

基于 UPLC-MS 技术分析马钱子-甘草药对配伍汤液不同相态中毒效物质的变化规律

郭玉岩¹, 马文保¹, 肖洪彬¹, 闫静¹, 李国玉², 孙爽¹, 杨大字¹, 吕邵娃^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 以相态角度为出发点, 研究马钱子-甘草配伍减毒的作用规律。 **方法** 采用自然沉降法、高速离心法及层析透析技术对马钱子单煎液、马钱子-甘草配伍共煎液进行相态拆分研究; 建立毒效物质 UPLC-MS 测定法, 对比研究 4 个不同相态中马钱子碱和土的宁量分布的差异, 分析毒效物质量的变化规律。 **结果** 配伍汤液可拆分为真溶液组、胶体溶液组、混悬液组及沉积物组 4 个不同相态; 在选定的色谱条件下马钱子碱和土的宁均得到良好分离, 分别在 0.020~2.008、0.022~2.236 μg 线性关系良好 (r 均为 0.999 8), 回收率为 96.84%、97.62%, 表明方法学良好; 测定单煎液不同相态中马钱子碱和土的宁量的分布呈现相同变化规律, 即胶体组 > 溶液组 > 沉积物组 > 混悬组, 配伍汤液不同相态马钱子碱和土的宁也呈现相同的分布规律, 即沉积物组 > 胶体组 > 混悬组 > 溶液组。 **结论** 马钱子经甘草配伍后其毒效物质的量均有降低, 毒性最强的土的宁的量降低尤为明显, 且主要集中在沉积物组分; 不同相态中毒效物质变化规律的研究表明, 配伍甘草后的沉积物组分的缓释作用, 是实现减毒增效关键因素。

关键词: UPLC-MS; 马钱子; 甘草; 药对; 配伍; 相态; 毒效物质; 配伍减毒; 成分分析; 自然沉降; 透析; 高速离心; 真溶液; 胶体溶液; 混悬液; 沉积物; 马钱子碱; 土的宁; 缓释

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)23-4880-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.010

Changes of toxic substance in different phase of compatibility decoction *Strychni Semen* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* based on UPLC-MS technique

GUO Yu-yan¹, MA Wen-bao¹, XIAO Hong-bin¹, YAN Jing¹, LI Guo-yu², SUN Shuang¹, YANG Da-yu¹, LV Shao-wa¹

1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: **Objective** To study the mechanism of attenuated *Strychni Semen* (SS) and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (GRR) compatibility with the phase angle as the starting point. **Methods** The phase separation of SS single decoction and compatibility decoction was carried out by natural sedimentation, dialysis and high-speed centrifugation. UPLC-MS assay was used to study the differences in the distribution of brucine and strychnine in four different phases, and the change of the amount of toxic substances was analyzed. **Results** The compatibility of the decoction can be divided into four groups: true solution group, colloidal solution group, suspension group, and sediment group. Brucine and strychnine were well separated under the selected chromatographic conditions. The linear relationship was good in the range of 0.020—2.008 and 0.022—2.236 μg ($r = 0.999\ 8$), and the recovery was 96.84% and 97.62%, which indicated that the method was good. The distribution of brucine and strychnine in the different phase of the single decoction showed the same variation regularity, colloid group > solution group > sediment group > suspended group; Compatibility decoction of different phase of brucine and strychnine also showed the same distribution, sediment group > colloidal group > suspension group > solution group. **Conclusion** The contents of toxic substances in SS were decreased after compatibility with GRR, especially for the strongest toxicity of strychnine, which mainly concentrated in the sediment components. Studies on the changes of toxic substances in phase states indicated that the sustained release effect of the sediments components after compatibility with GRR is

收稿日期: 2017-07-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81703724, 81373929); 黑龙江省教育厅创新人才支持计划 (051591); 黑龙江中医药管理局项目 (ZHY12-Z073)

作者简介: 郭玉岩 (1982—), 博士, 副教授, 从事中药新药开发研究。Tel: 13845046561 E-mail: guoyuyan622@163.com

*通信作者 吕邵娃, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为中药及复方的药效物质基础研究。Tel: (0451)87266916 E-mail: 1031892056@qq.com

the key factor of reducing toxicity and improving efficiency.

Key words: UPLC-MS; *Strychni Semen*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; herb pair; compatibility; phase state; toxic substances; compatibility attenuated; component analysis; natural sedimentation; dialysis; high speed centrifugation; true solution; colloidal solution; suspension; sediment; brucine; strychnine; slow release

马钱子 *Strychni Semen* 为马钱科马钱属植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子, 是一种常见的有毒中药, 多项研究表明, 马钱子具有较强的药理活性^[1-3]。然而, 马钱子自身固有的毒性使其应用受到一定限制^[4-5]。中药配伍减毒是中药理论的精髓之一, 马钱子经配伍甘草^[6]后可有效降低其毒性, 这已被多项研究所证实, 但其减毒机制说法各一。目前, 有人认为甘草配伍马钱子减毒的主要机制, 可能是甘草降低了马钱子中的毒性成分士的宁和马钱子碱的溶出量^[7-8]; 也有人认为甘草减毒的物质基础是其代谢产物葡萄糖醛酸, 葡萄糖醛酸可增强肝脏解毒能力^[9]; 另有报道, 甘草中甘草次酸可降低 I 相代谢中 CYP1A2、CYP2E1 mRNA 表达和酶活性, 并协同甘草苷抑制 CYP2E1、诱导 CYP1C mRNA 表达和酶活性, 从而达到减毒作用^[10]; 也存在甘草可沉淀马钱子中的生物碱从而起到类似活性炭作用的减毒说法^[11]; 但以上对甘草解马钱子之毒的解释多在推测阶段, 尚需进一步深入研究。

有研究发现, 中药配伍后的汤液是一个天然的共融体系, 在水煎煮过程中溶入水体的次生代谢小分子成分、生物大分子物质以及无机元素等均影响和改变着汤液的理化性质^[12], 这些天然表面活性剂, 可起到助悬、絮凝和反絮凝等多种作用, 使汤液形成不同的相态, 而汤液的相态性质也蕴含着中药药效和毒效物质基础的相关信息, 如陈秋薇等^[13]对附子-甘草药对配伍前后汤液相态进行对比, 章津铭等^[14]对甘草-附子合煎液的水煎液和沉积物进行毒效分析等, 发现不同相态理化参数均有变化, 而毒效成分在不同相态中的分布也具有显著的差异性。基于以上研究, 本课题设想马钱子-甘草药对配伍减毒的关键环节是由于相态分布的差异性而引起的, 将马钱子-甘草配伍汤液进行相态拆分, 追寻毒效成分在不同相态中量的改变, 分析相态差异与毒效物质变化的相关性, 以期从物理药剂学角度探讨甘草配伍马钱子减毒的作用机制。

1 仪器与材料

AB SCIEX4000QTRAP 三重四级杆线性离子阱串联质谱仪, 美国 AB SCIEX 公司; H-CLASS 高效液相色谱仪, 含在线脱气机、四元泵、自动进样器,

美国 Waters 公司; KQ-5200DB 型超数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; AL204、AB265-S 型电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司; Milli-Q 纯水器, 密理博上海贸易有限公司; DR15645 系列微量移液枪, 上海大龙医疗设备有限公司; Mikro200R 型离心机, 德国 Hettich 公司。水浴振荡器, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。

马钱子、甘草均购自于哈尔滨市同仁药材站, 经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定分别为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。

马钱子碱、士的宁对照品均购自于上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为 Y16A7S13272、Z02A7S18869, 质量分数均>98%。甲醇、乙腈, 色谱纯, 美国 Dikama 公司; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Acquity UPLC HSS T₃ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 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: 0~0.5 min, 98% A; 0.5~4 min, 98%~2% A; 4~4.5 min, 2%~98% A; 4.5~5.0 min, 98% A; 分析时间 5 min; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量为 2 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 多级反应监测 (MRM) 模式定量分析; 正离子检测模式 (ESI⁺); 源喷射电压 5 500 V; 离子源温度 550 °C; 雾化气 (Gas1) 379.25 kPa (55 psi); 辅助气 (Gas2) 379.25 kPa (55 psi); 气帘气 68.95 kPa (10 psi); 接口加热, 全程通入氮气。

对所测定的指标性成分马钱子碱和士的宁母离子及子离子进行扫描, 选择丰度最大的产物离子作为多反应监测 (MRM) 离子对, 解簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE) 见表 1; 2 种被测成分的二级质谱图见图 1。

2.2 马钱子单煎液、马钱子-甘草共煎液及其不同相态拆分研究

2.2.1 马钱子单煎液的制备 称取马钱子 100 g, 破

表1 马钱子中2种毒效成分的质谱数据
Table 1 HPLC-MS data of two toxic constituents from *Strychni Semen*

成分	t_R/min	相对分子质量	$MS^2(m/z)$	DP/V	CE/eV
马钱子碱	2.49	395.1	244.0	100.35	50.57
土的宁	2.48	336.1	157.2	123.69	64.39

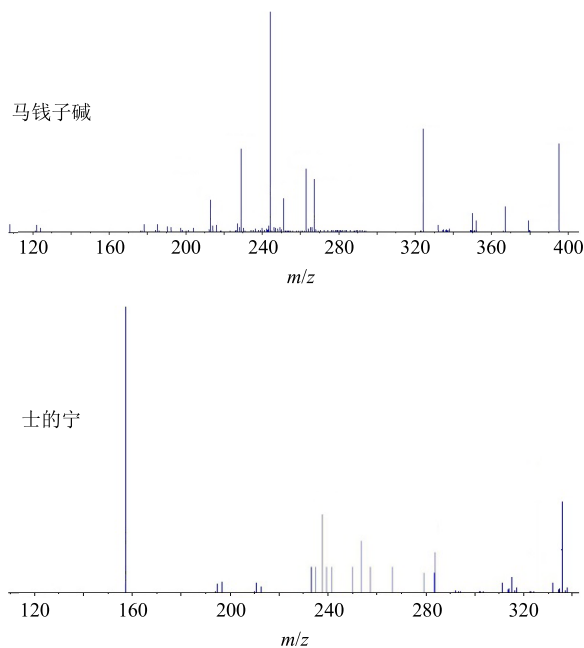


图1 马钱子中马钱子碱和土的宁的二级质谱图

Fig. 1 Second mass spectrum of strychnine and brucine in *Strychni Semen*

碎机处理, 过5号筛, 加5倍量水, 加热回流2次, 第1次60 min、第2次30 min, 合并2次回流水, 即得马钱子单煎液; 取部分提取液回收溶剂, 得马钱子单煎组分。

2.2.2 马钱子-甘草共煎液的制备 称取马钱子100 g、甘草300 g, 破碎机处理过5号筛, 加5倍量水, 加热回流2次, 第1次60 min、第2次30 min, 合并2次回流水, 即得马钱子-甘草共煎液; 取部分提取液回收溶剂, 得马钱子-甘草共煎组分。

2.2.3 汤液不同相态的拆分 分别精密移取马钱子单煎液700 mL、马钱子-甘草共煎液2 700 mL (均相当于马钱子药材74.3 g), 置于冰箱中静置24 h, 按以下步骤操作进行相态拆分, 即得马钱子单煎液沉积物组分、混悬物组分、胶体液组分、真溶液组分, 马钱子-甘草共煎液沉积物组分、混悬物组分、胶体液组分、真溶液组分, 共计8个不同相态组分。

(1) 沉积物组分的制备: 静置后提取液以无尘滤纸滤过, 滤纸上截留部分作为沉积物组分。

(2) 混悬物组分的制备: 取“(1)”项下上清液低温离心, 12 000 r/min 离心30 min, 分离上清液及沉淀, 沉淀部分即为混悬物组分。

(3) 胶体液组分的制备: 取“(2)”项下上清液, 精密移取后置于透析袋中, 按透析袋使用方法将提取液分成2部分, 内层溶液为透析内液即胶体液组分。

(4) 真溶液组分的制备: 取“(3)”项下透析外层溶液为透析外液, 即真溶液组分。

将上述获得的8个组分分别置于蒸发皿中蒸干, 称定质量, 得单煎液沉积物组分、混悬液组分、胶体组分、真溶液组分各2.00、0.51、3.50、0.70 g, 共煎液沉积物组分、混悬液组分、胶体组分、真溶液组分各20.73、6.38、13.03、1.44 g, 备用。

2.3 溶液配制

2.3.1 对照品溶液的制备 取土的宁对照品约3.0 mg、马钱子碱约2.5 mg, 精密称定, 分别置5 mL量瓶中, 加三氯甲烷适量溶解, 并稀释至刻度, 摇匀; 分别精密移取1 mL, 置同一5 mL量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀; 各取100 μL 置于10 mL量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。其中土的宁质量浓度为1.118 $\mu\text{g/mL}$ 、马钱子碱质量浓度为1.004 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 供试品溶液的制备 分别取马钱子-甘草合煎组分、马钱子单煎组分、马钱子-甘草合煎沉淀组分、混悬组分、胶体组分、真溶液组分以及马钱子单煎沉淀组分、混悬组分、胶体组分、真溶液组分各约0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入浓氨水1 mL、三氯甲烷25 mL, 密塞称定质量, 超声40 min后, 补足减失的质量, 滤过, 精密移取续滤液10 mL, 置蒸发皿中水浴蒸干, 加甲醇溶解并定容于10 mL量瓶中, 摇匀, 微孔滤膜(0.22 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.3 阴性样品溶液的制备 不加入各供试品, 按“2.3.2”项下供试品溶液制备法加入相应试剂处理, 制备成阴性样品, 备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性实验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各2 mL, 按“2.1”项下方法测定。结果表明, 在选定的色谱条件下, 毒效成分马钱子碱和土的宁实现完全分离, 测定溶剂无干扰, 典型的MRM色谱图见图2。

2.4.2 线性关系及定量限考察 在“2.1”项色谱条

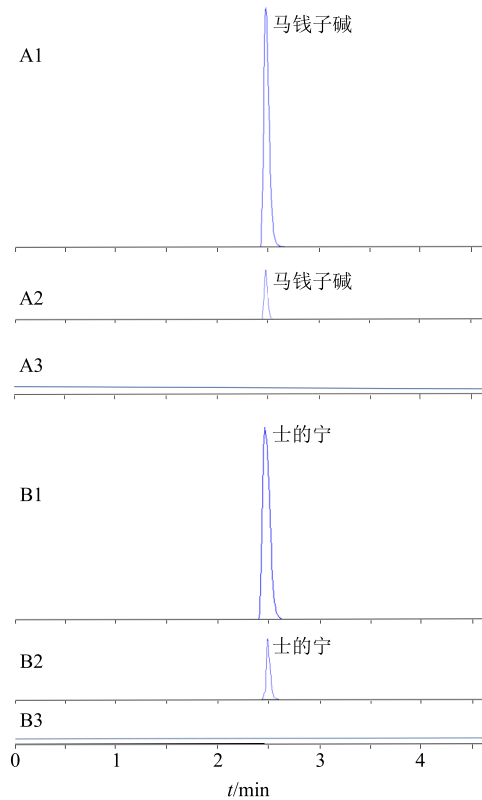


图 2 马钱子 (A) 和土的宁 (B) 对照品溶液 (1)、供试品溶液 (2) 及阴性样品溶液 (3) 的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of brucine (A) and strychnine (B) reference substance solution (1), sample solution of *Strychni Semen* (2), and negative sample solution (3)

件和质谱条件下测定，以对照品进样质量为横坐标 (X)，对照品色谱峰峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，获得马钱子碱和土的宁的线性回归方程分别为 $Y=2\times 10^7 X+8\ 616.6$ ($r=0.999\ 8$) 和 $Y=3\times 10^7 X+102\ 073$ ($r=0.999\ 8$)，结果表明马钱子碱和土的宁分别在 0.020~2.008、0.022~2.236 μg 线性关系良好。

2.4.3 检测限和定量限 在“2.1”项色谱条件下，信噪比为 3 时为检测限，信噪比为 10 时为定量限。结果测定马钱子碱和土的宁的检测限分别为 43、67 ng/mL，定量限分别为 130、95 ng/mL。

2.4.4 精密度试验 按照“2.1”项下色谱条件，分别取对照品溶液 2 μL ，重复进样 6 次，结果马钱子碱和土的宁的 RSD 分别为 1.58%、1.64%，结果表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 2 μL ，按“2.1”项色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样测定，记录峰面积，结果显示马钱子碱和土的宁峰面积的 RSD 分别为 1.74%、1.83%，表明样品在 10

h 内稳定性良好。

2.4.6 重复性试验 取同一批马钱子提取物，精密称定，按供试品溶液的制备方法制备样品 6 份，按选定的方法测定，计算得到马钱子碱和土的宁量的 RSD 分别为 1.93%、1.81%，RSD 均小于 2.0%，表明方法重复性良好。

2.4.7 加样回收率试验 加样回收率试验取已测定马钱子碱和土的宁量的马钱子提取物 6 份，分别向这 6 份样品中加入与提取物中二者量相当的马钱子碱和土的宁对照品，按供试品溶液的制备方法处理后，按“2.1”项色谱条件测定，计算回收率及 RSD。结果马钱子碱和土的宁的回收率分别为 96.84%、97.62%，RSD 分别为 1.65%、1.49%。

2.5 单煎组分、共煎组分及各组分不同相态中毒效物质的量对比研究

按“2.2”项下方法制备的马钱子单煎组分、马钱子-甘草共煎组分及二者不同相态组分各 2 份，每份约 0.5 g，精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，根据线性回归方程计算 2 种毒效成分的量。结果 (表 2) 发现，与单煎液相比，马钱子与甘草配伍后，其毒效成分马钱子碱和土的宁的量均有下降，且土的宁量下降较为明显，下降率为 41.31%；而共煎组分不同相态中 2 种毒效物质的量均有分布，且分布趋势相同，即沉积物组>胶体组>混悬物组>真溶液组，其中沉积物组分中所含有的马钱子碱和土的宁的量分别占 4 个相态加和量的 47.94%和 78.41%，由此可见沉积物组分对两毒效物质的量具有较高的分布，可对毒效物质的释药起到缓释作用。

表 2 各组分及其不同相态中毒效物质的量测定结果
Table 2 Results of determination of content of toxic substances in each component and its different phases

组分	质量分数/(mg·g ⁻¹)	
	马钱子碱	土的宁
马钱子单煎组分	1.334 1	2.020 4
马钱子-甘草共煎组分	1.210 7	1.185 7
单煎沉积物组分	0.320 7	0.495 8
单煎混悬物组分	0.146 4	0.211 8
单煎胶体液组分	0.622 3	0.806 6
单煎真溶液组分	0.418 4	0.676 8
共煎沉积物组分	0.364 6	0.860 6
共煎混悬物组分	0.125 1	0.086 8
共煎胶体液组分	0.232 4	0.121 8
共煎真溶液组分	0.038 4	0.028 3

3 讨论

有毒中药经配伍后,可改变毒效物质体内动态的行为过程,假使毒效物质在机体内的血药浓度始终保持在治疗浓度,便有可能达到既减毒又增效的目的。本实验研究马钱子与甘草配伍,并与马钱子单煎液相比较发现,经配伍甘草后,其毒效成分马钱子碱和土的宁的量均有所下降,下降比例分别为9.25%和41.31%,毒性最强的土的宁成分的量下降尤为明显,分析毒效成分量的下降可为二者的配伍减毒贡献作用,然而,是否存在其他协同机制,尚需进一步深入探索。

中药汤液是一个天然的共融体系,多种成分共同作用于汤液体系中,使汤液形成不同的相态,而汤液的相态性质与其在体吸收与毒性表达息息相关。本实验从胶体化学和物理药剂学的角度,采用膜分离、透析与高速离心等技术将汤液拆分成真溶液组分、胶体溶液组分、混悬液组分及沉积物组分4个不同相态,并采用UPLC-Q-MS/MS^[15]分析技术,对比分析单煎汤液及配伍汤液中不同相态的毒效物质基础。

结果发现,单煎液不同相态中马钱子碱、土的宁量的分布呈现相同变化规律,即胶体组>真溶液组>沉积物组>混悬物组,按生药计马钱子碱和土的宁总量分别为1.507 8、2.191 0 mg/g;对配伍汤液不同相态毒效物质的量研究发现,马钱子碱和土的宁也同样呈现相同的分布规律,但又与单煎液相态不尽相同,即沉积物组>胶体组>混悬物组>真溶液组。由此结果可推测配伍后毒效物质,在溶液组分中虽然分布量较少,但可较快释放,在药效先期发挥作用,混悬组分和胶体组分存在的毒效物质释放略慢,可维持药效发挥的中期阶段,而沉积物组分中毒效物质质量最大,但由于其吸附作用,毒效成分释放缓慢,可维持药效的后期阶段,并可维持平稳的药物浓度,从而实现减毒增效的作用;而单煎液的毒效物质成分主要集中在胶体组分和溶液组分中,物质释放较快,因而容易产生中毒现象。

为了获得分析物较好的灵敏度和信号强度,本实验对待测成分的质谱条件进行优化,分别选择正、负离子模式进行检测,由于马钱子碱和土的宁结构中存在碱性基团,容易形成 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰,最终选择正离子模式适于本实验研究;实验还对影响待测物质的母离子和子离子各种参数进行优化,优化后质谱参数能够满足待测物的定量要求。

参考文献

- [1] 刘艳萍. 马钱子的化学成分研究 [D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [2] 赵引利, 何燕宁, 杨宇杰, 等. 马钱子及其制剂药动学研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1710-1714.
- [3] Mohesh G. Antiangiogenic activity of *Strychnos nux-vomica* leaf extract on chick chorioallantoic membrane model [J]. *J Chem Pharm Res*, 2016, 8(1): 549-552.
- [4] Kandhavelu M, Senthilkumar P K. To analysis the antioxidant potential of *Strychnos nux-vomica* [J]. *Int J Curr Res*, 2015, 7(10): 21046-21048.
- [5] Perumal B, Velmani S, Santhosh C, et al. Phytochemical and medicinal properties on *Strychnos nux-vomica* (L.) [J]. *J Adv Appl Sci Res*, 2016, 1(3): 96-99.
- [6] Marjan N A, Hossein H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(6): 709-724.
- [7] 闫 静, 朱海光, 刘志强, 等. 马钱子与甘草配伍前后生物碱成分的变化规律 [J]. 分析化学, 2007, 35(8): 1218-1220.
- [8] Yan J, Liu Z Q, Yan C Y, et al. Analysis of strychnos alkaloids using electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance multi-stage tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(8): 1335-44.
- [9] 李 林. 马钱子药理学毒理学研究和减毒研究概述 [J]. 山西中医, 2011, 27(2): 37-40.
- [10] 邢盼盼. 马钱子碱与甘草次酸、甘草苷配伍后对大鼠肝脏 CYP450 酶基因表达与蛋白活性的影响 [D]. 武汉: 湖北大学, 2011.
- [11] 扬子东, 梁晓东, 唐迎雪. 马钱子配伍减毒研究概述 [J]. 山东中医药大学学报, 2015, 39(1): 91-93.
- [12] 李 霞, 马贾骅, 李 楠, 等. 当归补血汤相状态的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 1-5.
- [13] 陈秋薇, 章津铭, 傅超美, 等. 附子-甘草药对配伍前后汤液相态对比 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 92-95.
- [14] 章津铭, 傅超美, 何宇新, 等. 附子-甘草配伍前后汤液中沉积物的化学组分对比研究 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 165-169.
- [15] Zhang H B, Zhang T J, Xu J, et al. Rapid analysis and identification of absorbed components and their metabolites of Yuanhu Zhitong Dropping Pill in rat plasma and brain tissue using UPLC-Q-TOF/MS with multivariate statistical analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 154-163.