

附子-甘草配伍前后汤液中沉积物的化学组分对比研究

章津铭¹, 傅超美¹, 何宇新², 卢君蓉¹, 高飞¹, 王继森³, 廖婉^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137
2. 西华大学生物工程学院, 四川 成都 610039
3. 成都市食品药品检测中心, 四川 成都 610045

摘要: **目的** 研究附子-甘草配伍前后汤液中沉积物的化学组成, 以揭示附子-甘草配伍作用机制。**方法** 采用高效液相-飞行时间质谱(HPLC-TOF-MS)对比分析附子-甘草合煎前后沉积物中 6 种酯型生物碱的量, 借助傅立叶变换红外光谱(FTIR)及二阶光谱指认附子-甘草合煎前后沉积物的结构变化。**结果** 附子配伍甘草合煎过程中, 附子中大量酯型生物碱被甘草成分复合而发生沉积, 沉积物产生的机制初步确定为生物碱中叔胺 N 与甘草羧酸 C=O 发生缔合。**结论** 初步探析了附子-甘草合煎前后汤液中沉积物化学组分, 有助于揭示附子-甘草配伍过程中物质基础变化及配伍作用机制。

关键词: 附子; 甘草; 配伍; 沉积物; 化学组分

中图分类号: R283.21; 286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)02-0000-00

Comparison on chemical components in sediments of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*-*Glycyrrhizae Radix* before and after their compatibility

ZHANG Jin-ming¹, FU Chao-mei¹, HE Yu-xin², LU Jun-rong¹, GAO Fei¹, WANG Ji-sen³, LIAO Wan¹

1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Bio-Engineering College, Xihua University, Chengdu 610039, China
3. Food and Drug Testing Center of Chengdu, Chengdu 610045, China

Abstract: **Objective** To study the chemical components in the sediments of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (ALRP)-*Glycyrrhizae Radix* (GR) before and after their compatibility and to reveal the mechanism. **Methods** The contents of six ester alkaloids in the sediments of single ALRP and ALRP-GR compatibility were compared simultaneously using HPLC-TOF-MS method, and the structural changes of the sediments in single ALRP and ALRP-GR compatibility were identified using FTIR and second-derivative spectra. **Results** The sediments in ALRP-GR compatibility would be produced by the association reaction between tertiary amine of alkaloids and carboxyl of compounds in GR. **Conclusion** In this paper, the chemical information of sediments in single ALRP and ALRP-GR compatibility is preliminarily investigated, which would be beneficial to uncovering the material basis changes and compatibility mechanism of ALRP and GR.

Key words: *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; *Glycyrrhizae Radix*; compatibility; sediments; chemical components

附子 (*Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, ALRP) 为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品^[1], 被誉为乱世之良将, 回阳救逆之第一品。附子效峻猛而毒性极大, 历代医家多依据七情配伍之“相畏/相杀”, 配伍甘草 (*Glycyrrhizae Radix*, GR) 减毒增效。附子-甘草 (ALRP-GR) 为中医药常用药对, 组成了诸多名方^[2]如四逆汤、附子甘草汤等, 近年来引起药学工作

者极大关注, 并对其配伍机制进行了大量研究^[3-6], 但仍未能较好诠释两者配伍“毒解而效不减”的作用机制。笔者前期研究发现附甘合煎浑浊汤液静置后出现大量沉积物, 且该沉积物中含生物碱成分, 而近年来有研究者发现^[7-8], 部分药对如黄芩-黄连合煎产生的沉淀影响药物效应, 故对附子-甘草合煎液沉积物的研究可能有助于探析两者配伍物质基础作用机制。

收稿日期: 2012-06-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81073070)

作者简介: 章津铭 (1987—), 男, 四川内江人, 中药药剂学专业在读硕士研究生, 研究方向为中药新制剂。

Tel: 13540759605 E-mail: zhangjinming1987@126.com

*通讯作者 廖婉 E-mail: 22357393@qq.com

傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 指纹特征性强, 且可以反映样品的整体信息, 近年来在中药材品质品种鉴别以及制剂等质控过程中发挥着重要作用^[9-10]。同时现代研究表明, 酯型生物碱为附子毒(效)成分^[11], 故本实验拟采用高效液相-飞行时间质谱 (HPLC-TOF-MS) 对比研究附子-甘草合煎前后汤液沉积物中酯型生物碱的量, 并采用 FTIR 宏观表征附子-甘草配伍前后沉积物的结构信息, 以期探索附子-甘草配伍过程中物质基础成分形态转化与“减毒增效”配伍作用的相关性, 目前还暂未见对附子-甘草配伍所产生沉积物的相关研究。

Spectrum GX 傅里叶变换红外光谱仪 (Perkin Elmer 公司), DTGS 检测器; Agilent 1200 系列 HPLC 高效液相色谱仪 (在线真空脱气机-低压二元梯度泵-自动进样器-柱温箱); Bruker Micro QII-TOF (四级杆-飞行时间质谱); Anke TGL-16G 离心机; Mettler AE240 十万分之一电子分析天平 (德国 Mettler 公司)。

生附片 (批号 1002015) 购自四川新荷花中药饮片有限公司, 炙甘草 (批号 110521) 购自科伦天然药业有限公司, 经成都中医药大学卢先明教授鉴定, 分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎的炮制品 (蜜炙品); 乌头碱对照品 (批号 110720-200409)、次乌头碱对照品 (批号 110798-200405)、新乌头碱对照品 (批号 110720-200414) 购自中国药品生物制品检定所, 质量分数均大于 98%; 苯甲酰乌头原碱 (批号 MUST-11050501)、苯甲酰新乌头原碱 (批号 MUST-11050502)、苯甲酰次乌头原碱 (批号 MUST-11050503) 购自成都曼斯特生物科技有限公司, 实测质量分数均大于 98%; 乙腈、甲酸色谱纯 (Fisher 公司); 试验用水为去离子水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 附子单煎液沉积物制备 取生附片 50 g 置于圆底烧瓶, 加 15 倍量水, 浸泡 30 min, 加热回流煎煮, 大火煮沸后保持微沸 30 min, 趁热滤除药渣, 将药液静置至室温后, 即可见汤液底部出现大量沉积物, 将其离心 10 min (4 000 r/min), 去上清; 加入少量水快速洗涤, 离心而去上清, 重复洗涤两次, 收集得附子单煎液沉积物, 采用冷冻干燥法, 将其沉积物干燥成浸膏粉末。

2.1.2 甘草单煎液沉积物制备 取炙甘草 50 g 置于圆底烧瓶, 其余操作同“2.1.1”项。

2.1.3 附子-甘草合煎沉积物制备 取生附片、炙甘草共 100 g (1:1), 置于同一圆底烧瓶中, 加入 800 mL 水 (其中 50 mL 用于补足甘草吸水量), 其余操作同“2.1.1”项。

将以上 3 种样品分别研磨成粉状, 过 200 目筛备用, 用以 FTIR 测定。

2.1.4 混合对照品溶液的制备 取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱对照品适量, 精密称定, 加入二氯甲烷-异丙醇 (1:1) 混合溶液定容, 即得含 6 种酯型生物碱的混合对照品储备液, 其中含苯甲酰新乌头原碱 171.5 $\mu\text{g/mL}$ 、苯甲酰乌头原碱 108.1 $\mu\text{g/mL}$ 、苯甲酰次乌头原碱 85.5 $\mu\text{g/mL}$ 、新乌头碱 63.7 $\mu\text{g/mL}$ 、次乌头碱 465.1 $\mu\text{g/mL}$ 、乌头碱 78.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

分别吸取混合对照品储备液 1、4、8、12、16、25 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加入二氯甲烷-异丙醇 (1:1) 混合溶液稀释至刻度, 即得不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

2.1.5 供试品溶液的制备 分别称取上述生附片单煎及附子-甘草合煎沉积物 0.1 g, 置于 1 mL 量瓶中, 加入 100 μL 盐酸将沉积物溶解, 甲醇定容, 0.22 μm 滤膜滤过, 供酯型生物碱定量测定用。

2.2 HPLC-TOF-MS 的对比分析

2.2.1 分析条件

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 柱 (100 mm \times 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为 5 mmol/L 醋酸铵 (含 0.1% 醋酸) (A) - 乙腈 (含 0.1% 甲酸) (B), 进行梯度洗脱: 0~20 min, 80%~60% A; 20~40 min, 60%~55% A; 体积流量 0.4 L/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

(2) 质谱条件: 电喷雾离子化源 (ESI), 离子源电压为 4 500 V, 干燥气体积流量 6 L/min; 雾化气压力为 200 kPa; 干燥气温度为 180 $^{\circ}\text{C}$; 质谱扫描范围 m/z 150~1 000, 正离子模式采集。

2.2.2 线性关系考察 取上述不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 分别进样 10 μL , 按 HPLC-TOF-MS 分析条件测定, 以进样质量浓度 (C , $\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 峰面积积分值 (A) 为纵坐标, 进行线性回归, 结果见表 1。

2.2.2 方法学考察 以附子-甘草合煎供试品溶液为

表 1 线性关系考察试验结果
Table 1 Results of linear relationship test

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (mg·mL ⁻¹)
苯甲酰新乌头原碱	$Y=359\,004\,X-3\,913.4$	0.999 5	0.068 6~1.715
苯甲酰乌头原碱	$Y=422\,169\,X+2\,578.4$	0.999 8	0.043 2~1.081
苯甲酰次乌头原碱	$Y=372\,753\,X-1\,221$	0.999 8	0.034 2~0.855
新乌头碱	$Y=528\,249\,X+784.6$	0.999 9	0.025 5~0.638
次乌头碱	$Y=336\,731\,X+559.34$	0.999 6	0.186 0~4.653
乌头碱	$Y=421\,762\,X-2\,097$	0.999 3	0.031 4~0.785

代表, 进行方法学考察。

(1) 精密度考察: 取混合对照品储备液, 连续进样 6 次, 进样 10 μL, 依法测定, 记录峰面积, 结果 6 种酯型生物碱 (依次为苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱) 的 RSD 分别为 0.43%、0.55%、0.46%、0.63%、0.75%、0.69%, 表明仪器精密度良好。

(2) 稳定性考察: 取附子-甘草合煎液沉积物供试品溶液分别于室温下 0、2、4、8、12、16 h, 进样 10 μL, 依法测定, 记录峰面积, 结果 6 种酯型生物碱的 RSD 分别为 0.79%、1.14%、0.74%、0.88%、1.16%、1.26%, 表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

(3) 重复性考察: 按照上述供试品制备方法, 平行制备附子-甘草合煎液沉积物样品 6 份, 进样 10 μL, 依法测定, 记录峰面积, 结果 6 种酯型生物碱的 RSD 分别为 1.75%、1.69%、2.54%、2.79%、2.48%、2.74%, 表明该方法重复性较好。

(4) 加样回收率考察: 取已测定的附子-甘草合煎液沉积物供试品溶液样品 6 份, 每份 10 mL, 分别加入相等量的 6 种混合对照品, 进样 10 μL, 依法测定, 结果 6 种酯型生物碱的平均加样回收率分别为 94.65%、95.26%、102.67%、103.21%、95.36%、96.97%, RSD 分别为 2.46%、3.23%、2.84%、2.18%、1.96%、2.48%。

2.2.3 附子配伍甘草前后汤液沉积物中双酯型生物碱量对比分析 按上述分析条件, 分别测定生附片

单煎、附子-甘草合煎液沉积物中 6 种酯型生物碱的量, 结果见图 1, 表 3。由表 3 结果可知, 附子-甘草配伍前后沉积物中均含有一定量酯型生物碱, 但生附片单煎液沉积物中酯型生物碱尤其是双酯型生物碱较少, 其中乌头碱的量最低, 在该煎煮条件下未能检出; 而附子-甘草合煎所得沉积物中酯型生物碱较多。

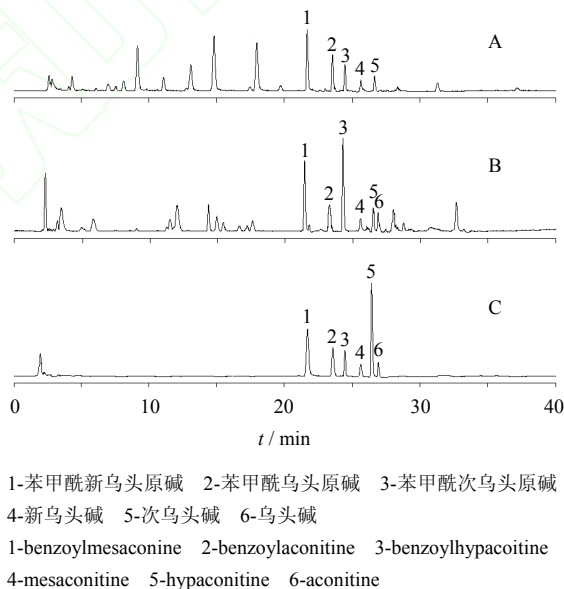


图 1 生附片单煎液 (A) 和附子-甘草合煎液 (B) 沉积物以及混合对照品 (C) 的 HPLC-MS 分析图

Fig. 1 HPLC-MS chromatograms of sediment samples of ALRP single decoction (A), ALRP-GR codecoction (B), and mixed reference substances (C)

表 3 HPLC-MS 对比分析附子配伍甘草前后沉积物中酯型生物碱测定结果
Table 3 HPLC-MS analysis on ester alkaloids in sediments of ALRP-GR before and after compatibility

样 品	质量分数 / (μg·g ⁻¹)					
	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
附子单煎	49.46	31.45	24.63	8.29	28.49	—
附子-甘草合煎	119.12	61.63	101.23	32.15	64.42	45.76

2.3 FTIR 的对比研究

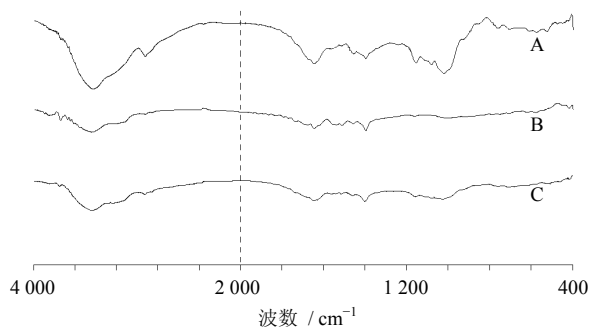
2.3.1 分析条件 光谱范围为 $4\,000\sim400\text{ cm}^{-1}$, 扫描信号累加 16 次, 分辨率 4 cm^{-1} , OPD 速度 $0.2\text{ cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; 扫描时实时扣除水和 CO_2 的干扰。将样品粉未经充分研磨后, 采用 KBr 压片法, 在室温下获得各样品的一维红外谱图, 每个样品均重复 6 次。

2.3.2 方法学考察 以生附片单煎液沉积物样品为代表, 进行方法学考察。将该样品连续扫描 6 次考察其精密度, 将所得到的谱图进行相似度比较, 相关系数分别为 0.999、1.040、1.000、1.020、0.989、0.998, 表明仪器具有较好的精密度; 将该样品按相同制备方法重复压片 6 次, 相关系数分别为 1.055、0.998、0.998、0.995、0.999、1.072, 表明方法具有良好的重现性; 将该样品放入干燥器内, 每隔 1 h 测定一次, 6 h 谱图间相关系数分别为 1.037、0.999、0.997、0.996、0.999、0.989, 表明该样品具有较好的稳定性。

2.3.3 数据处理 一维红外图谱采用 Pekin Elmer 公司的 Spectrum for window 软件获得; 二阶导数谱和消噪处理采用 Perkin-Elmer 公司的 Spectrum v3.02 操作软件获得 (13 点平滑); 相似度比较采用 Pekin Elmer 公司的定性分析软件——Compare 对比软件。

2.3.4 附子配伍甘草前后汤液沉积物红外光谱对比分析 将生附片单煎、炙甘草单煎、附子-甘草合煎沉淀物的红外谱图进行对比, 结果见图 2。由图 2 可见, 附子-甘草合煎沉积物的红外曲线与生附片单煎、炙甘草单煎沉积物的红外曲线有很大的差别, 说明合煎沉积物并非是附子沉积物与甘草沉积物的简单加和。附子单煎沉淀物中含酯型生物碱, $\nu_{\text{O-H}}$ 、 $\nu_{\text{C=O}}$ 、苯环的 $\nu_{\text{C=C}}$ 等是其特征吸收峰, 表现在谱图上位于 $\sim 3\,450$ 、 $1\,649$ 、 $1\,607$ 、 $1\,582$ 、 $1\,510\text{ cm}^{-1}$ 处。 $\nu_{\text{C=O}}$ 位于低频处, 提示其形成共轭体系, 产生共轭效应。此外, 还有 $\nu_{\text{C-O}}$ 位于 $\sim 1\,162\text{ cm}^{-1}$ 处, $\nu_{\text{C-H}}$ 由于与 O 相连, 于 $\sim 2\,900\text{ cm}^{-1}$ 处形成一宽峰, 在 $\sim 1\,443$ 、 $1\,378\text{ cm}^{-1}$ 也有吸收。炙甘草单煎沉积物中主要含有甘草皂苷和甘草黄酮类成分, 含有大量的 $\nu_{\text{O-H}}$ 和 $\nu_{\text{C=O}}$, 在谱图的 $\sim 3\,445$ 、 $1\,710\text{ cm}^{-1}$ 处有吸收。而在合煎沉积物中可观察到 $\nu_{\text{C=O}}$ 吸收峰向高频方向移动, 反映了合煎沉积物的形成过程发生了生物碱与甘草酸中羧酸基团的缔合反应。

3.3.5 附子配伍甘草前后汤液沉积物红外二阶导数光谱对比分析 为对合煎沉积物的红外谱图与单煎



A-生附片单煎沉积物样品 B-炙甘草单煎沉积物样品 C-附子-甘草合煎沉积物样品 图 3 同

A-sediment of raw *Radix Aconiti Lateralis* decoction B-sediment of roasted GR single decoction C-sediment of ALRP-GR decoction same as Fig. 3

图 2 附子-甘草配伍前后沉积物红外扫描结果对比
Fig. 2 Infrared scanning analysis on sediments of ALRP-GR before and after compatibility

生附片和炙甘草沉淀物的红外谱图进行进一步比较, 对 FTIR 谱图进行了二阶求导, 以获得更高的分辨率, 结果见图 3。由图 3 可见, 在 $1\,400\sim1\,200\text{ cm}^{-1}$ 处, 合煎沉淀物的红外谱图与生附片单煎、炙甘草单煎沉淀物红外谱图的物理加和形式具有明显的区别。 $1\,350\sim1\,260\text{ cm}^{-1}$ 是叔胺的特征吸收区, 附子-甘草合煎沉积物二阶导数图谱显示此段出现的中等强度的吸收峰改变, 可指认为缔合反应发生在叔胺处。在 $1\,200\sim1\,000\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\nu_{\text{C-O}}$ 区, 合煎沉淀与生附片中的 $\nu_{\text{C-O}}$ 区也存在明显的差异, 提示与 C-O 连接的基团不相同。

3 讨论

在试验过程中, 笔者观察到附子-甘草配伍合煎所得汤液浑浊, 静置冷却后出现明显的分层, 汤液底部出现大量沉积物。前期对附子-甘草合煎前后汤液上清液中酯型生物碱测定结果表明, 附子配伍甘草前后汤液上清液中酯型生物碱的量较整体汤液酯

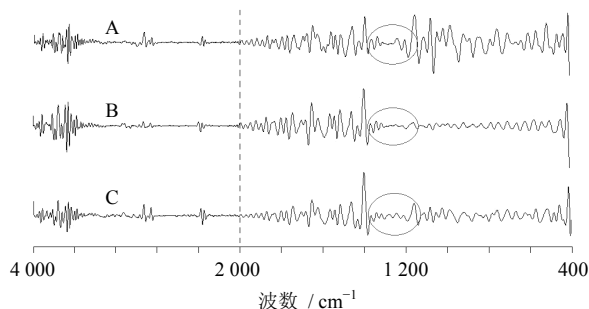


图 3 附子-甘草配伍前后沉积物红外二阶求导结果对比
Fig. 3 Second-order derivation analysis on sediments of ALRP-GR before and after compatibility

型生物碱降低较多,而对沉积物的药理实验显示其具有一定的药理效应。根据中药汤液的混相体系特性,笔者认为附子-甘草合煎液中酯型生物碱存在多种形态,上清液中酯型生物碱多为游离态存在,而沉积物中多为结合态存在。由此表明,附子-甘草合煎所产生的沉积物是汤液中有效物质基础不同存在形式。附子-甘草配伍属于“酸碱对药”,已有研究表明乌头碱和甘草酸成分在煎煮过程中可发生复合^[12],故笔者推测附子-甘草合煎液中沉积物是由于附子中生物碱与甘草中皂苷、黄酮等酸性成分发生复合,溶解度减小逐渐沉淀而产生。

本实验利用红外光谱技术的宏观指纹特性与中医整体观理论相结合,对附子-甘草配伍前后沉积物基团组成进行对比分析。结果表明,附子-甘草合煎沉积物的形成与附子与甘草等化学成分间相互作用相关:该沉积物与生附片沉积物红外光谱相比,其吸收峰位置的改变主要出现在生物碱叔胺的特征吸收区 $1\ 350\sim 1\ 260\text{ cm}^{-1}$,说明沉积物的形成与附子生物碱叔胺结构基团结合相关;而该沉积物与炙甘草单煎沉积物红外光谱相比,其吸收峰位置的改变主要出现在 $\nu_{\text{C=O}}$ 吸收峰的高频移动,说明沉积物的形成与甘草羧基结合相关。该结果与已有研究报道的乌头碱N原子与甘草酸结构中糖链的第二个葡萄糖醛酸上羧基发生缔合反应结果相吻合^[13]。

附子-甘草合煎前后沉积物的红外光谱对比可以体现中药物质基础的整体变化,有利于从整体上加以认识和综合考虑成分之间相互作用和影响,更符合中药复方特点。同时该方法避免了以单一指标成分反映复方配伍作用的局限性,从复方配伍的动态性、模糊性的角度进行附子-甘草配伍规律的研究,为中药配伍理论和药物相互作用机制研究提供新的思路。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 鲍捷. 基于古今药方纵横的附子减毒增效配伍规律研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2007.
- [3] 王亨, 徐墩海. 附子甘草配伍研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1332-1334.
- [4] 杨洁红, 张宇燕, 万海同, 等. 附子生物碱与甘草活性物质组合抗大鼠佐剂性关节炎的实验研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 439-444.
- [5] 章津铭, 傅超美, 秦素红, 等. LC-MS/MS 比较研究附子配伍甘草对大鼠体内次乌头碱药动学影响 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2011, 13(6): 1048-1053.
- [6] 沈红, 朱玲英, 姚楠, 等. 甘草与附子配伍对乌头碱、新乌头碱、次乌头碱大鼠药动学的影响 [J]. 中药材, 2011, 34(6): 937-942.
- [7] 李建荣, 左风, 张磊, 等. 泻心汤沉淀物代谢产物的研究 I [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1673-1676.
- [8] 邓江, 杜方麓. 含小檗碱的中药与甘草煎煮过程中的化学变化——小檗碱与甘草酸的沉淀反应机理研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2007.
- [9] 武彦文, 孙素琴, 肖小河, 等. 黄连-吴茱萸药对不同配伍方式的红外光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(7): 1797-1800.
- [10] 沈亮, 蒋舜媛, 黄荣韶, 等. 红外光谱法结合系统聚类和 SIMCA 模式识别法快速鉴别羌活种子 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2114-2118.
- [11] 王瑞, 乔延江. 附子质量评价及乌头碱类成分药动学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [12] 徐姗姗, 陈长勋, 高建平. 甘草与附子配伍减毒的有效成分及作用环节研究 [J]. 中成药, 2006, 28(4): 526-530.
- [13] 裴妙荣, 宣春生, 段秀俊, 等. 酸碱对药所含酸性成分共煎形成复合物的结构研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3054-3059.