

乌头属中药及其炮制品与浙贝母、川贝母配伍的化学研究

董欣^{1,2}, 王淑敏¹, 祝恩智^{1*}, 宋凤瑞², 刘志强², 刘淑莹²

1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022

摘要: **目的** 通过考察川乌、制川乌、草乌、制草乌、生附子、黑顺片分别与浙贝母、川贝母配伍前后双酯型生物碱的量, 分析共煎液中乌头类生物碱之间的转化。**方法** 采用 HPLC 及电喷雾质谱技术, 对川乌、草乌、生附子及其炮制品与浙贝母、川贝母配伍前后双酯型生物碱进行定量测定。**结果** 乌头属中药及其炮制品在与浙贝母配伍时能够抑制双酯型生物碱的水解转化, 而与川贝母配伍对双酯型生物碱的水解转化则起到促进作用。**结论** 从化学成分量的变化方面分析, 中药“十八反”之“乌头反贝母”并不是绝对的, 乌头属中药及其炮制品与浙贝母配伍“相反”, 与川贝母配伍“不反”。

关键词: 乌头属; 浙贝母; 川贝母; 配伍; 电喷雾质谱高效液相色谱

中图分类号: R283.1; 286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)02-0265-05

Chemical study on compatibility of medicinal plants in *Aconitum* L. and their processed products with *Fritillariae Thunberglii Bulbus* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*

DONG Xin^{1,2}, WANG Shu-min¹, ZHU En-zhi¹, SONG Feng-rui², LIU Zhi-qiang², LIU Shu-ying²

1. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

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

Abstract: **Objective** To investigate diester-diterpenoid alkaloids content in the decoctions before and after *Aconiti Radix*, *Aconiti Radix Cocta*, *Aconiti Kusnezoffii Radix*, *Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta*, *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, *Radix Aconiti Lateralis Praeparata* combined with *Fritillariae Thunberglii Bulbus* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and study the conversion of alkaloids in decoctions. **Methods** To quantitatively detect the content of diester-diterpenoid alkaloids in decoctions of plants in *Aconitum* L. and their processed products combined with *Fritillariae Thunberglii Bulbus* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* by HPLC and ESI-MS. **Results** Decoctions containing *Fritillariae Thunberglii Bulbus* could inhibit the hydrolysis and conversion of alkaloids, while those containing *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* could promote the transformation of alkaloids and reduce their content. **Conclusion** Analyses of content changes of three diester-diterpenoid alkaloids indicate that the statement of “aconite counteracts fritillaria” is not comprehensive medicinal plants in *Aconitum* L. and their processed products combined with *Fritillariae Thunberglii Bulbus* are counteraction, but with *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* are not.

Key word: *Aconitum* L.; *Fritillariae Thunberglii Bulbus*; *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; compatibility; HPLC-ESI-MS

中药“十八反”是中药药性理论的重要组成部分, 其中有“乌头(川乌、草乌、附子)反贝母(浙贝母、川贝母)”, 《中国药典》中也明确规定乌头属中药不宜与浙贝母、川贝母配伍同用^[1-2]。翁小刚等^[3-5]通过对附子与浙贝母配伍药效学实验的研究, 支持“乌头反贝母”。然而, 也有报道川乌与川贝母

配伍后乌头碱的量并没有明显的增加^[6]。本课题组齐瑶等^[7]研究表明制川乌与川贝母、浙贝母配伍前后成分均有明显差异, 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, 重复出现的标志物仅有 2 种, 认为“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

收稿日期: 2011-08-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772721); “973”计划中医理论专项(2006CB504706)

作者简介: 董欣(1985—), 女, 吉林松原人, 硕士, 从事中药生物制药技术研究。

Tel: 13844078716 (0431)86172409 E-mail: dongxin.16@163.com

*通讯作者 祝恩智 Tel: 13944862224 (0431)86172409 Fax: (0431)86172411 E-mail: enzhizhu@yahoo.com.cn

过其他因素共同引起的。GC-MS 证明双酯型生物碱煎煮后水解为单酯型生物碱^[8]。因此, 本实验通过考察乌头属中药及其炮制品分别与浙贝母、川贝母配伍前后药液中双酯型生物碱的量, 及其水解转化情况, 探讨乌头与贝母的配伍禁忌。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪 (Waters 2996 DAD 检测器, 美国 Waters 公司), Thermo LTQ 离子阱质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司), Eppendorf 5810R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。生川乌、制川乌、生草乌、制草乌、生附子、黑顺片购于四川江油饮片厂, 浙贝母、川贝母购于吉林大药房, 各饮片均由长春中医药大学王淑敏教授鉴定为正品。乌头碱 (批号 1107202200410)、中乌头碱 (批号 079929403)、次乌头碱 (批号 079829403) 对照品购自中国药品生物制品鉴定所; 甲醇、乙腈、醋酸 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取乌头碱、中乌头碱、次乌头碱对照品 1.58、1.66、1.56 mg 至 1 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容。

2.2 供试品溶液的制备

精密称定生川乌 5 g、制川乌 5 g、生草乌 5 g、制草乌 5 g、生附子 5 g、黑顺片 5 g 分别与浙贝母 5 g、川贝母 5 g (过 60 目筛) 混合均匀, 加 10 倍量水浸泡 30 min, 煮沸提取 2 次, 提取时间分别为 20、15 min, 合并提取液后 3 500 r/min 离心 30 min, 加 10% 氨试液调节 pH 值为 9.5, 用等体积乙醚萃取 3 次, 乙醚萃取液合并后于 50 °C 水浴中蒸干, 用甲醇-乙醚 (1:1) 定容至 2 mL, 得到共煎液的生物碱部分。另取生川乌 5 g、制川乌 5 g、生草乌 5 g、制草乌 5 g、生附子 5 g、黑顺片 5 g, 重复上述试验, 得到单煎液的生物碱部分。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent Extend C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: A 为甲醇-乙腈 (1:1), B 为 35 mmol/L 的乙酸铵溶液 (pH 值为 10.5), 梯度洗脱: 0 min, 45% A; 0~30 min, 45%~60% A; 30~55 min, 60%~85% A; 进样量 5 μL, 体积流量 0.6 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 235 nm。

2.4 质谱条件

电喷雾离子源, 喷雾电压 4.6 kV, 毛细管温度

245 °C, 壳气 27 L/h, 管透镜电压 115 V, 扫描范围 m/z : 50~1 000, 正离子模式。取“2.2”项下供试品溶液用甲醇稀释 200 倍, 涡旋振荡 1 min, 流动注射泵直接进样, 注射泵进样体积流量 5 μL/min。

2.5 HPLC 检测

2.5.1 线性关系考察 精密吸取适量乌头碱、中乌头碱、次乌头碱对照品溶液稀释至终质量浓度分别为 52.6、55.3、52.0 μg/mL 的混合对照品溶液。按照色谱条件, 分别进样 1、2、3、5、10、15、20 μL, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标进行线性回归, 得回归方程: 乌头碱 $Y=1.717 X-0.059$, $r=0.999 8$; 中乌头碱 $Y=1.140 9 X-0.006 8$, $r=0.999 9$; 次乌头碱 $Y=1.631 3 X-0.045 9$, $r=0.999 7$; 结果表明乌头碱在 52.6~1 052.0 ng、中乌头碱在 55.3~1 106.0 ng、次乌头碱在 52.0~1 040.0 ng 线性关系良好。

2.5.2 精密度试验 取“2.1”项下的混合对照品溶液, 按照色谱条件, 连续进样 5 次, 测定乌头碱、中乌头碱、次乌头碱峰面积积分值, 结果乌头碱、中乌头碱、次乌头碱峰面积积分值的 RSD 分别为 0.94%、1.12%、1.30%。

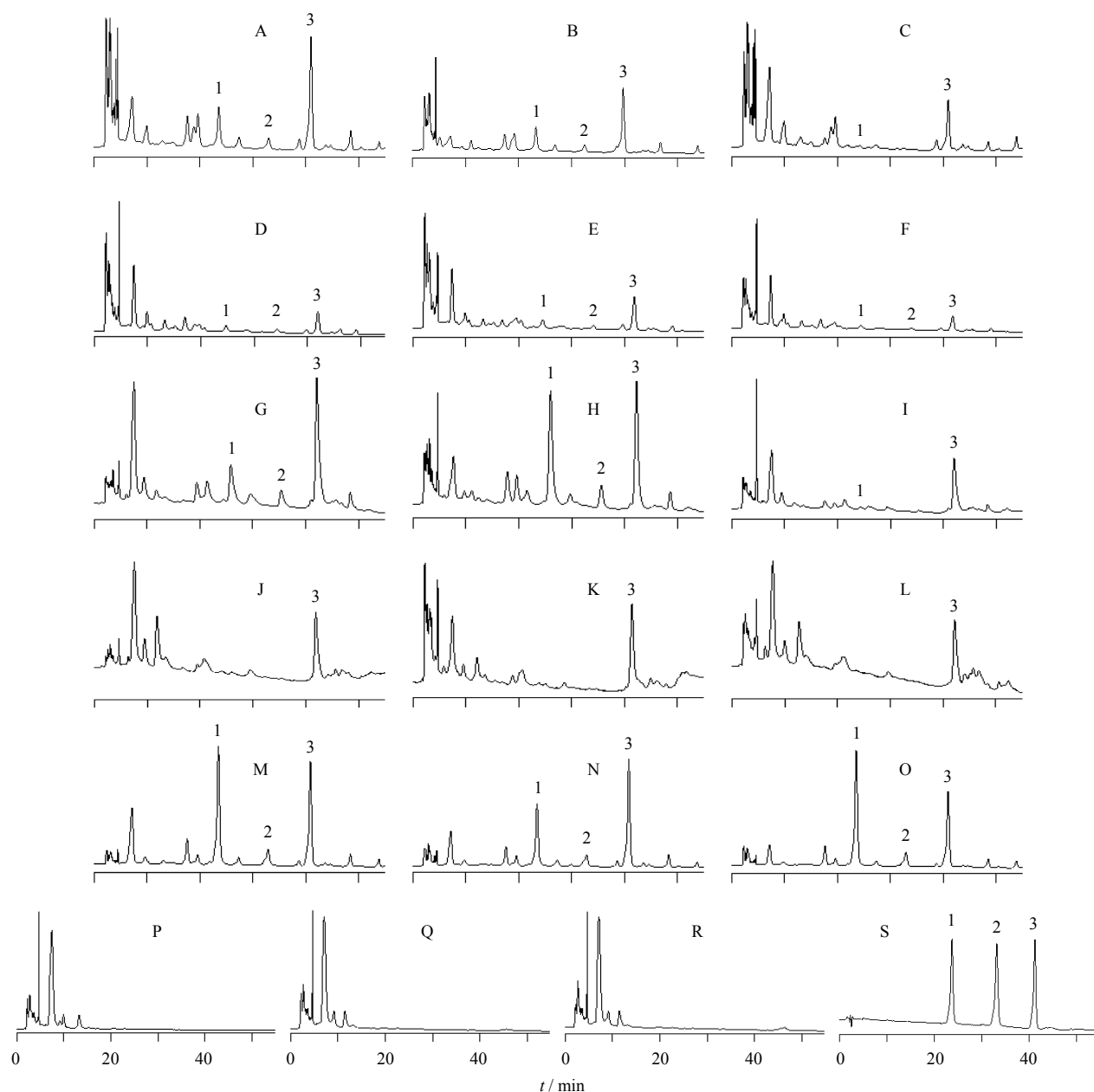
2.5.3 稳定性试验 取“2.2”项下供试品溶液, 按照色谱条件, 分别于 0、2、4、8、16、24 h 进样测定, 结果乌头碱、中乌头碱、次乌头碱峰面积的 RSD 分别为 2.53%、1.83%、1.20%, 表明供试品溶液在测定环境中 24 h 内稳定。

2.5.4 重现性试验 精密称取附子 5 g, 共 6 份, 按照“2.2”项下方法制备成供试品溶液, 按照色谱条件进样测定, 结果乌头碱、中乌头碱、次乌头碱质量分数的 RSD 分别为 2.34%、2.42%、2.55%。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取已测定乌头碱、中乌头碱、次乌头碱量的附子 5 g, 共 5 份, 分别精密加入乌头碱 0.069 mg、中乌头碱 0.16 mg、次乌头碱 0.51 mg (加入量约等同于样品中相应生物碱的量), 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照色谱条件进样测定, 结果平均回收率分别为乌头碱 104.20% (RSD 2.82%)、中乌头碱 95.38% (RSD 2.29%)、次乌头碱 98.30% (RSD 2.62%)。

2.5.6 样品测定 通过对 HPLC 条件的考察, 该方法可对各煎煮药液中的乌头碱、中乌头碱、次乌头碱进行定量分析, 乌头属中药及其炮制品与浙贝母、川贝母配伍药液的色谱图见图 1。各药液中 3 种生物碱的量见表 1。

通过比较发现乌头属中药与浙贝母配伍后药液



A-生川乌单煎液 B-生川乌与浙贝母共煎液 C-生川乌与川贝母共煎液 D-制川乌单煎液 E-制川乌与浙贝母共煎液 F-制川乌与川贝母共煎液 G-附子单煎液 H-附子与浙贝母共煎液 I-附子与川贝母共煎液 J-黑顺片单煎液 K-黑顺片与浙贝母共煎液 L-黑顺片与川贝母共煎液 M-生草乌单煎液 N-生草乌与浙贝母共煎液 O-生草乌与川贝母共煎液 P-制草乌单煎液 Q-制草乌与浙贝母共煎液 R-制草乌与川贝母共煎液 S-双酯型生物碱对照品 1-中乌头碱 2-乌头碱 3-次乌头碱

A-Aconiti Radix decoction B-decoction of Aconiti Radix and Fritillariae Thunberglii Bulbus C-decoction of Aconiti Radix and Fritillariae Cirrhosae Bulbus D-Aconiti Radix Cocta decoction E-decoction of Aconiti Radix Cocta and Fritillariae Thunberglii Bulbus F-decoction of Aconiti Radix Cocta and Fritillariae Cirrhosae Bulbus G-Aconiti Lateralis Radix Praeparata decoction H-decoction of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Fritillariae Thunberglii Bulbus I-decoction of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Fritillariae Cirrhosae Bulbus J-Radix Aconiti Lateralis Preparata decoction K-decoction of Radix Aconiti Lateralis Preparata and Fritillariae Thunberglii Bulbus L-decoction of Radix Aconiti Lateralis Preparata and Fritillariae Cirrhosae Bulbus M-Aconiti Kusnezoffii Radix decoction N-decoction of Aconiti Kusnezoffii Radix and Fritillariae Thunberglii Bulbus O-decoction of Aconiti Kusnezoffii Radix and Fritillariae Cirrhosae Bulbus P-Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta decoction Q-decoction of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta and Fritillariae Thunberglii Bulbus R-decoction of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta and Fritillariae Cirrhosae Bulbus S-diester-alkaloid reference substances 1-mesaconitine 2-aconitine 3-hypaconitine

图1 乌头属中药及其炮制品单煎液及其与浙贝母、川贝母配伍药液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of different decoctions of medicinal plants in *Aconitum* L. and their processed products combined with *Fritillariae Thunberglii Bulbus* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*

表 1 乌头属中药及其炮制品与浙贝母、川贝母配伍前后药液中 3 种双酯型生物碱的量

Table 1 Contents of three diester-diterpenoid alkaloids in decoctions of medicinal plants in *Aconitum* L. and their processed products combined with *Fritillariae Thunberglii Bulbus* and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*

样 品	中乌头碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	乌头碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	次乌头碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	样 品	中乌头碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	乌头碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	次乌头碱 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
生川乌	20.95	5.13	65.91	黑顺片	—	—	14.78
生川乌+浙贝母	29.04	9.66	57.94	黑顺片+浙贝母	—	—	15.00
生川乌+川贝母	1.81	—	34.47	黑顺片+川贝母	—	—	8.19
制川乌	10.13	6.43	38.96	生草乌	157.50	27.88	131.40
制川乌+浙贝母	13.01	6.27	55.01	生草乌+浙贝母	179.50	32.97	216.60
制川乌+川贝母	4.89	2.15	23.68	生草乌+川贝母	134.50	19.98	111.80
附子	32.50	13.88	102.90	制草乌	—	—	0
附子+浙贝母	107.90	22.41	155.60	制草乌+浙贝母	—	—	0
附子+川贝母	2.97	—	40.53	制草乌+川贝母	—	—	0

“—” 未检出

“—” not detected

中的乌头碱、中乌头碱、次乌头碱的量均高于其单煎液，而与川贝母配伍后 3 种双酯型生物碱的量则明显降低或是检测不到。结果说明由于浙贝母和川贝母的产地不同，因而两药在与乌头属中药共煎后对药液中双酯型生物碱的水解转化作用差异较大。

2.6 电喷雾质谱检测

电喷雾质谱为软电离技术，具有快速、灵敏、操作简便等特点，不仅可以从一级谱中得到相对分子质量信息，还可以通过串联质谱数据结合乌头类生物碱的质谱断裂规律来分析生物碱的成分变化^[9-11]。本实验以生川乌单煎液及其与浙贝母、川贝母配伍为例，考察共煎液中双酯型生物碱的变化，结果见图 2。生川乌与浙贝母共煎药液中以中乌头碱 (m/z 632) 为基峰，次乌头碱 (m/z 616)、乌头碱 (m/z 646)、去氧乌头碱 (m/z 630)、16-*O*-

乌头碱 (m/z 662)、16-*O*-中乌头碱 (m/z 648) 等双酯型生物碱的相对丰度比较高，单酯型生物碱除苯甲酰中乌头原碱 (m/z 590) 外，其余丰度都很低；而生川乌与川贝母配伍后则是以苯甲酰中乌头原碱 (m/z 590) 为基峰，苯甲酰乌头原碱 (m/z 604)、苯甲酰去氧乌头原碱 (m/z 588)、苯甲酰次乌头原碱 (m/z 574) 等单酯型生物碱的相对量也明显增加。二者与生川乌单煎液相比说明浙贝母与生川乌配伍后，能够抑制药液中双酯型生物碱水解转化为单酯型生物碱，而与川贝母配伍后则反之。其他乌头属中药与浙贝母、川贝母配伍后结果与生川乌类似。

3 讨论

HPLC 和电喷雾质谱得到的结果均显示，乌头属中药及其炮制品与浙贝母、川贝母配伍后药液中双酯型生物碱的量发生了较大的变化，在与浙贝母配

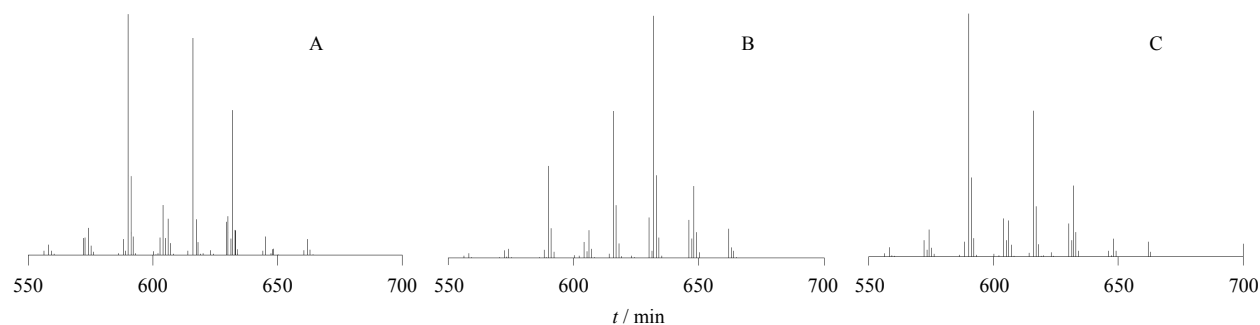


图 2 生川乌单煎液 (A) 及其与浙贝母 (B)、川贝母共煎液 (C) 的电喷雾质谱图

Fig. 2 ESI-MS spectra of *Aconiti Radix* decoction (A) and co-decoction of *Aconiti Radix* combined with *Fritillariae Thunberglii Bulbus* (B) and *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* (C)

伍后能够抑制双酯型生物碱的水解,而与川贝母配伍则反之。尽管浙贝母和川贝母均为百合科植物^[2],由于地域的差异,两药在与乌头属中药及其炮制品配伍后对药液中双酯型生物碱的水解转化作用程度不同,从毒性成分量的变化角度看中药配伍禁忌“贝母反乌头”并不是绝对的,乌头属中药及其炮制品与浙贝母配伍“相反”,与川贝母配伍则不“相反”。这一结果可为中医临床安全用药提供参考。

参考文献

- [1] 张颖,高建联,苗明三. 中药“十八反”现代研究及分析 [J]. 中医研究, 2010, 23(2): 11-15.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 杨庆,聂淑琴,翁小刚,等. 生附片与不同品种贝母配伍的药效学比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6): 25-29.
- [4] 杨庆,聂淑琴,翁小刚,等. 乌头、贝母单用及配伍应用体内、外抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 25-28.
- [5] 翁小刚,聂淑琴,杨庆,等. 浙贝母总生物碱对乌头生物碱在兔体内药动学的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(5): 24-27.
- [6] 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.
- [7] 齐瑶,皮子凤,宋凤瑞,等. 制川乌与川贝母、浙贝母配伍前后化学成分的变化研究 [J]. 中草药, 2011, 42(12): 2438-2441.
- [8] Ito K, Ohyama Y, Konishi Y, *et al.* Method for the simultaneous determination of *Aconitum* alkaloids and their hydrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry in human serum [J]. *Planta Med*, 1997, 63(1): 75-79.
- [9] 王勇,石磊,金东明,等. 四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的溶出和水解平衡 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 311-314.
- [10] 许庆轩,王勇,刘志强,等. 草乌中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究 [J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(4): 638-641.
- [11] 王勇,刘志强,宋凤瑞,等. 白山草乌中二萜生物碱的电喷雾串联质谱分析 [J]. 质谱学报, 2002, 23(3): 160-163.