

不同比例制川乌配伍甘草对单酯型生物碱煎出量的影响

王峰峰^{1,2}, 宋兆辉², 张兰兰², 周水平², 冯 锋^{1*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

2. 天津天士力集团研究院 中药所, 天津 300410

摘要: **目的** 研究制川乌配伍甘草对制川乌中多种单酯型生物碱煎出量的影响, 探索其变化规律, 以指导制川乌与甘草的合理配伍。 **方法** HPLC 法测定制川乌与甘草不同比例配伍时煎出液中单酯型生物碱的总量, 并通过对比, 分析不同配比对煎出量的影响。 **结果** 随着甘草配伍量的增加, 煎煮液中单酯型生物碱总量逐渐降低, 每种单酯型生物碱煎出量趋于单煎液煎出量的 40%。 **结论** 甘草配伍制川乌时, 甘草的使用量应是制川乌的一半以上, 既可以保证煎出液中单酯型生物碱总量稳定可控, 又可以防止制川乌毒性过大造成使用危险。

关键词: 制川乌; 甘草; 配伍; 单酯型生物碱; 毒性

中图分类号: R283.1; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1101-04

Effect of *Aconiti Radix Preparata* combined with *Glycyrrhizae Radix* in different ratios on monoester alkaloids

WANG Feng-feng^{1,2}, SONG Zhao-hui², ZHANG Lan-lan², ZHOU Shui-ping², FENG Feng¹

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. TCM R&D Institute of Tasly Academy, Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: **Objective** To study the effect of *Aconiti Radix Preparata* (RAP) combined with *Glycyrrhizae Radix* (RG) in different ratios on the decocted yield of monoester-type alkaloid from RAP and to investigate the disciplines of various compatibilities. **Methods** HPLC was adopted to determine the monoester-type alkaloid in decoction with different ratios of RAP and RG. The influence of the various compatibilities on alkaloid was analyzed. **Results** The total decocted yields of monoester-type alkaloid in the decoction decreased with the increasing of RG in the decoction. The monoester-type alkaloid in compatibility tended to be 20% of RAP single decoction. **Conclusion** The usage of RG should be more than half of that of RAP when using together, which could make the yields of monoester-type alkaloid stable and controllable and avoid the danger for use from the excessive toxicity of RAP.

Key words: *Aconiti Radix Preparata* (RAP); *Glycyrrhizae Radix* (GR); compatibility; monoester-type alkaloids; toxicity

川乌为毛茛科植物川乌 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根, 制川乌为其炮制加工品。制川乌味辛、苦、热, 有毒; 具有祛风除湿、温经止痛的功效, 主要用于风寒湿痹、关节冷痛、心腹冷痛、寒疝作痛及麻醉止痛^[1]。制川乌的主要成分分为二萜型生物碱, 其中量最高的是以苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰乌头原碱为代表的 C₁₉ 单酯型生物碱, 单酯型生物碱是双酯型生物碱水解脱去乙酰基的产物。现代药理学研究表明, 双酯型生物碱既是川乌和制川乌的有效

成分, 又是其毒性成分, 其水解产物单酯型生物碱在保留了双酯型生物碱药理活性的同时毒性降为原来的 1/200^[2-3]。由于川乌和制川乌均为有毒药材, 因此在使用时常同甘草或白芍等药味配伍使用以达到减毒的作用。以往配伍研究多集中在双酯型生物碱^[4-11], 对单酯型生物碱量变化的研究则较少, 本实验旨在通过研究制川乌与甘草不同配伍比例下 3 种有代表性的单酯型生物碱的煎出量, 找出不同配伍比例的影响和变化规律, 以指导制川乌的临床应用。

收稿日期: 2011-11-25

基金项目: “十一五”国家重大新药创制课题 (2010ZX09401-406)

作者简介: 王峰峰 (1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事制川乌配伍减毒的研究。Tel: (022)26736053 E-mail: wangff666@126.com

*通讯作者 冯 锋 Tel: (025)83271517 E-mail: fengsunlight@163.com

网络出版时间: 2012-05-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120511.0849.005.html>

1 仪器与材料

MF10basic 粉碎机 (德国 IKA 集团); Agilent 1200 液相色谱仪, 配有四元低压梯度混合系统、二极管阵列检测器 (美国 Agilent 公司); XS205 分析天平, MAX 81 g/220 g, d=0.01 mg/0.1 mg (瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

乙腈、四氢呋喃、异丙醇 (均为色谱纯, 德国 Merck 公司), 无水乙醇、醋酸铵、醋酸 (均为分析纯, 天津市化学试剂一厂), 三氯甲烷 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 二纯水 (Milli-Q 制备), 蒸馏水 (自制)。

苯甲酰乌头原碱 (批号 PCM-CW-04-20100902)、苯甲酰次乌头原碱 (批号 PCM-CW-05-20100925)、苯甲酰新乌头原碱 (批号 PCM-CW-06-20101110), 均购自天津马克生物技术有限公司, HPLC 面积归一化测定质量分数均大于 98%。

制川乌饮片、甘草饮片购自安国市药材市场, 经中国药科大学冯锋教授鉴定, 分别为毛茛科植物川乌 *Aconitum carmichaeli* Debx. 干燥母根的炮制品、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎。制川乌粉碎成最粗粉 (全部通过 1 号筛), 备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[12]

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 CH₃CN-THF (5:3, A)-0.1 mol/L CH₃COONH₄ 水溶液 (每 1 000 mL 加入 0.5 mL CH₃COOH, B), 梯度洗脱: 0~48 min, 15%~26% A; 48~49 min, 26%~35% A; 49~58 min, 35% A; 58~65 min, 35%~15% A; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 235 nm; 进样量 10 μL。制川乌配伍甘草合煎液谱图及甘草阴性样品谱图见图 1, 阴性样品在相应位置无干扰。

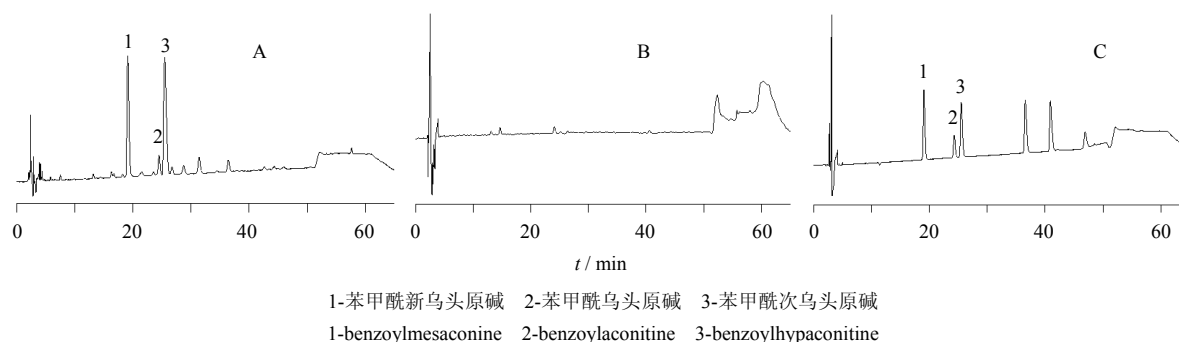


图 1 混合对照品 (A)、甘草阴性样品 (B) 和制川乌与甘草合煎液供试品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), negative sample (B), and decoction of ARP combined with GR (C)

2.2 对照品储备液的制备

精密称取苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱对照品适量, 加异丙醇-三氯甲烷 (1:1) 混合溶液^[12]制成含苯甲酰新乌头原碱 150.44 μg/mL、苯甲酰次乌头原碱 152.70 μg/mL、苯甲酰乌头原碱 55.27 μg/mL 的混合溶液, 作为混合对照品储备液, 备用。

2.3 供试品溶液制备

2.3.1 制川乌单煎试验样品的制备 称取 50 g 制川乌粗粉, 加入 10 倍量 50% 乙醇溶液, 加热回流, 从溶液沸腾时开始计时, 在 0.5 h 时停止加热, 迅速冷却, 滤过, 取续滤液 10 mL, 用等量乙醚洗涤 1 次, 弃去乙醚层, 再加入 2 mL 浓氨水, 混匀, 用 10 mL 乙醚萃取 2 次, 合并萃取液, 减压常温浓缩至干,

残渣用异丙醇-三氯甲烷 (1:1) 混合溶液溶解, 定容到 2 mL, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 照“2.1”项下色谱条件测定。

2.3.2 制川乌与甘草配伍样品的制备 称取制川乌粗粉 50 g, 分别配伍甘草 12.5、25、50、75、100 g, 按照“2.3.1”项下方法, 自“加入 10 倍量 50% 乙醇溶液”起操作。

2.3.3 阴性样品制备 称取 50 g 甘草饮片, 按照“2.3.1”项下方法, 自“加入 10 倍量 50% 乙醇溶液”起操作。

2.4 线性关系考察

分别吸取混合对照品储备液 2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 量瓶中, 用异丙醇-三氯甲烷 (1:1) 定容, 进样检测。分别以峰面积为纵坐标 (Y), 生物碱质

量分数为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程: 苯甲酰新乌头原碱 $Y=11.874 X-84.269, r=0.999 9$; 苯甲酰次乌头原碱 $Y=10.619 X-57.233, r=0.999 9$; 苯甲酰乌头原碱 $Y=10.619 X-57.233, r=0.999 4$ 。表明苯甲酰新乌头原碱在 $0.30 \sim 3.00 \mu\text{g}$ 、苯甲酰次乌头原碱在 $0.31 \sim 3.10 \mu\text{g}$ 、苯甲酰乌头原碱在 $0.11 \sim 1.10 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.5 精密度试验

按“2.1”项下色谱条件, 重复进样混合对照品储备液 6 次, 测定峰面积, 计算其 RSD, 分别为苯甲酰新乌头原碱 0.9%、苯甲酰次乌头原碱 1.1%、苯甲酰乌头原碱 0.9%。

2.6 稳定性试验

取制川乌甘草合煎供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0、4、8、12 h 时进样, 测定峰面积, 计算其 RSD, 分别为苯甲酰新乌头原碱 1.5%、苯甲酰次乌头原碱 3.9%、苯甲酰乌头原碱 2.9%。表明样品在 12 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

取制川乌粗粉 50 g 6 份, 每份配伍甘草 50 g, 按“2.3.2”项下方法平行处理, 按照“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算各成分质量分数的 RSD, 分别为苯甲酰新乌头原碱 4.2%、苯甲酰次乌头原碱 3.9%、苯甲酰乌头原碱 3.1%。

2.8 加样回收率试验

取制川乌甘草合煎溶液 6 份, 每份 10 mL。分别加入相当于合煎液样品量 100% 的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱混合对照品, 按照“2.3.1”项下方法, 自“用等量乙醚洗涤 1 次”起操作。计算得回收率分别为苯甲酰新乌头原碱 98.5% (RSD 为 2.3%), 苯甲酰乌头原碱 96.1% (RSD 为 4.1%), 苯甲酰次乌头原碱 97.8% (RSD 为 1.9%)。

2.9 各种单酯型生物碱煎出量比较

制川乌单煎液及与甘草合煎液中各单酯型生物碱量结果见表 1。以制川乌单煎液中 3 种生物碱的量为 1, 计算不同配比煎出液中 3 种生物碱对单煎液中 3 种生物碱的比值, 结果见图 2。

从表 1 和图 2 中可以看出, 随着甘草配伍量的增加, 3 种单酯型生物碱总量均逐渐减少。在甘草配伍量小于制川乌量的一半时, 单酯型生物碱减少速率较快; 在甘草配伍量大于制川乌的一半时, 单酯型生物碱减少速率较慢, 且有趋向定值的趋势。

表 1 制川乌合煎与单煎时 3 种单酯型生物碱的量

Table 1 Contents of three kinds of monoester-type alkaloids in different decoctions

制川乌与甘草配伍比例	苯甲酰新乌头原碱 / mg	苯甲酰乌头原碱 / mg	苯甲酰次乌头原碱 / mg
1 : 2	87.66	11.18	85.32
1 : 1.5	100.70	13.90	88.72
1 : 1	108.04	13.04	99.02
1 : 0.5	118.34	13.12	107.25
1 : 0.25	110.79	18.68	142.07
1 : 0	235.61	32.43	232.64

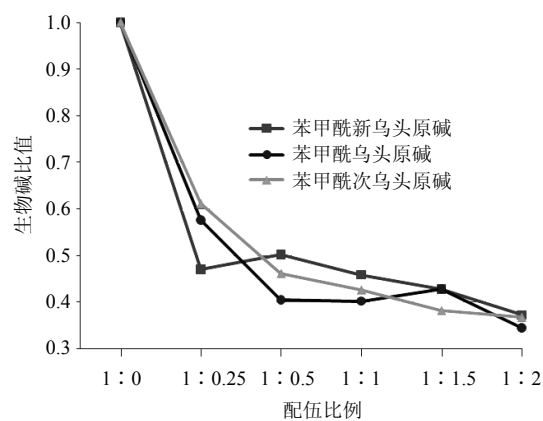


图 2 制川乌合煎时单酯型生物碱总量同单煎时生物碱总量比值变化图

Fig. 2 Ratio changes of total yields of monoester-type alkaloids in different decoctions

由此变化规律来看, 当甘草使用量为制川乌的一半以上时, 即可使溶液中的单酯型生物碱稳定在单煎煎出量的 40%。

3 讨论

3.1 研究对象的确定

制川乌中主要含单酯型生物碱, 其毒性较川乌中所含的双酯型生物碱小, 但是在实际应用中亦不可忽视其毒性。本研究中双酯型生物碱在药材中、单煎液和合煎液中由于炮制和合用的减毒效果使双酯型生物碱发生分解转化等变化, 使其量显著降低, 均无法检出, 因此不将双酯型生物碱作为考察对象, 而是将制川乌中所含量最多的 3 种单酯型生物碱作为考察对象。

3.2 煎煮条件的确定

在前期试验中分别考察了药材粉碎程度、煎煮时间、溶剂倍数、溶剂种类对制川乌中生物碱溶出量的影响, 发现药材粉碎程度、煎煮时间和溶剂倍

数对生物碱溶出影响不大,溶剂种类是主要影响因素。在 50%乙醇溶液中可以煎出最多的生物碱,因此选择将药材粉碎成最粗粉,加入 10 倍量 50%乙醇,煎煮 0.5 h 作为煎煮条件。通过对照品水解试验发现,单酯型生物碱在 50%乙醇溶液中较稳定,因此使用 50%乙醇不但可以煎出最多的生物碱,又能够保证单酯型生物碱的稳定。

制川乌和甘草合煎液中成分复杂,直接测定时甘草有干扰,无法准确测定单酯型生物碱的量。进一步测定溶液 pH 值发现,煎煮液 pH 值均在 4~5,生物碱在溶液中以离子形式存在,因此先用乙醚洗去大量脂溶性杂质,再加氨水碱化萃取生物碱可以得到较准确的结果。

从《中国药典》2010 年版收录的多种复方制剂来看,共有骨刺丸、骨刺消痛丸等 4 种制剂使用到了制川乌和甘草药对^[1],4 种制剂中制川乌和甘草比例均为 1:1。从本实验结果来看,当甘草使用量是制川乌的一半以上时,单酯型生物碱的煎出量趋于定值。4 种成方制剂中使用等倍量的甘草即保证了制川乌的药效又去除了部分毒性,同时使有效物质单酯型生物碱总量趋于稳定可控的量。初步推测,在配伍使用中甘草使用量至少是制川乌的一半,才可以达到良好的减毒增效作用,这一推测有待进一步药理实验证实。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 杨 姝,金振辉,羊晓东,等. 乌头属植物的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 云南农业大学学报: 自然科

学版, 2007, 22(2): 293-298.

[3] 苏孝礼,刘成基. 中药乌头去毒指数的测定 [J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(4): 229-233.

[4] 王 勇,石 磊,金东明,等. 四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的溶出和水解平衡 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 311-314.

[5] 孙 兰,周海燕,赵润怀,等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 131-134.

[6] 许庆轩,王 勇,宋凤瑞,等. 八味地黄汤各药味对附子生物碱影响的电喷雾质谱研究 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 519-522.

[7] 余成浩,彭 成,余葱葱,等. 制川乌与白芍不同配伍比例对总生物碱含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 1-2.

[8] 何 伟,王 宁,秦 林,等. 川乌与白芍配伍前后乌头碱和芍药苷煎出量的测定 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(9): 680-683.

[9] 郝瑞云,刘永刚,张宏桂,等. HPLC-MSⁿ 法研究次乌头碱在水中的化学反应 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(8): 539-542.

[10] 郑 琴,陆浩伟,郝伟伟,等. 乌头类双酯型生物碱水解转化规律及含量计算方法研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(9): 652-656.

[11] 黄勤安,张聿梅,何 轶,等. 乌头碱水解转化规律的研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(20): 2143-2145.

[12] 张聿梅,鲁 静,蒋 渝,等. 川乌和制川乌中单酯及双酯型生物碱成分的含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 807-812.