

四逆汤中附子甘草配伍规律研究

陈建萍, 谭炳炎, 吴伟康, 张敏生, 李礼娟*, 韩超*
(广州中山医科大学, 广州 510089)

摘要: 目的: 观察四逆汤中药附子、甘草配伍前后主要成分的含量变化。方法: 采用串联质谱 ESI-MS/MS 及 HPLC 测定附子中的主要成分在配伍前后含量变化, 采用薄层扫描测定甘草中的主要成分甘草酸在配伍前后的含量变化。结果: 附子与甘草配伍后乌头类生物碱和甘草酸的含量均明显降低。

关键词: 附子; 甘草; ESI-MS/MS, HPLC, TLC

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2001)03-0016-02

四逆汤(SD)源于张仲景的《伤寒论》,是治疗少阴虚寒证的代表方剂,临床主要用于少阴病,四肢逆冷,下利清谷,脉微细无力等症。在既往的研究发现,SD对冠心病心肌缺血具有良好的保护作用,本研究在此基础上,以SD方药为研究对象,从方药配伍的君、臣、佐、使关系出发,以君药附子为核心,对其中药味附子、甘草组成的方药进行药物成分定性定量相关性分析,对SD方药中主要药味配伍进行规律性的研究。

1 仪器和试剂

API-365 电喷雾离子化-质谱质谱(ESI-MS/MS)联用仪(Perkin elmer-SCIEX 公司);Waters 公司高效液相色谱仪,486 检测器,510 泵,810 色谱工作站;日本岛津 CS-930 型双波长薄层扫描仪。

中药来源: 附子(黑顺片)(*Aconitium carmichaeli* Debx.)、甘草(*Glycyrrhizae uralensis* Fisch)、干姜(*Zingiber officinale* Rosc.)(均购于广州药材公司,经广州中医药大学药鉴教研室鉴定);甘草浸膏用上述甘草原药材自制;甘草酸单铵盐对照品(中国药品生物检定所);硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂);其他化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 分别称取附子(50g),附子(50g)+甘草(20g),附子(50g),甘草(20g),于4个烧杯中,加入8倍量的水,水浴煮沸2h,过滤,滤液浓缩,醇沉,取醇层,回收乙醇将附子及甘草煎剂混合,上述方法形成附子单煎剂,附子与甘草的合煎剂以及附子甘草单煎后再混合,此三种溶液均以附子量

定容至1:1,得供试液,备用。各取供试液5ml,用氨水调pH值等于9,溶液用乙醚提取2次,每次10ml,挥干,渣用少量二氯甲烷溶解,移入1ml容量瓶中,加二氯甲烷至刻度,摇匀,备用。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取乌头碱2.0mg,次乌头碱2.3mg,新乌头碱1.5mg,置小烧杯中,加入二氯甲烷溶解后,移入10ml容量瓶中,加入二氯甲烷至刻度摇匀,即得。

2.3 定性分析

2.3.1 乌头类生物碱的薄层分析 将上述点样液各取10μl,点于同一块硅胶G薄层板上。用氯仿:甲醇(9:1)为展开系统,加适量的氨水饱和展开缸,上行展开,展距13~15cm,碘蒸气为显色剂进行显色。

2.3.2 甘草的薄层层析 各取供试液各10μl,点于同一块硅胶 GF₂₅₄薄层板上,用正丁醇:冰醋酸:水(6:1:3)为展开系统。紫外灯下显色。

2.4 定量分析

2.4.1 附子配伍前后乌头类生物碱的含量变化

扫描方式:Q1扫描(ESI/MS)正离子;Q3扫描分解CID谱。

样品处理:取Tab1中的方药2ml,用等量的甲醇稀释,过滤后,用水稀释10倍,直接用spring泵进样,30μl/min,计算机数据处理。用对照品扫描确定所测化学成分的离子峰,得到分子量值及顺序信息。

MS/MS分析:用串联质谱ESI-MS/MS将对照品及各样品溶液进行测定,结果见表1。

表1 SD方药不同配伍中乌头类生物碱的MRM分析结果

样品	结果	乌头碱	次乌头碱
附子	均值	438.33	3530
	RSD	16.35%	2.215%
	浓度($\mu\text{g/ml}$)	3.7	16.9
附+甘	均值	55.27	131.33
	RSD	26.07%	7.815%
	浓度($\mu\text{g/ml}$)	0.5	0.6
混合物	均值	79.2	1536
	RSD	16.35%	2.215%
	浓度($\mu\text{g/ml}$)	0.6	7.5

2.4.2 甘草配伍前后甘草酸的含量变化 测试样品的制备: 4002g(相当于甘草原生药量2.5g)用50%乙醇适量充分溶解, 滤过, 弃去沉淀, 用50%乙醇定容50ml, 得甘草酸样品液。

取上述批号甘草浸膏等量, 按比例(附子: 甘草 = 5: 2)与附子醇沉液合并, 回收乙醇后, 用50%乙醇定容50ml得配伍样品液I和II。

样品测定: 分别准确吸取各样品液4 μl 和甘草酸标准液8 μl , 分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上按2.3法展开, 定位扫描测定, 记录吸收度积分值。外标一点法定量, 测得各样品液甘草酸含量, 并将此成分与附子醇溶液合并后定容, 与单纯的甘草的体积相同。结果见表2。

表2 甘草酸样品液及配伍样品液I和II测定结果(mg, n=3)

项目	平均值($\bar{x} \pm s$)	CV(%)
甘草酸样品液	90.38 $\pm$ 5.69	6.29
配伍样品液I	74.13 $\pm$ 2.41	3.25
配伍样品液II	76.58 $\pm$ 1.75	2.29

3 讨论

3.1 从薄层色谱图1可以看出, 附子, 附子+甘草, 附子、甘草混合提取不同的配伍后附子的主要成分乌头碱、次乌头碱均存在, 但可能含量上有所变化。从薄层色谱图2可以看出, 甘草、附子+甘草以及单独提取后再混合, 其甘草的主要成分甘草酸及次甘

划酸的成份均存在。

3.2 从表1可知, 附子甘草合煎剂、附子、甘草单独提取后再混合, 其中乌头类生物碱的含量显著降低。且附子中乌头碱的稳定性相对差些, 说明两味药物相互作用可能产生不溶性的物质(因为乌头碱与甘草中的甘草酸可能形成络合物)从而减少乌头碱、次乌头碱的含量。从表2可知, 附子与甘草配伍后甘草酸的含量也有所降低。其原因与上述原因相同, 是附子与甘草的有关成分在一起形成不溶性的沉淀形成络合物, 从而降低其含量, 用薄层色谱对两药配伍以后甘草酸的含量也发生变化, 其减少的剂量与乌头碱类生物碱一致。

通过比较研究我们可以发现, 附子与甘草两药在配伍使用时较佳的方法为先单煎然后再混合为佳。从附子、甘草所含成分在同煎可能会发生络合作用, 生成络合物, 形成沉淀, 而被滤出。但其络合物在进入消化道以后可以在胃酸中或酶的作用下络合物可以发挥生理作用效应。还可能增加疗效^[1], 同时降低附子中乌头碱的毒副作用。笔者曾做过相关的药理实验, 结果表明, 单味药物的作用远不及药味之间的配伍运用。分析其机制可能是由于生物碱与甘草酸所产生的沉淀在体内的环境中会缓慢地释放, 从而维持其血药浓度。难怪在中药经典复方中沉淀将两味药同时使用, 充分体现了中药复方配伍存在着的内在规律。

中药复方配伍规律是十分复杂的过程, 其药味之间作用与其成分相的关系不一定是正比例, 而在体外不起作用的成分进入机体以后可能转化成具有生物学活性的物质, 而发挥药理效应^[2,3]。

参考文献:

- [1] 陈建萍, 吴伟康, 谭红梅. 四逆汤方药对缺血心肌冠脉流量的影响[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(2): 121.
- [2] 陈建萍, 吴伟康, 张敏生, 等. 中药复方配伍规律研究的思路与方法[J]. 中国实验方剂杂志, 2000, (1): 1.
- [3] 梁国刚. 中药复方化学研究方法的探讨[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(1): 36.