

# 龙胆泻肝汤配伍减毒的化学研究

许 刚, 谢 鸣\*

(北京中医药大学方剂学学科, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探讨含关木通的龙胆泻肝汤及其相关配伍制剂的减毒机制。方法: 采用 HPLC 法测定关木通及龙胆泻肝汤相关配伍制剂中马兜铃酸 A 含量。结果: 关木通甲醇提取液; 关木通水提取液; 龙胆泻肝汤; 去除当归、生地、甘草的龙胆泻肝汤中马兜铃酸 A 含量分别为 0.193 6, 0.062 7, 0.032 4, 0.045 4 mg·mL<sup>-1</sup>。结论: 龙胆泻肝汤全方中马兜铃酸 A 含量明显低于单味关木通和去除当归、生地、甘草的龙胆泻肝汤方, 提示龙胆泻肝汤全方相对较低的肾毒性与其水提过程中马兜铃酸 A 溶出减少有关, 方中佐使药味当归、生地、甘草的配伍可能起重要作用。

[关键词] 龙胆泻肝汤; 减毒机制; 马兜铃酸 A; 高效液相

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)05-0020-04

## Chemical Analysis on Attenuation Mechanism of the Compound Compatibility of Longdan Xiegan Decoction

XU Gang, XIE Ming\*

(Department of Formulaology, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the attenuation mechanism of Longdan Xiegan Decoction and other relevant prescriptions containing *Aristolochia manshuriensis* Kom. **Methods:** To determine the content of aristolochiae acid A in *Aristolochia manshuriensis* Kom and the relevant prescriptions of Longdan Xiegan Decoction with different components by the method of HPLC. **Results:** In the extract of *Aristolochia manshuriensis* Kom by methanol, by water, Longdan Xiegan Decoction and Longdan Xiegan Decoction without *Angelica sinensis*, *Rehmannia glutinosa* Libosch and *Glycyrrhizae uralensis*, the content of aristolochiae acid A is 0.193 6, 0.062 7, 0.032 4, 0.045 4 mg · mL<sup>-1</sup> accordingly. **Conclusion:** The content of aristolochiae acid A in Longdan Xiegan Decoction is significantly lower than that of the extract of *Aristolochia manshuriensis* Kom and Longdan Xiegan Decoction without *Angelica sinensis*, *Rehmannia glutinosa* Libosch and *Glycyrrhizae uralensis*. The results indicate that the lower nephrotoxicity of Longdan Xiegan Decoction is likely due to the decrease of aristolochiae acid A in the extract by water, and the compatibility of *Angelica sinensis*, *Rehmannia glutinosa* Libosch and *Glycyrrhizae uralensis* in Longdan Xiegan Decoction might play an important role.

[Key words] Longdan Xiegan Decoction; the attenuation mechanism; aristolochiae acid A; HPLC

马兜铃酸及含马兜铃酸的关木通确切的肾毒性作用使含关木通的中药复方的安全性面临评价。中药复方由多味药经配伍而成, 相对于单味中药的运用而言具有更好的疗效和较低的毒副作用。曾有研

究报道, 复方配伍能够减轻关木通的肾毒性<sup>[1]</sup>, 我们在前期关木通及龙胆泻肝汤肾毒性研究中, 也发现含等量关木通的龙胆泻肝汤的肾毒性作用小于单味关木通<sup>[2]</sup>, 而去除方中佐药当归、生地、甘草的龙胆泻肝汤肾毒性大于龙胆泻肝汤<sup>[3]</sup>, 提示龙胆泻肝汤复方中存在的减毒机制可能与当归、生地、甘草的配伍有关。为进一步探讨龙胆泻肝汤复方中佐使药的有关配伍减毒机制, 本文比较观察了关木通、含关木

[收稿日期] 2007-07-23

[通讯作者] \* 谢鸣, Tel: (010) 64286992; E-mail: xieming603@263.net

通龙胆泻肝汤及其有关配方水提液中主要肾毒性成分马兜铃酸 A 含量的变化, 以从制剂角度认识含关木通的龙胆泻肝汤中存在的减毒效应机理。

## 1 实验材料

**1.1 试剂** HPLC 用甲醇为色谱纯; 其余试剂均为分析纯; 水为双蒸水。

**1.2 药物 中药** ①关木通方由关木通组成; ②龙胆泻肝汤方由关木通 9 g, 龙胆草 6 g, 黄芩 9 g, 栀子 9 g, 泽泻 12 g, 车前子 9 g, 当归 3 g, 生地黄 9 g, 柴胡 6 g, 生甘草 6 g 共 10 味中药所组成; ③去关木通的龙胆泻肝汤方由前方去除关木通后的 9 味药所组成;

④去当归、生地、甘草的龙胆泻肝汤方由关木通 9 g, 龙胆草 6 g, 黄芩 9 g, 栀子 9 g, 泽泻 12 g, 车前子 9 g, 柴胡 6 g 共 7 味中药所组成。关木通药材由北京同仁堂科技股份有限公司提供, 其余药材均购自北京鹤延龄中药饮片公司。

马兜铃酸 A 标准品 购自中国药品生物制品检定所, 批号: 11076—200406。

**1.3 仪器** 高效液相色谱仪(日本岛津公司, 配 LCT-20AT 泵、CTO-20AC 柱温箱、SPD-M20 A 检测器)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱为 SHIMADZU VP-ODS C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-醋酸(65:34:1) 检测波长 310 nm; 柱温: 40 °C; 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.2 方药的提取** 关木通醇提 精密称取关木通粉末(过 60 目筛) 0.9 g, 置索氏提取器中, 加 60 mL 甲醇, 加热回流 8 h<sup>[4]</sup>, 浓缩, 定量转移至 10 mL 容量瓶中, 以甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 制成关木通醇提取液, 4 °C 冷藏备用。

关木通水提液 取 5 倍处方量中药饮片, 置于煎煮器中, 加相当于药材量 7 倍体积的冷水浸泡 1 h, 加热至沸, 煎煮 30 min, 倾出药液, 残渣再加入 5 倍体积的水, 煎煮 20 min, 合并两次药液, 过滤、浓缩至约 450 mL, 转移至 500 mL 容量瓶中, 定容至 500 mL, 摇匀, 制成关木通水提取液, 4 °C 冷藏备用。

龙胆泻肝汤、去关木通的龙胆泻肝汤、去当归、生地、甘草的龙胆泻肝汤的水提液 各取处方量中药饮片, 置于煎煮器中, 加相当于药材量 7 倍体积的冷水浸泡 1 h, 加热至沸, 煎煮 30 min, 倾出药液, 残渣再加入 5 倍体积的水, 煎煮 20 min, 合并两次药液,

过滤、浓缩至约 80 mL, 转移至 100 mL 容量瓶中, 定容至 100 mL, 摇匀, 4 °C 冷藏备用。

**2.3 对照品溶液的制备** 精密称取马兜铃酸 A 标准品 0.006 60 g, 置 25 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇(色谱纯), 超声 30 min 使溶解, 冷却至 20 °C, 以甲醇定容至 25 mL, 作为标准品溶液储备液, 再精密吸取该溶液 1 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 以甲醇定容至 10 mL, 作为标准品溶液, 浓度为 0.026 4 mg·mL<sup>-1</sup>。

**2.4 供试品溶液的制备** 关木通醇提供试品 取关木通醇提液, 全部转移至 50 mL 容量瓶中, 以甲醇定容至 50 mL 即得, 用前过 0.45 μm 微孔滤膜。

各水提样品供试品 精密吸取各水提取液样品 10 mL, 加水稀释至约 30 mL, 全部转入 100 mL 分液漏斗中, 加入 5 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液, 至不再产生沉淀为止, 用 120 mL 氯仿分 4 次萃取, 每次 30 mL, 合并氯仿萃取液, 减压回收氯仿至干, 用甲醇洗净残渣, 置 50 mL 容量瓶中, 定容至 50 mL 即得, 用前过 0.45 μm 微孔滤膜。

**2.5 测定方法** 分别精密吸取对照品溶液与各供试品溶液 15 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。结果如图 1(A~F)。

**2.6 线性范围** 取马兜铃酸 A 对照品溶液, 在上述色谱条件下分析, 分别进样 3, 5, 10, 15, 20, 25 μL, 测定峰面积。以马兜铃酸 A 进样质量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程  $Y = 1.68 \times 10^3 X + 1.23 \times 10^4$ ,  $r = 0.999 5$ 。结果表明, 马兜铃酸 A 在(79~660) ng 与峰面积呈良好线性关系。

**2.7 精密度试验** 精密吸取上述标准品溶液 15 μL, 按上述色谱条件进行分析, 重复进样 5 次, 其峰面积 RSD 为 1.48%。

**2.8 重复性试验** 精密称取关木通水提样品 5 份, 每份 10 mL, 按照 2.4 项下关木通水提供试品方法制备, 各精密吸取 15 μL, 按上述色谱条件进行分析, 测定峰面积并计算含量, 结果样品液中马兜铃酸 A 平均含量为 0.061 8 mg·mL<sup>-1</sup>, RSD 为 1.35%。

**2.9 稳定性试验** 取关木通水提供试品溶液 1 份, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 后进样 15 μL, 按上述色谱条件进行分析, 其峰面积 RSD 为 1.67%, 表明本溶液在 8 h 内稳定性良好。

**2.10 回收率试验** 采用加样回收法, 取已知含量的关木通水提样品 6 份, 每份 10 mL, 分别加入马兜铃酸 A 标准品储备液 0.5, 0.5, 1, 1, 1.5, 1.5 mL, 按

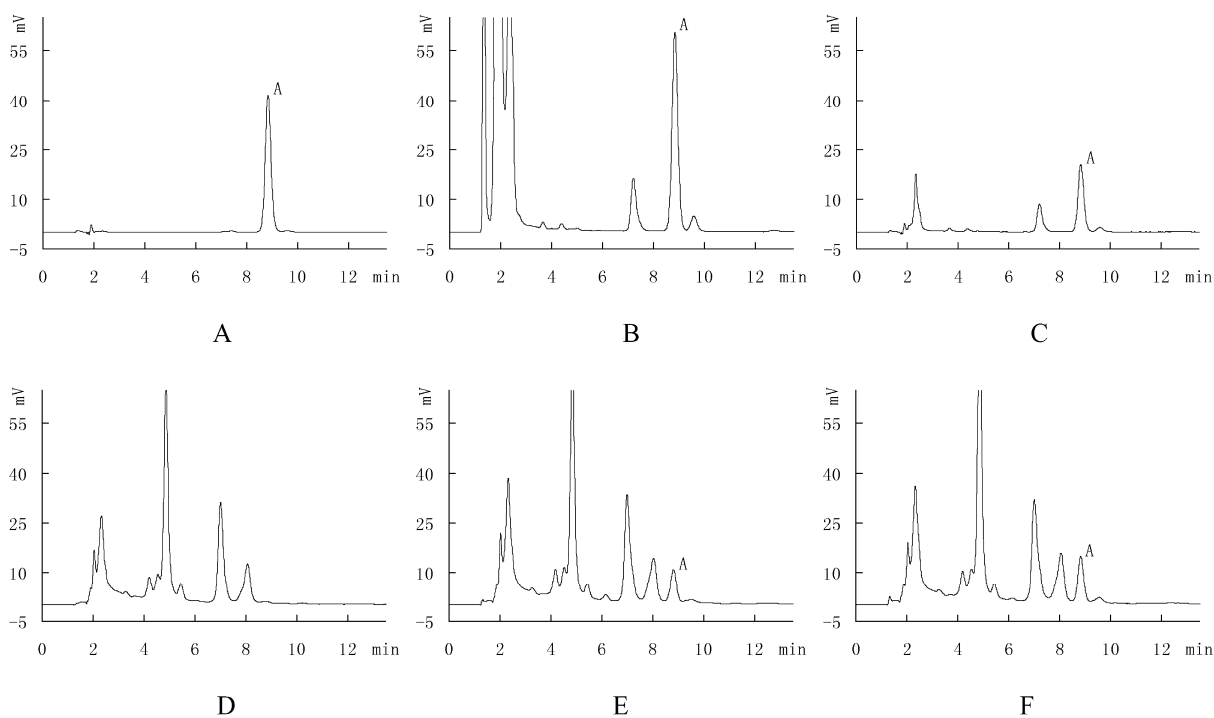


图 1 HPLC 色谱图

A. 马兜铃酸 A 对照品; B. 关木通甲醇提取液; C. 关木通水提取液;  
D. 去关木通的龙胆泻肝汤; E. 龙胆泻肝汤; F. 去当归、生地、甘草的龙胆泻肝汤  
注: 各谱图中 A 表示马兜铃酸 A

2.4 项下关木通水提供试品方法制备, 各供试品精密吸取 15  $\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件进行分析, 测定峰面积并计算含量, 结果显示, 平均回收率为 98.39%, RSD 为 1.39%。

**2.11 样品含量的测定** 取各样品溶液 2 份, 每份 10 mL, 按 2.4 方法制备, 精密吸取各供试品 15  $\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件进行分析, 测定峰面积并计算样品溶液中马兜铃酸 A 含量, 结果见表 1。

表 1 各样品溶液中马兜铃酸 A 含量测定

样品	马兜铃酸 A 含量( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		
	1	2	平均
A	0.193 4	0.193 8	0.193 6
B	0.062 5	0.063 0	0.062 7
C	0.032 6	0.032 1	0.032 4
D	0.045 8	0.045 0	0.045 4

注: A. 关木通甲醇提取液; B. 关木通水提取液; C. 龙胆泻肝汤; D. 去当归、生地、甘草的龙胆泻肝汤

### 3 讨论

关木通药材中马兜铃酸 A 含量测定的方法已有文献报道, 但复方制剂中成分众多, 为避免干扰, 本实验中供试品制备参考文献方法<sup>[5]</sup> 并进行改进, 谱图(图 1)显示, 马兜铃酸 A 分离良好, 阴性对照(去关木通的龙胆泻肝汤)无干扰。

许多研究显示, 马兜铃酸是关木通及其相关配

方肾毒性的主要物质<sup>[6]</sup>, 关木通中含有马兜铃酸 A、B、C、D 等多种马兜铃酸类成分, 其中以马兜铃酸 A 为主, 因此测定关木通及其复方中马兜铃酸 A 含量对于其安全性评价是重要的。鉴于汤剂(水煮)是中医临床最常用的剂型, 本实验在考察建立马兜铃酸 A 的 HPLC 测定方法的基础上, 对关木通及其有关配方水提液中的马兜铃酸 A 进行了含量测定, 根据结果算得实验所用关木通药材中马兜铃酸 A 含量为  $2.15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 但关木通及其配方水提液中马兜铃酸 A 含量明显降低。实验测得各方药制剂中马兜铃酸 A 转移率分别为: 水提关木通 32.4%, 水提龙胆泻肝汤 16.7%, 水提去当归、生地、甘草的龙胆泻肝汤 23.5%。结果表明, 关木通在水提制剂中马兜铃酸 A 得率较低, 与文献报道相同<sup>[7]</sup>, 由此可见龙胆泻肝汤作为汤剂应用的合理性。

在前期关于龙胆泻肝汤肾毒性研究的实验中, 曾观察到龙胆泻肝汤肾毒性作用较单味关木通小, 而去除当归、生地、甘草配伍的龙胆泻肝汤肾毒性作用较含关木通的龙胆泻肝汤全方大。本实验进一步测得, 在含等量关木通的水提制剂中, 龙胆泻肝汤全方中马兜铃酸 A 含量为  $0.032 4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 仅为水提关木通中马兜铃酸 A 含量的一半左右。已知马兜铃酸 A 是关木通肾毒性作用的主要成分, 由此推断, 含

关木通龙胆泻肝汤复方配伍减毒机制可能与制剂过程中马兜铃酸含量降低有关。

根据中医方剂的配伍学理,龙胆泻肝汤为泻火除湿之方,该方在重用大队苦寒泻火和淡渗清利药味的同时,配伍了滋阴养血的当归、生地和甘温补中的甘草,以防苦寒渗利太过而败胃伤肾,该3味在方中兼有佐制作用<sup>[7]</sup>。实验中测得龙胆泻肝汤去除当归、生地、甘草佐使药后,其马兜铃酸A含量较龙胆泻肝汤全方明显升高,说明有关佐使药配伍可减少方中马兜铃酸A的溶出,推测这可能是当归、生地、甘草的配伍能减轻龙胆泻肝汤全方肾毒性的作用的体外机制。该结果为从毒理和化学层面认识中医组方配伍的合理性提供了一定的实验依据。

马兜铃酸A为3,4-次甲二氧基-10-硝基-1-菲酸,分子中含有羧基<sup>[8]</sup>,可与生物碱、金属离子等发生络合反应而影响溶出,方中药味众多,化学成分复杂,如生地、当归中均含有大量金属离子,龙胆草中含有生物碱,均有可能与马兜铃酸A相互作用而使其水溶液中含量降低,而甘草中甘草甜素分解生成的葡萄糖醛酸也可与羧基结合而使马兜铃酸A溶出减少,另外,方中的大分子物质如蛋白、鞣质等也可能吸附马兜铃酸A而使其溶出减少,这有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] 李春香,朱晓卉,丁芳,等.配伍降低关木通肾毒性的研究现状[J].河北中医药学报 2005,20(2):35-37.
- [2] 张娜,谢鸣.龙胆泻肝汤中关木通配伍的肾毒性研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(5):59-61.
- [3] 谢鸣,张娜.佐使配伍对含关木通的龙胆泻肝汤全方肾毒性作用的影响[J].北京中医药大学学报,2007,30(10):647-677.
- [4] 袁志芳,田葆萍,卢兴红,等.RP-HPLC法测定中药材及其制剂中马兜铃酸A的含量[J].药物分析杂志 2003,23(3):215-219.
- [5] 谢昭明,李顺祥,廖汉成.HPLC法测定细辛药材中马兜铃酸A的含量[J].中南药学,2003,1(3):165-167.
- [6] 李红霞,孙田玲,刘寨东.马兜铃酸肾病研究概况[J].中国中医药科技,2005,12(2):125-126.
- [7] 叶志斌,张悦,王一梅.HPLC法测定关木通及4种中成药中马兜铃酸A含量[J].复旦学报(医学版) 2003,30(5):491-493.
- [8] 谢鸣.21世纪课程教材·方剂学[M].北京:人民卫生出版社,2002.124-125.
- [9] 赵辉,张建夫.马兜铃酸的结构分析和性质研究[J].周口师范学院学报,2003,20(2):34-35.