麻黄附子甘草汤配伍过程中炮附子生物碱成分的变化研究*

□皮子凤　越　皓　孟翔宇　宋凤瑞**　刘志强　刘淑莹

（中国科学院长春应用化学研究所长春质谱中心　长春　130022）

摘　要：利用电喷雾串联质谱方法（ESI-MS/MS^n）和内标法分析麻黄附子甘草汤方剂中二萜类生物碱种类和含量的变化，通过拆方研究了麻黄、甘草对附子生物碱的影响规律，揭示了麻黄附子甘草汤的配伍内涵。研究表明，麻黄、甘草单独与炮附子配伍时能够通过化学和物理作用减少热解型单酯型生物碱的含量，并生成脂型生物碱，但方剂组合后有效成分热解型单酯型生物碱的含量增加。结合初步药效学实验表明，热解型单酯型生物碱是具有明显的抗炎作用，说明炮附子在复方中发挥抗炎作用的主要成分可能为热解型单酯型生物碱，同时复方的整体配伍利于有效成分的转化。

关键词：炮附子　麻黄附子甘草汤　二萜类生物碱　电喷雾串联质谱

“麻黄附子甘草汤”源自《伤寒论》，主治恶寒发热、身痛无汗等症，为治疗阳虚外感的经典方剂，此外还可用于治疗头痛、坐骨神经痛、风湿性关节炎等各种痛症。方剂由麻黄（去节）6g、甘草（炙）6g、炮附子 3g 组成，目前对该方的研究多为临床应用的考察方面[1~2]，对复方配伍过程中化学成分变化的研究甚少。附子具有镇痛、抗炎、补火助阳的功效，其主要活性成分为二萜类生物碱，包括双酯型、单酯型和脂型生物碱，其中双酯型生物碱毒性最大，经过炮制后多转变为毒性较小的单酯型和脂型生物碱[3~5]。方中采用的炮附子为砂烫法所制，由于其炮制条件剧烈，导致饮片质量参差不齐，本文采用烘箱法自制炮附子代替炮附子进行组方研究，其中所含单酯型生物碱（见表 1）为双酯型生物碱热解生成的。

目前对包含附子的复方配伍前后化学成分变化影响的研究多采用高效液相色谱法或薄层色谱法[6~8]，主要检测其中的双酯型生物碱，如乌头碱、次乌头碱、新乌头碱，并不能对附子中的其他化合物进行检测。近年来，电喷雾串联质谱法（ESI-MS/MSn）已成功应用于乌头类中药化学成分的鉴别及复方配伍研究等方面[3,9~11]，显示出灵敏度高、特异性强、多成分检测的优势。本研究采用电喷雾质谱结合内标法分析“麻黄附子甘草汤”配伍过程中二萜类生物碱的种类及含量变化情况，并通过拆方实验研究了麻黄、甘草对附子生物碱的影响规律，并结合药效学实验，阐明了麻黄甘草附子汤中附子发挥药效作用的物质基础。

收稿日期：2008-12-24

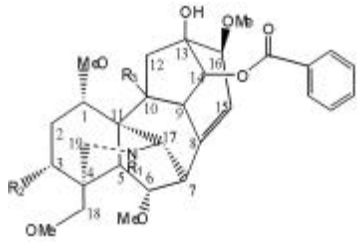
修回日期：2009-03-20

*　国家自然科学基金项目（30472134）：麻黄附子甘草汤”化学物质基础及其质谱方法学研究，负责人：宋凤瑞；国家自然科学基金项目（30672600）：中药复杂体系药效物质基础的分析方法学研究，负责人：刘淑莹；吉林省科技发展计划项目（20080105）：中药附子中具有强心活性的低毒成分筛选及结构鉴定项目资助，负责人：皮子凤。

**　联系人：宋凤瑞，博士，研究员，主要研究方向：中药指纹图谱及中药炮制配伍研究，E-mail: mslab@ciac.jl.cn。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

表 1 热解单酯型二萜类类生物碱的结构

结构式	生物碱	m/z	R_1	R_2
	去乙酸次乌头碱	556	CH_3	H
	去乙酸中乌头碱	572	CH_3	OH

一、材料与方法

1. 仪器、试剂与药品

LCQTM 离子阱质谱仪(美国 Thermo-Finnigan 公司)。

炙甘草和麻黄(购自长春市吉林大药房),生附片(购自四川江油附子开发有限公司)经过长春中医药大学王淑敏教授鉴定。中乌头碱 (批号 0799-9403)、次乌头碱(批号 0798-9403)、氢溴酸高乌甲素(批号 10289-0001)对照品(均购自中国药品生物制品检定所)。甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

2. 质谱条件

金属加热毛细管温度 200℃;喷雾电压 4.5kV;管透镜补偿电压 10V;碰撞能量为 20%~35%;氮气作为壳气; 金属加热毛细管电压-10V; 注射泵流速 3μL/min。上述样品溶液 200μL,与等体积氢溴酸高乌甲素溶液(13.1μg/mL)10μL 混合,漩涡震荡 1min,供电喷雾质谱分析。

3. 样品制备

取生附片置于烘箱中 230℃烘制 15min, 室温放冷,得自制炮附子,以下简称炮附子。

将炮附子、甘草、麻黄粉碎过 40 目筛,取 10g 炮附子 3 份,分别混合甘草 20g,麻黄 20g,甘草 20g 和麻黄 20g,另取炮附子 10g 作为单煎对照液。粗粉加 10 倍量水浸泡 20min,微沸提取 2 次,提取时间分别为 40min,20min,过滤,药渣烘干备用(50℃),合并滤液,加 95%乙醇使醇浓度达到 50%,24h 后过滤,滤液减压浓缩,定容至 10mL,用 10%氨试液调节 pH 9.5,用等量乙醚萃取 3 次, 乙醚萃取液合并后蒸干(50℃), 得到各提取液的生物碱部分, 检测前用甲醇-乙醚(1:1)混合溶液定容至 10mL。药渣用 10%氨试液润湿,加 5 倍量氯仿超声提取 2 次,每次 30min,过滤后合并滤液,蒸干(50℃),得到药渣提取液的生物碱部分, 检测前用甲醇-乙醚(1:1)混合溶液定容至 10mL。

二、结果与讨论

为了对配伍前后炮附子中生物碱成分的变化进行科学的评价,在电喷雾质谱分析中加入氢溴酸高乌甲素作为内标化合物,对生物碱成分进行半定量分析。

1. 炮附子单煎液及药渣的 ESI-MS/MSn 研究

图 1-a 是炮附子单煎液的电喷雾质谱图。其中,m/z585 为内标化合物。m/z556 离子的二级串联质谱图中有中性丢失甲醇、水、苯甲酸、一氧化碳的碎片离子峰 (图 2-a), 与次乌头碱的三级串联质谱相似(图 2-b),因此可以推断此离子对应的化合物为去乙

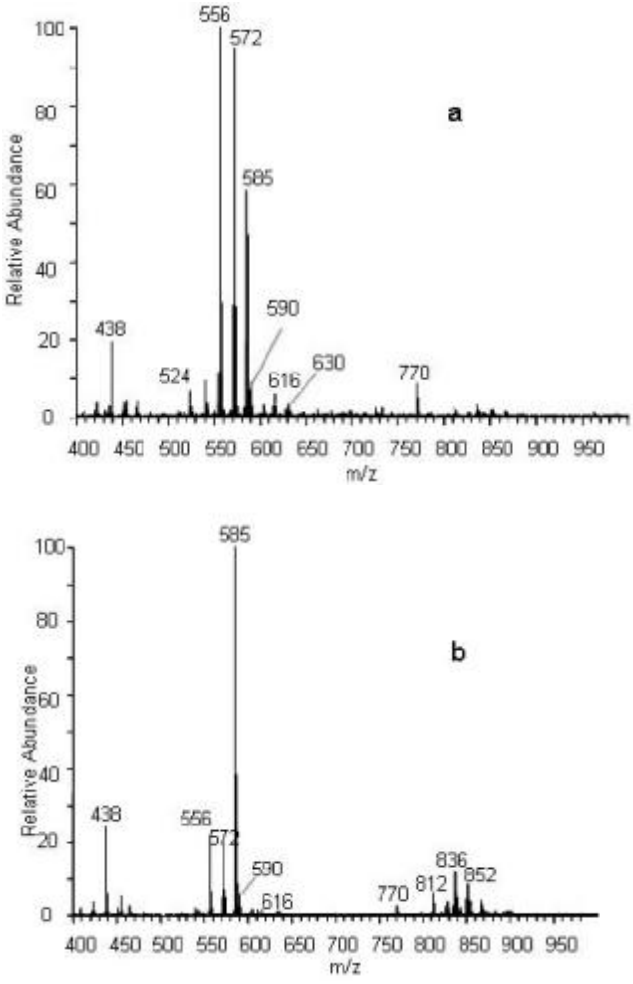


图 1 炮附子单煎液(a)和药渣(b)的电喷雾质谱图

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

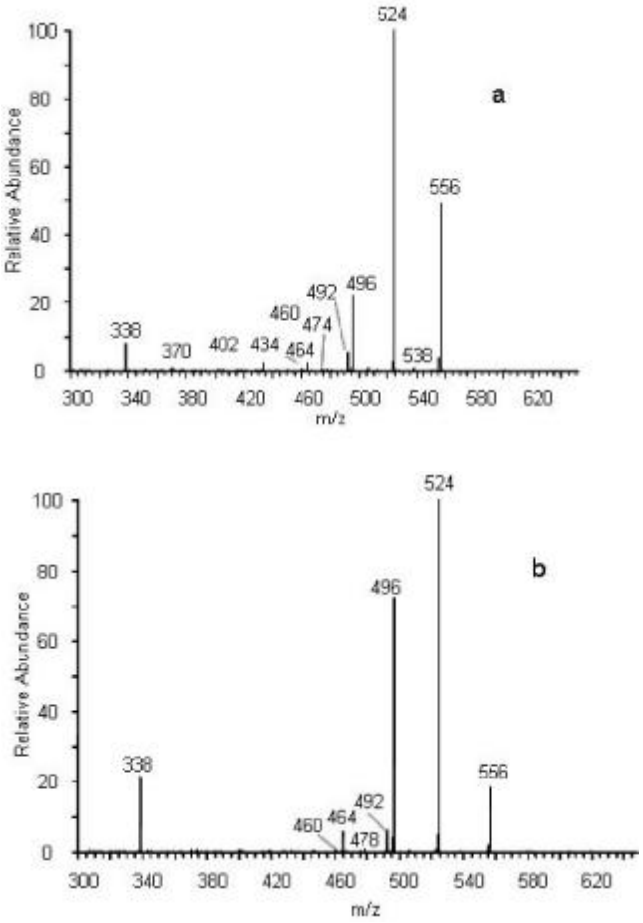


图 2　图 1-a 中 m/z556 离子的 MS^2(a)和次乌头碱的 MS^3(b)质谱图

酸次乌头碱,是单酯型二萜类生物碱的一种。同理,m/z572 离子对应的化合物为去乙酸中乌头碱。另外,还鉴定了生物碱尼奥灵(m/z438),水解型单酯型生物碱 14-苯甲酰中乌头胺(m/z590),双酯型生物碱次乌头碱(m/z616),去氧乌头碱(m/z630)。

在炮附子单煎液的药渣中(图 1-b),除了单酯型和双酯型生物碱外，还存在脂型生物碱，如 8-亚油酰-14-苯甲酰次乌头原碱 (m/z836),8-亚油酰-14-苯甲酰中乌头原碱(m/z852)等,这是因为此类生物碱的水溶性较差,所以在药渣中含量较多。

2. 炮附子与甘草共煎液的 ESI-MS/MSn 研究

对于附子与甘草配伍的研究较多[6,12~13],文献中报道的主要有含有双酯型生物碱的生附子或含有水解型单酯型生物碱的黑顺片，但治疗痛症和炎症主要使用炮附子。因此,本节介绍以热解型单酯型生物碱为主要成分的炮附子与甘草配伍后，二萜类生物碱的变化情况。

图 3-a 为炮附子与甘草配伍共煎液的电喷雾质谱图。其中,m/z585 为内标化合物。与炮附子单煎液比较,配伍后有脂型生物碱生成,其来源于热解型单酯型生物碱与脂肪酸的加成反应[3]。并且有两个新的化合物产生 m/z662 和 m/z676,串联质谱数据揭示它们相差一个亚甲基，但具体结构还需结合核磁共振波谱等技术手段来确定。图 4 比较了配伍前后的主要生物碱成分的相对含量，去乙酸次乌头碱和去乙酸中乌头碱由于生成了脂型生物碱，所以配伍后的相对含量降低。在共煎后药渣中生物碱的含量远远高于单煎后的药渣，这是由于甘草具有很强的物理吸附作用。

3. 炮附子与麻黄共煎液的 ESI-MS/MSn 研究

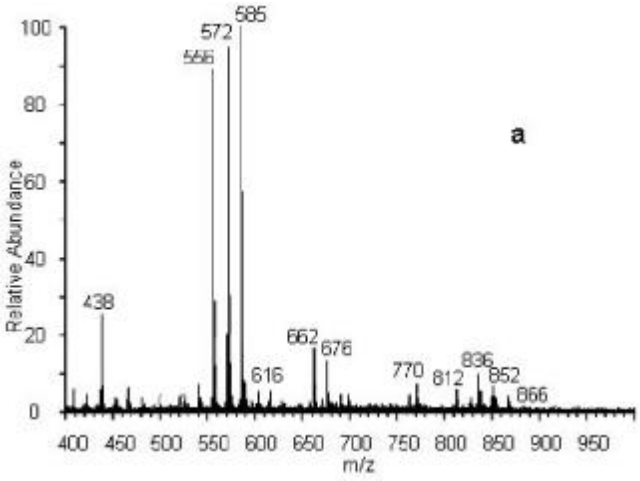
麻黄中主要含有生物碱、挥发油、黄酮和脂肪酸等成分。配伍后共煎液中也有脂型生物碱生成(图 3-b),单酯型生物碱的相对含量较单煎下降,但比炮附子与甘草配伍共煎液多(图 4)。共煎液中代表性的脂型生物碱 8-亚油酰-14-苯甲酰次乌头原碱和 8-亚油酰-14-苯甲酰中乌头原碱比炮附子与甘草共煎液中相对含量低，说明麻黄的化学成分与二萜类生物碱的作用较甘草弱。另外,配伍前后药渣中对应生物碱的相对含量变化不大。

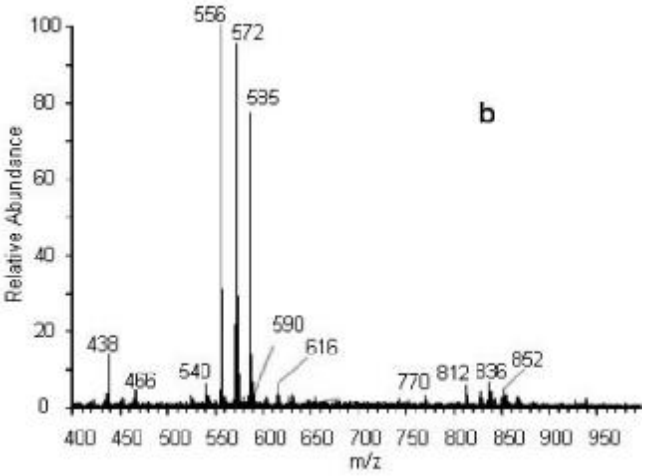
4. 麻黄附子甘草汤的 ESI-MS/MSn 研究

方剂的共煎液电喷雾质谱图中(图 3-c),未见脂型生物碱,但可见 m/z662 和 m/z676 离子对应的化合物。 与图 4 比较得知，单酯型生物碱去乙酸次乌头碱和去乙酸中乌头碱的相对含量分别增加了 1.37 和 1.01 倍。药渣中的单酯型生物碱相对含量也高于单煎和药对共煎的药渣。说明全方配伍能够促进热解型单酯型生物碱的稳定和溶出。这可能是麻黄中的生物碱与甘草中脂肪酸优先发生化学反应，使二萜类生物碱的加成反应减弱。为证实以上假设,取甘草与麻黄的合煎液与炮附子共煎，其结果表明共煎液中单酯型生物碱的相对含量与麻黄附子甘草汤相似。但药渣中的生物碱含量大大降低,可能是由于缺乏甘草的吸附作用导致。

通过分离提取炮附子中的生物碱部位结合大鼠抗炎试验表明，热解型单酯型生物碱对蛋清致大鼠足肿胀的抑制作用非常明显，而脂型生物碱的作用较弱。将化学成分变化与有效部位的药效试验结果相结合，说明炮附子在麻黄附子甘草汤中发挥抗炎作用的主要是热解型单酯型生物碱。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn





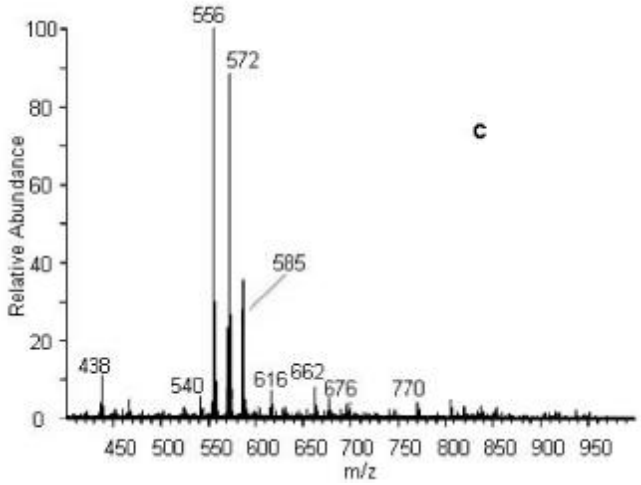


图 3 炮附子与甘草共煎液(a),炮附子与麻黄共煎液(b),麻黄附子甘草汤(c)的电喷雾质谱图

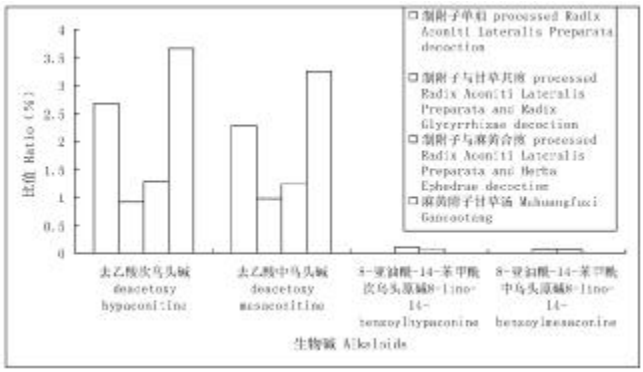


图 4 炮附子配伍前后主要生物碱的相对含量

三、结 论

通过复方的拆方配伍表明,炮附子和麻黄、甘草单独配伍时，均会造成有效成分——热解单酯型生物碱含量的降低,而整方配伍时,有利于炮附子中的有效成分的溶出,使其含量升高。研究结果表明,在分析复方配伍中化学成分的变化情况过程中，单纯拆方研究药对配伍有一定的片面性，在拆方研究的同时应研究全方配伍时的化学成分变化。

参考文献

1 刘爱真. 麻黄附子甘草汤临床运用体会. 河南中医,2000;20(6):10~11.

2 越皓,皮子凤,赵宇峰,等. 电喷雾串联质谱分析附子炮制中的化学成分变化.分析化学,2007;35(7):959~963.

3 Bisset, N.G.. Arrow poisons in China. Part II. Aconitum-botany, chemistry, and pharmacology. J Ethnopharmacol., 1981,4:247~336.

4 Bai, Y.L.,Desai, H.K.,Pelletier, S.W. . Long-Chain Fatty Acid Esters of Some Norditerpenoid Alkaloids. J Nat. Prod.,1994;57(7):963~970.

5 马鸿雁,刘小彬,李楠,等. 乌头碱和甘草酸作用的研究. 时珍国医国药,2006;17(2):208~209.

6 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. 中国实验方剂学杂志,2006;12(4): 9~10.

7 徐姗君,陈长勋,高建平. 甘草与附子配伍减毒的有效成分及作用环节研究. 中成药,2006,28(4):526~530.

8 许庆轩,王勇,刘志强,等. 草乌中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究. 高等学校化学学报,2005,26(4):638~641.

9 王勇,刘淑莹,刘志强,等. 雪上一支蒿中乌头碱类生物碱的电喷雾串联质谱分析. 分析化学,2003;31(2):139~142.

10 艾路, 孙莹, 张宏桂. 复方中药中乌头生物碱在人体内的代谢产物. 北京中医药大学学报,2007,30(6):417~422.

11 杨明,刘小彬,黄庆德. 附子甘草配伍减毒增效机理探析. 时珍国医国药, 2003, 14(4):197~198.

12 张梅,苏晓琳,雨田,等. 五种中药与附子配伍前后有效成分含量的变化. 世界科学技术-中医药现代化,2006,8(3): 27~29

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

Variations of Alkaloids in Fuzi in Preparing Mahuang-Fuzi- Gancao-Tang

Pi Zifeng, Yue Hao, Meng Xiangyu, Song Fengrui, Liu Zhiqiang, Liu Shuying
(Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun 130022, China)

Norditerpenoid alkaloids in Mahuang-Fuzi-Gancao-Tang was studied using Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry and internal standard method. By measuring the structures and relative amount of norditerpenoid alkaloids in Mahuang-Fuzi-Gancao-Tang, the effects of Mahuang or Gancao on norditerpenoid alkaloids in the processed Fuzi was revealed. Mahuang and Gancao could reduce the abundance of pyrolytic monoester-diterpenoid alkaloids (P-MDAs) in the processed Fuzi, and increase the amount of lipo-alkaloids through chemical reactions and physical absorption. Meanwhile, the amount of P-MDAs has registered an apparent increase in the whole prescription. Pharmacological experiments also revealed that P-MDAs is a major anti-inflammatory component in the processed Fuzi, and the compatibility of the prescription is desirable for the effective transformation of constituents.

Keywords: processed Fuzi; Mahuang-Fizi-Gancao-Tang; Norditerpenoid alkaloids; ESI-MS/MS

（责任编辑：王　瑀　责任译审：邹春申）

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn