

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

张鲁, 李遇伯, 李利新, 王玉明, 许妍妍, 靳晶, 张秀秀, 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 研究制川乌与法半夏不同配伍组合中乌头类生物碱的变化趋势, 阐明两药配伍后的化学物质基础。方法 采用 LC-MS 技术分析久煎处理的不同配伍组合, 结合药液 pH 值的变化, 运用化学计量学方法寻找、分析差异标记物。结果 制川乌与法半夏不同配伍组合化学成分含量差异明显, 随着法半夏比例的增大, 药液 pH 值呈上升趋势, 乌头类双酯型生物碱的含量整体呈下降趋势。结论 制川乌与法半夏配伍后毒性物质减少, 这可能与法半夏中的某些成分影响了乌头类生物碱的稳定状态有关。

关键词: 制川乌; 法半夏; 化学计量学; 配伍; pH 值

中图分类号: R283.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)06-0000-00

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.000

Contribution of Aconiti Radix Cocta combined with Pinelliae Rhizoma Praeparatum in different ratios to *Aconitum* alkaloids

ZHANG Lu, LI Yu-bo, LI Li-xin, WANG Yu-ming, XU Yan-yan, JIN Jing, ZHANG Xiu-xiu, 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 investigate the compatibility taboo theory, the effect of Aconiti Radix Cocta combined with Pinelliae Rhizoma Praeparatum in different ratios on the alkaloids. **Methods** LC-MS and the pH value were used to analyze the decoctions with different ratios after long time frying, chemometrics was applied to identify the chemical markers. **Results** There were significant differences in different Aconiti Radix Cocta combined and Pinelliae Rhizoma Praeparatum taboo ratios. The more the Pinelliae Rhizoma Praeparatum's ratios were, the higher the pH value was. However, the diester diterpene alkaloids' content was decreasing. **Conclusion** The chemism may be accessories, which make aconite alkaloids reduce after compatibility process.

Key words: Aconiti Radix Cocta; Pinelliae Rhizoma Praeparatum; chemometrics; compatibility; pH value

“乌头反半夏”属中药“十八反”范畴, 历来一直被视为配伍用药禁忌, 《中国药典》历年版均将十八反列为中药临床应用的配伍禁忌^[1]。但是现代研究发现^[2-6]与制川乌单煎相比, 法半夏配伍制川乌后双酯型乌头碱的量降低, 配伍液毒性降低, 且毒性成分的变化趋势与共煎前后溶液的 pH 值变化相关。为了探索制川乌配伍法半夏后的物质基础, 本实验利用 LC-MS 技术对制川乌和法半夏不同配伍组合的化学成分和汤液 pH 值变化规律进行了系统考察, 以期寻找两药配伍的化学物质变化规律, 为中药配伍的合理使用提供有力的数据支撑。

1 仪器与材料

Agilent 1200 RPLC 四元泵液相系统 (美国 Agilent 公司), Bruker micro TOF—QII 高性能的电喷雾-四级杆-飞行时间串联质谱仪、Data Analysis 数据分析软件 (德国 Bruker 公司), BS124S 型电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), PB—10 型酸度计 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

乙腈为色谱纯 (美国 Merck 公司), 甲酸为色谱纯 (瑞士 Fluka 公司)。乌头碱 (批号 110720-200410)、次乌头碱 (批号 110798-200805)、新(中)乌头碱 (批号 110799-200505)、苯甲酰乌头原碱 (批

收稿日期: 2012-08-04

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: 张鲁 (1985—), 男, 博士研究生, 研究方向为中药分析和代谢组学研究。Tel: (022)59596223 E-mail: tianjin_tcm001@sina.com

*通信作者 张艳军 Tel: (022)59596223 E-mail: zyjsunye@163.com

号 110797-200405)、苯甲酰次乌头原碱(批号 111796-201002)、苯甲酰新(中)乌头原碱(批号 11795-200901)、高乌甲素(批号 100289-200902)均购自中国食品药品检定研究院;制川乌、法半夏药材购于安国药材市场,经天津中医药大学中药学院张鲁博士鉴定分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 干燥母根的炮制加工品和天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 干燥块茎的炮制加工品。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

称取 1.0 g 制川乌,加入 10 倍量水浸泡后再煎煮 1 h,加入已浸泡 0.5 h 的不同比例(6:1、2:1、1:1、1:2、1:6)的法半夏,再一起煎煮 0.5 h,离心滤过,残渣加入 8 倍量蒸馏水,再煎煮 1.5 h,离心后合并。取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,将上述过程重复 3 次即得 15 份样品,同时进行样品 pH 值的测定。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent SB-Aq 柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相由 A 相(甲酸-水 0.1:100)和 B 相(乙腈-水 0.1:100)组成,体积流量 0.2 mL/min;柱温 25 °C;进样量 5 μL。按下列程序进行梯度洗脱:0~5 min, 98%~94% A;5~10 min, 94%~87% A;10~15 min, 87%~85% A;15~20 min, 85%~80% A;20~25 min, 80%~72% A;25~30 min, 72%~60% A;30~35 min, 60%~15% A;35~40 min, 15% A;40~42 min, 15%~98% A;42~60 min, 98% A。

2.3 质谱条件

LC-MS 系统使用 ESI 离子源,在正离子模式下采集数据。毛细管电压 4.5 kV,干燥气温度 180 °C,干燥气体积流量 6 L/min,辅助气压力 80 kPa;每 0.02 s 采集 1 次谱图,每次采集 0.1 s,采用 HCOONa 溶液进行在线校正,数据采集范围 m/z 100~1 000。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 按照“2.1”项下方法平行制备制川乌与法半夏配伍组(比例 1:1)水提供试品溶液,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 在 1.6%~5.8%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 按照“2.1”项下方法平行制备 6 份制川乌与法半夏配伍组(比例 1:1)水提供试

品溶液,依次进样分析,随机选取 20 个色谱峰,经计算各色谱峰峰面积的 RSD 在 3.0%~8.2%,表明方法重现性良好。

2.4.3 稳定性试验 按照“2.1”项下方法平行制备制川乌与法半夏配伍组(比例 1:1)水提供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 进样分析,随机选取 20 个色谱峰,经计算各色谱峰峰面积的 RSD 在 1.5%~7.5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 数据分析

液质联用数据使用 Data Analysis 4.0 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-P 11.5 软件进行分析,寻找化学标记物。pH 值数据采用 SPSS 17.0 分析软件进行数据处理,以邓肯氏新复极差法(即 Duncan 法)评价差异的显著性。

2.6 结果分析

2.6.1 LC-MS 的基峰色谱图(base peak chromatogram, BPC)比较 BPC 图见图 1,内标物(IS)为高乌甲素。由图可知,在数据采集的范围内,法半夏几乎没有响应,而制川乌中的各种生物碱能较好的分离。

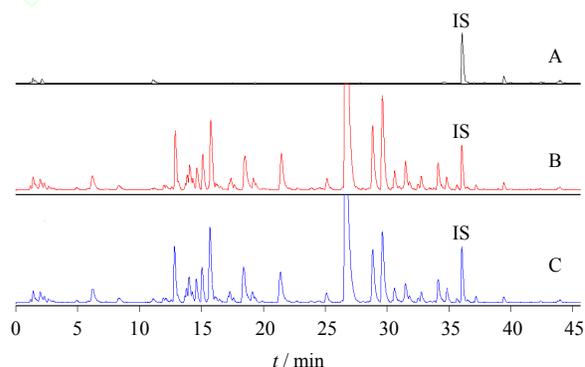


图 1 法半夏水提液(A)、制川乌水提液(B)和制川乌与法半夏等比配伍水提液(C)的 LC-MS 正离子 BPC 图

Fig. 1 BPC of *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* (A), *Aconiti Radix Cocta* (B), and *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* combined with *Aconiti Radix Cocta* (C) extracted by water and analyzed by LC-MS at positive ion mode

2.6.2 差异性标记物的寻找 为了更加直观、准确地阐明制川乌与法半夏配伍后各种化学成分的变化情况,本研究将所得到的质谱数据导入 Simca-P 11.5 统计软件,进行偏最小二乘方-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)。PLS-DA

模型参数中 R_X^2 表明组分所含有的 X 方差信息, 表征 X 变量对 Y 数据的拟合度, R_Y^2 是组分含有的 Y 的方差信息, 表征 X 变量对 Y 数据的预测率。 Q^2 表明交叉验证的正确率, 以上参数取值范围均是 0~1^[7]。

通过图 2 的分析发现, 不同配伍组合的制川乌与法半夏有一定的差异, 且随着法半夏比例的升高表现一定的差异规律。结合 PLS-DA 模型的载荷图、得分图 (score plots)、多变量分类模型中的 VIP 值 (variable importance plot, VIP 值综合概括了模型中某一变量对于解释 X 矩阵和与分类变量 Y 矩阵相关的重要性), 最终选择出 14 个差异性标记物, VIP 值是反映变量对模型重要性的系数, VIP 值越大, 表明变量对模型越重要, 一般将 $VIP > 1$ 的变量视为模型的重要标记物^[7]。

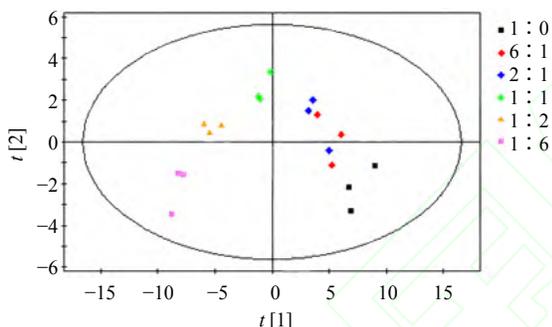


图 2 制川乌与法半夏不同配伍组合的 PLS-DA 得分图 ($R_X^2=0.770$, $R_Y^2=0.363$, $Q^2=0.127$)

Fig. 2 Score plots of PLS-DA for *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* combined with *Aconiti Radix Cocta* in different ratios ($R_X^2=0.770$, $R_Y^2=0.363$, $Q^2=0.127$)

由表 1 可知, 在该提取条件下, 差异性标记物可分为 3 类: 双酯型生物碱、醇胺型生物碱和其他类型生物碱。其中双酯型生物碱对区分不同组间的

差异 VIP 值贡献度最大, 醇胺型生物碱和其他类型生物碱次之。

表 1 制川乌与法半夏不同配伍组合的差异性标记物
Table 1 Variability makers for *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* combined with *Aconiti Radix Cocta* in different ratios

序号	保留时间	质荷比	VIP 值	鉴别 ^[6, 8-23]
1	34.119	646.119 8	1.54	乌头碱
2	30.925	648.301 5	1.49	10-羟基中乌头碱
3	35.594	630.326 7	1.49	去氧乌头碱
4	32.902	662.316 9	1.46	10-羟基乌头碱
5	34.096	616.313 1	1.46	次乌头碱
6	32.468	632.305 4	1.39	中乌头碱
7	17.171	344.256 6	1.30	雪上一枝蒿甲素
8	22.005	464.298 9	1.18	乙酰塔拉萨敏
9	17.556	438.284 5	1.14	尼奥林
10	8.353	502.263 4	1.09	10-羟基中乌头原碱
11	6.228	394.259 2	1.06	川乌胺
12	12.536	378.261 6	1.04	卡乌碱
13	19.296	452.298 5	1.03	次乌头原碱脱水
14	32.448	586.300 2	1.02	乌头碱脱乙酸

2.6.3 差异性标记物的趋势 根据文献的处理方法^[24-25], 以制川乌单煎液中各种生物碱的量为 1, 计算不同配比煎出液中各种差异标记物对单煎液中相应生物碱的比值。

根据图 3 可知, 制川乌与法半夏配伍后化学成分的变化显著, 其中毒性最大的双酯型生物碱乌头碱、10-羟基中乌头碱、去氧乌头碱、10-羟基乌头碱、次乌头碱、中乌头碱的减少趋势非常明显, 当配伍比例为 1:1 或以上时就已经检测不到双酯型生物碱; 其他类型的生物碱均随着法半夏比例的增加, 逐渐呈现出减少的趋势。

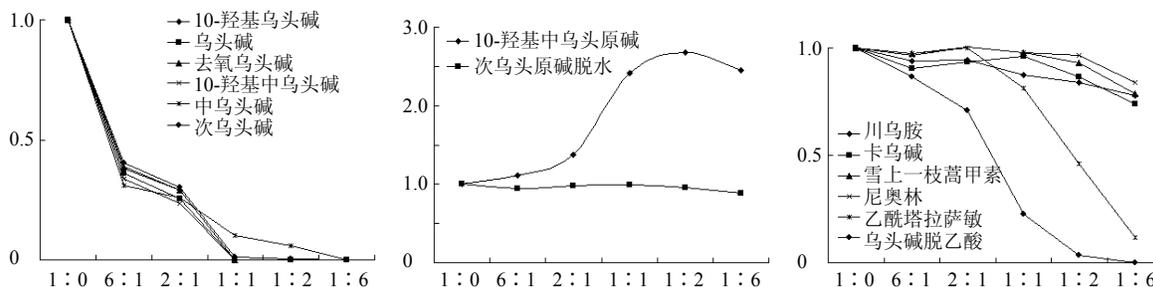


图 3 双酯型生物碱 (A)、醇胺型生物碱 (B) 和其他类型生物碱 (C) 差异标记物的量变化趋势图
Fig. 3 Tendency chart of variability makers for the contents of diester diterpene alkaloids (A), amine diterpenoid alkaloids (B), and other component (C)

表2 制川乌与法半夏不同配伍比例水煎液的 pH 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 The solution pH value for *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* combined with *Aconiti Radix Cocta* in different ratios ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制川乌与法半夏配伍比例	pH 值
1 : 0	4.62 ± 0.03 Ef
6 : 1	5.28 ± 0.02 De
2 : 1	6.51 ± 0.05 Cd
1 : 1	7.63 ± 0.29 Bc
1 : 2	8.10 ± 0.14 Ab
1 : 6	8.44 ± 0.08 Aa

同一列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著; 同一列不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著^[26]

The different lower cases of the same train indicate significant different at 0.05 level; The different majuscules of the same train indicate significant different at 0.01 level^[26]

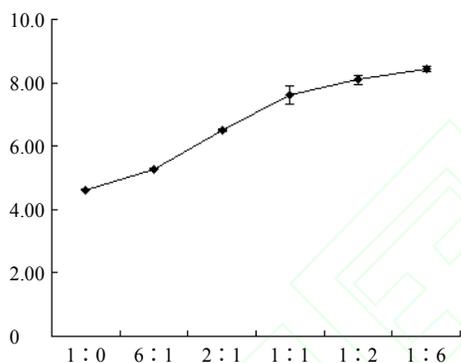


图4 制川乌与法半夏不同配伍比例水煎液的 pH 值趋势图
Fig. 4 The tendency chart of solution pH value for *Pinelliae Rhizoma Praeparatum* combined with *Aconiti Radix Cocta* in different ratios

2.7 药液 pH 值的变化趋势

由表 2、图 4 可知, 随着法半夏配伍比例的升高, 双酯型生物碱的含量逐渐下降, 差异标记物整体呈现下降趋势时, 制川乌与法半夏水煎液的 pH 值呈上升的趋势, 其中 1 : 0~1 : 1 的配伍区间上升趋势更为明显, 这表明配伍后生物碱含量的多少和 pH 值的变化趋势存在一定的联系。

3 讨论

制川乌与法半夏配伍后有毒成分双酯型生物碱明显下降, 这与前人^[2-6,26]的研究结果一致。同时发现随着法半夏比例的增加, pH 值逐渐增大, 表明溶液的酸碱条件可能对双酯型生物碱的含量有一定的影响。

制川乌与法半夏配伍后单酯型生物碱整体趋势

变化不明显。法半夏是由生半夏经甘草石灰浸泡得, 王峰峰等^[25]报道当制川乌与不同比例的甘草配伍时, 苯甲酰新乌头碱等 3 种单酯型生物碱的含量随着甘草的量升高而降低。但本实验发现随着法半夏配伍比例的增加, 也就是配伍中甘草的加入量逐渐增大, 单酯型生物碱的含量变化不显著, 可能是由于本文根据临床采用久煎工艺、样品提取和前处理方式不同造成的, 也可能是法半夏的炮制过程或者制川乌药材的差异产生了影响。

有文献^[25]报道, 双酯型生物碱既是乌头中的有效成分, 又是其毒性成分, 其水解产物单酯型生物碱在保留了双酯型生物碱药理活性的同时毒性降为原来的 1/200。本研究发现当制川乌与法半夏比例为 1 : 1 或法半夏比例更高时, 双酯型乌头类生物碱几乎趋于零, 表明有毒成分大大减少, 但是这种配伍方式是否还能产生制川乌的功效作用, 用药方式是否合理, 还需要结合药理实验进一步挖掘。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 37-38.
- [2] 张琦. 十八反“半蒺贝莖芩攻乌”物质基础及毒性研究 [D]. 吉林: 长春中医药大学, 2010.
- [3] 刘文龙, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 川乌与半夏、瓜蒌、贝母、白蒺、白芨配伍禁忌的化学研究 [J]. 化学学报, 2010, 68(9): 889-896.
- [4] 刘文龙, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 川乌与半夏配伍禁忌的化学研究 [J]. 化学通报, 2008(6): 435-438.
- [5] 黄志芳, 易进海, 陈燕, 等. 附子配伍和汤剂 pH 对 6 种酯型生物碱含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 60-64.
- [6] 朱日然, 李启艳, 张学顺, 等. 附子与半夏不同炮制品种配伍应用的 ESI-MSn 研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 62-67.
- [7] 王惠文, 吴载斌, 孟洁. 偏最小二乘回归的线性与非线性方法 [M]. 北京: 国防工业出版社, 2006.
- [8] 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.
- [9] 曹岩, 景晶, 吕狄亚, 等. 用细胞膜色谱法和 HPLC-TOF/MS 研究附子中的有效成分 [J]. 药学实践杂志, 2011, 29(5): 339-341, 349.
- [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] 董欣, 王淑敏, 祝恩智, 等. 乌头属中药及其炮制品与浙贝母、川贝母配伍的化学研究 [J]. 中草药, 2012,

- 43(2): 265-269.
- [12] 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.
- [13] Yue H, Pi Z F, Song F R, *et al.* Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum Carmichaeli* Debx. by HPLC/ESIMS/MSⁿ [J]. *Talanta*, 2009, 77(5): 1800-1807.
- [14] 王超, 王宇光, 梁乾德, 等. UPLC/Q-TOF-MS 分析十八反乌头半夏配伍化学成分的变化 [J]. *药学学报*, 2010, 45(10): 1301-1306.
- [15] 郝瑞云, 刘永刚, 张宏桂, 等. HPLC-MSⁿ 法研究次乌头碱在水中的化学反应 [J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(8): 539-542.
- [16] 董昕, 刘敏, 赵靖霞, 等. 传统中药川乌炮制前后的离子阱质谱研究 [J]. *药学实践杂志*, 2009, 27(5): 349-352.
- [17] 包懿, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 乌头碱类双酯型二萜生物碱水解反应的电喷雾质谱分析 [J]. *质谱学报*, 2009, 30(1): 1-5.
- [18] 王勇, 宋凤瑞, 金东明, 等. 复方中药四逆汤中乌头碱类二萜生物碱的电喷雾串联质谱研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2004, 25(1): 85-89.
- [19] 赵皓, 皮子凤, 宋凤瑞, 等. 生附片中化学成分的HPLC/ESI-MSⁿ 研究 [J]. *化学学报*, 2008, 66(2): 211-215.
- [20] 张帆, 李锐, 傅亚, 等. 宣威乌头总生物碱的串联质谱分析 [J]. *分析测试学报*, 2005, 24: 179-183.
- [21] 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, 238(4): 290-293.
- [22] 夏焯, 杨春华, 刘静涵, 等. 乌头属药材特征成份二萜生物碱的电喷雾质谱研究进展 [J]. *海峡药学*, 2009, 21(3): 1-5.
- [23] 包懿. 乌头类二萜生物碱的分离方法及ESI-MS图谱分析 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [24] 王峰峰, 宋兆辉, 张兰兰, 等. 不同比例制川乌配伍甘草对单酯型生物碱煎出量的影响 [J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1101-1104.
- [25] 陈儒燕. 附子配伍甘草的物质基础研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
- [26] 明道续. 生物统计附试验设计 [M]. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2002:103-108.