

诃子制草乌模拟炮制品在人工胃液与肠液中的水解行为研究[△]

刘 帅*,刘晓艳,林 森,杨 畅,李 飞,杜 红[#](北京中医药大学中药学院,北京 100029)

中图分类号 R283.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1752-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.07

摘要 目的:研究诃子制草乌模拟炮制品在人工胃液与肠液中的水解行为,明确二者相互作用机制,为诃子制草乌的炮制减毒提供依据。方法:采用高相液相色谱(HPLC)法测定诃子制草乌在人工胃肠液中孵育不同时间(胃液中孵育2 h,肠液中孵育5、6、7、8 h)后其降解产物乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酸的含量。结果:诃子制草乌中乌头碱含量在人工胃液中减少,在人工肠液中明显回升,在人工肠液孵育6~8 h时含量稳定;诃子制草乌中苯甲酰乌头原碱在人工胃液中未测得,在人工肠液中测得;诃子制草乌中苯甲酸在人工胃肠液中含量变化呈先递增再递减的趋势,且在人工肠液中孵育6 h时达最大值,7~8 h时维持稳定。结论:诃子制草乌炮制过程中鞣质与乌头碱可能结合生成难溶性物质,胃肠液pH对游离乌头碱的释放和水解有一定影响,人工胃液酸性环境对其水解有抑制作用,而人工肠液碱性环境对其水解有促进作用。

关键词 诃子制草乌;鞣质;乌头碱;模拟炮制;人工胃液;人工肠液;体外代谢

Hydrolysis of Simulation Processing Products of *Aconitum kusnezoffii* Processed with *Terminalia chebula* in Simulated Gastric Fluid and Intestinal Fluid

LIU Shuai, LIU Xiao-yan, LIN Sen, YANG Chang, LI Fei, DU Hong (School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the hydrolysis of simulation processing products of *Aconitum kusnezoffii* processed with *Terminalia chebula* in simulated gastric fluid and intestinal fluid, identify the mechanism of interactions of both and provide a basis for preparing *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* and reducing its toxicity. METHODS: After *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* was incubated in simulated gastric fluid and intestinal fluid for different periods of time (2 h in gastric fluid and 5, 6, 7 and 8 h in intestinal fluid), HPLC was adopted to determine the content of aconitine, benzoyleaconine and benzoic acid. RESULTS: The content of aconitine in *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula* was decreased in the simulated gastric fluid, but obviously increased in the simulated intestinal fluid and had stable content after incubation in the simulated intestinal fluid for 6-8 h. No benzoyleaconine was detected in the simulated gastric fluid, but it was found in the simulated intestinal fluid. The content of benzoic acid in the simulated gastric fluid tended to increase followed by decrease, got largest value after incubation in the simulated intestinal fluid for 6 h and maintained stable at 7-8 h. CONCLUSIONS: During the preparation of *A. kusnezoffii* processed with *T. chebula*, tannins may combine with aconitine to form insoluble substances. The pH of gastric and intestinal fluid has certain effect on the release and hydrolysis of free aconitine, the acidic environment of simulated gastric fluid has inhibition effect on the hydrolysis and the alkaline has promoting effect.

KEYWORDS *Aconitum kusnezoffii* processed with *Terminalia chebula*; Tannin; Aconitine; Simulation processing; Simulated gastric fluid; Simulated intestinal fluid; Metabolism *in vitro*

诃子、草乌均为中蒙医常用药。诃子为使君子科植物诃子(*Terminalia chebula* Retz.)的干燥成熟果实,主要成分为鞣质,具有解毒功效^[1-2]。草乌为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb.的干燥块根,具有杀“黏”、止痛等功效^[3]。草乌有大毒,未经炮制或炮制不当均可引起中毒,二萜类生物碱乌头碱是其主要毒性成分之一^[4]。蒙药炮制草乌的主要目的

是减毒增效,且以诃子制最为常见^[5]。本课题组通过前期试验表明,鞣质可抑制双酯型生物碱在炮制与煎煮过程中的水解反应,且对一级水解和二级水解均有抑制作用,但其在体内的代谢过程尚不明确。笔者通过建立人工胃肠液体外水解模型,了解鞣质与乌头碱模拟炮制品在消化道水解的动态变化规律,明确鞣质与乌头碱相互作用机制,以及pH对生物碱的影响,进而阐明诃子制草乌的炮制减毒原理。

1 材料

1.1 仪器

2695型高效液相色谱仪,包括2695型色谱泵、2996型紫外检测器、Empower工作站(美国Waters公司),QIYS 002-91 DS型恒温水浴锅(北京市医疗设备厂);TDL-S-A型离心机(上

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81102815、81102807);高等学校博士学科点专项科研基金(No.20110013120017)

* 硕士研究生。研究方向:中药炮制。E-mail:13716399230@163.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:中药炮制。电话:010-84738616。E-mail:duhong@vip.163.com

海安亭科学仪器厂,半径:16 cm,下同);SB25-12DTDN型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

乌头碱对照品(批号:110720-201111,纯度:≥98%)、新乌头碱对照品(批号:110799-201106,纯度:≥98%)、次乌头碱对照品(批号:110798-201106,纯度:≥98%)、苯甲酰乌头原碱对照品(批号:111794-201102,纯度:≥98%)、苯甲酰新乌头原碱对照品(批号:111795-201002,纯度:≥98%)、苯甲酰次乌头原碱对照品(批号:111796-201002,纯度:≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;苯甲酸对照品(美国Accustandard公司,批号:23040,纯度:99.9%);诃子鞣质(上海士峰科技有限公司,批号:120512,纯度:≥98%);胃蛋白酶(美国Sigma公司,批号:P7000,活性:500 u/mg);胰蛋白酶(美国Amresco公司,批号:0458,活性:250 u/mg);乙腈、四氢呋喃、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 诃子制草乌模拟炮制品溶液的制备^[6] 精密称取诃子鞣质0.6 g,加水80 ml,加热使其完全溶解,放冷备用;精密称取乌头碱对照品9 mg,加入上述溶液中,密封,室温下浸泡3 d,每天搅拌2次;3 d后,加入适量清水,回流加热2 h,放冷,即得诃子制草乌溶液。

2.1.2 诃子制草乌人工胃液孵育样品的制备 (1)人工胃液^[7]:按2010年版《中国药典》附录相关方法制备。(2)人工胃液孵育样品^[8]:取“2.1.1”项下诃子制草乌模拟炮制品溶液30 ml,加入等体积人工胃液中,搅拌均匀,控温(37±1)℃,孵育2 h,即得。平行操作3次。

2.1.3 诃子制草乌人工肠液孵育样品的制备^[8-9] 分别在“2.1.2”项下诃子制草乌人工胃液孵育样品中加NaOH溶液以调pH至7,加入0.69 g KH₂PO₄,使其完全溶解后,加NaOH溶液调pH至6.8。另取胰酶0.6 g,加少量蒸馏水溶解后,加入溶液中,搅拌均匀,控温(37±1)℃,连续孵育5、6、7、8 h,即得。每个时间点样品平行操作3次。

2.1.4 空白人工胃液和空白人工肠液的制备 除用等量蒸馏水代替鞣质与乌头碱模拟炮制品溶液外,其余均与“2.1.2”“2.1.3”项下方法相同。

2.2 生物碱的含量测定

2.2.1 供试品的制备^[10-12] 分别精密移取“2.1”项下人工胃、肠液孵育样品5 ml,5 000 r/min离心30 min,取上清液,用乙酸调pH至4,用10 ml氯仿萃取3次;将上层液体用浓氨水调pH至10,用10 ml氯仿萃取3次;合并6次下层氯仿液,40℃减压蒸干,残渣加甲醇定容至2 ml,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 取乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酸对照品适量,混合。加异丙醇-三氯甲烷(1:1)溶液与上述溶液混合定容至10 ml,制成每1 ml分别含乌头碱0.061 mg、次乌头碱0.045 mg、新乌头碱0.089 mg、苯甲酰乌头原碱0.031 mg、苯甲酰次乌头原碱0.091 mg、苯甲酰新乌头原碱0.127 mg、苯甲酸0.103 mg的混合对照品溶液,备用。

2.2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent Extend C₁₈(250 mm×4.6

mm,5 μm);流动相A:乙腈-四氢呋喃(25:15),流动相B:0.1 mol/L醋酸铵溶液(每1 000 ml加冰醋酸0.5 ml),梯度洗脱;检测波长:235 nm;流速:0.8 ml/min;柱温:25℃;进样量:10 μl。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution programme

时间段,min	流动相A,%	流动相B,%
0~15	2→19	98→81
15~45	19→22	81→78
45~60	22→35	78→65

2.2.4 精密度、稳定性、重现性、回收率试验 依法进行方法的精密度、稳定性、重现性试验,结果各试验的RSD均小于3%,其中稳定性试验中供试品溶液12 h内结果测定稳定。回收率试验中,乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酸的回收率分别为99.36%、99.48%、98.97%(RSD分别为0.96%、1.03%、0.89%,n=5)

2.2.5 含量测定结果 精密量取上述对照品与供试品,按“2.2.3”项下色谱条件进行测定,外标法计算各供试品溶液中乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酸的含量,结果见表2,色谱见图1,含量变化曲线见图2。

表2 诃子制草乌模拟炮制品及其在人工胃肠液孵育过程中生物碱与苯甲酸的含量测定结果(n=3,mg)

Tab 2 Contents of the alkaloid and benzoic acid in simulation processing products of *A. kusnezoffii* with *T. chebulu* in the incubation processing in simulated gastric and intestinal fluid (n=3,mg)

成分	鞣质与乌头碱模拟炮制品	胃液孵育(2 h)	肠液孵育(5 h)	肠液孵育(6 h)	肠液孵育(7 h)	肠液孵育(8 h)
乌头碱	1.48	0.281	7.349	5.277	5.212	5.609
苯甲酰乌头原碱	0.165	-	0.647	0.472	0.474	0.493
苯甲酸	-	0.018	0.052	0.073	0.058	0.050

注:“-”为未检测到

Note:“-” means no detected

由表2、图1、图2表明,模拟炮制后,乌头碱含量大大降低;其在人工胃液中孵育,乌头碱含量减少;但在人工肠液中孵育后,乌头碱含量明显回升,且在6~8 h处于较恒定的范围内,最终含量达到初始含量的62.3%。苯甲酰乌头原碱的含量在模拟炮制品和胃孵育液中均较低;在人工肠液中含量升高,6~8 h维持稳定,其含量变化趋势与乌头碱近似。苯甲酸在人工胃肠液中含量变化呈先递增再递减趋势,6 h达最高。

3 讨论

乌头碱与鞣质经模拟炮制后,乌头碱含量大大减少。由于鞣质具有可以与生物碱结合生成难溶性沉淀的性质,推测乌头碱在模拟炮制的过程中可能与鞣质反应生成络合物^[12-13],导致游离乌头碱含量减少。酸性条件可抑制乌头碱水解^[14-15],因此模拟炮制品中少量的游离乌头碱在人工胃液中缓慢水解,导致乌头碱含量进一步降低,同时水解产物苯甲酰乌头原碱和苯甲酸含量有所增加。碱性条件可以促进鞣质与乌头碱生成的络合物解离,因此乌头碱含量在人工肠液中急剧回升,5 h达最高;随着反应发生肠液的pH降低(水解产物呈酸性),游离乌头碱水解受到抑制,因此人工肠液孵育6~8 h时乌头

碱含量相对稳定。

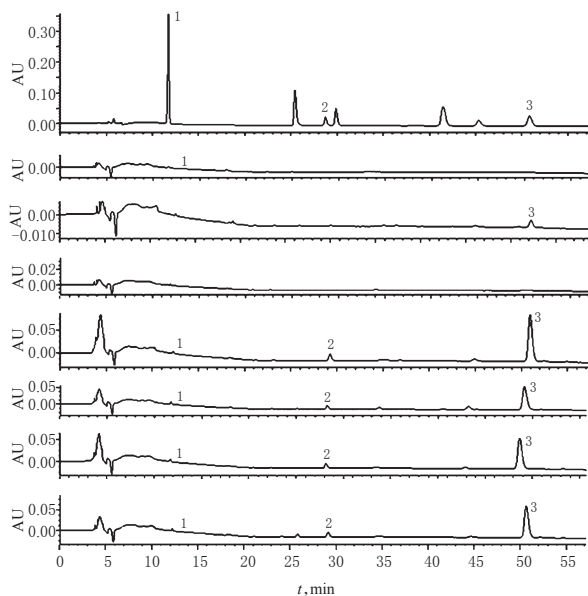


图1 高效液相色谱图

1.苯甲酸;2.苯甲酰乌头原碱;3.乌头碱

注:从上到下依次为混合对照品,空白人工胃液,人工胃液孵育2 h后的样品,空白人工肠液,人工肠液分别孵育5、6、7、8 h后的样品

Fig 1 HPLC chromatograms

1. benzoic acid; 2. benzoaaconine; 3. aconitine

Note: from the top to bottom, the following are respectively mixed reference, blank simulated gastric fluid, simulated gastric fluid sample after incubation for 2 h, blank simulated intestinal fluid, simulated intestinal fluid samples after incubation for 5, 6, 7 and 8 h

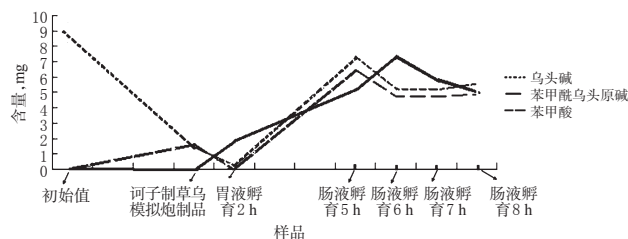


图2 乌头碱、苯甲酰乌头原碱和苯甲酸的含量变化曲线

Fig 2 Curves of the content changes of aconitine, benzoaaconine and benzoic acid

苯甲酸在人工胃肠液中含量变化呈先递增再递减的趋势。由于苯甲酸与氨基醇型生物碱均为苯甲酰乌头原碱的水解产物,二者的物质的量之比为1:1,所以氨基醇型生物碱的含量变化趋势与苯甲酸一致;在人工胃液中含量较低,肠液中先升高再降低,最后维持稳定。

结合表2,可知3种生物碱在体外代谢的过程中含量呈规律性变化,人工胃液中含量均较低,肠液中含量升高,在6~8 h处于动态平衡。因此判断,诃子制草乌炮制减毒的原理与药典法制草乌不同,并不是通过促进双酯型生物碱水解达到减毒目的。蒙医“诃子可解草乌毒”的原因可能是:诃子中的鞣质与草乌中生物碱成分在炮制过程中生成难溶性络合物,使得游离乌头碱含量降低,难溶性络合物在小肠液中缓慢解离

并发生水解,使得草乌中双酯型生物碱、单酯型生物碱、氨基醇型生物碱在较高浓度下维持动态平衡。这一方面避免了生物碱含量突然升高导致中毒,另一方面可保证持续发挥药效。

本研究从体外模拟炮制层面上分析了诃子制草乌炮制减毒的原理,还需结合药理实验和体内的量-毒-效关系进一步验证,以为深入阐明诃子制草乌炮制减毒原理、进一步优化饮片炮制工艺及控制饮片质量标准提供科学依据,保证临床用药安全有效。

参考文献

- [1] 杨俊荣,孙芳云,李志宏,等.诃子的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(6):450.
- [2] 李志恒,那生桑,赫向峰.诃子在蒙医药中的独特应用[J].中医药信息,1994(4):34.
- [3] 图雅,张贵君,刘志强,等.蒙药草乌的研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(7):1581.
- [4] 吴修红,孙晖,王喜军.草乌毒性及解毒方法研究进展[J].中医药学报,2009,37(4):96.
- [5] 乌力吉特古斯,包淑芝,敖艳青,等.蒙医对草乌炮制的历史沿革与发展现状[J].中国民族医药杂志,2005,11(21):153.
- [6] 杨畅,李飞,侯跃飞,等.诃子草乌配伍与诃子制草乌水煎液中生物碱含量的比较:诃子制草乌炮制原理探讨 II [J].中国实验方剂学杂志,2013,19(4):130.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XII A.
- [8] 马莎,杨晓梅,薛咏梅,等.胃肠模拟系统对明矾炮制药材中铝的形态转变影响[J].光谱实验室,2012,29(5):3103.
- [9] 谭锐,郭力,董晓萍,等.麻黄汤体内代谢的比较研究[J].中药药理与临床,2002,18(2):1.
- [10] 周静波,郭力,陈儒燕,等.乌头类双酯型生物碱水解产物:苯甲酸的含量测定研究[J].现代生物医学进展,2009,9(4):712.
- [11] 张晓芬,王彬辉,章文红. HPLC测定乌头汤提取物中3种乌头类生物碱的含量[J].中国中医药科技,2012,19(6):510.
- [12] 周玲.乌头类中药化学成分及其生物碱含量测定方法的研究概况[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(2):223.
- [13] 刘帅,李飞,侯跃飞,等.诃子中的鞣质成分对诃子汤制草乌的影响:诃子制草乌炮制原理探讨 I [J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):158.
- [14] 王勇,刘志强,宋凤瑞,等.附子配伍原则的电喷雾质谱研究[J].药学报,2003,38(6):451.
- [15] 徐建东,王洪泉,张文英,等.大黄附子汤中诸药的不同组合及煎法对乌头碱含量的影响[J].中国药房,2003,14(10):634.

(收稿日期:2014-06-03 修回日期:2014-07-14)

(编辑:张静)