

# 附子不同配伍药对中生物碱成分的电喷雾质谱分析

越 皓<sup>1,2</sup>, 皮子凤<sup>1</sup>, 宋凤瑞<sup>1</sup>, 刘志强<sup>1</sup>, 刘淑莹<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院 长春应用化学研究所 长春质谱中心, 吉林 长春 130022; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 以传统中医用药附子的配伍药对为研究对象, 考察附子与不同中药配伍对附子中生物碱的影响规律, 揭示配伍减毒的科学内涵。利用电喷雾质谱技术和内标法, 分别对生附子, 生附子加炙甘草、白芍、干姜、大黄共煎液和药渣中乌头类生物碱进行系统考察。与生附子相比, 双酯型生物碱在附子加炙甘草、大黄、白芍、干姜共煎液中的含量降低; 附子加炙甘草、白芍、干姜共煎液中的脂型生物碱含量增高。附子与炙甘草、白芍、干姜配伍的解毒机制是使毒性较大的双酯型生物碱转化为毒性小的脂型生物碱; 与大黄配伍的解毒机制是药物所含成分与附子中的双酯型生物碱络合生成难溶于水的复合物, 使双酯型生物碱的含量降低。本法对深入研究乌头属植物的配伍作用机制具有借鉴作用。

**关键词:** 附子; 配伍; 生物碱; 电喷雾质谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)02-0201-05

## Analysis of aconite alkaloids in the combination of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* with different herbs by ESIMS spectrometry

YUE Hao<sup>1,2</sup>, PIZIFENG<sup>1</sup>, SONG Feng-rui<sup>1</sup>, LU Zhi-qiang<sup>1</sup>, LU Shu-ying<sup>1\*</sup>

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun 130022, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract** The method was established study the influence of different herbal combination with *Radix Aconiti* in the traditional medical formulae on content of the aconite alkaloids for elucidating the scientific basis of reducing the toxicity of aconite in traditional Chinese medical formulation. The samples for ESIMS study were prepared by decocting a mixture of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* (RALP) with *Radix Glycyrrhizae Preparata* (RGP), *Radix Paeoniae Alba* (RPA), *Rhizoma Zingiberis* (RZ) or *Radix Et Rhizoma Rhei* (RERR), separately, and extracting the residue of the above mentioned mixtures after decocting. The diester-diterpenoid alkaloids (DDAs) was lower in the herb couples of RALP-RGP, RALP-RPA, RALP-RZ and RALP-RERR, and lipo-alkaloids was increased in the herb couples of RALP-RGP, RALP-RPA and RALP-RZ. The reason of reducing toxic effect principle is that the components of RGP, RPA and RZ have ester-exchange reactions with DDAs in RALP to produce lipo-alkaloids of low toxicity in the decocting process of the herb couples. The combination of RALP-RERR can reduce the content of DDAs in decoction and residue due to the formation of water insoluble alkaloid compound.

**Key words** *Radix Aconiti Lateralis Preparata*; compatibility; alkaloid; ESIMS

附子为毛茛科植物乌头的干燥子根。《金匱要

略》、《伤寒论》等经典方剂中的痛证用药, 多以附子与炙甘草、干姜、白芍、大黄等配伍为主, 其中: 附子与炙甘草配伍主治风湿痹痛; 附子与大黄配伍主治胃肠等脏器痛证; 附子与白芍配伍用于阳虚寒湿身痛证; 附子与干姜配伍用于心胸冷痛。目前, 对于附子配伍的研究主要在于检测配伍后附子中的双酯型

收稿日期: 2006-07-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472134); 中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(KGCX2-SW-213-06)。

\* 通讯作者 Tel / Fax 86-431-5362236  
E-mail mskl@ciac.jl.cn

生物碱的含量变化<sup>[1~6]</sup>,以及临床应用和药理方面的研究<sup>[7~11]</sup>,对其全面的化学成分变化及配伍规律的研究甚少。本实验室曾经利用电喷雾质谱研究了四逆汤组方中的二萜类生物碱成分,并考察了其在水溶液中的化学反应<sup>[12,13]</sup>。由于乌头碱类生物碱在电喷雾条件下形成的离子峰的相对强度与其物质的量成正比例关系<sup>[14]</sup>,因此通过电喷雾质谱图中各离子的相对丰度可以说明对应离子的相对含量变化<sup>[15]</sup>。通过内标法,可以更准确地比较同一化合物在不同样品中的相对含量。本研究采用电喷雾质谱技术,以传统中药复方中的不同药物与附子的配伍比例为依据,对生附子单煎液,与炙甘草、大黄、白芍、干姜共煎液以及药渣中的生物碱进行了研究,从化学角度阐明了附子配伍减毒的科学依据。

## 材料和方法

**仪器与材料** 所有质谱实验均在 Finnigan MAT LCQ<sup>TM</sup> 离子阱质谱仪(美国)上完成,电喷雾离子源,喷雾电压为 4.5 kV,金属加热毛细管温度设为 180 °C,注射泵进样速度为 3  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。炙甘草、干姜、白芍、大黄均购自长春市吉林大药房,生附子购自四川江油饮片厂,经过长春中医药大学王淑敏教授鉴定。乌头碱(批号 110720-200410)、中乌头碱(批号 0799-9403)、次乌头碱(批号 0798-9403)及氢溴酸高乌甲素(批号 10289-0001)对照品均购自中国药品生物制品检定所。

**共煎液和单煎液的提取分离** 将生附子 10 g 分别与 10 g 大黄、40 g 白芍、10 g 炙甘草、10 g 干姜混合粉碎,粗粉加 10 倍量水浸泡 20 min 煮沸提取 2 次,提取时间分别为 40 min 和 20 min 过滤,药渣烘干备用(50 °C),合并滤液,加 95% 乙醇至终浓度为 50%,24 h 后过滤,滤液减压浓缩回收乙醇,浓缩液用 10% 氨试液调节 pH 9.5 用等体积乙醚萃取 3 次,乙醚萃取液合并后蒸干(50 °C),得到各提取液的生物碱部分。为与药材配伍具有可比性,另取生附子重复上述试验,得到生附子单煎液。

**药渣中生物碱的提取** 将“共煎液和单煎液的提取分离”项下的药渣分别用 10% 氨试液润湿,加 5 倍量乙醚超声提取 2 次,每次 30 min 过滤,合并滤液,蒸干(50 °C),得到药渣中的生物碱部分。

**电喷雾串联质谱分析** 上述提取物分别用甲醇溶解,定容至 10 mL,再用甲醇稀释 250 倍后,与等体积氢溴酸高乌甲素溶液( $13.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )混合,

涡旋振荡混合 1 min 供电喷雾质谱仪分析。

## 结果与讨论

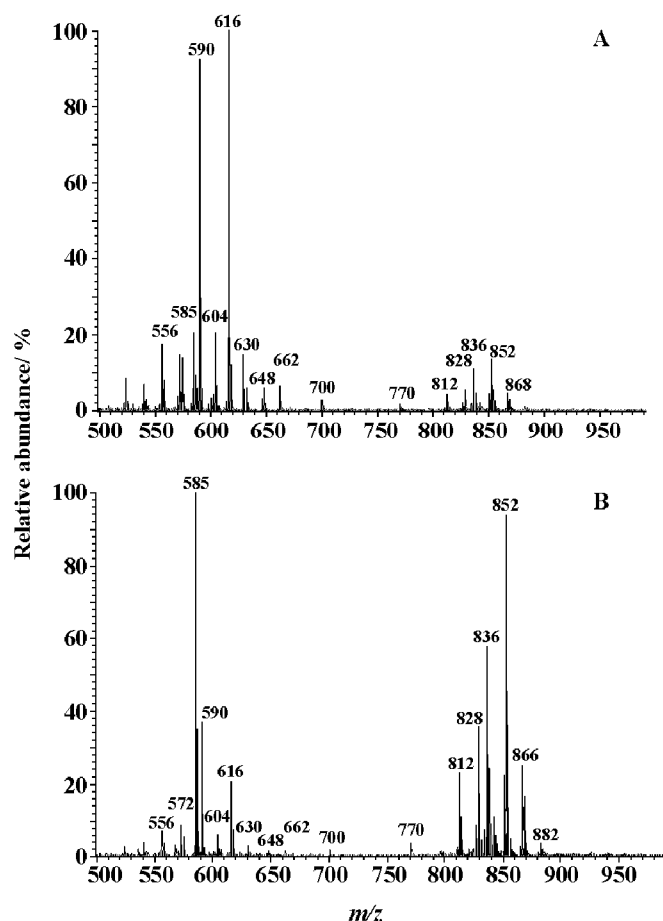
### 1 生附子中生物碱的电喷雾质谱

附子在传统中药配伍应用中,有以炮制后的制附子入药,也有以生附子或生附子和制附子混合入药的。为便于对比分析,更明确地阐明配伍过程中附子主要成分的变化规律,本文以生附子与其他药材配伍进行研究。

图 1A 是生附子水煎液的电喷雾质谱图。从图中可以看出生附子中主要的 3 类生物碱(双酯型、单酯型和脂类生物碱),以及其他小分子的化合物。 $m/z$  616 632 646 离子的多级串联质谱图与次乌头碱、中乌头碱和乌头碱的串联质谱图完全相同,可以确定它们分别对应次乌头碱(hypaconitine HA)、中乌头碱(mesaconitine MA)和乌头碱(aconitine AC)这 3 种双酯型生物碱,比较乌头碱型生物碱的串联质谱碎裂规律<sup>[16]</sup>,发现其他属于双酯型生物碱的成分还有 10-OH-中乌头碱(bewutinine BW,  $m/z$  648)、10-OH-乌头碱(aconifine AF,  $m/z$  662)、去氧乌头碱(deoxyaconitine DA,  $m/z$  630),这些双酯型生物碱是附子中的主要毒性成分<sup>[17]</sup>。 $m/z$  574~610 的离子峰为单酯型生物碱的质子化分子离子峰,分别对应苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconitine BH,  $m/z$  574)、苯甲酰中乌头原碱(benzoylmesaconitine BM,  $m/z$  590)、苯甲酰乌头原碱(benzoylaconitine BA,  $m/z$  604)、苯甲酰去氧乌头原碱(benzoyldeoxyaconitine BD,  $m/z$  588),由相应的双酯型生物碱通过  $C_8$  位酯键水解生成,毒性较小<sup>[17]</sup>。 $m/z$  800~900 的离子对应的是脂类生物碱的质子分子离子化峰,其结构特征在于双酯型生物碱的  $C_8$  位的乙酸被长链的脂肪酸取代,产生于双酯型生物碱与药材中脂肪酸类成分发生的脂交换反应,其中相对丰度较高的有 8- $\alpha$ -油酰-苯甲酰次乌头原碱(8-O-lino-benzoylhypaconitine LBH,  $m/z$  836)、8- $\alpha$ -油酰-苯甲酰脱氧乌头原碱(8-O-ole-benzoyldeoxyaconitine OBD,  $m/z$  852)、8- $\alpha$ -油酰-苯甲酰中乌头原碱(8-O-lino-benzoylmesaconitine LBM,  $m/z$  852),脂型生物碱的毒性介于双酯型和单酯型生物碱之间,口服后半数致死量是双酯型生物碱的 10~80 倍<sup>[13,17,18]</sup>。

在生附子药渣的质谱图中(图 1B),以内标物氢溴酸高乌甲素( $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_8$ )的质子化分子离子峰( $m/z$  585 lappaconitine)为基峰,脂型生物碱  $m/z$  852 的质子化分子离子峰与内标物的丰度比为

94:100 8-亚油酰-苯甲酰次乌头原碱 ( $m/z$  836) 等脂型生物碱的含量也很高, 这是由于药材中的脂型生物碱难溶于水, 因此大量存在于药渣中。双酯型生物碱中的次乌头碱、去氧乌头碱、10-OH-乌头碱在质谱图中也能观察到。其他还有相对丰度较低的单酯型生物碱如苯甲酰中乌头原碱、苯甲酰乌头原碱, 表明双酯型和单酯型生物碱能被水煎液有效提取, 只有少部分残留在药渣中。



**Figure 1** ESI-MS spectra of RALP (A), RALP residue (B). RALP: *Radix Aconiti Lateralis Preparata*

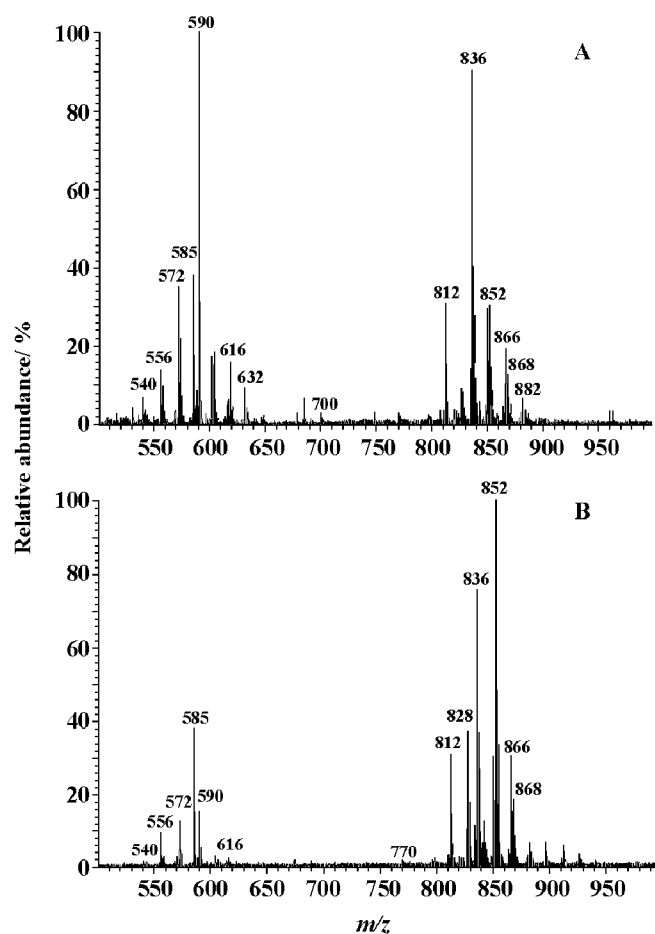
## 2 附子与炙甘草配伍

炙甘草中主要含有黄酮及皂苷类成分, 甘草味甘, 炙用偏温, 在附子炮制和配伍中均有应用, 是传统的制约附子毒性的药材。从图 2A 和表 1 可以看出, 附子与炙甘草共煎液与生附子单煎液相比, 单酯型和双酯型生物碱的含量分别降低了 41.8% 和 97.0%, 脂型生物碱 8-亚油酰-苯甲酰次乌头原碱 ( $m/z$  836) 和  $m/z$  852 混合物的含量分别提高了 4.38 和 1.16 倍。而在药渣的提取液 (图 2B) 中脂型生物碱的相对丰度也要高于生附子药渣中相应的脂型生物碱相对丰度, 可以推断共煎液和药渣中增加的脂型生物碱于药对共煎时产生。这说明炙甘草

**Table 1** The ratio of relative abundance between HA ( $m/z$  616), BM ( $m/z$  590), 8-lino-benzoylhypaconine (LBH,  $m/z$  836), the compound (OBD and LBM,  $m/z$  852) and the reference compound lappaconitine ( $m/z$  585) in the decoction and extracting of residue from RALP combined with RGP, RPA, RZ and RERR

Sample	HA	BM	LBH	OBD and LBM
RALP decoction	487.80	453.17	54.83	68.49
RALP residue	20.52	37.28	58.24	94.09
RALP-RGP decoction	14.80	263.85	240.50	79.68
RALP-RGP residue	5.90	40.16	199.01	261.10
RALP-RPA decoction	211.22	430.79	552.79	310.17
RALP-RPA residue	8.56	6.25	18.16	42.80
RALP-RZ decoction	346.62	192.79	178.23	141.91
RALP-RZ residue	39.52	22.45	30.85	48.38
RALP-RERR decoction	203.67	41.69	16.29	19.92
RALP-RERR residue	81.89	10.73	20.04	51.26

*Radix Aconiti Lateralis Preparata* (RALP), *Radix Glycyrrhizae Preparata* (RGP), *Radix Paeoniae Alba* (RPA), *Rhizoma Zingiberis* (RZ), *Radix Et Rhizoma Rhei* (RERR). The abundance of lappaconitine is 100



**Figure 2** ESI-MS spectra of RALP + RGP (A), RALP + RGP residue (B)

解附子毒性是因为炙甘草中的成分容易与附子中的双酯型生物碱发生脂交换反应,生成毒性更小的脂型生物碱。在共煎液和药渣中双酯型生物碱的含量都有降低,进一步证明了炙甘草对附子减毒在于通过脂交换反应减少了毒性最大的双酯型生物碱的含量。

### 3 附子与白芍配伍

白芍中主要含有黄酮和酚酸类化合物。在与附子的共煎液和药渣中,单酯型和双酯型生物碱的含量均降低(表1)。与生附子相比,单酯型生物碱的变化较小,表明白芍的化学成分对于单酯型生物碱无显著影响。而脂型生物碱在共煎液的含量显著增加,其中8-亚油酰-苯甲酰次乌头原碱与 $m/z$  852的混合脂碱的比值为1.8:1,而在生附子药渣中对应的比例为0.8:1,8-亚油酰-苯甲酰次乌头原碱是由亚油酸与次乌头碱反应生成,脂交换反应显著导致了次乌头碱含量的降低。与生附子药渣比较,附子配伍白芍的药渣中脂型生物碱含量变化不大,进一步说明共煎液中增加的脂型生物碱来源于双酯型生物碱与白芍中的化学成分反应,不易水解的次乌头碱生成脂型生物碱使之含量降低为生附子单煎液的43.3%,从而达到减毒的目的。

### 4 附子与干姜配伍

在附子与干姜共煎液中,单酯型和双酯型生物碱含量均有所降低,而脂型生物碱含量增加幅度没有附子与炙甘草和白芍配伍时显著。与生附子药渣比较(表1),药渣中的单酯型和脂型生物碱的含量降低,双酯型生物碱的含量仅增加1.9倍。从化学的角度分析,由于干姜中的化学成分与双酯型生物碱生成脂型生物碱,并且抑制了双酯型生物碱的溶出,从而达到解毒的目的,但其作用较弱。因此,除了成分之间的化学反应外,可以推断干姜中的某些化学成分还可以拮抗乌头碱的中枢抑制作用,在药物作用过程中起到解毒作用。

### 5 附子与大黄配伍

附子与大黄共煎液中的3类生物碱和药渣中的单酯型和脂型生物碱的含量均有降低,而药渣中的双酯型生物碱的含量与生附子对应比较仅增加了4倍(表1),可以看出大黄与附子配伍解毒的原理并不是以上讨论的不同类型生物碱之间的相互转化。总生物碱含量的减少,是由于大黄中的鞣酸与附子中的生物碱生成了难溶性的复合物,进一步证实了文献中的相关报道<sup>[19]</sup>。

另外,配伍后溶液中的双酯型生物碱含量与pH

具有相关性<sup>[20]</sup>,但起决定作用的是减毒的方式。如大黄和白芍的减毒机制不同,则不能用配伍溶液的pH衡量减毒作用的强弱。

## 结论

本研究以传统中药复方中的附子配伍药对为研究对象,利用电喷雾质谱技术和内标法相结合,考察不同药物配伍对附子中生物碱的影响规律,从化学的角度阐释了附子配伍减毒的科学依据。通过比较生附子及其药对配伍后水煎液和药渣中3种主要类型生物碱相对含量的变化规律,结果表明附子配伍解毒的机制如下:与炙甘草、白芍、干姜配伍,由于含有脂肪酸成分,易发生脂交换反应,使毒性较大的双酯型生物碱转化为毒性小的脂型生物碱;与大黄配伍,药物所含大分子鞣酸成分与附子中的双酯型生物碱络合生成难溶于水的复合物,使双酯型生物碱的含量降低,达到减毒的目的。

## References

- [1] Pei MY, Wang SM, Li J. Correlativity analysis on detoxicating effect of Radix Glycyrrhizae on Radix Aconiti Preparata in *sini* decoction [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21: 50-53
- [2] Ma HY, Liu XB, Li N, et al. Study of interaction of aconitine and glycyrrhizic acid by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2006, 17: 208-209
- [3] Xu JD, Wang HQ, Zheng WY, et al. Influence of different composed herbs and decocting processes on content of aconitine in Rhubarb and Aconite decoction [J]. *China Pharm* (中国药房), 2003, 14: 634-635
- [4] Xu JD, Wang HQ, Jiang CM. The correlation analysis of the detoxifying function of Rhubarb to Aconite [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 1999, 3: 7-9
- [5] He W, Wang N, Qing L, et al. Determination of aconitine and paeoniflorin before and after Radix Aconiti concomitant with Radix Paeoniae Alba boiled with water [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37: 680-683
- [6] Liu XX, Chao RB. Determination of alkaloids in Radix Aconiti Lateralis Preparata by RP-ion-pair HPLC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2006, 41: 365-369
- [7] Li WD, Ma C. Tissue distribution of Aconitum alkaloids extracted from Radix aconiti preparata after oral administration to rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2005, 40: 539-543
- [8] Zhan HX, Peng C. To effect hemodynamics of rat of heart failure in compatibility of Radix Aconiti Laterlis and

- Radix Ginger [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2006, 22: 42-44
- [9] Xu SJ, Chen CX, Gao JP. The effective components of Radix Ginger on reducing the toxicity of Radix Aconiti Laterlis [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2006, 17: 518-520
- [10] Wang JN, Liu GS. Study of method in toxicity decreased and effect increased of compatibility of Fuzi [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26: 63-65
- [11] Yang M, Liu XB, Huang QD. The increasing effect and reducing effect principle of compatibility of Radix Aconiti Laterlis Preparata and Radix Glycyrrhizae [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2003, 14: 197-198
- [12] Wang Y, Song FR, Jin DM, et al. Studies on the Aconitum alkaloids in the Sini decoction by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2004, 25: 85-89
- [13] Wang Y, Shi L, Song FR, 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
- [14] Tang L, Kebrle P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analyses in the electrospray solution [J]. *Anal Chem*, 1993, 65: 3654-3668
- [15] Wang Y, Shi L, Jin DM, et al. Stripping and hydrolyzing balance of aconitic alkaloids in processing of Sini Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34: 311-314
- [16] Wang Y, Liu ZQ, Song FR, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the aconitines in the roots of aconitine [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002, 16: 2075-2082
- [17] Bisset NG. Arrow poisons in China [J]. *J Ethnopharmacology*, 1981, 4: 247-336
- [18] Sun WX, Song FR, Cui M, et al. Simultaneous determination of lipo-alkaloids extracted from *Aconitum camiechaeli* using electrospray ionization mass spectrometry and multiple tandem mass spectrometry [J]. *Planta Med*, 1999, 65: 432-435
- [19] Guo XZ. *Lexicon of Chinese Traditional and Toxic Herbs* (有毒中药大辞典) [M]. Tianjin: Tianjin Science & Technology Translation & Publishing Corporation, 1992: 67.
- [20] Wang Y, Liu ZQ, Song FR, et al. Study on the combination principles about aconite roots by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38: 451-454

### 祝贺张婷、徐珞珊、王峥涛等同志撰写的论文荣获第四届中国科协期刊优秀学术论文奖

第四届中国科协期刊优秀学术论文评比于 2007 年 1 月 16 日揭晓, 发表在《药学报》2005 年 40 卷第 8 期的论文“药用植物束花石、流苏石及其形态相似种的 PCR-RELP 鉴别研究”(作者: 张婷、徐珞珊、王峥涛、周开亚、张宁、史永峰; 单位: 中国药科大学等)荣获优秀论文奖。

本届活动经全国学会及其期刊编辑部推荐和作者自荐论文 710 篇, (《药学报》编辑部共推荐学术论文 5 篇), 涉及学会 105 个、期刊 283 种。经期刊优秀论文评审委员会专家评审, 中国科协常委会学术工作专门委员会审定, 中国科协网站、科技导报社等媒体公示无异议, 共评出优秀论文 200 篇。

为了进一步提高我国学术期刊质量, 促进学术交流, 激励科研人员不断创新, 倡导和鼓励高水平的学术论文在国内学术期刊发表, 中国科协评选及表彰中国科协期刊优秀学术论文已进行了四届, 本刊在往届评比中获奖的论文有:

第一届: 发表在 2001 年 36 卷第 8 期“鹿类中药材的位点特异性 PCR 鉴定研究”(作者: 刘向华、王义权、周开亚、刘忠权、曹琳; 单位: 南京师范大学遗传研究所等)

第二届: 发表在 2002 年 37 卷第 10 期“铁破锣皂苷 O 和 P 的结构及其药理活性”(作者: 鞠建华、林耕、杨峻山、逯海燕、马柄娜、聂淑芹、张侠; 单位: 中国医学科学院、中国协和医科大学药用植物研究所等)

第三届: 发表在 2004 年 39 卷第 7 期“3-溴代丙酰胺苯甲酰胺抗人白血病和淋巴瘤的作用机理”(作者: 李建东、宋丹青、蒋建东; 单位: 中国医学科学院、中国协和医科大学医药生物技术研究所)