

## HPLC-Q-TOF/MS 指纹技术对比分析附子配伍炙甘草前后化学组分变化

林彦君, 游宇, 季宁平, 章津铭, 陈秋薇, 傅超美\*

成都中医药大学, 四川 成都 611137

**摘要:** 目的 分析附子-炙甘草配伍前后化学组分变化, 探讨附子配伍炙甘草减毒的机制。方法 采用 HPLC-Q-TOF/MS 分别对附子配伍炙甘草前后汤液进行化学对比研究。分别制备附子单煎液与附子炙甘草合煎液供试品溶液, 在同一分析条件下, 分别建立其 HPLC-MS 指纹图谱, 并采用 Q-TOF/MS 检测。结果 从附子单煎液中指出 20 种成分及其结构; 从附子炙甘草合煎液中指出 32 种成分及结构, 其中 4 种成分来源于炙甘草, 28 种成分来源于附子, 但附子配伍炙甘草前后汤液中生物碱成分种类和量差别均较大。结论 说明配伍炙甘草可能导致汤液中附子生物碱成分状态的变化, 为附子-炙甘草配伍减毒机制的探讨提供了实验依据。

**关键词:** 附子; 炙甘草; 配伍; HPLC-Q-TOF/MS; 化学组成; 指纹技术

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)11-1556-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.011

## Changes of chemical ingredients before and after compatibility of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* analyzed by HPLC-Q-TOF/MS fingerprint technology

LIN Yan-jun, YOU Yu, JI Ning-ping, ZHANG Jin-ming, CHEN Qiu-wei, FU Chao-mei

Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To analyze the changes of chemical ingredients before and after compatibility of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* (ALRP) and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* (GRRPM), and to explore the possible mechanism of toxicity attenuation of their compatibility. **Methods** The chemical ingredients in the decoction of ALRP and the decoction of compatibility of ALRP and GRRPM were comparatively researched by HPLC-MS. Single decoction of ALRP and compound decoction of compatibility of ALRP and GRRPM were prepared, and their HPLC-MS fingerprints were respectively established and determined by Q-TOF/MS under the same condition. **Results** Twenty ingredients and their structures were identified from single decoction of ALRP; 32 ingredients and their structures were indentified from the decoction of ALRP and GRRPM, among them 4 from GRRPM, 28 from ALRP. And the alkaloid categories and contents of ALRP were significantly different before and after the compatibility with GRRPM. **Conclusion** The compatibility with GRRPM could change the alkaloid composition in ALRP, which provides the experimental evidences for the toxicity attenuation mechanism of compatibility of ALRP and GRRPM.

**Key words:** *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*; compatibility; HPLC-QTOF/MS; chemical composition; fingerprint technology

中药配伍为中医用药的基本形式, 附子-炙甘草是中药“相畏相杀”配伍应用极具代表性的常用药对。附子大辛大热, 功效峻猛但毒性极大, 炙甘草味甘, 具有调和药性、缓急解毒的作用。《景岳全书》载:“附子之性急, 得炙甘草而后缓; 附子之性毒, 得炙甘草而后解。”研究表明, 药效及毒性的变化与

配伍前后化学组分的变化密切相关。有研究者推测附子-炙甘草配伍减毒作用机制是由于炙甘草中酸性成分与附子中碱性成分发生结合, 使汤液中附子乌头碱的量减少<sup>[1]</sup>; 据文献报道<sup>[2-3]</sup>, 附子与炙甘草合煎后, 附子乌头碱和炙甘草黄酮类成分的量均有不同程度下降; 但对附子配伍炙甘草前后化学成分

收稿日期: 2013-12-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81073070)

作者简介: 林彦君 (1980—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为中药新制剂、新技术与新工艺研究。Tel: 13880652659 E-mail: 53075384@qq.com

\*通信作者 傅超美 (1961—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新技术与新工艺研究。E-mail: chaomeifu@126.com

变化的全面分析报道还较少,未能很好反映中药“多组分”特点。目前常采用化学指纹技术作为中药多组分分析的重要手段,由于附子、炙甘草两者成分种类多,类型复杂,常规紫外测定难以满足组分的全面分析;并且已有研究表明,附子煎煮过程部分生物碱可能转化为无紫外吸收的成分结构,因此,本实验采用 HPLC-Q-TOF/MS 技术,分别建立附子-炙甘草合煎及附子单煎的化学指纹图谱,对比分析其配伍前后的化学变化规律,以期从化学组分角度揭示中药“相畏相杀”配伍理论的科学实质。

## 1 仪器与材料

Agilent1200 系列高效液相色谱仪(在线真空脱气机-低压二元梯度泵-自动进样器-柱温箱); Bruker Micro QII—TOF(四级杆-飞行时间质谱)。共收集 14 批次生附片(购自四川新荷花中药饮片有限公司),经成都中医药大学卢先明教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品;炙甘草(批号 110521)购自科伦天然药业有限公司,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎的炮制加工品。色谱纯乙腈、甲酸(Fisher 公司);实验用水为去离子水(Milli-Q 纯水机制备),其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 水煎液样品的制备<sup>[4]</sup>

附子单煎液:取生附片 50 g,置于 2 L 三颈圆底烧瓶,加 15 倍量纯水,浸泡 30 min,加热回流煎煮,大火煮沸后保持微沸 30 min,滤过,减压浓缩至 1 g/mL。

附子-炙甘草合煎液:将同一批次炙甘草饮片与 14 个批次生附片(1:1),置于 2 L 三颈圆底烧瓶,加 15 倍纯水,浸泡 30 min,加热回流煎煮,大火煮沸后保持微沸 30 min,滤过,减压浓缩至 1 g/mL。

### 2.2 供试品溶液制备

移取 0.2 mL 上述水煎液置于 2 mL 量瓶中,加水溶解定容,取上清液,0.22 μm 滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液,进样。

### 2.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱(100 mm×4.6 mm, 3.5 μm);流动相:以 5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含 0.1%醋酸)为 A 相,以乙腈(含 0.1%甲酸)为 B 相,梯度洗脱程序:0~35 min, 90%~80% A; 35~45 min, 80%~60% A; 45~65 min, 60%~

50% A; 体积流量 0.4 L/min; 柱温为 30 °C; 进样量 10 μL。

### 2.4 质谱条件

ESI 源毛细管电压: 4.5 kV; 锥孔电压: 25 V; 干燥气体积流量为 6 L/min; 雾化气压力为 200 kPa; 干燥气温度为 180 °C; 质谱记录范围:  $m/z$  150~1 000, 正离子模式采集, 采样频率 0.1 s; 数据分析采用 Bruker 公司的 Compass Data Analysis 工作站。

### 2.5 数据分析

根据测得的精确相对分子质量,应用 Analyst QS 质谱分析软件在规定的误差范围内(误差 $\pm 5 \times 10^{-6}$ )计算可能的元素组成,并结合各个成分峰的二级质谱碎片信息和附子生物碱类、炙甘草中三萜皂苷类、黄酮类已知化合物的文献报道,并与自建化学成分数据库进行对比,对色谱峰进行定性分析和化学成分鉴别。

### 2.6 精密度试验

分别取同一附子单煎液和附子-炙甘草合煎液供试品溶液,连续进样 6 次,测定各成分峰的峰面积,结果各色谱峰峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明仪器精密度良好。

### 2.7 重复性试验

平行取附子单煎液和附子-炙甘草合煎液 6 份,照“2.2”项下方法制备供试品溶液并测定,测得各成分峰的峰面积,结果各色谱峰峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明重复性良好。

### 2.8 稳定性试验

分别取同一附子单煎液和附子-炙甘草合煎液供试品溶液,于 0、2、4、8、12、16、24 h 测定各成分峰面积,结果各色谱峰相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%。表明供试品溶液在 24 h 内较稳定。

### 2.9 样品的指纹图谱建立

附子单煎液和附子-炙甘草合煎液共有模式总离子流图见图 1。将各样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(中国药典委员会 2004A 版),各批次间指纹图谱相似度均大于 0.85。

### 2.10 样品的成分定性分析对比

对附子单煎液进行鉴定分析,共指认出响应值较高的 24 个峰,鉴定出 20 种化合物及其结构,结果见表 1。对附子-炙甘草合煎液进行鉴定分析,共指认出响应值较高的 38 个共有峰进行鉴定分析,共指认出 32 种化合物及其结构,结果见表 2。

由表 1 和表 2 可知,附子单煎液和附子-炙甘草

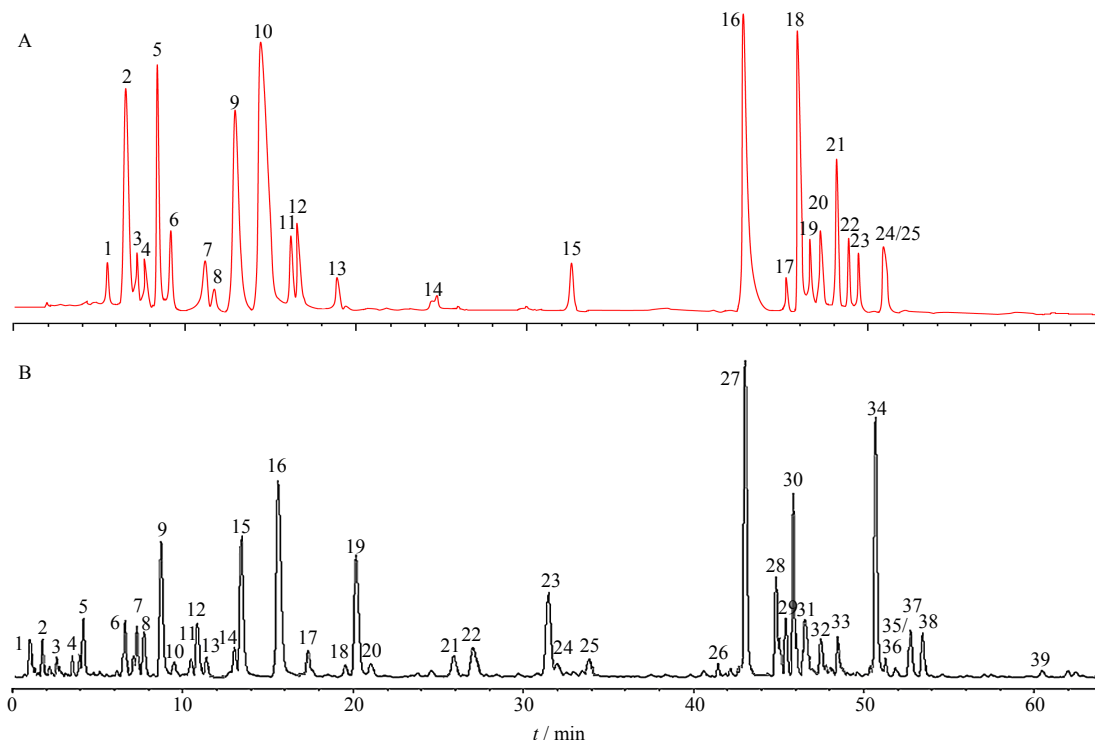


图1 14个批次附子单煎液 (A) 和 14个批次附子-甘草合煎液 (B) 的共有模式图  
 Fig. 1 Total mode chromatogram of 14 batches of ALRP decoction (A) and 14 batches of compatibility of ALRP and GRRPM (B)

表1 附子单煎液 HPLC-MS 指纹图谱 20 种化学成分鉴定结果

Table 1 Identification of 20 ingredients in ALRP decoction by HPLC-MS fingerprints

峰号	$t_R$ / min	相对分子质量 ( $m/z$ )	分子式	离子形式	鉴定化合物
1	5.8	424.266 5	$C_{23}H_{37}NO_6$	$[M+H]^+$	森布星 B
2	6.3	408.269 4	$C_{23}H_{37}NO_5$	$[M+H]^+$	塔拉乌头定
3	7.4	500.283 5	$C_{25}H_{41}NO_9$	$[M+H]^+$	乌头胺
4	7.9	360.249 9	$C_{22}H_{33}NO_3$	$[M+H]^+$	欧乌头碱
5	8.2	358.235 1	$C_{22}H_{31}NO_3$	$[M+H]^+$	准葛尔乌头碱
6	9.7	452.261 2	$C_{24}H_{37}NO_7$	$[M+H]^+$	去氢翠雀胺
7	10.1	470.273 3	$C_{24}H_{39}NO_8$	$[M+H]^+$	次乌头胺
9	13.6	450.284 2	$C_{25}H_{39}NO_6$	$[M+H]^+$	易混翠雀花碱
10	14.4	342.167 6	$C_{20}H_{23}NO_4$	$[M+H]^+$	附子亭碱
11	15.8	438.284 5	$C_{24}H_{39}NO_6$	$[M+H]^+$	新乌宁碱
13	19.4	392.280 9	$C_{23}H_{37}NO_4$	$[M+H]^+$	黄草乌碱丁
14	24.3	600.342 5	$C_{33}H_{45}NO_9$	$[M+H]^+$	异飞燕草碱
15	33.0	606.296 8	$C_{31}H_{43}NO_{11}$	$[M+H]^+$	10-OH-苯甲酰新乌头胺
16	43.3	590.299 3	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	$[M+H]^+$	苯甲酰中乌头胺
18	45.8	558.309 0	$C_{31}H_{57}NO_9$	$[M+H]^+$	苯甲酰-3, 13-脱氧乌头胺
19	46.3	574.300 8	$C_{31}H_{43}NO_9$	$[M+H]^+$	苯甲酰次乌头胺
22	49.1	542.314 4	$C_{31}H_{43}NO_7$	$[M+H]^+$	苯甲酰新乌宁碱 (胺)
23	49.4	632.311 5	$C_{33}H_{45}NO_{11}$	$[M+H]^+$	新乌头碱
24	51.1	616.317 1	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	$[M+H]^+$	次乌头碱
25	51.1	646.328 3	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	$[M+H]^+$	乌头碱

表 2 附子-炙甘草合煎液 HPLC-MS 指纹图谱 32 种化学成分鉴定结果

Table 2 Identification of 32 ingredients in decoction of compatibility of ALRP and prepared GRRPM by HPLC-MS fingerprints

峰号	$t_R$ / min	相对分子质量 ( $m/z$ )	分子式	离子形式	鉴定化合物	源于附子	源于炙甘草
4	3.8	196.123 5	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	棍掌碱	√	
5	4.1	180.092 3	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	去甲猪毛菜碱	√	
6	6.6	378.262 6	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	多根乌头碱	√	
7	7.6	440.261 8	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	9-去羟基森布星 A	√	
9	8.6	364.245 6	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	16-β-hydroxycardiopetaline	√	
10	9.2	424.267 4	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	森布星 B	√	
11	10.2	408.271 7	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	塔拉定	√	
12	11.1	500.284 2	C <sub>25</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	乌头胺	√	
13	11.9	360.250 2	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	欧乌头碱	√	
14	12.4	358.235 5	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	准葛尔乌头碱	√	
15	12.9	330.203 9	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	异叶乌头素	√	
16	14.9	454.278 7	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	附子宁碱	√	
17	17.1	438.283 2	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	新乌宁碱	√	
20	21.6	422.289 2	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	塔拉乌头胺	√	
21	26.0	466.242 5	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	翠雀它明	√	
22	27.0	480.293 5	C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14-O-乙酰新乌宁碱	√	
24	32.9	464.298 8	C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14-O-乙酰塔拉乌头胺	√	
25	33.9	676.258 0	C <sub>35</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>12</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	素馨(杰斯)乌头碱	√	
26	41.2	466.241 4	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	翠雀它明	√	
27	42.8	855.404 3	C <sub>42</sub> H <sub>64</sub> O <sub>16</sub>	[M+K] <sup>+</sup>	甘草皂苷 J2		√
28	44.4	590.290 4	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	苯甲酰新乌头胺	√	
29	45.3	985.467 8	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>21</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	甘草皂苷 A3		√
30	46.2	604.310 6	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	苯甲酰乌头胺	√	
31	46.4	257.071 2	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	甘草素		√
32	47.2	574.298 6	C <sub>31</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	苯甲酰次乌头胺	√	
33	48.3	558.305 8	C <sub>31</sub> H <sub>57</sub> NO <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	苯甲酰-3,13-去氧乌头胺	√	
34	51.7	572.319 4	C <sub>32</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	14-O-茴香酰新乌宁碱(胺)	√	
35	52.2	616.304 7	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	次乌头胺	√	
36	52.2	646.325 9	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	乌头碱	√	
37	52.6	600.314 8	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	异飞燕草碱	√	
38	53.5	866.983 2	C <sub>50</sub> H <sub>85</sub> NO <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱	√	
39	61.8	369.131 7	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	甘草宁 B		√

合煎液中来源于附子的成分均基本属于生物碱类, 附子单煎液与附子-炙甘草合煎液中共有 11 种相同成分。双酯型生物碱为附子主要毒性成分, 图 1 中, 峰 23、24、25 分别为新乌头碱和次乌头碱、乌头碱成分, 图 2 中峰 35、36 为次乌头碱和乌头碱, 图 1 中 3 种双酯型乌头碱的峰面积比较发现, 附子单煎液中的双酯型生物碱的总量高于附子-炙甘草合煎

中的 3 种成分总量, 结合前期的研究<sup>[4]</sup>, 推断附子配伍炙甘草合煎过程中有大量双酯型生物碱因结合而减少。

### 3 讨论

本实验基于四级杆-飞行时间质谱联用仪 Micro TOF-Q 设备的高分辨性和成分定性优势, 采用多级裂解和源碰撞诱导解离成分结构解析方式, 对各色

谱峰进行裂解规律的研究。目前已对附子单煎液 24 个共有峰进行结构鉴定和归属,已推断 20 种化合物组成及其结构;首次对附子-炙甘草合煎液 38 个共有峰进行结构鉴定和归属,已推断 32 种化合物组成及其结构。

本实验过程中考察了水和甲醇作为样品最终溶剂的适宜性,由于附子煎煮过程脂溶性较大的双酯型生物碱类已经大部分转变为水溶性较强的单酯型生物碱及醇胺,使用水和甲醇等极性溶剂提取得到的化学成分较为类似,使得实验考察中,盐酸-甲醇溶解液和水煎液的 HPLC-MS 指纹图谱的轮廓比较接近。

本实验过程中发现在相同的分析条件下,同一成分在图 1-A 和图 1-B 中保留时间存在差异,如森布星 B,在图 1-A 中保留时间为 5.8 min,而图 1-B 却为 9.2 min,这可能是由于附子与甘草合煎过程中,附子中生物碱成分与甘草皂苷黄酮等成分之间产生分子间作用,形成络合形式,从而引起附子中部分成分在同一色谱分离条件下,色谱峰保留时间差异,该成分间作用也与前期研究发现附子与甘草合煎后产生大量沉积物的现象相吻合<sup>[4]</sup>。

目前文献报道<sup>[5-7]</sup>,附子指纹图谱研究常需要在流动相中添加适量的十二烷基磺酸钠(SDS)以获取合适的分离度,但这会造成基线的波动且色谱峰峰型较差;另外,为了改善色谱峰型,多数方法需要将流动相的 pH 值调整到碱性条件,但色谱柱在碱性条件下会缩短使用寿命。本实验采用 HPLC-ESI-TOF/MS 分析手段,建立起附子配伍炙甘草前后水煎液 HPLC-MS 化学指纹图谱,避免了流动性中加入 SDS 和碱液,方法学考察表明该指纹图谱重

复性和稳定性均较好。目前还未见对基于附子-炙甘草配伍合煎液 HPLC-MS 指纹图谱的化学成分整体分析,故本实验中附子-炙甘草合煎液 HPLC-MS 指纹图谱的建立为深入寻找附子有效(毒)物质基础及探明其物质基础在配伍炙甘草合煎过程的变化奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 随志刚,陈明玉,刘志强,等. 附子煎煮与配伍应用中乌头类生物碱含量的变化及意义 [J]. 吉林大学学报:医学版, 2009, 35(2): 226-229.
- [2] Ji C J, Tschantz W R, Pfeifer N D, *et al.* Development of a multiplex UPLC-MRM MS method for quantification of human membrane transport proteins OATP1B1, OATP1B3 and OATP2B1 in *in vitro* systems and tissues [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 717(2): 67-76.
- [3] Turtoi A, Mazzucchelli G D, de Pauw E. Isotope coded protein label quantification of serum proteins-comparison with the label-free LC-MS and validation using the MRM approach [J]. *Talanta*, 2010, 80(4): 1487-1495.
- [4] 章津铭,李玲,高飞,等. 附子配伍甘草前后汤液沉积物的 HPLC-MS 化学组成分析 [J]. 药学学报, 2012, 47(11): 1527-1533.
- [5] 李莹,章津铭,傅超美,等. 不同方法制备四逆汤中化学成分对比研究 [J]. 中成药, 2012, 34(4): 673-678.
- [6] 刘慧,苏娟,杨超,等. 采用 GC-MS 及 RRLC-Q-TOFMS 法分析中药复方附子理中丸的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2011, 9(4): 267-273.
- [7] Tang L, Gong Y, Lv C, *et al.* Pharmacokinetics of aconitine as the targeted marker of Fuzi (*Aconitum carmichaeli*) following single and multiple oral administrations of Fuzi extracts in rat by UPLC/MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 736-741.