

制川乌炮制废水中生物碱含量的探讨*

易剑平¹, 迟玉明¹, 孟贺¹, 张立波¹, 李敏¹, 陈加富^{2**}

(1. 北京中研同仁堂医药研发有限公司 北京 100079; 2. 北京同仁堂科技发展股份有限公司 北京 100079)

摘要:目的 建立HPLC同时测定制川乌炮制废水中6种毒性生物碱成分含量和UC测定总生物碱含量的方法,总结炮制废水中生物碱含量的变化规律。方法 采用HPLC同时测定6种生物碱成分;采用UV法测定总生物碱含量。结果 HPLC法和UV法在研究的线性范围内线性关系均良好,制川乌炮制废水中6种毒性生物碱成分随着炮制时间的推移有所降低。结论 建立的6种生物碱成分含量和总生物碱含量测定方法均简便、稳定、准确,可以为该废水的减毒处理提供检测手段。

关键词:川乌 炮制 毒性 生物碱

doi: 10.11842/wst.20180328002 中图分类号: R917 文献标识码: A

川乌为毛茛科植物乌头(*Aconitum carmichaelii* Debx.)的干燥母根,性热,味辛、苦;有大毒,临床使用时常用其炮制品。主治祛风除湿、温经止痛。用于风寒湿痹、关节疼痛、心腹冷痛、寒疝作痛^[1]。川乌炮制前后其成分发生了较大的变化,秦语欣等在生川乌中检测到99个成分,制川乌中检测到106个成分,炮制前后共有成分53个,炮制后新增成分53个,消失成分46个^[2]。在川乌炮制过程中采用水浸泡法,浸泡使生物碱类成分含量降低,随浸泡程度加深,双酯型生物碱(新乌头碱、次乌头碱、乌头碱)总量的降低率分别为28.7%、36.8%、44.9%,单酯型生物碱(苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱)总量的降低率分别为21.8%、25.5%、40.0%^[3]。可见,在川乌浸泡过程中有部分生物碱可能进入了废水中。而川乌所含的乌头类生物碱具有极强的毒性,相比较单酯型生物碱的毒性,双酯型生物碱毒性较大,是乌头类中药的主要毒效成分,其中乌头碱毒性最强。小鼠ig给药,三者半数致死量(LD₅₀)值分别为1.0-1.8、1.9、5.8 mg/kg^[4-11]。目前未见有川乌炮制废水的有效处理

方法,且未见有对川乌炮制过程中废水中毒性成分含量的报道,为此,需要建立对川乌炮制废水中毒性生物碱含量的测定方法,以明确该废水中的毒性成分及其含量,评估该废水排放后进入到天然水体中给生态环境带来的威胁。同时可以明确川乌炮制过程中产生的大量毒性污水中生物碱含量的变化情况,为其减毒处理研究提供试验依据。

1 仪器与材料

Waters e2695 高效液相色谱仪(2998PDA 检测器,美国 Waters 公司);UV757CRT 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);梅特勒-托利多 DELTA 320 pH 计;AB-135s 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

乌头碱对照品(批号:110720-200410)、次乌头碱对照品(批号:110798-200805)、新乌头碱对照品(批号:110799-200404)、苯甲酰乌头原碱对照品(批号:111794-200901)、苯甲酰次乌头原碱对照品(批号:

收稿日期:2018-06-11

修回日期:2018-07-11

* 北京市东城区科委一般课题(2015-3-001):川乌炮制毒性污水的减毒工艺研究,负责人:易剑平。

** 通讯作者:陈加富,主管药师,主要研究方向:中药开发。

111796-200901)、苯甲酰新乌头原碱对照品(批号:111795-200901),以上对照品均购于中国药品生物制品检定所;乙腈、四氢呋喃为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。本实验使用的供试品溶液由北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司依据实验需求进行提供。

2 方法与结果

2.1 HPLC同时测定苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱

2.1.1 色谱条件

色谱柱为phenomenex C18 (4.6×250 mm, 5 μm),流动相A相为乙腈-四氢呋喃(25:15),B相为0.1 mol·L⁻¹醋酸铵(每1000 mL含冰醋酸0.5 mL)水溶液,梯度洗脱,体积流量1.0 mL·min⁻¹,进样量50 μL,柱温35℃,检测波长为235 nm,色谱图(图1)。

2.1.2 标准曲线绘制

取上述6种生物碱对照品适量,精密称定,加乙腈-0.05%乙酸水(30:70)的混合溶液制成含苯甲酰新乌头原碱9.03 μg·mL⁻¹、苯甲酰乌头原碱12.61 μg·mL⁻¹、苯甲酰次乌头原碱11.82 μg·mL⁻¹、新乌头碱12.05 μg·mL⁻¹、次乌头碱9.03 μg·mL⁻¹、乌头碱9.41 μg·mL⁻¹的对照品溶液,取该对照品溶液稀释10倍,制成含苯甲酰新乌头原碱0.903 μg·mL⁻¹、苯甲酰乌头原碱1.261 μg·mL⁻¹、苯甲酰次乌头原碱1.182 μg·mL⁻¹、新乌头碱1.205 μg·mL⁻¹、次乌头碱0.903 μg·mL⁻¹、乌头碱0.941 μg·mL⁻¹的对照品溶液,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线(图2),建立色谱峰面积对进样量的回归方程(表1)。结果表明,各成分在检测的浓度范围内线性关系良好。

2.1.3 精密度试验

取混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,连续进样6次,检测上述6种生物碱的峰面积,计算得各生物碱的RSD值依次为:苯甲酰新乌头原碱0.47%、苯甲酰乌头原碱0.86%、苯甲酰次乌头原碱0.79%、新乌头碱0.57%、次乌头碱0.44%、乌头碱1.35%,表明该方法精密度良好。

2.1.4 稳定性试验

取“2.2”项下川乌炮制过程中的水样1,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,在0、2、4、6、8、10、12、18、24 h

时间/分钟	流动相/A%	流动相/B%
0-48	15→26	85→74
48-49	26→35	74→65
49-58	35	65
58-65	35→15	65→85

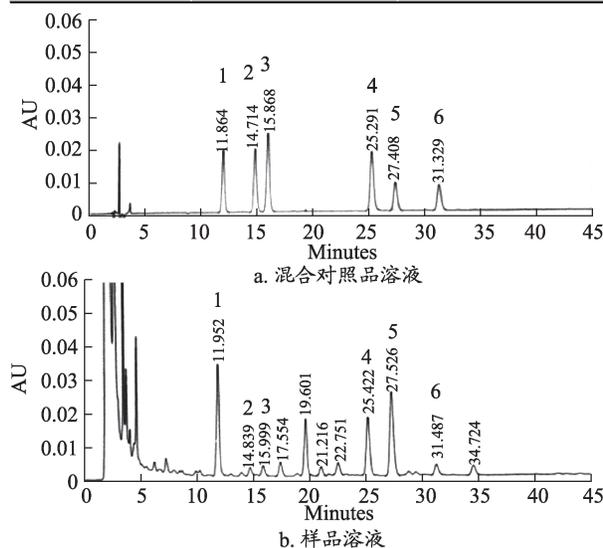


图1 6种生物碱混合对照品和样品的HPLC图

进样,检测6种生物碱的峰面积,计算得各生物碱的RSD值依次为:苯甲酰新乌头原碱0.67%、苯甲酰乌头原碱1.01%、苯甲酰次乌头原碱1.14%、新乌头碱0.89%、次乌头碱0.76%、乌头碱1.26%,表明供试品在24h内稳定,可供检测。

2.1.5 重复性试验

平行制备6份“2.2”项下川乌炮制过程中的水样1,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,检测6种生物碱的峰面积,计算得各生物碱的RSD值依次为:苯甲酰新乌头原碱1.97%、苯甲酰乌头原碱2.06%、苯甲酰次乌头原碱1.89%、新乌头碱2.41%、次乌头碱0.97%、乌头碱2.82%,表明重复性较好。

2.1.6 加样回收率试验

精密移取“2.2”项下川乌炮制过程中的水样1溶液5 mL于10 mL容量瓶中,平行6份,各精密加入对照品适量,定容,摇匀,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,计算得苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的平均加样回收率分别为98.75%、105.14%、108.97%、97.94%、102.46%、115.25%,RSD分别为1.82%、2.44%、2.71%、0.96%、1.56%、3.23%。

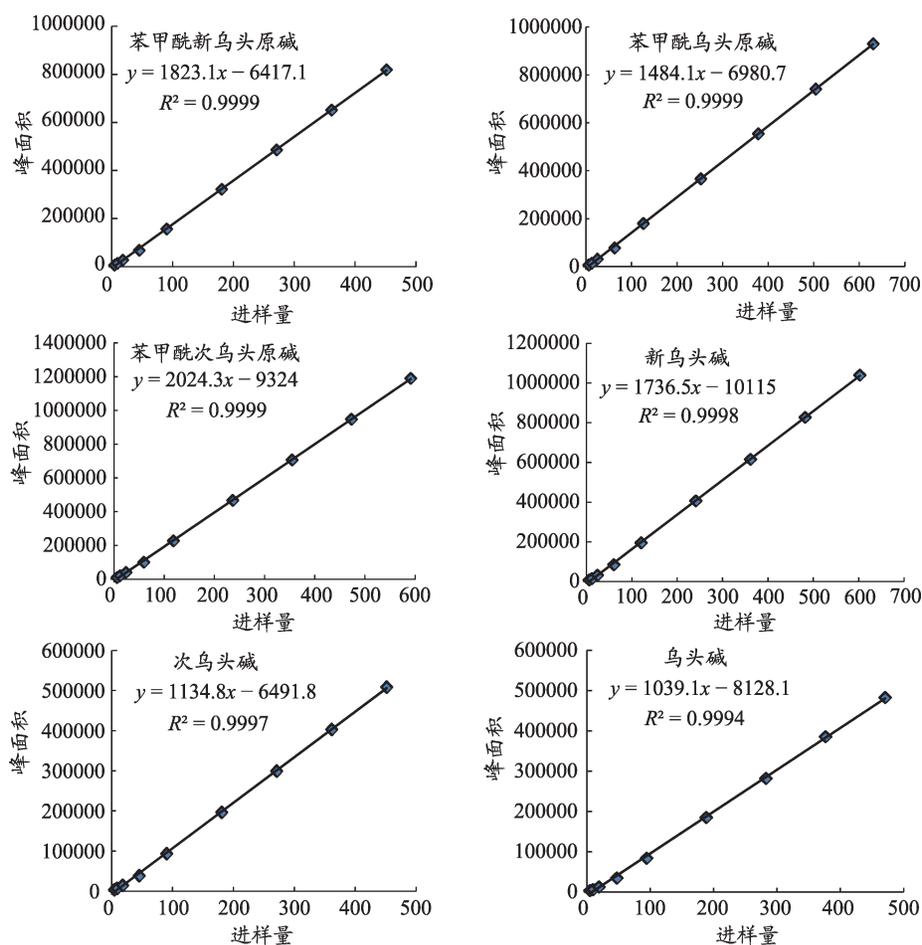


图2 6种生物碱类的标准曲线

表1 6种生物碱成分的回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	相关系数	线性范围/ μg
苯甲酰新乌头原碱	$Y = 1823.1X - 6417.1$	1.0000	$4.515-451.5 \times 10^{-3}$
苯甲酰乌头原碱	$Y = 1484.1X - 6980.7$	1.0000	$6.305-630.5 \times 10^{-3}$
苯甲酰次乌头原碱	$Y = 2024.3X - 9324$	1.0000	$5.910-591.0 \times 10^{-3}$
新乌头碱	$Y = 1736.5X - 10115$	0.9999	$6.025-602.5 \times 10^{-3}$
次乌头碱	$Y = 1134.8X - 6491.8$	0.9998	$4.515-451.5 \times 10^{-3}$
乌头碱	$Y = 1039.1X - 8128.1$	0.9997	$4.705-470.5 \times 10^{-3}$

2.2 UV测定总生物碱

2.2.1 试剂的配制

乌头碱标准溶液:精密称取乌头碱标准品 16.75 mg, 置 50 mL 量瓶中,加 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸使溶解,并加至刻度,摇匀。

醋酸钠缓冲溶液的配制:称取醋酸钠 0.3 g,加适量水溶解后,加冰醋酸 11.2 mL,再加水至 1000 mL。混匀,用 pH 计测定该溶液的 pH 值为 3.05。

0.1% 溴甲酚绿指示液:称取溴甲酚绿 0.2 g,用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液研磨,加水溶解至 200 mL,滤

过,用三氯甲烷除去脂溶性杂质。

2.2.2 线性关系考察

精密量取乌头碱标准液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL,分别置于干燥分液漏斗中,加醋酸钠缓冲液 5.0 mL 和溴甲酚绿指示液 2.0 mL,加蒸馏水使总体积达到 10.0 mL,摇匀,再精密加入三氯甲烷 10.0 mL,充分振摇 3 min,静置 0.5 h,分取三氯甲烷层,用干燥滤纸过滤。弃去初滤液,收集续滤液至已放入 0.5 g 无水硫酸钠的试管中,放置 0.5 h,于 416 nm 处测定吸收度,以 0.01 mL 盐酸同法操作,所得三氯甲烷液作为空白。

以浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,吸光度为纵坐标,得线性回归方程为 $Y = 0.031X - 0.0071$, $r = 0.9991$,其线性范围为 $3.4\text{--}23.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (图3)。

2.2.3 萃取次数的考察

对照品溶液的制备:精密量取乌头碱标准溶液 0.5 mL ,置于分液漏斗中,按照标准曲线制备方法制备对照品溶液。

空白溶液的制备:精密量取 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 2 mL ,置于分液漏斗中,照标准曲线制备方法制备空白溶液。

样品溶液的制备:精密量取1号川乌炮制液 20 mL 3份,置于3个分液漏斗中,用浓氨水调pH值至 $10\text{--}11$,分别用三氯甲烷 20 mL 振摇提取2次、3次、4次,合并三氯甲烷层,减压 40°C 蒸干,残渣用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶解至 10 mL 量瓶中,并加至刻度,摇匀。精密量取 2.0 mL 置于分液漏斗中,照标准曲线方法操作,精密量取试管中的溶液 1 mL 至 5 mL 量瓶中,加三氯甲烷至刻度,摇匀,测定吸光度,结果见表2。

结果表明,以三氯甲烷振摇提取3次即可将川乌炮制废水中的生物碱基本萃取出来。

2.2.4 重复性试验

平行制备6份“2.2”项下川乌炮制过程中的水样1,按“2.2.3”项下制备对照品溶液、空白溶液和样品溶液,同法进行测定,计算得总生物碱含量为 $24.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD值为 3.37% ,表明重复性较好,可以满足检测精度的要求。

2.2.5 精密度试验

取“2.2.4”项下的3号样品溶液连续测定吸光度6次,测得平均吸光度值为 0.623 ,RSD值为 0.17% 。结果表明,仪器的精密度良好,可以满足检测的要求。

2.2.6 稳定性试验

取“2.2.4”项下的3号样品溶液于 $0、1、2、4、8 \text{ h}$ 分别测定吸光度,测得平均吸光度值为 0.618 ,RSD值为 0.87% 。结果表明,样品供试品溶液在8小时内稳定。

2.2.7 加样回收试验

对照品溶液的制备:精密量取浓度为 $0.335 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的乌头碱标准溶液 25 mL ,置于 50 mL 量瓶中,以 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸加至刻度,摇匀,得浓度为 $0.168 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的乌头碱标准溶液。精密量取浓度为 $0.335 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的乌头碱标准溶液 0.5 mL ,置于分液漏斗中,照标准曲线制备方法制备对照品溶液。

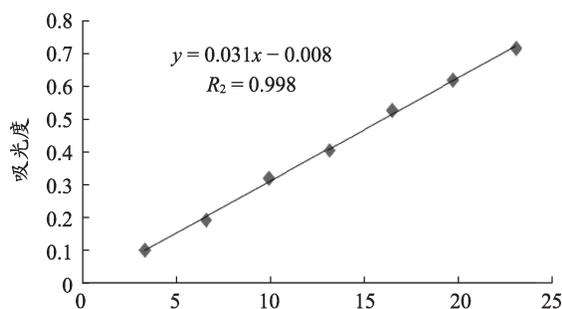


图3 UV检测乌头碱标准曲线

表2 萃取次数的考察及结果

萃取次数	2次	3次	4次
浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	23.8	25.4	25.6

表3 加样回收试验及结果

试验号	加入标准品/mg	标准品实测/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.251	0.230	91.67	95.59	3.13
2	0.251	0.234	93.33		
3	0.251	0.241	95.98		
4	0.251	0.238	94.65		
5	0.251	0.249	99.30		
6	0.251	0.248	98.64		

空白溶液的制备:精密量取 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 2 mL ,置于分液漏斗中,照标准曲线制备方法制备空白溶液。

样品溶液的制备:精密量取1号川乌炮制液 10 mL 6份,置于分液漏斗中,加入浓度为 0.168 mg/mL 的乌头碱标准溶液各 1.5 mL ,再加入 10 mL 蒸馏水,摇匀,用浓氨水调pH值至 $10\text{--}11$,分别用三氯甲烷 20 mL 振摇提取3次,合并三氯甲烷层, 40°C 减压蒸干,残渣用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶解至 10 mL 量瓶中,并加至刻度,摇匀。精密量取 2.0 mL 置于分液漏斗中,照标准曲线方法操作,精密量取试管中的溶液 1 mL 至 5 mL 量瓶中,加三氯甲烷至刻度,摇匀,测定吸光度(表3)。

结果表明本方法加样回收试验结果良好,可以满足检测的要求。

2.3 样品溶液生物碱含量的检测结果

2.3.1 样品溶液的制备

制川乌按照2015版《中华人民共和国药典》一部^[1]和《北京市中药饮片炮制规范》^[12]进行炮制,其在炮制过程中产生的含毒性成分的废水主要产生在前期的“水浸泡至内无干心”阶段,该过程历时长,约为 $7\text{--}10$ 天,且每天均需换水2次,产生的毒性污水量大,其中

表4 样品溶液生物碱含量HPLC检测结果($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱
1	5.96	0.67	0.58	4.72	10.46	1.44
2	7.36	0.77	0.78	3.19	10.37	1.16
3	6.07	0.58	0.66	1.89	7.84	0.68
4	2.64	0.28	0.24	0.65	2.89	0.26
5	3.43	0.34	0.29	0.77	3.38	0.32
6	1.67	0.13	0.10	0.23	1.41	0.11
7	2.87	0.29	0.21	0.54	2.36	0.25
8	1.30	0.17	0.08	0.15	0.92	0.07
9	2.45	0.24	0.15	0.41	1.77	0.22
10	1.30	0.18	0.09	0.16	0.88	0.08
11	1.29	0.19	0.10	0.16	0.91	0.09
12	0.88	0.15	0.06	0.09	0.61	0.06
13	1.48	0.23	0.11	0.18	1.00	0.11
14	0.73	0.10	0.05	0.07	0.48	0.04
15	1.10	0.17	0.08	0.13	0.69	0.06
16	0.63	0.10	0.05	0.09	0.41	0.04
17	0.80	0.12	0.05	0.13	0.46	0.03
18	0.49	0.07	0.04	0.06	0.29	0
19	0.72	0.12	0.05	0.06	0.39	0.04
20	0.39	0.06	0.03	0.05	0.20	0

表5 样品溶液检测结果

样品编号	川乌炮制液总生物碱含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	样品编号	川乌炮制液总生物碱含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	24.3	11	1.0
2	21.2	12	0.7
3	12.5	13	1.2
4	5.0	14	0.6
5	5.1	15	0.8
6	2.4	16	0.6
7	3.3	17	0.6
8	1.0	18	0.4
9	2.9	19	0.5
10	2.6	20	0.4

中,能够产生巨大的危害,在浸泡后期,产生的污水也存在少量毒性成分,必须经过处理才能排放。

2.3.3 样品溶液UV检测结果

取制备好的样品溶液,按照“2.2”项下的UV制备对照品溶液和空白溶液,并按方法进行检测,由结果可以看出,在浸泡提取前2天产生的污水,川乌炮制液总生物碱含量非常高,随着浸泡次数的增加,总生物碱含量逐渐降低,但是,也存在大量的毒性成分,因此,必须经过处理才能排放。(表5)。

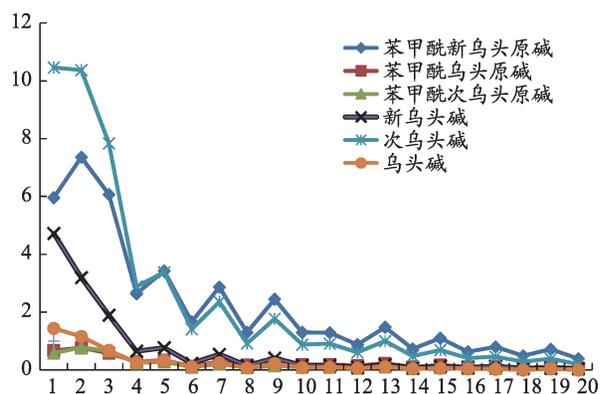


图4 川乌炮制废水中毒性成分含量的变化

含有双酯型乌头碱和单酯型乌头碱,本供试品溶液即为该部分水样。取川乌,用水浸泡10天,每天换水2次,水量为川乌量的10倍,水样编号依次为1、2、3……20,即为样品溶液。

2.3.2 样品溶液HPLC检测结果

取制备好的样品溶液,按照“2.1.1”项下的HPLC条件进行检测,结果(表4)和(图4),可以看出在浸泡前2天产生的污水,含有大量的苯甲酰新乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱,若不经处理直接排放到环境当

3 讨论

制乌头自古以来用于痛痹、历节之证。现临床普遍用来治疗类风湿关节炎。在现代许多治疗类风湿的中成药中,制乌头大多是主药。不论是煎汤服,还是中成药都有较好的疗效。尤其是对一些寒湿型的病人,其即刻疗效是非常显著的,这已经得到中医界的公认^[13]。

乌头类中药的主要毒性来源于3种双酯型二萜生物碱,其毒性作用主要是影响中枢神经系统、心脏和肌肉组织。其中损害心脏是乌头碱中毒最重要、最常见的危险因素。乌头碱的毒性概括为①箭毒样作用,即阻断神经-肌肉接头传导;②乌头碱样作用,表现为心率紊乱、血压下降、体温降低、呼吸抑制、肌肉麻痹和中枢神经功能紊乱等。现代研究表明,乌头类生物碱的毒理学机制主要包括影响电压依赖性钠离子通道、调节神经递质释放、促进脂质过氧化作用和诱导细胞凋亡等^[14];乌头碱可直接作用于心肌细胞,使室内异位起搏点的兴奋性增高和产生折返激动,形成单源或多源多形室性早搏、室性心动过速、室颤等,

故其致命性的心脏毒副作用最为严重^[15];乌头碱可使中枢神经系统及周围神经先兴奋后麻痹,阻止冲动的发生和传导,因而使心率变慢、心律不齐、血压下降^[16]。可见,川乌中的乌头碱类成分的毒性是需要重点关注的。目前对川乌的研究主要集中在川乌炮制前后的差异性,川乌毒性成分及其结构等方面,对川乌炮制过程中产生的大量废水并没有进行研究,而王哲等的研究表明川乌浸泡后,其生物碱成分有了明显的降低,即川乌炮制废水中含有一定量的毒性生物碱成分,以斑马鱼进行的初步毒理实验结果表明该水具有一定的毒性,能造成斑马鱼的死亡。因此建立较为简便、有效的川乌炮制废水中生物碱含量的检测方法,可以为后期进行川乌炮制废水减毒处理研究奠定技术基础。

3.1 HPLC法供试品溶液处理方法的考察

对供试品溶液的处理方法进行了对比研究,其方法包括(1)精密量取“2.2”项下川乌炮制过程中的水样150mL,滴加氨水3mL,混匀后,用乙醚振摇提取2次,每次50mL,合并乙醚液,室温挥干,残渣用乙腈-0.05%乙酸水(30:70)的混合溶液溶解,转移至5mL量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得;(2)精密量取“2.2”项下川乌炮制过程中的水样150mL,滴加氨水3mL,混匀后,用二氯甲烷振摇提取2次,每次50mL,合并二氯甲烷液,40℃减压蒸干,残渣同方法(1)溶解并稀释定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得;(3)精密量取“2.2”项下川乌炮制过程中的水样150mL,加入3倍量的乙醇,醇沉过夜,滤过,减压浓缩(40℃)至无醇味,用稀盐酸调pH值至1-2,用石油醚(60-90℃)振摇提取2次,每次20mL,弃去石油醚液,水液用浓氨水调pH值至9-10,用二氯甲烷振摇提取2次(40mL:40mL),合并二氯甲烷液,40℃减压蒸干,残渣同方法(1)溶解并稀释定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得;(4)水样原液。结果表明,经过不同方式萃取后的样品溶液和原液直接进样,其6种生物碱成分分离度均达到《中华人民共和国药典》的要求,但经过萃取处理后的供试品溶液其6种生物碱都有一定量的损失,不同萃取溶剂损失的生物碱的种类和多少差异性较大,且需要消耗一定量的试剂,故选择原液直接进样。

3.2 HPLC法进样体积的考察

在液相仪器允许的范围内进行进样体积的研究。本实验考察了供试品溶液进样量为10、20、30、40、50

μL,考虑到在川乌炮制过程中,其生物碱含量的变化可能趋势,结合峰面积,确定进样量为50μL。

3.3 生物碱的变化情况

由HPLC和UV检测结果可知,川乌炮制过程中6种生物碱成分和总生物碱成分在炮制过程中含量的变化趋势是基本一致的。在炮制第一天和第二天时,由于生川乌中生物碱含量较高,由渗透压造成生物碱类成分在水中的溶出程度较高,其中3种双酯型生物碱的溶出均超过了65%,单酯型生物碱的溶出为50%左右,UV检测由于自6号样品后总生物碱含量低于检测方法的检出限,仅具有一定的参考价值,但其趋势与HPLC的检测结果一致,前两天总生物碱的溶出占总溶出量的70%以上,液相检测结果在炮制的后期样品中6种成分有部分也出现了低于检测限的情况,但其检测结果也具有一定的参考意义。可见,6种生物碱含量的变化和总生物碱含量的变化均显示川乌在炮制的前两天生物碱成分大部分都已经溶出。随后三天生物碱成分继续有一定的溶出量,这可能是由于前两天主要是川乌外层生物碱溶出,随着浸泡时间的延长,水分逐步渗入川乌细胞的内部,将其生物碱成分溶出,五天后生物碱的溶出量呈现逐步下降的趋势。

由于换水时间间隔在一天中有一定的差异性,一次为9小时,一次为15小时,故生物碱成分存在含量起伏的现象,但总体趋势是随着时间的推移和水的更换,水液中的有毒成分含量逐渐降低,HPLC检测结果和UV检测结果基本一致。川乌炮制废水中双酯型生物碱的含量以次乌头碱最高,其次是新乌头碱,乌头碱的含量最低,在浸泡3天后的含量已经不易检出;浸泡6天后水中的双酯型乌头碱的含量均已经很低,而单酯型生物碱的含量下降比双酯型的慢,到10天仍然有检出。乌头属植物的主要化学成分是二萜类生物碱,根据其骨架碳原子数目及其类型结构上的差异,可以分为4大类:C₂₀、C₁₉、C₁₈-二萜生物碱和双二萜生物碱。其中C₁₉-二萜生物碱中的乌头碱型生物碱是目前研究最多的一类生物碱,也是最具毒性的植物成分之一。按照取代基的不同乌头碱型生物碱又可分为双酯型二萜生物碱、单酯型二萜生物碱和醇胺型二萜生物碱,三者的毒性大小顺序:双酯型>单酯型>醇胺型^[17]。由于单酯型生物碱在一定含量范围内虽有毒性,但其活性明显,是制川乌的药效成分,可见川乌炮

制过程在“水浸泡至内无干心”阶段历时7-10天是有一定科学道理的,经过该浸泡炮制过程,将毒性大的双酯型生物碱尽量去除,保留了一定含量毒性较低且具有生物活性的单酯型生物碱。在川乌随后的炮制过程中,生物碱成分得到了进一步的去除,从而确保制川乌在具有药效活性的同时其毒性降低到可接受的范围内。

当前,制药工业废水常用的处理方法大多为物理法、化学法、生化法、其他组合工艺等。物理方法是指根据废水中污染物的物理性质相应开发的一些水处理工艺方法,目前所报道的较为有效的物化处理法,主要有吸附法、萃取法、磁分离法、混凝沉降法、反渗透技术等。化学处理法是利用化学反应的原理和方法来分离回收废水中的污染物,其中化学氧化法是采用添加氧化剂的方式,使有机化合物的结构发生转变,改变它们的化学性质,从而使其降解或使之稳定化,最终达到无害化的效果。生物法主要是利用微生物的代谢作用将水中有机物同化或分解的方法,对水中大部分呈溶解性、胶体及悬浮颗粒状的有机物都有

效,其种类主要分为好氧法、厌氧法及一些由此衍生出来的处理方法,针对不同性质的污水,需要培养具有相应特性降解作用的菌种微生物,活性污泥法就是属于一种好氧生物处理方法。本课题组根据川乌污水的特征分析,结合现有污水处理方法,在后期将进行絮凝沉降和树脂吸附法(物化法)、活性污泥法(生化法)和高级氧化法(化学法)等对川乌炮制毒性污水进行减毒甚至无害化处理的研究,以达到低毒或无毒排放的目的,降低其污水排放对环境的影响。

本文建立了HPLC同时检测川乌炮制废水中6种生物碱的含量测定方法和以醋酸钠缓冲液和溴甲酚绿指示液检测总生物碱总含量的UV法,这两种检测方法均快速、简便、稳定、准确、可靠。采用这两种方法对川乌炮制工艺过程中水中生物碱含量进行了检测,确定了6种生物碱和总生物碱含量在水中的变化情况,为该废水毒性成分的减毒处理提供了技术支持,同时为川乌传统炮制工艺的科学性提供了数据支持,也为后期进行川乌炮制毒性污水减毒甚至无害化处理的研究提供有效的检测手段和评价依据。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 36-37.
- 2 秦语欣, 张先灵, 王蕾等. HPLC-MS法研究川乌炮制前后化学成分的变化. 北京中医药大学学报, 2016, 39(4): 298-303.
- 3 王哲, 谭鹏, 刘红玉等. 浸泡程度对川乌炮制品传统质量及生物碱成分的影响. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 7-9.
- 4 季宗彬. 中药有效成分药理与应用. 人民卫生出版社, 第1版.
- 5 钱信忠. 有毒中药大辞典. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1992, 64.
- 6 田代华. 实用中药辞典. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 177.
- 7 高黎明, 魏小梅. 二萜类生物碱的药理作用及构效关系研究概况. 西北师范大学学报(自然科学版), 1999, (1): 98-103.
- 8 包懿, 宋凤瑞, 刘志强等. 乌头碱类双酯型二萜生物碱水解反应的电喷雾质谱分析. 质谱学报, 2009, 30(1): 1-5.
- 9 刘帅, 李妍, 李卫飞等. 乌头类中药毒性及现代毒理学研究进展. 中草药, 2016, 47(22): 4095-4102.
- 10 刘艳, 章诗伟, 周兰等. 乌头类生物碱对心肌的毒性作用及分子毒理学研究进展. 中国法医学杂志, 2009, 24(6): 398-400.
- 11 王峰峰, 宋兆辉, 张兰兰等. 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱水解和醇解产物的研究. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1564-1569.
- 12 北京市药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范. 北京: 化学工业出版社, 2008: 15-17.
- 13 陈少珍. 乌头汤治疗类风湿性关节炎的药效学及作用机理研究. 广州中医药大学, 2006.
- 14 Fu M, Wu M, Qiao Y, et al. Toxicological mechanisms of Aconitum alkaloids. *Pharmazie*, 2006, 61(9): 735-741.
- 15 刘艳. 乌头碱对大鼠心肌细胞毒性作用的分子毒理学机制研究. 华中科技大学, 2009, 398-401.
- 16 马天宇, 俞腾飞, 李树民等. 乌头类中药毒代动力学及代谢组学研究进展. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 430-431.
- 17 蔡超群, 杨春华, 梁敬钰等. 乌头属二萜生物碱成分构效关系研究进展. 海峡药学, 2013, 25(3): 1-5.

Discussion on the Alkaloid Content in Wastewater during Processing of *Radix Aconiti*

Yi Jianping¹, Chi Yuming¹, Meng He¹, Zhang Libo¹, Li Min¹, Chen Jiafu²

(1. Beijing Zhongyan Tongrentang Medicine Research Company, Beijing 100079, China;

2. *Tong Ren Tang Technologies Co.Ltd, Beijing 100079, China*)

Abstract: This study was aimed to establish a method for simultaneous determination of 6 kinds of toxic alkaloids in *Radix Aconiti* processing wastewater by HPLC and the total alkaloid content by UC, and to determine the changes of alkaloid content in the processing wastewater. The determination of 6 toxic alkaloids in *Radix Aconiti* processing wastewater was simultaneously conducted by HPLC. The the total alkaloid content was detected by UC. The results showed that the linear range of HPLC method and UC method was good. The content of 6 kinds of toxic alkaloids and total alkaloid in the processing wastewater of *Radix Aconiti* decreased with the processing time. It was concluded that the method was convenient, stable and accurate for simultaneous determination of the six alkaloids content in the processing wastewater of *Radix Aconiti*, which could provide the basis for the attenuated treatment of the wastewater.

Keywords: *Radix Aconiti*, processing, toxic, alkaloid

(责任编辑: 闫 群, 责任译审: 钱灵姝)