

基于 RRLC-Q-TOF-MS 技术分析白芍对制川乌主要化学成分溶出的影响

王 晖[△], 陈 宁[△], 许妍妍, 程丽丽, 庄朋伟, 李遇伯, 张艳军*

天津中医药大学中药学院 天津市现代中药重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 天津 300193

摘要: 目的 分析“十八反”药对白芍与制川乌配伍中特征化学成分的变化规律, 初步探讨制川乌与白芍配伍相反的体外化学机制。方法 将一定量的制川乌与不同量的白芍进行配伍, 采用高分离快速液相色谱串联四级杆-飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF-MS)联用技术对不同配伍比例水煎液及沉积物进行生物碱的测定, 并对结果进行偏最小二乘判别分析和方差分析, 比较不同配伍的组间差异并分析其规律。采用紫外可见分光光度法测定白芍中淀粉和鞣质成分的量。结果 不同配比组间存在一定的差异, 其中制川乌单煎(1:0)和制川乌-白芍(1:3)配伍组差异最为明显。随着配伍药对中白芍比例的增加, 制川乌中生物碱类成分在煎煮液中的量呈现降低的趋势; 沉积物中生物碱的量随白芍比例的增加而增加。白芍中淀粉和鞣质质量分数分别为 25.44% 和 0.31%。结论 白芍中大量的淀粉类成分抑制了乌头生物碱的溶出, 使生物碱类成分沉淀, 而使水煎液中生物碱的量降低, 研究结果为进一步阐明白芍与制川乌配伍的化学机制奠定基础。

关键词: 十八反; 制川乌; 白芍; 配伍; 高分离快速液相色谱串联四级杆-飞行时间质谱; 偏最小二乘判别分析; 生物碱

中图分类号: R283.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)15-2059-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.008

Effect of *Ampelopsis Radix* on dissolution of main chemical constituents in *Aconiti Radix Cocta* based on RRLC-Q-TOF-MS technology

WANG Hui, CHEN Ning, XU Yan-yan, CHENG Li-li, ZHUANG Peng-wei, LI Yu-bo, ZHANG Yan-jun

Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine-Province and Ministry Co-established State Key Laboratory Cultivation Base, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective Under the guidance of eighteen antagonisms of Chinese materia medica, to analyze the effect of *Aconiti Radix Cocta* combined with *Ampelopsis Radix* in different ratios on the characteristic constituents and to explore the *in vitro* compatibility mechanism of *Aconiti Radix Cocta* and *Ampelopsis Radix*. **Methods** A certain weight of *Aconiti Radix Cocta* was combined with various amounts of *Ampelopsis Radix*, and a rapid resolution liquid chromatography coupled with quadruple-time-of-flight mass spectrometry (RRLC-Q-TOF-MS) method based on chemical profiling approach was used to determine the content of alkaloids in decoctions and sediments. The aconitine alkaloids were established and were subjected to PLS-DA and ANOVA to provide intergroup difference and distribution characteristics. In addition, the method of UV spectrophotometer was adopted to determine the content of starch and tannins in *Ampelopsis Radix*. **Results** There were certain differences among each group, especially between the single *Aconiti Radix Cocta* and *Aconiti Radix Cocta* combined with *Ampelopsis Radix* at the ratio of 1:3. With the increasing of the ratio of *Ampelopsis Radix* in the combination, the content of alkaloids appeared to increase in the decoction while decrease in the sediment. After determination, the mass fractions of starch and tannic acid in *Ampelopsis Radix* were 25.44% and 0.31%, respectively. **Conclusion** The aconitine alkaloids could be deposited with the starch in *Ampelopsis Radix*, meanwhile decreased in the decoction, which establishes the foundation for the further research on the chemical mechanism of *Aconiti Radix Cocta* combined with *Ampelopsis Radix*.

Key words: eighteen antagonisms; *Aconiti Radix Cocta*; *Ampelopsis Radix*; compatibility; RRLC-Q-TOF-MS; PLS-DA; alkaloid

收稿日期: 2013-02-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2011CB505300, 2011CB505302)

作者简介: 王 晖, 女, 博士, 天津中医药大学, 讲师, 研究方向为中药质量研究。Tel: (022)59596221 E-mail: tgwanghui@163.com

陈 宁, 女, 学士, 天津中医药大学, 硕士研究生, 研究方向为中药分析。Tel: (022)59596221 E-mail: chenning19870904@163.com

*通信作者 张艳军, 男, 博士生导师, 天津中医药大学, 教授, 研究方向为中药药理(中药毒理)。Tel: (022)59596221 E-mail: zyjsunye@163.com

[△]王 晖, 陈 宁为共同第一作者。

网络出版时间: 2013-06-04 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130604.1801.002.html>

“白蒺反乌头”是“十八反”中“半夏贝蒺及攻乌”的内容之一^[1-2]。然而在《千金要方》中却有记载白蒺与乌头治症瘕之镇心丸，在临床上也不乏用制川乌与白蒺治寒湿顽痹^[3]。《医学心语》记载普救万全膏使用川乌、草乌配伍白蒺、川芎和牛膝治疗“一切风寒湿气，走注疼痛”等证以及腹中食积痞块、小儿疳积、女人癥瘕、咳嗽等疾病^[4]。因此开展“十八反”的基础研究，迫切需要科学阐释相反作用机制，为中医临床用药安全有效提供指导。

目前对于制川乌与白蒺的配伍研究主要在临床应用和药理方面，研究发现两者配伍使用小鼠死亡数和毒性未见增加，反而可以增强镇痛作用。也有临床报道白蒺与制川乌合用有抗肿瘤的作用等^[5]。而对其配伍前后主要化学成分及其量变化研究报道几乎没有。

本实验采用高分离快速液相色谱串联四级-飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF-MS)联用技术，结合偏最小二乘判别分析(PLS-DA)法及方差分析法对数据进行分析，探讨制川乌与白蒺配伍煎煮后的主要化学成分的变化规律，并对其变化机制进行初步探讨，从体外化学的角度为揭示两者配伍相反的科学内涵研究奠定基础。

1 仪器与材料

Agilent 1200/API 4000 型 RRLC/Q-TOF-MS/MS 色谱-串联质谱联用仪、MassLynx V4.1 质谱工作站(Agilent 公司)，Heraeus Labofuge 400R 冷冻离心机(Thermo Scientific)，UV2100 紫外分光光度计(北京谱朋科技有限公司)。

制川乌 *Aconiti Radix Cocta* 购自于四川江油，白蒺购自安徽六安中药材市场，经天津中医药大学李天祥副教授鉴定分别为毛茛科乌头属植物川乌 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根炮制品、葡萄科白蒺 *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Makino 的块根。标本(编号 110501)收藏于天津中医药大学实验教学部。甲酸为色谱纯，购自天津市光复精细化工研究所；乙腈为色谱纯，购自 Thermo Fisher Scientific 公司；超纯水由杭州娃哈哈集团有限公司提供。对照品乌头碱(批号 110720-200410，质量分数 >98%)、次乌头碱(批号 110798-200805，质量分数 >98%)、中乌头碱(批号 110799-200505，质量分数 >98%)、14-苯甲酰次乌头原碱(批号 111796-201002，质量分数 >98%)、14-苯甲酰中乌头原碱(批号 111795-200901，质量分数 >98%)、

没食子酸(批号 110831-200302)均购自中国药品生物制品检定所；对照品 14-苯甲酰乌头原碱(批号 B-010-110916，质量分数 >98%，成都瑞芬思生物科技有限公司)，纯淀粉(分析纯，天津市福晨化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 制川乌与白蒺配伍体外化学研究

2.1.1 供试样品的制备 分别精密称取 1 g 制川乌置圆底烧瓶中，加入 10 倍量的水浸泡 1 h，回流提取 1 h，分别加入 0、0.25、0.5、1、3 g 浸泡 1 h 的白蒺，回流提取，合煎 30 min，待冷却后转移至离心管中，3 500 r/min 离心 10 min，将煎煮液转移至 100 mL 量瓶中，沉淀分别加入 8 倍量的水再回流提取 1.5 h，待冷却后离心 10 min，合并 2 次煎煮液，蒸馏水定容至 100 mL。每个配伍比例平行 3 份。

沉淀使用 95%乙醇洗涤 4 次，3 500 r/min 离心 10 min，将上清液转移至 25 mL 量瓶中，合并 2 次上清液用 95%乙醇定容至刻度。将定容好的样品分别在 12 000 r/min 的转速下离心 10 min，取出 600 μ L 于离心管中，涡旋混均，离心 10 min，4 $^{\circ}$ C 保存，待测。

2.1.2 RRLC 色谱条件 采用 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱；柱温为 40 $^{\circ}$ C；体积流量为 0.3 mL/min；进样量为 5 μ L；流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)，梯度洗脱：0~2 min, 99% A；2~5 min, 99%~94% A；5~15 min, 94%~90% A；15~30 min, 90%~80% A；30~31 min, 80%~70% A；31~36 min, 70%~50% A；36~38 min, 50%~30% A；38~39 min, 30%~1% A；39~41 min, 1% A。

2.1.3 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI)，正离子 V 模式检测； m/z 100~1 000；毛细管电压为 4 kV；锥孔电压为 35 V；离子源温度为 120 $^{\circ}$ C；雾化温度为 300 $^{\circ}$ C；壳气体积流量为 900 L/h；干燥器温度 350 $^{\circ}$ C；以亮氨酸-脑啡肽进行精确质量校正([M+H]⁺ m/z 556.2771)。

2.1.4 数据分析 质谱数据采用 Simca-p 软件进行 PLS-DA 分析、峰提取、峰对齐及归一化等处理，分析不同配伍比例之间存在的差异性以及对主要生物碱成分的变化趋势。

2.2 方法学考察

2.2.1 精密度试验 按照上述“2.1.1”项下方法制备制川乌-白蒺(1:1)配伍供试品溶液，连续进样

6 次, 随机选取 20 个色谱峰, 经计算 20 个色谱峰峰面积的 RSD 小于 2%, 保留时间的 RSD 小于 0.7%, 表明仪器精密良好。

2.2.2 重复性试验 平行制备制川乌-白芍 (1:1) 配伍供试品试液 6 份, 依次进样分析, 选取“2.2.1”项下 20 个色谱峰, 经计算各色谱峰峰面积的 RSD 小于 5%, 保留时间的 RSD 小于 2%, 表明重复性良好。

2.2.3 稳定性试验 按照“2.1.1”项下的方法制备制川乌-白芍 (1:1) 配伍供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析, 随机选取 20 个色谱峰 (同“2.2.1”), 经计算各色谱峰峰面积的 RSD 小于 2%, 保留时间的 RSD 小于 1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3 RRLC-Q-TOF-MS 分析结果

2.3.1 13 种生物碱成分的鉴别 制川乌的活性成

分也是其毒性成分, 主要为生物碱类。双酯型生物碱如乌头碱、中乌头碱和次乌头碱等^[6-9], 其水解后生成相应的单酯型和醇胺型生物碱, 较双酯型生物碱毒性大幅降低但仍具有一定活性。本实验着重关注这些生物碱类成分并通过对照品比对和质谱信息鉴定了其中 13 种生物碱。

13 种生物碱类化合物鉴定结果见表 1, 其中 $[M+H]^+$ m/z 646、616、632、590、604、574 离子的质谱图与对照品的质谱图比较, 可以确定峰 13 为乌头碱 ($[M+H]^+$ 646), 峰 12 为次乌头碱 ($[M+H]^+$ m/z 616), 峰 11 为中乌头碱 ($[M+H]^+$ m/z 632), 峰 7 为 14-苯甲酰中乌头原碱 ($[M+H]^+$ m/z 590)、峰 8 为 14-苯甲酰乌头原碱 ($[M+H]^+$ m/z 604)、峰 9 为 14-苯甲酰次乌头原碱 ($[M+H]^+$ m/z 574)。其他化合物质谱数据依据相关文献报道进行质谱峰指认^[10-12]。

表 1 制川乌与白芍共煎液生物碱成分的鉴定

Table 1 Identification of alkaloids in co-decoction of *Aconiti Radix Cocta* with *Ampelopsis Radix*

峰号	t_R / min	实测质荷比	理论质荷比	质谱精确度	对照物质荷比	分子式	鉴别结果
1	12.195	486.269 9	486.270 3	0.823	—	$C_{24}H_{39}NO_9$	中乌头原碱 ^[9]
2	14.616	500.286 8	500.286 9	0.200	—	$C_{25}H_{41}NO_9$	乌头原碱 ^[9]
3	17.004	470.275 6	470.275 4	-0.425	—	$C_{24}H_{41}NO_9$	次乌头原碱 ^[9]
4	24.300	606.291 6	606.291 7	0.165	—	$C_{31}H_{43}NO_{11}$	14-苯甲酰-10-OH-中乌头原碱 ^[9]
5	25.790	620.307 9	620.307 2	-1.128	—	$C_{32}H_{45}NO_{11}$	10-OH-苯甲酰乌头原碱 ^[9]
6	25.801	662.317 3	662.317 7	0.604	—	$C_{34}H_{47}NO_{12}$	10-OH-乌头碱 ^[9]
7	27.017	590.296 8	590.296 5	-0.508	590.303 4	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	14-苯甲酰中乌头原碱
8	28.561	604.311 6	604.312 2	0.993	604.315 7	$C_{32}H_{45}NO_{10}$	14-苯甲酰乌头原碱
9	29.668	574.301 6	574.301 6	0.000	574.306 3	$C_{31}H_{43}NO_9$	14-苯甲酰次乌头原碱
10	30.938	648.302 3	648.302 0	-0.463	—	$C_{33}H_{45}NO_{12}$	10-OH-中乌头碱 ^[9]
11	33.184	632.306 7	632.307 1	0.633	632.305 4	$C_{33}H_{45}NO_{11}$	中乌头碱
12	35.485	616.312 1	616.312 2	0.162	616.313 1	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	次乌头碱
13	35.561	646.322 6	646.322 7	0.155	646.391 8	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	乌头碱

2.3.2 煎煮液与沉积物 RRLC-Q-TOF-MS 的基峰色谱图 (base peak chromatogram, BPC) 比较 煎煮液 BPC 图见图 1, 比较了制川乌单煎、制川乌与白芍合煎 (1:0、1:1、1:3) 的煎煮液 BPC 图的差异。图 1 显示, 单煎 (1:0) 与合煎的煎煮液相比, 合煎液 (1:1) 中 14-苯甲酰乌头原碱和 14-苯甲酰次乌头原碱峰面积值较低, 其他峰无明显差异; 随着白芍的比例增加, 合煎液 (1:3) 中 14-苯甲酰乌头原碱、14-苯甲酰次乌头原碱以及 14-苯甲酰中乌头原碱峰面积比单煎液中 (1:0) 明显减少, 其

他离子峰峰面积也略有减小。

沉积物 BPC 图见图 2, 比较了制川乌单煎 (1:0)、制川乌与白芍合煎 (1:1、1:3) 沉积物的 BPC 图的差异。图 2 显示, 合煎 (1:3) 与单煎 (1:0) 的沉积物相比, 14-苯甲酰-10-OH-中乌头原碱、14-苯甲酰乌头原碱和次乌头碱离子峰峰面积有较显著的增加, 14-苯甲酰乌头原碱和 14-苯甲酰次乌头原碱离子峰峰面积也略有增加, 但其差异不显著。

2.3.3 数据处理 为了更加准确、直观地阐明煎煮液和沉积物中不同比例配伍的制川乌与白芍间差异

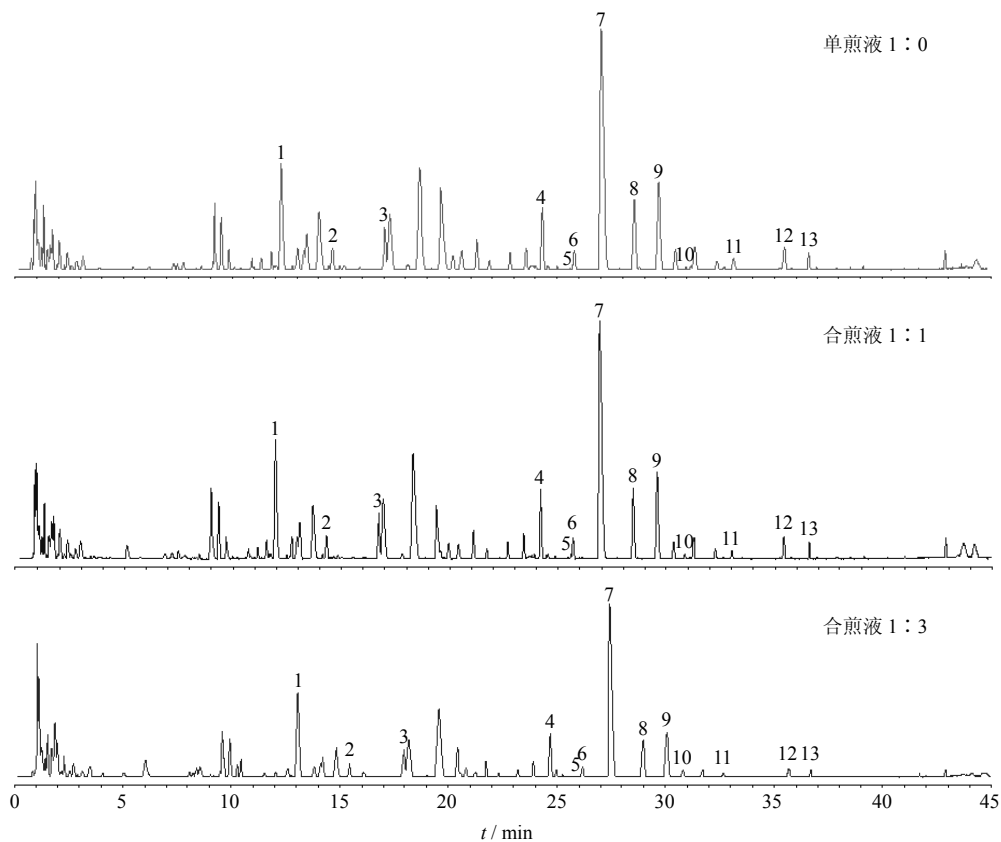


图1 制川乌单煎液 (1 : 0) 和制川乌与白薇合煎液 (1 : 1 和 1 : 3) 的 RRLC-Q-TOF-MS 正离子 BPC 图

Fig. 1 BPC of decoction with single *Aconitum Radix Cocta* (1 : 0), co-decoction of *Aconitum Radix Cocta* with *Ampelopsis Radix* (1 : 1 and 1 : 3)

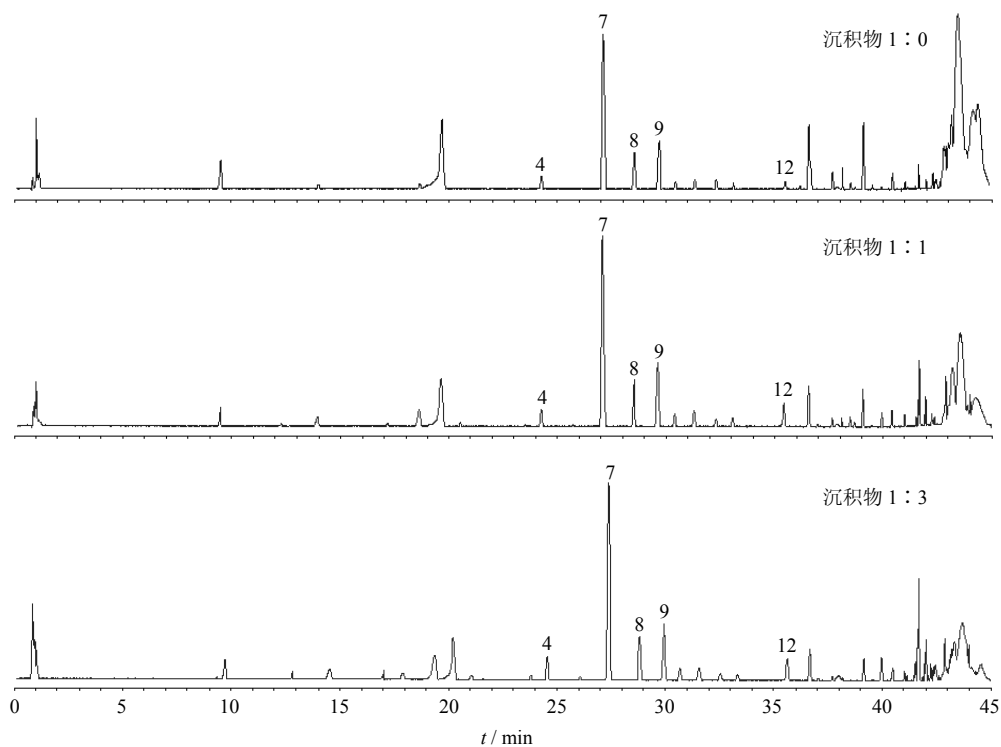


图2 制川乌单煎沉积物 (1 : 0) 和制川乌与白薇合煎沉积物 (1 : 1 和 1 : 3) 的 RRLC-Q-TOF-MS 正离子 BPC 图

Fig. 2 BPC of sediment in single *Aconitum Radix Cocta* decoction (1 : 0), sediment of co-decoction of *Aconitum Radix Cocta* with *Ampelopsis Radix* (1 : 1 and 1 : 3)

性, 本研究所得到的质谱数据经过 Profile Analysis 软件处理后, 将数据导入 Simca-p 11.5 统计软件, 运用 PLS-DA 法进行分析, 同时使用 SPSS 软件进行方差分析, 其结果见图 3 和表 2。由图 3 可见煎煮液中 1:0~1:3、1:0.25~1:3 均有明显的区分, 因此不同的配伍比例是存在差异的, 尤其单煎与配伍比例为 1:3 的煎煮液差异更为显著, 其双酯型、单酯型和醇胺型生物碱的量之间的方差分析结果见表 2, P 值均小于 0.05。而在沉积物中 1:0~1:0.25、1:0.25~1:0.5、1:0~1:3 均分居不同象限且距离较远, 因此不同配比之间存在较大差异, 单煎与配伍比例为 1:3 的沉积物中各生物碱成分差异性显著, P 值也均小于 0.05。而这些差异性主要体现在特征性化合物的量的变化。

由图 4 可知, 煎煮液中多数双酯型、单酯型、醇胺型生物碱的量随着白芷的配伍比例增加呈现下降趋势, 如 10-OH-乌头碱、10-OH-中乌头碱、10-OH-苯甲酰乌头原碱、14-苯甲酰-10-OH-中乌头原碱、乌头原碱、中乌头原碱等化合物的量均随着白芷配

伍比例的增加 (1:0、1:0.25、1:0.5) 而逐渐降低, 而在沉积物中多数生物碱的量随白芷比例增加上呈上升趋势。

2.4 白芷中淀粉的测定

精密称取 0.2 g 的白芷粉末 (过 5 号筛), 加入 80% 硝酸钙溶液至 10 mL; 分别加入 2 mL 0.5% 碘液, 混匀, 静置, 3 500 r/min 离心 15 min, 弃去上清, 沉淀用 5% 的含碘硝酸钙溶液洗涤 2 次, 离心弃去上清; 在沉淀中加入 8 mL 0.1 mol/L NaOH 混匀, 沸水浴 5 min, 使沉淀溶解。冷却后, 25 mL 量瓶定容, 加入 0.3 mL 0.5% 碘液和 1 mol/L 盐酸 5 mL, 在 581 nm 波长处测定吸光度值。以纯淀粉作为对照, 计算白芷中淀粉类成分的量^[13]。

按照上述方法平行制备 6 份供试品溶液, 依次测定分析其重复性; 且其中 1 份连续测定 6 次分析其精密度; 分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定, 分析其稳定性; 平行制备 3 份供试品溶液加入等量的纯淀粉对照品考察加样回收率, 结果其精密度、稳定性、重现性 RSD 均小于 2%, 表明该仪器精密度

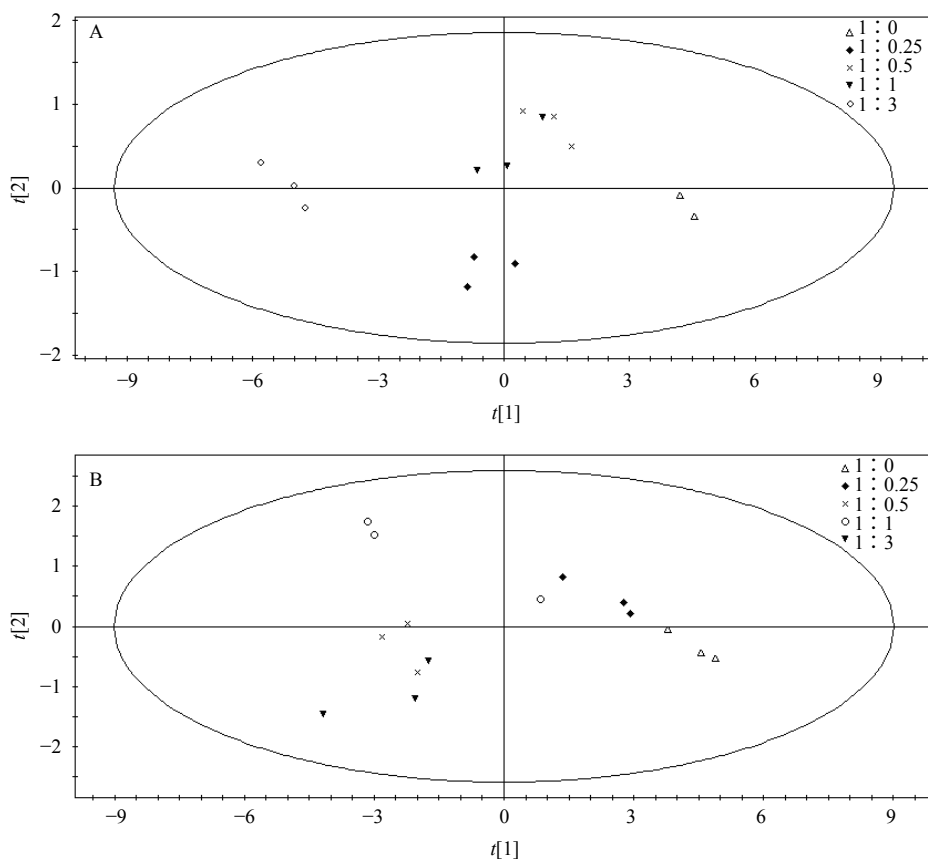


图 3 制川乌与白芷不同配伍比例组合的煎煮液 (A) 和沉积物 (B) 的 PLS-DA 得分图 ($R^2_X=0.816, R^2_Y=0.244, Q^2=0.211$)

Fig. 3 Score plots of PLS-DA for co-decoction of *Aconiti Radix Cocta* with *Ampelopsis Radix* in different ratios (A) and sediment (B) ($R^2_X=0.816, R^2_Y=0.244, Q^2=0.211$)

表2 制川乌与白芍不同配伍比例生物碱差异性分析的P值

Table 2 P value of analysis on alkaloid differences in various ratios of *Aconiti Radix Cocta* with *Ampelopsis Radix*

生物碱 类型	成分	1:0 vs 1:0.25		1:0.25 vs 1:0.5		1:0.5 vs 1:1		1:1 vs 1:3		1:0 vs 1:3	
		煎煮液	沉积物	煎煮液	沉积物	煎煮液	沉积物	煎煮液	沉积物	煎煮液	沉积物
双酯型	10-OH-中乌头碱 (峰 10)	0.261	0.052	0.522	0.025	0.678	0.613	0.007	0.136	0.017	0.001
生物碱	10-OH-乌头碱 (峰 6)	0.103	0.034	0.570	0.016	0.604	0.687	0.002	0.873	0.002	0.001
	次乌头碱 (峰 12)	0.032	0.019	0.851	0.029	0.155	0.369	0.000	0.185	0.000	0.002
	中乌头碱 (峰 11)	0.378	0.120	0.748	0.300	0.435	0.998	0.087	0.118	0.031	0.001
	乌头碱 (峰 13)	0.138	0.091	0.601	0.434	0.476	0.426	0.003	0.770	0.006	0.002
单酯型	10-OH-苯甲酰乌头原碱 (峰 5)	0.003	0.459	0.946	0.008	0.247	0.417	0.004	0.751	0.000	0.003
生物碱	14-苯甲酰-10-OH-中乌头原碱 (峰 4)	0.002	0.685	0.095	0.017	0.116	0.163	0.002	0.356	0.000	0.002
	14-苯甲酰乌头原碱 (峰 8)	0.001	0.184	0.460	0.030	0.532	0.846	0.018	0.461	0.000	0.002
	14-苯甲酰中乌头原碱 (峰 7)	0.000	0.132	0.027	0.005	0.781	0.656	0.011	0.978	0.000	0.001
	14-苯甲酰次乌头原碱 (峰 9)	0.001	0.310	0.674	0.050	0.579	0.813	0.016	0.343	0.000	0.005
醇胺型	乌头原碱 (峰 2)	0.002	0.016	0.014	0.003	0.807	0.131	0.005	0.121	0.000	0.017
生物碱	中乌头原碱 (峰 1)	0.001	0.162	0.003	0.002	0.412	0.011	0.009	0.002	0.001	0.000
	次乌头原碱 (峰 3)	0.001	0.215	0.010	0.000	0.791	0.001	0.006	0.005	0.000	0.001

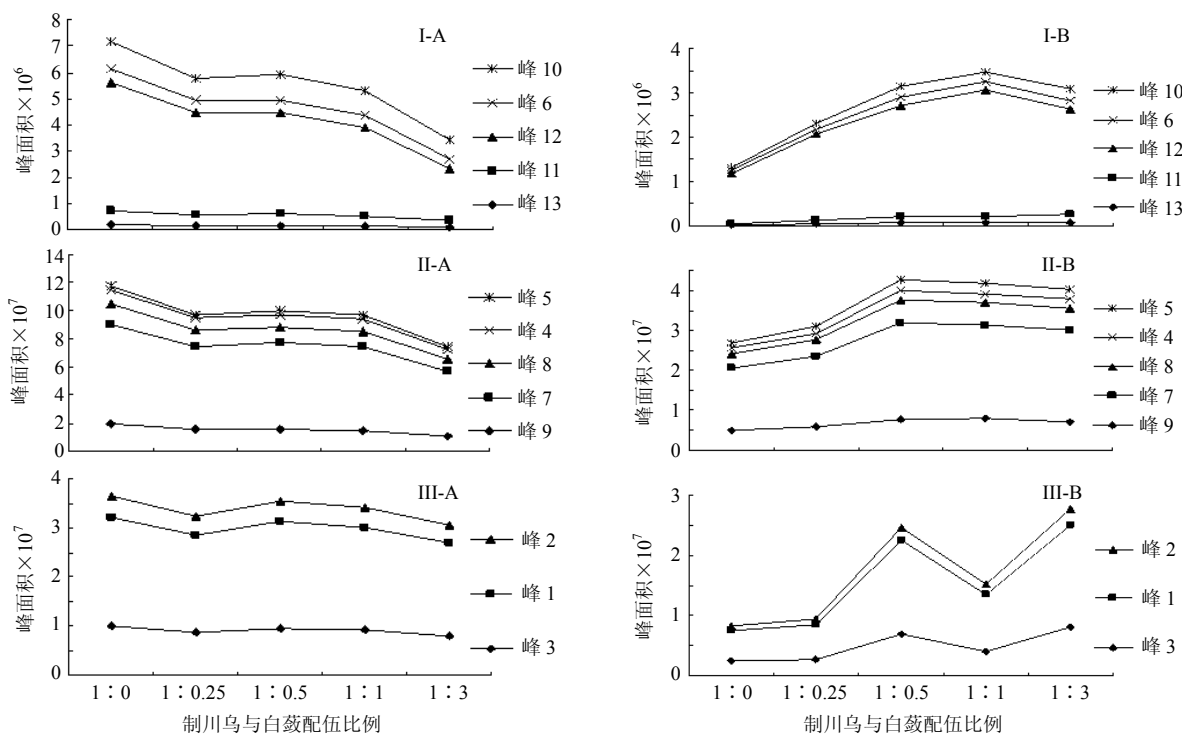


图4 制川乌与白芍不同配伍比例的煎煮液 (A) 和沉积物 (B) 中双酯型 (I)、单酯型 (II) 和醇胺型 (III) 生物碱成分量的变化趋势图

Fig. 4 Content change trends of diester-type (I), monoester-type (II), and alcohol amine-type (III) alkaloids in decoction in various ratios (A) and sediment (B) of *Aconiti Radix Cocta* with *Ampelopsis Radix*

良好, 样品在 24 h 内稳定, 方法重复性良好, 加样回收率达 97.99%, RSD 为 0.19%。以纯淀粉为对照品的标准曲线方程为 $Y=8.673 7 X-0.020 5$, $r=$

0.998 8, 线性范围为 0.02~0.4 mg/mL, 计算可知 0.2 g 白芍中淀粉浓度为 0.204 3 mg/mL, 质量为 50.88 mg, 占白芍生药总量的 25.44%。

2.5 鞣质的测定

精密称定白芷 1.8 g, 加水 150 mL, 放置过夜, 超声 10 min, 加水 100 mL, 摇匀, 静置, 弃去初滤液 50 mL, 精密量取续滤液 20 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。加入依照《中国药典》2010 年版方法配制的磷钼钨酸试液^[13], 取该试液 1 mL, 再分别加水 11.5、11、10、9、8、7 mL, 用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置 30 min, 以相应试剂为空白, 在 760 nm 的波长处测定吸光度值。以没食子酸为对照品计算白芷中鞣质类成分的量^[13]。

按照上述方法, 平行操作 6 份供试品溶液, 依次测定分析重复性; 且其中 1 份连续测定 6 次分析仪器的精密性; 分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定分析样品稳定性, 计算其方法精密性、重现性、稳定性 RSD 均 < 2%, 表明该仪器精密性良好, 样品在 24 h 内稳定, 重复性良好。以没食子酸为对照品的标准曲线方程为 $Y=97.688 X-0.068 8, r=0.999 7$, 线性范围为 2.5~25.0 $\mu\text{g/mL}$, 经计算可得 1.8 g 白芷总酚量为 42.9 mg, 不被吸附的多酚量为 37.3 mg, 鞣质的量 = 总酚量 - 不可吸附的多酚量, 为 5.6 mg, 占白芷总量的 0.31%。

3 讨论

制川乌主要有效成分为剧毒的双酯型生物碱, 而且治疗剂量与中毒剂量接近, 主要包括乌头碱、中乌头碱、次乌头碱等, 经过炮制或煎煮后水解成相应的单酯型二萜生物碱如 14-苯甲酰乌头原碱、14-苯甲酰次乌头原碱、14-苯甲酰中乌头原碱、10-OH-苯甲酰乌头原碱等, 毒性大为降低, 继续水解生成醇胺型的生物碱如次乌头原碱、乌头原碱和中乌头原碱等, 几乎没有毒性^[14-16]。所以本实验主要针对制川乌的关键药效成分进行分析。本研究采用与临床用药一致的煎煮法, 并将制川乌先煎, 旨在对制川乌进行更深入的研究以及实现制川乌临床使用的安全有效提供一定的理论参考。

通过对川乌与半夏、瓜蒌、贝母、白芷等配伍双酯型生物碱变化的影响因素进行研究, 其结果显示可能是由于煎煮过程 pH 值的变化导致的^[17-19]。但是关于配伍前后煎煮液中生物碱类成分变化规律的研究较少^[20-21]。在本课题前期对白芷和制川乌配伍毒性变化的研究过程中发现, 白芷与制川乌的配伍在 1:0.2~1:5 时, 毒性有显著的变化, 因此本实验在此基础上选择区间内的配伍比例进行分析,

并对煎煮液和沉淀中的乌头类生物碱的量都进行了测定(半定量), 发现随着白芷配伍比例的增加乌头类生物碱的量在煎煮液中呈降低趋势, 而在沉淀中呈现上升趋势。

白芷的主要成分为淀粉、有机酚酸类和黄酮类等多羟基物质^[22]。酸性成分可能在煎煮过程中与生物碱类成分发生作用, 对生物碱的溶出及量产生影响。在复方汤剂煎煮过程中, 淀粉类成分在高温水溶液中分散并吸水溶胀, 具有一定的黏性^[23], 而小分子物质与溶胀淀粉混合成均匀糊状溶液, 使其在水溶液中的溶出度受到影响。较高浓度的鞣质类成分在水中形成的胶体具有黏性, 亦可能影响小分子物质的溶出。此外, 淀粉的组成和性质影响中药汤剂的理化性质, 进而对汤剂疗效产生影响^[24]。本实验对白芷中鞣质和淀粉的量进行了测定, 结果表明, 白芷中鞣质的量很低, 仅为 0.31%, 而淀粉的量高达 25% 以上, 实验中制川乌煎煮液中生物碱成分的量随白芷的配比增加而有降低的趋势, 可能是由于白芷中大量淀粉对生物碱的溶出产生影响, 其变化的机制需要进一步探索。

4 结论

本实验初步分析了不同量的白芷与制川乌配伍煎煮后特征化学成分的变化规律, 并对其变化机制进行初步的推测和分析, 研究证实白芷能够显著地影响制川乌中生物碱类成分在煎煮液和沉淀中的量, 由于生物碱类成分是制川乌中的药效成分也是其毒性成分, 生物碱量的变化影响其药效和毒性, 因此白芷通过对生物碱量的影响在配伍过程中对制川乌的作用产生影响, 起到相反的作用, 其变化的规律为“十八反”配伍化学机制的研究提供了科学数据。

参考文献

- [1] 宿树兰, 段金庵, 李文林, 等. 基于物质基础探讨中药“十八反”配伍致毒/增毒机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 123-129.
- [2] 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.
- [3] 于海艳, 金东明. 金东明教授伍用乌药治痹验案 [J]. 长春中医药, 2009, 29(12): 1069.
- [4] 清·程国彭. 医学心悟杂症要义 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 1993.
- [5] 罗国龙, 黄汉清. 白芷瓜蒌反草乌川乌的毒理研究 [J]. 中国医院药学杂志, 1987, 7(7): 318-320.
- [6] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 第 1 版. 北京: 中国中医药

- 出版社, 2005.
- [7] Chen J H, Lee C Y, Liao B C, *et al.* Determination of aconitine-type alkaloids as markers in *fuzi* (*Aconitum carmichaeli*) by LC/(+)-ESI/MS³ [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(4): 1105-1111.
- [8] Singhuber J, Zhu M, Prinz S, *et al.* *Aconitum* in traditional Chinese medicine: A valuable drug or an unpredictable risk? [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(1): 18-30.
- [9] 皮子凤, 越皓, 宋凤瑞, 等. 附子与不同药味药材配伍后乌头碱类生物碱的电喷雾质谱研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(10): 1474-1477.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 王超. 基于液质联用技术的乌头、藜芦配伍禁忌的化学反应 [D]. 长沙: 南华大学, 2011.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [14] 吕立华, 邓铁宏, 胡容峰. 药剂学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [15] 董欣, 王淑敏, 祝恩智, 等. 乌头属中药及其炮制品与浙贝母、川贝母配伍的化学反应 [J]. *中草药*, 2012, 43(2): 265-269.
- [16] 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.
- [17] 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反应 [J]. *化学学报*, 2010, 68(9): 889-896.
- [18] 周思思, 马增春, 梁乾德, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 分析附子半夏配伍相反的物质基础 [J]. *化学学报*, 2012, 70(3): 284-290.
- [19] 张聿梅, 鲁静, 蒋渝, 等. 川乌和制川乌中单酯及双酯型生物碱成分的含量测定 [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(7): 807-812.
- [20] 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(3): 421-431.
- [21] 李飞, 王宇光, 杨亮, 等. UPLC-Q-TOF/MS 分析不同比例丹参配伍藜芦毒性生物碱变化规律 [J]. *化学学报*, 2012, 70(1): 2257-2264.
- [22] 郝军. 白蔹化学成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [23] 陈婷, 宿树兰, 钱叶飞, 等. 乳香-没药配伍前后汤液理化参数变化与化学成分的关联分析 [J]. *中成药*, 2012, 34(8): 1529-1536.
- [24] 李洪娟, 张蕾, 王术光. 白蔹的药理作用及临床应用 [J]. *食品与药品: A 版*, 2007, 9(10): 60-62.