

配伍对乌头汤中乌头碱型生物碱的影响

李国卫, 吴成凤, 桂蜀华*
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 考察在乌头汤中制川乌配伍后对乌头碱型生物碱的影响。方法: 采用 HPLC-ESI-MS 正离子检测模式分析制川乌单煎液及乌头汤中乌头碱型生物碱类成分, 对各成分的 MS² 和 MS³ 谱图进行解析, 比较制川乌单煎液与乌头汤中乌头碱型生物碱类成分的区别。结果: 制川乌单煎液及乌头汤中检出 36 个共有成分, 制川乌单煎液中有 13 个成分在乌头汤中未检出, 分别为 10-羟基焦乌头碱, 10-羟基焦乌头原碱, 10-羟基焦中乌头原碱, 中乌头碱, 10-羟基次乌头次碱, 10-羟基焦次乌头碱, 去氧乌头碱, 焦去氧乌头原碱, 去氧中乌头次碱, 去氧中乌头原碱, 3,13-去氧乌头原碱, 3,13-去氧焦乌头碱, 3,13-去氧焦乌头原碱。乌头汤中 10-羟基中乌头原碱在制川乌单煎液中未检出。结论: 制川乌配伍后, 大量乌头碱型生物碱类成分丢失, 成分区别明显。建立的 HPLC-ESI-MS 可有效分离各种乌头碱型生物碱类成分, 提供了各组分的相对分子质量和结构信息。

[关键词] 液质联用技术; 制川乌; 乌头汤; 乌头碱型生物碱; 配伍

[中图分类号] R283.6; R284.1; R944.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150401.0929.009.html>

[网络出版时间] 2015-04-01 9:29

Effect of Compatibility on Aconitine Type Alkaloids in Wutou Tang LI Guo-wei, WU Cheng-feng, GUI Shu-hua*
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of compatibility on alkaloids in Aconiti Radix Cocta from Wutou Tang. **Method:** HPLC-ESI-MS positive ion mode was adopted to analyze alkaloids in Aconiti Radix Cocta single decoction and Wutou Tang, parsing each component of MS² and MS³ spectra, thus comparing alkaloids between Aconiti Radix Cocta single decoction and Wutou Tang. **Result:** Thirty-six common compositions were detected in Aconiti Radix Cocta single decoction and Wutou Tang, 13 ingredients were detected in single decoction, which were not detected in Wutou Tang, such as dehydrated 10-OH-aconitine, dehydrated 10-OH-aconine, mesaconitine and so on. 10-OH-mesaconine in Wutou Tang was not detected in single decoction solution of Aconiti Radix Cocta. **Conclusion:** A lot of aconitine type alkaloids in Aconiti Radix Cocta are missing after compatibility, ingredients are clearly different. This established HPLC-ESI-MS can effectively separate various aconitine type alkaloids by providing molecular weight and structure information of components.

[Key words] HPLC-ESI-MS; Aconiti Radix Cocta; Wutou Tang; aconitine type alkaloids; compatibility

乌头汤由制川乌、麻黄、芍药、黄芪、甘草(炙)组成, 具有温经散寒、祛湿止痛的功效, 主治寒湿痹证^[1]。该方临床主要用于风湿性关节炎、类风湿性关节炎、小儿风湿性舞蹈病、坐骨神经炎、椎管狭窄、腰腿痛等属上述证机者^[2]。目前关于乌头汤减毒

配伍的研究较少, 且多集中在药理研究方面, 药学研究方面多集中在乌头碱的含量变化。本实验拟通过研究乌头汤配伍后乌头碱型生物碱类成分的变化, 采用高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(HPLC-ESI-MS)分析制川乌单煎液和乌头汤中乌头碱型生

[收稿日期] 20140825(004)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2011B050500008)

[第一作者] 李国卫, 硕士, 从事中药新药研究与开发, Tel:15017592618, E-mail:452048107@qq.com

[通讯作者] * 桂蜀华, 博士, 副研究员, 从事中药新药研究与开发, Tel:13631396525, E-mail:guiguishuhua@163.com

物碱类成分的差异性,为阐明乌头汤配伍减毒机制提供参考^[3-7],为该方的体内成分分析及药代动力学研究提供实验依据。

1 材料

LCQ Fleet 型液质联用仪(美国 Thermo Finnigan 公司),TDL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。乙腈为色谱纯,水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。制川乌饮片购自广州市清平药材批发市场,黄芪、麻黄、白芍、炙甘草均购自广州市杏园春药店,经广州中医药大学赖小平教授鉴定分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 干燥母根的炮制品,豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根,麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* 的干燥草质茎,毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 干燥根的蜜炙品。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 InertSustain™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.01% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~15 min, 13% B; 15~20 min, 13%~21% B; 20~55 min, 21%~40% B; 55~65 min, 40%~13% B),柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 235 nm,进样量 10 μL,记录时间 65 min。

2.1.2 质谱条件 ESI 源,正离子模式,扫描质量范围 *m/z* 300~800,离子阱条件为鞘气压力 0.276 MPa,辅气流速 10 L·min⁻¹,碰撞电压 4 kV,毛细管温度 300 °C,碰撞能量 35 eV,分流比 1:3。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 制川乌单煎液 精密称取过 60 目筛的制川乌 3.0 g,加 10 倍量水浸泡 30 min,沸水浴回流 2 h,离心(4 000 r·min⁻¹, 5 min,下同),加水 10 mL 洗涤残渣,离心,合并上清液,60 °C 减压浓缩,加水定容至 25 mL,即得^[7]。

2.2.2 乌头汤 精密称取过 60 目筛的制川乌、炙甘草、麻黄、黄芪、白芍各 3.0 g,按 2.2.1 项下方法操作,即得^[7]。

2.3 样品 HPLC-ESI-MS 分析 取 2.2 项下样品溶液,按 2.1 项下条件检测,见图 1。通过参考文献[8-15]并结合乌头碱型生物碱的质谱裂解规律,根据各化合物的准分子离子峰判断其相对分子质量和各成分多级质谱图的裂解碎片以确定成分结构。在制川乌单煎液和乌头汤中共初步鉴定了 51 种成分,

出峰时间、多级质谱数据见表 1。确定分子离子峰为 604,590,574 的成分分别为乌头次碱、中乌头次碱和次乌头次碱^[8-15];在多级质谱中,乌头碱型生物碱大部分是丢失 CH₃OH, H₂O, CH₃COOH, CO 等。

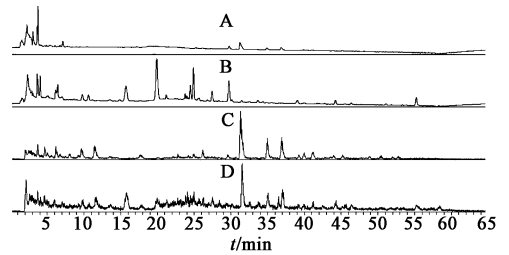


图 1 制川乌单煎液(A,C)和乌头汤(B,D)HPLC 和总离子流
Fig. 1 HPLC chromatogram and total ionic chromatogram of Aconiti Radix Cocta single decoction (A,C) and Wutou Tang (B,D)

表 1 制川乌单煎液中化学成分的名称及多级质谱数据
Table 1 Name and multistage mass spectrometry data of composition in Aconiti Radix Cocta single decoction

No.	保留时间	一级离子	二级离子	三级离子	化合物
1	4.1	394.3	376.3	358.1	10-羟基在多根乌头碱
2	4.3	378.3	360.3	342.2	川乌碱乙
3	4.5	486.4	436.3	404.2	中乌头原碱
4	5.4	470.3	452.3	420.3	去氧中乌头原碱 ¹⁾
5	5.9	484.3	434.3	402.2	10-羟基焦中乌头原碱 ¹⁾
6	6.3	408.3	390.3	358.3	川乌碱甲
7	6.6	500.3	450.3	418.2	乌头原碱
8	7.0	358.2	340.3	322.3	宋果灵
9	7.4	360.2	342.3	324.3	12-表-欧乌头碱
10	9.1	470.3	438.3	406.3	次乌头原碱
11	9.5	454.3	436.4	404.2	去氧次乌头原碱
12	12.3	438.3	420.4	388.4	尼奥灵
13	12.3	468.3	418.3	386.3	焦中乌头原碱
14	13.3	450.3	432.3	400.4	3,13-去氧焦乌头原碱 ¹⁾
15	14.4	484.3	452.3	420.3	去氧乌头原碱
16	17.4	422.3	390.3	358.2	塔拉胺
17	19.1	436.1	418.2	372.3	焦去氧次乌头原碱
18	19.9	344.5	326.3	298.3	雪上一枝蒿甲素
19	22.1	466.4	434.3	402.3	焦去氧乌头原碱 ¹⁾
20	22.2	480.3	462.3	430.3	14-乙酰尼奥灵
21	22.3	468.4	436.3	404.3	3,13-去氧乌头原碱 ¹⁾
22	22.7	452.3	420.3	388.4	焦次乌头原碱
23	24.8	498.3	480.3	462.4	10-羟基焦乌头原碱 ¹⁾
24	24.9	464.3	432.3	400.4	乙酰塔拉胺
25	25.9	606.3	556.3	524.3	10-羟基中乌头次碱
26	28.5	620.3	570.3	538.1	10-羟基乌头次碱
27	29.4	590.3	558.5	526.2	10-羟基次乌头次碱 ¹⁾

续表 1

No.	保留时间	一级离子	二级离子	三级离子	化合物
28	31.1	590.3	540.3	508.4	中乌头次碱
29	33.6	540.5	522.3	504.5	焦去氧次乌头碱
30	34.5	574.3	524.4	492.4	去氧中乌头次碱 ¹⁾
31	34.7	604.3	554.3	522.4	乌头次碱
32	35.4	558.2	526.3	508.4	去氧次乌头次碱
33	36.1	588.3	538.3	506.2	10-羟基焦中乌头碱
34	36.5	632.3	540.3	508.3	10-羟基次乌头碱
35	36.6	574.3	542.3	510.3	次乌头次碱
36	38.5	616.3	566.3	534.2	去氧中乌头碱
37	39.0	572.2	522.3	490.2	3,13-去氧乌头次碱
38	40.8	588.3	556.3	524.2	去氧乌头次碱
39	42.0	632.2	572.3	512.3	中乌头碱 ¹⁾
40	42.6	556.2	524.2	492.3	焦次乌头碱
41	44.0	586.3	536.3	504.3	焦乌头碱
42	45.8	570.4	538.3	478.4	焦去氧乌头碱
43	47.2	602.2	542.2	509.9	10-羟基焦乌头碱 ¹⁾
44	48.3	614.2	554.2	494.3	3,13-去氧乌头碱
45	48.9	572.3	540.3	508.3	焦中乌头碱
46	49.7	616.1	556.3	496.4	次乌头碱
47	52.3	572.3	484.3	456.3	10-羟基焦次乌头碱 ¹⁾
48	55.9	630.2	570.3	510.3	去氧乌头碱 ¹⁾
49	56.6	554.4	522.4	490.4	3,13-去氧焦乌头碱 ¹⁾

注: ¹⁾ 配伍后消失的成分, ²⁾ 配伍后产生的成分。

由表 1 可知,共有 36 个成分在 2 个样品中均被检出,制川乌单煎液中有 13 个成分在乌头汤中未检出,分别是 10-羟基焦乌头碱,10-羟基焦乌头原碱,10-羟基焦中乌头原碱,中乌头碱,10-羟基次乌头次碱,10-羟基焦次乌头碱,去氧乌头碱,焦去氧乌头原碱,去氧中乌头次碱,去氧中乌头原碱,3,13-去氧乌头原碱,3,13-去氧焦乌头碱,3,13-去氧焦乌头原碱。乌头汤中含有 1 个成分在制川乌单煎液中未检出,即 10-羟基中乌头原碱。

3 讨论

川乌中主要毒性成分双酯型乌头生物碱经炮制后分解为单酯型乌头生物碱,单酯型乌头生物碱的毒性仅为双酯型乌头生物碱毒性的 1/200,但毒性依然存在。当制川乌用量加大时,其毒性可对人体产生危害。吕志杰等^[16]在研究制川乌的毒性时发现,制川乌灌胃 10 g 后家兔开始出现中毒表现,随着制川乌用量的增加毒性表现越明显。为了增效

表 2 乌头汤中化学成分的名称及多级质谱数据

Table 2 Name and multistage mass spectrometry data of composition in Aconiti Radix Cocta single decoction in Wutou Tang

No.	保留时间	一级离子	二级离子	三级离子	化合物
1	3.8	502.4	452.3	420.3	10-羟基中乌头原碱 ²⁾
2	3.9	394.3	376.4	358.3	10-羟基在多根乌头碱
3	4.5	486.3	436.3	404.2	中乌头原碱
4	6.2	408.3	390.3	358.4	川乌碱甲
5	6.3	378.4	360.3	342.3	川乌碱乙
6	6.6	500.4	450.3	418.4	乌头原碱
7	7.4	360.3	342.3	324.3	12-表-欧乌头碱
8	7.9	358.2	340.3	322.0	宋果灵
9	9.1	470.3	438.3	406.3	次乌头原碱
10	9.6	454.3	436.3	404.4	去氧次乌头原碱
11	11.4	438.3	420.3	388.3	尼奥灵
12	12.5	468.3	418.3	386.3	焦中乌头原碱
13	14.3	484.2	452.3	420.4	去氧乌头原碱
14	17.4	422.3	390.3	358.4	塔拉胺
15	18.8	436.2	418.3	372.3	焦去氧次乌头原碱
16	20.0	344.5	326.3	298.3	雪上一枝蒿甲素
17	22.2	480.4	462.3	430.3	14-乙酰尼奥灵
18	22.7	452.4	420.3	388.5	焦次乌头原碱
19	24.9	464.3	432.3	400.4	乙酰塔拉胺
20	26.0	606.3	556.3	524.2	10-羟基中乌头次碱
21	29.5	620.3	570.3	538.3	10-羟基乌头次碱
22	31.3	590.4	540.3	508.3	中乌头次碱
23	33.4	540.3	522.3	504.3	焦去氧次乌头碱
24	34.8	604.3	554.3	522.4	乌头次碱
25	35.4	558.3	526.4	508.4	去氧次乌头次碱
26	35.9	588.6	538.3	506.2	10-羟基焦中乌头碱
27	36.3	632.4	540.3	508.2	10-羟基次乌头碱
28	36.8	574.4	542.4	510.3	次乌头次碱
29	38.4	616.4	566.3	534.5	去氧中乌头碱
30	39.1	572.3	522.3	490.3	3,13-去氧乌头次碱
31	40.9	588.3	556.3	524.5	去氧乌头次碱
32	44.0	586.3	536.3	504.4	焦乌头碱
33	45.0	556.3	524.3	492.3	焦次乌头碱
34	48.3	614.2	554.3	494.3	3,13-去氧乌头碱
35	48.6	572.3	540.3	508.7	焦中乌头碱
36	49.8	616.2	556.3	524.3	次乌头碱
37	50.2	570.3	538.3	506.6	焦去氧乌头碱

减毒,中医临床常采用药物配伍来解决该问题。何伟等^[17]研究发现制川乌与白芍配伍后,乌头碱煎出量降低,芍药苷煎出量增加,表明配伍可降低川乌的毒性。张言等^[7]研究发现制川乌配伍后能明显减低乌头汤中单脂型乌头碱的含量,推测该现象可能与减毒机制有关。表1中结果表明乌头汤与制川乌单煎液中乌头碱型生物碱成分区别明显,说明配伍对乌头碱型生物碱具有明显影响,可能是配伍减毒的原理之一。川乌的主要毒性成分乌头碱在2个样品中均未检出,可能是由于在炮制过程中乌头碱的含量已大大降低,同时在提取过程中进一步水解。

预试验比较了不同鞘气压力、碰撞电压、碰撞能量对化合物离子化程度的影响,结果鞘气压力0.276 MPa,碰撞电压4 kV,碰撞能量35 eV时,可在总离子流图中获得最优的离子强度,同时正离子模式的离子流信息多于负离子模式,这可能与被检测成分的化学性质有关,故选择正离子模式进行检测。

[参考文献]

[1] 刘伟栋,施旭光,旷永强,等. 乌头汤对RA大鼠相关细胞因子影响的研究[J]. 中药材,2009,32(8):1267-1269.

[2] 余翔. 川乌的临床应用进展[J]. 中国民族民间医药,2013,22(11):136-137.

[3] 王丹华,刘春芳,谭淑芳,等. 乌头汤对大鼠的镇痛作用及初步机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(10):109-112.

[4] 吴锦俊,程再兴,刘中秋,等. 乌头汤对大鼠肝药酶CPY3A4活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):233-236.

[5] 桂蜀华,张言,李卓明,等. 改良乌头汤减毒增效比较研究[J]. 中国药房,2013,24(43):4060-4063.

[6] 张晓芬,王彬辉,章文红,等. HPLC测定乌头汤提取物中3种乌头类生物碱的含量[J]. 中国中医药科技,2012,19(6):510-511.

[7] 张言,桂蜀华,谢友良,等. 乌头汤不同配伍对单酯型乌头生物碱含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(17):11-14.

[8] 谭鹏. 乌头碱型生物碱的模拟炮制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.

[9] 马芳,赵东,吴晓霞,等. LC-MS-MS法检测附子水提液中新乌头碱、次乌头碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):95-97.

[10] 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.

[11] 吴克红,唐力英,王祝举. 附子的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):91-94.

[12] Lu L, Yue H, Song F R, et al. Rapid profiling of alkaloids in several medicinal herbs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Chem Res Chinese U, 2010, 26(1):11-16.

[13] Li Y B, Wang Y M, Su L N, et al. Exploring potential chemical markers by metabolomics method for studying the processing mechanism of traditional Chinese medicine using RPLC-Q-TOF/MS: a case study of Radix Aconiti [J]. Chem Cent J, 2013, 7(1):36-45.

[14] Zhu H B, Liu S, Li X, et al. Bioactivity fingerprint analysis of cyclooxygenase-2 ligands from Radix Aconiti by ultrafiltration-UPLC-MSⁿ [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(23):7437-7445.

[15] 越皓,皮子凤,宋凤瑞,等. 生附片化学成分的HPLC/ESI-MSⁿ研究[J]. 化学学报,2008,66(2):211-215.

[16] 吕志杰,卢月英,朱方,等. 制川乌的毒性实验研究[J]. 中国中医药科技,1996,3(5):17.

[17] 何伟,王宁,秦林,等. 川乌与白芍配伍前后乌头碱和芍药苷煎出量的测定[J]. 中国药学杂志,2002,37(9):680-683.

[责任编辑 刘德文]