

藜芦与人参配比毒性与生物碱类成分变化的相关性研究

杨 亮^{1,2}, 王宇光^{2*}, 梁乾德², 马增春², 肖成荣², 谭洪玲², 高 月^{2*}

1. 安徽医科大学研究生学院, 安徽 合肥 230032

2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 药理毒理研究室, 北京 100850

摘 要: 目的 探索中药“十八反”中藜芦-人参药对的毒性与生物碱类成分的关系。方法 通过动物毒性实验比较藜芦与人参不同配比的毒性, 采用超高效液相色谱-四级杆/飞行时间质谱联用(UPLC/Q-TOFMS)技术检测藜芦与人参1:2.63配比的合煎液、单煎后合并液(简称合并液)、合并液再煎液中生物碱类成分; Mass Lynx 4.1软件分析生物碱类成分的变化。结果 动物毒性实验显示藜芦与人参1:2.63配比时动物死亡较多, 且此时合煎液与合并液毒性差别最为明显。将合并后再煎液可能引起物质变化的两个因素(即毒性生物碱的溶出增加和药物相互作用)单一化, 即去除溶出影响因素时突显的药物本身化学反应的影响, 可见藜芦胺和芥芬胺在合煎后溶出量增大, 生物碱成分增加; 计米亨碱、3-当归酰棋盘花胺在合煎液及合并液再煎液中的量均升高, 提示可能是化学反应导致相关成分溶出增多。结论 藜芦与人参合用后毒性增大, 可能与生物碱的溶出量增加及药物相互作用密切相关。

关键词: 藜芦; 人参; 十八反; 生物碱; 毒性; 藜芦胺; 芥芬胺

中图分类号: R289.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1574-06

Correlation between toxicity and changes of alkaloids in combination of *Veratrum nigrum* and ginseng

YANG Liang^{1,2}, WANG Yu-guang², LIANG Qian-de², MA Zeng-chun², XIAO Cheng-rong², TAN Hong-ling², GAO Yue²

1. Graduate School of Anhui Medical University, Hefei 230032, China

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

Abstract: Objective To explore the correlation between the toxicity of *Veratrum nigrum*-ginseng combination (VGC) and alkaloids in eighteen incompatible medications (Shibafan) in the theory of traditional Chinese medicines. **Methods** The toxicities of different ratios of VGC were investigated by animal toxicity experiment. Through ultra performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOFMS), alkaloids among co-decoction, mixed decoction, and re-decoction of VGC in the ratio of 1:2.63 were detected. The datasets were processed with Mass Lynx V14.1 software to analyze the changes of alkaloids. **Results** Animal toxicity experiment indicated that there was a high mortality and the difference of toxicity between the co-decoction and mixed decoction was the most significant, as the ratio of VGC was 1:2.63. The two factors in the VGC re-decoctions, i.e. the increased dissolution of toxic alkaloids and the drug interreaction, which could cause the material change, were unified. It could be observed that the dissolution of jervine and veratramine and the content of alkaloids were increased. The contents of germidine and 3-angeloylzygadenine in co-decoction and mixed decoction were increased, which might mean that the chemical interaction could lead to the stripping components of the related components increased. **Conclusion** The toxicity increases of VGC may be closely related to the increased dissolution of alkaloids and drug interaction.

Key words: *Veratrum nigrum* L.; ginseng; eighteen incompatible medications (Shibafan); alkaloids; toxicity; jervine; veratramine

收稿日期: 2011-10-24

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2011CB505304); 国家自然科学基金资助项目(81073149); 北京市自然科学基金资助项目(7112110)

作者简介: 杨 亮(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: (010)66930267 E-mail: yangliang19890322@163.com

*通讯作者 高 月 Tel/Fax: (010)66931312 E-mail: gaoyue@nic.bmi.ac.cn

王宇光 Tel/Fax: (010)66930221 E-mail: wang.yuguang@139.com

中药“十八反”是中药配伍禁忌的重要内容之一,“诸参辛芍叛藜芦”是“十八反”中的一组^[1-3],藜芦与人参是“诸参辛芍叛藜芦”中的药对之一。藜芦味辛、苦,性寒,有涌吐风痰、杀虫疗疮的功效,主要用于治疗高血压、中风、癫痫等疾病^[4],由于藜芦有大毒,在中医复方中用药十分谨慎,因此有必要对其配伍的增毒减效作用机制进行研究。藜芦与人参配伍增毒减效是由于人参皂苷类成分可增加藜芦中毒性生物碱的溶出^[5],以及藜芦中的生物碱与人参中的人参皂苷类成分发生化学反应使毒性生物碱的量增加、人参皂苷类成分减少所致的^[6]。因此,藜芦与人参配伍引起物质变化的两个因素包括毒性生物碱溶出的增加和药物相互反应。本实验通过动物毒性实验比较藜芦与人参不同配比毒性,采用均匀设计和超高效液相色谱-飞行时间电喷雾质谱(UPLC-Q/TOFMS)技术,通过比较藜芦与人参1:2.63配伍的合煎液、单煎后合并液(简称合并液)、合并液再煎液的差异,揭示煎液中成分化学反应对物质变化的影响,进而从化学成分变化的角度阐明藜芦与人参相反的科学内涵。

1 材料

1.1 药材与试剂

藜芦,产自长春市农安县华家镇,购自安徽丰原铜陵中药饮片公司;人参,产自吉林省白山市抚松县,购自吉林银河参业科技开发有限公司。两味药材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,分别为百合科藜芦 *Veratrum nigrum* L. 的干燥根、五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根。

超纯水经 Millipore 纯水系统纯化,乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯。

1.2 动物

昆明种小鼠,18~22 g,6~8 周龄,雌雄各半,由军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号为 SCXK-(军)2007-004。

1.3 仪器

98—1—B 型电子调温电热套,天津市泰斯特仪器有限公司;RE52CS 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;电热恒温水浴锅,北京长安科学仪器厂;SHB—III A 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;BS 223S 型电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;Acquity UPLC-Synapt MS 色谱-质谱联用仪、Mass Lynx V14.1 质谱工作站,

Waters 公司;Millipore Simplicity 纯水仪,北京德原科技发展有限公司;Herarus Labofuge 400R 冷冻离心机,Beckman Coulter 公司。

2 方法

2.1 供试样品的制备

藜芦与人参分别按 1:8.85(A)、1:153.8(B)、1:2.63(C)、1:9.3(D)、1:163.2(E)、1:0.48(F)、1:8.23(G) 精确称质量混合,加入 10 倍量的蒸馏水,浸泡 1 h 后煮沸 1 h,提取滤液,3 层纱布滤过,称量滤液。第二煎加入与第一煎滤液等量的蒸馏水,煎煮 1 h 后用 3 层纱布滤过,合并 2 次滤液,即得藜芦与人参的合煎液。按照上述方法制备藜芦单煎液、人参单煎液,将藜芦与人参单煎液按原药材 1:2.63(C1)、1:0.48(F1)、1:8.23(G1) 的比例混合,即得藜芦人参合并液。将合并液煎煮 1 h 后即得合并液再煎液。

2.2 动物实验

2.2.1 均匀设计试验^[7] 结合藜芦半数致死量 LD₅₀ 值,按照两因素 7 水平(A~G)均匀设计原则,以两种单药临床使用的最低剂量为最小值,藜芦以其 1/2 LD₅₀、人参以其 1/3 最大耐受量为最大值,从小到大等比递增,每组 20 只小鼠,雌雄各半。

2.2.2 各煎液毒性比较 根据均匀设计试验结果,取小鼠死亡率较高的 C、F、G 3 组,每组再设合并液组、合煎液组,比较死亡率差异,每组 20 只小鼠,雌雄各半,各组均一次性 ig 给药,观察给药后 14 d 内小鼠存活情况。

2.3 化学成分分析

2.3.1 供试样品的处理 取藜芦与人参配比为 1:2.63 的合并液、合煎液及合并液再煎液静置,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过即得,4 ℃ 保存,待测。

2.3.2 超高效液相色谱条件 Waters ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),柱温 23 ℃,体积流量 0.5 mL/min,进样量为 5 μL,流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液,流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液,正离子模式下梯度洗脱:0~1 min, 1%~2% B; 1~2 min, 2%~5% B; 2~5 min, 5%~12% B; 5~10 min, 12%~20% B; 10~12 min, 20%~30% B; 12~13 min, 30%~50% B; 13~16 min, 50%~100% B; 16~20 min, 100%~2% B。

2.3.3 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*: 100~1 000,毛细管电压

为 3 kV，锥孔电压为 30 V，离子源温度为 100 ℃，雾化温度为 450 ℃，壳气体积流量为 900 L/h。以亮氨酸-脑啡肽进行精确质量校正（[M+H]⁺为 556.277 1）。

2.3.4 数据分析 液-质联用数据采用 Mass Lynx 4.1 软件（Waters 公司）进行峰提取、峰对齐及归一化等处理，利用主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）找出合煎液与合并液化合物指纹图谱之间的差异，并通过变量重要性投影（variable importance in projection）得到潜在的化学标记物，结合对照品和质谱数据库检索对潜在的化学标记物进行快速鉴定。

3 结果

3.1 藜芦与人参配伍比例的选择

3.1.1 均匀设计筛选 通过均匀设计试验筛选小鼠死亡率较高的几组配伍中藜芦与人参的配比，结果见表 1。可知藜芦与人参不同比例配伍对小鼠的急性毒性差异较大，随着藜芦剂量的增加，对小鼠的急性毒性增强；藜芦与人参 1：2.63、1：8.23、1：0.48 比例配伍对小鼠急性毒性较强，故对此 3 种配比的合煎液与合并液进一步进行毒性差异比较。

表 1 藜芦与人参不同比例配伍合煎液对小鼠死亡率的影响 (n=20)

Table 1 Effect of VGC co-decoction in different ratios on mortality of mice (n=20)

组别	藜芦 / (g·kg ⁻¹)	人参 / (g·kg ⁻¹)	两药比例	死亡数	死亡率 / %
A	0.55	4.87	1：8.85	0	0
B	0.26	40.00	1：153.8	0	0
C	1.14	3.00	1：2.63	14	70
D	0.13	1.21	1：9.31	0	0
E	0.06	9.79	1：163.2	1	5
F	5.00	2.42	1：0.48	20	100
G	2.39	19.68	1：8.23	8	40

3.1.2 各煎液毒性比较 对藜芦与人参配伍毒性较大的 3 种比例配伍合煎液与合并液毒性进行进一步比较，结果见表 2。实验小鼠多在 1~15 min 内即出现死亡，30 min 后存活的小鼠在 14 d 观察期内死亡情况较少。结果发现藜芦与人参以 1：8.23（藜芦剂量为 2.39 g/kg）配伍同藜芦与人参 1：2.63（藜芦剂量为 1.14 g/kg）配伍相比，虽然藜芦的剂量降低，但是由于与人参配伍比例的不同，对小鼠的急

表 2 藜芦与人参合煎液及合并液给药后小鼠死亡情况 (n=20)

Table 2 Mortality of mice between VGC co-decoction and VGC mixed decoction groups (n=20)

组别	藜芦 / (g·kg ⁻¹)	人参 / (g·kg ⁻¹)	两药比例	死亡数	死亡率 / %
C 合并液	1.14	3.00	1：2.63	2	10
C 合煎液	1.14	3.00	1：2.63	14	70
F 合并液	5.00	2.42	1：0.48	20	100
F 合煎液	5.00	2.42	1：0.48	20	100
G 合并液	2.39	19.68	1：8.23	10	50
G 合煎液	2.39	19.68	1：8.23	9	45

性毒性反而增强，且藜芦与人参 1：2.63 配伍合煎液与合并液急性毒性差异最大，推测以此比例配伍合煎液化学成分发生明显变化，故对藜芦与人参 1：2.63 配伍合煎液与合并液进行化学成分分析。

3.2 藜芦与人参 1：2.63 配伍煎液化学成分分析

3.2.1 各煎液正离子模式下的总离子流图 由图 1 可见，与合并液相比，合煎液在保留时间为 2.54、5.18、4.54 min 的离子峰峰面积增加显著，分别为藜芦定（1 号峰）、计米亭碱（3 号峰）、芥芬胺（4

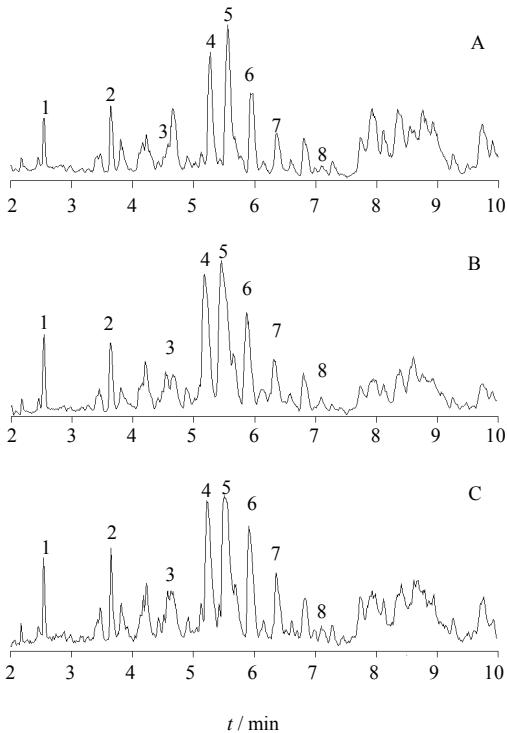


图 1 藜芦与人参配伍单煎后合并液 (A)、合煎液 (B)、合并液再煎液 (C) 的液相色谱-质谱总离子流图
Fig. 1 LC-MS TIC chromatograms of VGC mixed decoction (A), VGC co-decoction (B), and VGC re-decoction (C)

号峰);与合煎液、合并液相比,合并液再煎液在保留时间为 3.63、6.31 min 的离子峰峰面积增加比较显著,分别为藜芦新碱(2 号峰)、3-当归酰棋盘花胺(7 号峰),显示合煎液、合并液及合并液再煎液三者的化学成分存在差异。在比较三者色谱图差异的基础上,通过 Mass Lynx 4.1 软件和 Q-TOF 进一步对其成分进行分析和结构鉴定。

3.2.2 各煎液正离子模式下的分子离子峰鉴别 表 3 列出合煎液、合并液及合并液再煎液的总离子峰化合物(即图 1 中 1~8 号峰,经 MHDB 数据库检索以及参考相关文献得到^[8-9]),其中 1、2、3、5、7 号峰分别为藜芦中生物碱类成分藜芦定、藜芦新碱、计米亨碱、藜芦胺、3-当归酰棋盘花胺,系藜芦中主要毒性成分,4、8 号峰均为芥芬胺的衍生物。

表 3 藜芦与人参合并液、合煎液及合并液再煎液的总离子峰化合物

Table 3 Compounds of total ion peak in VGC mixed decoction, VGC co-decoction, and VGC re-decoction

峰号	t/min	化合物	相对分子质量 / ($\times 10^3$)	
			实测	理论
1	2.54	藜芦定	460.305 2	460.306 3
2	3.63	藜芦新碱	572.359 3	572.358 7
3	4.54	计米亨碱	636.375 5	636.374 8
4	5.18	芥芬胺	426.298 7	426.300 8
5	5.45	藜芦胺	410.304 8	410.305 9
6	5.91	未知	678.384 3	—
7	6.31	3-当归酰棋盘花胺	576.353 1	576.353 6
8	7.09	去氧芥芬胺	412.322 3	412.321 6

3.2.3 各煎液正离子模式下差异成分鉴别 由主成分分析图(图 2) OPLS-DA 可见,合煎液、合并液及合并液再煎液 3 组样品得到明显的区分。3 种煎液在化学成分上的差异性(图 3~6)显示,藜芦胺、芥芬胺、去氧芥芬胺、3-当归酰棋盘花胺的量变化明显,即与合并液相比,合煎液中芥芬胺、去氧芥芬胺、藜芦胺和 3-当归酰棋盘花胺的量增加;与合并液再煎液相比,合煎液藜芦胺的量显著增加,芥芬胺和藜芦定的量有所增加,计米亨碱和 3-当归酰棋盘花胺的量下降。

4 讨论

UPLC-Q/TOFMS 是近年来发展起来的新技术,超高效液相色谱(UPLC)不仅使柱效得到提高,而

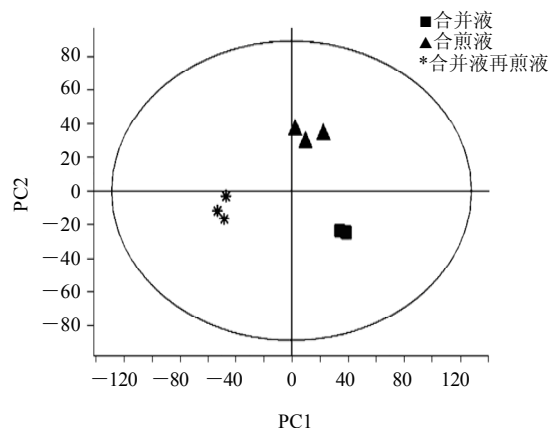
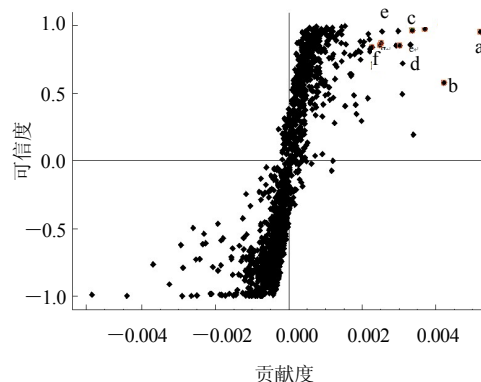


图 2 藜芦与人参配伍合并液、合煎液及合并液再煎液正交偏最小二乘法分析结果

Fig. 2 OPLS analysis on VGC mixed decoction, VGC co-decoction, and VGC re-decoction



a: $t=2.54$ min, m/z 460.306 6 b: $t=5.22$ min, m/z 426.298 9
c: $t=6.29$ min, m/z 412.322 3 d: $t=6.35$ min, m/z 636.375 1
e: $t=5.55$ min, m/z 410.305 4 f: $t=7.41$ min, m/z 414.336 1

图 3 基于正交偏最小二乘法获得的藜芦与人参配伍合并液与合煎液数据分析结果散点图 (ES^+)

Fig. 3 OPLS-DA/S-Plot between VGC mixed decoction and VGC co-decoction (ES^+)

且在较宽的体积流量范围内柱效保持恒定,从而有利于通过提高流动相的体积流量而缩短分析时间,提高流通量^[10-12]。飞行时间-质谱(TOF-MS)技术可提供准确质量数,大大减少推测结构时可能的化合物数量。近年来 UPLC-Q/TOFMS 已广泛用于快速确定中药的整体化合物特征^[13-14]。

本实验在前期研究^[15]藜芦与人参 10:1 配伍效果的基础上,采用均匀设计研究藜芦与人参不同配比对动物的急性毒性。观察相同比例及用量、不同煎煮方法的毒性时发现,配比为 1:2.63(C 组,藜芦用量为 1.14 g/kg)时合煎液与合并液的毒性变化

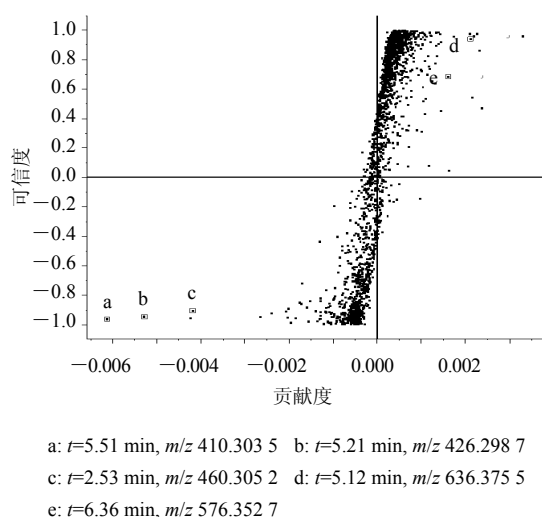


图4 基于偏最小二乘法获得的藜芦与人参配伍合煎液与合并液再煎液数据分析结果散点图

Fig. 4 OPLS-DA/S-Plot between VGC co-decoction and VGC re-decoction

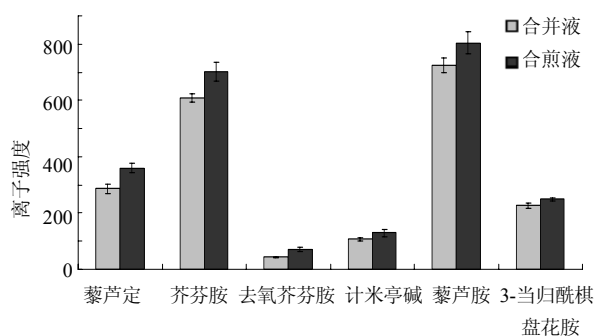


图5 藜芦与人参配伍合并液与合煎液差异显著特征化合物的离子强度变化趋势图 (ES^+)

Fig. 5 Trend plots of ionic strength changes of characteristic compounds from VGC mixed decoction and VGC co-decoction (ES^+)

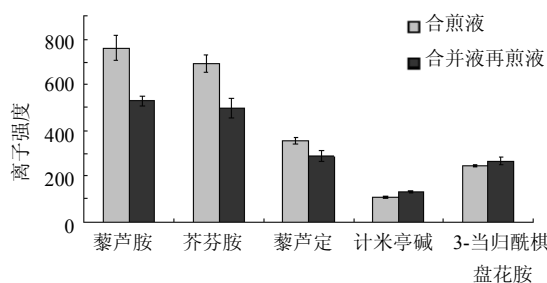


图6 藜芦与人参配伍合煎液与合并后再煎液中差异显著的特征化合物的离子强度变化趋势图 (ES^+)

Fig. 6 Trend plots of ionic strength of characteristic compounds from VGC co-decoction and VGC re-decoction (ES^+)

最为明显。进一步分析藜芦与人参 1:2.63 配比在煎煮过程中化学成分的变化发现,合煎液中藜芦胺、芥芬胺、3-当归酰棋盘花胺等生物碱类的量高于合并液,表明该配比时生物碱类成分的变化与动物毒性密切相关,且随着生物碱量的增加,对动物毒性增大。

藜芦胺为藜芦中的主要毒性成分,对中枢神经系统、消化道均有很强的刺激作用,芥芬胺为藜芦中的芥藜芦生物碱类,毒性仅次于原藜芦胺,对消化系统、神经系统等均有很强的毒性^[16]。本研究动物急性毒性试验结果显示,藜芦与人参配伍的合煎液毒性大于合并液,可能是由于藜芦胺及芥芬胺类成分量的差异导致的,小鼠在给药后 15 min 内出现抽搐,最终死亡,可能与藜芦胺及芥芬胺类成分的神经毒性有关。

引起藜芦与人参配伍的合煎液、合并液中成分差异的因素有两种:一是人参皂苷类成分增加了藜芦中毒性生物碱(藜芦胺、芥芬胺)的溶出;二是藜芦中毒性较小的生物碱与人参中皂苷类成分发生反应,转化成毒性较大的生物碱^[5-6](如计米亨碱、3-当归酰棋盘花胺),但究竟是哪一种因素起主导作用尚难确定。本实验结果显示,藜芦、人参单煎液合并后再煎煮,其中的生物碱溶出与合并液相比固定不变。因此比较了藜芦与人参的合煎液与合并液再煎液中成分的差异,并与合煎液和合并液成分的差异进行比较,从而判断引起藜芦与人参配伍不同煎液中成分差异的是哪种因素。结果显示,藜芦胺与芥芬胺在不同煎煮液中的量相同,可能是在合煎过程中人参皂苷类成分增加了它们的溶出而使其量增加;计米亨碱、3-当归酰棋盘花胺在不同煎液中的量不同,推测在合煎过程中发生的化学反应是导致成分发生变化的主导因素。

本实验初步分析了藜芦与人参以 1:2.63 配比的合并液、合煎液、合并液再煎液物质变化,提出了一种新的研究方法,可将影响成分变化的两类因素很好的区分,为进一步研究藜芦人参药对的反作用的物质基础提供了依据,也为研究中药配伍提供了新的思路和方法,并为临床合理用药提供了参考。然而由于合并液再煎液经过两次处理,与传统的合并液与合煎液相比,其平行对照原则有待考察,因此探寻在将改变煎液成分的两种因素区分开的同时,又可保持对照原则的方法是今后研究的重点。今后还将结合动物体内实验继续探讨藜芦与人参配伍的作用机制。

参考文献

- [1] 孟莉, 向绍杰, 乔敏, 等. 均匀设计法考察藜芦对人参的耐缺氧及抗疲劳作用的影响 [J]. 实用中医内科杂志, 2010, 24(2): 20-21.
- [2] 唐于平, 吴起成, 丁安伟, 等. 对中药“十八反”、“十九畏”的现代认识 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 79-82.
- [3] 王辰允, 叶璇, 王宇光, 等. 人参与藜芦合用对CYP1A酶活性的影响 [J]. 解放军药学报, 2010, 26(2): 104-106.
- [4] 王金辉, 丛悦, 曹颖林. 藜芦 (*Veratrum nigrum* L.) 生品与炮制品中藜芦新碱 (veratrosine) 含量和毒性差异研究 [J]. 河南大学学报, 2007, 26(4): 1-5.
- [5] 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 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 123-129.
- [6] 盛伟, 张语迟, 王淑敏. 人参与藜芦配伍后人参皂苷类成分煎出量变化研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1417-1418.
- [7] 王新春, 侯世祥, 李文, 等. 均匀设计联用星点设计优化白藜芦醇固体脂质纳米粒制备处方 [J]. 中成药, 2007, 29(8): 1139-1142.
- [8] 田代华. 实用中药词典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [9] Yue H, Pi Z F, Song F R, *et al.* Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum Carmichaeli* Debx by HPLC/ESIMS/MS [J]. *Talanta*, 2009, 77(5): 1800-1807.
- [10] Zheng X T, Shi P Y, Cheng Y Y, *et al.* Rapid analysis of a Chinese herbal prescription by liquid chromatography-time-of flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1206(2): 140-146.
- [11] 王超, 王宇光, 梁乾德, 等. 乌头与贝母配伍化学成分变化的 UPLC/Q-TOFMS 研究 [J]. 药学报, 2010, 45(10): 1301-1306.
- [12] Li L, Luo G A, Liang Q L, *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(1): 66-72.
- [13] Song L L, Jing Z S, Chun F Q, *et al.* UPLC-PDA-TOFMS 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(4): 468-478.
- [14] Zhou D Y, Zhang X L, Xu Q, *et al.* UPLC/Q-TOFMS/MS as a powerful technique for rapid identification of polymethoxylated flavones in *Fructus Aurantii* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(1): 2-8.
- [15] 王超. 基于液质联用技术的乌头、藜芦配伍禁忌的化学研究 [D]. 湘潭: 南华大学, 2010.
- [16] 汤建, 李慧梁, 黄海强, 等. 藜芦属植物化学成分的研究近况 [J]. 药学进展, 2006, 30(5): 206-212.