



论文

十八反中藜芦与人参配伍化学成分变化的 UPLC/Q-TOF MS 研究

王宇光^{①†}, 王超^{②†}, 梁乾德^①, 马增春^①, 陆倍倍^①, 肖成荣^①, 谭洪玲^①, 高月^{①*}^① 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850^② 安徽省医学科学研究院, 合肥 230061

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: gaoyue@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-07-16; 接受日期: 2011-08-13

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB505304)、北京市自然科学基金(批准号: 7112110)和国家自然科学基金(批准号: 81073149)资助项目

doi: 10.1360/052011-602

摘要 利用超高压液相色谱串联飞行时间质谱(UPLC/Q-TOF MS)对中药十八反药对藜芦与人参配伍的合煎液与单煎后的合并液进行检测, 经过 MassLynx 4.1 软件分析, 结果表明其化学成分存在差异, 与人参配伍合煎后部分藜芦类甾体生物碱, 如藜芦定碱、芥藜芦碱类、棋盘花胺类等的溶出增加, 有可能致毒性增加; 藜芦与人参配伍同时降低了人参皂苷类药效成分的含量, 具有增毒减效的作用。

关键词
UPLC
Q-TOF MS
LC-MS
藜芦
人参

中药十八反是中药七情中相反这一配伍关系的具体体现, 自《神农本草经》以后, 历代本草均有关于配伍禁忌的警示记载。当前, 中药配伍禁忌日益受到广泛关注, 开展具有中医药理论特色的十八反研究, 以期指导和保障临床用药的安全与有效, 成为亟待解决的关键科学问题^[1]。中药临床疗效或毒性的物质基础是其化学成分的总和。配伍后药物成分的变化是配伍禁忌产生的重要原因之一, 因此, 对合煎后化学成分的分析是配伍禁忌研究的重要内容^[2]。

人参反藜芦是中药十八反代表性药对之一, 由一味剧毒中药藜芦与人参组成。该药对一直是中医用药禁忌, 但其产生相反作用机制并不十分清楚, 是否与藜芦毒性成分的变化相关联也有待探究。因此有必要从人参与藜芦配伍后化学成分的变化进行研究, 进而发现其相反作用的可能原因。UPLC 在中药

等复杂体系的分离分析上具有明显优势, 具有超高压、超高灵敏度、超高分离度等特点。飞行时间串联质谱仪(Q-TOFMS)是高分辨串联质谱, 其显著特点是高灵敏度、高选择性, 能得到高质量质谱图和化合物精确分子量(质量精度 $<3 \times 10^{-6}$), 能大大提高化合物结构鉴定的准确性。

本研究采用 MarkerLynx 4.1 软件进行峰提取、峰对齐及归一化等处理, 利用主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘判别分析法(OPLS-DA), 找出合并液与合煎液化学指纹图谱的差异, 并通过变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)得到潜在的化学标记物(marker), 结合标准品和质谱数据库检索, 对潜在的化学标记物进行快速鉴定。这些都较以往液质联用技术具有更明显的优势, 更适合中药这种复杂体系的研究。本研究利用此方法建立人参与

英文引用格式: Wang Y G, Wang C, Liang Q D, et al. Analysis of chemical composition in combination of veratrum nigrum and radix ginseng by UPLC/Q-TOFMS with multivariate statistical analysis. SCIENTIA SINICA Vitae, 2011, 41: 925-932, doi: 10.1360/052011-602

藜芦配伍后毒性成分的指纹图谱, 寻找引起毒性和药效变化的物质基础, 进而揭示藜芦与人参配伍后相关毒性成分的变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

藜芦购自安徽丰原铜陵中药饮片公司, 产自长春华家; 人参购自吉林银河参业科技发展有限公司, 产自吉林抚松, 经军事医学科学院马百平教授鉴定, 分别为百合科藜芦属植物藜芦(*Veratrum nigrum* Linn.) 的干燥根和五加科人参属植物人参(*Panax ginseng* C.A. Mey.) 的干燥根, 标本存放于军事医学科学院二所二室。甲酸为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈为色谱纯, 购自 Fisher Scientific 公司; 超纯水经 Millipore 纯水系统纯化。

1.2 仪器设备

Acquity UPLC-Synapt MS 色谱-质谱联用仪(Waters 公司), MassLynx V4.1 质谱工作站(Waters 公司), Heraeus Labofuge 400R 冷冻离心机(Heraeus, 德国), Millipore Simplicity 纯水仪(Millipore, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 供试样品的制备

(1) 合煎液的制备: 藜芦、人参按 1:10 比例称重混合, 加入 10 倍量的水, 浸泡 30 min 后煎煮, 煮沸 60 min, 提取煎液, 3 层纱布过滤; 第二次煎煮加入 5 倍量水, 煎煮 30 min 后纱布过滤, 提取煎液, 合并 2 次滤液, 即为藜芦人参合煎液; (2) 单煎后合并液的制备: 先制备藜芦单煎液和人参单煎液, 制备方法同上, 待单煎液冷却后将两煎液按 1:10 混合, 即为藜芦人参合并液。将制备的煎液静置, 经 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液。

以上样品均经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得待测样品, 4℃ 保存, 待测。

1.3.2 超高压液相色谱条件

采用 Waters ACQUITY® BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 柱温为 45℃, 流速为 0.4 mL/min, 进样量为 5 μL ; 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶

液; 流动相 B: 乙腈。正离子模式下梯度洗脱程序为: 0~0.5 min, 乙腈 1%~10%; 0.5~3.0 min, 乙腈 10%~20%; 3.0~8.0 min, 乙腈 20%~35%; 8.0~11.0 min, 乙腈 35%~99%; 11.0~13.0 min, 乙腈 99%~1%。负离子模式下梯度洗脱程序为: 0~0.5 min, 乙腈 1%~15%; 0.5~6.0 min, 乙腈 15%~30%; 6.0~8.0 min, 乙腈 30%~36%; 8.0~9.0 min, 乙腈 36%~40%; 9.0~11.0 min, 乙腈 40%~48%; 11.0~13.0 min, 乙腈 48%~1%。

1.3.3 质谱条件

采用电喷雾电离离子源(ESI), 正、负离子 V 模式检测; m/z 范围: 50~1500; 毛细管电压为 3 kV; 锥孔电压为 35 V; 离子源温度为 120℃; 雾化温度为 300℃; 壳气流速为 900 L/h; 正、负离子模式下以亮氨酸-脑啡肽进行精确质量校正($[M+H]^+=556.2771$, $[M+H]^-=554.2615$)。

1.3.4 统计学方法

液质联用数据采用 MarkerLynx 4.1 软件进行峰提取、峰对齐及归一化等处理, 利用主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘判别分析法(OPLS-DA), 找出合并液与合煎液之间化合物指纹图谱的差异, 并通过变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)得到潜在的化学标记物(marker), 结合标准品和质谱数据库检索对潜在的化学标记物进行快速鉴定。

2 结果

2.1 人参藜芦合并液、人参藜芦合煎液总离子流色谱图差异比较

首先比较了人参藜芦合并液、人参藜芦合煎液总离子流色谱图差异。人参藜芦合煎液与合并液相比, 如图 1 所示, 正离子模式下合煎液在 t_R 为 4.04, 4.59, 4.66, 4.73, 4.93, 5.09, 6.01, 6.56, 6.90, 7.39 min, 分子离子峰 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 16 峰面积显著增加; t_R 为 2.70, 6.72, 9.09 min, 合煎液离子峰 1, 13, 17 的峰面积显著减小。负离子模式下, 合煎液在 t_R 3.03 min 分子离子峰 1 峰面积显著增加; t_R 为 7.25, 8.11, 9.45, 9.57, 9.75, 11.66 min, 分子离子峰 7, 10, 14, 15, 16, 17 的峰面积显著减少。初步显示合煎液与合并液之间化学成分在含量上存在差异。以上仅为二者色谱图的差异初步的比较, 进一步的分析需要通过 MarkerLynx 4.1 的统计

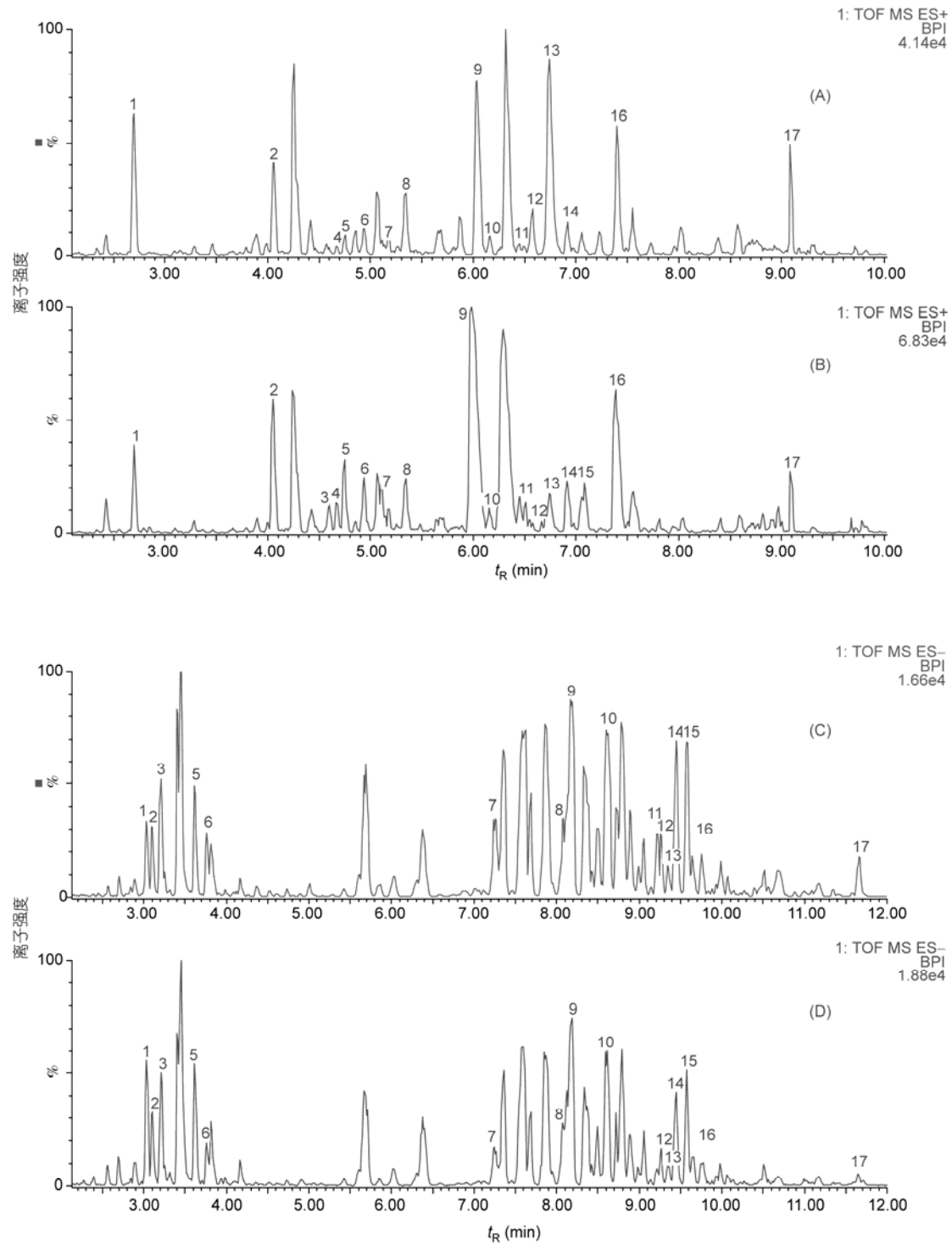


图 1 藜芦人参配伍的液相色谱/质谱总离子流色谱图(ES⁺, ES⁻)

(A) ES⁺藜芦人参合并液色谱图; (B) ES⁺藜芦人参合煎液色谱图; (C) ES⁻藜芦人参合并液色谱图; (D) ES⁻藜芦人参合煎液色谱图

学处理功能和 Q-TOF 给出的精确质量数对差异成分进行查找和结构鉴定。

2.2 MarkerLynx 4.1 统计分析软件寻找合并液与合煎液化学指纹图谱的差异

MarkerLynx 4.1 统计分析软件进行峰提取、峰对齐及归一化等处理, 利用主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘判别分析法(OPLS-DA), 找出合并液与合煎液化学指纹图谱的差异, 结果如图 2 所示。两组样品能够得到明显的区分。如图 3 的 S 散点图所示, 两组样品在化学成分上存在差异性, 在 S 型曲线两端的数据点分别代表了两组样品中可信度最高的特征化合物。

2.3 差异成分的结构鉴定

图 4 为 MarkerLynx 4.1 软件分析得到的两组样品中差异显著的特征化合物离子强度变化的趋势图。根据质谱数据与相关文献报道, 相关离子推断见 ES^+ 模式(表 1)和 ES^- 模式(表 2)。藜芦与人参配伍合煎后, 来源于藜芦的部分生物碱显著增加(芥芬胺: t_R 14.20 min, m/z 632.3039; 伪芥芬胺: t_R 15.16 min, m/z 646.3239; 去氧芥芬胺: t_R 13.21 min, m/z 648.3032; 当归酰棋盘花胺: t_R 14.43 min, m/z 662.3182; 红芥芬胺: t_R 15.93 min, m/z 630.3285; 藜芦酰棋盘花胺: t_R 15.17 min, m/z 616.3115; 藜芦定碱: t_R 15.17 min, m/z 616.3115); 计米定碱(t_R 13.83 min, m/z 556.2924)含量显著降低; 而来源于人参的部分人参皂苷类成分含量显著降低(竹节人参皂甙 Iva: t_R 9.22 min, m/z 793.4368;

竹节人参皂甙 Iva: t_R 9.21 min, m/z 793.4295; 姜状三七甙 R1: t_R 11.66 min, m/z 793.4397; 人参皂苷 Rg3: t_R 7.25 min, m/z 829.4942; 人参皂苷 Ma-Re: t_R 3.76 min, m/z 1031.5520; 人参皂苷 Ma-Rd: t_R 9.57 min, m/z 1031.5470; 人参皂苷 Ma-Rc/Rb2/Rb3/isomer: t_R 9.28 min, m/z 1163.5950; 人参皂苷 Rd: t_R 9.45 min, m/z 991.5490)。以上数据提示, 人参与藜芦合煎可能存在配伍增毒减效的作用。

3 讨论

现代研究表明, 藜芦具有降血压、强心、抗血栓、改善脑血液循环及抗寄生虫感染等作用, 但同时会对神经系统、呼吸系统、心血管系统、消化系统有明显的毒性作用^[3]。藜芦的毒性主要来源于其所含的生物碱类, 其中原藜芦碱毒性最强, 介藜芦胺次之^[4]。人参反藜芦为十八反配伍禁忌之一。现代研究也表明, 在人参煎剂中加入 1/10 左右的藜芦煎剂, 小鼠耐疲劳能力显著降低^[5]。二者配伍合用对大鼠肝脏 P450 酶活性影响的研究显示, 可能存在基于药物代谢酶机制的相反作用^[6]。

近来, 很多学者对乌头类和藜芦类中药配伍规律的物质基础进行了研究, 试图通过对配伍前后毒性成分分析, 来了解物质基础变化与配伍、药效之间的内在关系。夏锦明等人^[7]对丹参与藜芦配伍化学成分进行了研究, 发现二者配伍后藜芦所含成分发生变化, 认为其相反具有一定道理。张旭等人^[8]对人参和藜芦配伍化学成分进行了研究, 结果显示配伍后人

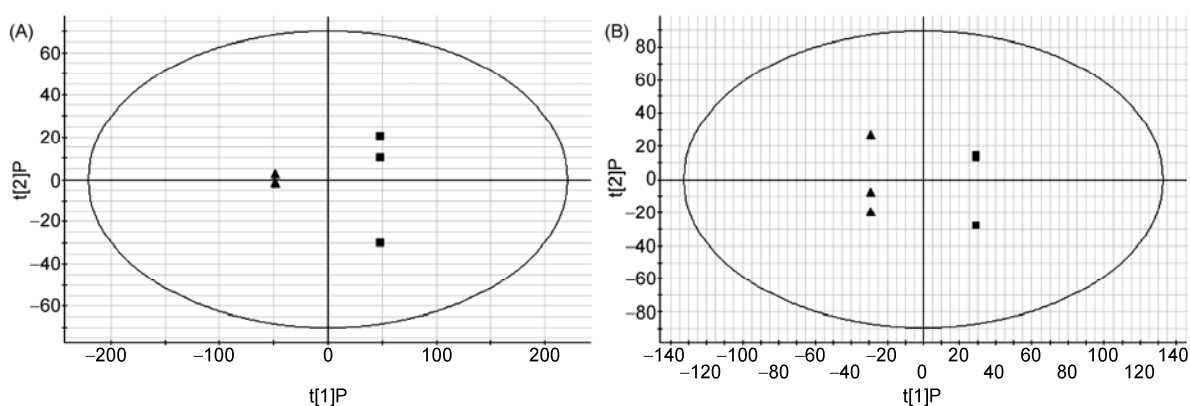


图 2 基于正交偏最小二乘法数据分析的分值结果

(A) ES^+ ; (B) ES^- . ▲, 合并液; ■, 合煎液

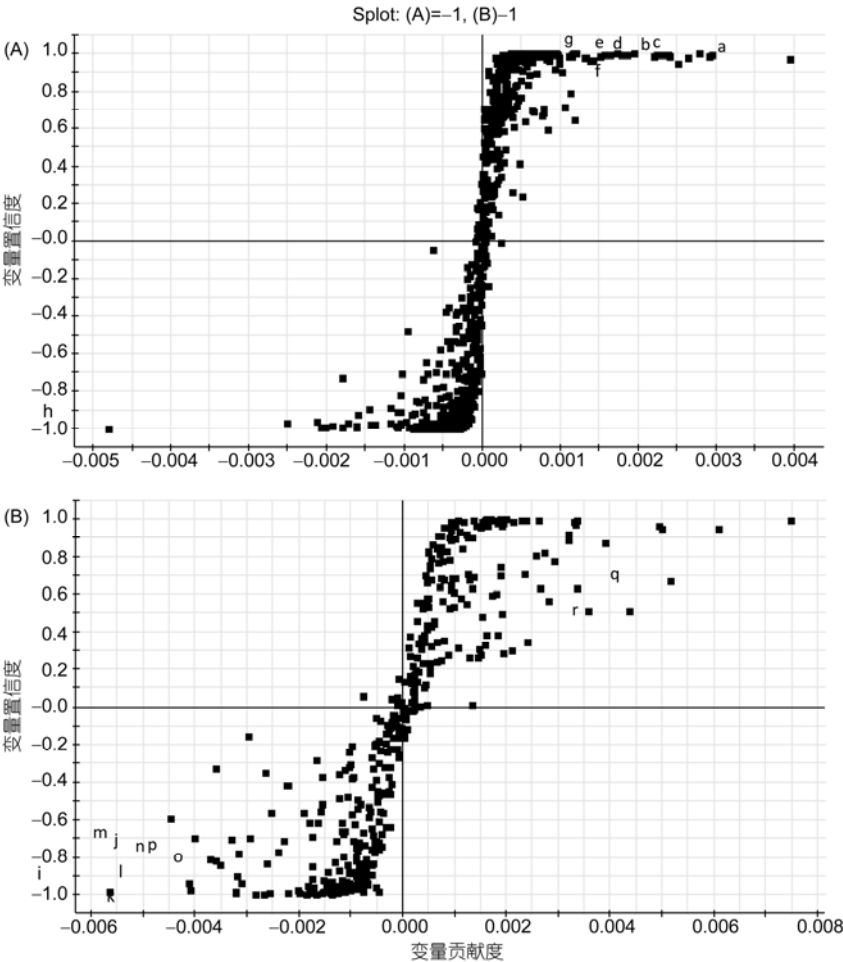


图 3 基于正交偏最小二乘法的藜芦人参配伍数据结果的散点图

表 1 藜芦人参合煎液与合并液中差异明显的离子峰化合物(ES⁺)^{a)}

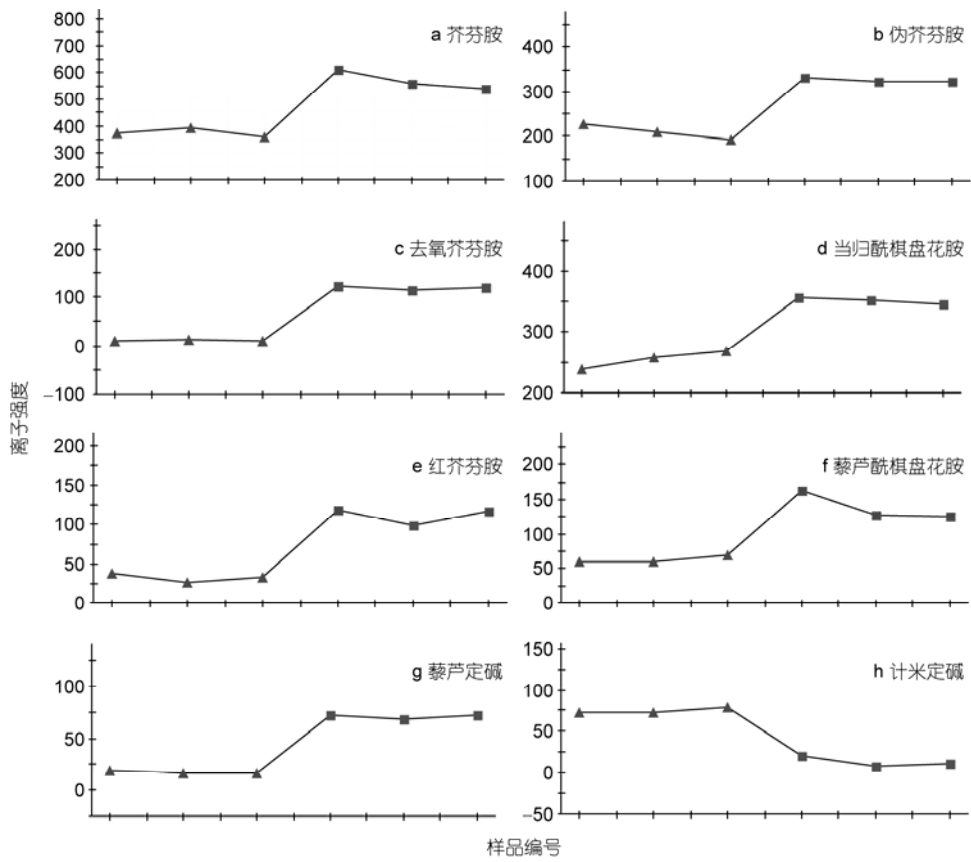
峰编号	t_R (min)	化合物归属	分子式	[M+H] ⁺ /m/z			VIP
				实际测量质量数 (Da)	理论精确质量数 (Da)	质量精度(10 ⁻⁶)	
1	2.70	verdine	C ₂₇ H ₄₁ NO ₅	460.3053	460.3063	-2.2	4.4803
2	4.04	伪芥芬胺	C ₃₃ H ₄₉ NO ₈	588.3530	588.3536	-1.0	5.0170
3	4.59	未知	—	574.3738	—	—	3.6935
4	4.66	藜芦定碱	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₁	674.3537	674.3540	-0.4	3.4349
5	4.73	未知	—	428.3126	—	—	5.3460
6	4.93	未知	—	658.3591	—	—	4.1425
7	5.09	红芥芬胺	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂	414.3352	414.3372	-4.8	4.1515
8	5.86	计米定碱	C ₃₄ H ₅₃ NO ₁₀	636.3725	636.3748	-3.6	3.6810
9	6.01	芥芬胺	C ₂₇ H ₃₉ NO ₃	426.2983	426.3008	-5.9	6.4871
10	6.24	未知	—	560.3946	—	—	4.0458
11	6.43	未知	—	560.3933	—	—	3.9353
12	6.56	未知	—	676.3708	—	—	3.6456
13	6.72	未知	—	678.3855	—	—	8.5369
14	6.90	藜芦酰棋盘花胺	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₀	658.3600	658.3591	1.4	3.9937
15	7.07	去氧芥芬胺	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂	412.3196	412.3159	9.0	4.8968
16	7.39	当归酰棋盘花胺	C ₃₂ H ₄₉ NO ₈	576.3527	576.3536	-1.6	4.5899
17	9.09	未知	—	274.2727	—	—	3.9787

a) —, 未确证

表 2 藜芦人参合煎液与合并液中差异明显的离子峰化合物(ES⁻)^{a)}

峰编号	<i>t_R</i> (min)	化合物归属	分子式	[M-H] ⁻ ([M-H+HCOOH] ⁻)/ <i>m/z</i>			VIP
				实际测量质量数 (Da)	理论精确质量数 (Da)	质量精度 (10 ⁻⁶)	
1	3.03	未知	—	723.5013	—	—	4.6281
2	3.20	未知	—	931.5245	—	—	3.8695
3	3.21	未知	—	977.5319	—	—	3.1500
4	3.21	未知	—	931.5317	—	—	2.4637
5	3.62	未知	—	841.4976	—	—	3.1004
6	3.76	人参皂苷 Ma-Re	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	1031.5520	1031.5427	9.0	2.4454
7	7.25	人参皂苷 Rg3	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.4942	—	—	2.5683
8	8.11	人参皂苷 Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1077.5780	1077.5846	-6.1	3.4995
9	8.13	未知	—	1209.6400	—	—	2.5917
10	8.59	人参皂苷 Rb2	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1077.5870	1077.5846	2.2	3.0067
11	9.21	竹节人参皂甙 IVa	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	793.4395	793.4374	2.6	2.8682
12	9.22	竹节人参皂甙 IVa	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	793.4368	793.4374	-0.8	3.5421
13	9.28	人参皂苷 Ma-Rc/Rb2/Rb3/isomer	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅	1163.5950	1163.5849	8.7	2.3889
14	9.45	人参皂苷 Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.5490	991.54	—	2.3279
15	9.57	人参皂苷 Ma-Rd	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	1031.5470	1031.5427	4.2	2.4433
16	9.75	未知	—	1119.5940	—	—	2.4766
17	11.66	姜状三七甙 R1	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	793.4397	793.4374	2.9	2.6471

a) —, 未确证.



(接下页)

(接上页)

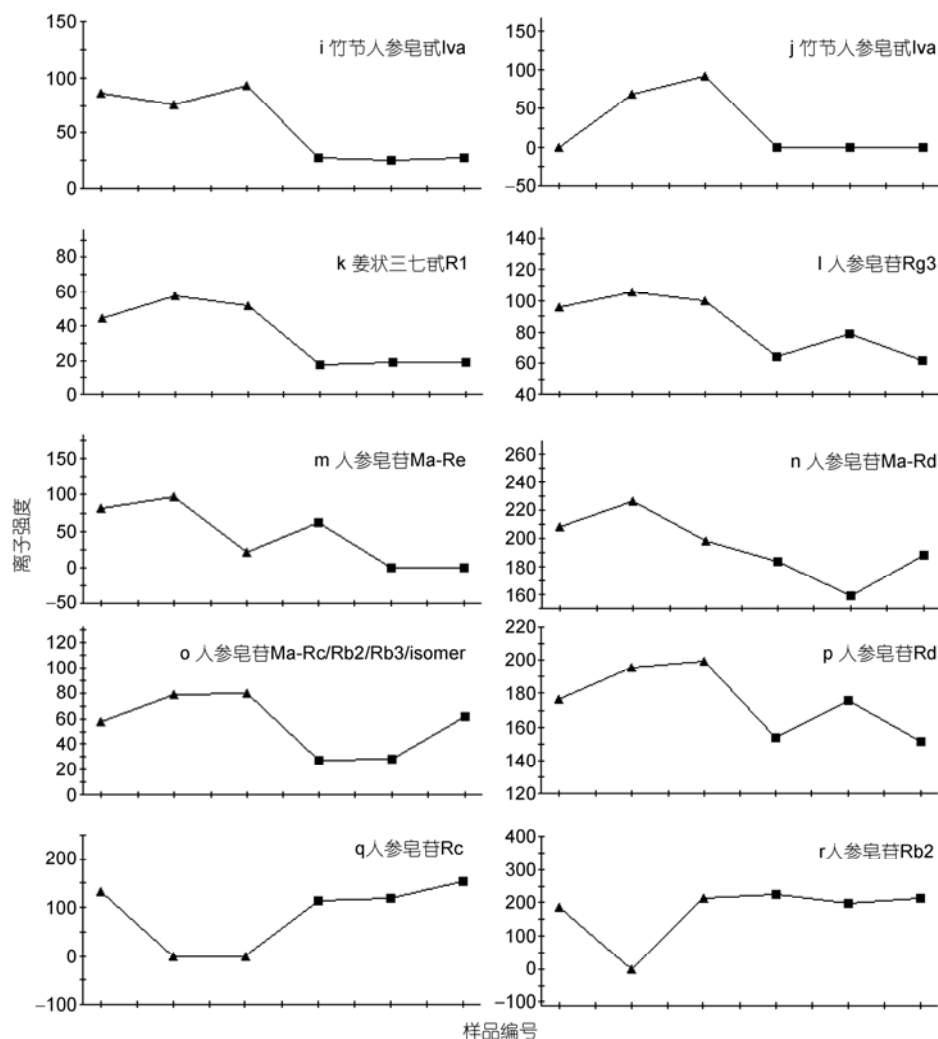


图 4 藜芦人参配伍差异显著的特征化合物的离子强度变化趋势图

▲, 合并液; ■, 合煎液

参皂苷含量下降, 藜芦总碱含量上升, 认为人参反藜芦具有一定道理. 本研究结果表明, 藜芦与人参配伍合煎, 会使得来源于藜芦中的部分生物碱 (veratrum steroid alkaloids, VSAs) 含量显著增加, 包括芥芬胺、伪芥芬胺、去氧芥芬胺、当归酰棋盘花胺、红芥芬胺、藜芦酰棋盘花胺、藜芦定碱; 而计米定碱含量降低; 同时, 来源于人参中的部分皂苷类成分含量降低. 说明藜芦与人参合煎过程中部分 VSAs 的溶出增加, 初步从体外化学成分的角度阐释了其配伍增毒的物质基础; 此外, 藜芦与人参配伍影响人参中

主要药效成分人参皂苷的含量, 降低了其配伍合用的药效作用, 存在减效的作用.

从配伍煎煮的实验结果显示, 人参与藜芦配伍合煎后部分藜芦类甾体生物碱, 如藜芦定碱、芥藜芦碱类、棋盘花胺类等的溶出增加可能与毒性增强有关; 二者配伍时也降低了人参皂苷类药效成分的含量, 具有减效的作用. 今后将通过动物毒理学实验进一步验证合煎应用是否能够体现出增毒的作用, 并与单煎合并液动物毒理学数据进行比较, 阐明增毒作用与化学物质的关系.

参考文献

- 1 宿树兰, 段金廛, 李文林, 等. 基于物质基础探讨中药“十八反”配伍致毒/增毒机制. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16: 123–129
- 2 李东晓, 邓文龙. 中药配伍禁忌药理学及药学研究现状. 中药药理与临床, 2009, 25: 93–97
- 3 Parsons H M, Ludwig C, Gunther U L, et al. Improved classification accuracy in 1- and 2-dimensional NMR metabolomics data using the variance stabilising generalised logarithm transformation. BMC Bioinformatics, 2007, 8: 234
- 4 Slupsky C M, Rankin K N, Wagner J, et al. Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. Anal Chem, 2007, 18: 6995–7004
- 5 Xia J G, Bjorndahl T C, Tang P, et al. MetaboMiner—semi-automated identification of metabolites from 2D NMR spectra of complex biofluids. BMC Bioinformatics, 2008, 9: 507
- 6 Xia J G, Psychogios N, Young N, et al. MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation. Nucleic Acids Res, 2009, 37: W652–W660
- 7 夏锦明, 孟宪生, 张颖, 等. 丹参与藜芦配伍化学成分变化的 UPLC/Q-TOF 研究. 光谱学与光谱分析, 2008, 10: 465–466
- 8 张旭, 宋凤瑞, 王隶书, 等. 人参与藜芦配伍化学成分变化的 HPLC-ESI-MS 与 ESI-MS 研究. 化学学报, 2007, 9: 829–833

Analysis of Chemical Composition in Combination of *Veratrum Nigrum* and *Radix Ginseng* by UPLC/Q-TOFMS with Multivariate Statistical Analysis

WANG YuGuang¹, WANG Chao², LIANG QianDe¹, MA ZengChun¹, LU BeiBei¹,
XIAO ChengRong¹, TAN HongLing¹ & GAO Yue¹

1 Institute of Radiation and Irradiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2 Academy of An Hui Province Medical Sciences, Hefei 230061, China

In the present study, an ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOFMS) based chemical profiling approach to rapidly evaluate chemical diversity after co-decocting of the incompatible pairs of *Veratrum nigrum* and *radix ginseng*. Result showed significant difference between two kinds of decoction samples, and *Veratrum* steroid alkaloids (VSAs), eg. jervine, pseudojervine, rubijervine, deoxyjervine, angeloylzygadenine, veratroylzygadenine, veratridine were identified as the most changed/increased toxic components of the incompatible pairs of *Veratrum nigrum* during co-decocting.

UPLC, Q-TOF MS, LC-MS, *Veratrum nigrum*, *radix ginseng*

doi: 10.1360/052011-602