

成分分析

HPLC 法测定化风丹药母在发酵过程中 6 个酯型生物碱的含量*

马奋刚, 张永萍**, 曹国琼, 徐剑, 胡正平

(贵州中医药大学, 贵阳 550025)

摘要 目的: 为控制化风丹药母的稳定性的稳定性, 探究化风丹药母在发酵过程中 6 个酯型生物碱的含量变化。方法: 采用高效液相色谱法, 选用色谱柱: Wondasil® C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 以 0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液 - 乙腈 - 四氢呋喃, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 235 nm, 柱温 30 °C。结果: 在此色谱条件下, 6 个酯型生物碱成分可达到较好分离, 苯甲酰新乌头碱, 苯甲酰乌头碱, 苯甲酰次乌头碱, 次乌头碱, 新乌头碱, 乌头碱进样量分别在 0.086 48~1.383 68 μg、0.032 4~0.518 4 μg、0.027 44~0.439 04 μg、0.094 24~1.507 84 μg、0.084 48~1.351 68 μg、0.022 8~0.364 8 μg 范围内呈现较好的线性关系, 精密性、稳定性、重复性均较稳定, 平均加样回收率分别为 97.1%、96.3%、95.2%、94.4%、93.4%、94.4%。发酵 6 周后, 单酯型总生物碱含量变化为 4.52%~7.36%, 双酯型总生物碱含量变化为 12.40%~6.35%。结论: 通过发酵后, 单酯型生物碱含量有所增加, 双酯型生物碱含量有所降低, 化风丹药母毒性降低。

关键词: 化风丹药母; 生物碱; 发酵; 毒性; 稳定性; 高效液相色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2020) 03-0413-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.03.03

Determination of six ester alkaloids in Huafengdan Yaomu during fermentation by HPLC*

MA Fen-gang, ZHANG Yong-ping**, CAO Guo-qiong, XU jian, HU Zheng-ping

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract Objective: To study content change of six ester alkaloids in Huafengdan during fermentation in order to investigate the stability of Huafengdan Yaomu. **Methods:** HPLC was used to determine the contents of alkaloids. Analysis was performed on a Wondasil® C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase consisting of 0.1 mol · L⁻¹ ammonium acetate solution, acetonitrile and tetrahydrofuran with gradient elution

* 国家自然科学基金地区基金(81860704); 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2019]1025号); 国家苗药工程技术研究中心项目(2014FU125Q09); 贵州省教育厅普通高等学校中药民族药(苗药)新剂型新制剂工程研究中心项目(黔教合 KY 字[2014]22号); 贵中医时珍大创合字(2018)3号

** 通信作者 Tel: (0851) 85652056; E-mail: 642055255@qq.com
第一作者 Tel: 18786016885; E-mail: 1652509280@qq.com

at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 235 nm and the column temperature was 30 °C.

Results: Six ester alkaloids could be separated well. The linear ranges of benzoylneoaconitine, benzoylaconitine, benzoylhypoaconitine, neoaconitine, aconitine and aconitine were 0.086 48–1.383 68 μg, 0.032 4–0.518 4 μg, 0.027 44–0.439 04 μg, 0.094 24–1.507 84 μg, 0.084 48–1.351 68 μg and 0.022 8–0.364 8 μg, respectively. The precision, stability and repeatability were good, and the average recoveries were 97.1%, 96.3%, 95.2%, 94.4%, 93.4% and 94.4%, respectively. After 6 weeks' fermentation, the contents of monoester alkaloids and diester alkaloids changed from 4.52% to 7.36% and 12.40% to 6.35%, respectively. **Conclusions:** After fermentation, the contents of monoester alkaloids increased, and the contents of diester alkaloids decreased, which reduced the toxicity of the Yaomu.

Keywords: Huafengdan Yaomu; alkaloid; fermentation; toxicity; stability; HPLC

化风丹由紫苏叶、僵蚕、全蝎、制天南星、苍术、雄黄、硼砂、巴豆霜、人工麝香、冰片、天麻、荆芥穗、檀香、朱砂 14 味中药和药母组成。化风丹具有息风镇痉、豁痰开窍的功效,主要用于治疗风痰闭阻、中风偏瘫、癫痫、面神经麻痹、口眼歪斜等症,是世界上生产、销售时间较长的治疗脑部疾病的中成药之一^[1-3]。化风丹同时采用了植物、动物和矿物药三效组方组成,治疗疾病的范围较广,疗效较好。其中药母为化风丹处方中的君药,是由白附子、生半夏、生天南星、生川乌、郁金、神曲粉末混合均匀后,加入牛胆汁搅拌均匀,通过特定的环境以及一定周期发酵而成,其中生物碱成分(尤其双酯型生物碱)是药母中主要指标性成分,也是毒性成分。本研究旨在测定发酵过程中药母中苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、新乌头碱、乌头碱、次乌头碱 6 个单 / 双酯型生物碱成分的含量变化,以提高和改善化风丹药母的质量标准。探究药母在发酵过程中毒性较大的双酯型生物碱是否转换为毒性较小的单酯型生物碱,以保证药品质量可靠,用药安全有效。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

安捷伦 1260 高效液相色谱仪(Agilent 公司); METTLER AE240 万分之一分析天平(梅特勒公司); KUDDOS 型超声波清洗仪(上海商信化玻仪器有限公司); 冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),离心机(上海安亭科学仪器厂); 恒温恒湿培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试剂

化风丹药母样品由贵阳中医学院药物制剂实验

室制备;药材白附子、生半夏、生天南星、生川乌、郁金、神曲粉末,均来自于本草药行,经贵州中医药大学肖承鸿高级实验师鉴定为真品;对照品苯甲酰乌头碱(批号 17102610,含量 98.99%),苯甲酰新乌头碱(批号 18032406,含量 99.73%),苯甲酰次乌头碱(批号 18032807,含量 99.66%),乌头碱(批号 17110910,含量 98.00%),新乌头碱(批号 17111010,含量 98.12%),次乌头碱(批号 17111310,含量 99.04%)均为北京恒元启天化工技术研究院和北京世纪奥科生物技术有限公司联合研制。乙腈(国药集团化学试剂有限公司)、四氢呋喃(天津市科密欧化学试剂有限公司)均为色谱级;娃哈哈纯净水;乙酸铵(西陇化工股份有限公司)、异丙醇(上海试四赫维化工有限公司)、乙酸乙酯(上海试四赫维化工有限公司)、三氯甲烷(西陇科学股份有限公司)、氨水(重庆江川化工集团有限公司)均为分析纯。鲜牛胆(市售)。

2 方法与结果

2.1 药母的制备

经查阅相关资料^[4]和咨询遵义廖元和堂药业有限公司和贵州万胜药业有限责任公司,并依据贵阳中医学院药剂实验室前期对化风丹药母发酵工艺和干燥条件的优化,确定了化风丹药母的发酵炮制工艺:按化风丹药母处方量精密称取白附子、生半夏、生天南星、生川乌、郁金、神曲粉末(过三号筛)混合均匀,取鲜牛胆汁加入搅拌均匀,置于密闭玻璃组培瓶内,放入恒温恒湿培养箱中,在温度为 35 °C,湿度为 60% 的环境条件下进行发酵,总计发酵 6 周,每隔 1 周取样 1 次,备用,具体发酵过程样品信息详见表 1。

2.2 色谱条件

选用 Wondasil[®] C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相采用 0.1 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液 (A) - 乙腈 (B) - 四氢呋喃 (C), 梯度洗脱, 具体洗脱程序见表 2; 检测波长为 235 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。

表 1 发酵过程药母样品信息

Tab. 1 Sample information of Huafengdan
Yaomu during fermentation process

编号 (number)	批号 (batch number)	发酵时间 (fermentation time) / 周 (week)
S0	20180526	0
S1	20180602	1
S2	20180609	2
S3	20180616	3
S4	20180623	4
S5	20180630	5
S6	20180707	6

表 2 流动相洗脱程序

Tab. 2 Mobile phase elution procedure

t/min	A/%	B/%	C/%
0	85	9.5	5.5
48	74	16.3	9.7
49	65	22	13
58	65	22	13
65	85	9.5	5.5

2.3 混合对照品溶液的制备

分别精密称取对照品苯甲酰乌头碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱适量, 加 0.05% 盐酸甲醇溶液制成每 1 mL 中含有苯甲酰乌头碱 32.4 μg, 苯甲酰新乌头碱 86.48 μg, 苯甲酰次乌头碱 27.44 μg, 乌头碱 22.8 μg, 新乌头碱 84.48 μg, 次乌头碱 94.24 μg 的混合对照品溶液, 备用。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取一定发酵周期的化风丹药母约 2.0 g, 置于具塞锥形瓶中, 先加氨试液 (取浓氨溶液 40 mL, 加一定量娃哈哈水定容至 100 mL) 3 mL, 精密加入异丙醇 - 乙酸乙酯 (1:1) 的混合液 50 mL, 称量, 超声 (500 W、频率 53 kHz) 1 h, 放冷, 称量, 再用异丙醇 - 乙酸乙酯 (1:1) 的混合液补足减失的量, 摇匀, 转移至 50 mL 离心管中, 置于冷冻离心机中离心 (5 000 r · min⁻¹) 5 min, 取全部上清液于玻璃蒸发

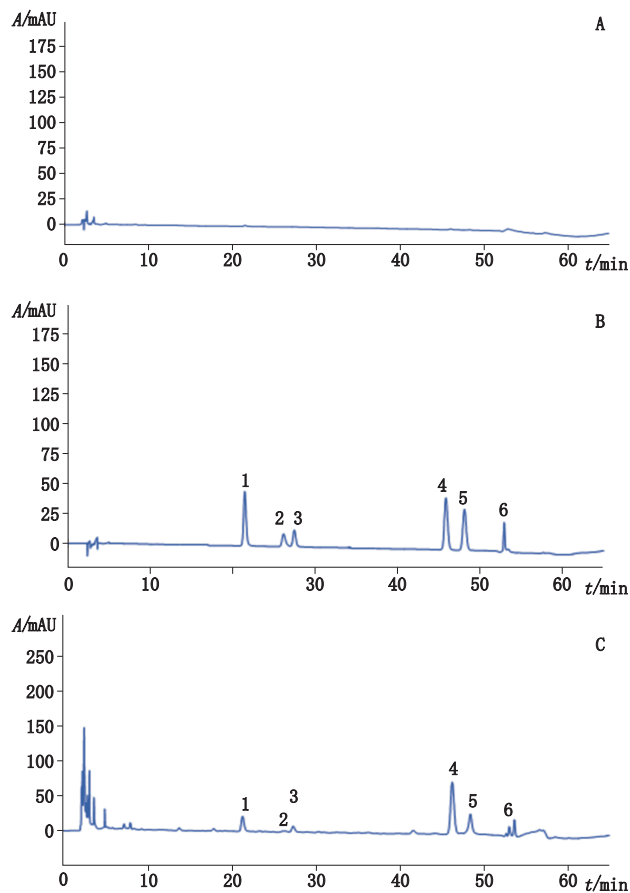
皿中, 在 50 °C 水浴锅上挥干溶剂, 所得残渣精密加入异丙醇 - 三氯甲烷 (1:1) 混合溶液 2 mL 进行溶解, 离心滤过, 取上清液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得, 备用。

2.5 测定方法

精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按照 “2.2” 项下色谱条件进行测定。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性考察 在一定条件下, 分别取上述对照品溶液、供试品 (S0) 溶液及空白溶剂进样, 按 “2.2” 项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。结果混合对照品和样品中其他组分色谱峰可达基线分离, 空白溶剂对药母中的含量测定无干扰。图谱见图 1。



1. 苯甲酰新乌头碱 (benzylneoaconitine) 2. 苯甲酰乌头碱 (benzylaconitine) 3. 苯甲酰次乌头碱 (benzylhypoaconitine) 4. 次乌头碱 (hypoaconitine) 5. 新乌头碱 (neoaconitine) 6. 乌头碱 (aconitine)

图 1 空白溶剂 (A)、混合对照品溶液 (B) 及供试品溶液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solution (A), mixed reference substances solution (B) and sample solution (C)

2.6.2 标准曲线的建立 分别精密吸取“2.3”项下制备的混合对照品溶液,取1、2、4、6、8、10、12、16 μL 注入高效液相色谱仪进行测定。以进样量 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,进行线性回归,得到苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱的线性回归方程式及线性范围见表3。

表3 线性回归
Tab.3 Linear regression

成分 (component)	标准曲线 (standard curve)	r	线性范围 (linear range) / μg
苯甲酰新乌头碱 (benzoylneoaconitine)	$Y=1110X+24.20$	0.999 6	0.086 5~1.383 7
苯甲酰乌头碱 (benzoylaconitine)	$Y=939.3X+4.191$	0.999 6	0.032 4~0.518 4
苯甲酰次乌头碱 (benzoylhypoaconitine)	$Y=1194X+6.990$	0.999 1	0.027 4~0.439 0
次乌头碱 (hypoaconitine)	$Y=1261X+4.271$	0.999 9	0.094 2~1.507 8
新乌头碱 (neoaconitine)	$Y=1154X+0.1617$	0.999 9	0.084 4~1.351 7
乌头碱 (aconitine)	$Y=1663X+2.554$	0.999 2	0.022 8~0.364 8

2.6.3 精密度试验

精密吸取“2.3”项下混合对照品溶液 10 μL ,按照“2.2”项下的色谱条件,连续进样6次,记录各个色谱峰的峰面积,计算得苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱的RSD分别为1.5%、2.1%、1.6%、1.3%、1.1%、2.8%,表明仪器精密度良好。

2.6.4 稳定性试验 取“2.4”项下供试品溶液,于室温下0、2、4、6、8、10、12 h,按照“2.2”项下的色谱条件分别进样 10 μL ,记录各个色谱峰的峰面积,计算得苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱峰面积的RSD分别为1.7%、4.3%、2.5%、1.8%、4.2%、3.8%,表明供试品溶液在室温条件下12 h相对稳定。

2.6.5 重复性试验

取同一批次药母样品,精密称定6份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,记录各个色谱峰的峰面积,计算得苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、次乌头碱、

新乌头碱、乌头碱的含量分别为0.048 4、0.007 0、0.020 4、0.1885、0.078 8、0.012 5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 及其RSD分别为2.9%、3.9%、3.6%、3.3%、3.1%、3.8%,表明重复性较好。

2.6.6 加样回收率试验

精密称定已知含量的同一批发酵的药母约1.0 g,共6份,分别加入相应的对照品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算回收率,结果显示苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱的平均回收率分别为97.1%、96.3%、95.2%、94.4%、93.4%、94.4%,RSD分别为2.9%、4.0%、2.8%、3.5%、3.9%、2.4%,表明该方法具有较好的回收率。结果见表4。

2.7 药母发酵过程中化学成分的含量变化

药母置于恒温恒湿培养箱中,在温度为35 $^{\circ}\text{C}$,湿度为60%的环境条件下进行发酵,总计发酵6周,从均匀混合初始至每隔1周进行取样1次,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱的含量变化。单/双酯型生物碱含量变化见表5和表6。

3 讨论与结论

本研究在预试验中通过查阅文献^[5-8],考察了甲醇-水(磷酸、乙酸、甲酸)、乙腈-水(磷酸、乙酸、甲酸)、乙酸铵水-乙腈-四氢呋喃、乙酸铵水-乙腈-四氢呋喃、甲醇-三乙胺溶液(磷酸调pH 3)、乙腈-0.2%冰乙酸(加三乙胺调节pH 6.25)等不同流动相,最终选择为乙酸铵水-乙腈-四氢呋喃,可使主要指标性成分分离,峰形较好。

从含量测定结果可以看出,化风丹药母在发酵1周时的含量变化较大,发酵4周后含量变化较小。由于目前粉碎工艺较粗糙、混合条件不稳定,造成化风丹药母物料存在分散混合不均匀的问题,导致不同时间点取样测定的含量有所波动,但总体呈降低趋势。总之,从表5和表6可以看出化风丹药母在发酵过程中双酯型生物碱总含量下降,单酯型生物碱总含量增加。由此推断,在发酵过程中双酯型生物碱可能转换为单酯型生物碱,以降低药母的毒性。可能在发酵过程中,因发酵时间的不同,化风丹药母中pH和微生物等一系列因素的改变使化风丹药母中化学成分含量发生变化。目前化风丹药母作用机制尚不明确,有待进一步深入研究。

表 4 单双酯型生物碱加样回收试验

Tab. 4 Recoveries of mono-diester alkaloids

成分 (component)	称样量 (sample quantity)/g	含量 (content)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
苯甲酰新乌头碱 (benzoylneoaconitine)	1.000 7	0.048 5	0.048 0	0.093 7	94.4	97.1	2.9
	1.002 4	0.048 5	0.048 0	0.094 0	94.8		
	1.003 5	0.048 6	0.048 0	0.096 0	98.7		
	1.004 1	0.048 6	0.048 0	0.097 4	101.6		
	1.006 6	0.048 7	0.048 0	0.095 8	98.0		
	1.004 6	0.048 6	0.048 0	0.094 2	94.9		
苯甲酰乌头碱 (benzoylaconitine)	1.000 7	0.007 0	0.007 0	0.013 4	92.0	96.3	4.0
	1.002 4	0.007 0	0.007 0	0.013 6	94.2		
	1.003 5	0.007 0	0.007 0	0.013 9	99.1		
	1.004 1	0.007 0	0.007 0	0.014 1	102.0		
	1.006 6	0.007 0	0.007 0	0.013 5	93.2		
	1.004 6	0.007 0	0.007 0	0.013 8	97.2		
苯甲酰次乌头碱 (benzoylhypoaconitine)	1.000 7	0.020 4	0.020 0	0.040 2	98.9	95.2	2.8
	1.002 4	0.020 5	0.020 0	0.039 5	95.3		
	1.003 5	0.020 5	0.020 0	0.039 4	94.4		
	1.004 1	0.020 5	0.020 0	0.038 8	91.7		
	1.006 6	0.020 6	0.020 0	0.039 2	93.5		
	1.004 6	0.020 5	0.020 0	0.040 0	97.4		
次乌头碱(hypoaconitine)	1.000 7	0.188 6	0.190 0	0.373 7	97.4	94.4	3.5
	1.002 4	0.188 9	0.190 0	0.372 8	96.8		
	1.003 5	0.189 1	0.190 0	0.359 4	89.6		
	1.004 1	0.189 2	0.190 0	0.362 2	91.0		
	1.006 6	0.189 7	0.190 0	0.370 7	95.2		
	1.004 6	0.189 3	0.190 0	0.372 9	96.6		
新乌头碱(neoaconitine)	1.000 7	0.078 8	0.080 0	0.158 4	99.4	93.4	3.9
	1.002 4	0.078 9	0.080 0	0.150 9	89.8		
	1.003 5	0.079 0	0.080 0	0.151 9	90.9		
	1.004 1	0.079 1	0.080 0	0.156 0	96.1		
	1.006 6	0.079 3	0.080 0	0.153 8	93.1		
	1.004 6	0.079 1	0.080 0	0.152 2	91.2		
乌头碱(aconitine)	1.000 7	0.012 5	0.013 0	0.024 9	94.8	94.4	2.4
	1.002 4	0.012 5	0.013 0	0.024 8	93.8		
	1.003 5	0.012 5	0.013 0	0.024 7	93.0		
	1.004 1	0.012 6	0.013 0	0.025 0	95.9		
	1.006 6	0.012 6	0.013 0	0.025 3	97.5		
	1.004 6	0.012 6	0.013 0	0.024 5	91.2		

表 5 单酯型生物碱含量

Tab. 5 Contents of monoester alkaloids

发酵时间 (fermentation time)/d	苯甲酰新乌头碱 (benzoylneoaconitine)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	苯甲酰乌头碱 (benzoylaconitine)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	苯甲酰次乌头碱 (benzoylhypoaconitin)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	单酯型含量 (monoester alkaloid content)/%
0	34.705 3	5.010 9	5.493 0	4.52
7	42.533 3	5.940 5	4.846 7	5.33
14	49.735 4	3.250 3	6.187 5	5.92
21	44.472 0	0.000 0	10.005 6	5.45
28	59.641 1	5.121 6	13.518 5	6.90
35	57.034 8	4.770 3	13.761 3	7.56
42	59.386 3	4.403 0	9.840 3	7.36

表 6 双酯型生物碱含量

Tab. 6 Contents of diester alkaloids

发酵时间 (fermentation time)/d	次乌头碱 (hypoaconitine)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	新乌头碱 (neoaconitine)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	乌头碱 (aconitine)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	双酯型含量 (diester alkaloid content)/%
0	65.910 1	48.151 8	9.957 7	12.40
7	74.543 4	44.290 1	7.244 9	12.61
14	55.279 0	30.269 3	8.192 3	9.37
21	47.477 0	31.668 7	4.865 9	8.40
28	33.097 8	27.941 3	4.887 0	6.59
35	34.925 4	27.528 2	5.551 7	6.80
42	33.438 7	25.214 3	4.887 0	6.35

化风丹药母在前期研究^[7]中,仅测定了3个毒性较大的双酯型生物碱的含量。本研究增加了3个单酯型生物碱的含量测定,探究了化风丹药母双酯型生物碱含量降低的同时是否转换单酯型生物碱,可以更好地控制化风丹药母的质量。

本研究采用高效液相色谱技术,开展不同发酵时间化风丹药母化学成分定量测定,探明不同发酵时间化风丹药母中化学成分的变化;在后期研究中应开展化风丹药母发酵过程中不同阶段其微生物多样性鉴定研究,明确发酵过程中微生物菌群变化;采用毒理学方法研究不同发酵时间化风丹药母毒性作用。基于微生物多样性和化学成分变化及毒理学数据分析,挖掘不同发酵时间药母中优势菌种与化学成分变化及毒性相关性;通过对优势菌种生物转化研究揭示药母发酵减毒的科学内涵,为化风丹药母发酵减毒

提供实验依据,为化风丹药母现代发酵菌种选择提供依据并为有毒中药复方炮制提供新思路。通过测定了发酵过程中药母中单/双酯型生物碱的含量变化,为药厂大批量生产提供了一定的依据,给临床用药提供了保障,保证了质量的安全可靠。

发酵是指经过净制或处理后的药物,在一定温度和湿度条件下,利用霉菌和酶的催化分解作用,使药物发泡,生衣的方法。发酵主要可以改变药物的原有性能,产生新的治疗作用,增强疗效,减弱毒副作用,还可以扩大用药范围,还有利于成分溶出及产生新的活性成分等^[9-12]。发酵过程主要是微生物新陈代谢的过程。化风丹药母中白附子,生川乌,生半夏,生天南星都是毒性中药,通过发酵的方式不仅能够降低原有药物的毒副作用,而且还能提高原有药物的治疗效果。

参考文献

- [1] 徐文峰,李怡,金鹏飞,等. 化风丹的研究进展[J]. 中南药学, 2017, 15(8): 1100
XU WF, LI Y, JIN PF, *et al.* Research progress of Huafengdan [J]. Cent South Pharm, 2017, 15(8): 1100
- [2] 曹国琼,张永萍,徐剑,等. 化风丹中 As_2S_2 及 As_2O_3 的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 54
CAO GQ, ZHANG YP, XU J, *et al.* Determination of As_2S_2 and As_2O_3 in Huafengdan [J]. Chin J Exper Form, 2015, 21(7): 54
- [3] 田兴中,付中祥,隋怡,等. 化风丹对大鼠的亚慢性肝肾毒性研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(19): 5
TIAN XZ, FU ZX, SUI Y, *et al.* Subchronic hepatorenal toxicity of Huafengdan in rats [J]. Asia-Pac Tradit Med, 2016, 12(19): 5
- [4] 曹国琼,张永萍,徐剑,等. 化风丹药母干燥工艺的研究[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(7): 38
CAO GQ, ZHANG YP, XU J, *et al.* Study on drying technology of Huafengdan pharmaceutical mother [J]. Chin J Ethn Med, 2012, 18(7): 38
- [5] 李智勇,邓亚利,孙冬梅. HPLC 法测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱[J]. 中成药, 2011, 33(6): 988
LI ZY, DENG YL, SUN DM. Determination of aconitine, hypaconitine and neoaconitine in Cantong cataplasm by HPLC [J]. Chin Pat Med, 2011, 33(6): 988
- [6] 罗霄,彭善贵,文永盛,等. HPLC 测定制川乌中的乌头碱、次乌头碱和新乌头碱[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(4): 472
LUO X, PENG SG, WEN YS, *et al.* Determination of aconitine, hypaconitine and neoaconitine in Radix Aconiti Preparata by HPLC [J]. J West China Pharm, 2010, 25(4): 472
- [7] 曹国琼,张永萍,徐剑,等. 高效液相色谱法测定化风丹药母中 3 种双酯型生物碱含量[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(11): 58
CAO GQ, ZHANG YP, XU J, *et al.* Determination of three diester alkaloids in Huafengdan pharmaceutical mother by high performance liquid chromatography [J]. Guizhou Agr Sci, 2014, 42(11): 58
- [8] 丁文丽. HPLC 法在中药饮片制川乌、乌头碱含量测定中的应用[J]. 西部中医药, 2014, 27(11): 32
DING WL. Application of HPLC in the determination of aconitine and aconitine in the preparation of Chinese herbal pieces [J]. West Chin Med, 2014, 27(11): 32
- [9] 刘双,杨静,江振作,等. 中药“神曲”发酵工艺及质量标准研究进展[J]. 天津中医药, 2015, 32(5): 318
LIU S, YANG J, JIANG ZZ, *et al.* Research progress on fermentation technology and quality standard of Chinese traditional medicine Shenqu [J]. Tianjin Tradit Chin Med, 2015, 32(5): 318
- [10] 于定荣,麻印莲,顾雪竹,等. 白芍发酵菌种及发酵工艺的优选[J]. 中草药, 2014, 45(20): 2924
YU DR, MA YL, GU XZ, *et al.* Selection of fermentation strains and fermentation technology of *Paeonia lactiflora* [J]. Chin Herb Med, 2014, 45(20): 2924
- [11] 杨清,徐立,王俊,等. 桑红茶发酵工艺条件优化及活性成分含量的动力学研究[J]. 蚕业科学, 2010, 36(2): 221
YANG Q, XU L, WANG J, *et al.* Study on optimization of fermentation conditions and kinetics of active ingredients in mulberry black tea [J]. Sericul Sci, 2010, 36(2): 221
- [12] 孟金明,沈艳华,贾氏臣,等. 液态发酵生产大麦酒发酵工艺的研究[J]. 酿酒科技, 2015(9): 86
MENG J, SHEN YH, JIA SC, *et al.* Study on fermentation technology of barley wine by liquid fermentation [J]. Brewing technol, 2015(9): 86

(本文于 2019 年 5 月 9 日收到)