

· 工艺与制剂 ·

基于化学组分动态变化的附子配伍甘草煎煮条件研究

秦素红¹, 章津铭¹, 何宇新², 何瑶¹, 廖婉¹, 傅超美^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 西华大学, 成都 610039)

[摘要] 目的: 研究与甘草配伍前后, 附子化学组分在煎煮过程中的动态变化规律, 以确定附子配伍甘草的最佳煎煮条件。方法: 测定不同时间附子单煎液和附子-甘草合煎液中乌头总碱及 3 种双酯型生物碱的含量, 确定最佳煎煮条件; 考察最佳煎煮工艺所得汤液的大鼠心脏毒性。结果: 附子-甘草配伍的最佳煎煮条件为大火煮沸后小火微沸保持 30 min; 在煎煮 0 ~ 90 min 时, 附子-甘草配伍前后的乌头总碱及 3 种双酯型生物碱的含量呈现不同的变化趋势, 30 min 时达两者综合的峰值; 煎煮 30 min 的单附煎液和附子-甘草合煎液均表现出一定的大鼠毒性, 但合煎液心脏毒性较小。结论: 优选的配伍煎煮工艺可为中药复方及临床应用中附子的“减毒存性”提供参考。

[关键词] 附子; 甘草; 化学组分; 动态变化; 煎煮时间

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0020-05

Optimization of Decoction Conditions of Compatibility of *Aconitum
carmichaelii* and *Glycyrrhiza uralensis* Base on Dynamic
Change of Chemical Components

QIN Su-hong¹, ZHANG Jin-ming¹, HE Yu-xin², HE Yao¹, LIAO Wan¹, FU Chao-mei^{1*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. Xihua University, Chengdu 610039, China)

[Abstract] **Objective:** To study on dynamic change rule of chemical components from *Aconitum carmichaelii* during decoction process after and before compatibility with *Glycyrrhiza uralensis*, in order to determine optimum decoction conditions of compatibility of *G. uralensis* and *A. carmichaelii*. **Method:** To determine optimum decoction conditions by determining the contents of total alkaloids and 3 kinds of double ester alkaloid in different decoction time, which were from single decoction liquid of *A. carmichaelii* and mixed decoction liquid of *G. uralensis* and *A. carmichaelii*. And rats cardiac toxicity of soup with optimum boiling technology was investigated. **Result:** Optimum boiling technology of *G. uralensis*-*A. carmichaelii* was: after boiling with a blaze, kept boiling 30 min with small fire. During 0-90 min decoction process, it showed different change trend of the contents of total alkaloids and 3 kinds of double ester alkaloid before and after compatibility of *G. uralensis* and *A. carmichaelii*, it reached to both comprehensive peak value in 30 min; both single decoction liquid of *A. Carmichaelii* and mixed decoction liquid of *G. uralensis* and *A. carmichaelii* showed some cardiac toxicity on rats in boiling 30 min, but cardiac toxicity of the latter was relative less. **Conclusion:** Optimized compatibility boiling technology could provide reference for ‘reducing toxicity and storing efficacy’ of *A. carmichaelii* in clinical application and traditional Chinese medicine compound.

[Key words] *Aconitum carmichaelii*; *Glycyrrhiza uralensis*; chemical components; dynamic change; decoction time

[收稿日期] 20120615(009)
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073070)
[第一作者] 秦素红, 在读硕士, 从事药剂学研究, Tel:13550167435, E-mail:susu1437@163.com
[通讯作者] * 傅超美, 博士, 教授, 从事中药药剂学研究, Tel:13981855638, E-mail:chaomeifu@126.com

附子性刚烈迅捷,主用于亡阳虚脱及阳虚诸症,其功效峻猛但毒性极大,中医临床常配伍甘草以减毒增效,构成中医临床组方常用药对,组成了诸多名方,如四逆汤、甘草附子汤等。近年来,研究者对附子-甘草药对进行了大量研究^[1-4],已揭示生物碱为附子中主要物质基础,但未能诠释两者配伍“毒解而效不减”的作用机制。研究表明,附子“久煎”和“配伍”都为其传统减毒方式,其中“久煎减毒”机制为双酯型生物碱在煎煮过程将发生裂解,转化为低毒或无毒的单酯型或醇胺型生物碱,而煎煮时间是附子生物碱发生裂解的关键因素^[5]。附子-甘草配伍大多用于汤液中,若两者配伍煎煮时间不当,对其“配伍减毒”的研究可能造成“久煎减毒”的假阳性结果。目前有学者观察到附子-甘草配伍煎煮过程存在附子生物碱的动态变化过程,但在两者配伍机制研究时,基本都未对其最佳煎煮时间进行考察和确定^[6-8],且不同研究中煎煮条件相差较大^[9-10],从煎煮 30 min 到 2 h 不等,且煎煮次数的确定具有随意性。单用附子煎煮 1 h 时毒性显著降低,煎煮 1.5 h 后未见明显心脏毒性,说明附子毒性的降低可能是煎煮太过而造成,煎煮时间的随意性难以避免煎煮条件对附子自身的减毒作用,且不利于研究附子配伍甘草的减毒作用^[11-12]。

本试验拟通过比较不同煎煮时间乌头总碱、双酯型生物碱含量动态变化,以确定附子-甘草配伍的最佳煎煮条件;同时对该最佳煎煮条件所得汤液心脏毒性进行表征,以避免附子本身因久煎而减毒的假阳性结果,保证附子配伍甘草减毒存性机制研究的准确性。

1 材料

UV1700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),PHS-2 型酸度计(上海雷磁仪器厂),BT25S 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯),Christ Alpha1-4 LSC 型冷冻干燥器(德国),1200 Series 分析型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),BL-420 型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)。

生附片(批号 1002015)购自四川新荷花中药饮片有限公司,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum caimichaeli* Debx. 子根加工品;炙甘草(批号 110521)购自科伦天然药业有限公司,经鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎的炮制品。乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品(中国药品生物制品检定所,纯度均 > 98%,批号分别为 110720-200409, 110798-

200405, 110720-200414),水为去离子水,其余试剂均为分析纯。

清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,体重(200 ± 20) g,由四川省医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(川)2008-21。

2 方法与结果

2.1 乌头总碱含量动态变化

2.1.1 对照品溶液制备 取乌头碱对照品适量,精密称定,加二氯甲烷-异丙醇(1:1)混合溶液制成含 0.504 2 g·L⁻¹ 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液制备

2.1.2.1 附子单煎^[1] 取生附片 50 g 置于三颈圆底烧瓶,加 15 倍量水浸泡 30 min,大火煮沸小火微沸,分别于沸腾 5, 15, 30, 45, 60, 90 min 时,取上清液 10 mL,并补充等体积水,溶液趁热过滤,冻干呈粉末状。将冻干粉末置于具塞锥形瓶中,加乙醚-三氯甲烷(3:1)混合溶液 20 mL 与氨试液 2 mL,振摇提取 1 h,滤过,残渣再用乙醚-三氯甲烷(3:1)混合溶液洗涤 3 次,滤过,洗液与滤液合并,减压浓缩挥去溶剂,残渣加乙醇 5 mL 溶解,即得。

2.1.2.2 附子-甘草合煎 分别取生附片和炙甘草各 50 g,按生附片-炙甘草(1:1)置于三颈圆底烧瓶,加水 800 mL(其中 50 mL 用以补足甘草吸水),其余操作方法同 2.1.2.1,即得。

2.1.3 样品测定 参照《中国药典》2010 年版一部正文附子项下“总生物碱含量测定”方法测定。结果生附片单煎液煎煮 5, 15, 30, 45, 60, 90 min 乌头总碱质量分数分别为 0.178%, 0.260%, 0.425%, 0.541%, 0.517%, 0.553%;附子-甘草合煎液则依次为 0.224%, 0.346%, 0.519%, 0.478%, 0.459%, 0.462%。说明附子配伍甘草后,生物碱总量达最大值时间缩短。在达峰值前的时间内,附子-甘草合煎液乌头总碱含量略高于附子单煎液;而在达峰后的时间内,附子-甘草合煎液乌头总碱含量略低于附子单煎液。

2.2 双酯型生物碱含量动态变化

2.2.1 色谱条件 Global C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-5 mmol·L⁻¹ 碳酸氢铵(含 0.1% 醋酸)(25:75),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 235 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 取乌头碱、次乌头碱、新乌头碱对照品适量,精密称定,加二氯甲烷-异丙醇(1:1)溶液制成新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的质量浓度分别为 30.2, 50.4, 27.2 mg·L⁻¹ 的混合溶

液,即得。置于 4℃下保存。

2.2.3 供试品溶液的制备

2.2.3.1 附子单煎 分别取生附片 50 g 置于圆底烧瓶中,加 15 倍量水浸泡 30 min,加热回流煎煮,大火煮沸后保持微沸,分别微沸 5,15,30,45,60,90 min 后,滤过,60℃减压浓缩至 1 g·mL⁻¹。取不同煎煮时间下浸膏 5 mL 置分液漏斗中,分别加入氨试液调 pH 8~9,加入乙醚 50 mL 萃取 3 次,收集乙醚萃取液并低温回收溶剂至干,精密加入 0.1% 盐酸-甲醇溶液 5 mL 溶解残渣,以 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3.2 附子-甘草合煎 分别取生附片和炙甘草各 50 g,生附片-炙甘草(1:1)置于圆底烧瓶,加水 800 mL,其余操作方法同 2.2.3.1,即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 专属性考察 分别取水,混合对照品溶液,附子-甘草合煎液样品,按上述 HPLC 分析条件测定,进样 10 μL,见图 1,结果表明样品专属性良好。

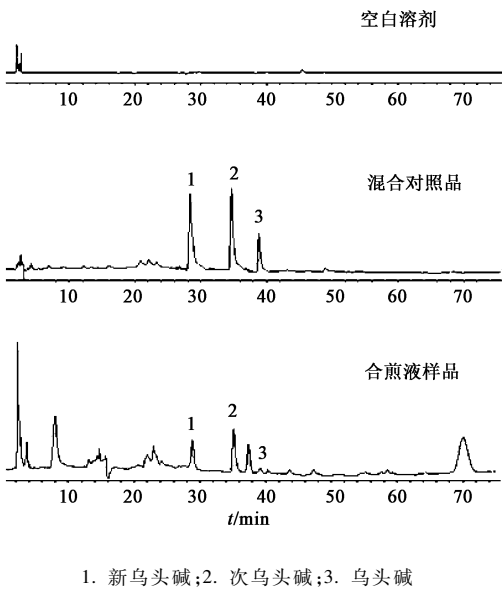


图 1 双酯型生物碱 HPLC

2.2.4.2 线性关系考察 分别吸取混合对照品溶液 1,2,4,6,8,10 mL 置于 10 mL 量瓶中,加入二氯甲烷-异丙醇(1:1)混合溶液定容,配置成不同质量浓度混合对照品溶液。各进样 10 μL,按上述 HPLC 分析条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 附子中双酯型生物碱线性关系考察

对照品	线性范围/μg	回归方程	r
新乌头碱	0.030 2 ~ 0.302	$Y = 4.77 \times 10^5 X + 661.58$	0.999 8
次乌头碱	0.050 4 ~ 0.504	$Y = 3.45 \times 10^5 X + 633.66$	0.999 5
乌头碱	0.017 2 ~ 0.172	$Y = 3.88 \times 10^5 X - 254.51$	0.999 1

2.2.4.3 精密度考察 取同一混合对照品溶液连续进样 6 次,每次 10 μL,依法测定,记录峰面积,结果新乌头碱、次乌头碱、乌头碱 RSD 分别为 0.78%,1.03%,0.54%,表明仪器精密度良好。

2.2.4.4 稳定性考察 取附子-甘草 30 min 合煎液样品,分别于室温下 0,2,4,8,12,16 h 进样 10 μL,依法测定,记录峰面积,结果新乌头碱、次乌头碱、乌头碱 RSD 分别为 0.79%,0.66%,0.61%,表明样品在 16 h 内稳定。

2.2.4.5 重复性考察 按 2.2.3.2 项下供试品制备方法,平行制备附子-甘草 30 min 合煎液样品 6 份,进样 10 μL,依法测定,记录峰面积,结果新乌头碱、次乌头碱、乌头碱 RSD 分别为 1.27%,0.97%,1.39%,表明该方法重复性良好。

2.2.4.6 加样回收率考察 取已知含量的附子-甘草 30 min 合煎液浸膏 2.5 mL,共 6 份,分别加入一定量混合对照品,按 2.2.3.2 项下方法处理,进样 10 μL,依法测定,结果新乌头碱、次乌头碱、乌头碱平均加样回收率分别为 96.20%,95.31%,98.28%;RSD 分别为 1.89%,2.78%,3.01%。

2.2.5 样品测定 取待测药材分别参照 2.2.3 项下方法制得附子单煎和附甘合煎供试品溶液,进样测定,结果见表 2。

表 2 附子配伍甘草前后不同煎煮时间
双酯型生物碱含量测定(n=3) mg·g⁻¹

煎煮时间 /min	新乌头碱		次乌头碱		乌头碱	
	附子 单煎	附子- 甘草	附子 单煎	附子- 甘草	附子 单煎	附子- 甘草
5	0.037 5	0.056 4	0.057 3	0.075 3	0.036 7	0.031 4
15	0.068 4	0.084 2	0.094 8	0.118 6	0.056 8	0.066 3
30	0.096 4	0.118 6	0.145 9	0.165 4	0.087 8	0.078 7
45	0.124 2	0.086 4	0.175 4	0.107 4	0.074 8	0.067 4
60	0.086 4	0.058 3	0.126 3	0.085 3	0.051 3	0.049 3
90	0.047 4	0.037 4	0.075 9	0.057 6	0.037 5	0.032 6

由表 2 可知,煎煮时间对 3 种双酯型生物碱的含量均有显著影响,在煎煮过程出现“先增加后降低”的变化趋势。通过对煎煮过程附子配伍甘草前后乌头总碱和双酯型生物碱含量动态变化规律研究,确定了附子-甘草合煎液毒(效)性成分的变化拐点,并依此选定附甘配伍研究宜采用合煎 30 min。

2.3 心脏毒性试验

2.3.1 供试品溶液的制备 取生附片 50 g 置于圆底烧瓶中,加 15 倍水浸泡 30 min;称取生附片-炙甘草(1:1)100 g 置于圆底烧瓶中,加水 800 mL 浸泡

30 min,加热回流煎煮,大火煮沸后保持微沸 30 min,趁热滤过,将滤液减压浓缩至 1 g·mL⁻¹,即得,4 ℃ 保存备用。

2.3.2 心脏毒性检测^[11] 取正常 SD 大鼠,雌雄各半,均分为 2 组,分别为附子单煎组和附子-甘草合煎组。各组 SD 大鼠均用 25% 乌拉坦按体重(0.4 mL/100g,ip)麻醉,背位固定,连接皮下针式电极,用 BL-420 生物机能试验系统测定二导联心电图。平衡 30 min 后记录给药前值作为基线值。按照 1 mL 药液/100 g 大鼠体重规格,分别经胃壁注射附子单煎液和附子甘草合煎汤液。给药后,观察大鼠出现心率失常的潜伏期,记录出现心脏毒性后 1 h 内 QRS 间期,QT 间期和心率变化,试验数据采用

SPSS 13.0 中 One-way ANOVA 检验判断组间差异。QT 间期测量从 QRS 波群的起点到 T 波起点的时间。据报道,大鼠 QT 间期不受心率变化的影响,故从心电图上推算出给药前及给药后各时间点 5 个心动周期的平均 QTc,再计算 QTc 延长率。

$$\begin{aligned} \text{HR 减慢率} &= \frac{\text{HR}_{\text{给药前}} - \text{HR}_t}{\text{HR}_{\text{给药前}}} \times 100\% \\ \text{QRS 延长率} &= \frac{\text{QRS}_t - \text{QRS}_{\text{给药前}}}{\text{QRS}_{\text{给药前}}} \times 100\% \\ \text{QTc 延长率} &= \frac{\text{QTc}_t - \text{QTc}_{\text{给药前}}}{\text{QTc}_{\text{给药前}}} \times 100\% \end{aligned}$$

表 3 结果说明附子配伍甘草前后均会出现不同程度的心脏毒性,配伍甘草后,其心率失常潜伏期增长,且心脏毒性程度显著减小。

表 3 灌胃附子配伍甘草前后最佳煎煮工艺所得汤液对大鼠心脏毒性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	心率失常潜伏期/min	HR 减慢率/%	QRS 延长率/%	QTc 延长率/%
附子单煎组	37.54 ± 7.36	7.72 ± 1.26	28.36 ± 5.35	17.43 ± 5.23
附甘合煎组	83.57 ± 15.81 ²⁾	2.64 ± 0.63 ¹⁾	11.66 ± 4.73 ¹⁾	8.64 ± 2.61 ²⁾

注:与附子单煎组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

清代医家徐灵胎认为“煎药之法最宜深讲,药之效与不效,全在乎此”,说明煎煮条件对药效(毒)的重要性。本试验通过化学成分动态变化及大鼠心脏毒性试验确定与验证最佳煎煮条件,证明了该煎煮条件下附子毒性的减弱并非因煎煮太过而造成,体现了附子配伍甘草的减毒作用,保证最佳煎煮条件确定的科学性,为进一步深入研究附子配伍甘草减毒作用机制奠定基础。

本试验通过对煎煮过程附子-甘草配伍前后乌头总碱和双酯型生物碱含量动态变化规律测定,确定合煎 30 min 为附子-甘草配伍研究样品的最佳煎煮时间,并对该煎煮工艺所得附甘配伍前后汤液的毒性进行表征。附子-甘草配伍前后其乌头总碱含量随煎煮过程均表现出“先上升后逐渐恒定”的总体变化趋势,但附子单煎液的上升平衡点在煎煮 45 min,而附子-甘草合煎液的上升平衡点出现在煎煮 30 min。由此提示,配伍甘草后附子生物碱从药材中溶出速率较单附子加快。现代研究表明,甘草中含三萜皂苷类成分具有表面活性作用,可能是附子配伍甘草后乌头总碱含量达峰值时间缩短的原因;附子煎煮过程存在双酯型生物碱、单酯型生物碱、醇胺型生物碱等几种形式的生物碱分解过程,附甘配伍前后乌头总碱含量达上升平衡点后,其总含量值均变化较小。由此可见,附子久煎后尽管存在酯型

生物碱的分解转化,但其乌头总碱含量变化较小,该结果印证了临床上附子“单用须久煎”的合理性和科学性。

附子-甘草配伍前后双酯型生物碱含量随煎煮过程出现“先增加后降低”的变化趋势。煎煮过程生物碱成分需首先从药材中提取出,而双酯型生物碱在煎煮过程又将逐渐水解,故本试验所得双酯型生物碱含量变化曲线可能是该成分“溶出”和“水解”综合作用的结果。可能是由于甘草中三萜皂苷类成分的增溶作用,促进双酯型生物碱从药材中溶出;但煎液中溶出的酯型生物碱又可与甘草中酸性成分反应,使其溶解度减少而析出。目前已有研究证实,甘草酸与乌头碱在煎煮过程中将发生结合形成大分子复合物^[13]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:177.
[2] 徐姗瑶,陈长勋,高建平. 甘草与附子配伍减毒的有效成分及作用环节研究[J]. 中成药,2006,28(4):526.
[3] 解素花,张广平,孙桂波,等. 附子与甘草不同配伍比例配伍减毒的实验研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2210.
[4] 黄勤挽,周子渝,王瑾,等. 附子炮制历史沿革研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):269.

三黄散瘀巴布剂的基质配方优选

尹华*

(浙江中医药大学药学院,杭州 310053)

[摘要] 目的:优选三黄散瘀巴布剂的基质配方。方法:以巴布剂的外观性状和黏力为评价指标,采用单因素试验和正交试验优选三黄散瘀巴布剂的基质配方。结果:三黄散瘀巴布剂的较优基质配方为 NP-700-K90-甘油(0.5:0.4:6)。取大黄、黄芩合提浓缩液加入卡波姆-u10NF 得质量浓度 0.02 g·mL⁻¹溶液,溶胀过夜,作为 A 相,将聚丙烯酸钠 0.5 g 和聚乙烯吡咯烷酮 0.4 g 加入到 6 g 甘油中作为 B 相,将三氯化铝和柠檬酸加入到水中作为 C 相,黄柏单提浓缩液作为 D 相,将上述 4 相按 A-B-C-D(10:3:3:5)充分混合搅匀,搅拌 15 min,涂布,盖上防黏层。结论:所优选三黄散瘀巴布剂的基质配方简单、稳定,可推广于大生产应用。

[关键词] 三黄散瘀巴布剂;基质配方;单因素试验;正交试验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0024-04

Optimization of Matrix Formulation of Sanhuang Sanyu Cataplasms

YIN Hua*

(College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] Objective: To optimize matrix formulation of Sanhuang Sanyu cataplasms. Method: Taking appearance and adhesion of cataplasms as evaluation indexes, matrix formulation of Sanhuang Sanyu cataplasms was optimized by single factor test and orthogonal test. Result: Optimized matrix formulation of Sanhuang Sanyu cataplasms was NP-700-K90-glycerol (0.5:0.4:6). 0.02 g·mL⁻¹ solution was received by adding carbomer-u10NF into mixed extraction concentrated liquid of *Rheum palmatum* and *Scutellaria baicalensis*, swelling overnight, as A phase, 0.5 g sodium polyacrylate and 0.4 g PVP were added to 6 g glycerol as B phase, aluminum chloride and

[收稿日期] 20120711(009)

[基金项目] 浙江省科技厅科技计划项目(2007C23020);浙江省中药现代化专项资金项目(浙财企字[2008]268号);浙江省中医药管理局项目(2006C038)

[通讯作者] *尹华,学士,教授,博士生导师,从事中药质量标准、中药成分分析及中药新药研究,Tel:0571-86613604,E-mail:maryyinhua@163.com

[5] 李洁,杨洪涛. 附子减毒增效略谈[J]. 浙江中医杂志,2012,47(1):12.

[6] 陈东安,易进海,黄志芳,等. 附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):64.

[7] 张化为,冯改利,王薇,等. 不同煎煮时间对附子总生物碱的影响及其指纹图谱研究[J]. 陕西中医学院学报,2010,33(4):100.

[8] 张宇燕,杨洁红. 附子甘草配伍对乌头碱、甘草酸、甘草苷的动态影响[J]. 中国药学杂志,2009,44(1):11.

[9] 邓家刚,范丽丽,郝二伟,等. 附子的回阳救逆量效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):150.

[10] 沈少华,张宇燕,杨洁红,等. 附子甘草配伍与炮制对乌头碱含量影响的比较研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(2):367.

[11] 丘小惠,何洁. 煎煮时间及甘草配伍剂量对附子中酯型生物碱含量的影响[J]. 时珍国医国药,2007,18(12):3015.

[12] 刘筱嵩,吴伟康,梁天文. 煎煮方法和药物配伍对附子毒性的影响[J]. 医药世界,2006,4(9):98.

[13] 裴妙荣,宣春生,段秀俊,等. 酸碱对药所含酸碱性成分共煎形成复合物的结构研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(23):3054.

[责任编辑 仝燕]