

·基础研究·

本文引用:张序晴,彭兰,李赛,李耀伟,喻阳,曾嵘,任卫琼,邓凯文,王志琪. 附子-甘草对离体蛙心的影响及其指纹图谱研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(2): 184-189.

附子-甘草对离体蛙心的影响及其指纹图谱研究

张序晴¹, 彭兰¹, 李赛¹, 李耀伟¹, 喻阳², 曾嵘³, 任卫琼⁴, 邓凯文⁴, 王志琪^{3,5*}

(1. 湖南中医药大学研究生院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学湘杏学院, 湖南长沙 410208;
3. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208; 4. 湖南中医药大学附属第一医院, 湖南长沙 410000;
5. 湖南省中药饮片标准化及功能工程技术中心, 湖南长沙 410208)

〔摘要〕 目的 研究附子-甘草合煎液和混合液对离体蛙心的影响及其物质基础。方法 通过离体蛙心实验观察附子-甘草合煎液和混合液对离体正常蛙心和心衰蛙心功能的影响,应用高效液相色谱法建立并测定附子-甘草煎液的 HPLC 指纹图谱。结果 附子-甘草合煎液与混合液的强心作用有差别;附子与甘草配伍后其指标成分的含量发生了明显变化,且合煎液与混合液的成分变化差别显著。结论 附子-甘草合煎液和混合液对离体蛙心的作用及其指纹图谱均不一致。

〔关键词〕 附子;甘草;离体蛙心;指纹图谱;合煎液;混合液

〔中图分类号〕R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.02.008

Effect of Aconite-Licorice on the Isolated Frog Heart and Its Fingerprint

ZHANG Xuqing¹, PENG Lan¹, LI Sai¹, LI Yaowei¹, YU Yang², ZENG Rong³, REN Weiqiong⁴, DENG Kaiwen⁴, WANG Zhiqi^{3,5*}

(1. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Xiangxing College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China; 5. Hunan Provincial Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces Standardization and Functional Engineering Technology Center, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the effects of aconite-licorice combined decoction and aconite-licorice mixed liquid on the isolated frog heart and their material basis. **Methods** The effects of aconite-licorice combined decoction and aconite-licorice mixed liquid on the isolated normal and failing frog hearts were evaluated by isolated frog heart experiment. Their HPLC fingerprints were established and compared. **Results** There was a difference in the cardiotoxic effect between aconite-licorice combined decoction and aconite-licorice mixed liquid. The content of index components changed significantly after the combination of aconite and licorice, and there was a significant difference in component changes between the combined decoction and the mixed liquid. **Conclusion** Aconite-licorice combined decoction and aconite-licorice mixed liquid have different effects on the isolated frog heart as well as different fingerprints.

〔Keywords〕 aconite; licorice; isolated frog heart; fingerprint; decoction; mixture

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品,味辛甘,性大热,其功效峻猛,且有大毒^[1]。有毒中药常用的解毒方法有炮制和

配伍等^[2]。甘草,味甘而性平,具有调和诸药之功效。附子-甘草配伍是经典药对,一般认为甘草配伍附子可起到减毒增效的作用。

〔收稿日期〕2018-09-13

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81503492,81473617);湖南省自然科学基金项目(2015JJ6079);湖南省教育厅教改项目(湘教通[2016]400-321);湖南中医药大学教改项目(2018-JG021)。

〔作者简介〕张序晴,女,在读硕士研究生,研究方向:网络药理学与抗炎免疫。

〔通讯作者〕* 王志琪,女,副教授,硕士研究生导师,E-mail:wzqx2004@126.com。

研究表明,附子生物碱与甘草有效部位配伍能明显降低毒性,并协同增加附子的强心作用^[9]。附子强心作用可通过离体蛙心实验加以研究,而指纹图谱是定量分析中药的重要手段。故本实验首先在离体器官水平观察附子-甘草合煎液与单煎后混合液对离体蛙心的作用,另一方面建立附子-甘草配伍前后的 HPLC 指纹图谱来探讨其物质基础,以期为附子-甘草药对的药效和物质基础研究提供实验数据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);FW177 型中药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);DK-98 II 型电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司);RE-52AA 旋转蒸发器(上海雅荣生化仪器设备有限公司);SB-5200 DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟软件有限公司)。

乌头碱(批号:16041801)、新乌头碱(批号:16102001)、苯甲酰新乌头原碱(批号:16060804)、异甘草苷(批号:151120)、甘草苷(批号:160421)次乌头碱(批号:16102002)、异甘草素(批号:16061501)、甘草素(批号:151013)、甘草酸(批号:160418),以上对照品均购自深圳菲斯生物科技有限公司。生附子产自四川江油,甘草产自甘肃,上述药材均经过湖南中医药大学中药鉴定学教研室周小江教授鉴定。乙腈、磷酸、三乙胺为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

1.3 实验动物

蟾蜍 140 只,体质量 110~130 g,雌雄不拘,市场购买。本实验的环境与设施条件符合中国国家标准《实验动物环境及设施》,动物实验单位的许可证编号为 SYXK(湘)2013-0005。

2 方法

2.1 药液的制备

实验用药液参照文献[4-5]制备,其中,药材:水=1:30,附子:甘草=1:1,浸泡 30 min 后回流提取 1 h,然后用纱布过滤,在 70 °C 下减压浓缩,定容后制得 1 mL 含附子生药量 0.08 g 的水煎液(合煎液、混合液中的甘草生药量均为 0.08 g)。实验所需药液均为新鲜制备。

2.2 离体蛙心实验

2.2.1 分组与给药 将 140 只蟾蜍随机分为 4 个药

物组,即模型组、附子煎液组、附子-甘草单煎混合液组、附子-甘草合煎液组,其中每个药物组 35 只蟾蜍,每药物组按相邻剂量组等比设置 7 个浓度,每个药物浓度 5 只蟾蜍。然后参照文献[6-8]制备离体蛙心。正常蛙心的给药^[9]:正常离体蛙心模型制备完成后,在蛙心套管内加入 1 mL 的正常任氏液,先记录一段时长为 2 min 的离体蛙心自主曲线,然后分别加入含附子生药为 0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 5、0.001 25 g/mL 的附子单煎液、附子-甘草单煎混合液、附子-甘草合煎液。加入蛙心套管内的药液体积为 100 μL。加药后记录曲线 2 min,完成一次给药观察后,更换离体蛙心,进行下一次给药。心衰蛙心给药^[9]:离体蛙心模型制备完成后,先记录一段正常曲线,然后将蛙心套管中的液体换成 1 mL 的低钙任氏液,复制心衰蛙心模型,记录离体蛙心在心衰情况下的 2 min 自主收缩曲线,即为心衰曲线。之后操作同上。正常蛙心模型和心衰蛙心模型均按上述方法给予相同体积的提药用水。

2.2.2 指标检测与数据记录 记录蛙心心肌收缩曲线,计算蛙心的张力变化百分比,所得实验数据均使用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析。

2.3 药物 HPLC 指纹图谱研究

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取乌头碱、新乌头碱、苯甲酰新乌头原碱、异甘草苷、甘草苷、次乌头碱、异甘草素、甘草素、甘草酸对照品适量,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,得浓度分别为 221.2、263.6、222.0、221.2、237.6、259.6、266.8、343.2、227.2 μg/mL 的对照品储备液,备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密移取“2.1”下制备的药液 10 mL,水浴蒸干后,加适量甲醇溶解,洗涤,转移并定容于 10 mL 容量瓶中,摇匀。取适量溶液置离心管中,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.3.3 色谱条件^[10] 色谱柱 Agilent C₁₈ 4.6 mm × 150 mm,5 μm;流速 1.0 mL/min;柱温 30 °C;检测波长通过全波长扫描,得出最佳波长为 230 nm^[11,12];运行时间 70 min;进样量为 20 μL。以乙腈和 0.2%磷酸+0.2%三乙胺为流动相,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

流动相	时间/min							
	0	10	20	30	40	50	60	70
乙腈/%	10	10	12	18	30	40	60	80
0.2%磷酸+0.2%三乙胺/%	90	90	88	82	70	60	40	20

2.3.4 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,在“2.3.3”色谱条件下连续进样6次,各共有峰的相对保留时间RSD均小于1.4%,各共有峰相对峰面积RSD均小于3.67%。

2.3.5 重复性试验 取同一批次的附子-甘草合煎液,按“2.3.2”项下方法操作,平行制备6份供试品溶液,在“2.3.3”色谱条件下进样测定。结果各共有峰相对保留时间的RSD均小于1.7%,相对峰面积的RSD均小于2.45%。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取同一批次的附子-甘草合煎液的供试品溶液,在“2.3.3”色谱条件下,分别于0、2、4、6、8、12 h进行测定,结果表明,各共有峰相对保留时间RSD均小于1.52%,各共有峰相对峰面积RSD均小于3.34%。

2.3.7 指纹图谱的建立与评价 分别精密吸取10批附子和甘草单煎液的供试品溶液20 μ L,注入高效液相色谱仪,按“2.3.3”项下的色谱条件进行检测,记录色谱图;按照同样的方法分别记录其中1批附子-甘草药材合煎液以及混合液的HPLC指纹图谱;吸取“2.3.1”项下制备的9种对照品溶液,分成3组进样测定(第1组:苯甲酰新乌头碱,新乌头碱,次乌头碱,乌头碱;第2组:甘草苷,VI异甘草苷;第3组:甘草素,异甘草素,甘草酸,因在该色谱条件下异甘草苷与甘草素的色谱峰难分离,故将与甘草成分的对照品分两次进样),得到3种混合对照品的色谱图。

3 结果

3.1 离体蛙心实验

药材煎液对正常组和心衰组离体蛙心的影响见表2和表3。药物对正常离体蛙心作用的实验结果显示,附子与甘草配伍后,其强心作用比单用附子弱,附子-甘草合煎液可以增加蛙心的张力变化百分比,附子-甘草混合液对蛙心的张力变化百分比基本无影响。附子与甘草配伍可改善心衰蛙心的心功能:附子生药量为1 mg时,合煎液即可达到最强药效;而附子单煎液与混合液均在附子生药量为4 mg时作用最强。附子单煎液、附子-甘草合煎液、附子-甘草混合液3个药物组对离体蛙心的作用有显著统计学意义($P<0.05$)。

3.2 药物HPLC指纹图谱研究

3.2.1 指纹图谱色谱峰的归属与指认 对10个不同批次附子和甘草药材的单煎液、合煎液与混合液进行指纹图谱检测,并进行指标成分的确证。以上数据均采用中药指纹图谱相似度评价系统2012版本(国家药典委员会)处理,结果如图1-3。

由以上指纹图谱可以看出,在图1-3中标记的31个峰中,1、2、3、5、10、12、13、18、19、20号峰来源于附子,其余峰来源于甘草;其中7号峰为甘草苷,15号峰为异甘草苷,16号峰为甘草素,18号峰为新乌头碱,19号峰为次乌头碱,20号峰为乌头碱,21

表2 药物对正常离体蛙心张力变化百分比的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

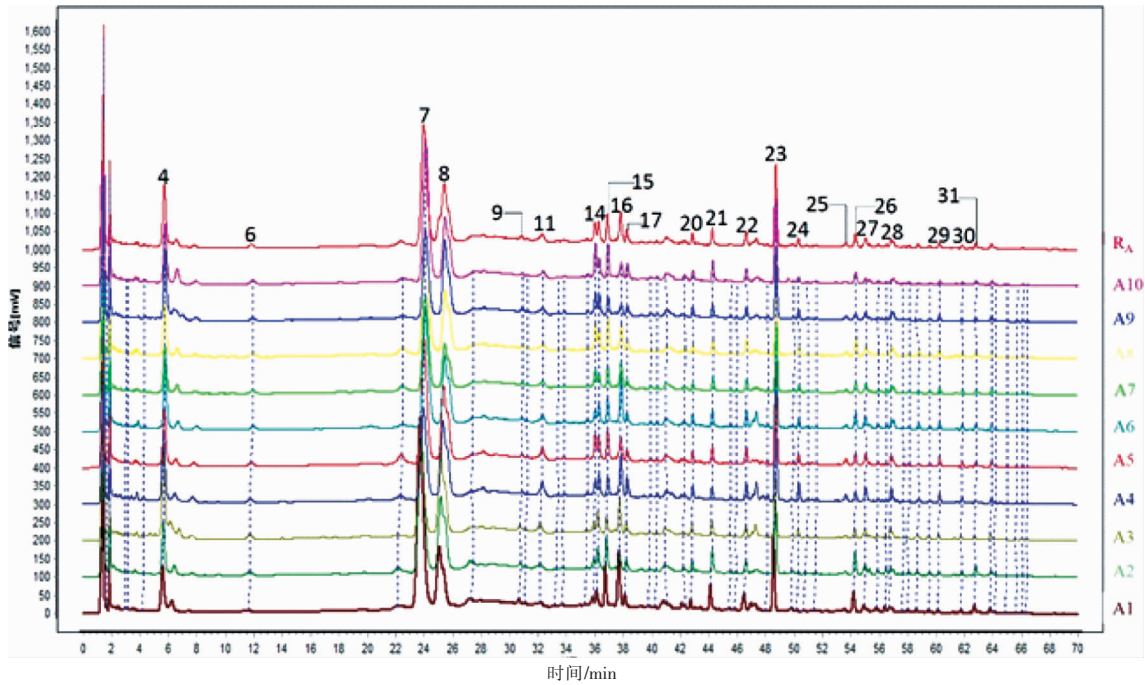
组别	剂量/mg						
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8
附子煎液组	-13.23±0.46 ^{▲▲▲}	0.19±1.91 ^{▲▲}	14.77±0.60 ^{▲▲▲}	51.58±3.12 ^{▲▲▲}	92.10±8.03 ^{▲▲▲}	47.90±6.46 ^{▲▲}	22.91±0.96 ^{▲▲▲}
合煎液组	3.16±0.87 ^{***▲}	12.02±1.32 ^{**}	28.43±4.84 ^{***▲}	25.30±0.94 ^{***▲}	29.80±3.67 ^{***▲}	34.62±1.70 ^{***▲}	12.37±0.48 ^{***▲}
混合液组	-1.60±0.15 ^{***▲}	-0.69±0.25 ^{***}	-0.69±0.16 ^{***}	1.39±0.37 ^{**}	-4.2±0.12 ^{***}	0.00±0.01 ^{**}	-0.36±0.69 ^{***}

注:与附子组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$;与混合液组比较,▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$;与合煎液组比较,▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$

表3 药物对心衰离体蛙心张力变化百分比的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

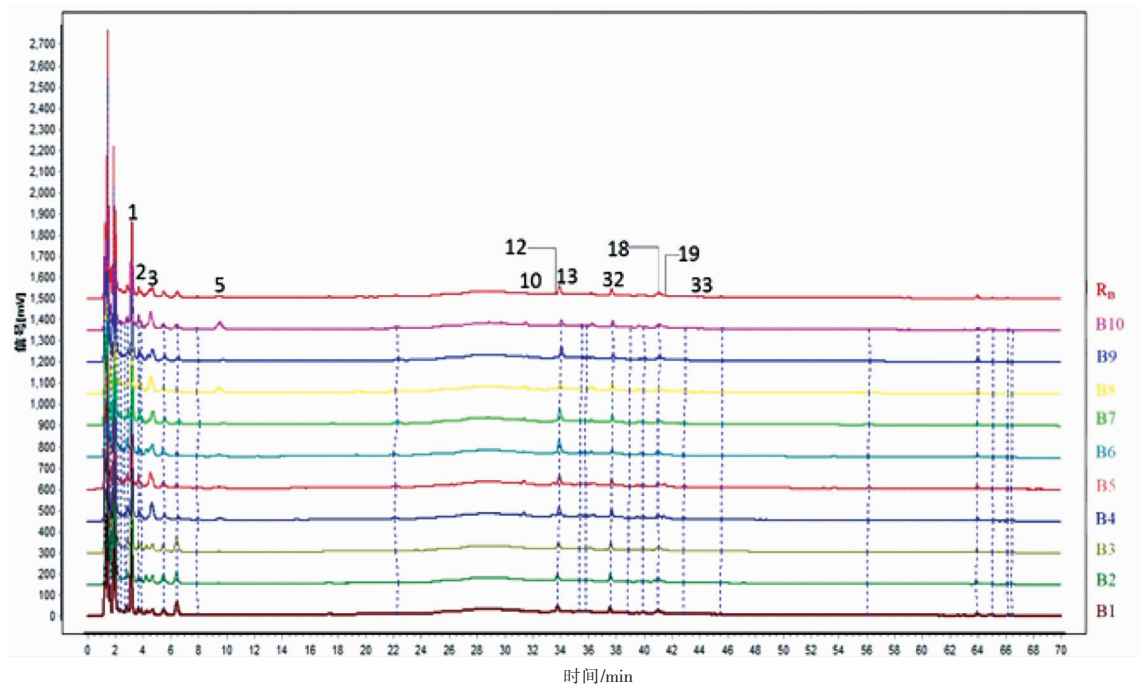
组别	剂量/mg						
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8
附子煎液组	-1.31±2.05 ^{▲▲▲}	7.76±4.63 ^{▲▲▲}	11.36±1.43 ^{▲▲}	36.55±3.27 ^{▲▲}	98.95±6.51 ^{▲▲▲}	115.68±4.64 ^{▲▲▲}	100.69±9.71 ^{▲▲▲}
合煎液组	22.21±3.50 ^{***▲}	34.53±2.50 ^{**}	42.21±4.22 ^{***}	195.69±28.53 ^{***▲}	151.35±9.68 ^{***▲}	99.53±11.77 ^{***▲}	5.99±1.61 ^{**}
混合液组	4.61±0.27 ^{***}	32.03±1.52 ^{**}	15.32±1.95 ^{**}	28.53±3.51 ^{**}	63.41±3.99 ^{***}	198.65±3.12 ^{***}	23.81±2.44 ^{***}

注:与附子组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$;与混合液组比较,▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$;与合煎液组比较,▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$



注:A1~A10:10个不同批次的甘草;RA:10批甘草的对照指纹图谱

图 1 10 批甘草药材指纹图谱与其对照指纹图谱



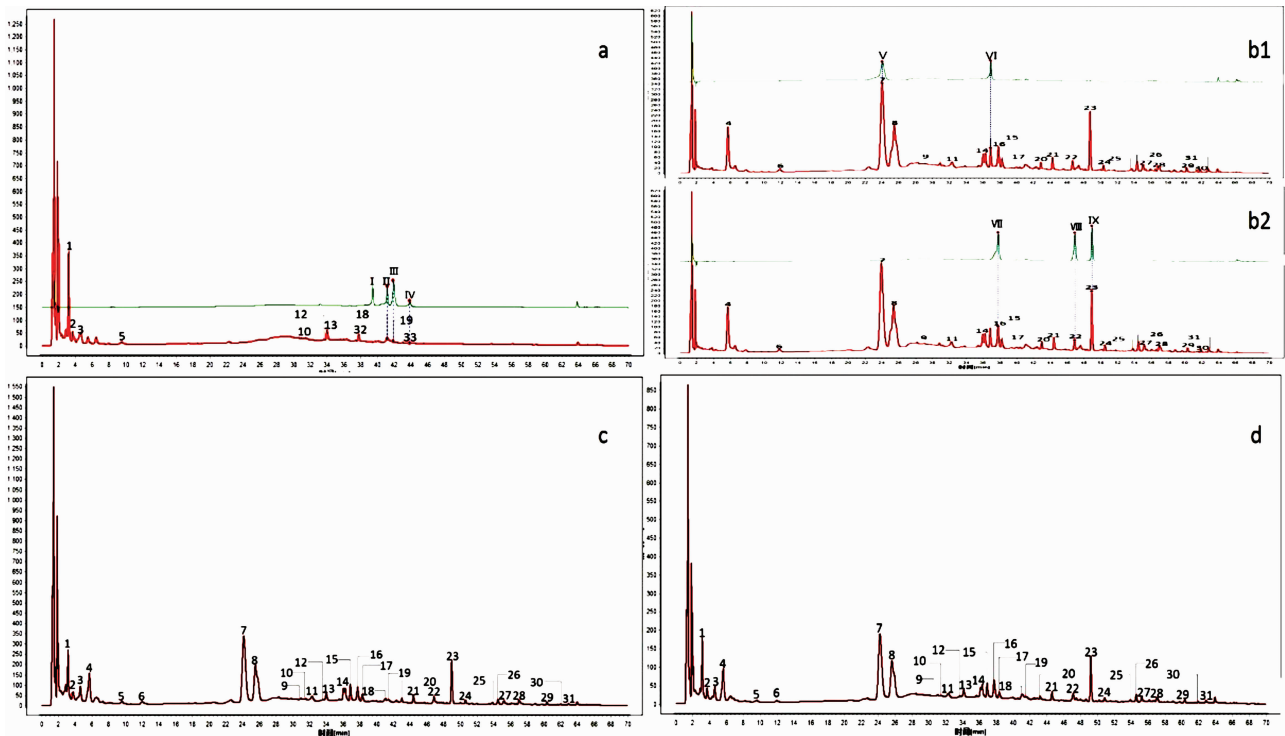
注:B1~B10:10个不同批次的附子;RB:10批附子的对照指纹图谱

图 2 10 批附子药材指纹图谱与其对照指纹图谱

号峰为甘草酸,22号峰为异甘草素,33号峰为乌头碱。与甘草单煎液相比,合煎液与混合液色谱图中峰的数目基本无变化;而相比于附子单煎液,在药对色谱图中减少了两个峰,即附子中的32号峰与33号峰(乌头碱)消失。说明在此色谱条件下,未发现附子甘草配伍后有新成分产生,且合煎液与混合液色谱图的峰数目一致。

3.2.2 配伍前后指纹图谱的变化 为观察附子-甘草合煎液与混合液指纹图谱的差异,将对照指纹图谱的各色谱峰与附子单煎液和甘草单煎液对照指纹图谱的各色谱峰进行比较,分别计算其变化的百分比。见图4。

指纹图谱中的峰面积与成分的含量呈正相关性,故可以通过对比配伍前后峰面积的变化来估计



注:a.附子单煎液与标准品(I 苯甲酰新乌头碱, II 新乌头碱, III 次乌头碱, IV 乌头碱); b1.甘草单煎液与标准品(V 甘草苷, VI 异甘草苷); b2.甘草单煎液与标准品(VII 甘草素, VIII 甘草素, IX 甘草酸); c.附子-甘草合煎液; d.附子-甘草混合液

图3 附子甘草配伍前后药液的对照指纹图谱及标准品的指纹图谱

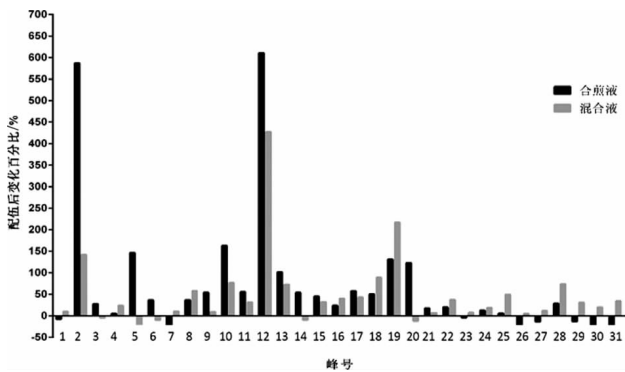


图4 合煎液与混合液指纹图谱中各峰配伍后变化百分比的比较

成分的含量变化。指纹图谱对比显示,配伍后,甘草中的异甘草苷(15号峰)、甘草素(16号峰)与异甘草素(22号峰)成分含量均升高,甘草酸(23号峰)无明显变化,附子中的乌头碱成分(33号峰)和32号峰代表的成分消失。总体而言,合煎液和混合液中的成分变化差别较复杂,未呈现明显的规律性。与甘草单煎液相比,合煎液中大部分甘草相关成分含量有所升高,但甘草苷(7号峰)以及26号峰、30号峰、31号峰代表的成分含量大幅度降低;混合液中甘草苷含量升高,20号峰代表的成分含量降低,而其他大多数甘草相关成分增多或无明显改变。与附子单煎液相比,合煎液中的3号峰与5号峰代表的附子

相关成分含量有明显的上升趋势,而在混合液中,3号峰代表的成分无明显变化,5号峰代表的成分含量呈下降趋势。

以上结果表明,附子与甘草配伍后,其合煎液与单煎液的混合液成分变化不一致。

4 讨论

4.1 色谱条件的选择

参考文献[13-14]资料并结合预实验,本实验以乙腈和0.2%磷酸+0.2%三乙胺为流动相进行梯度洗脱,样品利用DAD检测器进行全波段扫描检测分析。检测结果发现样品在230、250、337、360 nm检测处都有比较显著的特征色谱峰,其中以230 nm为检测波长时所得色谱图指纹信息最好,因此本实验选取230 nm作为检测波长。在上述分离检测条件下,附子单煎液样品,附子-甘草合煎液与混合液样品均在70 min内出峰完毕,且分离度良好。

4.2 结果分析

本实验在用药剂量及配伍比例、药材浸泡、煎煮时间和浓缩条件相同的情况下,通过离体蛙心实验和HPLC指纹图谱比较了附子-甘草药合煎液与混合液的药效和物质基础。结果表明,对离体正常蛙

心,合煎液可以缓和附子的强心作用,混合液则无明显影响。对离体心衰蛙心,附子与甘草配伍后可以明显增强药效,合煎可使附子在较低生药量(1 mg)时达到最高药效,而单煎液与混合液均含附子为4 mg时方可达到最高药效。

药物指纹图谱研究显示附子甘草配伍前后成分有变化,但未发现新的化合物;另合煎液与混合液的指纹图谱差异显著:各指标成分的峰面积均有差别,并且甘草昔以及5号、20号、30号、31号峰代表的成分变化是相反的。上述结果提示,指纹图谱上这些成分变化是附子、甘草合煎液与混合液药效差异的物质基础。但这些色谱峰所代表的成分、具体的化学反应差别及其原因,以及这些成分对离体蛙心的具体作用还有待研究。

4.3 小结

根据文献报道,甘草对附子的减毒增效主要与附子与甘草中各成分间的相互反应或作用密切相关^[15],故本实验将附子-甘草合煎液与混合液进行对比研究。实验发现附子-甘草的合煎液与混合液,无论在化学成分、成分含量以及药效上均有差别。合煎液与混合液中产生的成分变化差别可能是由于成分间产生的化学反应不同。为进一步阐明附子、甘草配伍的物质基础,可在本研究基础上,通过UPLC-MS、NMR等手段对合煎液与混合液中未辨别的色谱峰进行定性定量研究。

汤剂是中药临床应用的传统剂型和主要形式,中药配方颗粒是由单味中药饮片经提取浓缩制成,供中医临床配方用的颗粒。中药复方的配方颗粒虽方便病人服用,但与传统合煎汤剂相比,其有效成分的含量有明显区别^[16-19],量效关系、毒效关系均有待评估^[20]。本研究结果还提示,为使中药配方颗粒与传统汤剂等效且确保安全性,其临床用量需经科学研究加以论证。

参考文献

[1] 陈荣昌,孙桂波,张强,等.附子毒性研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(8):1126-1129.
 [2] 曹明成,黄泰康.我国有毒中药的研究进展综述[J].中国药业,2016,25(2):9-13.
 [3] 王律韵,杨洁红,张宇燕,等.附子与甘草配伍减毒增效的物质基

础初探[J].中国中医急症,2011,20(2):248-250.

- [4] 张丹,叶强.附子配伍不同甘草炮制品及其比例的研究[J].中国医院药学杂志,2013,33(13):1102-1104.
 [5] 张广平,解素花,朱晓光,等.附子甘草配伍减毒增效/存效实验研究[J].中国中医药信息杂志,2012,19(6):31-34.
 [6] 齐梁煜,黄月维,韦家河,等.王不留行醇提物和水提物对离体蛙心的影响[J].现代预防医学,2016,43(10):1873-1876.
 [7] 汪洋,唐泽耀,王珂萌,等.茶色素对离体蟾蜍心肌收缩力的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(12):90-94.
 [8] 吕云瑶,王兴娜,张梦芸,等.洋葱醇提物对离体蟾蜍心脏功能的影响[J].西部中医药,2018,31(3):15-18.
 [9] 邓家刚,范丽丽,郝二伟,等.附子的回阳救逆量效关系研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):150-154.
 [10] HUANG W W, WANG M Y, SHI H M, et al. Comparative study of bioactive constituents in crude and processed *Glycyrrhizae radix* and their respective metabolic profiles in gastrointestinal tract in vitro by HPLC-DAD and HPLC-ESI/MS analyses[J]. Archives of Pharmacal Research,2012,35(11):1945-1952.
 [11] CSUPOR D, BORCSA B, HEYDEL B, et al. Comparison of a specific HPLC determination of toxic aconite alkaloids in processed *Radix aconiti* with a titration method of total alkaloids[J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 49(10):1097-1101.
 [12] NIELSEN N P V, CARSTENSEN J M, SMEDSGAARD J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 805(1/2):17-35.
 [13] CSUPOR D, BORCSA B, HEYDEL B, et al. Comparison of a specific HPLC determination of toxic aconite alkaloids in processed *Radix aconiti* with a titration method of total alkaloids[J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 49(10):1097-1101.
 [14] 王文鹏,冯玉康,郝鹏彬,等.甘草提取物 HPLC 指纹图谱及质量评价研究[J].西部中医药,2017,30(11):52-55.
 [15] 何瑶,章津铭,高飞,等.附子甘草配伍减毒增效作用机制研究进展及展望[J].中药与临床,2013,4(3):62-65.
 [16] 张斐妹,蔡舒婷,舒析,等.中药配方颗粒的临床运用概况与未来趋势[J].中国医药导报,2016,13(16):70-73.
 [17] 何书芬,张倩,朱立静,等.四逆汤配方颗粒煎煮前后6种成分的含量变化研究[J].药学与临床研究,2016,24(4):308-311.
 [18] 郝云芳.苓桂术甘汤传统汤剂、复方颗粒剂、配颗粒剂化学成分与药效对比研究[D].太原:山西省中医药研究院,2014.
 [19] 史蕙,黄蓓.HPLC对戊己丸传统汤剂与其复方、配方颗粒汤剂的特征图谱比较[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):86-94.
 [20] 鹿岩,李妮,段梦雅,等.2010-2013年357种中药配方颗粒的临床使用分析[J].现代药物与临床,2014,29(9):1050-1053.