

HPLC 测定草乌与瓜蒌配伍前后 6 种毒性成分量的变化

张凌¹, 柳芳林¹, 刘长安¹, 翟兴英¹, 廖清花¹, 杨世林^{1,2*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 研究草乌 *Aconiti Kusnezoffii Radix* 与瓜蒌 *Trichosanthis Fructus* 按照 13 个不同比例配伍后, 苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、中乌头碱、乌头碱、次乌头碱成分量的变化。方法 草乌与瓜蒌的干燥粉末, 混匀, 分别用 10 倍量蒸馏水和 75% 乙醇浸润 1 h, 提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 离心, 取上清液。HPLC 采用 Welch Xtimate C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-40 mmol/L 乙酸铵 (氨水调 pH 10.0) 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min, 检测波长 235 nm。结果 草乌与瓜蒌配伍后, 随瓜蒌比例增加, 药液 pH 值逐渐降低, 单酯型生物碱总量变化不明显, 而双酯型生物碱总量增加。结论 草乌与瓜蒌配伍后, 从化学成分来看, 双酯型生物碱类成分增加导致毒性增加。

关键词: 草乌; 配伍; 瓜蒌; 毒性成分; HPLC; 双酯型生物碱; 单酯型生物碱; 苯甲酰新乌头碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 中乌头碱; 乌头碱; 次乌头碱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)06-0786-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.009

Content changes of six toxic components before and after *Aconiti Kusnezoffii Radix* combined with *Trichosanthis Fructus* by HPLC

ZHANG Ling¹, LIU Fang-lin¹, LIU Chang-an¹, ZHAI Xing-ying¹, LIAO Qing-hua¹, YANG Shi-lin^{1,2}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Aconiti Kusnezoffii Radix* (AKR) combined with *Trichosanthis Fructus* (TF) in 13 different ratios on contents of benzoylmesaconitine, benzoylaconine, benzoylhypaconine, mesaconitine, aconitine, and hypaconitine.

Methods The powdered AKR-TF material, mixture, was alkalinized by 10 times 75% ethanol and distilled water for 1 h, respectively, and extracted regurgitantly twice (each time for 1 h). The extracts were combined and centrifuged, and the supernatant was taken. The Welch Xtimate-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was eluted with a mobile phase consisted of aceto-nitrile and 40 mmol/L ammonium acetate (pH value 10.0, adjusted with aqueous ammonia) and gradient elution at a flow rate of 1 mL/min. The eluent was monitored by a UV detector at 235 nm. **Results** After AKR combined with TF, the content of monoester-alkaloids did not change significantly. Liquid pH value gradually reduced and total quality of diester-alkaloids increased with the ratios of TF increasing.

Conclusion From the view of chemical composition, the toxicity is increasing when AKR combined with TF.

Key words: *Aconiti Kusnezoffii Radix*; compatibility; *Trichosanthis Fructus*; toxic components; HPLC; diester-alkaloids; monoester-alkaloids; benzoylmesaconitine; benzoylaconine; benzoylhypaconine; mesaconitine; aconitine; hypaconitine

草乌属毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根, 具有祛风除湿、温经止痛的作用。用于风寒湿痹、关节疼痛、心腹冷痛、寒疝作痛、麻醉止痛等^[1]。“十八反”是中药配伍禁忌的主要内容, 包括“半蒌贝斂芫攻乌”。历代医药学者

认为十八反不是绝对的配伍禁忌, 有时会增加、增强毒性, 有的是对方剂本身或其他药物的疗效产生干扰、拮抗乃至抵消^[2]。有学者通过毒性成分的变化来阐述十八的科学内涵^[3-4], 本实验通过测定草乌与瓜蒌合煎后毒性成分的变化来研究“半蒌贝斂及

收稿日期: 2013-10-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) 项目资助 (2011CB505302)

作者简介: 张凌 (1962—), 女, 硕士生导师, 研究方向药物分析研究。Tel: (0791)7118630 E-mail: dw64810@163.com

*通信作者 杨世林 (1953—), 男, 博士生导师。Tel: 13870608982 E-mail: slyang3636@126.com

攻乌”的物质基础,为进一步丰富“十八反”中药配伍禁忌提供实验依据。

1 仪器与材料

Agilent1260型高效液相色谱仪,含VWD检测器、Agilent1200工作站(美国安捷伦公司)。KQ—250 UDB型双频数控超声波清洗器(昆山市仪器有限公司),Sartorius ISO 9001型电子天平(德国赛多利斯科技有限公司),PHS—3C pH计(上海虹益仪器仪表有限公司),TL—5.0台式离心机(上海市离心机械研究所),旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

生草乌 *Aconiti Kusnezoffii Radix*、瓜蒌 *Trichosanthis Fructus* 购自浙江中医药饮片厂,由江西中医药大学邓可众教授鉴定均为正品。生草乌按《中国药典》2010年版项下鉴定,乌头碱、次乌头碱、中乌头碱总量为0.34%,杂质总量为3.62%,水分为8.25%,总灰分为4.96%,酸不溶性灰分为0.72%;瓜蒌按《中国药典》2010年版项下鉴定,水分为10.45%,总灰分为5.72%,浸出物为35.49%。对照品乌头碱(批号X-015-110425)、中乌头碱(批号X-011-110425)、次乌头碱(批号MUST-13011706)、苯甲酰乌头原碱(批号B-010-110316)、苯甲酰中乌头原碱(批号B-009-110316)、苯甲酰次乌头原碱(批号B-016-110316)购自成都瑞芬思生物科技有限公司,质量分数均大于98%。甲醇、乙腈为色谱纯,购于Tedia公司;其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、中乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品0.485、1.325、1.010、1.325、0.980、0.950 mg分别置5 mL量瓶中,用乙腈溶解定容。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 草乌配伍瓜蒌水提液供试品溶液制备 取供试品生草乌2.5 g,分别与瓜蒌按16:1、13.5:1、11:1、8.5:1、6:1、3.5:1、1:1、1:3、1:5、1:7、1:9、1:11、1:13、0:13比例混合均匀,分别加入10倍量的水,浸泡1 h,煮沸提取2次,提取时间各1 h,合并提取液后离心30 min,4 000 r/min,上清液测定pH值,浓缩定容至25 mL。按照上述方法分别制备草乌单煎液、瓜蒌单煎液。

2.2.2 草乌配伍瓜蒌醇提液供试品溶液制备 取供

试品生草乌2.5 g,分别与瓜蒌按16:1、13.5:1、11:1、8.5:1、6:1、3.5:1、1:1、1:3、1:5、1:7、1:9、1:11、1:13、0:13比例混合均匀,分别加入10倍量的75%乙醇,其余按水提液的方法制备供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱 Welch Xtimate C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-40 mmol/L的乙酸铵溶液(氨水调pH值为10.0),梯度洗脱:0~8 min,18%乙腈;8~35 min,18%~30%乙腈;35~45 min,30%乙腈;45~55 min,30%~45%乙腈;55~65 min,45%~50%乙腈;65~75 min,50%乙腈;75~85 min,50%~55%乙腈;进样量20 μL;体积流量1 mL/min;柱温30 ℃;检测波长235 nm。

2.4 定量限和检测限

取“2.1”项下的对照品溶液,依次稀释205、675、694、1 307、1 387、648倍,使各峰高约为基线噪音的10倍,得定量限分别为苯甲酰新乌头原碱0.449 μg/mL、苯甲酰乌头原碱0.532 μg/mL、苯甲酰次乌头原碱0.287 μg/mL、新乌头碱0.194 μg/mL、乌头碱0.137 μg/mL、次乌头碱0.297 μg/mL;依次稀释410、1 350、971.6、1 041、2 614、1 280倍,使各峰高约为基线噪音的3倍,得检测限分别为苯甲酰新乌头原碱0.223 μg/mL、苯甲酰乌头原碱0.266 μg/mL、苯甲酰次乌头原碱0.205 μg/mL、新乌头碱0.013 μg/mL、乌头碱0.013 μg/mL、次乌头碱0.148 μg/mL。

2.5 线性关系考察

分别精密称取苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、中乌头碱、乌头碱、次乌头碱对照品分别逐级稀释成6个不同质量浓度溶液到定量限,进样,以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程苯甲酰新乌头原碱 $Y=35\,598X-1.302\,4$, $r=1.000\,0$,线性范围0.47~97 μg/mL;苯甲酰乌头原碱 $Y=6\,981.4X+13.478$, $r=0.999\,3$,线性范围0.41~265 μg/mL;苯甲酰次乌头原碱 $Y=15\,251X+21.293$, $r=0.999\,4$,线性范围0.29~202 μg/mL;新乌头碱 $Y=5\,485.7X+5.073\,1$, $r=0.999\,9$,线性范围0.203~265 μg/mL;乌头碱 $Y=20\,542X-5.633\,2$, $r=0.999\,7$,线性范围0.141~196 μg/mL;次乌头碱 $Y=20\,528X+12.594$, $r=0.999\,9$,线性范围0.293~190 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.1”项下的对照品溶液，分别取 0.5 mL 混合，按照色谱条件，连续进样 6 次，测定 6 种乌头类生物碱的峰面积积分值，结果苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、中乌头碱、乌头碱、次乌头碱的 RSD 分别为 2.97%、2.5%、2.48%、2.54%、2.77%、2.77%，6 种生物碱的 RSD 值均小于 3%，表明精密度良好。

2.7 稳定性考察

取草乌与瓜蒌 1:1 配伍的供试品溶液，冷藏放置 0、2、4、6、8、10、12、24、36 h 后，按上述色谱条件进行 HPLC 分析，测定 6 种生物碱的量，苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、中乌头碱、乌头碱、次乌头碱在不同时间峰面积的 RSD 分别为 2.04%、2.03%、2.24%、2.32%、2.54%、2.68%。

2.8 重复性试验

精密称取草乌与瓜蒌各 2.5 g，混合，共 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按上述色谱

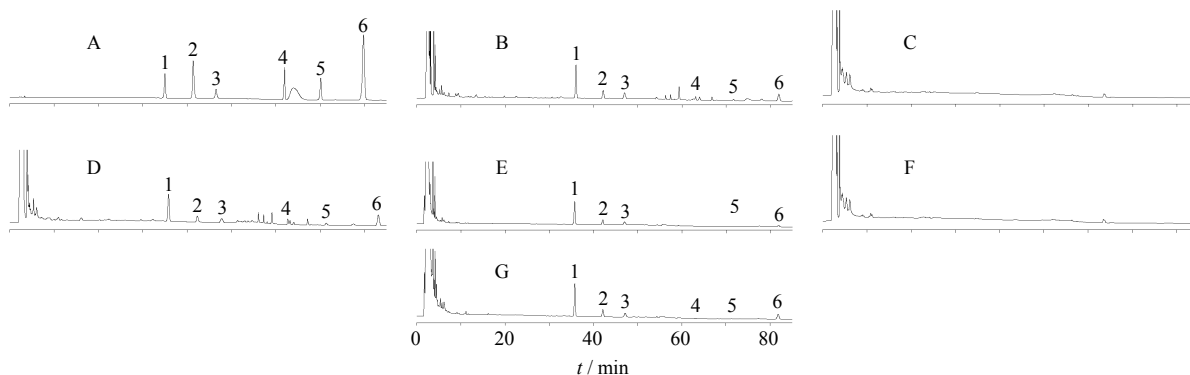
条件进行 HPLC 分析。根据所得 6 种生物碱的峰面积并计算其在样品中的量，结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、中乌头碱、乌头碱、次乌头碱质量分数的 RSD 分别为 2.92%、2.53%、1.98%、2.27%、2.06%、2.27%。

2.9 回收率试验

精密称取已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、中乌头碱、乌头碱、次乌头碱的生草乌与瓜蒌各 2.5 g，共 6 份，分别按 80%、100%、120% 的量精密加入各种对照品，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，按照色谱条件进样测定，结果平均回收率分别为 104.40%、97.21%、97.30%、95.31%、103.47%、104.72%，RSD 分别为 2.52%、2.68%、2.85%、2.33%、2.74%、2.92%。

2.10 样品测定

将“2.2”项下各供试品溶液，按照色谱条件分别进样测定，计算共煎液 6 种生物碱的量。色谱图见图 1。水提液中 6 种生物碱测定结果见表 1，75% 醇提液中 6 种生物碱测定结果见表 2。



A-混合对照品 B-草乌醇提 C-瓜蒌醇提 D-草乌与瓜蒌 1:1 配伍醇提 E-草乌水提 F-瓜蒌水提 G-瓜蒌与草乌 1:1 配伍水提
1-苯甲酰新乌头原碱 2-苯甲酰乌头原碱 3-苯甲酰次乌头原碱 4-新乌头碱 5-乌头碱 6-次乌头碱
A-mixed reference substances B-AKR extracted by ethanol C-TF extracted by ethanol D-AKR combined with TF in 1:1 ratio extracted by ethanol E-AKR extracted by water F-TF extracted by water G-AKR combined with TF in 1:1 ratio extracted by water
1-benzoylmesaconin 2-benzoylaconine 3-benzoylhypaconine 4-mesaconitine 5-aconitine 6-hypaconitine

图 1 混合对照品和供试品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances and samples

3 讨论

与生草乌水提单煎液相比，草乌与瓜蒌水提合煎液中双酯型生物总量随瓜蒌所占比例的增高而逐渐增加，单酯型生物碱总量变化不大，而药液 pH 值逐渐下降，药液的 pH 值可能对双酯型生物碱的量有一定的影响。瓜蒌经水提及醇提后，均不含有本实验中测定的 6 种乌头类生物碱。草乌水提液中不含新乌头碱，且乌头碱质量分数接近定量限，故

色谱峰上不明显。瓜蒌与草乌 1:1 水提液中新乌头碱及乌头碱含量亦与定量限接近，两色谱峰不明显。

与生草乌醇提单煎液相比，草乌与瓜蒌醇提合煎液中双酯型生物碱的量随瓜蒌所占比例的增高而逐渐增加，单酯型生物碱的量变化不大，药液 pH 值则逐渐下降，变化趋势与草乌配伍瓜蒌水提合煎液类似。

草乌中主要毒性成分为双酯型生物碱和单酯型

表1 草乌配伍瓜蒌水提后定量测定结果

Table 1 Quantity determination of AKR combined with TF after water extraction

草乌-瓜蒌	pH 值	单酯型生物碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				双酯型生物碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			
		苯甲酰新乌头碱	苯甲酰乌头碱	苯甲酰次乌头碱	总量	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱	总量
1 : 0	5.40	355.077	488.085	164.846	1 008.009	—	6.228	53.399	59.600
16 : 1	5.39	244.818	334.033	109.997	688.849	—	8.859	27.065	35.900
13.5 : 1	5.11	281.450	396.342	126.521	804.312	—	5.327	40.232	45.500
11 : 1	5.13	500.493	708.027	234.973	1 443.493	—	6.496	110.366	116.900
8.5 : 1	4.25	438.579	625.021	202.221	1 265.821	4.700	7.008	93.798	105.500
6 : 1	3.73	405.501	544.736	168.420	1 118.657	63.000	8.372	115.565	187.000
3.5 : 1	5.10	433.298	633.472	203.696	1 270.466	6.247	11.296	133.372	150.800
1 : 1	4.86	479.565	681.743	206.352	1 367.659	27.575	15.486	213.247	256.300
1 : 3	4.64	431.360	697.213	226.941	1 355.513	118.448	32.953	263.461	414.700
1 : 5	4.58	437.147	614.350	181.435	1 232.931	102.862	27.131	281.025	411.000
1 : 7	4.45	470.042	641.207	211.138	1 322.387	126.560	45.134	265.113	436.800
1 : 9	4.21	480.450	679.379	229.235	1 389.064	111.612	47.692	306.752	466.100
1 : 11	4.36	495.731	635.549	221.465	1 352.745	133.943	49.495	311.683	494.900
1 : 13	4.56	507.839	640.634	221.662	1 370.135	145.700	50.469	317.465	513.500
0 : 1	4.57	—	—	—	—	—	—	—	—

表2 草乌配伍瓜蒌 75%醇提后定量测定结果

Table 2 Quantity determination of AKR combined with TF after 75% alcohol extraction

草乌-瓜蒌	pH 值	单酯型生物碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				双酯型生物碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			
		苯甲酰新乌头碱	苯甲酰乌头碱	苯甲酰次乌头碱	总量	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱	总量
1 : 0	5.40	458.337	590.213	234.476	1 283.071	131.245	23.504	162.331	317.080
16 : 1	5.77	494.748	766.182	327.754	1 588.684	235.935	40.091	324.485	600.511
13.5 : 1	5.74	491.981	762.171	330.475	1 584.627	251.521	48.740	332.697	632.958
11 : 1	5.73	515.171	837.084	346.703	1 698.958	247.693	46.937	314.622	609.252
8.5 : 1	5.70	307.715	502.481	193.041	1 003.237	184.346	39.482	264.943	488.771
6 : 1	5.76	450.953	707.741	329.458	1 488.152	278.045	46.620	339.814	664.479
3.5 : 1	5.45	468.918	751.428	309.165	1 529.511	373.383	61.213	407.835	842.431
1 : 1	5.81	450.953	631.825	268.741	1 351.519	466.261	91.080	501.897	1 059.238
1 : 3	4.59	419.056	642.925	237.825	1 299.806	478.566	77.828	481.394	1 037.788
1 : 5	4.88	473.722	752.359	276.511	1 502.592	567.707	90.617	553.666	1 211.990
1 : 7	4.63	355.428	523.823	163.239	1 042.490	485.584	72.005	408.515	966.104
1 : 9	4.38	500.984	702.226	255.955	1 459.165	638.801	116.270	532.604	1 287.675
1 : 11	4.23	309.203	472.329	142.225	923.757	400.089	61.456	573.757	1 035.302
1 : 13	4.51	294.764	374.355	124.029	793.148	405.467	139.658	578.712	1 123.837
0 : 1	4.77	—	—	—	—	—	—	—	—

生物碱，两者毒性差异大，单酯型生物碱毒性为双酯型生物碱的 10%~20%，因此生草乌毒性以双酯型生物碱的量为指标^[5]。瓜蒌配伍草乌经水提和醇提后，双酯型生物碱成分的量增加，则毒性增强，

因此从化学成分看，瓜蒌与草乌相反。由于 6 种生物碱都是酯型生物碱，因此醇提合煎液中 6 种生物碱的量要高于水提合煎液。生草乌除本实验中测定的 6 种生物碱外还含有大量脂型二萜生物碱和其他

生物碱，且在醇中溶解度好，醇用量越高，生物碱溶解度越大，采用75%乙醇提取可以防止过多溶出其他生物碱，避免干扰。

本法是测定草乌与瓜蒌配伍之后6种毒性成分量的变化，《中国药典》2010年版方法则是测定草乌（或附子、川乌）单独处理后6种毒性生物碱，与药典方法相比本法分离度高，效果好。此法还能用于草乌与“半贝敛芩”配伍之后6种毒性成分的测定。

水煎剂中生物碱盐的抗热破坏作用高于游离生物碱，差异极显著^[6]。瓜蒌水提液pH值为4.56，醇提液pH值为4.76，都显酸性，瓜蒌比例越高溶液所含酸性成分越多，酯型生物碱在酸性条件下，形成盐，加速了生物碱的游离，因此瓜蒌能提高生草乌双酯型生物碱的溶出率。本实验以原药材为研究

目标，通过考察毒性成分量的变化及其影响因素，为研究草乌与瓜蒌的配伍禁忌提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 武德龚. 中药十八反现代研究及临床应用 [J]. 方药园地, 2008, 28(11): 834.
- [3] 张鲁, 李遇伯, 李利新, 等. 制川乌与法半夏不同比例配伍组合对乌头类生物碱的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 681-684.
- [4] 许庆轩, 王勇, 刘志强, 等. 草乌中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究 [J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(4): 638-641.
- [5] 高文韬, 王壮, 王新波, 等. 乌头的研究进展 [J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2009, 10(2): 144-147.
- [6] 翁小刚, 聂淑琴, 黄璐琦. HPLC测定“蒺藜芩芩攻乌”与其他诸药合煎前后次乌头碱的含量变化 [J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(1): 57-59.