

• 药剂与工艺 •

RRLC-QTOF/MS 研究不同比例制川乌与瓜蒌配伍前后化学成分变化

许妍妍, 程丽丽, 李遇伯, 王 晖, 陈 宁, 张艳军*

天津中医药大学中药学院 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 分析制川乌与瓜蒌配伍前后化学成分变化规律, 为阐释制川乌与瓜蒌配伍禁忌提供物质基础。方法 利用 RRLC-QTOF/MS 分析制川乌与瓜蒌配伍提取液, 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱; 采用 Mass Hunter Workstation 软件和偏最小二乘判别法进行化合物鉴别和差异分析; 以化合物与内标峰面积之比来表示化学标志物的相对质量分数。结果 采用此方法共检测到制川乌-瓜蒌合煎液中 65 种化学成分, 进一步鉴别了其中 57 种成分, 15 种成分在配伍前后有差异, 其溶出受制川乌与瓜蒌配伍比例的变化影响。结论 RRLC-QTOF/MS 方法灵敏、准确, 能够较全面反映制川乌与瓜蒌配伍前后化学成分的变化; 从体外化学物质基础角度分析, 中药“十八反”之乌头与瓜蒌是否相反尚无定论, 还需结合体内实验进一步深入研究。

关键词: RRLC-QTOF/MS; 制川乌; 瓜蒌; 配伍; 化学成分

中图分类号: R283.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)17-2372-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.007

Chemical constituent changes of *Aconiti Cocta Radix* before and after combination with *Trichosanthes Fructus* in different ratios by RRLC-QTOF/MS

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

Tianjin Key Laboratory of Chinese Chemistry and Analysis, College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To analyze the chemical constituent changes of *Aconiti Cocta Radix* (ACR) before and after combination with *Trichosanthes Fructus* (TF) in different ratios and to provide the material bases for the incombination. **Methods** The rapid resolution liquid chromatography with quadrupole and time-of-flight mass spectrometry (RRLC-QTOF/MS) was used to analyze the extract solution from ACR and TF combination. The chromatographic separation was achieved on an Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with 0.1% formic acid water solution-0.1% formic acid in acetonitrile solution as mobile phase for gradient elution. Mass Hunter Workstation and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were utilized for the identification of components and chemical biomarkers. Peak-area ratio of the analyte/internal standard was used to represent the contents of the variance analysis. The amounts of chemical markers were indicated by the ratio of compound and internal standard peak area. **Results** By an overall analysis of RRLC-QTOF/MS, a total of 65 compounds were detected in the extracts from ACR in combination with TF, including 57 compounds with confirmed structures and 15 compounds with significant differences before and after combination, and the relative dissolution rates were affected by the changes of the combination ratios. **Conclusion** The sensitive and accurate RRLC-QTOF/MS method could fully reflect the chemical constituent changes of ACR before and after combination with TF. On the basis of *in vitro* chemical constituent and contents, it is still unclear whether the combination of ACR and TF should be prohibited, which requires further *in vivo* investigation.

Key words: RRLC-QTOF/MS; *Aconiti Cocta Radix*; *Trichosanthes Fructus*; combination; chemical constituent

收稿日期: 2013-03-26

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

作者简介: 许妍妍 (1983—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为中药分析及代谢动力学。E-mail: candyxyy@gmail.com

*通信作者 张艳军 Tel: (022)23051053 E-mail: zyjsunye@163.com

制川乌 (*Aconiti Cocta Radix*, ACR) 为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根炮制品, 为常见中药, 其主要功能为祛风除湿、温经止痛, 用于风寒湿痹、关节疼痛及心腹冷痛等^[1]。《中国药典》2010 年版一部记载制川乌与瓜蒌 (*Trichosanthes Fructus*, TF) 为“十八反”配伍禁忌之一, 而配伍禁忌产生的重要原因为配伍前后药物化学成分的变化。有研究发现生川乌、生附子与瓜蒌配伍的煎煮液中 3 种毒性双酯型生物碱的量高于其单煎液^[2-5], 制川乌与瓜蒌配伍后 3 种双酯型生物碱的量降低^[5], 但对其配伍前后化学成分变化的全面分析的研究报道较少^[6]。本实验以制川乌-瓜蒌药对为研究对象, 采用 RRLC-QTOF/MS 技术分析其不同比例配伍前后的化学成分变化规律, 以期从体外化学物质基础角度全面探讨其是否“相反”的科学内涵。

1 仪器与材料

Agilent 1200 液相系统、6520 四极杆-飞行时间串联质谱系统 (美国 Agilent 公司), BS224S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), KDM 型可控温电热套 (山东省鄄城县新华电热仪器厂), 5804R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

制川乌 *Aconiti Cocta Radix*、瓜蒌 *Trichosanthes Fructus* 分别购自四川江油、江苏洪泽, 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乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根炮制加工品、葫芦科栝楼属植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥成熟种子。乌头碱 (批号 110720-200410)、次乌头碱 (批号 110798-200805)、新乌头碱 (批号 110799-200505)、苯甲酰乌头原碱 (批号 110797-200405)、苯甲酰次乌头原碱 (批号 111796-201002)、苯甲酰新乌头原碱 (批号 11795-200901) 均购自中国药品生物制品检定所, 氧化苦参碱由山东省分析测试中心重点实验室提供, 经 HPLC 峰面积归一化法测得其质量分数 >98%。乙腈、甲醇均为色谱纯 (韩国 Duksan 公司), 甲酸为色谱纯 (美国 Sigma 公司), 无水乙醇为分析纯 (天津市广成化学试剂有限公司), 娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱各 1.0 mg, 分别置 1 mL 量瓶中, 乙腈溶解并稀

释至刻度, 配制成 1 mg/mL 储备液。

精密量取各储备液 100 μ L, 乙腈逐步稀释成 10 μ g/mL 的工作液。精密量取各溶液 100 μ L 于 1 mL 量瓶中, 乙腈稀释至刻度, 即制得 1 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2 内标溶液的制备

精密称取氧化苦参碱 2.5 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 乙腈溶解并稀释至刻度, 即制得 50 μ g/mL 的内标溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 配伍组供试液的制备 根据《中国药典》2010 年版推荐剂量制川乌 1.5~3 g/(d·人), 瓜蒌 9~15 g/(d·人) 设定配伍比例, 固定制川乌质量, 分别精密称取制川乌粉末 (过 3 号筛) 1.0 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h 后, 加热回流提取 1 h, 按制川乌-瓜蒌 6 种比例 (4:1、2:1、1:1、1:3、1:5、1:10) 分别加入已精密称取并单独浸泡 1 h 的瓜蒌粉末, 合煎 0.5 h 后, 4 000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至量瓶中; 药渣加入 8 倍量蒸馏水, 再煎煮 1.5 h, 4 000 r/min 离心 5 min; 残渣加入 5 mL 蒸馏水混匀, 4 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 4 次, 合并 6 次离心上清液, 定容, 备用。

2.3.2 单煎供试液的制备 精密称取制川乌粉末 (过 3 号筛) 1.0 g, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h, 共煎 2 次, 第 1 煎 1.5 h, 4 000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至容量瓶中; 药渣加入 8 倍量蒸馏水再煎 1.5 h, 4 000 r/min 离心 5 min; 残渣加入 5 mL 蒸馏水混匀, 4 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 4 次, 合并 6 次离心上清液, 定容, 备用。

精密称取瓜蒌粉末 1.0 g, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加 10 倍量蒸馏水浸泡 1 h, 共煎 2 次, 第 1 煎 0.5 h, 4 000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至容量瓶中; 药渣加入 8 倍量蒸馏水再煎 1.5 h, 4 000 r/min 离心 5 min; 残渣加入 5 mL 蒸馏水混匀, 4 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 4 次, 合并 6 次离心上清液, 定容, 备用。

进样前取适量溶液, 10 000 r/min 离心 10 min, 精密量取 500 μ L 上清液, 加入 20 μ L 氧化苦参碱溶液 (50 μ g/mL) 作为内标, 涡旋混匀 1 min, 即得各供试品溶液。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m); 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, 1% B; 2~5 min, 1%~6% B; 5~15 min, 6%~10% B; 15~20 min, 10%~20% B; 20~31 min, 20%~30% B; 31~36 min, 30%~50% B; 36~38 min, 50%~70% B; 38~39 min, 70%~99% B; 39~41 min, 99% B; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 5 μ L。

2.5 质谱条件

RRLC-QTOF/MS 系统在电喷雾正离子模式下采集数据, 质量扫描范围为 m/z 100~1 000, 毛细管电压 4 kV, 雾化气压力 241.325 kPa, 干燥气体积流量 10 L/min, 干燥气温度 350 °C, Skimmer 65 V, 选取 m/z 121.050 873 和 m/z 922.009 798 的内标离子作实时质量数校正, 测定样品前采用混标调谐液校准质量轴。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 按照“2.3.1”项下方法制备制川乌与瓜蒌配伍组 (1:1) 供试品溶液, 连续进样 6 次, 随机选取 20 个色谱峰, 经计算, 20 个色谱峰峰面积积分值的 RSD 在 0.7%~1.8%, 表明仪器精密度良好。

2.6.2 重复性试验 按照“2.3.1”项下方法平行制备 6 份制川乌与瓜蒌配伍组 (1:1) 供试品溶液, 依次进样分析, 选取“2.6.1”项下 20 个色谱峰, 经计算, 各色谱峰峰面积积分值的 RSD 在 2.1%~4.9%, 表明方法精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 按照“2.3.1”项下方法制备制川乌与瓜蒌配伍组 (1:1) 供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析, 选取“2.6.1”项下 20 个色谱峰, 经计算, 各色谱峰峰面积积分值的 RSD 在 0.7%~2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 所以每批样品保证在 24 h 内测定。

2.7 样品测定

在方法学考察合格的基础上, 按照“2.3”项下方法制备制川乌与瓜蒌不同比例配伍供试品溶液 ($n=3$), 采用内标半定量方法进行测定, 数据使用 Mass Hunter Workstation 进行色谱峰提取, 基峰强度色谱图 (base peak intensity chromatogram, BPC) 见图 1。

2.8 结果分析

2.8.1 化学成分的鉴别 比较图 1 中瓜蒌单煎液、制川乌单煎液和不同比例制川乌配伍瓜蒌共煎液可

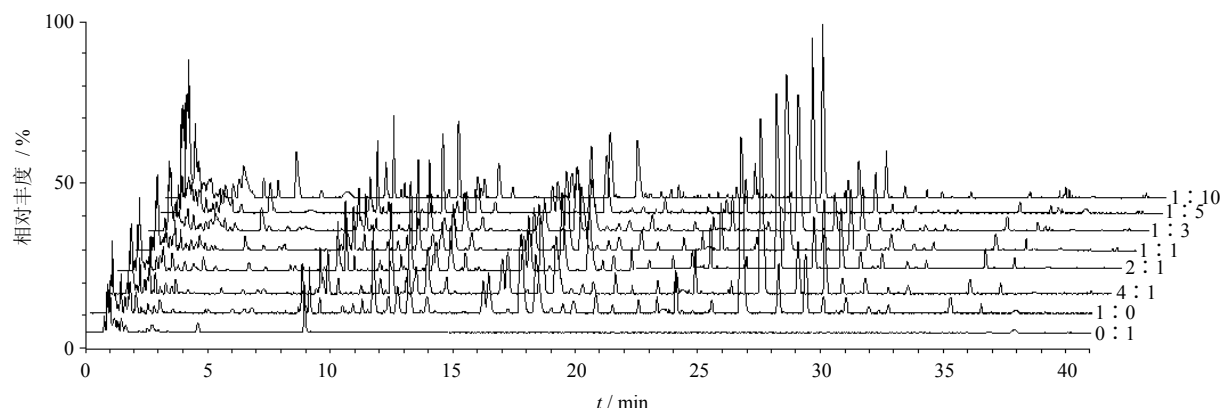


图 1 不同比例制川乌与瓜蒌配伍药液 BPC 图

Fig. 1 BPC chromatograms for solution of ACR by combination with TF in different ratios

见, 在本方法检测条件下未检测到瓜蒌中化学成分, 制川乌与瓜蒌不同配伍比例水提取液与制川乌单煎液相比没有新化合物产生。在制川乌单煎液和不同配伍提取液中共检测到 65 个成分, 见图 2 和表 1。化合物 43、46、47、56、60、61 通过与对照品对比, 分别鉴定为苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱以及乌头碱, 其余 59 种成分经 MS/MS 质谱分析以及文献报道^[7-26]对照, 进一步推断了其中 51 种成分, 鉴

定结果见表 1。

2.8.2 配伍前后化学成分的变化 将 Mass Hunter Workstation 软件处理后的数据导入 SIMCA-P+12.0 统计软件, 进行偏最小二乘判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)^[27-28], 数据分析结果见图 3。由图 3 以及变量重要性投影 (variable importance plot, VIP) 分析可知, 制川乌与瓜蒌不同比例配伍后有明显区分, 筛选 VIP 值大于 1 且与制川乌单煎液相比经 t 检验有显著性差异

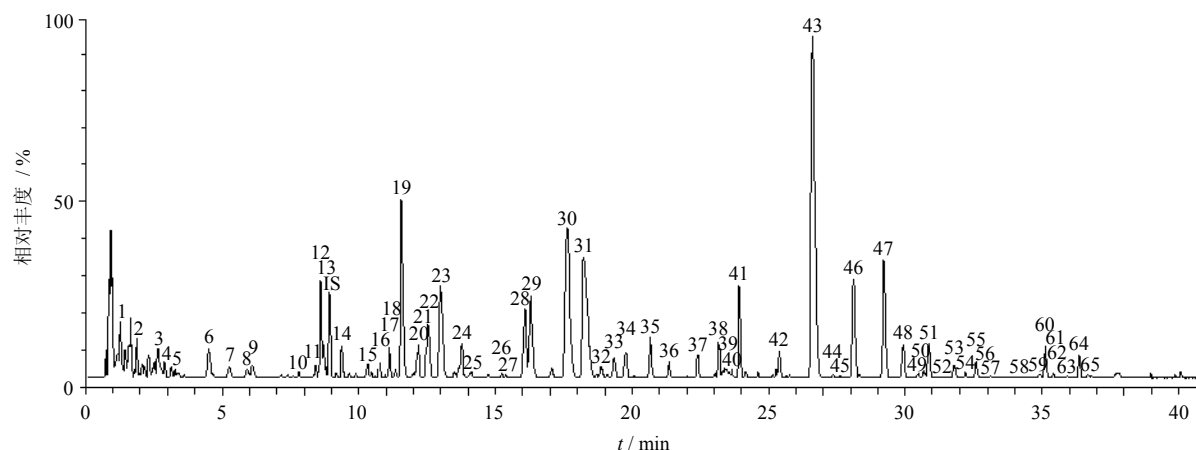


图2 制川乌与瓜蒌配伍药液 BPC 图

Fig. 2 BPC chromatograms for solution of ACR by combination with TF

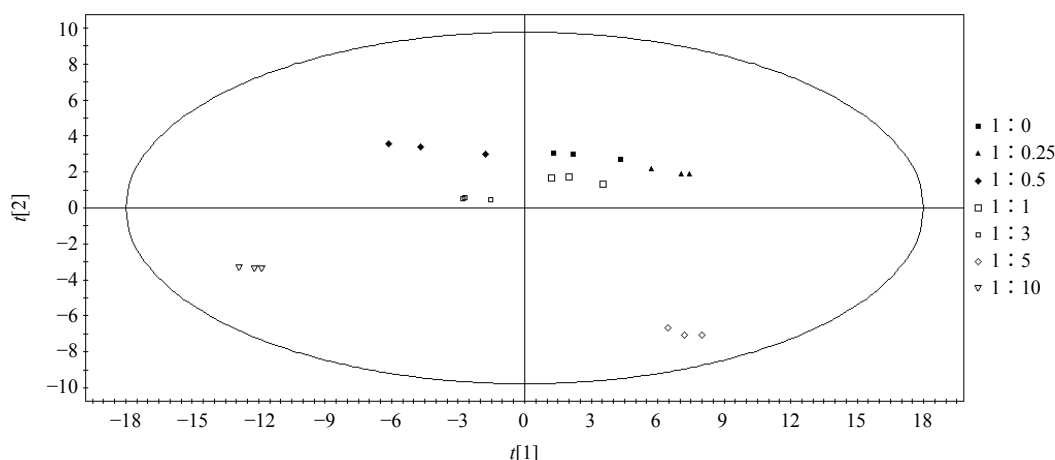
表1 制川乌与瓜蒌配伍药液化学成分鉴定结果

Table 1 Chemical constituents identified in solution for ACR by combination with TF

峰号	$[M+H]^+$ (m/z)	t / min	分子式	化合物名称	峰号	$[M+H]^+$ (m/z)	t / min	分子式	化合物名称
1	305.133 6	1.280	$C_{20}H_{34}NO$	未知化合物 1	27	436.233 6	15.339	$C_{23}H_{33}NO_7$	pengshenine A
2	180.101 8	1.890	$C_{10}H_{13}NO_2$	去甲猪毛菜碱	28	470.276 6	16.080	$C_{24}H_{39}NO_8$	次乌头原碱
3	488.248 3	2.660	$C_{23}H_{37}NO_{10}$	beiwutinine	29	454.280 5	16.280	$C_{24}H_{39}NO_7$	附子灵 (或其同分异构体)
4	268.104 4	3.124	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	腺苷	30	438.285 5	17.620	$C_{24}H_{39}NO_6$	尼奥灵
5	392.243 3	3.365	$C_{22}H_{33}NO_5$	脱氢川附宁	31	342.171 2	18.230	$C_{20}H_{23}NO_4$	附子亭
6	178.086 4	4.822	$C_{10}H_{11}NO_2$	未知化合物 2	32	484.290 6	18.880	$C_{25}H_{41}NO_8$	脱氧乌头原碱
7	472.248 7	5.819	$C_{23}H_{37}NO_9$	<i>N</i> -deethylaconine	33	454.281 2	19.360	$C_{24}H_{39}NO_7$	附子灵 (或其同分异构体)
8	394.259 6	6.301	$C_{22}H_{35}NO_5$	10-羟基-多根乌头碱	34	344.256 6	19.770	$C_{22}H_{33}NO_2$	雪上一枝蒿甲素
9	440.263 4	6.575	$C_{23}H_{37}NO_7$	9-羟基-森布星 A	35	422.290 7	20.680	$C_{24}H_{39}NO_5$	塔拉地萨敏
10	456.259 9	7.967	$C_{23}H_{37}NO_8$	未知化合物 3	36	438.285 2	21.350	$C_{24}H_{39}NO_6$	10-羟基-塔拉地萨敏
11	208.132 9	8.503	$C_{12}H_{17}NO_2$	猪毛菜定碱	37	452.298 5	22.400	$C_{25}H_{41}NO_6$	查斯曼宁碱
12	394.258 8	8.657	$C_{22}H_{35}NO_5$	川附宁	38	576.280 7	12.180	$C_{30}H_{41}NO_{10}$	脱甲基苯甲酰新乌头原碱
13	502.263 4	8.755	$C_{24}H_{39}NO_{10}$	10-羟基-新乌头原碱	39	372.217 6	23.369	$C_{22}H_{29}NO_4$	11-乙酰海替生
14	424.267 6	9.360	$C_{23}H_{37}NO_6$	森布星 A	40	464.298 9	23.660	$C_{26}H_{41}NO_6$	14-乙酰塔拉地萨敏
15	378.264 5	10.300	$C_{22}H_{35}NO_4$	未知化合物 4	41	606.294 9	23.930	$C_{31}H_{43}NO_{11}$	10-羟基-苯甲酰新乌头原碱
16	424.269 9	10.738	$C_{23}H_{37}NO_6$	森布星 B	42	620.307 4	25.390	$C_{32}H_{45}NO_{11}$	10-羟基-苯甲酰乌头原碱
17	364.247 2	11.110	$C_{21}H_{33}NO_4$	16- β -hydroxycardiopetaline	43	590.297 6	26.590	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	苯甲酰新乌头原碱
18	516.280 8	11.330	$C_{25}H_{41}NO_{10}$	10-羟基-乌头原碱	44	540.293 8	27.360	$C_{31}H_{41}NO_7$	未知化合物 5
19	486.273 1	11.560	$C_{24}H_{39}NO_9$	新乌头原碱	45	544.291 4	27.620	$C_{30}H_{41}NO_8$	3-乙酰-10-羟基-新乌头原碱
20	378.265 1	12.170	$C_{22}H_{35}NO_4$	卡乌碱	46	604.312 6	28.10	$C_{32}H_{45}NO_{10}$	苯甲酰乌头原碱
21	454.280 2	12.490	$C_{24}H_{39}NO_7$	脱甲氧基脱氧乌头原碱	47	574.302 0	29.210	$C_{31}H_{43}NO_9$	苯甲酰次乌头原碱
22	408.274	12.550	$C_{23}H_{37}NO_5$	异塔拉定	48	572.286 7	29.950	$C_{31}H_{41}NO_9$	焦新乌头原碱
23	358.238 4	13.000	$C_{22}H_{31}NO_3$	宋果灵					
24	500.285 1	13.760	$C_{25}H_{41}NO_9$	乌头原碱					
25	330.206 7	14.090	$C_{20}H_{27}NO_3$	海替生					
26	406.259 1	15.219	$C_{23}H_{35}NO_5$	脱甲基-14-乙酰多根乌头碱					

续表 1

峰号	$[M+H]^+$ (m/z)	t/min	分子式	化合物名称	峰号	$[M+H]^+$ (m/z)	t/min	分子式	化合物名称
49	648.302 1	30.460	$C_{33}H_{45}NO_{12}$	10-羟基-新乌头碱	57	662.316 9	33.110	$C_{34}H_{47}NO_{12}$	10-羟基-乌头碱
50	558.306 2	30.665	$C_{31}H_{44}NO_8$	脱氧苯甲酰次乌头原碱	58	614.295 4	34.061	$C_{33}H_{43}NO_{10}$	2, 3-脱氢次乌头原碱
51	588.318 5	30.870	$C_{32}H_{45}NO_9$	脱氧苯甲酰乌头原碱	59	570.307 2	34.915	$C_{32}H_{43}NO_8$	焦脱氧乌头碱
52	618.289 2	31.487	$C_{33}H_{47}NO_{10}$	8-乙氧基-14-苯甲酰新乌头原碱	60	616.310 9	35.140	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	次乌头碱
53	530.309 7	31.790	$C_{30}H_{43}NO_7$	未知化合物 6	61	646.323 5	35.250	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	乌头碱
54	586.300 2	32.190	$C_{32}H_{43}NO_9$	焦乌头碱	62	600.316 8	35.748	$C_{33}H_{45}NO_9$	脱氧次乌头碱
55	556.292 3	32.600	$C_{31}H_{41}NO_8$	焦次乌头碱	63	628.311 4	35.901	$C_{34}H_{45}NO_{10}$	未知化合物 7
56	632.307 8	32.740	$C_{33}H_{45}NO_{11}$	新乌头碱	64	700.277 0	36.360	$C_{39}H_{41}NO_{11}$	未知化合物 8
					65	630.326 7	36.790	$C_{34}H_{47}NO_{10}$	脱氧乌头碱

图3 不同比例制川乌与瓜蒌配伍的 PLS-DA 得分图 ($R^2_X=0.988$, $R^2_Y=0.984$, $Q^2=0.954$)Fig. 3 PLS-DA score plot of ACR by combination with TF in different ratios ($R^2_X=0.988$, $R^2_Y=0.984$, $Q^2=0.954$)

的 15 个化合物为化学标志物, 结果见表 2。

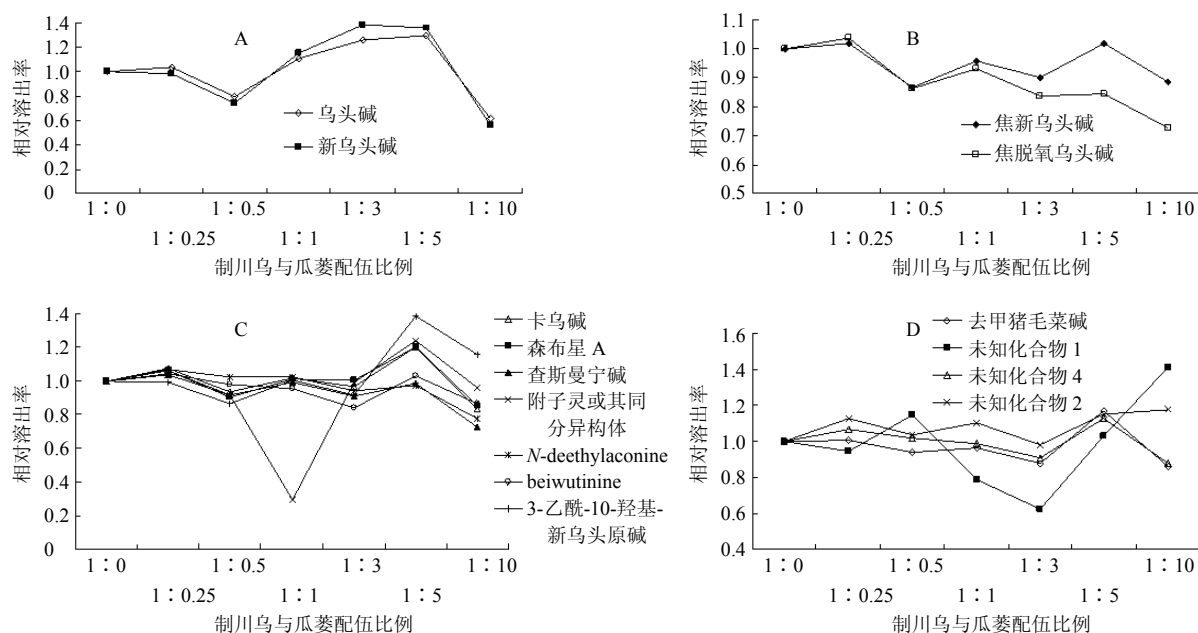
2.8.3 化学标志物的质量分数变化 以化学标志物的峰面积与内标物的峰面积之比来表示化学标志物的相对质量分数, 采用相对溶出率来反映制川乌与瓜蒌配伍前后化学标志物的溶出变化。各化学标志物通过与制川乌单煎液对比计算相对溶出率^[29-31],

化学标志物的溶出随瓜蒌比例增加的变化趋势见图 4。可见制川乌中毒性最大的双酯型生物碱乌头碱和新乌头碱随瓜蒌比例的增加, 溶出规律基本一致, 即当配伍比例为 2:1 时, 瓜蒌抑制了乌头碱和新乌头碱溶出; 当配伍比例达到 1:1~1:5 时, 瓜蒌明显促进了其溶出; 随着配伍比例增加到 1:10, 瓜

表 2 制川乌与瓜蒌配伍药液的化学标志物

Table 2 Chemical markers of ACR by combination with TF

序号	$[M+H]^+$ (m/z)	化合物名称	VIP	序号	$[M+H]^+$ (m/z)	化合物名称	VIP
1	454.280 5	附子灵 (或其同分异构体, $t_R=16.280$ min)	2.854 48	8	632.307 8	新乌头碱	1.274 46
2	178.086 4	未知化合物 2	1.852 21	9	572.286 7	焦新乌头碱	1.271 31
3	305.133 6	未知化合物 1	1.548 46	10	452.298 5	查斯曼宁碱	1.186 34
4	488.248 3	beiwutinine	1.457 06	11	180.101 8	去甲猪毛菜碱	1.148 91
5	378.265 1	卡乌碱	1.444 86	12	646.323 5	乌头碱	1.099 13
6	472.248 7	N-deethylaconine	1.323 96	13	570.307 2	焦脱氧乌头碱	1.097 48
7	544.291 4	3-乙酰-10-羟基-新乌头原碱	1.296 77	14	378.264 5	未知化合物 4	1.075 23
				15	424.267 6	森布星 A	1.046 16



A-双酯型二萜类生物碱 B-单酯型二萜类生物碱衍生物 C-醇胺型二萜类生物碱 D-其他类化合物
A-diester-diterpenoid alkaloids B-derivatives of monoester-diterpenoid alkaloids C-amine-diterpenoid alkaloids D-other compounds

图4 不同比例制川乌与瓜蒌配伍化学标志物量的变化趋势图 ($n=3$)

Fig. 4 Content change trends of chemical markers of ACR by combination with TF in different ratios ($n=3$)

蒌明显抑制了其溶出。单酯型生物碱衍生物焦新乌头碱和焦脱氧乌头碱整体上随配伍比例的增加呈逐渐减少趋势,说明瓜蒌抑制了焦新乌头碱和焦脱氧乌头碱的溶出。醇胺型生物碱附子灵(或其同分异构体)在制川乌与瓜蒌 1:1 配伍时显著降低,当配伍比例增加到 1:5~1:10 时,瓜蒌促进附子灵(或其同分异构体)的溶出,在其他配比下溶出率变化较小。

未知化合物 1 (m/z 305.133 6) 在制川乌与瓜蒌 4:1 配伍时,溶出略微降低;随着配伍比例增加到 2:1 时,瓜蒌促进其溶出,当配伍比例增加到 1:1~1:3 时,其溶出受到明显抑制,而配伍比例再增加,未知化合物 1 溶出逐渐增加并在制川乌与瓜蒌配伍达到 1:10 时相对溶出率最高;其他化学标志物随瓜蒌配伍比例的增加,均出现了影响溶出的促进与抑制交替现象。

3 讨论

C₁₉-乌头碱型二萜生物碱既是川乌的特征活性成分,也是其毒性成分^[32]。根据其结构特点,可分为双酯型、单酯型、脂型和醇胺型二萜生物碱,其中双酯型生物碱毒性最大,乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的小鼠 LD₅₀ 分别为 1.8、1.9、5.8 mg/kg^[33-34]。乌头类生物碱的活性、毒性与其结构有着密切的关

系,取代基位置、数目、种类的不同均可使川乌在活性、毒性等方面有较大的差异。生川乌中双酯型生物碱的量高,毒性较大,临床上常用其炮制品,在川乌炮制过程中^[33],双酯型生物碱 C₈、C₁₄ 位酯键可逐渐水解,成为单酯型生物碱和醇胺型生物碱,毒性明显降低(约为双酯型生物碱毒性的 1/200 和 1/2 000),提示双酯型生物碱的毒性与 C₈、C₁₄ 位酯键有关,而 C₈ 位乙酰氧基或乙氧基、C₁₄ 位的芳基取代与川乌的镇痛活性密切相关^[35]。

乌头与瓜蒌为“十八反”反药组合,存在配伍禁忌,临床上瓜蒌常与乌头类药材配伍用于慢性胃炎、心绞痛、痹症^[36-39]等疾病治疗,疗效显著,因此对其配伍禁忌的科学性至今仍存争议。配伍禁忌产生的基础之一为配伍前后化学成分的变化,本实验利用 RRLC 的快速高分离液相以及半定量 Q-TOF/MS 质谱分析,从制川乌-瓜蒌配伍药液中检测到 65 种乌头类生物碱成分,以单酯型生物碱和醇胺型生物碱为主,双酯型生物碱较少,更全面揭示了其体外化学内涵。研究结果表明,制川乌与瓜蒌合煎、久煎提取时,制川乌中包括双酯型生物碱、单酯型生物碱衍生物等 15 种化学标志物的溶出发生变化,并随瓜蒌配伍比例的增加呈现溶出促进与抑制的交替变化,表明在一定的配伍条件下,瓜蒌能

够影响制川乌化学成分的溶出。

中药化学成分复杂,作用机制复杂,配伍产生毒/效除与药物基源、配伍比例、煎煮时间、化学成分等相关外,更与体内药物代谢、患者病症等多方面因素有密切联系。有研究报道^[2,5,40]制川乌与瓜蒌合煎后双酯型生物碱的量虽然降低,但制川乌配伍全瓜蒌高剂量给药对正常大鼠肝脏、肾脏具有不可逆的损伤,在适当剂量范围内,则具有可逆的消化系统及肝肾毒性,对心衰病证模型动物具有改善症候的作用。可见“十八反”配伍禁忌不是绝对的。制川乌与瓜蒌配伍是否相反、为何反以及如何反等科学问题,还需结合作用物质基础、体内代谢、药理作用、辨证论治等多方面进行更全面、系统、科学的深层次研究与探讨。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 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.
- [3] 张蓉娟. 附子瓜蒌合煎成分变化的研究 [D]. 咸阳: 陕西中医学院, 2011.
- [4] 董欣. 中药附子与“半夏贝蔹芩”配伍的化学研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2011.
- [5] 张琦. 十八反“半夏贝蔹芩攻乌”物质基础及毒性研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2010.
- [6] 王超. 基于液质联用技术的乌头、藜芦配伍禁忌的化学研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2011.
- [7] Hu R, Zhao J, Qi L W, *et al.* Structural characterization and identification of C₁₉- and C₂₀-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.
- [8] 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.
- [9] 魏巍. 乌头碱降解产物化学成分及生物活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [10] 丁立生, 吴凤镏, 陈耀祖. 紫乌头中的二萜生物碱研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1991, 3(4): 19-23.
- [11] 陈迪华, 梁晓天. 中药附子成分研究—I. 去甲猪毛菜碱 (salsolinol) 的分离及其结构测定 [J]. 药学学报, 1982, 17(10): 792-794.
- [12] 赵宇峰, 宋凤瑞, 越皓, 等. 乌头碱的代谢产物去氧乌头碱的生物转化及其电喷雾串联质谱 [J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(11): 2051-2055.
- [13] 王勇, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 草乌花及其煎煮液中二萜生物碱的电喷雾串联质谱研究 [J]. 药学学报, 2003, 38(4): 290-293.
- [14] Zhang F, Peng S L, Luo F, *et al.* Two new norditerpenoid alkaloids of *Aconitum nagarum* [J]. *Chin Chem Lett*, 2005, 16(8): 1043-1046.
- [15] 葛永辉, 穆淑珍, 张建新, 等. 岩乌头根部的生物碱类成分及其抗PAE活性 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1935-1937.
- [16] 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.
- [17] Liu X X, Jian X X, Cai X F, *et al.* Cardioactive C₁₉-diterpenoid alkaloids from the lateral roots of *Aconitum carmichaeli* “Fu Zi” [J]. *Chem Pharm Bull*, 2012, 60(1): 144-149.
- [18] Cai L, Chen D L, Liu S Y, *et al.* New C₁₉-diterpenoid alkaloids from *Aconitum piepunense* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(6): 779-781.
- [19] 谢思敏, 林朝展, 祝晨蓀, 等. 藏药“嘎布得罗”化学成分研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 546-548.
- [20] 彭崇胜, 王建忠, 间锡贤, 等. 高乌头和彭州岩乌头中生物碱成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(4): 45-51.
- [21] Zhu H B, Wang C Y, 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.
- [22] 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): 1-12.
- [23] Sun H, Wang M, Zhang A H, *et al.* UPLC-Q-TOF-HDMS analysis of constituents in the root of two kinds of *Aconitum* using a metabolomics approach [J]. *Phytochem Anal*, 2013, 24(3): 263-276.
- [24] 章津铭, 李玲, 高飞, 等. 附子配伍甘草前后汤液沉积物的 HPLC-MS 化学组成分析 [J]. 药学学报, 2012, 47(11): 1527-1533.
- [25] Wu J, Hong B, Wang J, *et al.* The comparative research on constituents of *Radix Aconiti* and its processing by HPLC quadrupole TOF-MS [J]. *Biomed Chromatogr*,

- 2012, 26(11): 1301-1307.
- [26] 谭光国. 中药四逆汤化学物质组和代谢组学研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [27] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 481-489.
- [28] Bijlsma S, Bobeldijk I, Verheij E R, *et al.* Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-) processing and validation [J]. *Anal Chem*, 2006, 78(2): 567-574.
- [29] 陈艳琰, 钱大玮, 尚尔鑫, 等. 基于化学成分相互作用探讨羌花与甘草配伍禁忌的机制 [J]. 药学学报, 2012, 47(8): 1043-1048.
- [30] 汤响林, 易剑峰, 梁乾德, 等. 人参-附子配伍比例对人参皂苷成分溶出影响研究 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 36-41.
- [31] 张 鲁, 李遇伯, 李利新, 等. 制川乌与法半夏不同比例配伍组合对乌头类生物碱的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 681-685.
- [32] Borcsa B, Widowitz U, Csupor D, *et al.* Semisynthesis and pharmacological investigation of lipo-alkaloids prepared from aconitine [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(3): 365-368.
- [33] 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.
- [34] Csupor 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.
- [35] 蔡超群, 杨春华, 梁敬钰, 等. 乌头属二萜生物碱成分构效关系研究进展 [J]. 海峡药学, 2013, 25(3): 1-5.
- [36] 彭振声. 半夏瓜蒌附子配伍治疗慢性胃炎 67 例疗效观察 [J]. 实用中医药杂志, 1994(2): 110.
- [37] 张国江, 李桂林. 乌头与瓜蒌、半夏同用治疗心绞痛的体会 [J]. 河北中医药学报, 2009, 24(1): 46.
- [38] 王为民. 对乌头反贝母、瓜蒌、半夏的探讨 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(3): 183.
- [39] 李春娟, 金东明. 金东明教授伍用附蒌治痹验案举隅 [J]. 吉林中医药, 2010, 30(11): 980-981.
- [40] 尹 航. 川乌配伍瓜蒌药效学及毒性研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2011.