

附子及其炮制品中生物碱类成分的 ESI-MSⁿ 研究

李启艳¹, 朱日然^{2*}, 张学顺², 程明², 黄超³

(1. 山东省药品检验所, 济南 250010; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250012;
3. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的与方法: 采用电喷雾质谱方法(ESI-MS)分析附子炮制前后生物碱在种类和含量方面的变化。结果与结论: 附子中的生物碱类成分在电喷雾质谱条件下可形成结构相似质子化分子, 因而具有相似电离能力, 利用离子峰的相对丰度可以近似地反映同类生物碱的相对含量的特点, 通过添加结构相似的内标化合物, 对附子及其炮制品的生物碱类成分进行比较, 找出其变化规律, 揭示不同炮制方法对附子减毒作用的机制。

[关键词] 附子; 炮制方法; 电喷雾串联质谱; 双酯型生物碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0090-04

Analysis of Alkaloids in Aconite Roots and Its Processed Products by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)

LI Qi-yan¹, ZHU Ri-ran^{2*}, ZHANG Xue-shun², CHENG Ming², HUANG Chao³

(1. Shandong Institute for Drug Control, Jinan 250010, China;
2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250012, China;
3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** The content and categories of alkaloids in the unprocessed and processed aconite roots were studied by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Alkaloids could become protonated molecular with similar ionization efficiency under ESI-MS for their similar structures. Relative content of alkaloids with similar structure could be approximatively detected by the ion abundance, the method was established to compare alkaloids in aconite roots and its processed products with internal standard and to reveal the mechanism of toxin reducing effect of variously processed products.

[Key words] aconite roots; processing method; ESI-MS; diester diterpenoid alkaloids

附子所含的乌头碱、新乌头碱和次乌头碱等双酯型生物碱经加工炮制后可转化为其他生物碱, 从而减小毒性。附子的毒性与炮制方法有关, 但目前没有科学的、量化的质量标准。本实验利用电喷雾质谱(ESI-MS)分析生附子及其炮制品中的生物碱类成分, 电喷雾串联质谱具有软电离、高灵敏度和特异性强等优点。附子中的生物碱类成分在电喷雾质

谱条件下可形成质子化分子。由于结构相似, 该类化合物分子的电离能力相似, 离子峰的相对丰度可以近似地反映同类生物碱的相对含量, 所得数据具有很好的可重复性。通过添加结构相似的内标化合物, 对附子及其炮制品的生物碱类成分进行比较, 找出其变化规律^[1]。

[收稿日期] 2011-02-28

[第一作者] 李启艳, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药及中成药的质量控制, Tel: 15253118118

[通讯作者] * 朱日然, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药新药研发, Tel/Fax: 0531-68617910, 13953182672, E-mail: zhuriran@sina.com

1 实验方法

1.1 材料 Agilent 1200 LC-MSD TRAP SL 6310 型液质联用仪(美国安捷伦);SK5200H 型超声波提取仪(上海科导超声仪器有限公司);XW-80A 型漩涡混合器(上海精科实业有限公司);SENCOR-205 型旋转蒸发仪(上海申顺生物科技有限公司)。

乌头碱(批号 110720-200208)、新乌头碱(批号 110799-200404)、次乌头碱(批号 110798-200404)、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,苯甲酰乌头碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱对照品山东大学提供,纯度 >98%。乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。生附子购自山东省中药饮片厂。无胆熟附片(干片蒸制)、清水黑顺片、无胆熟附片(鲜片蒸制)、盐附子、无胆炮附片均为实验室自制。附子经山东省中医院张学顺教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Deb 的子根加工品。

1.2 液相色谱和质谱条件^[2,4]

1.2.1 液相色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);检测波长 235 nm,流动相乙腈-0.2% 冰醋酸(浓氨水调节 pH 为 7.29)(28:72)。

1.2.2 质谱条件 检测方式:正离子扫描;干燥器流速 12 L·min⁻¹,雾化室压强 55 psi,雾化器温度 350 °C,毛细管电压 4 000 V,扫描范围 100 ~ 800, Auto ms2 fragmentation Ampl 1.00 V, Cap exit 160.0 V, Smart target 30 000, Max Accu Time 200.0 ms。

1.3 内标溶液的制备 精密称取氢溴酸高乌甲素标准品 13.50 mg,置 10 mL 量瓶,加 0.01% 盐酸-甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶,加 0.01% 盐酸-甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(质量浓度 13.5 mg·L⁻¹)。

1.4 供试品溶液的制备^[5] 取待测样品粉末(过 40 目筛)2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 10% 氨水 2 mL,浸润,精密加入无水乙醚 50 mL,超声提取 30 min,取出过滤,并用 15 mL 无水乙醚分 3 次冲洗药渣,合并滤液,置 50 °C 水浴挥干乙醚,用 0.01% 盐酸-甲醇溶解转移至 10 mL 量瓶中,定容至刻度。将所得样品用 0.01% 盐酸-甲醇稀释 25 倍,精密量取 1 mL 与内标化合物等体积混合。涡旋混合均匀后,微孔滤膜滤过得供试品溶液。

2 结果

2.1 生附子的 ESI-MSⁿ 分析 按 1.2 项下实验条件

进样后,对所得实验结果进行分析。图 1 是生附子的电喷雾平均质谱图。从图中可以看到生附子中主要的生物碱类成分。通过标准品的串联质谱和供试品的串联质谱的比较,可以确定 [M + H]⁺ 为 616, 632, 646, 590, 604, 574 的生物碱分别为次乌头碱(hypaconitine, [M + H]⁺ = 616)、新乌头碱(mesaconitine, [M + H]⁺ = 632)、乌头碱(aconitine, AC, [M + H]⁺ = 646)、苯甲酰新乌头原碱(benzoylmesaconine, [M + H]⁺ = 590)、苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine, [M + H]⁺ = 604)、苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine, [M + H]⁺ = 574)。根据串联质谱数据和文献报道,可以推论 [M + H]⁺ 为 454, 438, 468, 588, 556 的生物碱离子^[2] 分别为附子灵(fuziline, [M + H]⁺ = 454)、尼奥灵(neoline, [M + H]⁺ = 438)、脱水中乌头碱([M + H]⁺ = 468)、脱氧乌头次碱([M + H]⁺ = 588)、焦乌头碱(pyraconitine, [M + H]⁺ = 586)。内标化合物为氢溴酸高乌甲素(1appaconitine, [M + H]⁺ = 585, C₃₂H₄₄N₂O₈)。

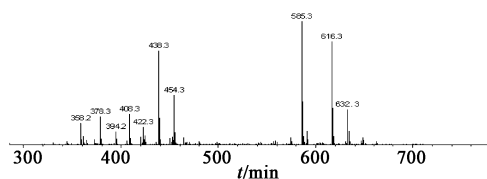


图 1 生附子单煎液 10 min

2.2 生附子、附子皮以及炮附子中 12 种生物碱类成分的相对含量比较 按上述实验条件进样后,得到生附子、附子皮、无胆熟附片(干片)、清水黑顺片、无胆熟附片(鲜片)、盐附子、无胆炮附片的平均质谱图。由于结构、电离能力相似,离子峰的相对丰度可以近似地反映同类生物碱的相对含量,所得数据具有很好的可重复性。把 11 种生物碱类成分的离子相对丰度与内标化合物氢溴酸高乌甲素的相对丰度进行比较,得到附子生品与炮制品中生物碱的相对含量。平均质谱图见图 2 ~ 10。样品相对含量见表 1。

3 讨论^[6-7]

本实验采用电喷雾质谱法考察了生附子、附子皮及 6 种炮制品中生物碱类成分的相对含量。实验中所用附子的炮制品均为本实验室采用四川江油产生附子自制而得,故具有较强的可比性。

实验结果表明,2 种生附子中 3 种双酯型生物

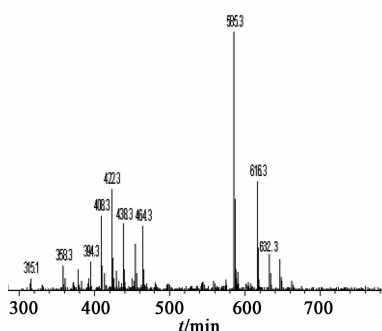


图 2 干片蒸制无胆熟附片(统片)

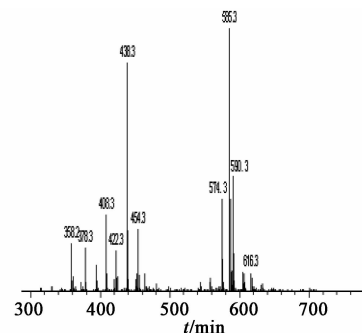


图 6 干片蒸制无胆熟附片(中张)质谱

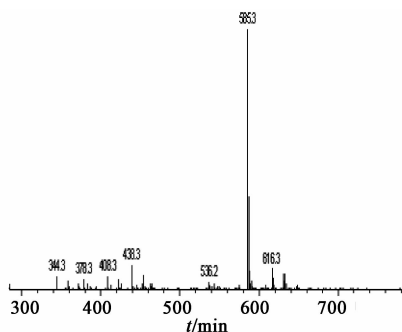


图 3 鲜片蒸制无胆熟附片质谱

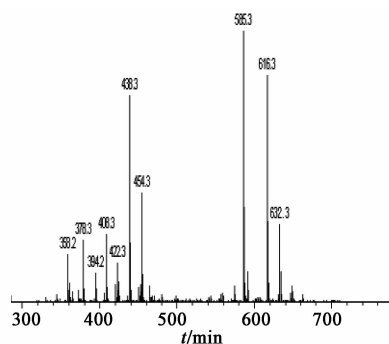


图 7 生附子(四川江油)质谱

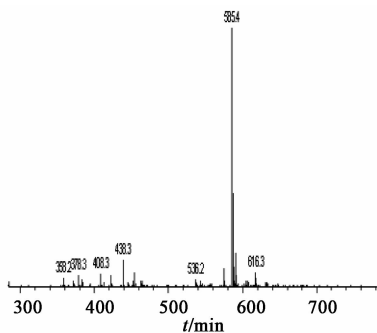


图 4 盐附子质谱

性均较低。

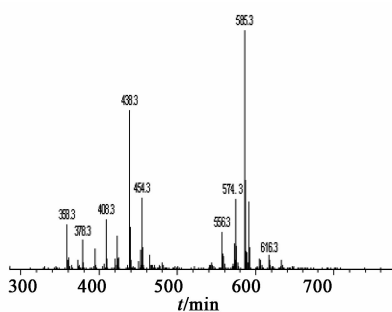


图 5 无胆炮附片质谱

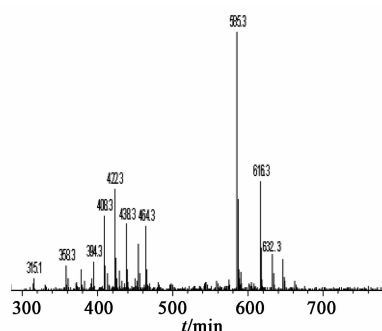


图 8 生附子(陕西)质谱

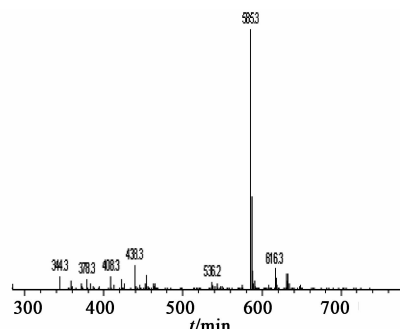


图 9 附子皮(四川江油)质谱

碱乌头碱(m/z 646)、新乌头碱(m/z 632)、次乌头碱(m/z 616)的含量较高,明显高于附子皮和 6 种炮制品,单酯型生物碱的含量低于 6 种炮制品;附子皮中双酯型生物碱的含量与炮制品相近,单酯型生物碱的含量远低于 6 种炮制品,表明附子皮的药效和毒

6 种炮制品中,盐附子、清水黑顺片中,双酯型生物碱的含量明显低于生品,单酯型生物碱含量与生品相近;乌头碱(m/z 646)和新乌头碱(m/z 632)基本检测不到,苯甲酰乌头原碱(m/z 604)、苯甲酰新乌头原碱

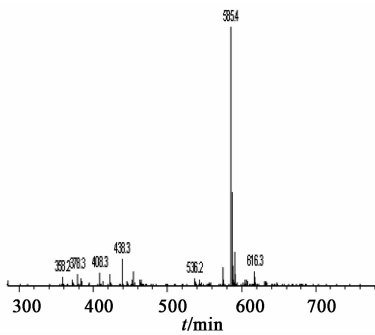


图10 清水黑顺片谱

表1 生附子及炮制品中生物碱类成分的相对含量(内标物丰度为100)

生物碱	<i>m/z</i>	干片蒸制		盐附子	干片蒸制		生附子 (四川江油)	生附子 (陕西)	附子皮	清水 黑顺片
		无胆熟附片 (统片)	鲜片蒸制 无胆熟附片		无胆炮附片	无胆熟附片 (中张)				
乌头碱	646	0.5	0	0	0	0	5.2	10.9	0.9	0
新乌头碱	632	5.1	0	0	3.7	2.5	31.6	13.1	3.9	0.9
次乌头碱	616	5.2	11.9	0.7	4.9	8.2	84.9	41.9	9.6	5.0
苯甲酰乌头原碱	604	7.8	11.6	2.4	4.3	7.2	5.6	2.3	0	2.3
苯甲酰新乌头原碱	590	34.0	51.1	7.7	27.9	44.1	10.8	6.6	3.1	12.6
苯甲酰次乌头原碱	574	28.8	49.9	5.4	30.9	35.5	1.8	3.6	1.5	6.8
附子灵	454	29.6	27.3	4.1	30.0	23.9	40.1	17.6	5.1	5.4
尼奥灵	438	66.2	68.5	10.1	66.2	86.8	76.3	25.2	9.5	9.9
脱水中乌头碱	468	1.7	2.0	0	1.6	1.5	2.0	2.1	0	0
脱氧乌头次碱	588	5.4	9.4	2.1	6.8	6.8	2.8	4.2	2.1	1.9
焦乌头碱	556	1.4	2.2	0	16.4	3.3	2.6	0	0.8	0

(*m/z* 590)、苯甲酰次乌头原碱(*m/z* 574)、附子灵(*m/z* 454)、尼奥灵(*m/z* 438)的含量也明显低于其他炮制品,焦乌头碱(*m/z* 556)的含量为零。其减毒机理可能由于盐附子和黑顺片炮制过程中均需加水长时间漂洗和蒸煮,导致生物碱在煎煮过程中发生热解或水解反应被破坏,或生成相应的热解产物。

干片蒸制无胆熟附片、鲜片蒸制无胆熟附片及无胆炮附片中的双酯型生物碱含量明显低于生品,但单酯型生物碱含量明显高于生品。其减毒机理

可能由于双酯型生物碱在炮制过程中水解生成单酯型生物碱。

此外,实验中我们发现,附子的炮制方法对生物碱类成分的含量有明显影响。盐附子、清水黑顺片炮制过程中均加入食用胆巴,故在双酯型生物碱含量降低的情况下,单酯型生物碱的含量亦未增加,可能加入食用胆巴有促进生物碱类成分水解的作用;干片蒸制无胆熟附片、鲜片蒸制无胆熟附片及无胆炮附片中双酯型生物碱含量降低,单酯型生物碱的含量增加,说明在炮制过程中双酯型生物碱发生水解,转化生成成单酯型生物碱。

4 结语

附子的主要成分为乌头生物碱类,药理研究表明,双酯型乌头碱毒性最强,主要为神经毒性和心脏毒性两个方面。临床应用乌头类药物必须经过炮制,即将其中双酯型二萜生物碱水解为苯甲酰单酯型和醇胺型二萜生物碱。苯甲酰单酯型乌头碱毒性较小,乌头原碱类毒性很弱或几乎无毒性。乌头碱的水解产物比较复杂,因此研究清楚其水解产物会对乌头类中药的炮制提供更多的监控指标,来防止炮制不足或过度,使附子能够发挥最大的治疗作用,

减小其毒副作用。

[参考文献]

- [1] 皮子凤,越皓,宋凤瑞,等. 附子与不同药味药材配伍后乌头碱类生物碱的电喷雾质谱研究[J]. 中草药, 2008, 39(10): 595.
- [2] 王勇,刘志强,宋凤瑞,刘淑莹. 附子配伍原则的电喷雾质谱研究[J]. 药学报, 2003, 38(6): 451.
- [3] 朱林平,李志强,李侠. 附子、半夏配伍研究[J]. 中成药, 2007, 29(12): 63.
- [4] 越皓,皮子凤,赵宇峰,等. 电喷雾串联质谱分析附子炮制中的化学成分变化[J]. 分析化学杂志, 2007, 35(7): 959.
- [5] 包懿,凤瑞,刘志强,等. 乌头碱类双酯型二萜生物碱水解反应的电喷雾质谱分析[J]. 质谱学报, 2009, (1): 572.
- [6] 刘秀秀,晁若冰. 反相离子对色谱法测定附子中生物碱成分[J]. 药学报, 2006, 41(5): 365.
- [7] 刘芳,于向红,李飞,等. HPLC测定附子及其炮制品中3种双酯型生物碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(14): 63.

[责任编辑 蔡仲德]