

制川乌与川贝母、浙贝母配伍前后化学成分的变化研究

齐 瑶^{1,2}, 皮子凤¹, 宋凤瑞¹, 林 娜³, 刘志强^{1*}

1. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039

3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘 要: **目的** 研究制川乌与川贝母、浙贝母配伍前后其化学成分的整体变化情况, 从而分析乌头反贝母的相反机制。**方法** 使用 UPLC-ESI-LTQ-MS 对配伍前后的煎煮液进行分析, 采用主成分分析 (PCA) 对数据进行分析并采用多级串联质谱技术对化学标志物进行鉴定。**结果** 制川乌与川贝母、浙贝母配伍前后成分均有明显差异, 其中与川贝母配伍产生 5 个化学标志物, 与浙贝母配伍产生 6 个化学标志物, 重复出现的标志物为次乌头碱和苯甲酰基次乌头原碱。**结论** 制川乌与两种贝母配伍后的化学标志物差异较大, 仅有 2 个相同, 结合前期的急性毒性试验结果, 推测制川乌与不同贝母配伍后 LD₅₀ 的变化与其配伍后化学成分的变化相关; 从而说明相反不完全是通过其化学成分变化引起的, 其相反机制可能还通过其他因素共同引起。

关键词: 制川乌; 川贝母; 浙贝母; UPLC-MS; 主成分分析

中图分类号: R286.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)12-2438-04

Chemical constituent changes of *Aconiti Radix Cocta* in compatibility process with *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus*

QI Yao^{1,2}, PI Zi-feng¹, SONG Feng-rui¹, LIN Na³, LIU Zhi-qiang¹

1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To investigate the compatibility taboo theory, the systemic changes of *Aconiti Radix Cocta* in compatibility process with *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus* have been studied. **Methods** Using UPLC-ESI-LTQ-MS to analyze the decoctions before and after compatibility, PCA was applied to comparing LC-MS data, then MSⁿ was employed to identify the chemical markers. **Results** There were significant differences before and after *Aconiti Radix Cocta* combined with *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus*, there were five chemical markers in *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* taboo, and six in *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus* taboo, only hyaconitine and benzoylhyaconine were repeated as the same of two pairs. **Conclusion** According to the research results of the chemical substance base and the acute toxicity, the changes of LD₅₀ value before and after drug-pair compatibility may be from the difference of chemical markers between *Aconiti Radix Cocta*-*Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and *Aconiti Radix Cocta*-*Fritillariae Thunbergii Bulbus*. The compatibility taboo theory may cause by other factors but not the chemical constituents changes.

Key words: *Aconiti Radix Cocta*; *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; *Fritillariae Thunbergii Bulbus*; UPLC-MS; PCA analysis

中药“十八反”是中医七情配伍理论的重要组成部分, 但关于配伍禁忌的合理性一直存在争议。乌头有大毒, 通常炮制后入药, 具有祛风除湿、温

经止痛的作用, 近年来关于其禁忌配伍中毒和应用的实例均有报道^[1-3]。双酯型生物碱是乌头中主要的毒性成分, 而贝母与乌头配伍后会使其双酯型生物

收稿日期: 2011-06-26

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) 资助项目 (2011CB505303); 国家自然科学基金资助项目 (81073040)

作者简介: 齐 瑶 (1986—), 女, 吉林省长春市人, 中国科学院长春应用化学研究所 2009 级硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。

Tel: (0431)85262237 E-mail: lhl@ciac.jl.cn

*通讯作者 刘志强 Tel: (0431)85262236 E-mail: liuzq@ciac.jl.cn

碱的量增加^[4-6],但对其配伍前后化学成分变化的全面分析的研究却很少。本实验通过 UPLC-ESI-LTQ-MS 技术和主成分分析 (PCA)^[7]对制川乌分别与川贝母和浙贝母配伍前后对制川乌整体化学成分的影响进行了分析,在化学物质基础层面说明两者配伍相反的科学内涵。

1 仪器与材料

LTQ XL 液质联用仪 (美国 Thermo 公司)。

乙腈为色谱纯,水为 Milli-Q 高纯水,其他试剂均为分析纯。制川乌购于四川江油饮片厂,川贝母和浙贝母购于吉林省仙草药材公司,经长春中医药大学王淑敏教授鉴定均为正品。乌头碱 (批号 1107202200410)、中乌头碱 (批号 079929403) 及次乌头碱 (批号 079829403) 对照品均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法

2.1 提取方法

称取制川乌 2 g,用 10 倍量水浸泡 1 h 后煎煮提取 1 h,纱布滤过,第 2 次再加入 10 倍量水煎煮提取 1 h,合并 2 次滤液,10 000 r/min 离心 15 min 后取上清液定容至 100 mL,0.22 μ m 微孔滤膜滤过

后每 800 μ L 加入 50 μ L 的 0.1 mg/mL 利血平内标溶液即为样品溶液。川贝母单煎液、浙贝母单煎液及制川乌与川贝母、制川乌与浙贝母均按 1:1 配伍,共煎液均按上述方法制备。每组样品平行提取 5 份。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity BEH C₁₈ 柱 (50 mm $\times$ 3.0 mm, 1.7 μ m),柱温 30 $^{\circ}$ C,体积流量 0.35 mL/min,进样量 5 μ L,流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B),梯度洗脱:0~14 min, 16%~44% B; 14~18 min, 44%~48% B; 18~22 min, 48%~64% B; 22~24 min, 64%~16% B; 24~32 min, 16% B。色谱图见图 1。

2.3 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI),正离子电离方式,喷雾电压 4.5 kV,毛细管电压 37 V,毛细管温度 250 $^{\circ}$ C,管透镜电压 130 V,壳气 N₂ 0.525 L/min,辅助气 N₂ 1.5 L/min, m/z 300~1 000,碰撞能量为 30%。

2.4 数据分析

液质联用数据使用 Mzmine 2 软件进行峰提取、峰对齐及归一化等处理,处理后的数据使用 Simca-P11.5 软件进行 PCA 分析,寻找化学标志物。

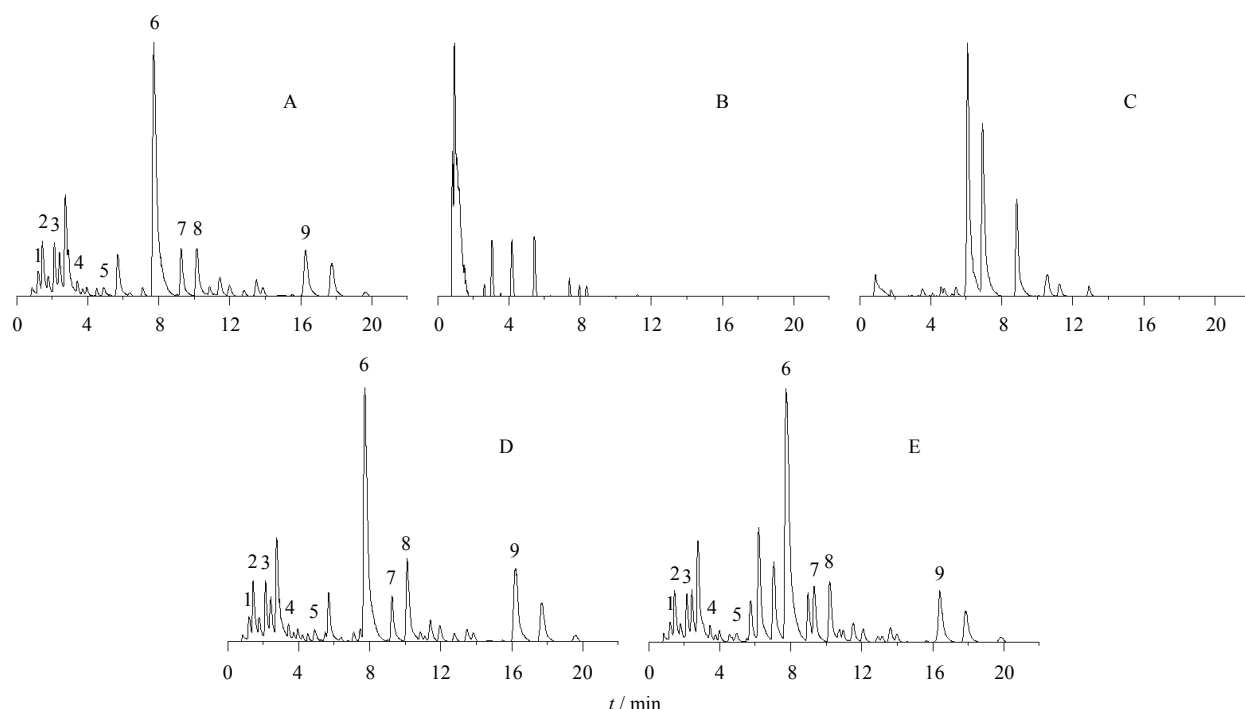


图1 制川乌单煎液 (A)、川贝母单煎液 (B)、浙贝母单煎液 (C)、制川乌与川贝母共煎液 (D) 及制川乌与浙贝母共煎液 (E) 的 BPI 图

Fig. 1 Base peak intensity chromatograms of *Aconiti Radix Cocta* decoction (A), *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* decoction (B), *Fritillariae Thunbergii Bulbus* decoction (C), *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* co-decoction (D), and *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus* co-decoction (E)

3 结果与讨论

3.1 UPLC-ESI-LTQ-MS 图谱比较

比较图 1 中制川乌单煎液、川贝母单煎液、浙贝母单煎液、制川乌与川贝母共煎液以及制川乌与浙贝母共煎液后发现,除浙贝母和川贝母的特有成分外,共煎液与制川乌单煎液相比较没有形成新的

色谱峰,只是在化学成分的量上有所变化。

3.2 PCA 结果分析

PCA 结果见图 2、3。从图 2 中可以看出制川乌分别与川贝母和浙贝母共煎后有明显的区分,而图 3 中距离原点较远的点并能通过 t 检验的即为化学标志物。

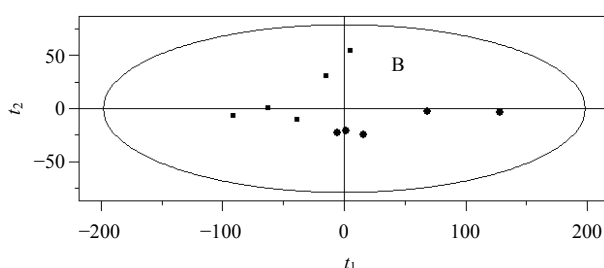
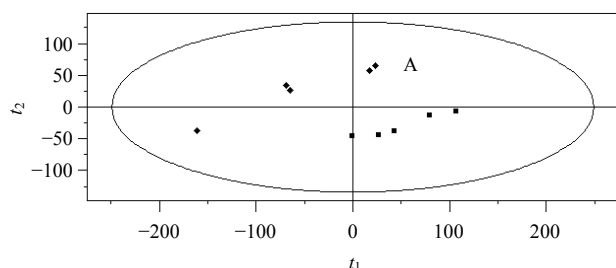


图 2 制川乌与川贝母共煎前后 (A)、制川乌与浙贝母共煎前后 (B) 的 PCA 得分图

Fig. 2 PCA scores plots of *Aconiti Radix Cocta* decoction comparison before and after *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* co-decoction (A), and *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus* co-decoction (B)

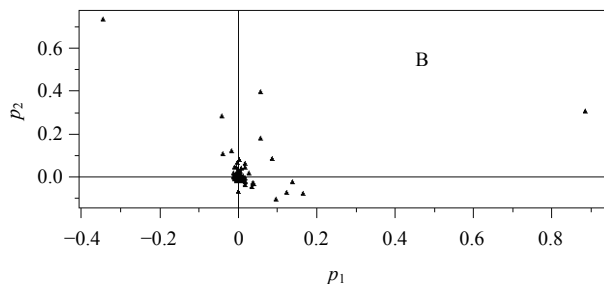
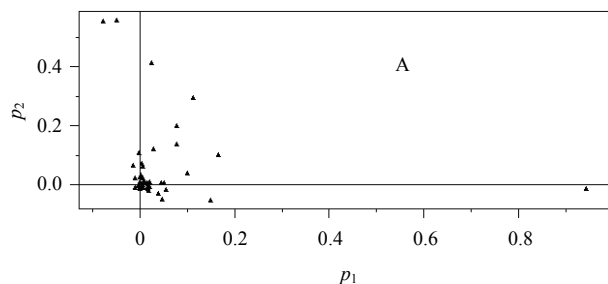


图 3 制川乌与川贝母共煎前后 (A)、制川乌与浙贝母共煎前后 (B) 的 PCA 载荷图

Fig. 3 PCA loading plots of *Aconiti Radix Cocta* decoction comparison before and after *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* co-decoction (A), and *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus* co-decoction (B)

3.3 化学标志物的鉴定

在 PCA 载荷图中找到的化学标志物,经与对照品对比、多级质谱串联数据分析以及结合相关文献报道^[8-9],鉴定结果见表 1。除次乌头碱和苯甲酰基次乌头原碱外,制川乌与川贝母和浙贝母共煎后的化学标志物均不同。而且制川乌中主要毒性成分双酯型生物碱除次乌头碱外均不是化学标志物,可能是制川乌中双酯型生物碱量较低和煎煮时间较长引起双酯型生物碱分解共同作用的结果。

3.4 化学标志物相对质量分数变化结果分析

根据化学标志物的峰面积与内标物利血平的峰面积之比来确定化学标志物相对质量分数变化情况,结果见表 2。制川乌与川贝母配伍后乌头中主要成分单酯型生物碱总体呈减少的趋势,而乌头类生物碱作为抗心律失常药物其活性与 N 原子的碱性和 C₁、C₄、C₆ 和 C₁₄ 上的芳香取代基有关,与乙酰基无明显关联^[10-11],说明配伍后其抗

心律失常活性有降低趋势,抗心律失常药效可能下降。制川乌与浙贝母配伍后单酯型、醇胺型生物碱均发生显著变化,且每种生物碱变化情况不同,由此引起的活性变化有待进一步研究。制川乌与 2 种贝母配伍后次乌头碱相对质量分数均增加,说明其毒性增加,从而从毒性角度说明相反原因。

4 讨论

制川乌与两种贝母配伍前后化学成分的质量分数存在明显差异,但并没有生成新的化合物,配伍后的化学标志物基本不同,仅有 2 个相同的化学标志物,制川乌中主要毒性成分次乌头碱配伍后的相对质量分数均增加,结合前期的急性毒性试验结果,推测制川乌与不同贝母配伍后 LD₅₀ 的变化与其配伍后化学成分的变化相关。从而说明相反不完全是通过其化学成分变化引起的,其相反机制还可能是通过其他因素共同引起的。

表 1 制川乌与川贝母和浙贝母配伍后的化学标志物

Table 1 Chemical marker of *Aconiti Radix Cocta* in compatibility with *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* or *Fritillariae Thunbergii Bulbus*

峰号	t_R/min	$[M+H]^+$	MS^2	MS^3	化合物名称
1 Δ	1.21	394	394→374(100), 356, 344	374→358(100), 346, 340, 330, 328, 312, 294, 268	chuanfumine
2*	2.38	470	470→452, 438(100), 420, 406, 388	438→420, 406(100), 388, 378, 374, 356, 324	未知物
3 Δ	2.43	454	454→436(100), 422, 418, 404, 386, 372	436→418, 408, 404, 386, 376, 372, 354	附子灵
4 Δ	2.93	342	342→311, 297(100), 282, 279, 265	297→282, 279, 265(100), 237, 207	未知物
5 Δ	4.91	576	576→558, 544, 526(100), 514, 508, 500, 494, 476, 468, 462	526→508, 494(100), 476, 462	去氧苯甲酰中乌头原碱
6*	7.74	590	590→572, 558, 540(100), 526, 508, 494, 490, 482, 476	540→522, 508(100), 490, 478, 476, 466, 458, 414, 398	苯甲酰基中乌头原碱
7*	9.28	604	604→586, 572, 554(100), 540, 522, 508, 496	554→522(100), 504, 490, 472	苯甲酰基乌头原碱
8*/ Δ	10.16	574	574→542(100), 524, 510	542→510(100), 492, 482, 478, 460, 388, 338	苯甲酰基次乌头原碱
9*/ Δ	16.27	616	616→584, 556(100), 524, 496, 338	556→524(100), 496, 492, 464, 338	次乌头碱

*和 Δ 分别表示制川乌与川贝母共煎液、制川乌与浙贝母共煎液和制川乌单煎液相比有显著差异 ($P<0.05$)
* and Δ means a statistically significant difference ($P<0.05$) between *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* co-decoction, *Aconiti Radix Cocta* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus* co-decoction, and *Aconiti Radix Cocta* decoction, respectively

表 2 制川乌与川贝母和浙贝母配伍前后化学标志物相对质量分数变化

Table 2 Relative content changes of chemical marker of *Aconiti Radix Cocta* before and after compatibility with co-decoction between *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and *Fritillariae Thunbergii Bulbus*

化合物	相对质量分数/%		
	制川乌单煎液	制川乌与川贝母共煎液	制川乌与浙贝母共煎液
未知物 (m/z 470)	38.6	45.1	—
苯甲酰基中乌头原碱	732.1	634.9	—
苯甲酰基乌头原碱	106.1	88.4	—
苯甲酰基次乌头原碱	109.3	148.5	127.0
次乌头碱	134.4	169.8	149.3
chuanfumine	54.9	—	48.6
附子灵	121.5	—	134.0
未知物 (m/z 342)	129.9	—	84.7
去氧苯甲酰基中乌头原碱	105.8	—	90.1

参考文献

[1] 户战亭. 乌头与贝母配伍中毒 1 例 [J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(3): 27.
[2] 陈生平, 赵根生. 附子配伍半夏、瓜蒌、贝母的应用观察 [J]. 现代中医药, 2007, 27(4): 60-61.
[3] 张世俊, 龚可, 何克强, 等. 乌头半夏散临床安全性观察 [J]. 四川中医, 2009, 27(8): 55-56.
[4] 边宝林, 司南, 王宏洁, 等. 附子单煎以及与浙贝母

合煎后乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等有毒成分的含量变化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 9-10.
[5] 刘文龙, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 川乌与半夏、瓜蒌、贝母、白蔹、白芨配伍禁忌的化学研究 [J]. 化学学报, 2010, 68(9): 889-896.
[6] 翁小刚, 聂淑琴, 黄璐琦. HPLC 测“半萎贝蔹芩攻乌”中乌头与其它诸药合煎前后次乌头碱的含量变化 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(1): 57-59.
[7] 黎阳, 刘素香, 张铁军, 等. 麻仁软胶囊的指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1097-1100.
[8] Yan G L, Sun H, Sun W J, et al. Rapid and global detection and characterization of *Aconitum* alkaloids in Yin Chen Si Ni Tang, a traditional Chinese medical formula, by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and automated data analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(2): 421-431.
[9] Hu R, Zhao J, Qi L W, et al. Structural characterization and identification of C_{19} - and C_{20} -diterpenoid alkaloids in roots of *Aconitum carmichaeli* by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(11): 1619-1635.
[10] Ameri A, Simmet T. Interaction of the structurally related *Aconitum* alkaloids, aconitine and 6-benzoylheteratisine, in the rat hippocampus [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 386(2/3): 187-194.
[11] Dzhakhangirov F N, Sultankhodzhaev M N, Tashkhodzhaev B, et al. Diterpenoid alkaloids as a new class of antiarrhythmic agents. Structure-activity relationship [J]. *Chem Nat Compd*, 1997, 33(2): 190-202.