每次 10 μ L,结果新乌头碱、乌头碱、次乌头碱、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 RSD 分别为 0.7%,0.7%,0.7%,1.4%,0.9%,0.9%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称取同一批号的附片药材 1 g,按上述供试品制备方法制备成供试品溶液,在上述色谱条件下进行分析,分别在 0,4,8,16,24 h 进样 10 μ L。结果 6 种生物碱的峰面积 RSD 分别为 1.2%,1.5%,2.6%,1.0%,0.9%,2.0%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批号的附片 5 份,依上述供试品溶液制备方法制备和上述条件测定,结果 6 种生物碱的 RSD 依次分别为 1.8%,1.6%,3.3%,1.9%,2.1%,2.4%,表明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取生附片药材粉末 5 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,各精密加入新乌头碱、乌头碱等 6 种对照品适量,按供试品制备方法制备成供试品溶液,在上述色谱条件

表 1 附子中 6 种生物碱的回归方程及线性关系

对照品	线性范围/μg	回归方程	R ²
新乌头碱	0.019 99 ~ 0.199 9	$Y = 1\,086.34X + 1.45$	0.999 98
	0.399 84 ~ 3.998 4	$Y = 1\,096.86X - 45.59$	0.999 90
次乌头碱	0.020 19 ~ 0.201 9	$Y = 1\,127.09X + 1.70$	0.999 96
	0.403 76 ~ 4.037 6	$Y = 1\,161.66X - 59.82$	0.999 91
乌头碱	0.020 19 ~ 0.201 9	$Y = 991.17X + 3.41$	0.999 91
	0.403 76 ~ 4.037 6	$Y = 955.29X - 38.30$	0.999 94
苯甲酰新乌头原碱	0.029 99 ~ 0.299 9	$Y = 903.22X + 2.40$	0.999 99
	0.599 74 ~ 5.997 4	$Y = 895.23X - 19.48$	0.999 97
苯甲酰乌头原碱	0.029 89 ~ 0.298 9	$Y = 865.01X + 2.35$	0.999 95
	0.059 78 ~ 0.597 8	$Y = 841.21X + 8.20$	0.999 90
苯甲酰次乌头原碱	0.029 89 ~ 0.298 9	$Y = 1\,000.42X + 2.14$	0.999 95
	0.059 78 ~ 0.597 8	$Y = 976.84X + 12.78$	0.999 84

下进行测定,结果新乌头碱平均回收率 101.3% (RSD 2.2%),次乌头碱平均回收率 97.9% (RSD 2.8%),乌头碱平均回收率 99.9% (RSD 2.9%),苯甲酰新乌头原碱平均回收率 96.8% (RSD 2.9%),苯甲酰乌头原碱平均回收率 98.4% (RSD 2.7%),苯甲酰次乌头原碱平均回收率 101.2% (RSD 2.5%),表明该方法测定结果准确可靠。

2.1.9 样品测定 按上述含量测定方法,测定附子生品及其炮制品中新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量。

2.2 总生物碱的含量测定^[2] 按 2010 年版《中国药典》一部附子项下总生物碱含量测定方法即滴定法进行测定,选择甲基红指示剂指示滴定终点。

2.2 附子软化方式

2.2.1 润湿法 取大小均匀的生附子,除去杂质,置于密闭容器中,喷洒适量的胆巴溶液,使药材全部湿润,润 0.5 h 并拌润。

2.2.2 润透法 取大小均匀的生附子,除去杂质,置于密闭容器中,喷洒适量的胆巴溶液,使药材全部湿润,底部不积水为度,上盖胆巴溶液浸湿的脱脂棉,每隔 1 h 拌润 1 次,至个大药材切开内无干心。

2.2.3 不换水浸泡法 取大小均匀的附子,除去杂质,置于密闭容器中,加入胆巴溶液使其盖过药面 1~2 cm,不换水浸泡至个大药材切开内无干心。

2.3 高压蒸制工艺的优选^[5-8] 据相关炮制资料的研究,确定附子的水处理所用胆巴使用量与药材的比例为 1:2,在预试验基础上,选择高压压力、蒸制

时间和水处理方式为考察因素,每个因素设立 3 个水平,因素水平见表 2,以传统外观性状、工艺生产性难易程度和生物碱含量为评价指标,评分时以各指标的最大值为参照将数据归一化。双酯型生物碱毒性最强,在炮制的过程中转化为低毒单酯型生物碱和其他生物碱,给予权重 50%,总生物碱含量给予权重 35%,外观质量权重 15%,综合评分 = 双酯型生物碱总含量评分 × 50% + 总生物碱含量评分 × 35% + 炮制品外观评分 × 15%,满分为 1.00。取大小均匀的生附子样品 9 份,每份 500 g,用相应的水处理方式进行炮制,取出,晾凉,进行传统外观质量评分,见表 3,并测定其生物碱的含量。试验安排及结果见表 4,方差分析见表 5。

表 2 附子高压蒸制工艺优选正交试验因素水平

水平	A	B	C
	炮制时间/min	压力/MPa	处理方式
1	90	0.07	润透法
2	150	0.10	润湿法
3	180	0.15	不换水浸泡法

由表 4 结果可知,影响附子高压炮制的因素的主次顺序为 B(炮制压力) > A(炮制时间) > C(处理方式);方差分析表明因素 A、B 具有显著性差异。确定附子高压炮制的最佳工艺为 A₂B₂C₂,即附子经润湿法处理后,于 0.10 MPa 压力下炮制 150 min。

2.4 验证试验及炮制前后生物碱含量比较 取大小均匀的附子 3 份,每份 500 g,按优选的高压蒸制工艺进行炮制,测定其 6 种生物碱和总生物碱的含量。结果见表 6。

由表 6 可知,附子生品主要含有双酯型生物碱

表 3 附子高压蒸制品外观评分标准

项目	10 分	7 分	5 分	1 分
色泽	乌黑发亮	黑褐色	皮部黄褐色、木部黄白色	黄白色
质地	质地实、酥脆	质地实、较为酥脆	质较坚实,略呈粉性	质硬呈粉性
	断面光泽	断面较有光泽	断面略有光泽	断面粗糙
气味	气微,无麻舌感	气微,微有麻舌感	气微,有麻舌感	气微,麻舌感强烈

表 4 附子高压蒸制工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	质量分数/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		外观评分 /分	综合 评分
					双酯型生物碱	总生物碱质量		
1	1	1	1	1	0.101	9.0	4	0.418
2	1	2	2	2	0.031	8.6	8	0.782
3	1	3	3	3	0.071	7.8	9	0.584
4	2	1	2	3	0.050	8.3	8	0.686
5	2	2	3	1	—	8.1	9	0.919
6	2	3	1	2	0.027	7.8	9	0.785
7	3	1	3	2	0.052	7.4	8	0.644
8	3	2	1	3	—	8.5	9	0.933
9	3	3	2	1	0.035	7.9	9	0.755
K_1	0.595	0.582	0.620	0.616				
K_2	0.796	0.878	0.782	0.800				
K_3	0.778	0.708	0.767	0.752				
R	0.202	0.295	0.162	0.185				

注“—”代表未检出,计算时按 0.000 计。

和单酯型生物碱,经高压蒸制法处理后,其双酯型生物碱大大降低,单酯型生物碱明显增加,总生物碱含量变化不大。说明该优选工艺稳定可行。

3 讨论

2010 年版《中国药典》收载了 3 种炮制规格的附子(黑顺片、白附片和炮附片)及 1 种利于储藏的附子保存方式-盐附子。3 种规格附子的功效均以温肾壮阳、填补命门之火为主,但在临床上各有侧重,黑顺片与白附片回阳救逆、散寒止痛,炮附子以温肾暖脾为主^[9]。本试验将黑顺片蒸煮的炮制方式更改为高压蒸制方式,得到的附子加工品与《中国药典》2010 年版规定的黑顺片相比,在外观上有极大的相似度,且在含量上也符合规定,可考虑作为

黑顺片的替代炮制方式^[10]。

表 5 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.074	2	0.037	25.297	<0.05
B	0.132	2	0.066	44.988	<0.05
C	0.002	2	0.001	0.518	
D(误差)	0.003	2	0.002		

注: $F_{0.05}(2,9)=4.26$, $F_{0.1}(2,9)=8.02$ 。

本试验制得的附片均能测到 6 种生物碱,但其含量在一定范围内随炮制压力的升高而变化,相关性表现为双酯型生物碱和总生物碱负相关,单酯型生物碱正相关;炮制时间对附子炮制有直接影响。研究发现,同一炮制条件下高压制附子时,双酯型生

表 6 附子炮制前后生物碱含量比较

名称	苯甲酰新 乌头原碱	苯甲酰 乌头原碱	苯甲酰次 乌头原碱	总单酯型 生物碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱	总双酯型 生物碱	总生物碱
生附子	0.603 3	0.046 4	0.107 4	0.757 0	0.280 6	0.457 6	0.035 1	0.773 3	10.387 5
高压蒸制附子	0.972 0	0.198 0	0.181 9	1.351 9	—	0.058 4	—	0.058 4	8.210 7

物碱的总量随蒸制时间延长而降低,平衡好压力和炮制时间是关键。试验中还对含水量进行测定,研究文献发现,酯型生物碱在水存在条件下,其水解比较完全^[11],而 3 种软化方式处理后,保留了一定水分,有利于水解作用。

含量测定结果显示,总双酯型生物碱和总单酯型生物碱的含量均落在《中国药典》2010 年版的限量范围内。与传统蒸煮工艺相比,高压蒸制法在一定程度上节约时间和资源,且需要的设备较简单,从本质上实现了附子饮片的参数化炮制,具有一定生产指导意义。附子中的 6 种生物碱具有强心、镇痛作用,经炮制后,单酯型生物碱含量的提高与双酯型生物碱的降低是否能促进附子回阳救逆的功效^[12],附子高温炮制后作用机制等的研究还有待进一步研究^[13]。此外,该炮制工艺改进较大,为保证其安全性和有效性,需进行毒理学和药理学研究。

[参考文献]

[1] 李志勇,张硕峰,畅洪昇,等. 不同炮制时间附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(19):1086.

[2] 中国药典. 一部[S]. 2010:36.

[3] 冉樊雄. 名贵中药材绿色栽培技术[M]. 北京:科学技术出版社,2002:9.

[4] 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.

[5] 武乐,张钰祺,易炳学,等. 附子江西特色炮制品种“临江片”初探[J]. 时珍国医国药,2012,23(3):690.

[6] 王冬梅,王艳宏,李永吉,等. 附子毒性、药效物质基础及分析方法研究进展[J]. 黑龙江医药,2011,24(1):45.

[7] 展海霞,彭成. 附子与干姜配伍对心衰大鼠血流动力学的影响[J]. 中药药理与临床,2006,22(1):42.

[8] 奚丽君,陈卫平. 附子与干姜配伍增效减毒作用机制研究概述[J]. 实用中医药杂志,2008,24(9):608.

[9] 吴龙花. 附子的加工炮制[J]. 中外医学研究,2009,7(10):170.

[10] 洪俐,游国均. 附子炮制诸法利弊与临床应用[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2836.

[11] 马鸿雁,李楠,杨明. 乌头碱水解实验和热力学研究[J]. 成都中医药大学学报,2005,28(3):57.

[12] 张银娣. 附子毒性研究[J]. 药学报,1966,14(5):350.

[13] Tang L, Gong Y, Lv C. Pharmacokinetics of aconitine as the targeted marker of Fuzi (*Aconitum carmichaeli*) following single and multiple oral administrations of Fuzi extracts in rat by UPLC/MS/MS[J]. J Ethnopharmacol, 2012,141:736.

[责任编辑 全燕]

欢迎订阅 2013 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》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“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、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。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,320 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 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:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。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,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfx_2010@188.com,网址:www.syfxzz.com。