

八味地黄方与人参汤共煎液中毒性物质的电喷雾质谱研究

许庆轩, 刘志强*, 王 勇, 宋凤瑞, 刘春明, 刘淑莹*

(中国科学院长春应用化学研究所 新药研究实验室, 吉林 长春 130022)

摘 要: 目的 采用电喷雾质谱技术研究附子的配伍规律, 阐明八味地黄方与人参汤共服时产生毒性的化学物质基础。方法 采用电喷雾质谱技术分别对八味地黄方加入人参汤、附子加入人参汤、附子加入人参、附子加干姜、附子加甘草、附子加白术、次乌头碱对照品加白术共煎液中生物碱成分的相对质量分数及其变化规律进行研究。结果 次乌头碱与白术、附子与白术、附子与人参汤、八味地黄方与人参汤共煎液中次乌头碱质量分数较高。结论 八味地黄方与人参汤共煎液产生的毒性是由人参汤中的白术抑制了附子中次乌头碱等双酯型生物碱的水解, 导致双酯型生物碱水平过高而引起的。甘草和干姜对附子具有解毒作用, 人参亦不会导致共煎液的毒性增加。

关键词: 八味地黄方; 人参汤; 次乌头碱; 双酯型生物碱; 电喷雾质谱

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0036-04

Toxicity components in decoction of Bawei Dihuang Recipe and Ginseng Decoction by ESI/MS

XU Qing-xuan, LIU Zhi-qiang, WANG Yong, SONG Feng-rui, LIU Chun-ming, LIU Shu-ying

(New Drug Laboratory of Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract: **Objective** To investigate the compatible mechanism of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* (RALP) by ESI/MS and clarify the chemical substances which could produce toxicity in the decoction of Bawei Dihuang Recipe (BDR) and Ginseng Decoction (GSD). **Methods** The relevant alkaloids and their changing regularities in the decoction of BDR + GSD, RALP + GSD, RALP + *Radix Ginseng* (RGS), RALP + *Rhizoma Zingiberis* (RZ), RALP + *Radix Glycyrrhizae* (RG), RALP + *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* (RAM), and hyaconitine + RAM were studied by ESI/MS. **Results** The relevant hyaconitine in the decoction of hyaconitine + RAM, RALP + RAM, RALP + GSD, and BDR + GSD are more abundant. **Conclusion** The hydrolysis of diester-alkaloids, like hyaconitine, in RALP has been intensively restrained by RAM in GSD, which leads to the over high diester-alkaloids and induces the toxicity in the decoction of BDR and GSD. RG and RZ can repel the toxicity of RALP, and RGS does not make the toxicity of the decoction increase.

Key words: Bawei Dihuang Recipe (BDR); Ginseng Decoction (GSD); hyaconitine; diester-alkaloids; electrospray ionization mass spectrometry (ESI/MS)

附子是临床常用中药, 经常经炮制后与甘草等其他药材配伍使用, 目前人们已对附子配伍规律的化学物质基础进行了大量研究。实验结果表明: 甘草、干姜和防己等可促进附子或川乌中毒性双酯型生物碱的水解, 降低其溶出率, 为含附子复方的减毒增效理论提供了化学证明^[1-3]。但到目前为止, 对由于附子配伍不当所产生毒性的化学研究较少。

八味地黄方由肉桂、制附子、地黄、山茱萸、山药、牡丹皮、泽泻和茯苓组成, 人参汤由人参、干姜、甘草、白术 4 味药组成, 当它们各自单独服用时, 并

不产生中毒现象, 但当八味地黄方与人参汤共服时却引起了中毒。伊藤等对服用八味地黄方加入人参汤导致中毒的原因进行了研究, 并采用 HPLC 法测定方剂中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的质量分数, 发现八味地黄方与人参汤共煎液中双酯型生物碱质量分数明显增加, 推断中毒的原因是由于八味地黄方与人参汤共服时人体内双酯型生物碱水平增加所致, 并指出方剂中某种药材中的化学成分可能抑制了双酯型生物碱的水解, 但并未指出是哪种药材抑制了其水解^[4]。电喷雾质谱技术是目前应用广泛的

* 收稿日期: 2004-03-26

基金项目: 国家科技部重大基础研究前期研究专项(2003CCA03100); 国家自然科学基金资助项目(30271600, 39930210)

作者简介: 许庆轩(1970—), 男, 山东单县人, 博士研究生, 1994年毕业于哈尔滨师范大学化学系, 1999年考入中国科学院长春应用化学研究所, 从事药物物质谱研究。Tel: (0431) 5262613

* 通讯作者

“软电离”技术,它可将液相中的分子和离子在适宜条件下完整地转入气相而被检测。乌头碱类二萜生物碱在电喷雾质谱条件下均可形成质子化分子,每个离子峰代表1种生物碱,其归属可通过文献数据确定,离子峰的相对丰度可以近似地反映出同类生物碱的相对含量,所得质谱图在准分子离子峰的种类和丰度上具有很好的可重复性^[5]。并且电喷雾质谱法操作简便,测定快速、灵敏,与高效液相色谱和薄层色谱等方法相比大大提高了复方体系的研究效率^[6]。

本实验采用电喷雾质谱技术分别对八味地黄方、人参汤及其共煎液中双酯型生物碱的变化规律进行了研究,并对附子与人参、附子与甘草、附子与干姜、附子与白术共煎液等体系中的双酯型生物碱进行了研究,着重考察了白术对附子毒性的影响规律,发现并不是中药禁忌理论中不能与附子共用的中药——白术抑制附子中双酯型生物碱的水解,阐明了八味地黄方与人参汤共服中毒的化学物质基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料:菲尼根MAT LCQ 电喷雾质谱(ESI/MS)(San Jose, CA, 美国),喷雾电压为5.0 kV,毛细管温度为150℃,进样速度为2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。所用试剂均为分析纯。干姜、山茱萸、山药、甘草、地黄、肉桂、牡丹皮、泽泻、茯苓、人参、附子和白术均购自吉林大药房,经长春中医学院药学院王淑敏副教授鉴定。次乌头碱对照品购自中国药品生物制品检定所,批号:0798-94030。

1.2 样品的制备:将肉桂(3 g)、制附子(9 g)、地黄(9 g)、山茱萸(9 g)、山药(9 g)、牡丹皮(6 g)、泽泻(9 g)和茯苓(9 g)加10倍量蒸馏水浸泡30 min,急火加热至沸腾,中火煎煮1 h,滤过,收集滤液。滤渣加8倍量蒸馏水同法煎煮2次,合并3次滤液,浓缩,得50 mL 八味地黄煎剂。按照上述方法分别制备八味地黄方加入人参汤(人参4.0 g、白术4.5 g、甘草3.0 g、干姜1.5 g)共煎剂,人参汤加制附子(4.5 g)共煎剂,制附子(4.5 g)加入人参(4.0 g)共煎剂,制附子(4.5 g)加白术(4.5 g)共煎剂,制附子(4.5 g)加甘草(3.0 g)共煎剂,制附子(4.5 g)加干姜(1.5 g)共煎剂,制附子单煎剂。上述煎剂分别加入200 mL 无水乙醇,静置24 h,滤过,减压蒸出乙醇,膏状物用50 mL 蒸馏水溶解,用氨水调至 $\text{pH}=10$,用氯仿萃取3次,每次50 mL,合并氯仿液,即得;准确称量次乌头碱对照品1.35 mg与白术(4.5 g)共煎1

h,共煎液按照上述方法处理,即得;准确称量次乌头碱对照品1.21 mg,单煎1 h,单煎液按上述方法处理,即得。

制附子(4.5 g)浸泡于200 mL 95%乙醇,超声1 h,冷浸12 h,滤过,药渣同法处理2次,合并乙醇溶液,减压蒸出乙醇,浸膏按照上述方法氯仿抽提处理,得到样品。分别取上述样品各2 mL,用甲醇稀释10倍,用于电喷雾质谱仪分析。

2 结果与讨论

2.1 制附子中生物碱的电喷雾质谱分析:附子在传统复方中药中通常是经过炮制之后入药的,为了更好地阐明其在配伍组方过程中其毒性成分的变化规律,必须对制附子中化学成分进行研究。制附子乙醇冷浸液中生物碱的电喷雾质谱见于图1-A,可以看出电喷雾质谱可以对制附子中3类生物碱(双酯类生物碱、单酯型生物碱和脂类生物碱)同时检出并进行定性分析。首先,在低质量区存在 m/z 454, 438离子,分别对应附子灵(fuziline)、尼奥灵(neoline)两种化合物^[7];在 m/z 610~700的离子峰为双酯型生物碱的质子化峰,它们分别对应次乌头碱(hypaconitine, m/z 616),中乌头碱(mesaconitine, m/z 632),乌头碱(aconitine, m/z 630)和脱氧乌头碱(deoxyaconitine, m/z 646)^[7-9],这类成分是附子中的主要毒性成分;在 m/z 574~610的离子峰为单酯型生物碱的质子化峰^[7],它们分别对应苯甲酰中乌头原碱(benzoylmesaconine, m/z 590),苯甲酰脱氧乌头原碱(benzoyldeoxyaconine, m/z 588),苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine, m/z 574)和苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine, m/z 604),它们是由相应的双酯型生物碱通过C-8酯键的水解而生成的,毒性很小;在 m/z 800~900的离子峰是酯类生物碱的质子化峰,它们分别对应双酯类生物碱的C-8位被取代的长链脂肪酸酯^[8,9]。

Tang等^[5]研究结果证明,气相离子的相对强度与液相中相应的离子浓度具有正比例关系,王勇等^[10]也曾采用对照品证明了在电喷雾质谱条件下,各准分子离子峰的相对丰度与其物质的量浓度呈正比例关系,因此,可以通过考察电喷雾质谱图中各离子的相对丰度,说明各相应离子的相对含量变化。图1-A的质谱数据表明,附子中的剧毒成分乌头碱、中乌头碱和脱氧乌头碱的丰度相对较低,但次乌头碱的质子化峰仍然是基峰,说明生附子在炮制过程中虽然其中剧毒成分——双酯型生物碱已部分转化为低毒成分——单酯型生物碱,但仍然具有较高的毒

性,因此在中医临床应用中,通常还要通过与其他中药材配伍共煎煮使用,从而使有毒中药达到减毒增效的目的,发挥其治疗疾病的作用。

2.2 制附子单煎液中生物碱的电喷雾质谱研究: 为了更清楚地分析制附子在其他中药材配伍组方的共煎煮过程中其毒性成分的变化规律,采用电喷雾质谱对制附子的单煎液中生物碱的变化进行研究,结果见图 1-B。结果表明,制附子经单煎后,其化学成分进一步发生量的变化,与图 1-A 相比较,单酯型生物碱苯甲酰中乌头原碱(m/z 590)的质子化峰变为基峰,而次乌头碱质子化峰相对降低,说明制附子中双酯型生物碱在煎煮过程中进一步发生了水解,即煎煮过程也是附子减毒增效的过程。但次乌头碱质子化峰仍然很强,说明制附子经过煎煮虽然次乌头碱发生了部分水解,但残留的次乌头碱的相对含量仍然很高,尚需与其他中药材配伍,以达到减毒增效的目的。

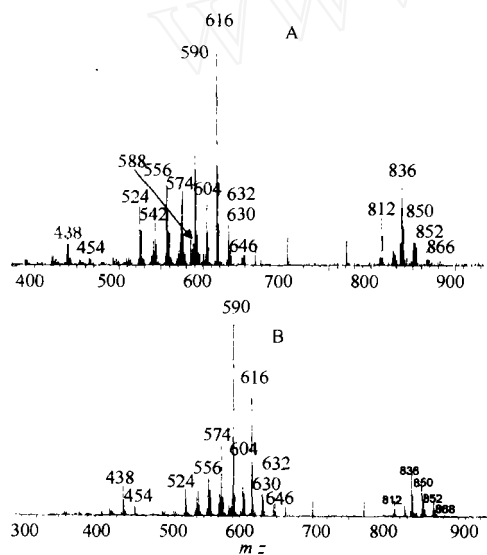


图1 制附子乙醇冷浸液(A)和水单煎液(B)的电喷雾质谱图

Fig. 1 ESI-MS chromatograms of prepared RALP extracted by cold ethanol (A) and decocted by boiling water (B)

2.3 八味地黄方、人参汤及其共煎液中双酯型生物碱的电喷雾质谱研究: 采用电喷雾质谱对八味地黄方中生物碱进行了研究,结果见图 2-A,与图 1-B 对比发现次乌头碱的相对丰度又有较明显的降低,说明八味地黄方中双酯型生物碱水解相对比较完全,毒性较低。据文献报道,人参汤在临床使用过程中,并无毒性,但是当八味地黄方与人参汤共服时,却产生了中毒现象,说明人参汤中某种药材抑制了附子

中双酯型生物碱的水解。为此,对八味地黄方与人参汤共煎液中双酯型生物碱进行了详细研究,实验结果表明,共煎后次乌头碱的质量分数明显升高(见图 2-B),证明人参汤对八味地黄方附子中双酯型生物碱的水解的确具有抑制作用,该结果与伊藤等^[4]采用高效液相色谱法的分析结果基本一致。为了进一步验证该结论,将附子与人参汤共煎(结果见图 2-C),发现共煎液中次乌头碱的相对含量高于八味地黄方,与八味地黄方加入人参汤共煎液中双酯型生物碱相当,说明人参汤中的确存在抑制双酯型生物碱水解的成分。

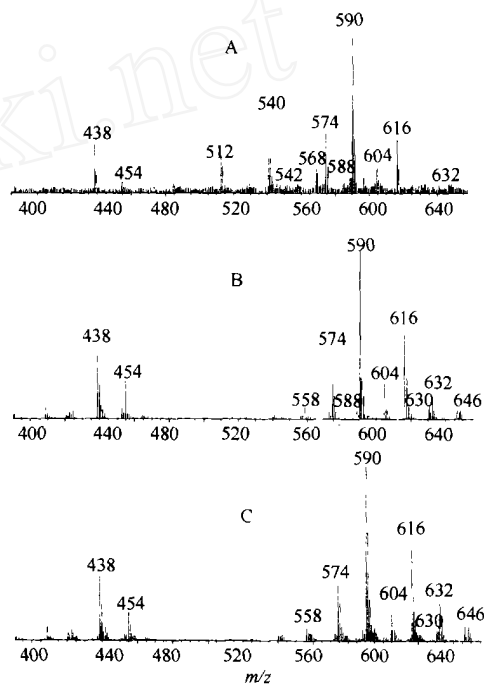


图2 八味地黄方(A)、八味地黄方加入人参汤(B)和附子加入人参汤(C)的电喷雾质谱图

Fig. 2 ESI-MS chromatograms of BDR (A), codecoction of BDR+ GSD (B), and RALP+ GSD (C)

2.4 附子与人参、甘草、干姜、白术共煎液中双酯型生物碱的电喷雾质谱研究: 为了更好地分析人参汤中抑制双酯型生物碱水解的成分来自于何种药材,分别将附子与人参、甘草、干姜、白术共煎,然后利用电喷雾质谱分析其共煎液中的双酯型生物碱的变化规律,并与附子单煎液中双酯型生物碱的电喷雾质谱结果进行对比。结果发现在煎煮过程中甘草(图 3-A)以及干姜(图 3-B)可以导致共煎液中次乌头碱的相对含量减少,其中甘草对附子的减毒效果最好,干姜即使在用量较小的情况下,仍然能够有效降低共煎液中次乌头碱的相对含量,即:干姜和甘草对附

子具有较好的解毒作用,该结果与文献报道^[1,2]的结果完全一致。图 3-C 实验结果表明,人参对共煎液中次乌头碱相对含量的影响不是很显著,但从质谱数据可以明显看出它并没有导致共煎液中次乌头碱相对含量增加。

此外,对附子与白术共煎液中双酯型生物碱的变化进行了研究(结果见图 3-D),结果表明,在该体系中,次乌头碱的质子化峰为基峰,脱氧乌头碱的丰度也有明显提高,单酯型生物碱的丰度很低。证明白

术在与附子共煎煮过程中严重抑制了次乌头碱的水解,导致共煎液中双酯型生物碱的质量分数增加,毒性升高。为了进一步验证该结论的正确性,利用次乌头碱对照品与白术进行共煎,并对其共煎液进行了电喷雾质谱(见图 4-A)研究。实验结果表明,与次乌头碱对照品单煎液(见图 4-B)相比,次乌头碱与白术共煎液中次乌头碱的水解程度较小,进一步证明白术的确抑制了附子中次乌头碱的水解反应。

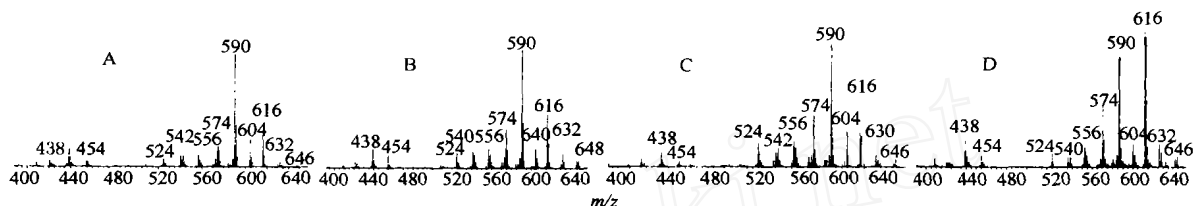


图 3 附子与甘草(A)、附子与干姜(B)、附子与人参(C)和附子与白术(D)共煎液的电喷雾质谱图

Fig. 3 ESI-MS chromatograms of RALP+ RG (A), RALP+ RZ (B), RALP+ RGS (C), and RALP+ RAM (D) decoctions

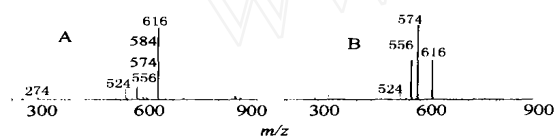


图 4 白术与次乌头碱共煎液(A)和次乌头碱单煎液(B)的电喷雾质谱图

Fig. 4 ESI-MS chromatogram of decoction of RAM + hyaconitine (A) and single hyaconitine decoction (B)

3 结论

采用电喷雾质谱技术,研究了制附子单煎液及其各种共煎剂中双酯型生物碱的相对含量的变化规律,证明了人参汤中抑制八味地黄方中双酯型生物碱的水解,促使其毒性增加的化学成分来自于白术。说明白术虽然不属于传统的附子禁忌理论中不能与附子共用的中药,但是在人参汤中的白术的确能够抑制八味地黄方中双酯型生物碱的水解,从而导致中毒。但值得注意的是,白术和附子配伍组方使用在传统复方中药中并不鲜见,因此,利用电喷雾质谱技术,从化学角度阐释白术与附子配伍组方的药效物质基础,对于揭示传统中医药理论的科学内涵,开发传统复方中药具有非常重要的理论意义,有关白术与附子配伍组方的机制正在进一步研究中。

References

[1] LÜ L, Si Y S, Zhu Y M, et al. Effect of herbs in Sini Tang on alkaloids of aconite [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (Suppl): 79-81.

[2] Huang L S, Zhao W C, Xia Y F. Effect of methods on the content of alkaloids and glycyrrhetic acid in Sini Injection [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, 30 (5): 332-334.

[3] He W, Qin L, Si S Y. Determination of aconitine and tetrandrin in separate and compatible decoction of *Radix Aconitum* and *Radix Stephaniae Tetrandrae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (7): 600-602.

[4] Ye Z G, Zhang Z J. Analysis of aconitum poisoning [J]. *Foreign Med Sci - Tradit Chin Med* (国外医学·中医中药分册), 2000, 22(3): 148-150.

[5] 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.

[6] Xu Y J, Song F R, Zhao X F, et al. Studies on antishock effect of active constituents in Ginseng Sini Tang [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 392-394.

[7] Sun W X, Liu X Y, Liu Z Q, et al. A study of aconitum alkaloids from aconite roots in *Aconitum camischalei* Debx. using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1998, 12: 821-825.

[8] Wang Y, Liu Z Q, Song F R, 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.

[9] Sun W X, Song F R, Cui M, et al. Simultaneous determination of lipo-alkaloids extracted from *Aconitum camischalei* using electrospray ionization mass spectrometry and multiple tandem mass spectrometry [J]. *Planta Med*, 1999, 65: 432-435.

[10] Wang Y, Shi L, Jin D M, et al. Stripping and hydrolyzing balance of aconitic alkaloids in processing of Sini Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(4): 311-314.