

生川乌配伍白芍、白及反药组合在大鼠血中移行成分的研究

许妍妍¹, 杜俊¹, 郭雪君¹, 吴环宇², 李遇伯¹, 张艳军^{3*}

1. 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

3. 天津中医药大学 天津市省部共建现代中药国家重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 鉴定生川乌配伍白芍、白及的入血成分, 比较配伍前后血中移行成分的变化特征。方法 大鼠 ig 给予生川乌配伍白芍、白及提取物, 收集血浆样品并采用 UPLC-QTOF/MS 法鉴定入血成分, 由半定量分析比较配伍前后血中移行成分的变化。结果 检测配伍组 20 个成分, 均为来自于生川乌的原形成分, 配伍组中双酯型生物碱的相对质量分数均显著降低, 单酯型生物碱中苯甲酰乌头原碱的相对质量分数显著降低, 醇胺型生物碱中宋果灵的相对质量分数显著降低, 其他没有显著性变化。结论 生川乌配伍白芍、白及能够改变其血中移行成分的体内过程。

关键词: 川乌; 白芍; 白及; 配伍; 移行成分; UPLC-QTOF/MS

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)04-0562-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.04.003

Absorbed constituents in rat plasma after administered crude *Aconiti Radix* in compatibility with *Ampelopsis Radix* or *Bletillae Rhizoma*

XU Yan-yan¹, DU Jun¹, GUO Xue-jun¹, WU Huan-yu², LI Yu-bo¹, ZHANG Yan-jun³

1. College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

3. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To identify the absorbed constituents in rat plasma after administered crude *Aconiti Radix* in compatibility with *Ampelopsis Radix* or *Bletillae Rhizoma*, and to compare changes of the absorbed constituents in plasma before and after compatibility. **Methods** Rats were given extract of crude *Aconiti Radix* in compatibility with *Ampelopsis Radix* or *Bletillae Rhizoma* by intragastric administration, and the plasma samples were collected and analyzed by UPLC-QTOF/MS method. Changes of the migrating components in rat plasma before and after compatibility were compared by semi-quantitative analysis. **Results** Twenty kinds of components were detected in rat plasma, which were all prototype components from *Aconiti Radix*. After compatibility, the contents of diester-type alkaloids were significantly decreased, and the contents of benzoyleaconitine (monoester-type alkaloid) and songorine (alcohol amine-type alkaloid) were significantly decreased, but there were no significant changes in other components. **Conclusion** Compatibility of *Aconiti Radix* with *Ampelopsis Radix* or *Bletillae Rhizoma* could change the *in vivo* process of absorbed constituents in plasma.

Key words: *Aconiti Radix*; *Ampelopsis Radix*; *Bletillae Rhizoma*; compatibility; absorbed constituents; UPLC-QTOF/MS

川乌-白芍、川乌-白及均为“十八反”中“半蒺藜及攻乌”的相反药对,《中国药典》2015 年版规定其不宜同用^[1],但临床应用不乏反药配伍治疗某些疑难病症的例证,如由川乌-白芍治疗跌打

损伤、风湿痹症等^[2],因此川乌-白芍、川乌-白及反药组合配伍禁忌的科学性仍存争议。本课题组对川乌-白芍、川乌-白及反药组合进行了药效毒理及体外化学物质基础的研究^[3-7],但其体内作用物

收稿日期: 2016-11-09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2011CB505300, 2011CB505302); 天津市高等学校科技发展基金计划项目(20140208)

作者简介: 许妍妍,女,讲师,主要从事中药分析与药动学研究。E-mail: xytytjtc@163.com

*通信作者 张艳军,博士生导师,主要从事中药药理学研究。E-mail: zyjsunye@163.com

质基础尚不明确。根据“血清药理学”和“血清药物化学”理论^[8], 中药只有被吸收入血的成分才能发挥药效作用, 才能真实反映中药在体内的变化过程, 因此利用中药血清药物化学的研究思路分析川乌-白芷、川乌-白及的入血成分, 对阐释其体内作用物质基础和作用机制具有重要意义。本实验以生川乌-白芷、生川乌-白及反药组合为对象进行血中移行成分研究, 采用 UPLC-QTOF/MS 分析技术, 分别建立大鼠 ig 生川乌-白芷、生川乌-白及的单味药及反药组合的血浆指纹图谱, 鉴定入血成分, 并进行半定量分析, 比较配伍前后血中移行成分的变化特征, 为揭示其体内直接作用物质和阐明其配伍原理提供科学依据。

1 材料和仪器

1.1 实验仪器

Xevo G2 型超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用仪(美国 Waters 公司), 3-18K 冷冻干燥离心机(美国 Sigma 公司), XW-80A 旋涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂), HAC-I 自动浓缩氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司)。

1.2 药材与试剂

川乌购自中国药材总公司, 白芷、白及购自北京华邈中药工程技术开发中心, 均经天津中医药大学李天祥教授鉴定, 分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 干燥母根、葡萄科白芷 *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino 块根、兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 干燥块茎。

甲醇(色谱级, Fisher 公司), 超纯水(杭州娃哈哈集团有限公司), 亮氨酸-脑啡肽(Sigma 公司), 其他均为分析纯。乌头碱、中乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰中乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、尼奥灵、附子灵、塔拉萨敏、查斯曼宁碱对照品(质量分数均 $\geq 98\%$, 批号分别为 X-011-130402、W-006-130421、C-023-130402、B-010-120416、B-009-130416、B-016-130416、N-019-130626、F-019-140228、T-008-130820、C-057-130522), 内标盐酸丁螺环酮(质量分数均 $\geq 98\%$, 批号 101059-201101)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

1.3 实验动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量(230 $\pm$ 20) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司。实验动物许可证编号 SCXK 京 409-6004。饲养于天津中医药大学实验动物中心, 其设施符合《中华人民共和国卫生

部实验动物环境设施标准》二级标准, 自由饮食、饮水, 适应性饲养 1 周后开始实验。

2 方法与结果

2.1 色谱质谱条件

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相: 水(含 0.1%甲酸)(A)-乙腈(含 0.1%甲酸)(B), 梯度洗脱: 0~2 min, 10% B; 2~7 min, 10%~15% B; 7~15 min, 15%~30% B; 15~21 min, 30%~39% B; 21~25 min, 39%~50% B; 25~26 min, 50%~99% B; 26~30 min, 99% B; 30~30.5 min, 99%~10% B; 30.5~40 min, 10% B; 体积流量: 0.3 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

质谱条件: 采用电喷雾离子源(ESI)正离子扫描模式, 质量扫描范围为 m/z 175~1 000, 毛细管电压 3 kV, 雾化气压力 241 kPa, 氮气作为干燥气体, 干燥气流量 800 L/h, 干燥气温度 350 $^{\circ}$ C, 锥孔电压 45 V, 校正离子为 m/z [M+H]⁺ 556.27 亮氨酸-脑啡肽, 测定样品前采用混标调谐液校准质量轴。

2.2 样品溶液的制备

称取生川乌、白芷、白及药材, 置于圆底烧瓶中, 分别以生川乌与白芷、白及质量比 1:0、1:1、0:1 混合均匀, 加入 10 倍量水浸泡 30 min, 水浴加热 1 h(微沸), 静置 10 min, 8 层纱布滤过, 合并滤液; 残渣加入 8 倍量水, 水浴加热 1 h, 静置 10 min, 8 层纱布滤过, 合并滤液; 旋蒸浓缩至半流动状态, 得提取浸膏, 最终配伍组以生川乌药材计, 白芷组以白芷生药计, 白及组以白及生药计质量浓度均约为 1.0 g/mL。

2.3 动物给药与采血

36 只 SD 大鼠, 随机分为 6 组, 每组 6 只, 分别为对照组、生川乌组、白芷组、生川乌-白芷组、白及组、生川乌-白及组, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。分别 ig 药液 10 g/kg(以生川乌计), 早晚各 1 次, 连续给药 2 d, 于第 3 天早晨给药 1 h 后腹主动脉取血 3 mL, 肝素抗凝, 13 000 r/min 离心取上清液, -80 $^{\circ}$ C 保存待用。

2.4 生物样品的预处理

取血浆 1 mL, 加入 100 μ L 丁螺环酮(10 ng/mL), 加入 3 倍体积乙腈(含 0.1%冰醋酸), 涡旋混匀 3 min, 4 $^{\circ}$ C 条件下 13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液于 40 $^{\circ}$ C 温和 N₂ 流吹干, 100 μ L 甲醇-水(1:1)复溶, 涡旋振荡 1 min 后, 4 $^{\circ}$ C 条件下 13 000

r/min 离心 5 min, 取 10 μ L 上清液进样分析。

2.5 入血成分的鉴定

将各组给药血浆、空白血浆及中药提取液进样分析, 获得提取离子色谱图。通过 MasslynxV4.1 进行峰提取, 先将给药后血浆与空白血浆对比扣除基质干扰, 再与提取液比较寻找入血成分, 借助数据后处理技术去除背景噪音, 分析各色谱峰保留时间、

分子离子峰、碎片峰, 并与对照品比对以及文献对照^[9-11], 在生川乌、生川乌-白蒺、生川乌-白及给药血浆中鉴定了 20 个入血成分, 均为来自于生川乌的原形成分, 结构属于乌头碱型二萜类生物碱, 包括双酯型 (DDA)、单酯型 (MDA)、醇胺型 (ADA) 生物碱, 未检测到白蒺、白及中的入血成分, 见表 1。

表 1 生川乌、生川乌-白蒺/白及提取液给药后大鼠血浆移行成分的鉴定

Table 1 Identification of absorbed constituents in rat plasma after administered crude *Aconiti Radix* in compatibility with *Radix ampelopsis* or *Rhizoma bletillae*

峰号	保留时间/min	[M+H] ⁺ /m/z	分子式	化合物名称	类型
1	16.39	632.308 1	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	中乌头碱	DDA
2	17.85	616.312 7	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	次乌头碱	DDA
3	17.93	646.322 7	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	乌头碱	DDA
4	19.59	630.328 1	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₀	脱氧乌头碱	DDA
5	14.15	602.296 3	C ₃₂ H ₄₂ NO ₁₀	去甲基次乌头碱	DDA
6	12.07	590.297 9	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	苯甲酰中乌头原碱	MDA
7	13.87	574.302 7	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	苯甲酰次乌头原碱	MDA
8	13.12	604.311 5	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀	苯甲酰乌头原碱	MDA
9	9.46	606.291 0	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₁	10-羟基苯甲酰中乌头原碱	MDA
10	3.75	454.280 2	C ₂₄ H ₃₉ NO ₇	附子灵	ADA
11	4.40	438.284 9	C ₂₄ H ₃₉ NO ₆	尼奥灵	ADA
12	5.91	422.290 1	C ₂₄ H ₃₉ NO ₅	塔拉地萨敏	ADA
13	7.66	452.300 9	C ₂₅ H ₄₁ NO ₆	查斯曼宁碱	ADA
14	3.62	424.270 0	C ₂₃ H ₃₇ NO ₆	去甲基尼奥灵	ADA
15	1.66	486.269 7	C ₂₄ H ₃₉ NO ₉	中乌头原碱	ADA
16	2.15	408.275 0	C ₂₃ H ₃₇ NO ₅	异塔拉地萨敏	ADA
17	2.57	358.236 5	C ₂₂ H ₃₁ NO ₃	宋果灵	ADA
18	9.12	464.300 8	C ₂₆ H ₄₁ NO ₆	14-乙酰塔拉地萨敏	ADA
19	2.97	406.354 6	C ₂₃ H ₃₅ NO ₅	demethyl-14-acetylkarakoline	ADA
20	2.29	454.281 4	C ₂₄ H ₃₉ NO ₇	去甲氧基脱氧乌头原碱	ADA

2.6 移行成分的变化规律

以入血成分的峰面积与内标的峰面积之比表示化合物的相对质量分数, 比较配伍前后血浆移行成分的变化规律, 见表 2。可见生川乌配伍白蒺后, 入血成分中毒性较大的双酯型生物碱相对质量分数显著降低, 单酯型生物碱中苯甲酰乌头原碱相对质量分数显著降低, 其他变化不显著, 毒性较小的醇胺型生物碱中宋果灵相对质量分数显著降低, 14-

乙酰塔拉地萨敏相对质量分数显著增加, 其他变化不显著; 生川乌配伍白及后, 入血成分中毒性较大的双酯型生物碱相对质量分数显著降低, 单酯型生物碱中苯甲酰乌头原碱、苯甲酰中乌头原碱相对质量分数显著降低, 其他变化不显著, 毒性较小的醇胺型生物碱中 demethyl-14-acetylkarakoline、宋果灵、附子灵的相对质量分数显著降低, 其他变化不显著。

表 2 生川乌与白蒺、白及配伍前后大鼠血浆入血成分的相对质量分数

Table 2 Relative contents of absorbed constituents in rat plasma after administered crude *Aconiti Radix* in compatibility with *Radix ampelopsis* or *Rhizoma bletillae*

序号	化合物	相对质量分数		
		生川乌	生川乌 - 白蒺	生川乌 - 白及
1	中乌头碱	3.73±0.83	0.91±0.27*	1.05±0.50*
2	次乌头碱	33.82±11.89	12.09±7.22*	11.97±1.74*
3	乌头碱	3.07±0.58	0.73±0.34*	1.25±0.16*
4	脱氧乌头碱	14.44±2.61	7.54±1.32*	5.84±1.24*
5	去甲基次乌头碱	4.52±1.33	2.77±2.05*	2.34±2.52*
6	苯甲酰中乌头原碱	2.76±0.47	2.28±0.31	1.54±0.48**
7	苯甲酰次乌头原碱	0.75±0.08	0.92±0.07	1.14±0.43
8	苯甲酰乌头原碱	0.35±0.03	0.24±0.03*	0.28±0.11*
9	10-羟基苯甲酰中乌头原碱	0.33±0.12	0.38±0.08	0.20±0.06
10	附子灵	3.94±0.95	3.19±0.53	2.01±0.35*
11	尼奥灵	15.03±7.77	8.18±3.32	2.72±0.29
12	塔拉地萨敏	3.95±1.48	6.06±2.49	2.43±0.47
13	查斯曼宁碱	3.24±0.56	3.54±0.53	4.45±0.67
14	去甲基尼奥灵	4.46±1.67	4.16±1.40	3.27±1.65
15	中乌头原碱	3.15±0.99	2.85±0.40	2.71±1.78
16	异塔拉地萨敏	2.92±1.22	4.87±0.70	1.45±0.26
17	宋果灵	13.16±7.70	0.40±0.00*	0.40±0.00*
18	14-乙酰塔拉地萨敏	5.60±1.33	11.83±2.05*	8.54±2.52
19	demethyl-14-acetylkarakoline	0.77±0.20	1.30±0.28	0.26±0.06**
20	去甲氧基脱氧乌头原碱	1.76±0.67	1.77±0.27	1.64±1.30

与生川乌组相比: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs crude *Aconiti Radix* group

3 讨论

随着分析技术的发展,高灵敏度的 UPLC-QTOF/MS 检测手段越来越多地应用到中药复杂成分的分析及血中化学成分的研究^[12-13]。本实验采用 UPLC-QTOF/MS 技术系统分析生川乌 - 白蒺、生川乌 - 白及的入血成分及其变化,对比配伍前后的血浆指纹图谱,鉴定入血成分并分析其配伍前后的变化规律。结果在生川乌 - 白蒺、生川乌 - 白及给药血浆中均发现 20 个入血成分,来源于生川乌原形成分包括双酯型、单酯型、醇胺型乌头碱型二萜生物碱。配伍后入血成分变化规律为:大鼠 ig 生川乌 - 白蒺水提液后中乌头碱、次乌头碱、乌头碱、脱氧乌头碱、去甲基次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、宋果灵相对质量分数均显著降低,14-乙酰塔拉地萨敏相对质量分数显著增加;大鼠 ig 生川乌 - 白及水提液后苯甲酰中乌头原碱、附子灵、demethyl-14-

acetylkarakoline 相对质量分数显著降低,表明生川乌配伍白蒺、白及改变了川乌的入血过程和成分。

课题组前期研究发现,川乌与白蒺配伍煎煮液中双酯型、单酯型、醇胺型生物碱相对质量分数均降低^[4],进一步研究证实白蒺所含淀粉类成分抑制了乌头生物碱类成分的溶出^[5],而本实验生川乌 - 白蒺反药组合给药后大鼠血浆移行成分中多数生物碱相对质量分数降低,其提取液中生物碱相对质量分数减少可能为原因之一。

乌头碱型二萜生物碱既是川乌的活性成分,也是其毒性成分,以往研究认为双酯型生物碱毒性最大,炮制后水解生成单酯型、醇胺型生物碱,毒性明显降低,单酯型生物碱毒性仅为双酯型生物碱毒性的 1/200~1/100,醇胺型生物碱几乎无毒性^[14-15]。课题组研究发现制川乌配伍白蒺能够降低乌头的镇痛作用,配伍白及能够延迟镇痛的起效时间^[6]。本

实验中生川乌配伍白芷、白及后血中移行成分中双酯型、单酯型、醇胺型生物碱相对质量分数均降低,提示其配伍后可能因活性成分减少、降低药效而表现“相反”;同时课题组研究亦发现生川乌与白芷反药配伍能够协同激动 β_2 肾上腺素能受体,进而升高大鼠血管紧张素II,降低肾血流,从而加重肾脏缺血性损伤,是药物“相反”的具体表现之一^[7],提示增毒“相反”的物质基础可能不是由于某一类成分的相对质量分数减少或增加,而是不同成分间通过调控靶点、网络等产生生物效应相互作用。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 39-40.
- [2] 于大猛. “半蒺藜及攻乌”同方配伍规律研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [3] 张 腾, 庄朋伟, 赖晓艺, 等. “半蒺藜及攻乌”反药配伍组合的急性毒性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(17): 2442-2445.
- [4] 王 晖, 陈 宁, 许妍妍, 等. 基于 RRLC-Q-TOF-MS 技术分析白芷对制川乌主要化学成分溶出的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2059-2066.
- [5] 王 晖, 张艳军. 半夏和白芷分别与生川乌合煎过程中淀粉类成分对生川乌生物碱类成分溶出的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1545-1550.
- [6] 赖晓艺, 庄朋伟, 卢志强, 等. “半蒺藜及攻乌”反药组合对制川乌镇痛作用的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(1): 32-35.
- [7] 宋甜甜, 卢志强, 庄朋伟, 等. 川乌与白芷反药组合协同降低大鼠肾血流作用及机制研究 [J]. 中南药学, 2016, 14(5): 493-496.
- [8] 常存库, 王喜军. 中药血清药物化学理论与方法的意义 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2010, 12(4): 634-637.
- [9] Tan G G, Lou Z Y, Jing J, *et al.* Screening and analysis of aconitum alkaloids and their metabolites in rat urine after oral administration of aconite roots extract using LC-TOFMS-based metabolomics [J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(12): 1343-1351.
- [10] Zhang J, Huang Z H, Qiu X H, *et al.* Neutral fragment filtering for rapid identification of new diester-diterpenoid alkaloids in roots of *Aconitum carmichaeli* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. *Plos One*, 2012, 7(12): e52352.
- [11] Zhu H, Wang C, Qi Y, *et al.* Fingerprint analysis of *Radix Aconiti* using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization /tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MSⁿ) combined with stoichiometry [J]. *Talanta*, 2013, 103: 56-65.
- [12] Tang Y N, Pang Y X, He X C, *et al.* UPLC-QTOF-MS identification of metabolites in rat biosamples after oral administration of *Dioscorea* saponins: a comparative study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 165: 127-140.
- [13] Ni S, Qian D, Duan J A, *et al.* UPLC-QTOF/MS-based screening and identification of the constituents and their metabolites in rat plasma and urine after oral administration of *Glechoma longituba* extract [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(28): 2741-2750.
- [14] Borcsa B, Widowitz U, Csopor D, *et al.* Semisynthesis and pharmacological investigation of lipo-alkaloids prepared from aconitine [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(3): 365-368.
- [15] Csopor D, Wenzig E M, Zupkó I, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of aconitine-type and lipo-alkaloids of *Aconitum carmichaelii* roots [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216 (11): 2079-2086.