

# HPLC-Q-TOF-MS 分析附子的化学成分 及煎煮过程中的变化规律

黄志芳<sup>1</sup>, 唐小龙<sup>1,2</sup>, 罗恒<sup>1</sup>, 张意涵<sup>1,2</sup>, 刘云华<sup>1</sup>, 陈燕<sup>1</sup>, 刘玉红<sup>1</sup>, 易进海<sup>1\*</sup>

(1. 四川省中医药科学院, 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:对附子生物碱进行分析鉴定并探究其主要成分在煎煮过程中的动态变化规律。方法:采用 HPLC-Q-TOF-MS 分析鉴定附子生物碱成分,基于溶出率分析附子主要成分在煎煮过程中的动态变化。结果:分析鉴定了附子中的 36 个生物碱成分,并测定了其中 25 个主要成分在煎煮过程中的溶出变化。双酯型生物碱(新乌头碱、乌头碱、次乌头碱、脱氧乌头碱等)迅速降低,约 2 h 几乎检不出;单酯型生物碱(苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、10-羟基苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰去氧乌头原碱、脱水苯甲酰次乌头原碱等)先逐渐升高,6~8 h 达到峰值,后逐渐降低;酯型原碱(新乌头原碱、乌头原碱、次乌头原碱)一直持续升高;其他原碱先逐渐升高,6~8 h 达到峰值,后趋于稳定。结论:对附子生物碱成分进行了较全面的分析,揭示了附子煎煮过程中各类生物碱含量的动态变化规律,为附子质量控制和临床应用提供参考。

**[关键词]** 附子; 生物碱; 高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用; 成分分析; 煎煮; 变化规律

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0057-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010057

**Chemical Constituents of Aconite Lateralis Radix and Changing Regularities During Decoction Process by HPLC-Q-TOF-MS** HUANG Zhi-fang<sup>1</sup>, TANG Xiao-long<sup>1,2</sup>, LUO Heng<sup>1</sup>, ZHANG Yi-han<sup>1,2</sup>, LIU Yun-hua<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>, LIU Yu-hong<sup>1</sup>, YI Jin-hai<sup>1\*</sup> (1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify the alkaloid compounds of Aconite Lateralis Radix and to probe into the dynamic changing regularities of main constituents during decoction process. **Method:** HPLC-Q-TOF-MS was used to identify chemical constituents and to analysis the content changes of main constituents during decoction process using dissolution rate. **Result:** Totally 36 alkaloid compounds of Aconite Lateralis Radix were identified and the dissolution rates of 25 compounds were determined in the process of decoction. The results showed that diester alkaloids (mesaconitine, hyaconitine, aconitine and deoxyaconitine) decreased quickly and their content were not detected after decocting 2 h; monoester alkaloids (benzoylaconine, benzoylmeaconine, benzoylhyaconine, 10-OH benzoylmeacinine, benzoyldeoxyaconine and dehydrated-benzoylhyaconine) firstly increased and reached the peak in 6 to 8 h and then gradually deceased. Aconine alkaloids (mesaconine, aconine and hyaconine) increased all the time during decoction process. General alkaloids firstly increased and reached to the peak in 6 to 8 h and then tended to stability. **Conclusion:** The analysis of the alkaloid compounds of Aconite Lateralis Radix was comparatively comprehensive and the dynamic changing regularities of the alkaloid compounds were explored. It provided a reference for quality control and clinic application of Aconite lateralis Radix.

**[Key words]** Aconite lateralis Radix; alkaloid; HPLC-Q-TOF-MS; constituent analysis; decoction; changing regularities

**[收稿日期]** 20140826(018)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2009CB522804);国家科技支撑计划项目(2011BAI13B05)

**[第一作者]** 黄志芳,副研究员,从事中药质量与新药研究工作,Tel:028-85210843,E-mail:huangzf74@163.com

**[通讯作者]** \*易进海,博士,研究员,从事中药化学成分与质量评价工作,Tel:028-85210843,E-mail:yijinhai63@163.com

附子为毛茛科植物乌头的子根的加工品,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛等功效<sup>[1]</sup>,被誉为“回阳救逆第一品药”。附子中双酯型生物碱是其主要毒效成分,经炮制或煎煮双酯型生物碱水解转化为单酯型生物碱和乌头类原碱,毒性大大降低,却仍能发挥镇痛、消炎等作用<sup>[2-4]</sup>。文献报道次乌头原碱、新乌头原碱和 beiwutinine 等乌头类原碱具有强心作用<sup>[5]</sup>。张仲景《伤寒论》四逆类方剂中,附子回阳救逆均以生品入药,通过先煎或久煎降低毒性。因此探究附子煎煮过程中化学成分的变化规律,对阐明“减毒增效”尤为重要。四级杆飞行时间质谱(Q-TOF-MS),具有高灵敏度、高选择性的特点,能获得化合物的精确分子量和高质量的质谱图,周思思等<sup>[6]</sup>运用 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定了附子煎煮液中 16 个生物碱成分,并指出双酯型生物碱在煎煮 120 min 后基本不存在了,而单酯型生物碱的含量在煮沸 0~120 min 内趋于增加。Rong Liu 等<sup>[7]</sup>运用 RRLC-TOF-MS 鉴定了附子中 38 个生物碱成分,越皓等<sup>[8]</sup>运用 HPLC/ESI-MS<sup>n</sup> 鉴定了生附片中 48 个生物碱成分,其中包括 29 个脂型生物碱。本研究应用 HPLC-Q-TOF-MS,对附子生物碱进行分析,共鉴定了 36 个成分,课题组前期报道了附子煎煮过程中 6 种酯型生物碱含量的动态变化<sup>[9]</sup>,此次选取了 25 个主要的生物碱,将其分为 4 大类,分析它们在煮沸 0~24 h 的含量变化趋势及规律,不仅验证了上述结论,而且更全面地探究了双酯型生物碱、单酯型生物碱、酯型原碱和其他原碱在煎煮过程中的变化规律,以期进一步为临床合理应用附子汤剂提供科学依据。

## 1 材料

HPLC-Q-TOF-MS (1260 型高效液相色谱仪,6520 型 Q-TOF 四级杆串联飞行时间质谱仪),HPLC-QQQ-MS (1200 型高效液相色谱仪,6410 型 QQQ 三重四极杆质谱仪),Masshunter Qualitative Analysis 数据分析软件,以上均由美国 Agilent 公司提供。3K15 型高速冷冻离心机 (Sigma 科技有限公司),Milli-Q Integral 3 型超纯水机 (美国 Millipore 公司)。

乌头碱 (批号 110720-200410)、次乌头碱 (批号 110798-200404)、新乌头碱 (批号 110799-200404) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。苯甲酰新乌头原碱 (纯度 99.2%)、苯甲酰乌头原碱 (纯度 97.8%)、苯甲酰次乌头原碱 (纯度 98.4%)、新乌头原碱 (纯度 99.1%)、乌头原碱 (纯度 99.7%)、次乌头原碱 (纯度 99.3%) 对照品均由本实验室自制。

甲酸为色谱纯 (成都市科龙化工试剂厂)、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司)。

生附子采自四川江油,由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为毛茛科多年生草本植物乌头 *Aconitum carmichaeli* 的子根,纵切成厚约 0.5 cm 的片,晒干。

## 2 方法与结果

### 2.1 附子化学成分分析

**2.1.1 检测条件**<sup>[10]</sup> 色谱条件:Shiseido Capcell Pak C<sub>18</sub> 色谱柱 (3.0 mm × 100 mm, 3 μm),流动相乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0~10 min, 5%~15% A; 10~18 min, 15%~18% A; 18~20 min, 18%~22% A; 20~35 min, 22%~25% A; 35~45 min, 25%~30% A; 45~70 min, 30%~40% A; 70~80 min, 40%~60% A; 80~85 min, 60%~65% A; 85~90 min, 65% A),流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 5 μL,三通管分流。

质谱条件:ESI 源,扫描方式 ESI<sup>+</sup> 模式,电离电压 4 000 V,干燥气流速 10 L·min<sup>-1</sup>,干燥气温度 350 °C,喷雾气压 40 psi,离子源温度 105 °C,碎裂电压 120 V,质量扫描范围 100~1 200 *m/z*,正离子选取 *m/z* 121.050 873 和 922.009 798 作为实时质量数校正。二级质谱碰撞能量 25,30,35,40 V。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取乌头碱、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、乌头原碱、次乌头原碱、新乌头原碱对照品适量,加 80% 甲醇溶解稀释成 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取生附片粉末 (过三号筛) 约 2 g,置具塞锥形瓶中,加入 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 50 mL,摇匀,超声处理 30 min,于 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,得到上清液 A。另取生附片粉末 25 g,加水 250 mL 煎煮 4 h,放冷,同上离心,得到上清液 B。分别取 A 液 2.5 mL 和 B 液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,即得。

**2.1.4 附子化学成分分析** 在 120 V 碎裂电压下,获得各成分的分子离子峰及精确分子量。对各成分做二级质谱,以进一步确认结构。

峰 6,11,14,22,23,25,30,31,33 通过与对照品的保留时间、精确相对分子质量和二级质谱图进行对比,鉴定其结构。其他化合物按照以下方法鉴别:根据测得的精确相对分子质量,结合二级质谱碎片和文献报道<sup>[8,10-14]</sup> 建立的附子化合物数据库进行对比,对色谱峰进行定性分析和化学成分鉴别。在二

级质谱中,  $[M + H]^+$  被打碎成不同的子离子, 一般丢失  $H_2O$ ,  $2H_2O$ ,  $3H_2O$ ,  $CH_3OH$ ,  $2CH_3OH$ ,  $3CH_3OH$ ,  $CH_2O$ ,  $2CH_2O$ ,  $3CH_2O$ ,  $CO$ ,  $2CO$  等中性分子。

根据以上方法, 共鉴定了供试品中 36 个生物碱成分, 结果见表 1。120 V 碎裂电压的总离子流图见图 1。

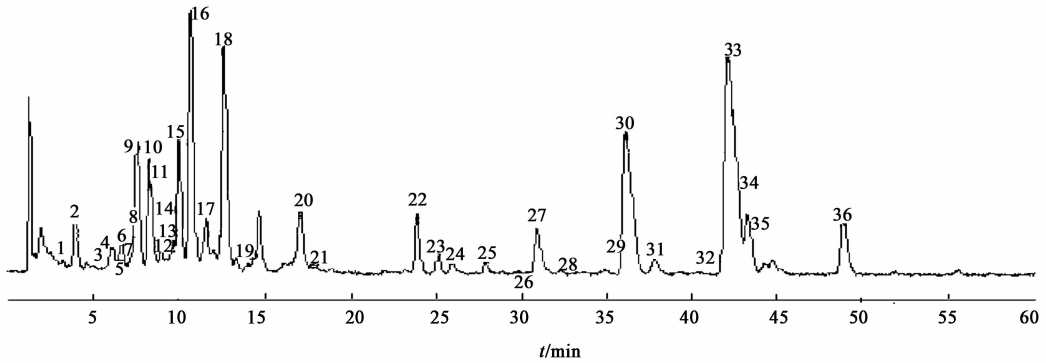


图 1 附子总离子流色谱  
Fig. 1 TIC chromatogram of Aconite Lateralis Radix

### 2.1.5 部分化合物的鉴别 化合物 1 和化合物 2

在 120 V 的碎裂电压下产生高灵敏度的  $394.2589 [M + H]^+$  离子, 二级质谱中这两个峰产生了不同的子离子, 化合物 1 有  $m/z$  为  $376.2485 [M + H - H_2O]^+$ ,  $358.2362 [M + H - 2H_2O]^+$ ,  $344.2207 [M + H - CH_3OH - H_2O]^+$ ,  $340.2272 [M + H - 3H_2O]^+$ ,  $326.2130 [M + H - CH_3OH - 2H_2O]^+$  的碎片离子, 而化合物 2 则有  $m/z$  为  $376.2474 [M + H - H_2O]^+$ ,  $358.2360 [M + H - 2H_2O]^+$ ,  $340.2255 [M + H - 3H_2O]^+$ ,  $328.2282 [M + H - CH_2O - 2H_2O]^+$  的碎片离子, 根据文献[11, 14]报道  $344.2272 [M + H - CH_3OH - H_2O]^+$  是 karakolidine 的特征离子, 基于以上信息, 我们推断化合物 1 为 karakolidine, 化合物 2 为 chuanfumine。

化合物 10 在 120 V 的碎裂电压下主要产生  $m/z$  为  $358.2379 [M + H]^+$  离子, 二级质谱有  $m/z$  为  $342.2403 [M + H - O]^+$ ,  $340.2262 [M + H - H_2O]^+$ ,  $322.2123 [M + H - 2H_2O]^+$  的碎片离子, 根据文献[10, 11]报道, 推断该化合物为 songorine。

化合物 14 在 120 V 的碎裂电压下主要产生  $m/z$  为  $470.2781 [M + H]^+$  离子, 二级质谱有  $m/z$  为  $452.2840 [M + H - H_2O]^+$ ,  $438.2479 [M + H - CH_3OH]^+$ ,  $406.2235 [M + H - 2CH_3OH]^+$ ,  $388.2096 [M + H - 2CH_3OH - H_2O]^+$ ,  $378.1926 [M + H - 2CH_2O - CH_3OH]^+$ ,  $374.1925 [M + H - 3CH_3OH]^+$ ,  $356.1864 [M + H - 3CH_3OH - H_2O]^+$  的碎片离子, 与次乌头原碱对照品对比, 推断该化合物为 hyaconine。

化合物 22 在 120 V 的碎裂电压下主要产生  $m/z$  为  $590.2961 [M + H]^+$  离子, 二级质谱有  $m/z$  为  $558.2689 [M + H - CH_3OH]^+$ ,  $540.2587 [M + H - CH_3OH - H_2O]^+$ ,  $526.2429 [M + H - 2CH_3OH]^+$ ,  $508.2322 [M + H - 2CH_3OH - H_2O]^+$  的碎片离子, 与苯甲酰新乌头原碱对照品对比, 推断该化合物为 benzoylmesaconine。

化合物 36 在 120 V 的碎裂电压下主要产生  $m/z$  为  $630.3277 [M + H]^+$  离子, 二级质谱有  $m/z$  为  $598.2972 [M + H - CH_3OH]^+$ ,  $570.3050 [M + H - 2CH_2O]^+$ ,  $538.2786 [M + H - 2CH_2O - CH_3OH]^+$ ,  $510.2829 [M + H - 2CH_2O - CH_3OH - CO]^+$ ,  $506.2521 [M + H - 2CH_2O - 2CH_3OH]^+$  的碎片离子, 根据文献[6-8, 12, 13]报道, 推断该化合物为 deoxyaconitine。

## 2.2 煎煮过程中化学成分变化的分析

### 2.2.1 检测条件

色谱条件: Shiseido Capcell Pak  $C_{18}$  色谱柱 (3.0 mm  $\times$  100 mm, 3  $\mu$ m), 流动相乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5% ~ 15% A; 10 ~ 18 min, 15% ~ 18% A; 18 ~ 20 min, 18% ~ 22% A; 20 ~ 35 min, 22% ~ 25% A; 35 ~ 45 min, 25% ~ 30% A; 45 ~ 70 min, 30% ~ 40% A; 70 ~ 80 min, 40% ~ 60% A; 80 ~ 85 min, 60% ~ 65% A; 85 ~ 90 min, 65% A), 流速 0.4 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 进样量 5  $\mu$ L。

质谱条件: ESI 源, 扫描方式 ESI<sup>+</sup> 模式, 毛细管电压 4 000 V, 干燥气流速 10 L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 干燥气温度 350  $^{\circ}$ C, 雾化气压力 40 psi, 离子源温度 105  $^{\circ}$ C, 碎裂

表 1 附子 HPLC-Q-TOF-MS 分析

Table 1 HPLC-Q-TOF-MS analysis results of Aconite Lateralis Radix

No.	$t_R$ /min	化合物	分子式	[M + H] <sup>+</sup> ( $m/z$ )			碎片离子 ( $m/z$ )
				实测值	理论值	偏差/mDa	
1	3.19	karakolidine	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub>	394.258 9	394.259 3	-0.4	376.248 5, 358.236 2, 344.220 7, 340.227 2, 326.213 0
2	3.93	chuanfumine	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub>	394.258 9	394.259 3	-0.4	376.247 4, 358.236 0, 340.225 5, 328.228 2
3	5.99	9-OH-senbusine A	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>7</sub>	440.264 3	440.264 8	-0.5	408.236 9, 378.263 9, 360.253 3
4	6.17	senbusine A	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>6</sub>	424.270 0	424.269 9	+0.1	406.258 7, 388.250 8, 378.263 9, 374.232 2, 370.239 0, 360.209 7, 356.222 5
5	6.62	16-hydroxycardiopetaline	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>4</sub>	364.248 3	364.248 8	-0.5	346.237 0, 328.226 8, 310.214 3
6	6.68	mesaconine	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>9</sub>	486.270 9	486.270 3	+0.5	468.261 3, 454.245 3, 436.236 8, 422.220 1, 404.208 8, 378.190 3
7	7.19	senbusine B	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>6</sub>	424.270 0	424.269 9	+0.1	406.259 0, 394.258 7, 388.251 8, 360.209 7, 358.237 9, 342.243 2
8	7.45	karakoline	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>4</sub>	378.264 0	378.264 4	-0.4	360.253 2, 332.221 9, 328.227 6, 310.214 4
9	7.59	isotalatizidine	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>5</sub>	408.274 7	408.275 0	-0.3	390.264 1, 378.262 9, 372.252 6, 360.238 8, 358.237 5, 342.242 0, 340.225 7, 328.22 60
10	8.26	songorine	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub>	358.237 9	358.238 2	-0.3	342.240 3, 340.226 2, 322.212 3
11	8.32	aconine	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>9</sub>	500.286 8	500.285 9	+0.9	482.282 4, 468.261 5, 450.250 8, 436.235 5, 418.230 3
12	8.95	hetisine	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	330.207 4	330.206 9	+0.5	312.197 5, 294.180 6, 270.178 4
13	9.25	14-acetykarakoline	C <sub>24</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>5</sub>	420.275 3	420.275 0	+0.3	342.241 7, 328.230 3, 324.213 6, 314.236 1, 310.216 5
14	9.81	hypaconine	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>8</sub>	470.278 1	470.275 4	+2.7	452.284 0, 438.247 9, 406.223 5, 388.209 6, 378.192 6, 374.192 5, 356.186 4
15	10.02	fuziline	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>7</sub>	454.279 9	454.280 4	-0.5	436.268 6, 418.258 3, 404.242 4, 386.228 1, 354.205 9
16	10.69	neoline	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>6</sub>	438.285 5	438.285 5	-0.0	420.274 7, 402.262 1, 388.247 2, 374.231 9, 356.221 5
17	12.54	fuzitine	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	342.170 4	343.170 5	-0.1	314.168 3
18	12.66	talatizamine	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>5</sub>	422.290 3	422.290 6	-0.3	390.264 4, 372.247 6, 358.238 0, 340.224 7
19	14.66	chasmanine	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>6</sub>	452.299 9	452.301 2	-0.3	436.268 4, 420.271 2, 404.240 7, 388.249 2, 370.237 2, 356.217 7
20	17.09	14-acetylalatizamine	C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>6</sub>	464.301 1	464.301 2	-0.1	432.274 3, 400.241 7, 372.223 0
21	18.04	10-OH-benzoylmeaconine	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>11</sub>	606.291 1	606.291 4	-0.3	588.277 8, 574.265 0, 556.252 9, 542.234 7
22	23.94	benzoylmeaconine	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>10</sub>	590.296 1	590.296 5	-0.4	558.268 9, 540.258 7, 526.242 9, 508.232 2
23	26.0	benzoylaconine	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>10</sub>	604.311 7	604.312 1	-0.4	586.301 0, 572.285 8, 554.273 3, 540.258 1, 522.249 1
24	26.21	13-deoxybenzoylhypaconine	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>8</sub>	558.306 5	558.306 7	-0.2	526.278 5, 508.263 1
25	27.92	benzoylhypaconine	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>9</sub>	574.301 2	574.301 6	-0.4	542.274 2, 510.218 4, 492.236 3, 482.218 4, 478.221 3
26	30.95	beiwutine	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>12</sub>	648.301 9	648.301 9	-0.0	616.276 0, 598.265 4, 588.281 3, 556.255 1, 538.245 0
27	31.19	benzoyldeoxyaconine	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>9</sub>	588.316 8	588.317 2	-0.4	556.256 3, 542.278 3, 524.692
28	33.75	8-oet-14-benzoylmesaconine	C <sub>33</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>10</sub>	618.327 3	618.327 8	-0.5	568.242 7, 558.267 2, 526.245 6, 476.207 4
29	36.13	dehydrated-benzoylhypaconine	C <sub>31</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>8</sub>	556.290 9	556.291 0	-0.1	524.264 3, 492.236 2
30	36.16	mesaconitine	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>11</sub>	632.307 3	632.307 0	+0.3	600.292 6, 582.270 9, 572.282 9, 540.254 7
31	37.79	aconifine	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>12</sub>	662.317 5	662.317 6	-0.1	644.306 5, 612.280 3, 584.285 4, 552.259 1
32	41.73	14-anisoylneoline	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>8</sub>	572.322 1	572.322 3	-0.2	540.296 0, 508.276 9
33	42.12	hypaconitine	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>10</sub>	616.312 6	616.312 1	-0.5	584.286 8, 556.291 4, 524.265 7, 492.239 4
34	43.12	delphinine	C <sub>33</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>9</sub>	600.317 1	600.317 2	-0.1	522.264 1, 490.258 8, 458.232 5
35	43.30	aconitine	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>11</sub>	646.322 7	646.322 7	-0.0	628.323 5, 596.297 7, 586.302 7, 554.276 3, 536.265 7
36	48.89	deoxyaconitine	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>10</sub>	630.327 7	630.327 8	-0.1	598.297 2, 570.305 0, 538.278 6, 510.282 9, 506.252 1

电压 120 V, 质量扫描范围  $m/z$  100 ~ 1 200。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 水煎供试品溶液: 取生附片 200 g, 加 10 倍量的水, 回流煎煮, 分别在沸腾后 0, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 取样, 精密量取 0.5 mL, 加甲醇定容至 5 mL, 摇匀, 滤过, 即得(含生药  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

附片供试品溶液: 取生附片粉末(过三号筛)约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 50 mL, 摇匀, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 摇匀, 于 12 000

$\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 精密量取上清液 2.5 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 滤过, 即得(含生药  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

**2.2.3 测定结果** 分别精密吸取水煎供试品溶液和附片供试品溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 测定。根据成分分析时各化合物的  $[\text{M} + \text{H}]^+$  和保留时间, 提取  $[\text{M} + \text{H}]^+$  离子, 积分, 记录峰面积, 计算煎煮过程中 25 个生物碱的溶出率(水煎液中检测成分的峰面积/附片中该成分的峰面积), 结果见表 2。

表 2 附子煎煮过程中化学成分的溶出率

Table 2 Dissolution rate of 25 compounds during decoction process of Aconite Lateralis Radix

No.	化合物	0 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h
1	chuanfumine	0.282	0.388	0.444	0.522	0.627	0.657	0.725	0.696	0.682	0.699
2	senbusine A	0.463	0.614	0.724	0.871	0.922	0.965	1.046	1.015	0.948	0.983
3	mesaconine	0.389	0.651	0.849	1.177	1.696	2.411	3.100	3.735	4.665	6.834
4	senbusine B	0.333	0.434	0.516	0.632	0.696	0.723	0.721	0.745	0.693	0.725
5	karakoline	0.422	0.571	0.635	0.767	0.837	0.875	0.930	0.911	0.885	0.875
6	isotalatizidine	0.444	0.599	0.673	0.803	0.913	0.930	0.980	0.963	0.925	0.892
7	songorine	0.420	0.560	0.615	0.738	0.816	0.817	0.841	0.858	0.801	0.806
8	aconine	0.341	0.485	0.656	0.972	1.411	2.219	2.949	3.533	4.736	7.369
9	hetisine	0.382	0.552	0.628	0.779	0.914	0.949	1.017	1.064	1.076	1.064
10	hyaconine	0.347	0.627	0.891	1.463	2.014	3.124	4.315	5.22	6.904	11.690
11	fuziline	0.426	0.582	0.649	0.810	0.886	0.947	0.975	0.963	0.970	0.975
12	neoline	0.448	0.614	0.658	0.836	0.948	0.937	0.976	0.969	0.839	0.905
13	talatizamine	0.415	0.559	0.658	0.765	0.856	0.880	0.926	0.935	0.872	0.895
14	chasmanine	0.353	0.502	0.587	0.737	0.825	0.893	0.918	0.939	0.855	0.866
15	acetylalatizamine	0.379	0.504	0.596	0.724	0.769	0.782	0.787	0.791	0.751	0.698
16	10-OH-benzoylmeaconine	0.357	0.939	1.132	1.535	1.759	1.901	1.955	1.942	1.766	1.239
17	benzoylmeaconine	0.389	0.694	0.822	1.069	1.305	1.470	1.553	1.528	1.347	0.974
18	benzoylaconine	0.255	0.494	0.672	0.953	1.186	1.495	1.687	1.753	1.663	1.309
19	benzoylhyaconine	0.299	0.662	0.910	1.407	1.860	2.327	2.580	2.785	2.710	2.472
20	benzoyldeoxyaconine	0.228	0.422	0.574	0.824	1.158	1.571	1.874	2.005	2.063	1.896
21	dehydrated-benzoylhyaconine	0.269	0.407	0.541	0.860	1.260	1.728	2.020	2.218	1.982	1.310
22	mesaconitine	0.301	0.042	0.002	0	0	0	0	0	0	0
23	hyaconitine	0.307	0.218	0.171	0.102	0.038	0.003	0	0	0	0
24	aconitine	0.132	0.023	0.009	0.004	0	0	0	0	0	0
25	deoxyaconitine	0.259	0.180	0.128	0.069	0.022	0.003	0	0	0	0

### 3 讨论

文献报道及本实验室前期研究表明,生附子主要含双酯型生物碱,可采用酸水超声提取测定<sup>[15]</sup>;生附子煎煮 4 h 主要含单酯型及原碱类生物碱<sup>[9]</sup>。因此,本文选用两种提取方法的混合溶液作为成分分析的供试品溶液,以期获得更多的附子生物碱的信息,使成分分析更全面,共鉴定了 36 个生物碱成分。

本文从鉴定的 36 个化合物中选取了含量较高和具有代表性的 25 个化合物,作为煎煮过程中化学成分变化的评价指标。根据化合物的结构和转化规律,将其分为四类,双酯型生物碱、单酯型生物碱、酯型原碱(可由酯型生物碱转化得到)、其他原碱(不能由酯型生物碱转化得到)。

本实验基于煎煮过程中 25 个生物碱的溶出率(水煎液中检测成分的峰面积/生药中该成分的峰面积)来表征化学成分的变化规律,因此,溶出率大于 1 的成分提示可由其他成分转化得到。

mesaconitine, hyaconitine, aconitine, deoxyaconitine 为剧毒性双酯型生物碱,此类生物碱煎煮过程变化规律是迅速降低,约 2 h 几乎检测不到(图 2),表明双酯型生物碱水煎受热不稳定。

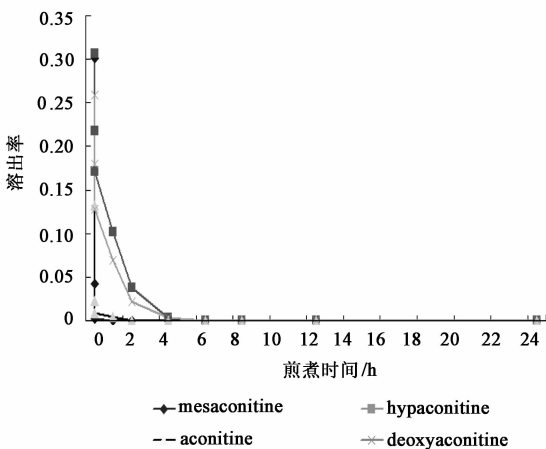


图 2 双酯型生物碱煎煮过程的变化规律  
Fig. 2 Changing regularities of diester alkaloids during decoction process

10-OH-benzoylmeacinine, benzoylaconine, benzoylmeaconine, benzoylhyaconine, benzoyldeoxyaconine, dehydrated-benzoylhyaconine 为毒性较小的单酯型生物碱,此类生物碱煎煮过程变化规律是先逐渐升高,6~8 h 达到峰值,后逐渐降低(图 3),该类生物碱在 0.5~1 h 后溶出率大于 1,表明煎煮过程中双酯型生物碱转化为单酯型生物碱。

3), 该类生物碱在 0.5~1 h 后溶出率大于 1,表明煎煮过程中双酯型生物碱转化为单酯型生物碱。

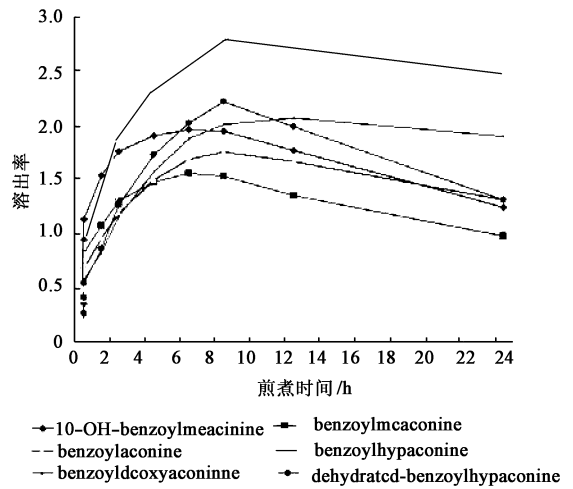


图 3 单酯型生物碱煎煮过程的变化规律  
Fig. 3 Changing regularities of monoester alkaloids during decoction process

Mesaconine, aconine, hyaconine 为几乎没有毒性的酯型原碱,煎煮过程中该类生物碱一直持续升高(图 4),提示受热稳定,约在 1 h 后溶出率大于 1,表明煎煮过程中酯型生物碱转化为酯型原碱。

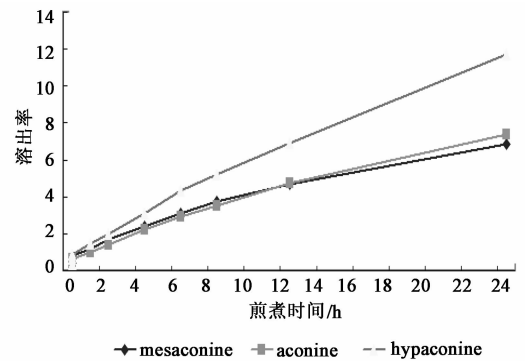


图 4 酯型原碱煎煮过程的变化规律  
Fig. 4 Changing regularities of aconine alkaloids during decoction process

Chuanfumine, senbusine A, senbusine B, karakoline, isotalatizidine, songorine, hetisine, fuziline, neoline, talatizamine, chasmanine, acetyltalatizamine 为其他原碱,不能由酯型生物碱转化得到,此类生物碱在煎煮过程中变化规律是先逐渐升高,6~8 h 达到峰值,后趋于稳定(图 5)。本研究准确、全面评价了附子汤剂,为该复方的临床合理应用提供实验依据。

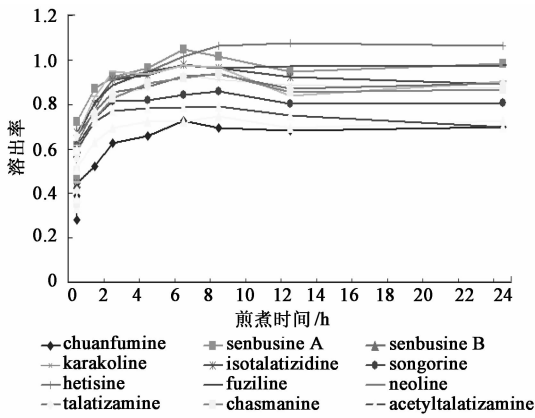


图5 其他原碱煎煮过程的变化规律  
Fig. 5 Changing regularities of general alkaloids during decoction process

[参考文献]

[ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:177-178.  
 [ 2 ] 黄勤安,张聿梅,何轶,等. 乌头碱水解转化规律的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(20):2143-2145.  
 [ 3 ] 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,2011:122.  
 [ 4 ] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1998:158.  
 [ 5 ] Liu X X, Jian X X, Cai X F, et al. Cardioactive C<sub>19</sub>-diterpenoid alkaloids from the lateral roots of *Aconitum carmichaeli*“Fu Zi” [J]. Chem Pharm Bull, 2012, 60 (1):144-149.  
 [ 6 ] 周思思,马增春,梁乾德,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析附子煎煮过程中化学成分的变化[J]. 中西医结合学报,2012,10(8):894-900.

[ 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, 23:1619-1635.  
 [ 8 ] 越皓,皮子凤,宋凤瑞,等. 生附片化学成分的 HPLC/ESI-MS<sup>n</sup> 研究 [J]. 化学学报, 2008, 66 (2):211-215.  
 [ 9 ] 陈东安,易进海,黄志芳,等. 附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):64-68.  
 [ 10 ] 谭光国. 中药四逆汤化学物质组成和代谢组学研究 [D]. 上海:第二军医大学,2012:37-44.  
 [ 11 ] 章津铭,李玲,高飞,等. 附子配伍甘草前后汤液沉积物的 HPLC-MS 化学成分分析 [J]. 药学学报, 2012, 47(11):1527-1533.  
 [ 12 ] 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.  
 [ 13 ] 马增春,周思思,梁乾德,等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 分析人参附子配伍减毒的物质基础 [J]. 药学学报, 2011, 46(12):1488-1492.  
 [ 14 ] Liu H, Su J, Yang X, et al. A novel approach to characterize chemical consistency of traditional Chinese medicine Fuzi Lizhong pills by GC-MS and RRLC-Q-TOFMS [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2011, 9(4):267-273.  
 [ 15 ] 黄志芳,易进海,唐小龙,等. 乌头类药材酯型生物碱含量测定方法的优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14):101-104.

[责任编辑 顾雪竹]