

附子与半夏不同炮制品种配伍应用的 ESI-MSⁿ 研究

朱日然^{1*}, 李启艳², 张学顺¹, 朱宗敏¹, 黄超³

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250012; 2. 山东省药品检验所, 济南 250010;
3. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 采用电喷雾质谱方法(ESI-MS)分析附子与半夏不同炮制品配伍前后生物碱在种类和含量方面的变化。方法: 利用电喷雾质谱技术, 分别对生附子、生附子加半夏、姜半夏、清半夏、法半夏共煎液中乌头类生物碱进行系统考察。结果: 与生附子相比, 双酯型生物碱在附子加清半夏、姜半夏、生半夏共煎液中含量增高, 附子加法半夏共煎液中的双酯型生物碱含量降低。结论: 附子与姜半夏配伍的解毒机制是使毒性较大的双酯型生物碱转化为毒性小的单酯型生物碱; 与清半夏、姜半夏、生半夏配伍的毒性增大的原因是其具有抑制附子中生物碱类成分的水解或热解反应的作用。

[关键词] 附子; 半夏; 电喷雾串联质谱; 双酯型生物碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0062-06

Analysis of Alkaloids in the Combination of Radix Aconiti Lateralis Preparata with Different Prepared Products of Pinellia Rhizoma by ESI-MSⁿ Spectrometry

ZHU Ri-ran^{1*}, LI Qi-yan², ZHANG Xue-shun¹, ZHU Zong-min¹, HUANG Chao³

(1. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250012, China;
2. Shandong Institute for Drug Control, Jinan 250010, China; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** The content and categories of alkaloids in the combination of Radix Aconiti Lateralis Preparata with different prepared products of Pinellia Rhizoma were studied by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). **Method:** The samples for ESI-MS study were prepared by decocting a mixture of Radix Aconiti Lateralis Preparata, Radix Aconiti Lateralis Preparata with unprocessed Rhizoma Pinelliae, prepared Rhizoma Pinellize with juice of Rhizoma zingiberis recens, prepared Rhizoma Pinellize without adjuvant and Rhizoma pinelliae preparatum. **Result:** Comparing to unprocessed Rhizoma Pinelliae, the content of diester diterpenoid alkaloids was higher in the decoction of Radix Aconiti Lateralis Preparata with prepared Rhizoma Pinellize without adjuvant, prepared Rhizoma Pinellize with juice of Rhizoma zingiberis recens and unprocessed Rhizoma Pinelliae, and lower in the decoction of Radix Aconiti Lateralis Preparata with rhizoma pinelliae preparatum. **Conclusion:** For the hydrolysis and pyrolysis of alkaloids are inhibited; and lower in the decoction of Radix Aconiti Lateralis Preparata with Rhizoma pinelliae preparatum. , for most of diester diterpenoid alkaloids are hydrolyzed.

[Key words] Radix Aconiti Lateralis Preparata; Pinellia Rhizoma; ESI-MS; diester diterpenoid alkaloids

“十八反”明言:“半蒺贝藜攻乌”。半夏和乌

头相反,不能同用。乌头与附子是自体所生,故附子与半夏也当是相反药。因此,很多中医的经典著作以及《中国药典》中都注明,乌头与半夏两种中药不可同用或应慎用。但是附子与半夏配伍历代应用较常见,两者配伍应用广泛,疗效显著。为了找出附

[收稿日期] 2011-02-28

[通讯作者] *朱日然, Tel/Fax: 0531-68617910, 13953182672, E-mail: zhuriran@sina.com

子、半夏配伍应用过程中主要成分的变化规律,为临床上安全、有效地使用附子和半夏提供理论依据。本课题利用电喷雾质谱(ESI-MSⁿ)对附子单煎液及附子半夏共煎液中的生物碱类成分进行了分析。附子中的生物碱类成分在电喷雾质谱条件下可形成质子化分子。由于结构相似,该类化合物分子的电离能力相似。通过添加结构相似的内标化合物,对水煎液中的生物碱类成分进行比较,离子峰的相对丰度可以近似地反映同类生物碱的相对含量,所得数据具有很好的可重复性^[1-3]。通过内标法,可以更准确地比较同一化合物在不同样品中的相对含量。

1 方法

1.1 仪器、试剂与药品 Agilent 1200 LC-MSD TRAP SL 6310 液质联用仪(美国安捷伦),SK5200H 超声波提取仪(上海科导超声仪器有限公司),XW-80A 漩涡混合器(上海精科实业有限公司),SENCO R-205 旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司)。

乌头碱(110720-200208)、新乌头碱(110799-200404)、次乌头碱(110798-200404)、氢溴酸高乌甲素(10289-0001)对照品均购自中国药品生物制品检定所,苯甲酰乌头碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱由山东大学提供,纯度大于98%。乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。生附子、生半夏、姜半夏、清半夏、法半夏购自山东省中药饮片厂,经山东省中医院张学顺教授鉴定附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* debx. 的子根的加工品,半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb) Breit. 的块茎。

1.2 液相和质谱条件

1.2.1 液相条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),柱温室温,UV 检测波长 235 nm,流动相乙腈-0.2% 冰醋酸(浓氨水调节 pH 为 7.29)(28:72),流速 0.7 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

1.2.2 质谱条件 检测方式正离子扫描,干燥器流速 12 L·min⁻¹,雾化室压强 55 psi,雾化器温度 350 °C,毛细管电压 4 000 V,扫描范围 100 ~ 800, Auto ms2 fragmentation Ampl 1.00 V, Cap exit 160.0 V, Smart target 30000, Max Accu Time 200.0 ms。

1.3 内标化合物制备 精密称取氢溴酸高乌甲素标准品 13.5 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得(浓度为 13.5 mg·L⁻¹)。

1.4 供试品溶液的制备^[4-5]

1.4.1 生附子、半夏及其炮制品共煎液样品制备 取生附子 10 g,共取 4 份,分别与生半夏 10 g、姜半夏 10 g、清半夏 10 g、法半夏 10 g 混合粉碎,加 10 倍量水浸泡 30 min,称定质量,回流提取 1 h,再称定质量,加水补足减失的质量,摇匀,滤过,滤液加乙醇使其含醇量达到 50%,静置 24 h,滤过,滤液减压回收乙醇,浓缩液加浓氨试液调节 pH 至 9.5,用等体积三氯甲烷萃取 3 次,合并三氯甲烷液,低温蒸干(< 50 °C),残渣加使甲醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,与等体积内标化合物氢溴酸高乌甲素溶液(13.5 mg·L⁻¹)混合,涡旋振荡 2 min,滤过,滤液作为供试品溶液。

另取生附子 10 g、生半夏 20 g,混合粉碎,重复上述提取过程,制成得供试品溶液。

1.4.2 生附子单煎液样品制备 取生附子 10 g,共取 2 份,分别回流提取 10,60 min,其他制备方法同 1.4.1,制成生附子单煎液供试品溶液 2 份。

1.4.3 生附子与生半夏不同煎煮时间样品制备 分别取生附子 10 g、生半夏 10 g,共取 2 份,分别回流提取 10,60 min,其他制备方法同 1.4.1,制成供试品溶液。

2 结果

2.1 生附子单煎液的 ESI-MSⁿ 分析^[6-7] 按上述实验条件测定,对所得实验结果进行分析。图 1 是生附子单煎液(10 min)的电喷雾平均质谱图。从图中可以看到生附子中主要的生物碱类成分。通过标准品的串联质谱和供试品的串联质谱的比较,可以确定 [M + H]⁺ 为 616, 632, 646, 590, 604, 574 的生物碱分别为次乌头碱(hypaconitine, [M + H]⁺ = 616)、新乌头碱(mesaconitine, [M + H]⁺ = 632)、乌头碱(aconitine, AC, [M + H]⁺ = 646)、苯甲酰新乌头原碱(benzoylmesaconine, [M + H]⁺ = 590)、苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine, [M + H]⁺ = 604)、苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine, [M + H]⁺ = 574)。根据串联质谱数据和文献报道,可以推论 [M + H]⁺ 为 454, 438, 468, 588, 556 的生物碱离子^[2] 分别为附子灵(fuziline, [M + H]⁺ = 454)、尼奥灵(neoline, [M + H]⁺ = 438)、脱水乌头碱([M + H]⁺ = 468)、脱氧乌头次碱([M + H]⁺ = 588)、焦乌头碱(pyraconitine, [M + H]⁺ = 586)。内标化合物为氢

溴酸高乌甲素 (lappaconitine, $[M + H]^+ = 585, C_{32}H_{44}N_2O_8$)。见图 2 ~ 7。

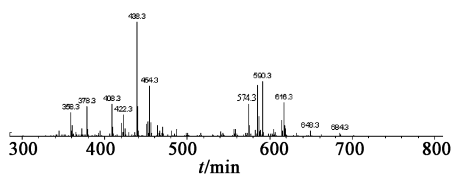


图 1 生附子单煎液 10 min

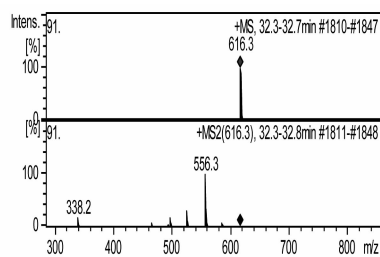


图 6 次乌头次碱对照品一级、二级质谱图

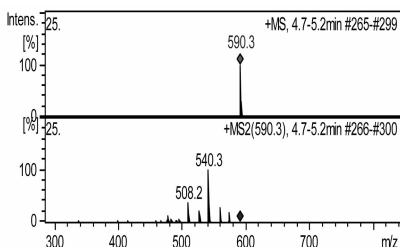


图 2 苯甲酰新乌头原碱对照品一级、二级质谱图

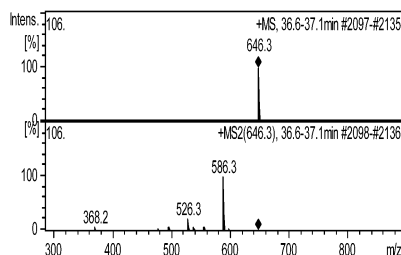


图 7 乌头碱对照品一级、二级质谱图

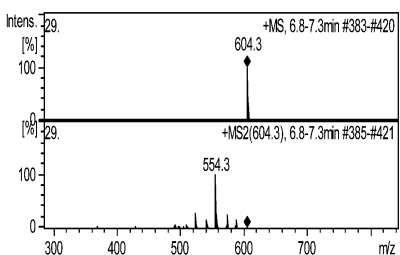


图 3 苯甲酰乌头原碱对照品一级、二级质谱图

MSⁿ 分析^[8-9] 通过 ESI-MSⁿ 对不同煎煮时间的生附子单煎液和生附子生半夏共煎液中的生物碱类成分进行分析,找出其变化规律。图 8 ~ 11 分别为各样品的平均质谱图,表 1 为各样品中生物碱类成分与内标化合物相对丰度的比值。

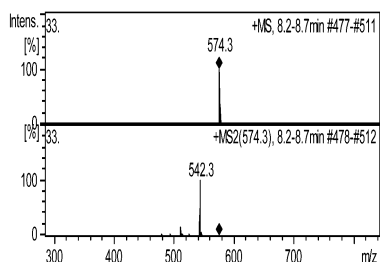


图 4 苯甲酰次乌头原碱对照品一级、二级质谱图

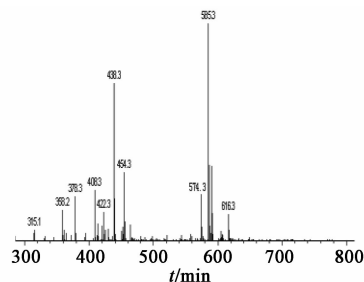


图 8 生附子单煎 10 min 平均质谱图

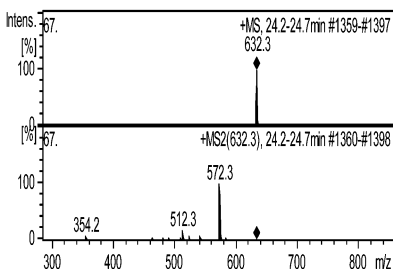


图 5 新乌头碱对照品一级、二级质谱图

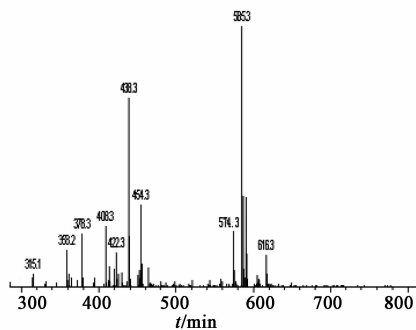


图 9 生附子单煎 60 min 平均质谱图

2.2 生附子单煎液,生附子与生半夏共煎液的 ESI-

从表 1 可以看出,生附子单煎液中,随着煎煮时间的延长,11 种生物碱的相对含量都有十分明显的下降,说明双酯型生物碱及其水解产物都不稳定,随

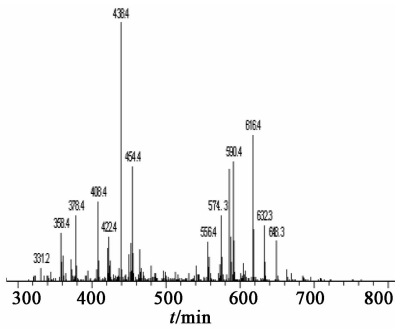


图 10 生附子与生半夏共煎液 10 min 平均质谱图

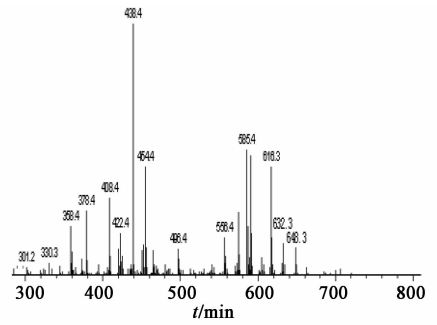


图 11 生附子与生半夏共煎液 60 min 平均质谱图

表 1 各样品中生物碱类成分相对丰度比值

生物碱	m/z	生附子单煎 10 min	生附子单煎 60 min	生附子/生半夏 共煎 10 min	生附子/生半夏 共煎 60 min
乌头碱	646	2.42	0	1.10	1.09
新乌头碱	632	6.74	1.2	49.76	24.55
次乌头次碱	616	65.48	11.9	131.73	86.77
苯甲酰乌头原碱	604	14.74	4.5	16.67	14.04
苯甲酰新乌头原碱	590	107.71	34.3	107.95	95.99
苯甲酰次乌头原碱	574	64.06	21.3	62.50	51.30
附子灵	454	97.12	31.2	102.76	87.22
尼奥灵	438	224.52	71.7	232.34	201.02
脱水中乌头碱	468	5.99	0.9	8.64	7.49
脱氧乌头次碱	588	12.75	3.6	18.22	14.15
焦乌头碱	556	13.40	1.1	35.71	29.53

着加热时间的延长,在水中容易发生热解或水解反应。生附子、生半夏共煎 10 min 的煎液中,新乌头碱(m/z 632)、次乌头次碱(m/z 616)的含量明显增高;但随着煎煮时间的延长,新乌头碱(m/z 632)、次乌头次碱(m/z 616)含量明显降低,但其他 9 种成分含量没有明显改变,下降幅度很小,说明半夏中某些成分有非常强的抑制附子中生物碱类成分的水解或热解反应的作用。生附子和生半夏共煎液中的主要毒性成分,新乌头碱(m/z 632)、次乌头碱(m/z 616)

的含量比生附子单煎液中的含量有成倍提高,说明半夏和附子配伍后毒性增加,进一步验证了半夏与附子不能配伍的规律。

2.3 生附子与半夏不同炮制品共煎液的 ESI-MSⁿ 分析 通过 ESI-MSⁿ 对生附子与半夏不同炮制品共煎液以及生附子与两倍量生半夏共煎液中的生物碱类成分进行分析,找出其变化规律。图 12 ~ 15 分别为各样品的平均质谱图,表 2 为各样品中生物碱类成分与内标化合物相对丰度的比值。

表 2 各样品中生物碱类成分相对丰度比值

生物碱	m/z	生附与姜半夏 60 min	生附子与 清夏 60 min	生附子与 法夏 60 min	生附子与 生半夏 60 min	生附子与 2 倍 生半夏 60 min	生附子单煎 60 min
乌头碱	646	2.45	2.27	0	1.09	4.90	0
新乌头碱	632	27.84	23.06	1.58	24.55	50.75	1.2
次乌头次碱	616	38.31	47.45	5.27	86.77	98.08	11.9
苯甲酰乌头原碱	604	14.48	13.04	1.76	14.04	13.86	4.5
苯甲酰新乌头原碱	590	95.99	83.36	13.53	95.99	102.35	34.3
苯甲酰次乌头原碱	574	49.22	37.99	12.30	51.30	47.76	21.3
附子灵	454	100.89	78.64	75.92	87.22	101.92	31.2
尼奥灵	438	222.72	189.03	175.75	201.02	213.22	71.7
脱水中乌头碱	468	8.46	4.54	7.25	7.49	7.46	0.9
脱氧乌头次碱	588	13.36	13.61	4.22	14.15	10.66	3.6
焦乌头碱	556	26.73	23.82	1.93	29.53	12.37	1.1

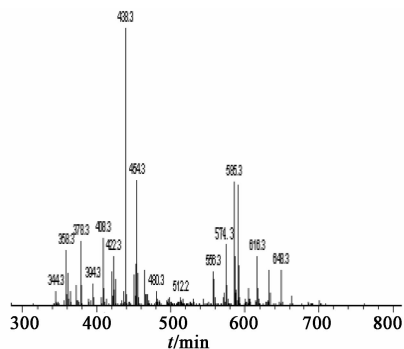


图 12 生附子与姜半夏 60 min 平均质谱图

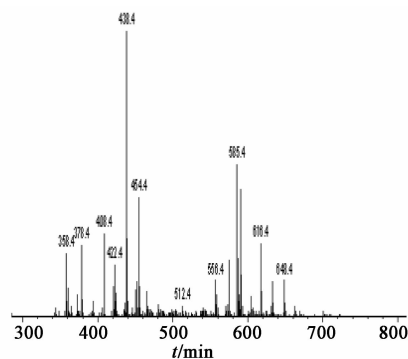


图 13 生附子与清半夏 60 min 平均质谱图

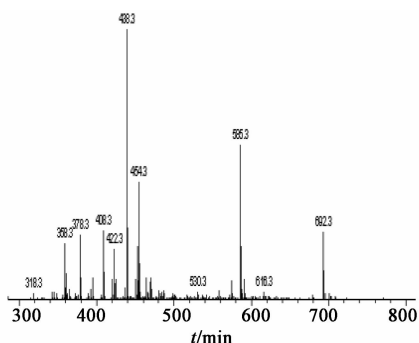


图 14 生附子与法半夏 60 min 平均质谱图

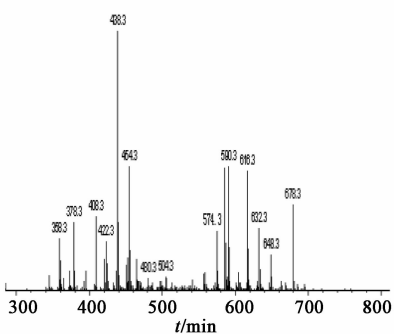


图 15 生附子与 2 倍量半夏 60 min 平均质谱图

从表 2 中可以看出,生附子与 2 倍量半夏共煎液中 11 种生物碱的相对含量明显高于生附子与 1 倍量半夏共煎液,说明随着半夏用量的增加,双酯

型生物碱的含量也相应增加;生附子与法半夏共煎液中,11 种生物碱含量均低于附子单煎液,可能由于法半夏炮制过程中加入甘草水,而甘草中的成分容易与附子中的双酯型生物碱发生脂交换反应,生成毒性更小的脂型生物碱的原因^[10]。生附子与清半夏、姜半夏、生半夏、2 倍量生半夏共煎液中 11 种生物碱类成分的含量均远高于生附子单煎液。说明除法半夏外,清半夏、姜半夏同样有非常强的抑制附子中生物碱类成分的水解或热解反应的作用。

3 结语

本研究利用电喷雾质谱方法(ESI-MSⁿ),通过加入内标化合物,建立了电喷雾质谱的半定量分析方法。通过比较生附子不同单时间煎液、生附子与生半夏不同时间共煎液以及生附子与半夏不同炮制品共煎液中生物碱类成分的含量变化规律,从化学角度解释了半夏反附子科学依据。结果表明,随着煎煮时间的延长,附子中双酯型与单酯型生物碱的含量均降低,说明乌头类生物碱水中容易发生热解或水解反应;但生附子与半夏不同炮制品共煎后,除姜半夏外,生物碱类成分含量明显增高,说明半夏会抑制附子中生物碱类成分的水解或热解反应;而附子与姜半夏共煎液中生物碱含量降低的原因可能由于法半夏炮制过程中加入甘草水,而甘草中的成分容易与附子中的双酯型生物碱发生脂交换反应,生成毒性更小的脂型生物碱的原因。

[参考文献]

- [1] 刘秀秀,晁若冰.反相离子对色谱法测定附子中生物碱成分[J].药学报,2006,41(5):365.
- [2] 徐姗姗,陈长勋,高建平.干姜与附子配伍减毒的物质基础探讨[J].时珍国医国药,2006,17:518.
- [3] 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):595.
- [4] 朱林平,李志强,李侠.附子、半夏配伍研究[J].中成药,2007,29(12):63.
- [5] 王勇,刘志强,宋凤瑞,等.附子配伍原则的电喷雾质谱研究[J].药学报,2003,38(6):451.
- [6] 刘芳,于向红,李飞,等.HPLC 测定附子及其炮制品中 3 种双酯型生物碱的含量[J].中国中药杂志,2006,31(14):63.
- [7] 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,2009,1:572.

原子荧光光谱法检测牛黄解毒片及其拆方可溶性砷的含量

董菊¹, 陈辉^{2*}, 吴娟¹, 王明艳¹, 詹臻¹

(1. 南京中医药大学基础医学院, 南京 210046; 2. 南京市疾病预防控制中心, 南京 210003)

[摘要] 目的: 探讨牛黄解毒片配伍对有毒中药雄黄是否具有减毒作用及其可能减毒药味。方法: 设立牛黄解毒片全方及其不同拆方组, 分别用人工胃液或人工肠液处理, 然后采用原子荧光光谱法测定并比较不同组可溶性砷的含量。结果: 人工胃液或人工肠液处理后, 牛黄解毒片全方组可溶性砷含量明显低于单味雄黄组 ($P < 0.01$); 牛黄解毒片全方去甘草、黄芩、大黄组可溶性砷含量明显高于牛黄解毒片全方组 ($P < 0.01$)。结论: 牛黄解毒片全方配伍对雄黄有减毒作用, 并且甘草、黄芩、大黄是减毒的可能药味。

[关键词] 原子荧光光谱法; 牛黄解毒片; 拆方; 雄黄; 可溶性砷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0067-04

Determination of Soluble Arsenic in Niu Huang Jie Du Tablets and Its Disassembled Prescription by AFS

DONG Ju¹, CHEN Hui^{2*}, WU Juan¹, WANG Ming-yan¹, ZHAN Zhen¹

(1. Department of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Nanjing Center For Disease Control and Prevention, Nanjing 210003, China)

[Abstract] **Objective:** To explore whether the compatibility of Niu Huang Jie Du tablets could reduce the toxicity of realgar, and which may be the possible herbal medicines that could reduce toxicity in the Niu Huang Jie Du tablets prescription. **Method:** Different groups about Niu Huang Jie Du Tablets and its disassembled prescription were arranged, treated with artificial gastric juice or artificial intestine juice, and then atom fluorescence spectrophotometry (AFS) was used to detect the content of soluble arsenic in the different groups samples. **Result:** The content of soluble arsenic in the whole prescription was significant lower than that in the single realgar ($P < 0.01$). The content of soluble arsenic in the whole prescription except for Gancao, Huangqin and Dahuang was significant higher than that in the whole prescription ($P < 0.01$). **Conclusions:** The compatibility for Niu Huang Jie Du tablets could reduce the toxicity of realgar, and Gancao, Huangqin and Dahuang may be the possible herbal medicines that could reduce toxicity.

[收稿日期] 20110430(003)

[基金项目] 江苏省高校研究生科研创新计划项目(2010); 江苏省中医药药效与安全评价重点实验室开放课题(T09019)

[第一作者] 董菊, 博士研究生, 研究方向: 中药毒理学, E-mail: dong_jv2007@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 陈辉, 女, 主任技师, 研究方向: 元素检测与分析, E-mail: dai-chen@sohu.com

[8] 边宝林, 司南, 王宏洁, 等. 附子单煎以及与浙贝母合煎后乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等有毒成分的含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 25.

[9] 随志刚, 陈明玉, 刘志强, 等. 附子煎煮与配伍应用中乌头类生物碱含量的变化及意义[J]. 吉林大学学

报, 2009, 35(2): 365.

[10] 孙兰, 周海燕, 赵润怀, 等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱[J]. 中草药, 2009, 40(1): 59.

[责任编辑 蔡仲德]