

民族药铁棒锤砂炒炮制品的质量标准研究[△]

廖琦*,杨继家,张 艺,张 静*(成都中医药大学民族医药学院,成都 611137)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-1007-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.17

摘 要 目的:制定民族药铁棒锤砂炒炮制品的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对该炮制品进行定性鉴别,采用高效液相色谱法测定样品中苯甲酰乌头原碱的含量,并对样品进行水分、灰分与浸出物测定。结果:TLC中苯甲酰乌头原碱斑点明显,分离度好;样品中苯甲酰乌头原碱的质量分数在0.53%~1.73%之间,水分、总灰分、酸不溶性灰分、70%乙醇浸出物的平均质量分数分别为2.80%、2.89%、1.08%、21.38%。铁棒锤砂炒炮制品中不得检出乌头碱。结论:所建标准可用于铁棒锤砂炒炮制品的质量控制和评价。

关键词 铁棒锤;砂炒炮制品;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;水分;灰分;浸出物

Study on Quality Standard of Stir-baked Products of Ethnic Drug *Aconitum pendulum*

LIAO Qi, YANG Ji-jia, ZHANG Yi, ZHANG Jing (College of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for stir-baked products of ethnic drug *Aconitum pendulum*. METHODS: The processed products were identified by TLC quantitatively, and the contents of benzoyleaconine in samples were determined by HPLC. The determination of moisture, ash and extracts were conducted. RESULTS: The spots of TLC were evident and had a good degree of separation; the mass fraction of benzoyleaconine in samples were 0.53%-1.73%; average mass fraction of moisture was 2.80%, that of total ash content was 2.89%, and that of acid-insoluble ash was 1.08%. The average mass fraction of 70% ethanol extracts was 21.38%. No aconitine was found in stir-baked products of *A. pendulum*. CONCLUSION: Established standard is suitable for quality control and evaluation of stir-baked products of *A. pendulum*.

KEY WORDS *Aconitum pendulum*; Stir-baked products; Quality standard; TLC; HPLC; Moisture; Ash; Benzoyleaconine

铁棒锤为毛茛科乌头属植物铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch.和伏毛铁棒锤 *A. flavum* Hand.-Mazz.的干燥块根,别名雪上一枝蒿、三转半、黑草乌等,分布于西藏、四川西部、青海等地区,生于海拔2 800~4 500 m的山地、草坡或林边,为藏、羌、回等民族的习用药。铁棒锤味苦、微辛,性热,有剧毒,具有祛风除湿、止痛、消肿散瘀的功效,主要用于跌打损伤、风湿疼痛等疾病的治疗^[1]。

铁棒锤及铁棒锤幼苗中二萜类生物碱^[2-3]既是有效成分,也是毒性成分^[4-6],其炮制方法主要有水煮、蒸制和砂炒^[7]。本课题组在前期试验中发现,铁棒锤生品毒性明显,砂炒炮制品安全性较好。铁棒锤用砂炒方法炮制后具有明显的抗炎、镇痛作用^[8]。目前,有关铁棒锤生品的质量标准在西北各省(区)及上海市药材标准中均有收载,而有关其砂炒炮制品质量标

准的研究尚未见报道,故笔者对此进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

1200高效液相色谱(HPLC)仪系统(美国Agilent公司);硅胶G预制薄层板(青岛海浪硅胶干燥剂厂);KQ-50B超声波清洗器(功率:150 W,频率:33 kHz,昆山市超声仪器有限公司);BP121S电子天平(德国Sartorius公司);CY-50B炒药机(青州市精诚医药装备制造有限公司)。

1.2 试剂

乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯;乌头碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:16720-200410,供含量测定用);苯甲酰乌头原碱对照品(成都中医药大学民族医药实验室自制,纯度>98%)。

源,2005,27(3):17.

[5] 魏艳静,卞红磊,俞文静,等.芝麻素对肝癌H22细胞增殖及H22荷瘤小鼠肿瘤生长的影响[J].中草药,2008,39

△基金项目:国家科技支撑计划课题资助(No.2007BAI48B08-6);教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(No.20105132120012)

*硕士研究生。研究方向:民族药、天然产物研究及新药开发。电话:028-87319373。E-mail:kamperl@163.com

#通信作者:副教授,博士。研究方向:民族药、天然产物研究及新药开发。E-mail:31649123@qq.com

(8):1 222.

[6] 赵天增.核磁共振氢谱[M].北京:科学出版社,1983:121.

[7] 梁晓天.核磁共振[M].北京:科学出版社,1976:50.

[8] 宁永成.有机化合物结构鉴定与有机波谱学[M].2版.北京:科学出版社,2000:200-218.

[9] 洪山海.光谱解析法在有机化学中的应用[M].北京:科学出版社,1981:7-30.

(收稿日期:2012-04-26 修回日期:2012-07-26)

1.3 药材

7批药材均经成都中医药大学严铸云教授鉴定为铁棒锤 *A. pendulum* Busch.的干燥块根。将铁棒锤均匀切制为长度为2 cm左右的小段,放入炒药机中,与已经净制晾干的砂混匀,并控制砂温在200~220 ℃,拌炒5 min左右,即得铁棒锤砂炒炮制品。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱(TLC)定性鉴别

2.1.1 对照品溶液的制备 取乌头碱、苯甲酰乌头原碱对照品各适量,加二氯甲烷制成每1 ml各含1 mg的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取铁棒锤砂炒炮制品粉末(过四号筛)约2.0 g,加乙醚20 ml,超声处理30 min,放冷,滤过,滤液挥干溶剂,加二氯甲烷1 ml溶解,即得供试品溶液。

2.1.3 TLC鉴别 吸取对照品溶液和7批供试品溶液各5 μl,点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚-乙醚-丙酮(5:1:6, V/V/V)为展开剂,碘化铋钾溶液为显色剂,室温显色观察。结果发现,在苯甲酰乌头原碱对照品色谱相应的位置上,供试品显相同颜色的斑点。TLC图见图1。

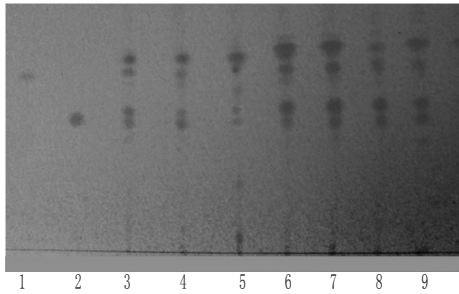


图1 7批铁棒锤砂炒炮制品的TLC图

1.乌头碱对照品;2.苯甲酰乌头原碱对照品;3~9.供试品

Fig 1 TLC of 7 batches of stir-baked products of *A. pendulum*

1. aconitine control; 2. benzoylaconine reference substance; 3~9. test samples

2.2 苯甲酰乌头原碱含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取苯甲酰乌头原碱对照品适量,加甲醇制成每1 ml含0.20 mg的对照品溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取铁棒锤砂炒炮制品粉末约3.0 g,置具塞锥形瓶中,加50%甲醇30 ml,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件 色谱柱:BDS Hypersil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.03 mol/L碳酸氢氨水溶液(每500 ml水加1.170 g碳酸氢铵、0.875 ml氨水,B),梯度洗脱(0~<10 min, 25% A; 10~30 min, 27% A);检测波长:231 nm;流速:1 ml/min;柱温:30 ℃。色谱见图2。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液(0.20 mg/ml)1、3、5、7、9 μl,注入液相色谱仪,记录色谱图,测定峰面积。以峰面积积分值(y)为纵坐标,苯甲酰乌头原碱进样量(x, μg)为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程为y=827.81x-28.3(r=0.999 9, n=5)。结果表明,苯甲酰乌头原碱进样量在0.2~1.8 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液20 μl,注入液相色谱

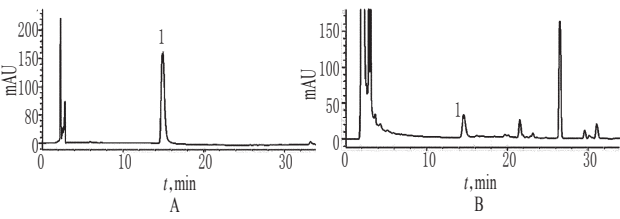


图2 苯甲酰乌头原碱的HPLC图

A.苯甲酰乌头原碱对照品;B.供试品;1. 苯甲酰乌头原碱

Fig 2 HPLC chromatograms of benzoylaconine

A. benzoylaconine control; B. test samples; 1. benzoylaconine

谱仪,连续进样6次,测定峰面积。结果,RSD=1.61%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液20 μl,分别于放置0、2、4、8、12 h时测定峰面积。结果,RSD=0.56%(n=5),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 按照拟定的含量测定方法,对同一批样品按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,测定峰面积并计算含量。结果,每1 g样品平均含苯甲酰乌头原碱1.16 mg, RSD=1.08%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取6份相同批次铁棒锤砂炒炮制品粉末,每份约1.50 g,分别精密加入1.743 mg苯甲酰乌头原碱对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件测定峰面积,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$, %	RSD, %
1.500 1	1.740	1.743	3.511	101.61		
1.500 2	1.740	1.743	3.536	103.04		
1.500 3	1.740	1.743	3.513	101.72	102.34	0.90
1.500 2	1.740	1.743	3.533	102.87		
1.500 2	1.740	1.743	3.519	102.07		
1.499 9	1.740	1.743	3.552	103.96		

2.2.9 样品含量测定 分别称取7批铁棒锤砂炒炮制品粉末各约3.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,各进样20 μl,按上述色谱条件测定峰面积,计算样品中苯甲酰乌头原碱的质量分数,结果见表2。

表2 7批铁棒锤砂炒炮制品的水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物和苯甲酰乌头原碱测定结果(% , n=3)

Tab 2 Results of content determination of moisture content, total ash, acid-insoluble ash, extracts and benzoylaconine in 7 batches of stir-baked products of *A. pendulum* (% , n=3)

编号	产地	水分	总灰分	酸不溶性灰分	70%乙醇浸出物	苯甲酰乌头原碱
1	四川阿坝州茂县	3.24	3.27	0.77	23.06	1.05
2	四川阿坝州茂县-2	3.12	2.97	1.57	28.38	0.83
3	四川阿坝州丹巴县太平桥乡	3.42	2.94	0.60	30.60	1.10
4	四川甘孜州康定县	1.98	2.86	1.62	11.60	0.97
5	四川阿坝州红原县	3.46	3.39	1.06	10.82	0.53
6	青海西宁八一路药材市场亚廊藏药行	3.33	2.20	0.90	30.66	0.91
7	成都荷花池中药材专业市场	1.07	2.57	1.01	14.56	1.73
平均值		2.80	2.89	1.08	21.38	1.02

2.3 检查项

2.3.1 常规项目测定 按照2010年版《中国药典》(一部)^[9]水

分测定法(附录 IX H)第一法烘干法、总灰分与酸不溶性灰分测定法(附录 IX K)、醇溶性浸出物测定法(附录 X A)之冷浸法分别测定样品中水分、灰分、浸出物的质量分数,结果见表2。

2.3.2 乌头碱限量检查 (1)TLC鉴别。照“2.1.3”项下方法检测乌头碱,结果显示供试品在乌头碱相应位置上不显示斑点。(2)HPLC测定。①供试品溶液的制备:取铁棒锤砂炒炮制品粉末2 g,同时加乙醚60 ml和氨试液4 ml,放置过夜,滤过,药渣加乙醚40 ml,振摇1 h,滤过,药渣再加乙醚洗涤3次,每次20 ml,滤过,合并滤液和洗液,低温蒸干,残渣加三氯甲烷2 ml溶解,转入分液漏斗,用三氯甲烷3 ml洗容器,洗液并入分液漏斗中,用0.05 mol/L的H₂SO₄提取3次,每次5 ml;酸液依次用同一三氯甲烷10 ml洗涤,合并酸液,加氨试液调pH值至9,再用三氯甲烷提取3次,每次10 ml,三氯甲烷液依次用同一水20 ml振摇洗涤,合并三氯甲烷液,低温蒸干,残渣加0.01%盐酸-甲醇溶解,转入10 ml量瓶中,再加0.01%盐酸-甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。②乌头碱对照品溶液的制备:照“2.2.1”项下方法制备。③色谱条件:色谱柱为Xtimate C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相同“2.2.3”项下,梯度洗脱(0~<10 min, 25%→27% A; 10~<25 min, 27%→33% A; 25~<35 min, 33%→40% A; 35~<45 min, 40%→50% A; 45~<52 min, 50%→60% A; 52~55 min, 60%→70% A),其他条件同“2.2.3”项下。照此色谱条件检测乌头碱,结果显示在乌头碱对照品相应保留时间内,供试品中没有乌头碱对照品峰出现。色谱见图3。

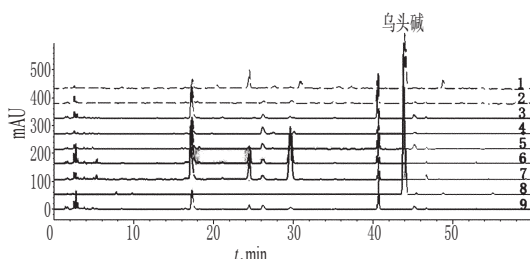


图3 乌头碱的HPLC图

1. 生品供试品; 8. 乌头碱对照品; 2~7, 9. 砂炒炮制品供试品

Fig 3 HPLC chromatograms of aconitine

1. test sample of crude product; 8. aconitine control; 2-7, 9. test sample of stir-baked products

3 讨论

本试验分别考察了2010年版《中国药典》(一部)制川乌项下^[9]薄层鉴别的条件——正己烷-乙酸乙酯-甲醇(6.4:3.6:1, V/V/V)和石油醚-乙醚-丙酮(5:1:6, V/V/V)2种展开系统,结果显示在石油醚-乙醚-丙酮(5:1:6, V/V/V)展开条件下,样品具有较好的分离效果,故选其为展开剂。

本试验采用2010年版《中国药典》(一部)中浸出物测定项下冷浸法测定铁棒锤砂炒炮制品的浸出物,提取溶媒考察了

30%、50%、70%、100%的乙醇,结果显示30%乙醇与70%乙醇测定时浸出物含量较高。生物碱类成分极性较小,不溶或难溶于高极性的溶媒中,故采用70%乙醇作为浸提溶媒。

在苯甲酰乌头原碱的含量测定中,供试品溶液的制备方式考察了超声提取和回流提取2种方法,结果显示采用超声提取时,苯甲酰乌头原碱的提取率要高于回流提取法,因此选用超声提取法提取样品;提取溶媒考察了甲醇和乙醇,结果显示采用甲醇作提取溶媒时,苯甲酰乌头原碱的提取率高于乙醇,因此选用甲醇作为提取溶媒。

本试验首次比较全面地建立了铁棒锤砂炒炮制品的TLC鉴别和水分、灰分、浸出物、有效成分含量测定的方法,以及有毒生物碱乌头碱的限量检查方法。有毒类药材的安全性是民族药研究的重点和难点,将其纳入质量标准的研究具有必要性。本课题组前期研究表明,苯甲酰乌头原碱的质量分数在铁棒锤被炮制后增加,其毒性较小且药效作用明显,因此本试验对其进行了薄层检识和含量测定,对其质量标准的提高具有一定的参考意义。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 藏药: 第1册[S]. 1995: 79.
- [2] 王毓杰, 曾陈娟, 姚喆, 等. 铁棒锤及其炮制品中二萜生物碱化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 347.
- [3] Wang Yujie, Zhang Jing, Zeng Chenjuan, et al. Three new C₁₉-diterpenoid alkaloids from *Aconitum pendulum*[J]. *Phytochem Lett*, 2011(4): 166.
- [4] Feng YZ, Shun XL, Lu XL. Assessment of bioavailability and risk of iron in phytomedicines *Aconitum carmichaeli* and *Paeonia lactiflora*[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2007, 21(2): 77.
- [5] Khan T, Ahmad M, Khan R. Phytotoxic and insecticidal activities of medicinal plants of pakistan: studies on *Trichodesma indicum*, *Aconitum laeve* and *Sauromatum guttatum*[J]. *J Chem Soc Pak*, 2007, 29(3): 260.
- [6] Matias R, Azucena GC. Structural diversity and defensive properties of diterpenoid alkaloids[J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6(1): 81.
- [7] 王毓杰. 羌药铁棒锤炮制减毒原理研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.
- [8] 王毓杰, 张静, 田会萍, 等. 民族药铁棒锤炮制原理初步研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(5): 588.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录52、附录53、附录62、附录37.

(收稿日期: 2012-04-09 修回日期: 2012-05-28)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊, 欢迎投稿、订阅