附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化

陈东安[1,2], 易进海[1*], 黄志芳[1], 李晓亮[3], 吴燕[2]
(1. 四川省中医药科学院, 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 成都 611137;
3. 泸州医学院, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的: 研究附子煎煮过程中酯型生物碱的动态变化规律, 建立其含量变化与煎煮时间的关系。方法: 采用 Eclipse XDB C_{18}(4.6 mm ×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 0.1 mol·L^{-1}醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加 0.5 mL 冰醋酸) 为 A 相, 乙腈-四氢呋(25∶15) 为 B 相, 梯度洗脱, 测定生附子和白附片不同时间水煎液中酯型生物碱的含量。结果: 生附子中双酯型生物碱水煎极不稳定, 仅在 0.5 h 检测出次乌头碱; 而白附片水煎液在 10 h 内均能检出新乌头碱和次乌头碱, 其含量逐渐降低, 在 4 h 内可检出乌头碱。生附子水煎液中 3 种单酯型生物碱含量呈现逐渐增加的变化趋势, 在 8 h 达到峰值; 而白附片水煎液中苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰乌头原碱含量先增后减, 约在 3 ~5 h 达到峰值, 苯甲酰次乌头原碱含量在 10 h 内逐渐增大至峰值。结论: 生附子和白附片煎煮过程中酯型生物碱含量的变化规律不同, 总体趋势是双酯型生物碱转化为焦新乌头碱、焦乌头碱、焦次乌头碱和苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱。

[关键词] 附子; 水煎; 酯型生物碱; 动态变化
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0064-05

Study on Dynamic Variation Patterns of Ester Alkaloids in Radix Aconite Lateralis at Different Decocting Time

CHEN Dong-an[1,2], *YI Jin-hai*[1*], *HUANG Zhi-fang*[1], *LI Xiao-liang*[3], *WU Yan*[2]
(1. *Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu* 610041, *China;*
2. *Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu* 611137, *China;*
3. *Luzhou Medical College, Luzhou* 646000, *China*)

[Abstract] **Objective:** Study on variation of ester alkaloids and hydrolysate in Radix Aconite Lateralis with the change of decocting time to establish the relationship between the content change and decocting time. **Method:**

[收稿日期] 20100920(003)
[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(2009CB522804)
[第一作者] 陈东安, 硕士, 研究方向: 中药化学成分与质量标准, Tel: 13709027270, E-mail: 190272466@qq.com
[通讯作者] * 易进海, Tel: 028-85210843, E-mail: yijinhai@yahoo.com.cn

[参考文献]

[1] 严仲铠, 李万林. 中国长白山药用植物彩色图志[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 238.
[2] 严启新, 李萍, 王迪. 鸡血藤脂溶性化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(5): 336.
[3] Kiem P V, Minh C V, Huong H T, et al. Pentacyclic triterpenoids from *Mallotus apelta*[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(11): 1109.
[4] Zhang T, Ye Q, Feng C, et al. Chemical study on *Gladiolus gandavensis*[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2007, 13(5): 635.
[5] 龚小见, 周欣, 赵超, 等. 马兰中的三萜类成分[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(3): 327.
[6] 张慧, 翟延君, 初正云, 等. 乌骨藤中五环三萜类化合物的分离鉴定[J]. 分析化学, 2007, 35(9): 1377.
[7] 邱桂华, 左文健, 王金辉, 等. 杜香化学成分的研究[J]. 中国现代中药, 2006, 8(6): 18.

[责任编辑 邹晓翠]

HPLC analysis was performed on a Eclipse XDB C_{18} (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) with 0.1 mol·L^{-1} ammonium acetate (contains 0.5 mL glacial acetic acid per 1 000 mL, phase A) and acetonitrile-tetrahydrofuran (25∶15, phase B) as mobile phase. Gradient elution was used to the determination of ester alkaloids in Baifupian and crude aconite roots at different decocting time. **Result:** The diester-type alkaloids in crude Aconite roots were extremely unstable, and there was only hypaconitine detected in 0.5 hours. But it's three kinds of monoester-type alkaloid showed a tendency of increasing gradually with increase of decocting time, and reached the peak at 8 hours. The mesaconitine and hypaconitine in Baifupian were detected in the whole decoction process, but the aconitine did't detect after 4 hours of decoction. The benzoylmesaconine and benzoylaconine in Baifupian decocted fluid firstly increased and then decreased, after 3-5 hours reached the peak, while the benzoylhypaconine gradually increased to the peak within 10 hours. **Conclusion:** In the decoction process, the change of ester alkaloids in crude Aconite roots and Baifupian was significantly different. The general trend is that the diester-type alkaloids in crude Aconite roots and Baifupian have transformed into pymesaconitine, pyraconitine, pyrhypaconitine, benzoylmesaconine, benzoylaconine and benzoylhypaconine.

[Key words] Radix Aconite Lateralis; decocting; ester alkaloids; dynamic variation

附子来源于毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 子根的加工品。其主要毒、效成分为双酯型生物碱[1], 如新乌头碱(mesaconitine)、乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)等, 由于此类生物碱毒性极大, 人口服乌头碱 2 ~5 mg 即可致死亡[2], 因此, 临床上大都以炮制品入药, 且久煎后服用。久煎是中医临床降低附子毒性的主要手段[3], 在煎煮过程中, 附子中双酯型生物碱水解转化为苯甲酰新乌头原碱(benzoylmesaconine)、苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine)和苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine)等单酯型生物碱, 毒性大大降低[4], 提高了临床用药的安全性, 但其药理活性亦随之减弱或消失[5]。因此, 本文以生附子和白附片为研究对象, 结合对照品水解, 研究探明附子煎煮过程中酯型生物碱成分的变化规律, 为临床应用提供参考。

1 仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD 检测器, 柱温箱, 自动进样器, 工作站); Clean-up C_{18} 固相萃取小柱(200 mg, 3 mL); KQ-100 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); DZKW-4 恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司), TDL80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂), 岛津 AUW220D 型 1/10 万天平, 美国 Milli-Q 纯水器。

实验药材购于成都荷花池药材市场, 由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定。新乌头碱(批号 110799-200404)、次乌头碱(批号 110798-200404)、乌头碱(批号 110720-200410)对照品购自中国药品生物制品检定所。苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱对照品由本实验室从制川乌中分得, 其纯度分别为 99.2%, 97.8%, 98.4%, 经理化性质和光谱数据分析, 鉴定结构。乙腈、四氢呋喃为色谱纯, 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Eclipse XDB C_{18} 柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm); 柱温 35 ℃; 流动相 A 为 0.1 mol·L^{-1} 醋酸铵溶液(每 1 000 mL 加 0.5 mL 冰醋酸), B 相为乙腈-四氢呋喃(25∶15)混合溶液, 梯度洗脱, 0 ~40 min, 85% ~80% A; 40 ~50 min, 80% A。流速 1 mL·min^{-1}, 检测波长 235 nm; 进样量 5 ~10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱对照品适量, 精密称定, 加 0.05% 盐酸甲醇溶液配置成每 1 mL 含新乌头碱 0.015 82 mg、次乌头碱 0.014 98 mg、乌头碱 0.013 34 mg、苯甲酰新乌头原碱 0.085 12 mg、苯甲酰次乌头原碱 0.017 08 mg、苯甲酰乌头原碱 0.012 7 mg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取白附片、生附子各 800 g, 分别置 10 L 圆底烧瓶中, 加水 8 L, 加热回流煎煮, 保持微沸状态, 分别于 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 h 取样 4 mL, 立即冰水浴冷却, 并分别补加 4 mL 蒸馏水。精密吸取白附片水煎液 2 mL, 加至已处理好的 C_{18} 固相萃取小柱上(5 mL 甲醇活化, 4 mL 水平衡), 待其通过后, 先用 5 mL 水洗涤, 再用 5 mL 甲醇洗

脱,整个洗脱过程控制流速约为 0.5 mL·min^{-1}。收集甲醇洗脱液,35 ℃减压回收蒸干,精密吸取 0.05% 盐酸甲醇 1 mL 溶解残渣,即得白附片水煎供试品溶液。取生附子水煎液约 4 mL,以 3 000 r·min^{-1}离心 10 min,上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得生附子水煎供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 取 2.2 项混合对照品溶液,分别进样 2,5,10,15,20 μL,按上述色谱条件测定,以进样量(μg)为横坐标,峰面积(*A*)为纵坐标绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 线性关系试验结果

名称	线性范围/μg	回归方程	相关系数 *r*
苯甲酰新乌头原碱	0.170 24 ~1.702 4	$Y=1124.66X+17.5$	0.999 8
苯甲酰乌头原碱	0.025 4 ~0.254	$Y=1\,023.40X-0.67$	0.999 5
苯甲酰次乌头原碱	0.034 16 ~0.341 6	$Y=874.811X+4.30$	0.999 7
新乌头碱	0.0316 4 ~0.316 4	$Y=1\,163.83X+4.82$	0.999 7
次乌头碱	0.029 96 ~0.299 6	$Y=874.340X+4.48$	0.999 3
乌头碱	0.026 68 ~0.266 8	$Y=936.29X+0.96$	0.999 2

2.4.2 重复性试验 取白附片 1 h 水煎液 5 份,照供试品制备方法制备,按 2.1 项色谱条件测定,记录峰面积,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、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱 RSD 分别为 1.98%,1.52%,1.61%,1.21%,0.80%,1.23%,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 2.3 项白附片 1 h 水煎供试品溶液,室温放置 0,2,4,8,12,24 h 后,按上述色谱条件测定,记录峰面积。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、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的 RSD 分别为 0.61%,0.53%,0.36%,0.72%,0.65%,0.85%,表明溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.4 回收率试验 按 2.3 项白附片供试品制备方法,取白附片 1 h 水煎液,共 5 份,冷却后分别加入一定量的混合对照品,依法测定,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、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱平均回收率分别为 100.86%,102.07%,98.79%,104.98%,97.34%,101.65%。RSD 分别为 0.92%,0.83%,0.62%,1.22%,0.75%,1.05%。

2.5 含量测定 按 2.1 项色谱条件,分别测定生附子、白附片各水煎液中酯型生物碱的含量,同时照《中国药典》2010 年版一部附子项下方法制备药材生附子、白附片供试品溶液,同法测定药材中酯型生物碱的含量,结果见表 2 和表 3。

表 2 生附子不同煎煮时间酯型生物碱含量测定 mg·g^{-1}

煎煮时间/h	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱
0.5	0.886	0.067	0.112	-	0.134	-
1	1.185	0.108	0.246	-	-	-
2	1.367	0.138	0.318	-	-	-
3	1.432	0.140	0.336	-	-	-
4	1.503	0.155	0.362	-	-	-
5	1.582	0.166	0.339	-	-	-
6	1.655	0.177	0.429	-	-	-
8	1.755	0.187	0.471	-	-	-
10	1.659	0.177	0.460	-	-	-
生附子	0.239	0.015	0.037	1.061	0.427	0.207

注:- 未检出(表 3 同)。

表 3 白附片不同煎煮时间酯型生物碱含量测定 mg·g^{-1}

煎煮时间/h	苯甲酰新乌头碱	苯甲酰乌头碱	苯甲酰次乌头碱	新乌头碱	次乌头碱	乌头碱
0.5	0.435	0.059	0.032	0.181	0.137	0.001
1	0.513	0.055	0.042	0.153	0.148	0.034
2	0.620	0.075	0.064	0.091	0.146	0.026
3	0.717	0.091	0.088	0.053	0.141	0.015
4	0.678	0.091	0.102	0.030	0.122	0.008
5	0.713	0.095	0.114	0.015	0.104	-
6	0.656	0.092	0.123	0.006	0.093	-
8	0.641	0.088	0.142	0.005	0.067	-
10	0.559	0.081	0.149	0.004	0.049	-
白附片	0.234	0.018	0.015	0.309	0.136	0.049

3 结果

为了探明附子煎煮过程中酯型生物碱的动态变化规律,本文对双酯型生物碱进行水解研究。称取新乌头碱、次乌头碱、乌头碱对照品各 2.20,2.27,3.26 mg,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇约 1 mL 超声使溶解,再加蒸馏水至刻度,摇匀。精密吸取上述对照品溶液各 5 mL,混匀,即得混合对照品溶液,置具塞锥形瓶中,于 60 ℃恒温水浴中加热水解,分别于 10 min,0.1,0.5,1,2,3,6 h 取样 1 mL,立即冰水浴冷却,备用。同时取新乌头碱、次乌头碱、乌头碱对照品溶液各 1 mL,同法水解 0.5 h。上述水解液照 2.1 项下色谱条件测定,图 1 为混合对照品 0.5 h 水

解液的 HPLC 图谱, 图 2 为 2.2 项下 6 种酯型生物碱对照品的 HPLC 图谱。

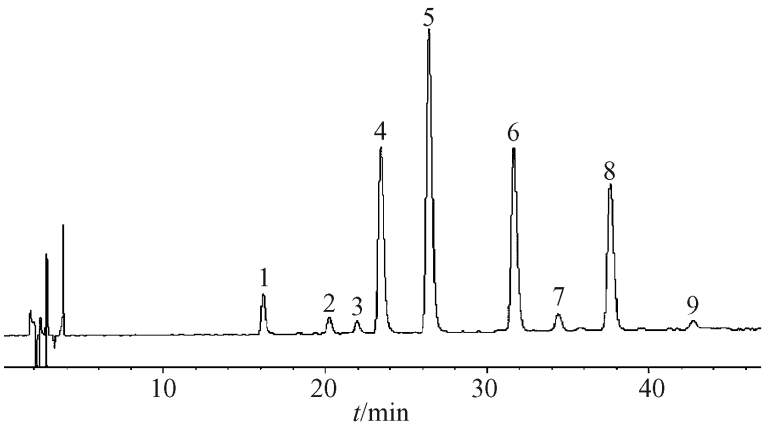

图 1　混合对照品水解 0.5 h HPLC 图谱

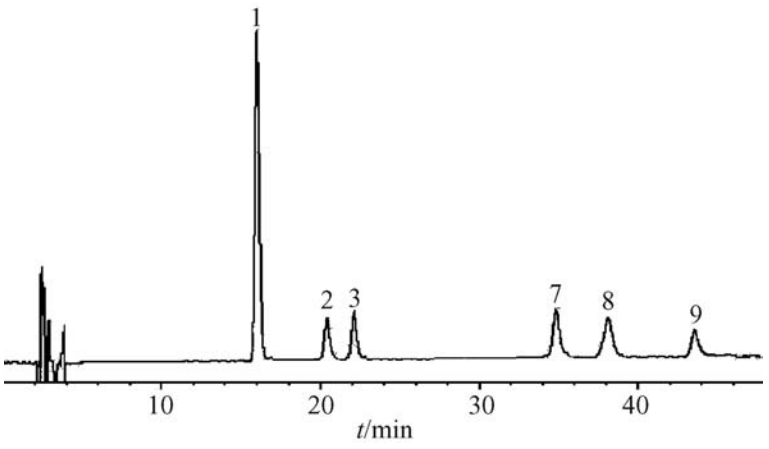

图 2　6 种酯型生物碱对照品 HPLC 图谱

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. 次乌头碱; 6. 乌头碱

由图 1 可知, 混合对照品水解液主要含有 9 个色谱峰(1 ~9 号峰) , 与图 2 比较可确认 1 ~3 号峰分别为苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱, 7 ~9 号峰分别为新乌头碱、次乌头碱、乌头碱。根据新乌头碱、次乌头碱和乌头碱单一对照品水解液的 HPLC 分析结果, 参考文献报道[6-7], 可确认 4 ~6 号峰分别为焦新乌头碱、焦次乌头碱、焦乌头碱。

混合对照品水解液的 HPLC 分析结果显示(图 3, 4, 5) : 双酯型生物碱迅速减少, 转化为焦乌头碱类生物碱和单酯型生物碱, 新乌头碱、乌头碱和次乌头碱分别于 2 h, 1 h 和 6 h 即消失; 焦新乌头碱、焦乌头碱在 0.5 h 达到峰值, 焦次乌头碱在 2 h 达到峰值, 随后 3 者峰面积逐渐变小。单酯型生物碱随着水解时间的延长峰面积逐渐增大, 苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱在水解 6 h 内一直增加, 苯甲酰新乌头原碱则在 3 h 达到峰值。

由表 2 可见, 生附子水煎液仅在 0.5 h 检测出次乌头碱(图 6) , 其他时间点均检不出双酯型生物碱, 该结果经多次验证可重复, 提示生附子中双酯型生物碱水煎极不稳定; 而白附片水煎液在 10 h 内均

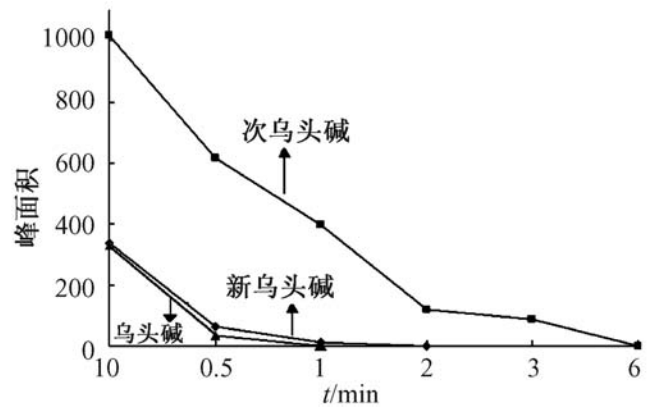

图 3　混合对照品双酯型生物碱水解变化

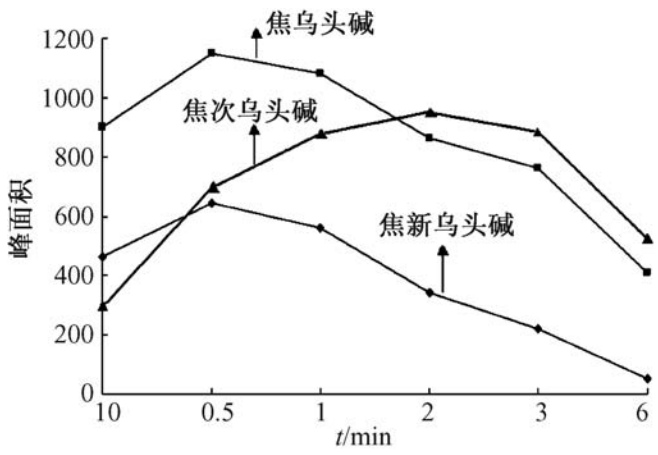

图 4　混合对照品焦乌头碱类成分水解变化

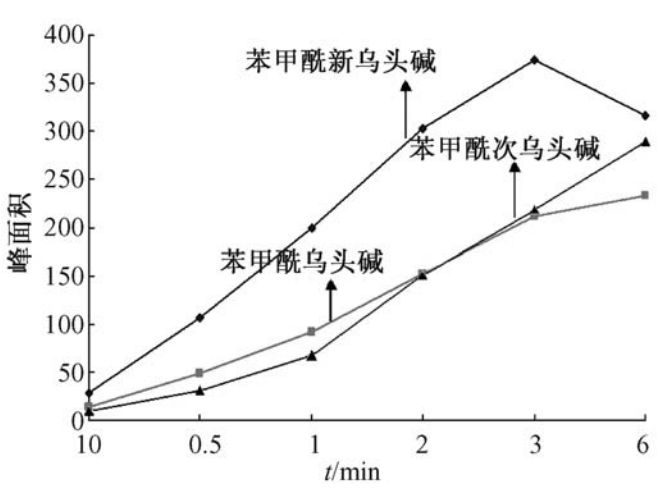

图 5　混合对照品单酯型生物碱水解变化

能检出新乌头碱和次乌头碱, 在 4 h 内可检出乌头碱(表 3) 。生附子水煎液中 3 种单酯型生物碱含量呈现逐渐增加的变化趋势, 在 8 h 达到峰值(表 2 和图 8) ; 而白附片水煎液中苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰乌头原碱含量先增后降, 约在 3 ~5 h 达到峰值, 苯甲酰次乌头原碱含量在 10 h 内逐渐增大至峰值(表 3 和图 9) 。此外, 由图 7 和图 6 比较可见, 生附子中基本不含焦乌头碱类生物碱, 煎煮过程中双酯型生物碱迅速转化为焦新乌头碱、焦乌头碱、焦次乌头碱(4 ~6 号峰) 和苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱(1 ~3 号峰) 。

一般认为酯型生物碱是附子的毒效成分, 本文研究结果显示, 生附子中双酯型生物碱含量显著高于白附片, 二者单酯型生物碱含量相当(表 2, 3) , 说明炮制显著降低了剧毒成分双酯型生物碱的含量, 且较好地保留了药效成分单酯型生物碱, 即炮制可

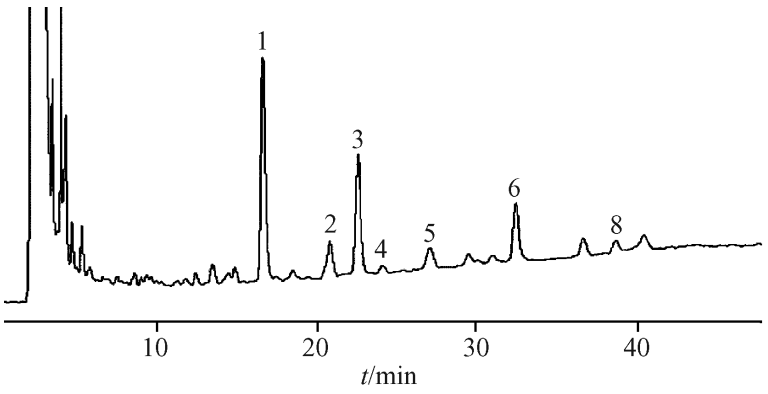

图 6 生附子煎煮 0.5 h HPLC 图谱

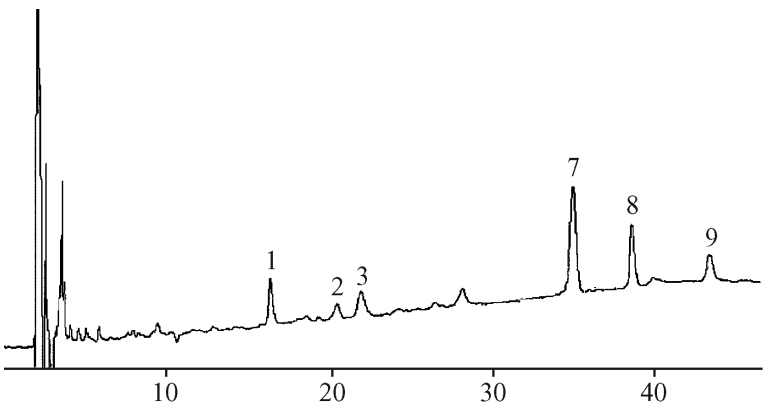

图 7 生附子药材含量测定 HPLC 图谱

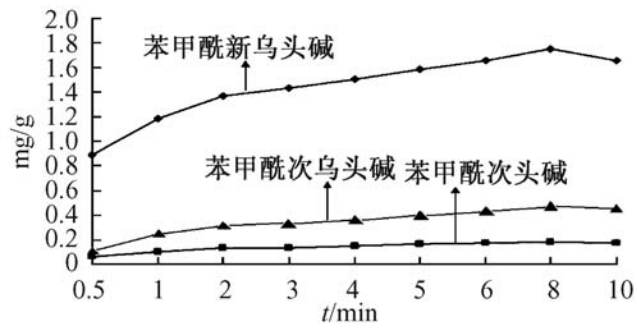

图 8 生附子中单酯型生物碱含量随煎煮时间变化

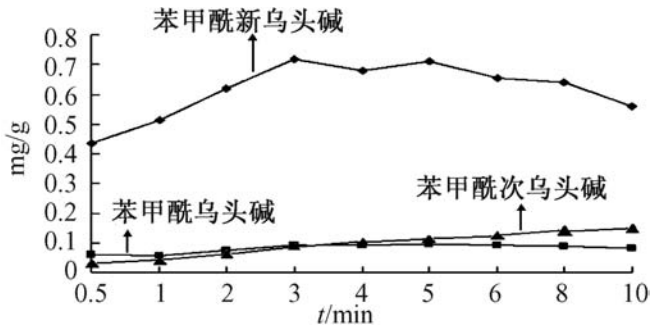

图 9 白附片中单酯型生物碱含量随煎煮时间变化

减毒存效。生附子水煎过程中双酯型生物碱迅速水解,而单酯型生物碱则逐渐增加,其含量显著高于白附片水煎液;白附片水煎过程中双酯型生物碱逐渐降低,而单酯型生物碱则先增后降,表明生附子和白附片煎煮过程中酯型生物碱的变化规律不尽相同,提示炮制不仅改变了附子酯型生物碱的含量,而且也影响酯型生物碱的转化。此外,煎煮时间对酯型生物碱的含量有显著影响,适度久煎可显著降低双酯型生物碱含量,增加单酯型生物碱含量,即解毒存效,但过度久煎可完全破坏双酯型生物碱,也使单酯型生物碱含量下降,即药理活性亦随之减弱或消失[5]。因此,临床使用附子应根据病情、附子用量和规格,选择适宜的煎煮时间,避免煎煮不足易导致中毒,或煎煮太过影响疗效。

本文将附子水煎液离心过滤后直接注入液相色谱仪测定,结果显示生附子水煎液分离效果良好(图 6),可直接进样。而白附片水煎液中酯型生物碱浓度低,且成分复杂,对测定干扰大,因此,采用 C_{18} 小柱对白附片水煎液中酯型生物进行富集和精制,获得理想的效果,各成分达到基线分离。

[参考文献]

[1] 刘芳,于向红,李飞,等. HPLC 测定附子及其炮制品中 3 种双酯型生物碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 1160.

[2] 王育珊,任连荣,刘忠良,等. 急性乌头碱中毒导致的严重心律失常与休克(附 4 例报告)[J]. 白求恩医科大学学报, 1996, 22(5): 521.

[3] 骆梅娟,周至安. 附子的毒性及临床应用浅析[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(5): 512.

[4] 洪波,仇永清. 附子中双酯型乌头碱类成分水解减毒机理的密度泛函理论研究[J]. 分子科学学报, 2008, 24(3): 216.

[5] 陈学习,彭成. 对附子毒性的再认识[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(6): 7.

[6] 孙婷婷,栾立标. HPLC 分离测定四逆汤中 3 种双酯型生物碱及其 6 种水解产物[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1634.

[7] 郗瑞云,刘永刚,张宏桂,等. HPLC-MS^n 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.

[责任编辑 顾雪竹]