

# 通脉四逆汤毒性分析

葛尔宁\*

(浙江中医学院中心测试室, 杭州 310053)

[摘要] 目的: 测定通脉四逆汤中乌头类生物碱的煎出量及变化规律。方法: 采用 RP-HPLC 法, Hypersil-BDS 柱(250mm × 4.6mm, 5 $\mu$ m), 以甲醇-水-氯仿-三乙胺(100:50:3:0.15)为流动相, 流速为 1mL·min<sup>-1</sup>, 波长为 234nm, 柱温: 30℃。结果: 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱在(0.0025~0.0800) $\mu$ g、(0.0028~0.0880) $\mu$ g 和(0.0023~0.0760) $\mu$ g 范围内线性关系良好,  $r$  分别为 0.9997、0.9996、0.9996。结论: 该方在煎煮过程中, 同煎的其他药物对乌头类生物碱在汤中的含量产生影响, 文火滚煎约 70min 后, 药汤中乌头碱和次乌头碱成分基本消失, 中乌头碱消失过半。

[关键词] 乌头碱; 中乌头碱; 次乌头碱; 通脉四逆汤; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)05-0012-03

## To Analyse the Toxicity of Tongmai-Sini-Tang

GE Er-ning

(Analytical Testing Center, Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To measure the contents of aconitine alkaloids in Tongmai-Sini-Tang, and its regularity of vary with decoction time. **Methods:** A RP-HPLC method was used. The chromatographic conditions are listed below: Hypersil-BDS column(250mm × 4.6mm, 5 $\mu$ m), a mobile phase composed of methanol-water-chloroform-triethylamine(100:50:3:0.15), a flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup> and wavelengths-234nm, column temperature was 30℃. **Results:** The linear range of aconitine was (0.0025~0.0800) $\mu$ g ( $r = 0.9997$ ), mesaconitine was (0.0028~0.0880) $\mu$ g ( $r = 0.9996$ ), and hypaconitine was (0.0023~0.0760) $\mu$ g ( $r = 0.9996$ ). **Conclusion:** while decocting medicinal herbs except from major herb in the formulation, other herbs were effective on the contents of aconitine alkaloids, the compositions of aconitine and hypaconitine would disappear after decocting medicinal herbs for 70 minutes, but the mesaconitine disappear only half.

[Key words] Aconitine; Mesaconitine; Hypaconitine; Tongmai-Sini-Tang; RP-HPLC.

通脉四逆汤始载于《金匱要略》<sup>[1]</sup>, 由附子、生姜、甘草 3 味药组成, 有回阳救逆之功效, 临床主症: 下利清谷, 里寒外热, 四肢厥逆, 脉微欲绝等症。是历代医家所推崇的名方之一。本方附子生用, 用量达 12g 之多, 生附子中的主要成分乌头碱; 中乌头碱和次乌头碱均为剧毒生物碱, 有报道称 3mg 乌头碱即可使人中毒至死<sup>[2]</sup>, 有关生附子中乌头类生物碱的含量及临床用药时的去毒方法, 国内文献已有许

多报道<sup>[3-5]</sup>, 按现有文献记载, 12g 生附子中乌头碱; 中乌头碱和次乌头碱的含量分别可达 0.58mg、3.28mg 和 3.50mg<sup>[6]</sup>, 但生附子用开水煎煮 10~20min 后, 毒性可迅速降低。有关上述 3 种至毒生物碱在本方煎煮过程中的煎出量及变化规律, 国内未有文献报道。本文分别对通脉四逆汤组方及方中主药生附子进行煎煮, 分时采样, 再用 RP-HPLC 法分别测定各组样中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的含量及变化规律, 得知在合煎情况下, 汤中三种乌头碱的煎出量及变化规律和主药单煎时有区别, 由拟和曲线得知在文火滚煎约 70min 后(即按文献[1]要求: 以水 300mL, 煮取 120mL), 方中乌头碱和次乌头

[收稿日期] 2005-07-26

[通讯作者] 葛尔宁, Tel: (0571) 86613589; E-mail: ge\_er\_ning@sina.com

碱成分基本消失, 中乌头碱成分仅消失过半。方法准确、可靠。

### 1 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪, 484 紫外检测器, 510 泵, 680 控制器, 浙江大学 N2000 色谱工作站, 甲醇为色谱醇, 水为纯净水, 三乙胺、氯仿为分析醇。

乌头碱、中乌头碱、次乌头碱对照品(中国药品生物制品检定所); 生附子购自亳州药材市场, 经浙江中医学院中药鉴定教研室陈锡林副教授鉴定, 其余药购自浙江中医学院实验药厂。

### 2 色谱条件

色谱柱: Hypersil-BDS 柱(250mm × 4.6mm, 5μm); 流动相: 甲醇-水-氯仿-三乙胺(100: 50: 3: 0.15); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 234 nm; 柱温: 30 °C。

### 3 对照品溶液和被测样品溶液的制备

**3.1 对照品溶液制备** 精密称取乌头碱 1mg、中乌头碱 1.1mg 和次乌头碱 0.9mg, 置 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 精密吸取上述溶液 0.05mL、0.2mL、0.4mL、0.8mL、1.6mL 分置 15 只 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 超声震荡、摇均后备用。

**3.2 样品溶液的制备** 煎法设计: 煎法一: 生附子 12g。煎法二: 生附子 12g、干姜 12g、甘草 6g。

按上述 2 种不同煎法称取各药材, 每种煎法各取 3 份, 置 6 只圆底烧瓶中, 按文献[1]要求各加 300 mL 水, 浸泡 1h 后取第一样。调节电压使 6 只加热电炉温度达到一致, 同时用文火煎煮 6 只烧瓶中的药物, 每 5 分钟取一次样(每次 0.8mL) 并记录总溶液量。分别对应混和 3 份样品溶液, 共提取 36 个待测样品, 经离心、取上清液、再经微孔滤膜过滤、碳 18 预柱吸附过滤后备用。

### 4 线性范围

取上述 3 种对照品稀释液各 5μL 进样, 以对照品峰面积  $Y$  为纵坐标, 进样量  $X$  (μg) 为横坐标绘制标准曲线, 乌头碱进样量在 0.0025~ 0.0800μg、中乌头碱进样量在 0.0028~ 0.0880μg、次乌头碱进样量在 0.0023~ 0.0760μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。回归方程分别为:  $Y = 1.2222 \times 10^6 X + 218, r = 0.9998 (n = 3)$ 、 $Y = 1.1657 \times 10^6 X + 365, r = 0.9999 (n = 3)$ 、 $Y = 1.3177 \times 10^6 X - 633, r = 0.9998 (n = 3)$ 。

### 5 重复性和稳定性

精密吸取煎法 2 中第 3 次所取样品, 按含量测定方法重复进样 5μL 5 次, 测定峰面积, RSD 为

2.3%(乌头碱)、1.8%(中乌头碱)、2.4%(次乌头碱); 分别精密吸取该样品溶液 5μL, 于 0, 2, 4, 8, 16h 进样, 测定上述三种乌头碱的峰面积积分值, RSD 为 1.2%(乌头碱); RSD 为 1.1%(中乌头碱), 1.7%(次乌头碱), 稳定性良好。

### 6 样品测定

取 2 种煎法所提取的样品溶液各 5μL 进样, 记录高效液相色谱图(见图 1)。根据各图谱中 3 种乌头碱的峰面积, 由上述 3 个回归方程算出各样品中 3 种乌头碱的含量, 重复 3 次取平均值, 以煎煮时间  $t$  为横坐标, 两种煎法的药汤中 3 种乌头碱的含量  $Y_{11}$ 、 $Y_{12}$ 、 $Y_{13}$ 、 $Y_{21}$ 、 $Y_{22}$ 、 $Y_{23}$  为纵坐标绘制趋势图(见图 2、图 3、图 4), 设第一样为 0 点, 以曲线拟合法求得本方中 3 种乌头碱随煎煮时间的变化方程为:

煎法一:

$$Y_{11}(\text{乌头碱}) = 7 \times 10^{-5} t^3 - 0.0070 t^2 + 0.1703 t + 0.2605$$

$$Y_{12}(\text{中乌头碱}) = 1 \times 10^{-5} t^3 - 0.0020 t^2 + 0.1301 t + 3.7756$$

$$Y_{13}(\text{次乌头碱}) = -4 \times 10^{-5} t^3 + 0.0099 t^2 - 0.8539 t + 26.5190 (t \geq 40)$$

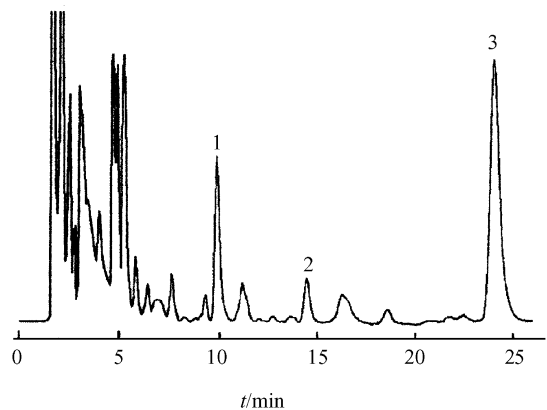


图 1 煎法二中 3 号样品高效液相色谱图

1. 中乌头碱 2. 乌头碱 3. 次乌头碱

煎法二:

$$Y_{21}(\text{乌头碱}) = 0.0016 t^2 - 0.1123 t + 1.9503$$

$$Y_{22}(\text{中乌头碱}) = 0.0001 t^2 - 0.0381 t + 5.6875$$

$$Y_{23}(\text{次乌头碱}) = 0.0013 t^2 - 0.2389 t + 11.435 (t \geq 10)$$

把上 6 式微分得:

$$dY_{11}/dt = 21 \times 10^{-5} t^2 - 0.0140 t + 0.1703$$

$$dY_{12}/dt = 3 \times 10^{-5} t^2 - 0.0040 t + 0.1301$$

$$dY_{13}/dt = -12 \times 10^{-5} t^2 + 0.0198 t - 0.8539$$

( $t \geq 40$ )

$$dY_{21}/dt = 0.0032t - 0.1123$$

$$dY_{22}/dt = 0.0002t - 0.0381$$

$$dY_{23}/dt = 0.0026t - 0.2389 (t \geq 10)$$

令上 6 式等于零,用解方程及数值逼近法可算得:在煎法一中,当  $t \approx 16(\text{min})$  时,药汤中乌头碱含量达到最高, $t \approx 51(\text{min})$  时,药汤中乌头碱成分消失; $t \approx 57(\text{min})$  时,药汤中中乌头碱含量达到最高,并在随后的煎煮时间里含量保持不变; $t \approx 40(\text{min})$  时,药汤中次乌头碱含量达到最高, $t \approx 83(\text{min})$  时,药汤中次乌头碱含量基本消失。在煎法二中,当  $t \approx 0(\text{min})$  时,药汤中乌头碱含量为最高, $t \approx 35(\text{min})$  时,药汤中乌头碱成分消失; $t \approx 0(\text{min})$  时,药汤中中乌头碱含量为最高, $t \approx 90(\text{min})$  时,药汤中中乌头碱含量消失过半; $t \approx 10(\text{min})$  时,药汤中次乌头碱含量达到最高, $t \approx 92(\text{min})$  时,药汤中次乌头碱成分基本消失。

## 7 讨论

乌头碱煎出量 (mg)

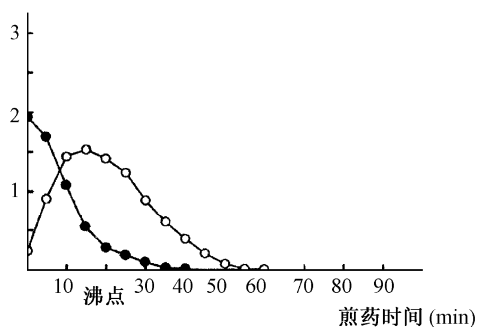


图 2 乌头碱煎出量随煎药时间的变化规律

○ ○: 煎法一 ● ●: 煎法二

中乌头碱煎出量 (mg)

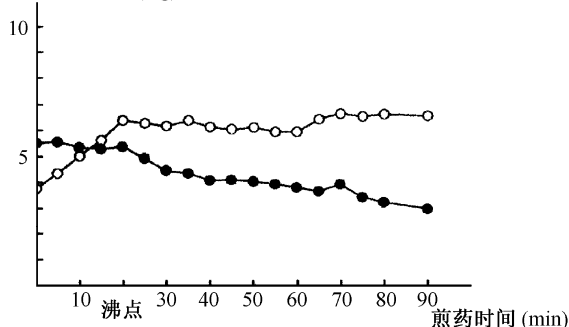


图 3 中乌头碱煎出量随煎药时间的变化规律

○ ○: 煎法一 ● ●: 煎法二

由 HPLC 分析得知,本方中 3 种乌头类生物碱的煎出量及消失程度明显受同煎其他两种药的影响,由图 2、图 3、图 4 可知,药汤在煎煮过程中乌头碱成分在其他两种药的作用下远比生附子单煎时消失得快,到沸点就基本消失;次乌头碱的情况类似,

次乌头碱煎出量 (mg)

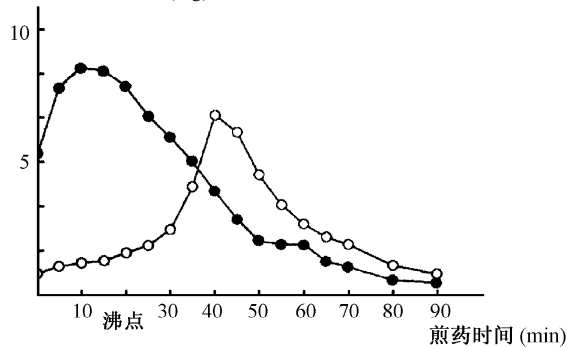


图 4 次乌头碱煎出量随煎药时间的变化规律

○ ○: 煎法一 ● ●: 煎法二

但比前者消失得慢,文火滚煎 70min (与文献[1]要求一致)后,也基本消失;生附子单煎时,药汤中中乌头碱含量经 70min 的滚煎后保持不变,在另两味药的作用下,70min 的滚煎可使中乌头碱的含量减半。充分证明“附子与干姜相配,可解附子之毒性”<sup>[1]</sup>之说。

由趋势图可知,沸点前后该药汤中 3 种乌头类生物碱的含量最高,毒性也最强;文火滚煎 70min 后,毒性大幅降低;但用文火完全煎去该药汤中乌头类生物碱的含量,按文献[1]要求(滚煎 70min 后,正好煮取 120 毫升)还不够,见图 3,中乌头碱含量趋势图,微分对应的拟合式  $Y_{22}$  可得,完全煎去药汤中中乌头碱成分需要较长的 190min。这对临床科学煎药有一定的指导意义。

本方法检测乌头类生物碱的含量,效果颇佳。色谱图中 3 种乌头碱的特征峰非常明显,与其他峰的分离也较好,完全能够满足这 3 种乌头类生物碱质量检测标准的要求。

## [参考文献]

- [1] 李文瑞. 金匱要略汤证论治[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993. 633-637.
- [2] 中国医学科学院药物研究所. 中药志[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 第二版, 第一册, 138.
- [3] 陈燕方, 何伟, 祝风池. HPLC 测定植物性农药—0.25% 乌头总碱乳油中的乌头类生物碱[J]. 色谱, 2002, 20(3): 253-255.
- [4] 聂晶, 张立群, 田颂九, 等. 高效液相色谱法分离测定康复新胶囊中乌头类生物碱含量[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(6): 421-423.
- [5] 郑虎占, 董泽宏, 余靖, 等. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1998. 第三卷, 2579-2582.
- [6] 孙文基, 谢世昌主编. 天然药物成分定量分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003. 2-6.