

麻黄-附子药对主要有效成分在不同汤方中的含量变化

周慧芳, 谭晓梅*, 陈飞龙, 谢颖, 郭阳, 罗佳波

(南方医科大学中医药学院广东省中药制剂重点实验室, 广州 510515)

[摘要] **目的:**研究麻黄-附子药对主要有效成分在麻黄附子细辛汤及麻黄附子甘草汤中的含量差异,为方剂配伍的科学性提供试验依据。**方法:**采用 HPLC 测定汤剂中麻黄-附子药对麻黄的有效成分去甲基伪麻黄碱、去甲基麻黄碱、麻黄碱、伪麻黄碱、甲基麻黄碱及附子的有效成分苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量。**结果:**药对及 2 种汤剂中 5 种麻黄生物碱的含量无显著性差异,附子中的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱有显著性差异。**结论:**麻黄-附子药对主要药效成分在不同方剂中含量的差异与其临床应用相关,但具体原因尚不明确。

[关键词] 麻黄; 附子; 药对; 麻黄附子细辛汤; 麻黄附子甘草汤

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0137-04

[doi] 10.11653/syfy2013130137

Research on Content of Main Active Compounds in Compatibility Ephedra Herba with Radix Aconiti Lateralis in Different Decoction

ZHOU Hui-fang, TAN Xiao-mei*, CHEN Fei-long, XIE Ying, GUO Yang, LUO Jia-bo

(Key Laboratory of Chinese Drugs Pharmaceutics of Guangdong Province School of Traditional Chinese Medicine Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** Study on the content of main active compounds in the compatibility Ephedra Herba with Radix Aconiti Lateralis in Mahuang Fuzi Xixin decoction and Mahuang Fuzi Gancao decoction, provide experimental basis for scientific prescripti compatibility. **Method:** HPLC was adopted to analyzed the content of norpseudoephedrine (NMP), norephedrine (NME), ephedrine (E), pseudoephedrine (PE), methylephedrine (ME), Benzoyl mesaconine and Benzoyl hypacoi-tine which are the major active compounds of compatibility Ephedra Herba with Radix Aconiti Lateralis. **Result:** The five alkaloid of Ephedra Herba showed little change, but had significant difference in active compounds of Radix Aconiti Lateralis. **Conclusion:** The content of main active compounds in the compatibility Ephedra Herba with *fuzi* in two decoction had difference related to its clinical application, but the exact caske in not clear.

[Key words] Ephedra Herba; Radix Aconiti Lateralis; compatibility; Mahuang Fuzi Xixin decoction; Mahuang Fuzi Gancao decoction

药对又称对药,是临床常用相对固定的配伍形式。药对具备了复方的基本功效,是中医遣方用药

的特色之一。麻黄配伍附子为临床常用药对,张仲景的著作中含有该药对的方剂有麻黄附子细辛汤、麻黄附子甘草汤、乌头汤等。麻黄附子细辛汤(MFX)和麻黄附子甘草汤(MFG)均为温经解表剂,用于少阴(心肾)阳衰兼风寒表证,少阴太阳并治者。前者用于表邪较重之症,后者用于表邪较轻之症^[1]。虽然两方剂临床应用有差异,但未见相应药理及化学方面的报道。方中麻黄的主要有效成分为去甲基伪麻黄碱(NMP)、去甲基麻黄碱(NME)、麻

[收稿日期] 20130108(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81030066)

[第一作者] 周慧芳, 硕士研究生, 从事中药复方研究, Tel: 15521183927, E-mail: jolin83349@126.com

[通讯作者] * 谭晓梅, 研究员, 中药学博士, 从事中药复方与新制剂开发, Tel: 020-61648265, E-mail: txm@fimmu.com

黄碱(E)、伪麻黄碱(PE)、甲基麻黄碱(ME),具有发汗解表作用;附子的主要有效成分为单酯型的苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和双酯型的新乌头碱、次乌头碱、乌头碱,具有助阳作用^[2-7]。本文主要研究麻黄-附子药对(MF)中主要有效成分在上述 2 个方剂中的含量差异,从功效成分含量变化角度分析方剂的配伍规律。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),WH-2 型漩涡振荡混合器(上海沪西分析仪器厂),LXJ-II 型离心机(上海)分析仪器,KQ-50 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AB250D 型 1/10 万电子分析天平(美国 DENVER 公司),1/万分析天平(美国 DENVER 公司)。麻黄购于广州致信药业公司(批号 110901),附子购于四川江油中坝附子科技发展有限公司(批号 110801),细辛购于广州致信药业公司(批号 20110501),炙甘草购于广东省药材公司中药饮片厂(批号 20101201),经南方医科大学中药鉴定教研室马骥教授鉴定均为正品。盐酸麻黄碱(批号 171241-201016)、盐酸伪麻黄碱(批号 171237-200807)、盐酸甲基麻黄碱(批号 171247-200301)、苯甲酰次乌头原碱(批号 111796-201002),以上均购于中国药品生物制品检定所;盐酸去甲基麻黄碱、盐酸去甲基伪麻黄碱为内蒙古赤峰艾克科技股份有限公司赠送,苯甲酰新乌头原碱购于广州牌牌生物科技有限公司,含量 $\geq 98\%$ 。

1.2 试剂 乙酸乙酯、甲醇、冰醋酸、氨水、三乙胺、磷酸、氯化钠、氢氧化钠、醋酸铵均为分析纯;乙腈(色谱纯,Merck 公司)双蒸水由南方医科大学纯水中心提供。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

2.1.1 MFX 参考《伤寒论》中 MFX 的用药剂量结合现代计量换算和加水量设定煎煮方法如下:精密称取麻黄 6 g,附子 11 g,细辛 6 g,加 15 倍量水,麻黄浸泡 30 min,先煎煮 30 min,再加入其余药材煎煮 70 min,保持微沸,过滤,减压浓缩,定容,平行制备 3 份样品。

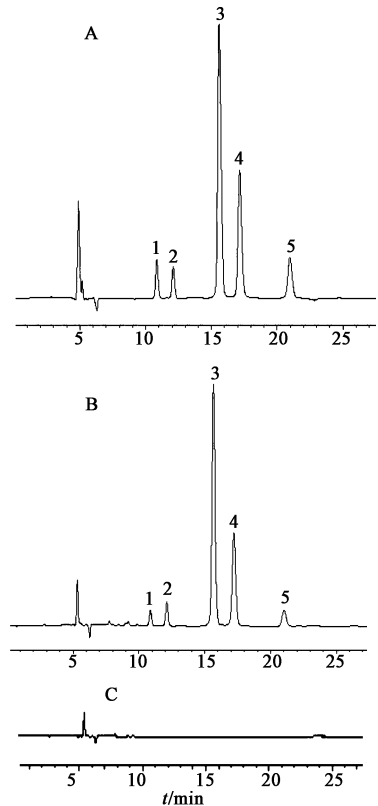
2.1.2 MFG 精密称取麻黄 6 g,附子 11 g,炙甘草 6 g,按照 2.1.1 方法制得样品,平行制备 3 份。

2.2 麻黄生物碱的测定^[8]

2.2.1 色谱条件 Eclipse XDB Pheny C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),流动相 0.02 mol \cdot L⁻¹磷

酸二氢钾(1 000 mL 加 2.8 mL 三乙胺,用磷酸调 pH 3.43)-乙腈(96:4),流速 0.6 mL \cdot min⁻¹,波长 210 nm,柱温 25 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸入上述各样品溶液 3 mL,加氯化钠 2.0 g,5 mol \cdot L⁻¹NaOH 溶液 200 μ L,乙酸乙酯 3 mL,涡旋 10 min,离心 10 min(2 400 r \cdot min⁻¹),转移上层乙酸乙酯至 EP 管中,氮气吹干,用 5 mL 流动相溶解,涡旋 3 min,过滤。对照品、样品、阴性对照溶液的色谱图见图 1。



1. NME; 2. NPE; 3. E; 4. PE; 5. ME

A. 混合对照品溶液; B. 样品溶液 C. 阴性对照

图 1 麻黄 HPLC

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取盐酸去甲基伪麻黄碱、盐酸去甲基麻黄碱、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸甲基麻黄碱适量,用甲醇定容,配制成 0.163, 0.165, 0.806, 1.604, 0.322, 0.243, 0.099 g \cdot L⁻¹的混合对照溶液储备液,备用。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 定容至 10 mL,吸取 10 μ L 注入高效液相色谱仪,按色谱条件测定,以峰面积(Y)对浓度(X)进行回归计算,结果见表 1。

2.2.5 样品含量测定 按 2.2.1 项色谱条件,取 2.2.2 项制备供试品 10 μ L,注入高效液相,分别测定样品中 5 种生物碱的含量,结果见表 2。

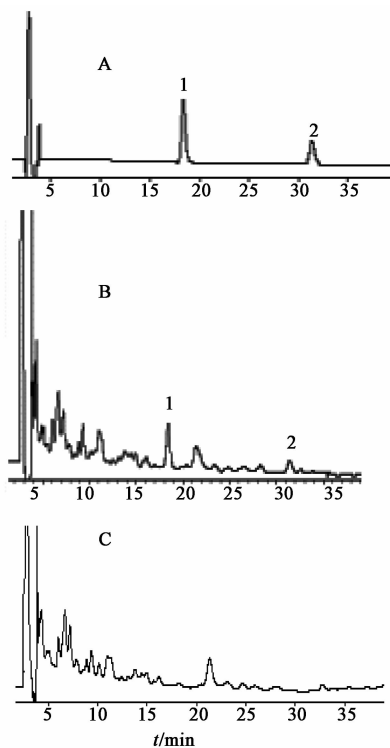
表 1 麻黄生物碱的线性范围、回归方程及相关系数

成分	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程	相关系数
NMP	1.628 ~ 16.28	$Y = 33.761X - 4.8494$	0.999 1
NME	1.646 4 ~ 16.464	$Y = 30.635X - 5.098 1$	0.999 8
E	16.038 4 ~ 160.384	$Y = 34.23X - 8.802 5$	1.000 0
PE	8.096 ~ 80.96	$Y = 33.781X + 3.312 5$	0.999 9
ME	3.218 4 ~ 32.184	$Y = 31.757X - 6.487 9$	0.999 8

表 2 麻黄 5 种生物碱的含量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	NMP	NME	E	PE	ME
MF	0.262 ± 0.61	0.159 ± 0.36	3.252 ± 0.51	1.112 ± 0.84	0.330 ± 0.70
MFX	0.293 ± 0.26	0.152 ± 0.28	3.377 ± 0.63	1.281 ± 0.51	0.374 ± 0.63
MFG	0.278 ± 0.21	0.134 ± 0.37	3.122 ± 0.61	1.186 ± 0.66	0.312 ± 0.61

2.3.2 供试品溶液的制备 精密吸取样品溶液 2 mL,用氨试液调 pH 9.0,加入乙酸乙酯 4 mL,涡旋 10 min,2 700 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,将上层转移至蒸发皿中,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干,重复两次,残渣用 1 mL 0.05%的盐酸甲醇溶出,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。对照品、样品、阴性对照溶液色谱图见图 2。



1. 苯甲酰新乌头原碱;2. 苯甲酰次乌头原碱;
A. 对照品;B. 样品(麻黄附子药对);C. 阴性对照

图 2 附子 HPLC

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱适量,0.05%盐酸甲醇定

2.3 附子生物碱的测定

2.3.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%醋酸铵(1 000 mL加 0.5 mL冰醋酸)(B)梯度洗脱(0 ~ 25 min,24% ~ 28% A;25 ~ 40 min,28% ~ 35% A),波长 235 nm,流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。

容,制成 0.243,0.099 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液储备液,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取混合对照品溶液 1 mL 定容至 20 mL,再精密吸取对照品溶液 0.1,0.2,0.5,1,1.5,2.0 mL 分别定容于 10 mL 量瓶,吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪,按色谱条件测定,以峰面积(Y)对浓度(X)进行回归计算,结果见表 3。

表 3 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的回归方程

名称	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程	相关系数
苯甲酰新乌头原碱	12.25 ~ 242.50	$Y = 25.185X + 13.583$	0.999 9
苯甲酰次乌头原碱	4.95 ~ 99.00	$Y = 27.519X + 47.834$	0.999 6

2.4.2 精密度试验 分别吸取混合对照品 20 μL ,重复进样 6 次,测定峰面积,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的平均峰面积的 RSD 分别为 0.42%,0.46%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取 MFX,按 2.3.2 项下方法操作,平行制备 6 份,按 2.3.1 色谱条件测定,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的 RSD 分别为 1.79%,2.35%,表明该方法的重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取 MFX,分别在 0,2,4,6,12,24 h 按照 2.3.1 项下色谱条件测定,结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的 RSD 分别为 1.20%,1.44%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密吸取已知含量的 MFX 药液 1 mL 共 9 份,分别精密加入高、中、低 3 种浓度混合对照品溶液,按照 2.3.2 方法制备样品溶液,按 2.3.1 色谱方法进行分析,计算回收率及

RSD,结果苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱平均加样回收率(RSD)分别为 100.00% (1.12%), 99.98% (1.10%)。

2.5 样品含量测定 按 2.3.1 项色谱条件,取 2.3.2 项制备供试品 20 μL,注入高效液相,分别测定 MFX 和 MFG 中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的含量,结果见表 4。

表 4 附子生物碱的含量($\bar{x} \pm s, n=3$) mg·g⁻¹

样品	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱
MF	36.621 ± 0.55	10.033 ± 0.32
MFX	35.448 ± 0.35	9.038 ± 0.23
MFG	27.037 ± 0.33 ¹⁾	1.349 ± 0.41 ¹⁾

注:与 MF 相比¹⁾ P < 0.05。

同 MF 相比,MFX 和 MFG 中麻黄 5 种生物碱的含量均无显著性差异,MFX 中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱无显著性差异,但 MFG 的差异显著且低于 MFX。

3 讨论

2010 年版《中国药典》“附子”项下“含量测定项”^[9]规定以高效液相色谱法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、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱生物碱的含量,但由于方剂中采用的是炮制过的附子,其双酯型生物碱含量较低,未达到检测限,故本文只检测了含量较高的苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头碱。

临床上温经发汗时,MFX 用于“始得之”证势稍急,而 MFG 用于“得之二三日”证势缓者^[10]。而实验结果显示 MF 与 MFX,MFG 中与发汗作用相关的麻黄 5 个生物碱含量无显著性差异,说明配伍并未增强麻黄发汗功效成分的溶出。但 MFX 中细辛也具有温经发汗的作用,说明细辛与君药麻黄相使为用,增强了麻黄附子药对解表散寒的功效。

MFX 用于肾阳不足,MFG 用于心阳不足。肾阳即“元阳”为一身阳气之本,人体各脏腑功能活动和精血津液的新陈代谢都需要在肾阳的温煦、推动下才能进行,因此肾阳不足其病情证势要比心阳不足严重。MFX 中与助阳作用相关的苯甲酰乌头原碱和苯甲酰次乌头碱的含量比 MFG 高 9 倍。由此可

见,两汤剂中附子有效成分的含量差异同临床应用相关。《本草纲目》提到附子“得甘草则缓”。附子配伍甘草^[11-12]可能是附子中的生物碱与甘草中的甘草酸、甘草苷等形成络合物,从而降低了附子中的酯型生物碱的含量。

[参考文献]

[1] 万迎来. 麻黄附子细辛汤与麻黄附子甘草汤的临证举隅[J]. 陕西中医,2001, 22(3):180.

[2] 周玲,吴德康,唐于平,等. 麻黄中化学成分研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2008, 24(1):71.

[3] 陈燕,朱全红,罗佳波,等. 麻黄汤中麻黄生物碱在人尿中的排泄研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(11):55.

[4] 王晓芬,朱英. 附子化学成分分析方法及药理作用的研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(11):37.

[5] 黄志芳,易进海,陈燕,等. 附片配伍和汤剂 pH 对 6 种酯型生物碱含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):60.

[6] 陈江,朱黎明. 麻黄附子细辛汤加减治疗慢性肺原性心脏病并发心力衰竭 50 例 [J]. 中国现代药物应用,2011,5(2):175.

[7] 王艳宏,包蕾,刘振强,等. 麻黄附子细辛汤药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2010, 21(1):216.

[8] Chen Y, Li X G, Chen F L, et al. Simultaneous determination of ephedra alkaloids in traditional chinese medicines by high performance liquid chromatography [J]. Acta Chromatographica, 2012, 24(24):475.

[9] 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,2010:178.

[10] 李文瑞. 伤寒论汤证论治[M]. 北京:人民军医出版社,1989:105.

[11] 张帆,葛亮,哈木拉提·吾甫尔,等. 麻黄附子甘草汤的不同配伍方式对其毒性成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):83.

[12] 皮子凤,越皓,孟翔宇,等. 麻黄附子甘草汤配伍过程中炮附子生物碱成分的变化研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2009,11(2):269.

[责任编辑 邹晓翠]