



民族药铁棒锤炮制减毒原理初步研究

王毓杰, 张静, 田会萍, 曾陈娟, 姚喆, 张艺*

(成都中医药大学, 四川 成都 611137)

[摘要] **目的:**研究铁棒锤不同炮制方法的炮制减毒原理。**方法:**采用高效液相色谱法和急性毒性试验比较铁棒锤炮制前后化学成分和毒性的变化。**结果:**生品中的主要毒性成分为乌头碱、去氧乌头碱和3-乙酰乌头碱,炮制品中这3种生物碱的含量降低,苯甲酰乌头原碱的含量增加,新出现了 polyschistine-D, beyzoyldeoxyaconine, 16-*epi*-pyroaconitine, 16-*epi*-pyrodeoxyaconitine 等生品中所不含的生物碱,从结构上分析,这些新增的成分由乌头碱等毒性成分转化而来。**结论:**铁棒锤的炮制减毒原理与乌头碱等有毒成分通过酯键水解和高温热解的方式转化成毒性小的成分有关,不同炮制方法均能够达到减毒的目的。

[关键词] 铁棒锤; 毛茛科; 二萜生物碱; 炮制

铁棒锤为毛茛科乌头属植物铁棒锤 *Aconitum pendulum* Busch. 和伏毛铁棒锤 *A. flavum* Hand.-Mazz. 的干燥块根^[1], 别名雪上一枝蒿、三转半, 是羌医、藏医临床中的常用药物, 性苦、微辛, 热, 剧毒。具有祛风除湿, 止痛, 消肿散瘀的功效, 用于治疗跌打损伤, 风湿。因其有剧毒, 需要炮制后使用, 目前常用的炮制方法有水煮法、蒸制法、砂炒法, 但各种炮制方法缺乏统一规范的炮制标准。铁棒锤中的生物碱类成分既是毒性成分也是有效成分^[2-4], 作者对铁棒锤生品和不同炮制品的生物碱类成分进行了研究, 从生品中分离得到: 去氧乌头碱, 3-乙酰乌头碱, 乌头碱、secoaconitine, *N*-去乙基-去氧乌头碱, *N*-去乙基-3-乙酰乌头碱, 15 α -hydroxyneoline, 8-*O*-acetyl-15 α -hydroxyneoline, neoline, 14-benzoyl-8-*O*-methylaconine、苯甲酰乌头原碱; 从水煮、砂炒炮制品中分离得到: polyschistine-D, beyzoyldeoxyaconine, polyschistine-A, 乌头原碱, 16-*epi*-pyrodeoxyaconitine, 16-*epi*-pyroaconitine 等生品中不含有的生物碱。

本研究采用 HPLC 法和急性毒性试验等方法对铁棒锤炮制前后化学成分和毒性的变化进行比较, 以期初步阐明不同炮制方法的炮制减毒原理, 为建立合理可行的炮制工艺和标准以及临床合理用药提

供一定的理论依据。

1 材料

高效液相色谱仪(岛津 LC-10Avp), SPD-10AV 紫外检测器; N2000 色谱工作站(浙江大学智达信息有限公司); BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司); 上海必能信 CQ-250 型超声波清洗器。

乌头碱, 3-乙酰乌头碱, 去氧乌头碱, polyschistine-D, beyzoyldeoxyaconine, 16-*epi*-pyroaconitine, 16-*epi*-pyrodeoxyaconitine, 苯甲酰乌头原碱均为自制样品, 纯度大于 98%。乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。取铁棒锤生品、水煮炮制品、蒸制炮制品、砂炒炮制品粉碎后, 过 7 号筛, 用蒸馏水按不同浓度稀释后配置, 充分混匀, 放入冰箱中冷藏保存备有。

昆明种小鼠 120 只, 体重 18 ~ 22 g, 雌雄各半, 由四川省医学科学院实验动物研究所提供, 合格证号 SCXK(川)2004-16。

铁棒锤药材于 2008 年 8 月采自青海省贵南县, 海拔 3 660 m, 植物标本经成都中医药大学张艺研究员鉴定为铁棒锤 *A. pendulum*, 凭证标本存放于成都中医药大学民族医药学院标本室。

2 方法与结果

2.1 铁棒锤炮制前后生物碱比较和含量测定

2.1.1 炮制品的制备

水煮炮制品制备: 取铁棒锤生品, 用水浸泡透心, 取出, 加水煮 1 h, 至切开无白心, 口尝微有麻舌感时, 取出, 晾干。砂炒炮制品制备: 将砂置热锅内, 投入铁棒锤, 不断翻动, 至断面呈灰黄色, 取出, 筛去

[收稿日期] 2009-11-04

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BA148B08-6)

[通信作者] * 张艺, 研究员, Tel: (028) 61800160, E-mail: 9006zmy@cdutcm.edu.cn

[作者简介] 王毓杰, 博士, Tel: 13618253896, E-mail: superwangyj@126.com



砂,放凉,即得。蒸制炮制品制备:取铁棒锤生品,放入锅中,蒸 6~8 h,至切开断面无白心,口尝微有麻舌感时,取出,晾干。

2.1.2 色谱条件

Waters X Terra™ RP18 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相(A)乙腈-(B)0.03 mol · L⁻¹碳酸氢铵溶液,浓氨水调 pH 9.5,梯度洗脱:0~10 min, 25%~30% A;10~25 min, 30%~35% A;25~35 min, 35%~42% A;35~45 min, 42%~50% A;45~50 min, 50%~60% A;50~55 min, 60%~65% A;55~60 min, 65%~100% A;60~65 min, 100% A;流速 1 mL · min⁻¹;检测波长 230 nm;柱温 35 °C。在此色谱条件下待测组分可达到基线分离,结果见图 1。

滤过,合并滤液和洗液,低温蒸干,残渣加三氯甲烷 2 mL 溶解,转入分液漏斗,用三氯甲烷 3 mL 洗容器,洗液并入分液漏斗中,用 0.5 mmol · L⁻¹ H₂SO₄ 提 3 次,每次 5 mL;酸液依次用同一三氯甲烷 10 mL 洗涤,合并酸液,加氨试液调 pH 9,再用三氯甲烷提 3 次,每次 10 mL,三氯甲烷液依次用同一水 20 mL 振摇洗涤,合并三氯甲烷液,低温蒸干,残渣加 0.01% 盐酸-甲醇溶解,定容至 5 mL 量瓶中。

2.1.5 线性范围的考察

取乌头碱、去氧乌头碱和 3-乙酰乌头碱对照品适量,精密称定,加 0.01% 盐酸-甲醇制成每 1 mL 含乌头碱 1.15 mg,去氧乌头碱 0.55 mg,3-乙酰乌头碱 0.42 mg,苯甲酰乌头原碱 1.12 mg 的对照品储备液。精密量取该储备液 0.2,0.5,1,2,4 mL 置 10 mL 量瓶中,加 0.01% 盐酸-甲醇至刻度,摇匀,即得。

精密吸取上述对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积,并以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,进行回归分析,计算回归方程,结果见表 1。

表 1 线性关系试验(n=6)

化合物	回归方程	r	线性范围/μg
乌头碱	$Y=1\ 188\ 435X-151\ 979$	1	0.230~11.5
去氧乌头碱	$Y=938\ 105X+33\ 799$	0.999 9	0.110~5.5
3-乙酰乌头碱	$Y=993\ 263X+21\ 219$	0.999 9	0.084~4.2
苯甲酰乌头碱	$Y=1\ 137\ 628X-145\ 940$	1	0.220~11.2

2.1.6 精密度试验

精密吸取对照品溶液 10 μL,按上述色谱条件,连续进样 5 次,测得乌头碱 RSD 0.81%;去氧乌头碱 RSD 0.83%;3-乙酰乌头碱 RSD 0.79%;苯甲酰乌头原碱 RSD 0.80%。

2.1.7 重复性试验

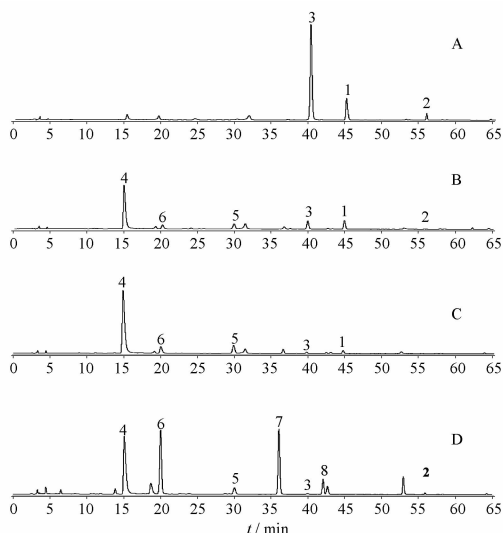
取同一批次生品、水煮炮制品各 5 份,分别制备供试液,按上述色谱条件测定,并计算含量,乌头碱 RSD 1.3%;去氧乌头碱 RSD 1.5%;3-乙酰乌头碱 RSD 1.9%。苯甲酰乌头原碱 RSD 1.5%。

2.1.8 稳定性试验

精密取对照品溶液 10 μL,于 0,1,2,4,8 h 进样,测得乌头碱 RSD 0.62%;去氧乌头碱 RSD 0.76%;3-乙酰乌头 RSD 0.75%;苯甲酰乌头原碱 RSD 0.66%。结果表明,样品供试液在 8 h 内稳定性较好。

2.1.9 加样回收率试验

2.1.9.1 生品回收率 取已知含量的样品(含乌头碱 1.808 mg · g⁻¹,去氧乌头碱 0.417 mg · g⁻¹,3-乙



A. 铁棒锤生品;B. 水煮炮制品;C. 蒸制炮制品;

D. 砂炒炮制品;1. 去氧乌头碱;2. 3-乙酰乌头碱;3. 乌头碱;

4. 苯甲酰乌头原碱;5. polyschistine-D;6. bezyoldeoxyaconine;

7. 16-*epi*-pyroaconitine;8. 16-*epi*-pyroaconitine。

图 1 铁棒锤生品和不同炮制品 HPLC 图

2.1.3 对照品溶液的制备

精密称定对照品,加 0.01% 盐酸-甲醇制成每 1 mL 含乌头碱 0.73 mg、去氧乌头碱 0.22 mg、3-乙酰乌头碱 0.084 mg、苯甲酰乌头碱 0.448 mg 的混合对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备^[5]

取样品粉末(过 7 号筛)2 g,同时加乙醚 60 mL 和氨试液 2 mL,放置过夜,滤过,药渣加乙醚 40 mL,振摇 1 h,滤过,药渣再加乙醚洗 3 次,每次 20 mL,



酰乌头碱 $0.081 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 9份各1g,精密称定,分别精密吸取0.8,1,1.2 mL混合对照品溶液(每毫升含乌头碱1.856 mg,去氧乌头碱0.412 mg,3-乙酰乌头碱0.082 mg)各3份,低温蒸干溶剂,按“供试品溶液制备”项下进行制备,按上述测定方法进行测定,计算回收率,结果见表2。

表2 生品中3种生物碱的加样回收率($n=9$)

名称	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	
乌头碱	1.811 9	1.484 8	3.225 1	95.2	96.2	0.8	
	1.824 4	1.484 8	3.251 2	96.1			
	1.813 9	1.484 8	3.246 1	96.5			
	1.828 4	1.856 0	3.635 6	97.4			
	1.808 9	1.856 0	3.573 4	95.1			
	1.813 2	1.856 0	3.591 1	95.8			
	1.812 7	2.227 2	3.967 3	96.7			
	1.810 9	2.227 2	3.950 3	96.1			
	1.814 3	2.227 2	3.976 7	97.1			
	去氧乌头碱	0.417 9	0.329 6	0.734 1	95.9	96.3	0.9
		0.420 8	0.329 6	0.736 3	95.7		
		0.418 4	0.329 6	0.735 0	96.1		
		0.421 7	0.412 0	0.817 5	96.1		
		0.417 2	0.412 0	0.814 3	96.4		
		0.418 2	0.412 0	0.815 9	96.5		
0.418 1		0.494 4	0.891 5	95.8			
0.417 7		0.494 4	0.890 3	95.6			
0.418 4		0.494 4	0.905 1	98.4			
3-乙酰乌头碱		0.081 2	0.065 6	0.144 3	96.2	96.6	0.7
		0.081 7	0.065 6	0.145 9	97.8		
		0.081 3	0.065 6	0.144 6	96.5		
		0.081 9	0.082 0	0.160 5	95.8		
		0.081 0	0.082 0	0.159 5	95.7		
		0.081 2	0.082 0	0.160 1	96.2		
	0.081 2	0.098 4	0.176 6	96.9			
	0.081 1	0.098 4	0.176 0	96.4			
	0.081 3	0.098 4	0.177 3	97.6			

2.1.9.2 炮制品回收率 取已知含量的样品(含苯甲酰乌头原碱 $0.505 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 9份各1g,精密称定,分别精密吸取0.8,1,1.2 mL混合对照品溶液(每毫升含苯甲酰乌头原碱0.525 mg)各3份,低温蒸干溶剂,按“供试品溶液制备”项下进行制备,按上述测定方法进行测定,计算回收率,结果见表3。

2.1.10 铁棒锤炮制前后生物碱比较和含量测定

取不同铁棒锤生品和炮制品,按拟定的含量测定方法,制备供试品溶液。分别精密吸取定量和定性对照品溶液各10 μL ,生品供试品溶液10 μL ,炮制品供试品溶液20 μL ,注入液相色谱仪,测定,结

表3 炮制品中苯甲酰乌头原碱回收率试验($n=9$)

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.505 1	0.42	0.913 0	97.1	96.6	0.9
0.508 7	0.42	0.910 8	95.7		
0.505 7	0.42	0.911 8	96.7		
0.503 3	0.525	1.006 7	95.9		
0.503 0	0.525	1.005 3	95.7		
0.505 3	0.525	1.015 6	97.2		
0.507 7	0.63	1.126 6	98.2		
0.508 1	0.63	1.116 1	96.5		
0.505 9	0.63	1.110 7	96.0		

果见图1,表4。

表4 样品含量测定($n=2$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品	苯甲酰乌头原碱	乌头碱	去氧乌头碱	3-乙酰乌头碱
生品	0.068	1.809	0.426	0.083
水煮	0.505	0.082	0.085	-
蒸制	0.738	-	-	-
砂炒	0.718	-	-	-

2.2 铁棒锤炮制前后急性毒性试验

2.2.1 试验剂量的选择

从预试验结果可知,生品的 $\text{LD}_{100} = 1.334 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{LD}_0 = 0.457 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。根据 LD_m 和 LD_n 值选择:1.667 6,1.334 1,1.067 3,0.853 8,0.683 1,0.546 5,0.437 2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行试验。蒸制品和砂炒品均测不出 LD_{50} ,故直接测最大给药量。水煮炮制品测最大耐受量。

2.2.2 生品半数致死量(LD_{50})测定

取小鼠70只,雌雄各半,随机分成7组,每组10只,小鼠禁食不禁水12h后。每只小鼠均按 $0.04 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 给药,观察小鼠灌胃相应浓度的样品后14d内出现的中毒反应(包括外观、活动、体重等)和死亡情况,计算出生品的 LD_{50} 。

2.2.3 蒸制炮制品、砂炒炮制品的最大给药量测定

取小鼠30只,雌雄各半,随机分为蒸制品组、砂炒品组和空白组,每组10只,小鼠禁食不禁水12h后。以动物能够接受的最大浓度和最大体积($0.04 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)给予各组小鼠灌胃1次,空白对照组小鼠灌胃给予等体积的蒸馏水。均连续观察14d,记录动物毒性反应,7,14d后测体重。计算出该剂量相当于临床每日推荐用药量的倍数。

2.2.4 水煮炮制品的最大耐受量(LD_0)测定

取小鼠 20 只,雌雄各半,随机分为水煮炮制品组和空白组,每组 10 只,小鼠禁食不禁水 12 h 后。水煮炮制品组按照 $0.04 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 体积给予相应浓度的样品溶液,空白组小鼠给予等体积的纯净水。均连续观察 14 d,记录动物毒性反应,7,14 d 后测体重。计算出该剂量相当于临床每日推荐用药量的倍数。

2.2.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析。

2.2.7 铁棒锤炮制前后毒性比较结果

铁棒锤炮制前后的急性毒性有很大差别:生品 (LD_{50} 为 $0.8262 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于临床人用量的 41 倍)、蒸制炮制品(最大给药量为 $10.1972 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于临床人用量的 509 倍)、水煮炮制品(最大耐受量为 $5.0400 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,相当于临床人用量的 252 倍)、砂炒炮制品(最大给药量为 $16.7798 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,

相当于临床人用量的 838 倍)。表明铁棒锤生品毒性明显,各炮制品均安全性较好。急性毒性由高到低为:生品 > 水煮炮制品 > 蒸制炮制品 > 砂炒炮制品。

3 讨论

从图 1 中可以看出生品与 3 种炮制品的 HPLC 图谱明显不同。水煮炮制品和蒸制炮制品图谱相似,而砂炒炮制品的图谱与前两者均不同。炮制品中乌头碱、去氧乌头碱、3-乙酰乌头碱 3 种毒性较大的生物碱含量降低,苯甲酰乌头原碱的含量明显升高,并且在炮制品中出现 polyschistine-D, beyzoyldeoxyaconine, 16-*epi*-pyroaconitine, 16-*epi*-pyroaconitine 等成分,这些成分由生品中的乌头碱、去氧乌头碱、3-乙酰乌头碱转化而来,提示 3 种炮制方法能够降低药物中毒性成分的含量,其主要生物碱的转化途径见图 2。

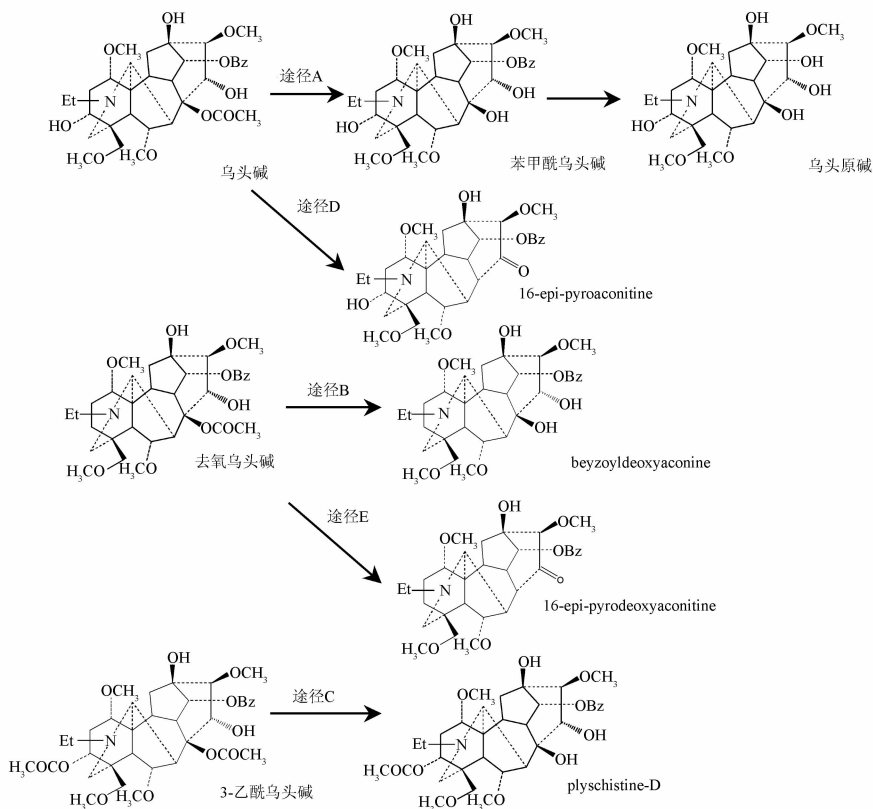


图 2 铁棒锤中主要生物碱转化途径

水煮法和蒸制法的炮制减毒原理是 3 种有毒生物碱通过 C-8 位、C-14 位酯键水解的方式转化成毒性较小的生物碱,如乌头碱转化成苯甲酰乌头原碱、乌

头原碱;去氧乌头碱转化成 beyzoyldeoxyaconine;3-乙酰乌头碱转化成 polyschistine-D,见途径 A,B,C。

砂炒法的炮制减毒原理除了酯键水解的方



式外,还有部分生物碱通过高温热解的方式转化成毒性较小的生物碱,如途径 D 中乌头碱通过 C-8 位脱-OCOCH₃基团, C-15 位的羟基被氧化成羰基的方式转化成 16-*epi*-pyroaconitine; 途径 E 中去氧乌头碱通过同样的方式转化成 16-*epi*-pyrodeoxyaconitine。

酯键水解是公认的乌头碱类生物碱的炮制减毒途径^[6],高温热解方式(乌头碱转化为 16-*epi*-pyroaconitine,去氧乌头碱转化为 16-*epi*-pyrodeoxyaconitine)则是本实验发现的一条新的乌头碱类生物碱减毒途径,也说明了砂炒法中部分生物碱通过高温热解途径同样达到了炮制减毒的目的。

本研究采用化学成分比较和急性毒性试验

相结合的方法,初步阐明铁棒锤不同炮制方法的炮制减毒原理,为建立合理可行的炮制工艺和标准,指导临床安全用药提供了一定的依据。

[参考文献]

- [1] 药典委员会. 卫生部药品标准·藏药[S]. 1995:79.
- [2] 宋东江,陆满文. 去氧乌头碱的抗炎、镇痛和解热作用[J]. 中国药理学通报,1987, 3(3):157.
- [3] 张世忠,吴博威. 乌头碱与钠离子通道激动剂合用对离体大树心脏的正性肌力作用研究[J]. 中国药理学通报,2001,17(5):570.
- [4] 周远鹏,刘文化,曾贵云,等. 乌头碱及其类似物的毒性和对心脏收缩功能的影响[J]. 药学报,1984,19(9):641.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2005:27.
- [6] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:311.

Study on processing principle of *Aconitum pendulum*

WANG Yujie, ZHANG Jing, TIAN Huiping, ZENG Chenjuan, YAO Zhe, ZHANG Yi*
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To study the processing principles of different processed products of *Aconitum pendulum*. **Method:** Using high performance liquid chromatography and acute toxicity test to compare the changes in chemical composition and toxicity of the roots and processed products of *A. pendulum*. **Result:** The main toxic components of the roots of *A. pendulum* were aconitine, deoxyaconitine and 3-acetylaconitine. The contents of these three alkaloids were significantly reduced in processed products, while benzoylaconitine significantly increased. In addition, processed products emerged aconine, polyschistine-D, benzoyldeoxyaconine, 16-*epi*-pyroaconitine and 16-*epi*-pyrodeoxyaconitine. From the structural analysis, these new emerged compounds transformed from the aconitine, deoxyaconitine and 3-acetylaconitine. **Conclusion:** Different processing methods can reduce the toxicity of the roots of *A. pendulum*. Processing principle is ester hydrolysis and high-temperature pyrolysis.

[Key words] *Aconitum pendulum*; Ranunculaceae; diterpene alkaloid; processing

doi: 10.4268/cjcm20100510

[责任编辑 周驰]