

传统中药川乌炮制前后的离子阱质谱研究

董昕¹,刘敏²,赵靖霞¹,张薇¹,娄子洋¹ (1.第二军医大学药学院分析测试中心,上海 200433; 2.南京军区联勤部药品仪器检验所,江苏南京 210002)

摘要 目的:通过应用电喷雾-离子阱质谱,研究了炮制前后的川乌药材成分,以揭示川乌炮制减毒的原理。方法:对3种乌头对照品进行了离子阱多级质谱分析,归纳其裂解规律。对炮制前后的川乌药材进行液-质联用分析,并对各色谱峰进行归属。结果:通过对比炮制前后的质谱总离子流图及紫外色谱图,提出了川乌炮制减毒的两方面原因。结论:同时指出了将液-质联用技术引入中药炮制品的质量控制是十分必要的。

关键词 川乌;离子阱质谱;炮制品

中图分类号:R927 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)05-0349-03

Research on constituents of Radix Aconiti and its processing by electrospray ionization trap mass spectrometry

DONG Xin¹, LU Min², ZHAO Jing-xia¹, ZHANG Wei¹, LOU Zi-yang¹ (1. Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, the Second Military Medical University, SHANGHAI 200433, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control of Nanjing Command, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT Objective: To reveal the processing principle of preparation of *Radix Aconiti* by electrospray ionization trap mass spectrometry. **Methods:** The three reference standards were made MSn analysis and elucidating the fragmentation pathways. The rapid analysis by HPLC-ESI/MS had been used for identification of constituents in *Radix Aconiti*. **Results:** The comparison of mass spectra and liquid chromatographic information revealed the differences of *Radix Aconiti* and its process product. **Conclusion:** It is necessary to make quality control of process product of traditional Chinese herbal medicines by HPLC-ESI/MS.

KEY WORDS *Radix Aconiti*; electrospray ionization trap mass spectrometry; process product

川乌为毛茛科植物乌头 (*Aconitum camichaeli* Debx) 的干燥母根,性辛、苦、热,有大毒。归心、肝、肾、脾经,祛风除湿,温经止痛,用于风寒湿痹,关节疼痛,心腹冷痛,寒疝作痛,麻醉止痛。但川乌的治疗剂量与中毒剂量很接近,用药不慎极易产生毒副作用,导致严重的心律失常与休克,甚至中度致死,所以在用药中一般使用川乌的炮制品。《中国药典》2005版一部^[1]中叙述的川乌炮制方法为:取川乌,大小个分开,用水浸泡至内无干心,取出,加水煮沸 4~6 h(或蒸 6~8 h)至取大个及实心者切开内无白心,口尝微有麻舌感时取出。晾至六成干,切片,干燥。该方法采用煮后口尝的感觉来判定炮制是否合格显然缺乏客观、科学的依据。

川乌中的主要化学成分为双酯型 C-19二萜类生物碱,同时也含有少量的单酯型生物碱、三酯型生物碱以及部分脂类生物碱^[2,3]。其中双酯型 C-

19二萜类生物碱是其主要的药效成分,但同时也是毒性成分,它的 C-8羟基乙酰化, C-14-a-OH 芳酰化都呈现出强烈的毒性^[4~7]。关于川乌的炮制原理有两种说法:一是通过水煮加热使 C-8上的乙酰基和 C-14上的苯甲酰基分别水解,使其毒性降低;另一种说法是脂肪酰基取代了 C-8上的乙酰基生成酯碱,使毒性降低^[8]。本研究通过电喷雾-离子阱质谱对炮制前后川乌的有关成分进行研究,旨在通过分析炮制前后川乌成分的变化,来揭示其炮制的原理并为川乌炮制品的质量控制提供科学、可控的依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 离子阱质谱:美国 Thermo Fisher 公司的 LCQ 型液相色谱-质谱联用仪,配有 FINNIGAN LCQ Deca XP MAX 型离子阱质谱仪,ESI 离子源, SURVEYOR 系列液相色谱仪, Xcalibur 数据处理软件。KUDOS SK2200H 型超声器(上海科导超声仪器公司)。METTLER AE240 型电子天平(瑞士梅

作者简介:董昕(1981-),男,助教。Tel: (021) 81871337, E-mail: dongxin@smmu.edu.cn

通讯作者:娄子洋。Tel: (021) 81871335, E-mail: louziyang@126.com

特勒托利多公司)。

川乌药材(安徽亳州亚珠药业有限公司,批号:20041201);对照品[中乌头碱(200404)、乌头碱(200410)和次乌头碱(9403)],均购自中国药品生物制品检定所。甲醇(Fisher公司,色谱醇);磷酸(上海试剂四厂,分析纯);氨水(050324)(上海精化科技研究所平湖化工试剂厂,分析纯);水为纯化水。

1.2 色谱条件与质谱条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax 80A Extend-C₁₈ 柱(5 m, 4.6 mm × 250 mm, Agilent)。流动相:A为甲醇,B为0.1%氨水(磷酸调 pH = 9.0 ± 0.2),梯度洗脱:0~10 min, 35%~60% A; 10~40 min, 60%~75% A。流速:1.0 mL/min,柱温:30℃,检测波长:235 nm。

1.2.2 质谱条件 正离子模式,电喷雾电压 5.3 kV;气帘电压 45 arbitrary units;辅助气压力 10 units;毛细管温度 350℃;毛细管电压 33 kV;漂移管电压 55 V。在全扫描质谱分析中,采集质荷比范围在 50~1500 之间的离子。碰撞诱导解离能调整至 20%~50%。

1.3 溶液的制备

1.3.1 对照品的制备 精密量取中乌头碱、乌头碱、次乌头碱适量,用甲醇溶解稀释制成对照品溶液。

1.3.2 川乌药材溶液的制备 将川乌药材过 30 目筛,取其粉末约 2 g,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,加入氨试液 2 mL 浸润,再加 25 mL 乙醚,浸泡 12 h,滤过,少量乙醚洗涤滤渣后挥干乙醚,残渣用甲醇定容至 5 mL,0.45 L 微孔滤膜过滤,即得。

1.3.3 川乌药材的炮制 将生川乌用水浸泡 7 d,浸泡后隔水蒸 6 h,取出后在常温 24 h 晾干,粉碎。

2 试验与分析

2.1 乌头对照品的质谱分析 分别对 3 个乌头对照品进行离子阱质谱分析,由图 1 可见,3 个对照品的基峰都为其准分子离子峰,但均有 2 个丰度较高的碎片峰。如:中乌头碱的准分子离子峰为 632,但可见 572 和 540 的碎片峰;乌头碱的准分子离子峰为 646,但可见 586 和 554 的碎片峰;次乌头碱的准分子离子峰为 616,但可见 556 和 524 的碎片峰。在基峰为 [M + H]⁺ 的情况下,但均可见 [M + H - 60]⁺ 和 [M + H - 60 - 32]⁺ 的碎片峰,即丢失了 CH₃COOH 和 CH₃OH。

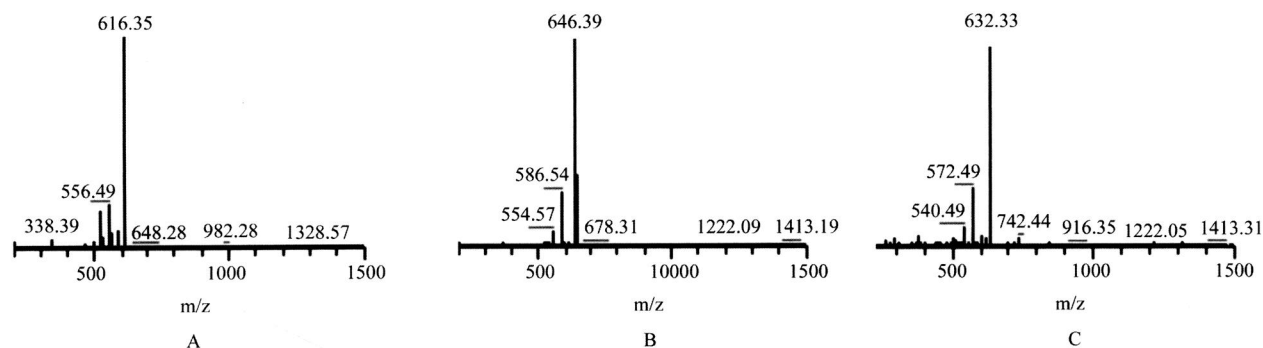


图 1 乌头对照品质谱图

A 次乌头碱; B 乌头碱; C 中乌头碱

2.2 川乌药材炮制前后的质谱分析 将川乌药材及其炮制后产物,按 1.2 项下条件进行液-质联用分析。首先根据 3 个对照品的保留时间,确定其位置,而后根据相关文献^[9-12]依次确定各峰的归属。从表 1,2 可以看出,其中丰度较大的峰主要为双酯或三酯型生物碱,如:17 号峰乌头碱、15 号峰中乌头碱、18 号峰次乌头碱、19 号峰去氧乌头碱、16 号峰 10-OH 乌头碱、13 号峰北乌碱和 20 号峰全乙酰乌头碱。其次为上述生物碱脱去乙酰基及苯甲酰基的产物,如:1 号、2 号、3 号、6 号、7 号等,还有一些上述生物碱脱去甲醇和乙酸的产物,如:12 号,最后是

各原碱依次脱去水或甲氧基的产物,如:4 号、5 号、8 号等。

2.3 川乌药材炮制前后的质谱总离子流分析 对比川乌药材炮制前后的质谱总离子流图可以看到明显的区别,见图 2。炮制前的质谱图峰多且强度较大,炮制后峰减少且强度均有较大程度的降低,只有 6 号和 7 号峰较炮制前强度上有所提升。这说明在炮制前的生川乌样品中双酯及三酯型生物碱是主要成分,含量较高,虽然也含有其水解或脱去各官能团的产物,但含量较低只是次要成分。而经过炮制的川乌样品中双酯及三酯型生物碱的

含量急剧降低,有些成分甚至丢失,而其他成分的含量下降程度都较低,其中苯甲酰中乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱的量反而较炮制前有提升。这表明在炮制过程中,双酯及三酯型生物碱都发生了水解反应,脱去了乙酰基和苯甲酰基,其中脱去乙酰基是主要反应,生成了 C-14 位芳酰化的单酯型生物碱及原碱。而由毒性较高的双酯及三酯型生物碱转化为毒性低的单酯型生物碱及原碱正式川乌炮制减毒的过程。

表 1 生川乌中有关成分的准分子离子

峰号	化合物名称	MS (m/z)
1	中乌头原碱	486
2	乌头原碱	500
3	去氧乌头原碱	484
4	中乌头原碱脱水	468
5	次乌头原碱脱水	452
6	苯甲酰中乌头原碱	590
7	苯甲酰次乌头原碱	574
8	去氧乌头原碱脱甲氧基	454
9	未知	394
10	中乌头原碱脱水再脱甲氧基	438
11	乌头原碱脱水再脱水	464
12	中乌头碱脱甲醇	600
13	北乌碱	648
14	未知	700
15	中乌头碱	632
16	10-OH 乌头碱	662
17	乌头碱	646
18	次乌头碱	616
19	去氧乌头碱	630
20	全乙酰乌头碱	772

表 2 制川乌中有关成分的准分子离子

峰号	化合物名称	MS (m/z)
1	中乌头原碱	486
2	乌头原碱	500
3	去氧乌头原碱	484
4	中乌头原碱脱水	468
5	次乌头原碱脱水	452
6	苯甲酰中乌头原碱	590
7	苯甲酰次乌头原碱	574
8	去氧乌头原碱脱甲氧基	454
9	未知	394
10	中乌头原碱脱水再脱甲氧基	438
11	乌头原碱脱水再脱水	464
12	未知	358
13	未知	700
14	中乌头碱脱乙酸	572
15	乌头碱脱乙酸	586
16	次乌头碱	616
17	3-乙酰乌头碱脱 CO	660
18	全乙酰乌头碱	772

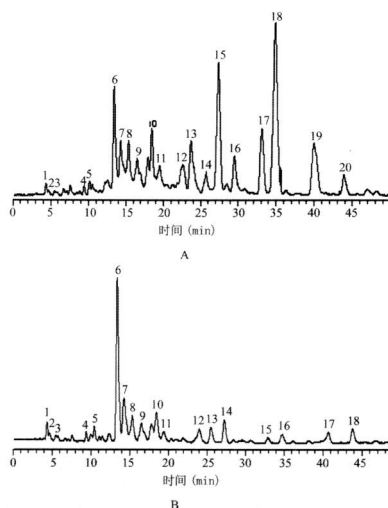


图 2 川乌炮制前后的质谱总离子流图
A 生川乌 ; B 制川乌

2.4 川乌药材炮制前后的紫外色谱图分析 在质谱分析的同时,我们也监测了川乌炮制前后的紫外色谱图,见图 3。由于川乌成分中苯甲酰基是产生紫外吸收的主要集团,所以在炮制前样品中 6号峰苯甲酰中乌头原碱、13号峰北乌碱、15号峰中乌头碱、17号峰乌头碱、18号峰次乌头碱及 19号峰去氧乌头碱都有较明显的紫外吸收。而炮制后 13、15、17、18号和 19号峰在紫外色谱图上基本消失了,6号峰苯甲酰中乌头原碱略有升高,而 7号峰苯甲酰次乌头原碱有明显升高。炮制前后紫外色谱图的变化也从一个侧面反映了川乌药材在炮制过程中成分的变化。

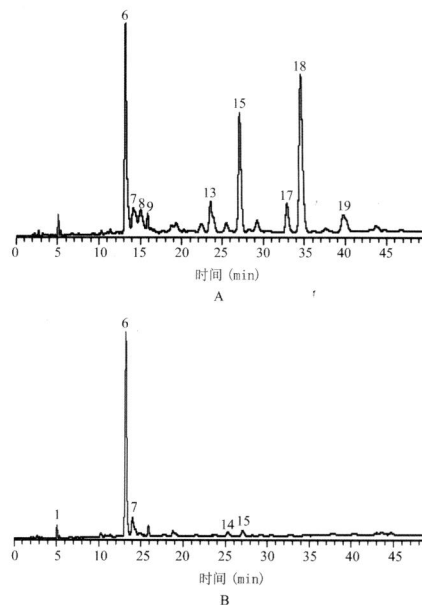


图 3 川乌炮制前后的紫外色谱图
A 生川乌 ; B 制川乌

3 讨论

3.1 关于川乌药材质谱图中各峰的认定,由于对照品较少,且离子阱质谱的测量精度有限,只是根据相关文献对各质谱峰做了初步的认定,准确程度还有待考察,尤其是一些较低分子量的物质,多是各原碱脱掉若干个水或CO的产物,对于脱水的位置和开环的位置还应进一步研究。

3.2 由川乌炮制前后的质谱分析可以看出,生川乌中双酯及三酯型生物碱是主要成分,但同时也含有单酯型生物碱、原碱及其它成分。炮制后,双酯及三酯型生物碱明显减少,单酯型生物碱有所升高,原碱类成分变化不大,这说明川乌炮制减毒的原因主要是将双酯及三酯型生物碱水解,尤其是使其脱掉乙酰基。但同时我们也发现,炮制后的样品在总体的质谱峰信息方面也明显少于炮制前,无论是峰数目还是强度都有较大程度的降低,不止是双酯及三酯型生物碱减少,其他成分的峰强度也有不同程度的降低,同时又没有新的物质出现,就总体而言,炮制后比炮制前的物质减少了。所以我们认为在水煮炮制的过程中由于水溶解及高温的原因,有相当一部分物质损失了,这也是炮制减毒的另一个原因。

炮制过程中损失了部分物质,虽然起到了减毒的效果,但同时也使药效成分有所流失,降低了疗效,所以希望能有新的炮制方法,在不损失成分的情况下,仅通过改变其化学结构来起到减毒的作用。

3.3 从本研究结果可见,将液质联用技术引入川乌炮制品的质量控制是十分有效和必要的。由于炮制前后川乌的质谱行为存在明显的差异,可采用类似中药指纹图谱的方法将川乌炮制前后的质谱总离子流图标准化,为其制定定性或半定量的

质控标准,用科学的方法取代仅凭“口尝”来判别炮制程度的方法。

参考文献:

- [1] 中国药典 2005版一部 [J]. 2005: 164.
- [2] 王勇,刘淑莹. 乌头碱类生物碱的质谱研究进展 [J]. 质谱学报, 2002, 23(2): 112.
- [3] 李正邦,吕光华,陈东林,等. 草乌中生物碱的化学研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1997, 9(1): 91.
- [4] 许庆轩,王勇,刘志强,等. 草乌中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究 [J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(4): 638.
- [5] 王勇,宋凤瑞,金东明,等. 复方中药四逆汤中乌头碱类二萜类生物碱的电喷雾质谱研究 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(1): 852.
- [6] Ohta H, Seto Y, Tsunoda, *et al* Determination of Aconitum alkaloids in blood and urine samples I High performance liquid chromatographic separation, solid - phase extraction and mass spectrometric confirmation [J]. Journal of Chromatography B, 1997, 691: 351.
- [7] ZHANG HG, SUN Y, Duan MY, *et al* Separation and identification of Aconitum alkaloids and their metabolites in human urine [J]. Toxicon, 2005, 46(5): 500.
- [8] 赵冬霞. 中药炮制去毒机理探讨 [J]. 云南中医学院学报, 2003, 25(1): 22.
- [9] 王勇,刘淑莹,刘志强,等. 雪上一支蒿中乌头碱类生物碱的电喷雾串联质谱分析 [J]. 分析化学, 2003, 31(2): 139.
- [10] 王勇,刘志强,宋凤瑞,等. 白山草乌中二萜生物碱的电喷雾串联质谱分析 [J]. 质谱学报, 2003, 23(3): 160.
- [11] 刘永刚,刘倩,张宏桂,等. 高效液相色谱-质谱联用法研究乌头碱的水解产物 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(4): 303.
- [12] 图雅,张贵君,王淑敏,等. 草乌叶及其煎煮液中生物碱类药效组分的电喷雾串联质谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 23(7): 789.

收稿日期: 2009-07-07

(上接第 336页)

- [6] 王宗仁,马世平,陈学福,等. 降粘抗栓片 I号对犬血流动力学及血液流变学指标的影响 [J]. 微循环学杂志, 1998, 8(2): 35.
- [7] 中医研究院西苑医院基础室药理组. 活血化瘀及益气活血药对犬实验性梗死的影响 [J]. 新医药学杂志, 1978, (7): 345.
- [8] 中医研究院西苑医院基础室药理组. 心外膜电图方法的改进 [J]. 新医药学杂志, 1978, (1): 53.

- [9] Waters DD, Luzzo PD, Wyatt HL, *et al* Early changer in regional and global left ventricular function induced by graded reductions in regional coronary perfusion [J]. Am J Cardiol, 1997, 39(2): 537.
- [10] Nayler WG, Grau A, Yopez C. Beta-adrenoceptor antagonists and the release of creatine phosphokinase from hypoxic heart muscle [J]. Cardiovasc Res, 1977, 11(4): 344.

收稿日期: 2009-04-29