

镇痛灵方分煎与合煎液中有效成分的比较研究

郑 琴, 郝伟伟, 杨 明*, 王木生, 乐志艳, 陆浩伟, 胡鹏翼

江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 考察合煎、分煎镇痛灵方提取液中乌头总生物碱、芍药苷及胡椒碱的变化。方法 采用紫外-可见分光光度(UV-Vis)法测定乌头总生物碱; 采用 Hypersil ODS2 C₁₈ 柱, 流动相分别以乙腈-0.1%磷酸水溶液(15:85), 在230 nm波长处测定芍药苷; 甲醇-水(75:25), 在328 nm波长处测定胡椒碱。结果 线性范围分别为乌头总生物碱3.28~29.80 μg/mL、芍药苷0.408~40.800 μg/mL、胡椒碱1.5~9.0 μg/mL, 合煎液中乌头总生物碱和芍药苷的量明显高于分煎液, 合煎液和分煎液中胡椒碱的量无明显差别。结论 镇痛灵方合煎与分煎对有效成分的溶出有影响。

关键词: 镇痛灵方; 合煎; 分煎; 乌头总生物碱; 芍药苷; 胡椒碱

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1957-04

Comparison on active ingredients in Zhentongling Prescription of different decoctions

ZHENG Qin, HAO Wei-wei, YANG Ming, WANG Mu-sheng, LE Zhi-yan, LU Hao-wei, HU Peng-yi

Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Key words: Zhentongling Prescription (ZTLP); combined decoctions; separated decoctions; *Aconitum* total alkaloids; paeoniflorin; piperine

临床经验方镇痛灵方是根据民间验方仲氏止痛散结合临床实践, 予以加减化裁而成的经验方, 具有温通散寒、活血行气、化瘀止痛作用, 主要用于乳痛、痛经、腹部及肢体疼痛、术后疼痛等的治疗。药理研究表明, 该方对大鼠实验性糖尿病具有降血糖作用, 作用机制可能与其促进四氧嘧啶引起的大鼠胰岛β细胞损伤的修复和胰岛素的分泌, 增加肝糖元合成, 改善耐糖功能有关^[1]。该方由制川乌、胡椒、白芍、延胡索4味药组成, 方中以制川乌祛风除湿、温经止痛为君药; 胡椒辛、大温, 温中祛痰、宣散下气; 白芍苦酸、微寒, 养血柔肝、缓中止痛、敛阴收汗, 并能抑制其他两味之温热性; 二者同为方中臣药。诸药合用, 既有温经散寒、活血行气止痛之效, 又无过于辛温而伤正之弊。

制川乌为川乌的炮制品, 含有的乌头类生物碱

既是药效成分也是毒性成分^[2], 其有效剂量与中毒剂量接近, 用量不慎, 易引起中毒现象^[3], 因此控制该类成分的定量限度尤为重要。研究表明白芍具有良好的抗炎、镇痛功效, 其有效部位主要为糖苷类物质包括芍药苷、羟基芍药苷、芍药花苷、芍药内酯苷等, 统称为总苷。其中芍药苷占总苷量的90%以上, 是白芍的主要有效成分^[4]。胡椒碱是胡椒的主要活性成分, 其化学结构属于桂皮酰胺类, 已有研究证明这类化合物具有镇静、催眠、抗惊厥、骨骼肌松弛和抗抑郁等多方面的作用^[5]。

中药成分复杂, 不同成分在共煎过程中可能产生多种相互作用, 使得共煎时的成分量和效应并不是分煎时各成分的简单加和。本实验以镇痛灵方中的有效成分乌头总生物碱、芍药苷及胡椒碱为考察指标, 比较分煎与合煎提取液中有效成分溶出的差

收稿日期: 2012-01-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81060347); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ08333)

作者简介: 郑 琴(1973—), 女, 江西九江人, 副教授, 博士, 主要从事中药新型给药系统研究。

Tel: (0791)87119010 18979102599 E-mail: zhengqin912006@163.com

*通讯作者 杨 明 Tel: (0791)87118658 13870608983 E-mail: yangming16@126.com

网络出版时间: 2012-09-07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120907.1018.002.html>

异,以期阐明该方合煎、分煎对活性成分的影响,从而为合理选择提取方法提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200 液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、G1314B VWD 紫外检测器,UV—2102 紫外分光光度计(美国 Unico 公司),PHS—3 C 精密 pH 计(上海精密仪器科技有限公司雷磁仪器厂),BS124S 电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

乌头碱对照品(批号 110720-200410)、芍药苷对照品(批号 110736-200629)、胡椒碱对照品(批号 0775-200203)均购自中国药品生物制品检定所。制川乌药材购自江油恒源药业集团有限公司,产自四川,批号 20080930,白芍、胡椒等药材购自黄庆仁大药房,产地分别为浙江和海南,批号分别为 20080925、20070730,经江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室刘荣华教授鉴定分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根炮制品、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,以及胡椒科植物胡椒 *Piper nigrum* L. 的干燥近成熟或成熟果实。乙腈、甲醇为色谱纯(江苏汉邦),双蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 合煎液的制备 按镇痛灵方处方及比例称取 1/10 处方量的各味药中粉共 137 g,加 6 倍量 65%乙醇,回流提取 2 h,共 3 次,合并 3 次提取液,滤过,浓缩至一定体积。

2.1.2 分煎液的制备 按镇痛灵方处方及比例称取 1/10 处方量的各味药中粉共 137 g,由于川乌、白芍两药配伍具有增效减毒的作用,分煎液中将制川乌与白芍药材作为一个单元提取,胡椒和另一味药材则分别单独提取,依上法分别加 6 倍量 65%乙醇回流提取 2 h,共 3 次,制备各单味药材的煎液,合并各煎液,浓缩至一定体积。

2.1.3 阴性样品的制备 分别按上述方法制备缺制川乌、缺白芍、缺胡椒的阴性对照液。

2.2 有效成分的定量测定

2.2.1 乌头总生物碱最大吸收波长的选择^[6] 分别取乌头碱对照品溶液、合煎液和制川乌阴性提取液,按照“2.2.3”和“2.2.4”项方法分别制备对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,照 UV-Vis 法在 190~760 nm 进行全波长扫描,确定最大吸收

波长为 416 nm。

2.2.2 色谱条件

(1) 芍药苷^[7]:十八烷基键合硅胶柱 Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水(15:85),柱温 30 ℃,检测波长 230 nm,体积流量 1.0 mL/min。

(2) 胡椒碱:十八烷基键合硅胶柱 Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(75:25),柱温 25 ℃,检测波长 328 nm,体积流量 1.0 mL/min。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取 60 ℃减压干燥的乌头碱、芍药苷、胡椒碱对照品适量,分别加 0.01 mol/L 盐酸溶液、50%甲醇、无水乙醇适量使溶解,摇匀,分别配制成质量浓度为乌头碱 149 μg/mL、芍药苷 40.80 μg/mL、胡椒碱 15 μg/mL 的 3 种对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液的制备 分别精密吸取合煎液与分煎液及缺制川乌阴性溶液各 10 mL,低温蒸干,残渣用 10 mL 蒸馏水溶解,加氨试液调节 pH 值至 10~11,用氯仿萃取 4 次,每次 10 mL,合并氯仿液,低温蒸干,残渣加 0.01 mol/L 盐酸溶液,分次溶解,并转入 25 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,得供试品 1、2 及缺制川乌阴性溶液。精密量取供试品 1、2 溶液与缺制川乌阴性溶液各 2 mL,分别置分液漏斗中,各精密加醋酸-醋酸钠缓冲液 10 mL,溴甲酚绿液 2 mL,氯仿 10 mL,振摇 3 min,静置,分取氯仿液,依法制备供试品 3、4,供乌头总生物碱的测定。

精密吸取合煎液与分煎液各 1 mL 置 25 mL 量瓶,加 65%乙醇定容至刻度,4 000 r/min 离心 5 min,上清液经 0.45 μm 滤膜滤过,得供试品 5、6,供芍药苷和胡椒碱测定用。

2.2.5 专属性考察 分别吸取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液,按上述色谱条件测定,芍药苷、胡椒碱出峰位置处,阴性对照液均无干扰,样品色谱图见图 1、2。

2.2.6 线性关系考察 精密量取 0.00、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 mL 乌头碱对照品溶液,分别置分液漏斗中,依次加入 0.01 mol/L 盐酸溶液 2.00、1.75、1.50、1.25、1.00、0.50、0.00 mL,各精密加醋酸-醋酸钠缓冲液 10 mL,溴甲酚绿液 2 mL,氯仿 10 mL,振摇 3 min,静置,分取氯仿液,按 UV-Vis 法(《中国药典》2010 年版附录 V)在

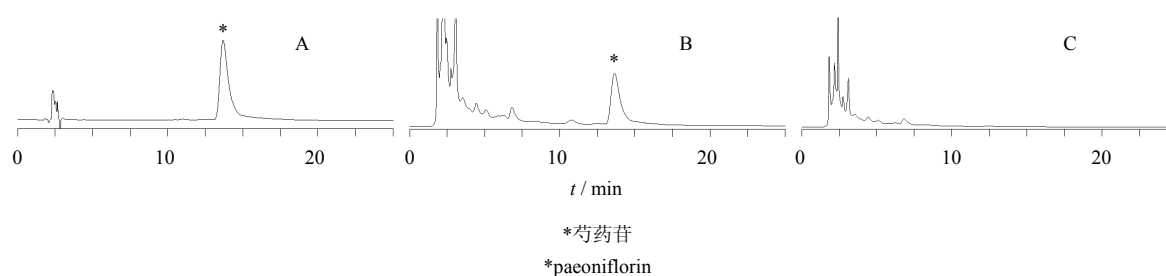


图 1 芍药苷对照品 (A)、镇痛灵方合煎样品 (B)、阴性样品 (C) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of paeoniflorin reference substance (A), combined decoction of ZTLP sample (B), and negative sample (C)

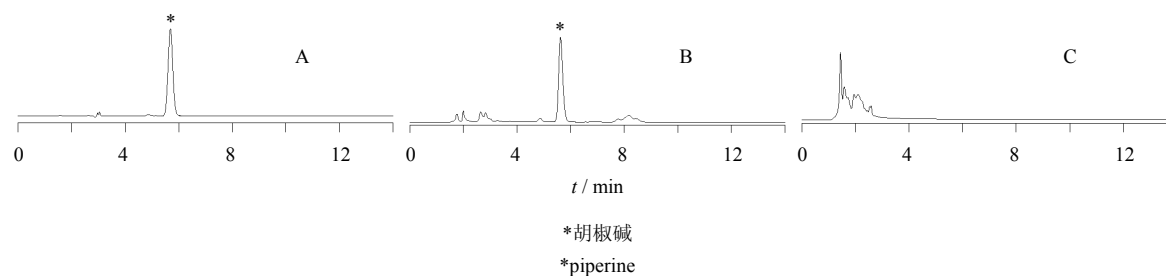


图 2 胡椒碱对照品 (A)、镇痛灵方合煎样品 (B)、阴性样品 (C) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC chromatograms of piperine reference substance (A), combined decoction of ZTLP sample (B), and negative sample (C)

416 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。以质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.6678X+0.115$, $r=0.9998$, 表明乌头总生物碱在 3.28~29.8 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

精密吸取芍药苷对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置 1 mL 棕色量瓶中, 用 50% 甲醇溶液定容至刻度, 摇匀, 制得 6 个不同质量浓度的对照品溶液。取上述质量浓度对照品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件分别进样 10 μL 分析。以芍药苷的质量浓度为横坐标 (X), 平均峰面积值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=25.924X-3.2414$, $r=0.9995$; 表明芍药苷在 0.408~40.800 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

精密吸取胡椒碱对照品溶液 1、2、3、4、5、6 mL 置 10 mL 量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度摇匀, 制备 1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。分别精密吸取各对照品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件分别进样 10 μL 进行分析。以胡椒碱的质量浓度为横坐标 (X), 平均峰面积值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程 $Y=9027.9X-36.747$, $r=0.9996$, 表明胡椒碱在 1.5~9.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 精密量取 0.149 mg/mL 乌头碱对照品 1 mL, 加 0.01 mol/L 盐酸溶液 1 mL, 按“2.2.6”项下方法制备乌头碱对照品溶液, 在 416 nm 处连续测定 6 次 A 值, 结果乌头碱 A 值的 RSD 为 0.208%。

分别精密吸取质量浓度为芍药苷 16.32 $\mu\text{g/mL}$ 、胡椒碱 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 按色谱条件测定峰面积值, 结果芍药苷峰面积值的 RSD 为 1.55%, 胡椒碱峰面积值的 RSD 为 0.944%。

2.2.8 稳定性试验 精密吸取供试品 3 溶液, 在显色、萃取后每隔 30 min 测定 1 次 A 值, 连续测定 7 次, RSD 为 0.69%, 表明样品显色后 3 h 内稳定性良好。

精密吸取供试品 5 溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 1 次, 测定峰面积, 结果芍药苷峰面积值的 RSD 为 1.82%, 胡椒碱峰面积值的 RSD 为 0.952%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 取同一批分煎液 6 份, 按“2.2.4”项下方法处理, 制得供试品溶液, 分别测定 A 值和峰面积, 计算得乌头总生物碱、芍药苷、胡椒碱质量分数的 RSD 分别为 1.61%、3.11%、0.99%。

2.2.10 加样回收率试验 精密吸取分煎液(含乌头总生物碱 0.174%、芍药苷 0.045%、胡椒碱 0.162%) 3组每组6份,其中一组取5 mL,剩余两组取0.5 mL,分别精确加入1.29 mg/mL 乌头碱对照品溶液1 mL、31.03 μ g/mL 芍药苷对照品溶液1 mL、101.12 μ g/mL 胡椒碱对照品溶液1 mL,按“2.2.4”项下方法处理,制得供试品溶液,分别测定 A 值和峰面积,计算回收率和RSD。结果乌头总生物碱平均回收率为100.29%,RSD为1.76%;芍药苷平均回收率为97.13%,RSD为1.43%;胡椒碱平均回收率为96.65%,RSD为1.22%。

2.2.11 样品测定 按“2.2.4”项下方法制备分煎、合煎液供试品溶液,按照上述测定方法,平行测定3份镇痛灵方处方中有效成分的量,计算煎出率,结果见表1。结果表明,合煎提取的乌头总生物碱与芍药苷的量明显高于分煎,而2种提取方法胡椒碱的量差别不大。

煎出率=提取液中某种有效成分的总质量/处方中总生药材量

表1 镇痛灵方不同煎液中有效成分的测定 ($n=3$)

Table 1 Determination of active components in ZTLP of different decoctions ($n=3$)

提取方法	煎出率/%		
	乌头总生物碱	芍药苷	胡椒碱
合煎	0.353	0.060	0.164
分煎	0.186	0.045	0.163

3 讨论

镇痛灵方中制川乌为君药,在处方中占较大比例,其主要成分是乌头总生物碱,既是有效成分也

是毒性成分,需要严格控制^[3]。本实验采用酸性染料显色后,再用离子对萃取,UV-Vis法测定乌头总生物碱,其原理是生物碱与酸性染料形成离子缔合物,经萃取后进行比色测定。在操作过程中,试剂、溶剂的用量、溶液的pH值、反应时间、温度等对反应条件有较大影响,应严格控制。

中药成分复杂,不同成分在共煎过程中可能产生多种相互作用,使得共煎时的成分量和效应并不是分煎时各成分的简单加和。实验结果表明,镇痛灵方采用合煎提取方式,有效成分的溶出总体高于单煎提取,故此方的最佳提取方式确定为合煎,为镇痛灵方的进一步开发提供依据。

参考文献

- [1] 陶惠然,刘月霞. 镇痛灵对大鼠实验性糖尿病降血糖作用及机制的研究 [J]. 中草药, 1996, 27(8): 475-478.
- [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): 293-295.
- [3] 张丰梅,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.
- [4] 沈晓东,黄黛瑛. 白芍抗炎镇痛的药理学研究进展 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(24): 197-199.
- [5] Pei Y Q. A review of pharmacology and clinical use of piperine and its derivatives [J]. *Epilepsia*, 1983, 24(2): 177-182.
- [6] 王苏会,李淑芝. 抗风湿颗粒的制备工艺及质量标准研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2005.
- [7] 李越峰,杨武亮,沈 菲,等. 高效液相色谱测定白芍中芍药苷的含量 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 438-439.