

## 基于 UPLC-TOF/MS 分析人参附子配伍减毒的物质基础

马增春, 周思思, 梁乾德, 霍 超, 王宇光, 谭洪玲, 肖成荣, 高 月\*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:** 利用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-TOF/MS) 分析人参附子药对配伍减毒的物质基础, 从化学成分层次阐释其配伍减毒机制。基于 UPLC-TOF/MS 建立人参附子药对配伍后生物碱类成分的化学指纹图谱, 通过主成分分析法和正交偏最小二乘判别法分析药对配伍在合煎过程中的生物碱类成分的含量变化, 找出差异变化显著的化学成分。结果表明, 正离子模式时人参附子药对合煎液中次乌头碱、去氧乌头碱的含量明显降低, 而苯甲酰中乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和去乙酸中乌头原碱等含量升高。人参附子药对配伍应用时双酯型二萜生物碱的含量明显降低, 而单酯型二萜生物碱的含量明显升高, 这可能是人参附子药对配伍减毒作用的物质基础。

**关键词:** 人参; 附子; 配伍

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 12-1488-05

## UPLC-TOF/MS based chemical profiling approach to evaluate toxicity-attenuated chemical composition in combination of ginseng and Radix Aconiti Praeparata

MA Zeng-chun, ZHOU Si-si, LIANG Qian-de, HUO Chao, WANG Yu-guang, TAN Hong-ling,  
XIAO Cheng-rong, GAO Yue\*

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

**Abstract:** In the present study, an ultra performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF/MS) based chemical profiling approach was used to evaluate chemical constitution between co-decoction and mixed decoction of ginseng and Radix Aconiti Praeparata. Two different kinds of decoctions, namely co-decoction of ginseng and Radix Aconiti Praeparata: water extract of mixed two herbs, and mixed decoction of ginseng and Radix Aconiti Praeparata: mixed water extract of each individual herbs, were prepared. Batches of these two kinds of decoction samples were subjected to UPLC-TOF/MS analysis. The datasets of  $t_R$   $m/z$  pairs, ion intensities and sample codes were processed with supervised partial least squared discriminant analysis (OPLS-DA) to holistically compare the difference between these two decoction samples. Significant difference between the two decoction samples was showed in the results of positive ion mode. The contents of hypaconitine and deoxyaconitine decreased, while that of benzoylmesaconine, benzoylhypaconine and dehydrated benzoylmesaconine increased in the samples of co-decoction of ginseng and Radix Aconiti Praeparata. The content of diester-diterpenoid alkaloids decreased, while that of monoester-diterpenoid alkaloids increased, which is probably the basis of toxicity-attenuated action when combined ginseng with Radix Aconiti Praeparata.

**Key words:** ginseng; Radix Aconiti Praeparata; compatibility

收稿日期: 2011-06-09.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2012CB518402, 2011CB505304); 北京市自然科学基金资助项目 (7112110).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-66931312, E-mail: gaoyue@bmi.ac.cn

药对是古方运用中最常用的药物配伍组合, 药对既是由相关的两味药所组成, 又是组成方剂的主干部分, 有时药对本身就是方剂。参附汤是临床常用的经典名方, 由人参、附子两味组成, 其方改剂为参附注射液可用于治疗多种休克。人参附子药对有效活性成分为人参总皂苷、乌头类生物碱等<sup>[1, 2]</sup>, 主要毒性成分为双酯型生物碱, 其水解后生成单酯型生物碱, 毒性显著降低<sup>[3-5]</sup>。人参、附子的化学成分研究较多<sup>[6, 7]</sup>, 但对其配伍煎煮后化学成分的变化鲜见报道。超高效液相色谱 (UPLC) 技术是近年发展起来的分离技术, 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<sup>[8]</sup>。飞行时间串联质谱仪是高分辨串联质谱, 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<sup>[9]</sup>。超高效液相色谱与飞行时间质谱联用技术 (UPLC-TOF/MS) 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<sup>[10]</sup>。

本实验采用 UPLC-TOF/MS 技术, 结合主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squared discriminant analysis, OPLS-DA) 进行数据分析, 探讨人参附子药对配伍煎煮对其毒性成分的影响, 试图从化学成分变化的角度阐述二者配伍减毒的科学内涵。

## 材料与方法

**药材** 人参、附子购自河北安国中药材市场, 均经军事医学科学院二所马百平教授鉴定分别为五加科多年生草本植物人参 (*Radix Ginseng*)、毛茛科乌头属植物川乌 (*Aconitum carmichaeli* Debx) 子根的加工品, 标本存放于军事医学科学院二所二室。

**仪器与试剂** 美国 Waters 公司 Acquity UPLC-Synapt MS 色谱-质谱联用仪, MassLynx V4.1 质谱工作站 (Waters 公司); 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。

**供试样品的制备** 人参、附子按 1:1 比例称重混合, 加入 8 倍量的水, 浸泡 30 min 后煎煮, 煮沸 30 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, 合并两次滤液, 即为人参附子合煎液; 人参附子合并液先制备人参单煎液和附子单煎液, 制备方法同上, 将两煎液按

1:1 混合, 即为人参附子合并液。将制备的煎液静置, 经  $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤即为样品,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 待测。

**超高效液相色谱条件** 采用 Acquity HSS T3 ( $100\text{ mm}\times 2.1\text{ mm ID}$ ,  $1.8\text{ }\mu\text{m}$ ) 色谱柱; 柱温为  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 流速为  $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样量为  $5\text{ }\mu\text{L}$ ; 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液; 流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱 ( $0\rightarrow 1\text{ min}$ : 2% B;  $1\rightarrow 2\text{ min}$ : 2% $\rightarrow$ 5% B;  $2\rightarrow 5\text{ min}$ : 5% $\rightarrow$ 12% B;  $5\rightarrow 10\text{ min}$ : 12% $\rightarrow$ 20% B;  $10\rightarrow 12\text{ min}$ : 20% $\rightarrow$ 30% B;  $12\rightarrow 13\text{ min}$ : 30% $\rightarrow$ 50% B;  $13\rightarrow 15\text{ min}$ : 50% $\rightarrow$ 100% B;  $15\rightarrow 16\text{ min}$ : 100% B;  $16\rightarrow 17\text{ min}$ : 100% $\rightarrow$ 2% B;  $17\rightarrow 20\text{ min}$ : 2% B)。

**质谱条件** 采用电喷雾电离离子源 (ESI), 正离子 V 模式检测;  $m/z$  70~1 000, 毛细管电压为 2.9 kV, 锥孔电压为 40 kV, 离子源温度为  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 脱溶剂温为  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 脱溶剂气体流速为  $900\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 锥孔气流量  $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 质量校正质核比为  $m/z$  556.277 1; 负离子 V 模式检测;  $m/z$  范围为 70~1 200, 毛细管电压为 3 kV, 锥孔电压为 40 kV, 离子源温度为  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 脱溶剂温为  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 脱溶剂气体流速为  $900\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 锥孔气流量  $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 质量校正  $m/z$  554.261 5。

**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 OPLS-DA 分析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 11 个潜在的化学标记物, 结合文献和数据库检索对潜在的化学标记物进行鉴定。

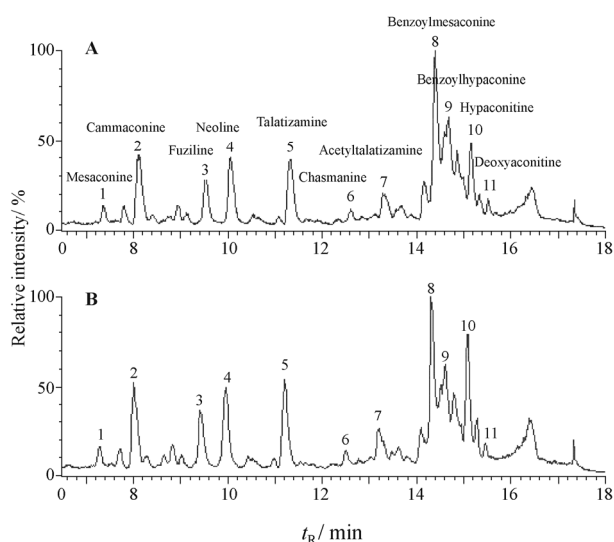
## 结果

### 1 人参附子药对合煎液与合并液正离子模式下的离子流分析

比较附子人参合并液、附子人参合煎液正离子模式下总离子流图, 结果如图 1 显示, 合煎液与合并液相比, 合煎液在  $t_R$  14.35 min 离子峰面积增加最为显著即 8 号离子峰苯甲酰中乌头原碱, 在  $t_R$  14.65 min 合煎液离子峰面积增加显著即 9 号离子峰苯甲酰次乌头原碱; 合并液在  $t_R$  15.15 min 离子峰面积增加最为显著即 10 号离子峰次乌头碱, 而在  $t_R$  15.38 min, 11.31 min 处合并液面积增加显著即 11 号峰去氧乌头碱和 5 号峰塔拉地萨敏。

### 2 人参附子药对合煎液与合并液的正离子模式下的分子离子峰鉴别

人参与附子合煎液与合并液中正离子模式下总



**Figure 1** Representative chromatograms of decoctions of ginseng and Radix Aconiti Praeparata monitored in positive ion mode. A: Co-decoction of ginseng and Radix Aconiti Praeparata; B: Mixed decoction of ginseng and Radix Aconiti Praeparata

离子流质谱图, 即相对应图 1 中的 1 号峰到 11 号峰, 经过 MHDB 数据库的检索以及参考相关文献得到表 1<sup>[11, 12]</sup>, 即人参与附子合煎液与合并液中各主要离子峰化合物, 其中 3~6 离子峰即附子灵 (fuziline)、尼奥灵 (neoline)、塔拉地萨敏 (talatizamine)、查斯曼丁 (chasmanine) 为乌头类植物中普遍存在的生物碱; 10、11 号离子峰分别为次乌头碱 (hypoconitine) 和去氧乌头碱 (deoxyaconitine), 它们的毒性较大; 1、2、7、8、9 号离子峰分别为中乌头原碱 (mesaconine)、卡马乌头原碱 (cammaconine)、乙酰塔拉地萨敏 (acetylaltatizamine)、苯甲酰中乌头原碱 (benzoylmesaconine) 和苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypoconine), 它们是乌头碱的水解产物, 基本没有毒性。

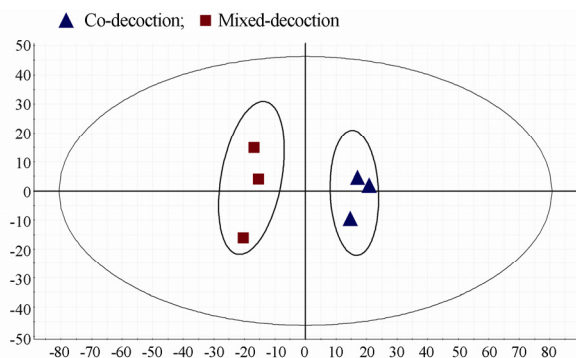
### 3 人参与附子药对合煎液与合并液正离子模式下的差异成分鉴别

MarkerLynx 4.1 统计分析结果如图 2~4 所示。由图 2 即主成分分析图 OPLS-DA 可见, 由两组样品能够得到明显的区分。主成分分析是 MarkerLynx 4.1 软件对两组数据的差异性做的分析, 而两组数据的差异是由各种乌头类生物碱的含量差异造成的, 因而可见两组样品的毒性具有显著性差异。进一步由图 3 可见, 两组样品在化学成分上的差异性, S 曲线的原理是偏最小二乘法, 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。左下方代表了合煎液中含量较高的化合物, 在右上方代表了合并液中含量较高的化合物。因此 a, b, c 点代表了合煎液与合并液相比差异显著的化学成分, 而 d, e, f 则代表了合并液与合煎液相比差异显著的化学成分。

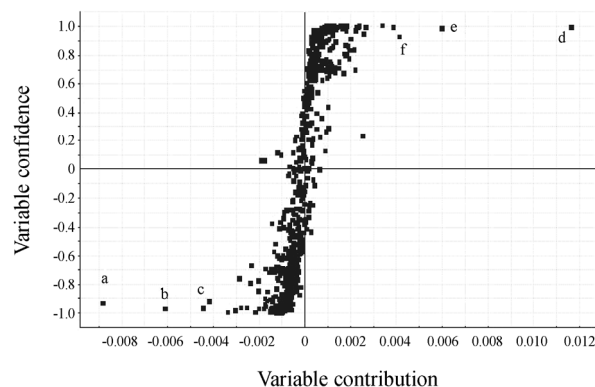
用 MarkerLynx 4.1 软件对 S 曲线两端可信度较高的特征化合物进一步分析, 如图 4 所示, 即在合煎液中一些原碱如: 苯甲酰中乌头原碱 ( $t_R$  14.35 min,  $m/z$  590.299 6)、苯甲酰次乌头原碱 ( $t_R$  14.65 min,  $m/z$  574.301 1) 和去乙酸中乌头原碱 ( $t_R$  15.10 min,  $m/z$  572.322 1) 的含量相对较高。在合并液中次乌头碱 ( $t_R$  15.09 min,  $m/z$  616.314 1)、去氧乌头碱 ( $t_R$  15.29 min,  $m/z$  630.329 6) 和塔拉地萨敏 ( $t_R$  11.23 min,  $m/z$  422.287 9) 的含量相对较高, 与人参与附子药对合煎液和合并液的总离子流图中具有差异性的各种峰的结果一致。合煎液中增加显著的化合物均为毒性较大的乌头类生物碱水解得到的乌头类原碱, 相对来说合并液中乌头碱类含量较高, 也就是被水解成乌头原碱的量较少, 说明人参与附子合煎确实降低了乌头碱的毒性。

**Table 1** Components identified from decoctions of ginseng and Radix Aconiti Praeparata monitored in positive ion mode

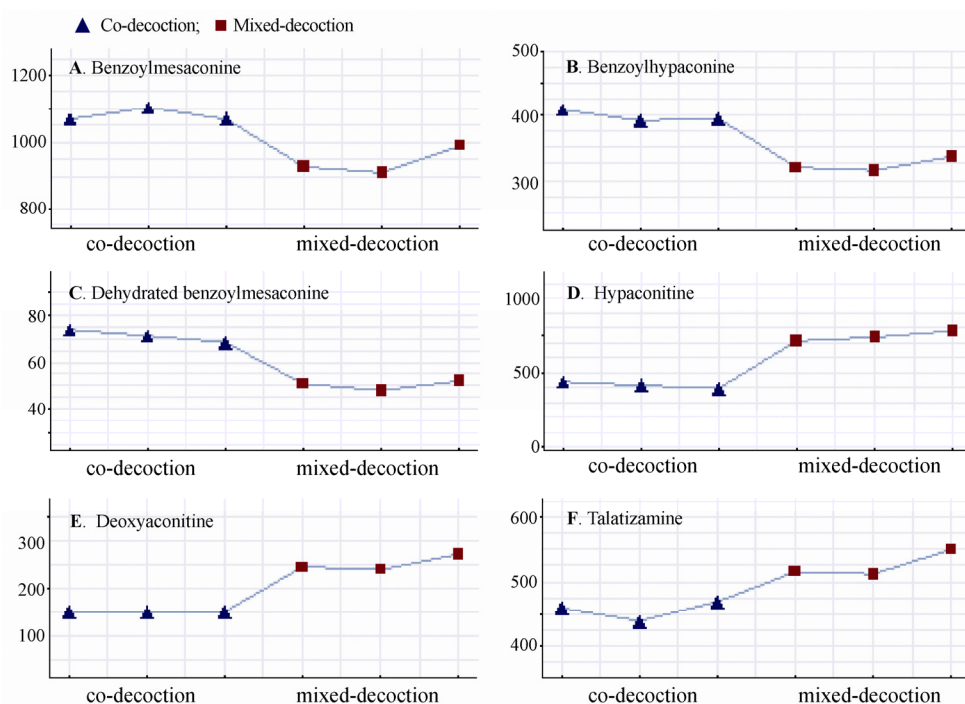
| Peak No. | $t_R$ /min | Assigned identity  | Molecular formula                                | [M+H] <sup>+</sup> $m/z$ |                        |                                |
|----------|------------|--------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------|
|          |            |                    |                                                  | Mean measured mass       | Theoretical exact mass | Mass accuracy $\times 10^{-6}$ |
| 1        | 7.29       | Mesaconine         | C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>9</sub>  | 486.269 7                | 486.270 3              | -1.2                           |
| 2        | 8.01       | Cammaconine        | C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>5</sub>  | 408.274 5                | 408.275 0              | -1.2                           |
| 3        | 9.42       | Fuziline           | C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>7</sub>  | 454.279 2                | 454.280 5              | -1.5                           |
| 4        | 9.95       | Neoline            | C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>6</sub>  | 438.283 8                | 438.285 6              | -4.1                           |
| 5        | 11.20      | Talatizamine       | C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>5</sub>  | 422.289 1                | 422.290 6              | -3.5                           |
| 6        | 12.51      | Chasmanine         | C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>6</sub>  | 452.299 7                | 452.301 2              | -3.3                           |
| 7        | 13.20      | Acetylaltatizamine | C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>6</sub>  | 464.300 6                | 464.301 2              | -1.3                           |
| 8        | 14.31      | Benzoylmesaconine  | C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>10</sub> | 590.297 7                | 590.296 5              | 2.0                            |
| 9        | 14.67      | Benzoylhypoconine  | C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>9</sub>  | 574.302 1                | 574.301 6              | -0.8                           |
| 10       | 15.15      | Hypoconitine       | C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>10</sub> | 616.314 7                | 616.312 2              | 4.0                            |
| 11       | 15.33      | Deoxyaconitine     | C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>10</sub> | 630.330 1                | 630.327 8              | 3.6                            |



**Figure 2** OPLS-DA/Scores plot of co-decoction and mixed-decoction of ginseng and Radix Aconiti Praeparata obtained using Pareto scaling with mean centering monitored in positive ion mode



**Figure 3** OPLS-DA/S-Plot of co-decoction and mixed-decoction of ginseng and Radix Aconiti Praeparata obtained using Pareto scaling with mean centering monitored in positive ion mode. a:  $t_R$  14.35 min,  $m/z$  590.299 6; b:  $t_R$  14.65 min,  $m/z$  574.301 1; c:  $t_R$  15.10 min,  $m/z$  572.322 1; d:  $t_R$  15.09 min,  $m/z$  616.314 1; e:  $t_R$  15.29 min,  $m/z$  630.329 6; f:  $t_R$  11.23 min,  $m/z$  422.287 9



**Figure 4** Selected ion intensity trend plots. A:  $t_R$  14.35 min,  $m/z$  590.299 6; B:  $t_R$  14.65 min,  $m/z$  574.301 1; C:  $t_R$  15.10 min,  $m/z$  572.322 1; D:  $t_R$  15.09 min,  $m/z$  616.314 1; E:  $t_R$  15.29 min,  $m/z$  630.329 6; F:  $t_R$  11.23 min,  $m/z$  422.287 9

## 讨论

“药有个性之特长，方有合群之妙用”，配伍是中医用药的特点，在长期的临床实践中由经验积累逐步形成了配伍理论。附子的主要成分是生物碱，约占总重的 7%~10%，具有显著的生理活性，同时也是其毒性成分，毒性表现为呼吸抑制、导致心律失常和休克，甚至中毒死亡<sup>[13]</sup>。根据其结构特点，可分为二萜生物碱 (diterpenoid alkaloids) 和非二萜生物碱，二萜生物碱中的  $C_{19}$  类二萜生物碱是目前研究最多，也是最具毒性的植物成分之一，根据其  $C_8$  和  $C_{14}$  位

的取代基团的不同可分为双酯型、单酯型、脂型和醇胺型<sup>[14, 15]</sup>。双酯型二萜生物碱 (diester diterpenoid alkaloids, DDAs) 由于  $C_8$ 、 $C_{14}$  位分别为乙酰基、苯甲酰基而毒性最强，其中乌头碱 (aconitine)、中乌头碱 (mesaconitine) 和次乌头碱 (hypoconitine) 在乌头类中药中广泛存在且含量较高，是其毒性的主要成分<sup>[16]</sup>。

附子与人参配伍前后的毒性减小主要由于其毒性成分 DDAs 在配伍的过程中发生的化学变化，主要包括降解反应、置换反应、酯化反应和加成反应。

乌头类二萜生物碱在煎煮过程中, C<sub>8</sub> 位乙酰基易发生水解反应, 由双酯型转化成单酯型 (monoester diterpenoid alkaloids, MDAs)、毒性较小且具有一定药理活性的苯甲酰乌头原碱类 (benzoylaconines), 基本达到去毒目的。进一步水解则失去 C<sub>14</sub> 位的苯甲酰基成为毒性更小、药理作用较弱的醇胺型乌头原碱类 (aconines)<sup>[14]</sup>。

UPLC-TOF/MS 分正、负离子模式检测, 正离子模式检测有利于生物碱发生电离, 而负离子模式有利于人参皂苷发生电离。通过 PCA、OPLS-DA 分析药对配伍在合煎过程中的化学成分变化, 正离子模式研究结果表明人参附子药对合煎液中次乌头碱、去氧乌头碱的含量明显降低, 而苯甲酰中乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和去乙酸中乌头原碱等含量升高。这可能是人参附子药对配伍减毒作用的物质基础。负离子模式研究结果表明, 人参附子药对合煎液中的竹节人参皂苷 IVa 含量增加显著, 20R-人参皂苷 Rh1 和人参皂苷 Ma-Rd 的含量增加, 合煎液中的人参类成分的含量增加很可能是人参附子药对配伍持效 (增效) 作用的物质基础, 负离子模式研究结果另文发表。

附子与人参配伍的急性毒性实验表明附子 ≈ 合并液 > 合煎液 > 人参, 与配伍减毒作用物质基础的研究结果一致, 目前正在进行附子与人参配伍的长期毒性实验, 附子与人参配伍毒性成分与毒性靶点之间的对应关系是我们今后研究的重点方向。

## References

- [1] Zhou H, Hou SZ, Luo P, et al. Ginseng protects rodent hearts from acute myocardial ischemia-reperfusion injury through GR/ER-activated RISK pathway in an endothelial NOS-dependent mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135: 287–298.
- [2] Ye R, Yang Q, Kong X, et al. Ginsenoside Rd attenuates early oxidative damage and sequential inflammatory response after transient focal ischemia in rats [J]. *Neurochem Int*, 2011, 58: 391–398.
- [3] Yim KM, Tse ML, Lau FL. Reversible intraventricular conduction defect in aconitine poisoning [J]. *Singapore Med J*, 2009, 50: 302–305.
- [4] Fujita Y, Terui K, Fujita M, et al. Five cases of aconite poisoning: toxicokinetics of aconitines [J]. *J Anal Toxicol*, 2007, 31: 132–137.
- [5] Yue H, Pi ZF, Song FR, et al. Analysis of aconite alkaloids in the combination of Radix Aconiti Praeparata with different herbs by ESI-MS spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 201–205.
- [6] Qi X, Ignatova S, Luo G, et al. Preparative isolation and purification of ginsenosides Rf, Re, Rd and Rb1 from the roots of *Panax ginseng* with a salt-containing solvent system and flow step-gradient by high performance counter-current chromatography coupled with an evaporative light scattering detector [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 1995–2001.
- [7] Chen JH, Lee CY, Liao BC, et al. Determination of aconitine-type alkaloids as markers in fuzi (*Aconitum carmichaeli*) by LC/ESI/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48: 1105–1111.
- [8] Li SL, Lai SF, Song JZ, et al. Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53: 946–957.
- [9] Li SL, Song JZ, Qiao CF, et al. UPLC-PDA-TOF MS based chemical profiling approach to rapidly evaluate chemical consistency between traditional and dispensing granule decoctions of traditional medicine combinatorial formulae [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52: 468–478.
- [10] Li L, Luo GA, Liang QL, et al. Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52: 66–72.
- [11] Yue H, Pi ZF, Song FR, et al. Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum Carmichaeli* Debx by HPLC/ESIMS/MS<sup>n</sup> [J]. *Talanta*, 2009, 77: 1800–1807.
- [12] 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.
- [13] Singhuber J, Zhu M, Prinz S, et al. Aconitum in traditional Chinese medicine: a valuable drug or an unpredictable risk [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126: 18–30.
- [14] Wang Y, Shi L, Song F, et al. Exploring the ester-exchange reactions of diester-diterpenoid alkaloids in the aconite decoction process by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 279–284.
- [15] Hu R, Zhao J, Qi LW, et al. Structural characterization and identification of C(19)- and C(20)-diterpenoid alkaloids in roots of *Aconitum carmichaeli* by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23: 1619–1635.
- [16] Csupora D, Wenzigb EM, Zupkó I, et al. Qualitative and quantitative analysis of aconitine-type and lipo-alkaloids of *Aconitum carmichaelii* roots [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 2079–2086.