

UPLC/Q-TOFMS 分析十八反乌头半夏配伍化学成分的变化

王超¹, 王宇光², 梁乾德², 让蔚清¹, 高月^{2*}

(1. 南华大学生命科学研究中心环境医学与放射卫生研究所, 湖南 衡阳 421001;

2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 利用 UPLC/Q-TOFMS 对中药十八反药对乌头半夏配伍煎煮前后水煎液进行检测, 分析合煎液与合并液化学成分差异, 探讨乌头半夏配伍产生毒性的可能机制, 从化学成分变化的角度阐述其相反的科学内涵。制备乌头半夏水煎液、乌头半夏合煎液及 1:1 合并液, 对合并液和合煎液进行 UPLC/Q-TOFMS 检测, 通过 MassLynx 4.1 统计软件分析两组间差异, 分析两组间差异显著的潜在化学标记物。乌头半夏合煎液与合并液色谱图存在明显差异, 二者合煎后剧毒成分乌头碱、中乌头碱及次乌头碱含量显著增加。乌头半夏合并煎煮与分别煎煮成分具有明显差异, 这种差异与乌头-半夏配伍增毒具有一定联系。

关键词: 十八反; UPLC; Q-TOFMS; 乌头; 半夏

中图分类号: R917; R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1301-06

Analysis of chemical composition in the combination of monkshood and pinellia by UPLC/Q-TOFMS with multivariate statistical analysis

WANG Chao¹, WANG Yu-guang², LIANG Qian-de², RANG Wei-qing¹, GAO Yue^{2*}

(1. Institute of Environmental Medicine and Radiation Hygiene, Research Center of Life Science, University of South China, Hengyang 421001, China;

2. Institute of Radiation and Irradiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: In the present study, an ultra performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOFMS) based on chemical profiling approach to evaluate chemical constitution between mixed decoction and co-decoction of monkshood-pinellia combination of the eighteen incompatible medications (Shi Ba Fan) was proposed. Two different kinds of decoctions, namely monkshood-pinellia co-decoction: water extract of the two herbs together, and monkshood-pinellia mixed decoction: water extract of each individual herbs mixed together, were prepared. Batches of these two kinds of decoction samples were subjected to UPLC/Q-TOFMS analysis, the datasets were processed with MassLynx 4.1 to holistically compare the difference between these two kinds of decoction samples. The most changed components during decocting were analyzed. Using the proposed approach, global chemical difference was found between co-decoction and mixed decoction, mesaconitine, aconitine and hyaconitine were identified as the most changed components (changed most significantly) during decocting. Result shows significant difference between two kinds of decoction samples, and the significant differences are probably related to the incompatibility of monkshood and pinellia.

Key words: eighteen incompatible medication; UPLC; Q-TOFMS; monkshood; pinellia

中药“十八反”是中药配伍禁忌的重要内容之一,最早源于《神农本草经》,其中将中药的配伍关系归纳为“有单行者,有相须者,有相使者,有相畏

者,有相恶者,有相反者,有相杀者,凡此七情,合和视之,当用。”但其中并未指出具体相反的药物。自《蜀本草》首先提出“相反者十八种”后,一直为历代医家所遵从,十八反的内容也被历版《中国药典》所收录,规定注明畏、恶、反的药物在一般情况下不宜使用或两药不宜同用,以避免可能导致的毒

收稿日期: 2010-04-13.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3070936).

*通讯作者 Tel: 86-10-66931312, E-mail: gaoyue@yahoo.com

性反应或拮抗药效。“乌头反半夏”是中药十八反的药对之一,但近年来中药十八反却成为现代药性理论争议最多的问题之一,焦点集中在其作为配伍禁忌的合理性。因此,开展具有中医药理论特色的十八反、十九畏相关研究,是迫切需要科学阐释其合理内涵的关键基础问题^[1]。

在反药配伍方剂中以乌头半夏为最多^[2],主要用于痹症的镇痛。乌头又名川乌,有祛风除湿、温经止痛的功效。其主要活性成分为二萜类生物碱,包括双酯型、单酯型和脂型二萜生物碱,其中双酯型毒性最大,乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的小鼠 LD_{50} 分别为 1.8、1.9 和 5.8 $mg \cdot kg^{-1}$ ^[3]。半夏性辛温,有小毒,归脾胃肺经,有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效。

目前,对于乌头半夏配伍的研究主要在于检测配伍后乌头中双酯型生物碱含量变化^[4-5],以及临床应用和药理方面的研究^[6-7],对其全面的化学成分变化及配伍规律的研究较少。超高效液相色谱(UPLC)技术是近年发展起来的分离技术,不仅使柱效得到提高,而且在较宽的流速范围内柱效保持恒定,从而有利于通过提高流动相的流速而缩短分析时间,提高分析通量。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。超高效液相色谱与飞行时间质谱联用技术(UPLC/Q-TOFMS)是目前科研中应用较好的定性测定方法,也是目前分析中药复杂系统的最有力工具之一^[8]。

本实验采用超高效液相色谱-飞行时间电喷雾质谱技术,结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析进行数据分析,探讨乌头与半夏配伍煎煮对其化学成分的影响,试图从化学成分变化的角度阐述二者相反的科学内涵。

材料与方方法

药材 乌头(川)、半夏购自河北安国中药材市场,均经军事医学科学院放射与辐射医学研究所马百平教授鉴定分别为毛茛科乌头属植物川乌(*Aconitum carmichaeli* Debx.)的干燥母根、天南星科半夏属植物半夏(*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.)的干燥块茎,标本收藏于军事医学科学院放射与辐射医学研究所二室。乌头碱等对照品购自中国药品生物制品检定所。

试剂 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;超纯水由Millipore制备。

仪器 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,Millipore Simplicity 纯水仪。

供试样品的制备 乌头和半夏按 1:1 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;第二煎加入 5 倍量水,煎煮 30 min 后纱布过滤提取煎液,合并两次滤液,即为乌头半夏合煎液;乌头半夏合并液先制备乌头单煎液和半夏单煎液,制备方法同上,将两煎液按 1:1 混合,即为乌头半夏合并液。将制备的煎液静置,经 10 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤即为样品,4 $^{\circ}C$ 保存,待测。

超高效液相色谱条件 采用 Waters ACQUITY BEH C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱;柱温为 45 $^{\circ}C$,流速为 0.4 $mL \cdot min^{-1}$,进样量为 5 μL ;流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液;流动相 B: 乙腈,梯度洗脱 (0~1.5 min: 乙腈 1%~3%; 1.5~13.5 min: 乙腈 3%~32%; 13.5~18.5 min: 乙腈 32%~60%; 18.5~20.5 min: 乙腈 60%~99%; 20.5~22.0 min: 乙腈 99%~1%)。

质谱条件 采用电喷雾电离离子源(ESI),正离子 V 模式检测; m/z 100~900;毛细管电压为 3 kV;锥孔电压为 35 V;离子源温度为 120 $^{\circ}C$;雾化温度为 300 $^{\circ}C$;壳气流速为 900 $L \cdot h^{-1}$;以亮氨酸-脑啡肽进行精确质量校正 ($[M+H]^+ = 556.2771$)。

数据分析 质谱数据采用 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谱的差异,并通过变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)得到 20 个潜在的化学标记物,结合质谱同位素分析和数据库检索对潜在的化学标记物进行鉴定。

结果

1 UPLC/Q-TOFMS 分析结果

首先比较了乌头半夏合并液、乌头半夏合煎液总离子流图差异。图 1 显示,合煎液与合并液相比,合煎液在 t_R 14.20 min 离子峰 16 峰面积增加最为显著;在 t_R 15.17、15.93 及 13.21 min 合煎液离子峰 19、20、

14 峰面积增加显著; 而 t_R 12.65 min、13.83 min 合煎液离子峰 13、15 峰面积显著减小。

乌头半夏合并液、乌头半夏合煎液质谱图见图 2。图中 m/z 632、616、646 离子的质谱图与对照品的质谱图比较, 可以确定为中乌头碱 (mesaconitine, $[M+H]^+ = 632$)、次乌头碱 (hypoconitine, $[M+H]^+ = 616$)、乌头碱 (aconitine, $[M+H]^+ = 646$)。根据质谱数

据与相关文献^[9, 10]报道, 相关离子推断见表 1。

2 MarkerLynx 统计结果

MarkerLynx 4.1 统计分析结果如图 3~5 所示。

由图 3 可见, 两组样品能够得到明显的区分。进一步由图 4 可见, 两组样品在化学成分上的差异性, 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。图 5 为 MarkerLynx 4.1 分析得

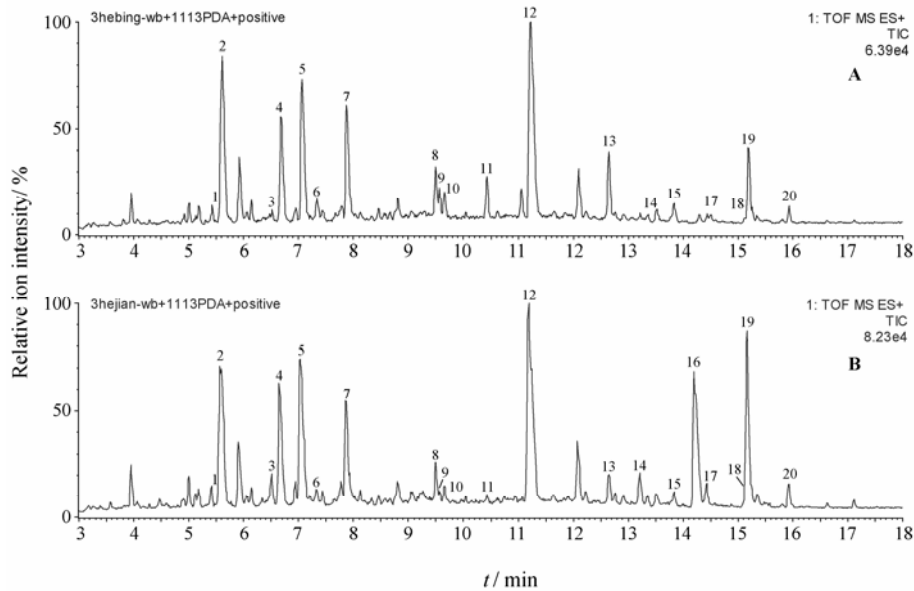


Figure 1 Representative chromatograms of (A) mixed decoction and (B) co-decoction of monkshood-pinellia

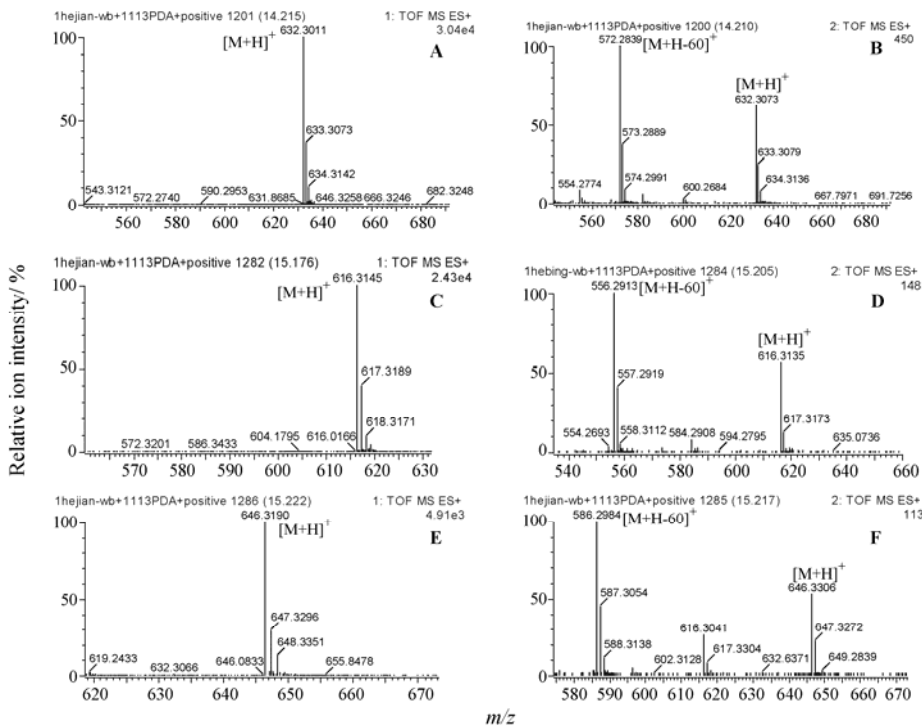


Figure 2 Representative mass spectra of most changed toxic components (A, B) mesaconitine, (C, D) hypoconitine and (E, F) aconitine during co-decocting of monkshood-pinellia

Table 1 The most changed components identified during co-decocting of monkshood-pinellia. VIP: Variable importance in projection

Peak No.	t_R /min	Assigned identity	Molecular formula	m/z	VIP
1	5.56	Carmichaeline	C ₂₂ H ₃₅ NO ₄	378.262 3	2.583 4
2	5.60	Cammaconine	C ₂₃ H ₃₇ NO ₅	408.271 9	3.932 7
3	6.51	Pengshenine A	C ₂₄ H ₃₇ NO ₆	436.231 3	2.128 1
4	6.68	Fuziline	C ₂₄ H ₃₉ NO ₇	454.278 9	2.322 1
5	7.04	Neoline	C ₂₄ H ₃₉ NO ₆	438.284 3	2.766 7
6	7.33	Torokonine	C ₂₇ H ₃₁ NO ₅	450.285 3	2.181 3
7	7.87	Talatizamine	C ₂₄ H ₃₉ NO ₅	422.288 3	2.081 2
8	9.50	Acetylalatizamine	C ₂₆ H ₄₁ NO ₆	464.300 5	2.361 2
9	9.57	Unknown	-	566.428 3	1.532 4
10	9.65	10-OH-benzoylmesaconine	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₁	606.290 7	2.010 3
11	10.43	Unknown	-	679.512 8	2.196 9
12	11.21	Benzoylmesaconine	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	590.296 5	2.752 1
13	12.65	Benzoylhypaconine	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	574.300 9	3.445 4
14	13.21	10-OH-mesaconitine	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₂	648.303 2	2.629 7
15	13.83	Dehydrated benzoylhypaconine	C ₃₁ H ₄₁ NO ₈	556.292 4	1.876 9
16	14.20	Mesaconitine	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	632.303 9	5.409 6
17	14.43	10-OH-aconitine	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₂	662.318 2	1.760 7
18	15.16	Aconitine	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	646.323 9	3.572 0
19	15.17	Hypaconitine	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	616.311 5	2.135 6
20	15.93	Deoxyaconitine	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₀	630.328 5	1.499 7

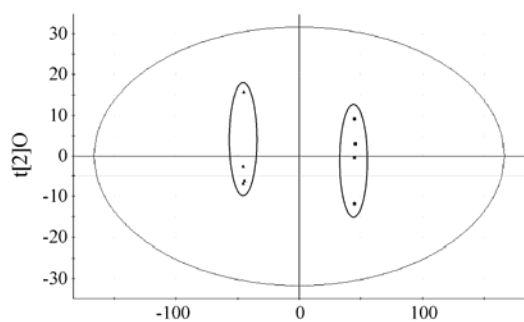


Figure 3 OPLS-DA/Scores plot of mixed decoction and co-decoction of monkshood-pinellia obtained using Pareto scaling with mean centering. ▲ mixed decoction; ■ co-decoction

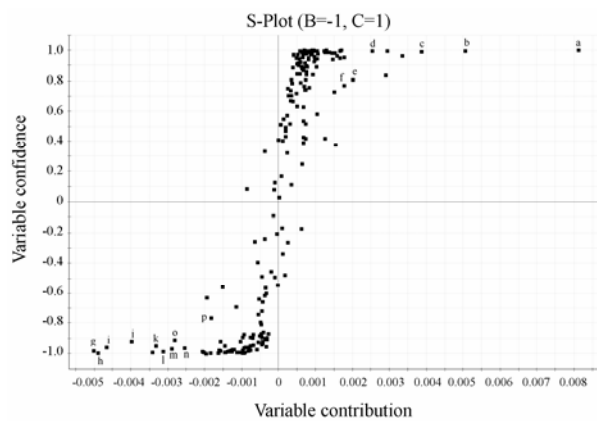


Figure 4 OPLS-DA/S-Plot of mixed decoction and co-decoction of monkshood-pinellia obtained using Pareto scaling with mean centering. a: t_R 14.20 min, m/z 632.303 9; b: t_R 15.16 min, m/z 646.323 9; c: t_R 13.21 min, m/z 648.303 2; d: t_R 14.43 min, m/z 662.318 2; e: t_R 15.93 min, m/z 630.328 5; f: t_R 15.17 min, m/z 616.311 5; g: t_R 5.60 min, m/z 408.271 9; h: t_R 12.65 min, m/z 574.300 9; i: t_R 7.04 min, m/z 438.284 3; j: t_R 11.21 min, m/z 590.296 5; k: t_R 9.65 min, m/z 606.290 7; l: t_R 7.33 min, m/z 450.285 3; m: t_R 9.50 min, m/z 464.300 5; n: t_R 13.83 min, m/z 556.292 4; o: t_R 6.68 min, m/z 454.278 9; p: t_R 7.87 min, m/z 422.288 3

到的两组样品中差异较显著的特征化合物的变化趋势图。

讨论

中药成分十分复杂，但其产生药效或毒性的物质基础仍然为化合物范畴。本课题组前期基于药物代谢酶层面，分别在酶活性、mRNA 及蛋白表达 3 个水平对乌头半夏配伍所致毒性增强的“中药-中药间相互作用”做了系统研究，结果显示乌头半夏配伍在酶活性、mRNA 及蛋白表达 3 个水平上均表现出对 CYP3A 的抑制作用。本实验将从化学物质基础层面探讨乌头半夏配伍致毒的可能机制。

研究表明乌头类药物的主要药效成分，亦是其主要毒性成分为双酯型二萜生物碱，主要包括乌头碱、中乌头碱、次乌头碱等；经过炮制或煎煮后水解成单酯型二萜生物碱，毒性大为降低；继续水解则进

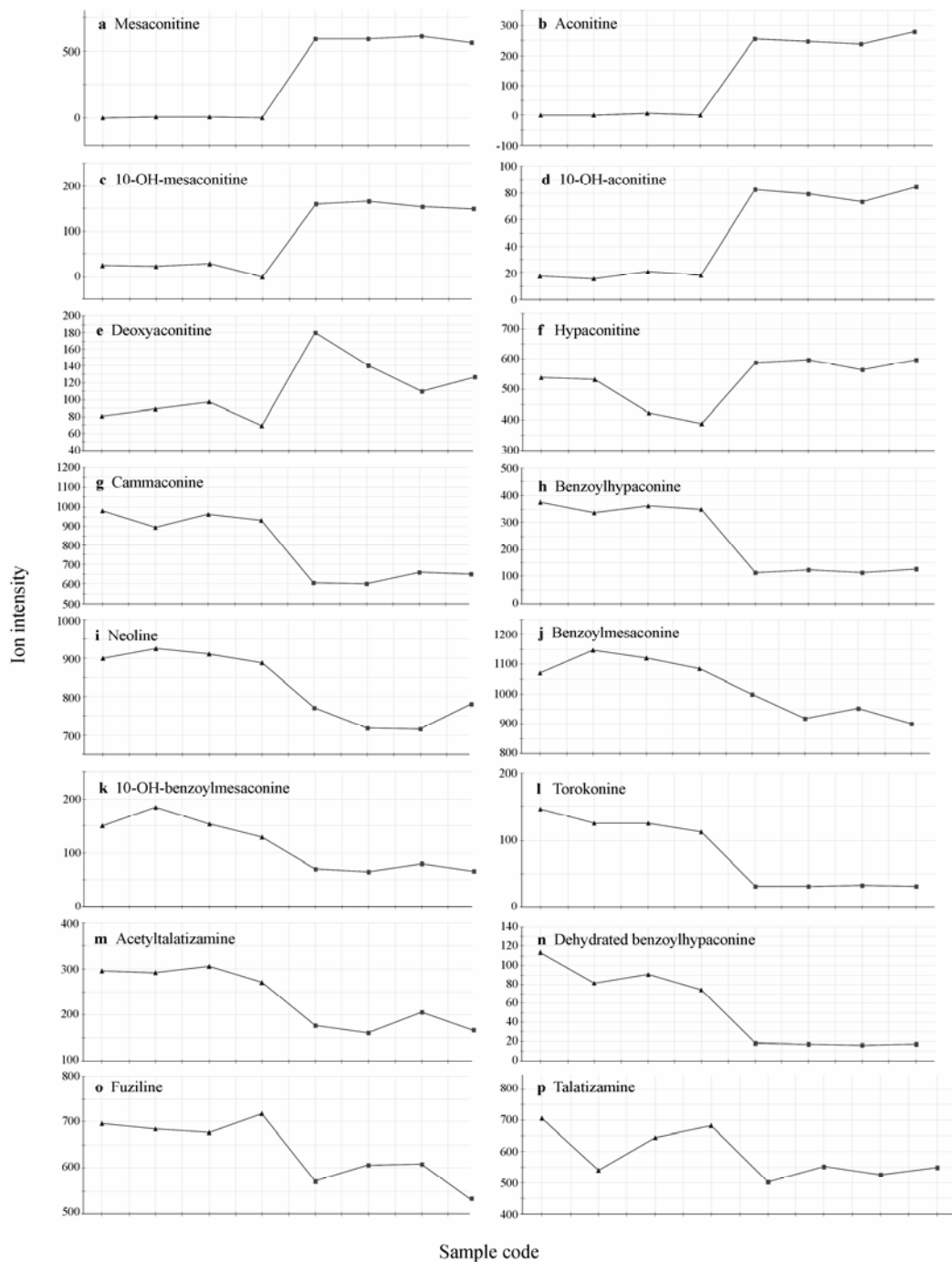


Figure 5 Selected ion intensity trend plots analyzed using Markerlynx 4.1 software. a-p see Figure 4. ▲ Mixed decoction; ■ Co-decoction

一步生成胺醇类生物碱, 几乎没有毒性。而在乌头与半夏配伍合煎后, 如图 5 所示主要的双酯型二萜生物碱却显著增加 (中乌头碱: t_R 14.20 min, m/z 632.303 9; 乌头碱: t_R 15.16 min, m/z 646.323 9; 10-羟基中乌头碱: t_R 13.21 min, m/z 648.303 2; 10-羟基乌头碱: t_R 14.43 min, m/z 662.318 2; 去氧乌头碱: t_R 15.93 min, m/z 630.328 5; 次乌头碱: t_R 15.17 min, m/z 616.311 5), 单酯型二萜生物碱含量均显著降低 (苯甲酰次乌头

原碱: t_R 12.65 min, m/z 574.300 9; 苯甲酰中乌头原碱: t_R 11.21 min, m/z 590.296 5; 10-羟基苯甲酰中乌头原碱: t_R 9.65 min, m/z 606.290 7; 14-苯甲酰次乌头原碱: t_R 13.83 min, m/z 556.292 4), 提示可能是半夏中的某些成分如有机酸类, 与乌头碱类二萜生物碱结合形成盐, 有助于合煎液中毒性成分的溶出, 且由于生物碱盐的抗热破坏作用增强, 稳定了毒性成分以盐的形式建立的平衡状态。

通过 MarkerLynx 软件对乌头半夏合煎液与合并液成分的比较发现, 合煎后卡马考尼 (t_R 5.60 min, m/z 408.271 9)、尼奥林 (t_R 7.04 min, m/z 438.284 3)、乙酰塔拉萨敏 (t_R 9.50 min, m/z 464.300 5) 等非酯化二萜生物碱含量显著降低, 提示在合煎过程中可能发生了由其非酯化二萜生物碱向酯型二萜生物碱的转化, 从而使双酯型二萜生物碱显著增加。

结论

本文初步分析了十八反中乌头、半夏这一对反药在配伍煎煮过程中的化学成分变化情况, 研究证实乌头半夏在配伍煎煮前后化学成分存在明显差异, 这种差异与乌头-半夏配伍增毒具有一定联系, 为进一步探讨乌头半夏相反机制提供了实验数据。

References

- [1] Su SL, Duan JA, Li WL, et al. Exploration the toxicity/increase virulence mechanisms of "eighteen incompatible medications" based on chemical substances [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2010, 16: 123-129.
- [2] Jiang YG, Zhang XH, Zou SR. Quantitative analysis on Formula-herb information of prescriptions containing "eighteen incompatible medicaments" [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai (上海中医药大学学报), 2008, 22: 24-26.
- [3] Judith S, Ming Z, Sonja P, et al. Aconitum in traditional Chinese medicine - a valuable drug or an unpredictable risk? [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126: 18-30.
- [4] Liu WL, Song FR, Liu ZQ, et al. The chemical study on combination taboo of Radix Aconiti and pinellia tuber [J]. Chemistry (化学通报), 2008, 6: 435-438.
- [5] Weng XG, Nie SQ, Huang LQ. Determination of content changes of hypaconitine in preparations of aconite matching other herbs in "pinellia tuber, snakegourd fruit, Fritillaria, Japanese ampelopsis root and common bletilla tuber counteract aconite" by HPLC [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2004, 39: 57-59.
- [6] Hou SL, Huang YH. The combination of *Aconitum* and pinellia and clinical application [J]. Chin Rem Clin (中国药物与临床), 2005, 5: 379.
- [7] Jin KT, Shi SY, Shen JX, et al. The regulating effect of aconitum coadministration with pinellia on cytochrome P450 in rat livers [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2007, 25: 1358-1361.
- [8] Huang K, Wang WH, Li BC, et al. Applications of combined ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry in the field of drug research [J]. Chin J Spectrosc Lab (光谱实验室), 2009, 26: 922-930.
- [9] Yue H, Pi ZF, Song FR, et al. Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum carmichaeli* Debx by HPLC/ESIMS/MSⁿ [J]. Talanta, 2009, 77: 1800-1807.
- [10] Zheng XT, Shi PY, Cheng YY, et al. Rapid analysis of a Chinese herbal prescription by liquid chromatography-time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1206: 140-146.