

· 化学与分析 ·

利用质谱研究诃子对草乌的化学解毒作用

辛杨^{1*}, 王淑敏², 张伟光¹, 吕君¹, 张滢¹, 张哲¹

(1. 齐齐哈尔大学 化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] **目的:**揭示蒙古族医药理论中诃子对草乌解毒作用的科学内涵。**方法:**采用超声提取法对草乌、草乌-诃子药对进行乙醚、无水乙醇提取,对草乌进行酸性乙醚提取,对草乌中双酯型生物碱提取部位-诃子混合后进行乙醚提取;采用电喷雾质谱技术对上述提取液进行检测。**结果:**电喷雾一级质谱图结果显示,随着诃子量的增加,草乌-诃子乙醚提取液中双酯型生物碱的相对丰度呈下降趋势,而脂型生物碱相对丰度呈上升趋势;草乌酸性乙醚提取液中脂型生物碱为基峰;草乌与草乌-诃子无水乙醇提取液中同种生物碱的相对丰度基本一致;双酯型生物碱提取部位加入诃子后,各生物碱的相对丰度与种类均无变化。**结论:**蒙古族医药理论中诃子对草乌的解毒作用是指在低极性条件下,诃子通过抑制双酯型生物碱的溶出对草乌起到减毒作用。本实验方法可用于制剂工艺为药材粉末直接混合合成的各种蒙古族成药复方的配伍机制研究。

[关键词] 草乌; 生物碱; 诃子; 解毒; 电喷雾

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0051-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014230051

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1522.004.html>

[网络出版时间] 2014-10-27 15:22

Chemical Detoxification of Fruit of Medicine Terminalia on Root of Kusnezoffii Monkshood by Mass Spectrometry

XIN Yang^{1*}, WANG Shu-min², ZHANG Wei-guang¹, LV Jun¹, ZHANG Ying¹, ZHANG Zhe¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;

2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this investigation was to study the detoxification of fruit of Medicine Terminalia (FMT) on root of Kusnezoffii Monkshood (RKM). **Method:** Ultrasonic extraction was applied to extract aconite alkaloids in RKM and RKM-FMT powder. ESI-MS was adopted to monitor the alkaloids in diethyl ether extract of RKM and the blend of RKM with FMT, in acidic diethyl ether extract of RKM, in absolute ethanol extract of RKM and the blend of RKM with FMT, in absolute ethanol extract of the residue of blend of RKM with FMT after extracting by diethyl ether, as well as diethyl ether extract of the blend of diester-alkaloids with FMT. **Result:** There were monoester-alkaloids, diester-alkaloids and lipo-alkaloids in diethyl ether extract of RKM, and the relative abundance of diester-alkaloids was the highest among them. In diethyl ether extract of the blend of RKM with FMT, the relative abundance of diester-alkaloids decreased as the FMT amount increased, moreover, that of lipo-alkaloids became the highest when the FMT amount was three times as that of RKM. In acidic diethyl ether extract of RKM, the lipo-alkaloids were detected as the basic peak. The relative abundance of all alkaloids in

[收稿日期] 20140410(023)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403067);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541874)

[通讯作者] *辛杨,博士,讲师,从事中药化学成分质谱分析,Tel:0452-2738217,E-mail:cc.xinyang@163.com

absolute ethanol extract of RKM was the same as that of the blend of RKM with FMT. FMT didn't affect the relative abundance of the alkaloids in diethyl ether extract of the blend of diester-aconite alkaloids with FMT. On the basis of the above results, we could conclude that FMT can restrain the dissolution of diester-alkaloids of RKM in diethyl ether, however, in absolute ethanol the effect was related to the amount of added FMT. Acid condition could also restrain the dissolution of diester-alkaloids in diethyl ether. **Conclusion:** Under low polarity condition, detoxification of FMT on RKM was through restraining the release of diester-alkaloids in diethyl ether. This research is significant for studying antidotal method of RKM as well as clarifying the mechanism of synergy of formula which contains both RKM and FMT.

[**Key words**] root of *Kusnezoffii* Monkshood; alkaloids; fruit of *Medicine Terminalia*; detoxification; electrospray ionization mass spectroscopy

草乌为毛茛科北乌头的干燥块根^[1],含有生物碱、有机酸、糖类^[2]、挥发油^[3]等成分,其中生物碱成分既是其主要药效物质^[4-5],又是其毒性来源^[6],其结构分为5类,胺醇型、单酯型、双酯型、三酯型和脂型^[7],其中双酯型和三酯型生物碱的毒性最强^[8-9]。诃子为使君子科植物诃子的干燥成熟果实,含有大量酸性成分^[10-11]。蒙古族医药理论认为诃子对草乌有解毒作用,有采用诃子汤炮制草乌的方法^[12],有制草乌(诃子汤炮制)与诃子等药材配伍主治风湿、关节疼痛及腰腿疼痛的蒙古族药复方——那如三味丸^[13],其制剂工艺十分简单,仅是方中各味药材的粉末直接混合而成,并无煎煮提取的过程,这在含有有毒药材的中药复方中是不多见的。对于中药复方,通过比较有毒药材单煎液与配伍共煎液中有毒成分的含量变化来阐述其配伍减毒机制是目前较常用的方法^[14],但这仅适用于制剂工艺中存在煎煮过程的中药复方,而对于制剂工艺简单,仅由药材粉末直接混合而成的某些蒙古族药复方则不适用。因此为了探究蒙古族医理论中诃子对草乌的解毒作用,本研究采用有机试剂超声提取法,结合电喷雾质谱检测技术开展实验,拟揭示诃子对草乌解毒作用的科学内涵。本研究结果对于解释一些蒙古族成药制剂工艺及配伍的合理性具有一定的科学意义,同时为诃子对草乌解毒机制的进一步深入研究提供参考依据。

1 材料

LCQ型电喷雾质谱仪(美国 Finnign 公司)。草乌(呼和浩特市药店),经长春中医药大学王淑敏教授鉴定为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* 的干燥根。乙醚、乙酸、无水乙醇(分析纯,北京化工厂),甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司)。

2 方法与结果

2.1 草乌提取液及草乌-诃子共提液的制备 精密

称定草乌药材粉末1 g,置于具塞锥形瓶中,加入乙醚10 mL 超声提取3次,30 min/次,将提取液过滤后合并,滤液挥干溶剂后用甲醇-乙醚(1:1)定容至2 mL,得草乌乙醚提取液。

精密称定草乌药材粉末1 g,置于具塞锥形瓶中,加入乙醚9 mL 与乙酸1 mL 超声提取3次,30 min/次,将提取液过滤后合并,滤液挥干溶剂后用甲醇-乙醚(1:1)定容至2 mL,得草乌酸性乙醚提取液。

精密称定草乌药材粉末1 g,置于具塞锥形瓶中,加入无水乙醇10 mL 超声提取3次,30 min/次,将提取液过滤后合并,滤液挥干溶剂后用甲醇-无水乙醇(1:1)定容至2 mL,得草乌无水乙醇提取液。

精密称定1 g 草乌药材粉末5份,分别按草乌-诃子质量比为1:0.5,1:1,1:2,1:3,1:5加入诃子药材,置于具塞锥形瓶中,加入10倍量乙醚超声提取3次,30 min/次,将提取液过滤后合并,滤液挥干溶剂后用甲醇-乙醚(1:1)定容至2 mL,得草乌与不同比例诃子配伍的乙醚共提液。

精密称定草乌药材1 g 与诃子药材2 g,共同置于具塞锥形瓶中,加入10倍量无水乙醇超声提取3次,30 min/次,将提取液过滤后合并,滤液挥干溶剂后用甲醇-无水乙醇(1:1)定容至2 mL,得草乌-诃子(1:2)无水乙醇共提液。

2.2 草乌药材提取液及草乌-诃子药材共提液中生物碱质谱检测

2.2.1 质谱条件 电喷雾离子源,毛细管温度200 ℃,喷雾电压4.5 kV,离子透镜补偿电压5 V,碰撞能20%~24%,鞘气(氮气),流速13.2 L·min⁻¹,毛细管电压-7 V,注射泵流速5 mL·min⁻¹。

2.2.2 草乌乙醚提取液 吸取草乌乙醚提取液10 μL,用甲醇稀释100倍后进行质谱检测,见图1。由

图 1 可以看出,草乌生药材中生物碱的 m/z 主要分布在 3 个区域,分别为 500 ~ 600,600 ~ 700,800 ~ 900,分别对应单酯型生物碱、双酯型生物碱、脂型生物碱。各类型生物碱的串联质谱数据详见表 1。将各生物碱的串联质谱数据与相关文献作对照^[15],推断草乌中的单酯型生物碱有去乙酰乌头碱(m/z 586)、去乙酰去氧乌头碱(m/z 570),双酯型生物碱有乌头碱(m/z 646)和 3-去氧乌头碱(m/z 630),脂型生物碱有 8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱(m/z 866)和 8-棕榈酰-苯甲酰乌头原碱(m/z 842),各生物碱的

结构详见表 2。

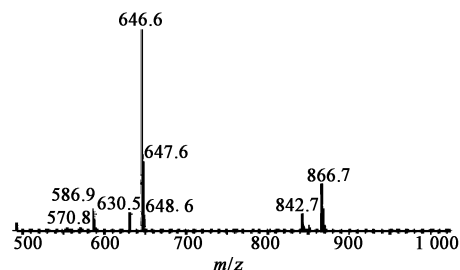


图 1 草乌乙醚提液中生物碱的电喷雾质谱

表 1 草乌乙醚提取液中生物碱的串联质谱数据

生物碱名称	MS ⁿ (m/z) 相对丰度/%	
	MS ² 谱	MS ³ 谱
去乙酰去氧乌头碱	537.95 (71.32), 510.01 (100), 478.00 (7.90), 352.00 (19.65)	478.82 (100), 459.98 (8.76), 446.99 (4.07), 388.01 (15.32)
去乙酰乌头碱	553.91 (42.42), 536.05 (21.00), 525.96 (100), 522.03 (4.46), 494.10 (9.43), 368.08 (9.98)	507.98 (6.40), 494.12 (100), 475.96 (8.96), 404.06 (15.98)
3-去氧乌头碱	598.16 (5.12), 570.06 (100), 538.03 (5.33)	537.89 (71.64), 509.99 (100), 478.18 (8.48), 352.00 (20.93)
乌头碱	614.17 (1.56), 586.01 (100), 554.21 (2.52), 526.13 (3.50)	554.09 (42.89), 536.07 (18.52), 526.00 (100), 494.12 (11.45), 368.06 (13.19)
10-羟基-中乌头碱	616.17 (5.36), 588.06 (100), 597.79 (9.88)	570.12 (7.17), 555.98 (78.45), 537.97 (72.56), 528.19 (100), 524.22 (16.96), 370.09 (25.22)
8-棕榈酰-苯甲酰乌头原碱	586.20 (100), 554.09 (4.93), 526.16 (10.86)	554.14 (37.25), 536.01 (18.56), 526.12 (100), 494.22 (13.45), 368.19 (1.37)
8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱	834.23 (2.19), 586.17 (100), 554.15 (10.94), 526.09 (5.92)	553.83 (11.04), 526.20 (100), 368.04 (7.33)

表 2 草乌药材中生物碱结构

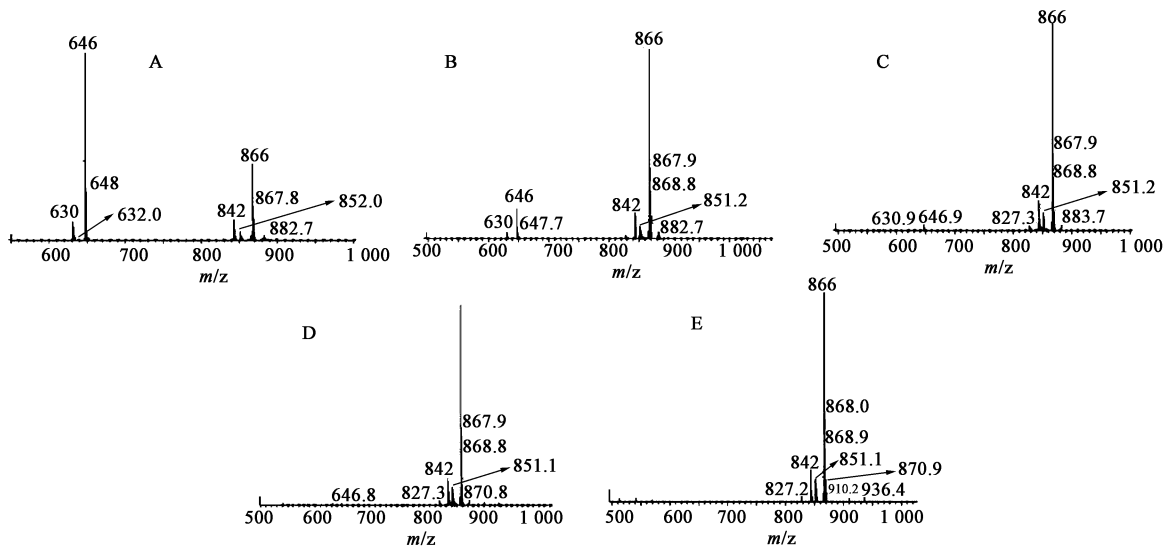
生物碱名称	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	[M + H] ⁺
去乙酰去氧乌头碱	Et	H	H	H	H	570
去乙酰乌头碱	Et	OH	H	H	H	586
3-去氧乌头碱	Et	H	OAc	H	OH	630
乌头碱	Et	OH	OAc	H	OH	646
10-羟基-中乌头碱	Et	OH	OAc	OH	OH	648
8-棕榈酰-苯甲酰乌头原碱	Et	OH	pal	H	OH	842
8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱	Et	OH	lino	H	OH	866

2.2.3 草乌-诃子乙醚共提液 分别吸取草乌-诃子不同比例混合的乙醚提取液 10 μ L,用甲醇稀释 100 倍后进行质谱检测,质谱图见图 2(A ~ E)。

比较图 2A 与图 1 中对应的相对丰度可以看出,当向草乌中加入 0.5 倍量诃子时,乙醚提取液中脂型生物碱的相对丰度整体提高,由于脂型生物碱

的毒性远低于双酯型生物碱^[17],因此可以初步推测诃子的加入可能对草乌有减毒作用,为了进一步考察这种作用与加入诃子量是否有关,作者又检测了草乌与不同量诃子混合时乙醚提取液中的生物碱成分。

当诃子与草乌等量混合时(图 2B),乙醚提取液



A. 草乌-诃子(1:0.5); B. 草乌-诃子(1:1); C. 草乌-诃子(1:2); D. 草乌-诃子(1:3); E. 草乌-诃子(1:5)
图 2 不同比例草乌-诃子乙醚共提液中生物碱的电喷雾质谱

中双酯型与脂型生物碱的相对丰度已发生了明显的改变,此时脂型生物碱已成为基峰被检测。

当向草乌中加入 2 倍量诃子时(图 2C),乙醚提取液中脂型生物碱仍为基峰被检测,而双酯型生物碱的相对丰度已由 16.7% 降低至 1.99%。

当向草乌中加入 3 倍量诃子时(图 2D),乙醚提取液中脂型生物碱仍为基峰被检测,在 m/z 600 ~ 700 区域几乎检测不到双酯型生物碱。

当向草乌中加入 5 倍量诃子时(图 2E),乙醚提取液中脂型生物碱仍为基峰被检测,在 m/z 600 ~ 700 区域已完全检测不到双酯型生物碱。

基于以上对图 2 的分析,可以初步推断,在乙醚提取液中,诃子对草乌有解毒作用,且这种作用随诃子加入量的增加而增强。

2.2.4 草乌酸性乙醚提取液 诃子中的化学成分主要为鞣质类酸性成分,为了进一步探究诃子对草乌的解毒作用,作者考察了酸性对草乌中生物碱在乙醚提取液中的影响。吸取 10 μL 草乌酸性乙醚提取液,用甲醇稀释 100 倍后进行质谱检测,得到的质谱见图 3。

在图 3 中,脂型生物碱作为基峰被检测,双酯型生物碱的相对丰度小于 5%,说明酸性可以降低草乌的毒性。

结合图 2 与图 3 的分析结果可以进一步推断,诃子中的酸性成分对草乌有解毒作用,其解毒的化学机制可能是诃子中的酸性成分抑制双酯型生物碱的溶出、与双酯型生物碱生成一种不易溶于乙醚的化合物,以及发生双酯型生物碱向脂型生物碱的

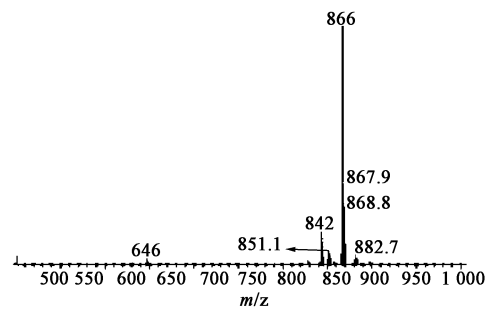


图 3 草乌酸性乙醚提液中生物碱的电喷雾质谱

转化。

为了进一步探讨诃子对草乌的解毒机制,本试验又对草乌与诃子混合物乙醚提取后的药渣,以及诃子双酯型生物碱部位的乙醚共提液进行了检测、分析。

2.2.5 草乌-诃子乙醚共提后药渣 将草乌、诃子混合物经乙醚提取后的药渣用乙醚清洗(为去除药渣表面残留的生物碱成分)后自然晾干,用无水乙醇超声 30 min,滤液用甲醇稀释后用于电喷雾质谱检测,结果见图 4。

表明药渣中的双酯型生物碱为基峰,且未发现新的化合物,由此排除了诃子中的酸性成分与双酯型生物碱结合生成不溶于乙醚的化合物的可能性。

2.2.6 双酯型生物碱部位与诃子混合前、后乙醚提取液 将草乌用乙醇超声提取,有机溶剂萃取纯化得到的双酯型生物碱部位(图 5A)与诃子粉末混合,按 2.1 项下“草乌与诃子配伍后乙醚提取液的制备”方法提取,经电喷雾质谱检测,结果见图 5B。

与图 5A 相比,在图 5B 中未发现有新的生物碱

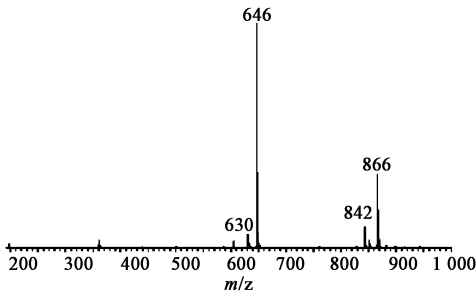


图4 草乌-诃子乙醚共提后药渣中生物碱的电喷雾质谱

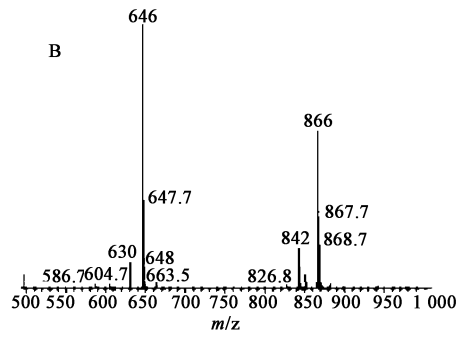
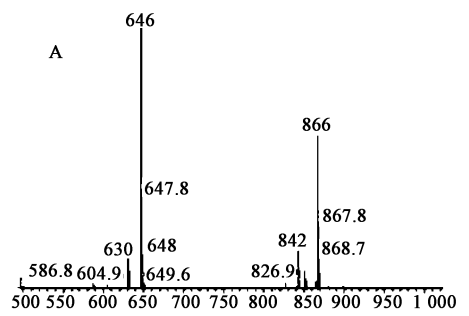


图6 草乌、诃子配伍前(A)、后(B)无水乙醇提取液中生物碱的电喷雾质谱

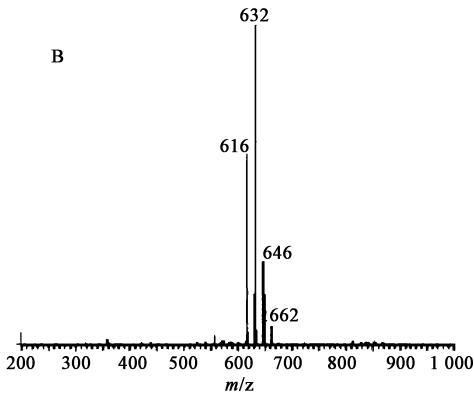
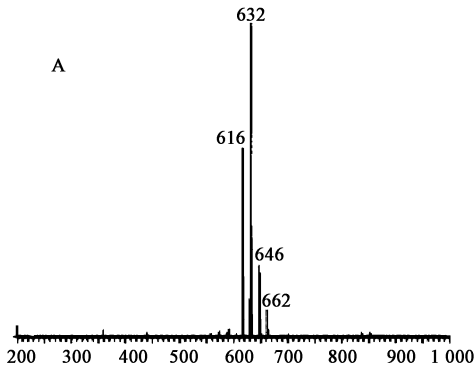


图5 双酯型生物碱与诃子混合前(A)、后(B)乙醚提取液中生物碱的电喷雾质谱

对草乌的解毒作用。

3 讨论

由以上试验结果可以初步得出以下结论,在低极性环境中,诃子通过抑制双酯型生物碱的溶出对草乌起到解毒作用,并且这种作用与加入的诃子量呈正相关;诃子对草乌解毒的化学物质基础可能是其中的鞣质类酸性成分,尚有待进一步试验研究。以上结论对于解释含有草乌、诃子的蒙古族成药的制剂工艺合理性具有一定的指导意义,对含有乌头类药材缓释制剂的开发研究及安全性考察具有一定的参考价值,本研究方法适用于制剂工艺仅为药材粉末直接混合而成的各种蒙古族成药复方的配伍机制研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:220.
- [2] 杨淳彬, 邓美彩, 董玮玮, 等. 细叶草乌的化学成分研究[J]. 应用与环境生物学报, 2009(3):323.
- [3] 赵英永, 崔秀明, 戴云, 等. 草乌药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13):1056.
- [4] Logan J Voss, Janet M Voss, Lance Mc Leay, et al. Aconitine induces prolonged seizure-like events in rat neocortical brain slices [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 584(2/3):291.
- [5] Zhang J M, Liao W, He Y X, et al. Study on intestinal absorption and pharmacokinetic characterization of diester diterpenoid alkaloids in precipitation derived from

生成,说明诃子的存在不能使双酯型生物碱向脂型生物碱转化,由此排除了双酯型生物碱向脂型生物碱转化的可能性。

2.2.7 草乌无水乙醇提取液 为了考察诃子对草乌的解毒作用是否仅发生于乙醚提取液中,作者选用高极性的无水乙醇作为提取溶剂开展了同样的试验。吸取草乌无水乙醇提取液、草乌-诃子无水乙醇共提液 10 μ L,分别用甲醇稀释 100 倍后进行质谱检测,结果见图 6。

图 6A,6B 中各生物碱的种类与相对丰度基本一致,说明用无水乙醇提取时,诃子的存在对生物碱的含量无影响,即采用无水乙醇作为提取溶剂时,诃子对草乌无解毒作用。由此推断诃子对草乌的解毒作用与提取溶剂体系有关,低极性环境有助于诃子

不同炮制工艺山绿茶药材特征图谱的比较

谢臻¹, 张龙², 陈勇^{1*}, 郑锡任¹, 李耀华¹, 农莉¹, 刘鼎¹, 李怡萱¹

(1. 广西中医药大学 药学院, 南宁 530001; 2. 柳州市人民医院, 广西 柳州 545006)

[摘要] 目的:采用 HPLC 研究不同炮制工艺山绿茶药材特征图谱的变化,为科学评价和控制其质量提供有效的方法。方法:以 70% 乙醇为提取溶剂,采用加热回流的方法提取制备供试样品。以 Phenomenon C₁₈ 色谱柱为固定相,流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱,检测波长 330 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹,进行 HPLC 特征图谱检测。以芦丁为对照品,检测不同炮制工艺山绿茶药材中芦丁含量变化。结果:不同炮制工艺药材中共确定 9 个主要共有特征峰。研究发现特征图谱中主要色谱峰发生了显著改变,与炮制前相比峰面积显著降低。表明山绿茶药材经炮制处理后,主要化学成分含量明显减少。结论:该 HPLC 特征图谱检测方法重复性、精密度良好,可用于山绿茶药材及其炮制品的质量控制。

[关键词] 山绿茶; 炮制工艺; 芦丁; 特征图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0056-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230056

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1521.003.html>

[网络出版时间] 2014-10-27 15:21

[收稿日期] 20140609(008)

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81060344);广西自然科学基金创新研究团队项目(2011GXNSFF018006)

[第一作者] 谢臻,博士,副教授,硕士生导师,从事中药质量控制、复方配伍研究,E-mail:xie_zhen@126.com

[通讯作者] * 陈勇,教授,硕士生导师,从事中药质量分析教学与科研工作,Tel:18978947922,E-mail:cy6381@163.com

Fuzi-Gancao herb-pair decoction for its potential interaction mechanism investigation [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(1):128.

[6] Thomas Y K Chan. Aconite poisoning following the percutaneous absorption of *Aconitum alkaloids* [J]. Forensic Sci Int, 2012, 223(1/3):25.

[7] 王勇, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 草乌花及其煎煮液中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究[J]. 药学学报, 2003, 38(4):290.

[8] Dezső C, Eva M W, István Z, et al. Qualitative and quantitative analysis of aconitine-type and lipo-alkaloids of *Aconitum carmichaelii* roots [J]. J Chromatogra A, 2009, 1216(11):2079.

[9] Bisset N G. Arrow poisons in China part ii *Aconitum*-botany, chemistry, and pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 1981, 4(3):247.

[10] 阳小勇, 唐荣平. 诃子化学成分的研究[J]. 西昌学院学报:自然科学版, 2012, 26(2):65.

[11] Beate P, Samy K E D, William E H, et al. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities [J]. Phytochemistry, 2010, 71(10):1132.

[12] 杨红霞, 杜玉枝, 肖远灿, 等. 诃子制草乌的炮制工艺研究[J]. 华西药学杂志, 2011, 26(6):572.

[13] 满都拉, 富玉兰. 蒙药那如三味丸离子透入治疗三叉神经痛 17 例临床观察[J]. 中国民族民间医药杂志, 2002, 5(5):287.

[14] 越皓, 皮子凤, 宋凤瑞, 等. 附子不同配伍药对中生生物碱成分的电喷雾质谱分析[J]. 药学学报, 2007, 42(2):201.

[15] Yue H, Pi Z F, Song F R, et al. Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum carmichaelii* Debx. by HPLC/ESIMS/MSn [J]. Talanta, 2009, 77(3):1800.

[16] 刘文龙, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 乌头类双酯型生物碱组分转化为单酯水解型及脂型生物碱组分的研究 [J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(3):717.

[责任编辑 顾雪竹]