

· 药剂与工艺 ·

四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的溶出和水解平衡

王 勇, 石 磊, 金东明, 宋凤瑞, 刘志强*, 刘淑莹*

(中国科学院长春应用化学研究所 新药研究室, 吉林 长春 130022)

摘要: 目的 研究四逆汤中乌头类生物碱的溶出平衡和水解平衡。方法 利用电喷雾质谱分析, 比较了制附子、四逆汤、四逆汤药渣和含有 3 种双酯型生物碱的混合对照品体系中的乌头碱类二萜生物碱。结果 在煎煮过程中双酯型生物碱溶解并发生水解反应, 而脂类生物碱则难溶于水。乌头碱、中乌头碱、次乌头碱水溶性相近, 但是次乌头碱在水中的热稳定性更高, C_{19} 二萜骨架上 C_3 取代基(-OH 或-H)的变化影响生物碱的稳定性。结论 四逆汤中的乌头碱类生物碱的种类及含量由其溶解性和化学稳定性共同决定。

关键词: 四逆汤; 生物碱; 电喷雾质谱; 平衡

中图分类号: R 283. 6; R 286. 02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)04-0311-04

Stripping and hydrolyzing balance of aconitic alkaloids in processing of Sini Decoction

WANG Yong, SHI Lei, JIN Dong-ming, SONG Feng-tui, LIU Zhi-qiang, LIU Shu-ying

(New Drug Laboratory of Changchun Institute of Applied Chemistry, CAS, Changchun 130022, China)

Abstract: **Object** To study the stripping and hydrolyzing balance of aconitic alkaloids in Sini Decoction. **Methods** Sini Decoction, the prepared aconite roots that had been concocted with liquorice and dried ginger, the residue of Sini Decoction and the mixed reference substance system contained three kind of di-ester diterpenoid alkaloids (DDAs) were analyzed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) respectively. **Results** The results showed that the DDAs were solved and reduced by hydrolysis reaction, and the lipo-alkaloids were difficult to be soluted in the Decoction. The further study for the system of three DDAs including aconitine, mesaconitine and hypaconitine indicated that the solubility of DDAs was similar, but hypaconitine was more stable in boiling water, which suggested that the change of C_3 -substitute (-OH or -H) on diterpenoid skeleton would influence the stability of DDAs evidently. **Conclusion** The content of aconitic alkaloids in Sini Decoction and its variety depend on both their solubility and chemical stability.

Key words: Sini Decoction; alkaloids; electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS); balance

中药复方中化学成分的分析已逐渐引起人们重视, 但对煎煮过程中化学成分的变化及其原因研究较少。复方中化学成分的含量主要由其是否容易溶出和溶出后是否发生化学反应两种因素决定。溶出率受煎煮时间、火候、煎煮次数、温度和溶剂用量等因素影响, 并建立了溶出率与以上因素之间的数学模型^[1, 2]。复方中的化学反应包括水解、络合和氧化等, 但将溶出和水解同时考虑的研究不多。四逆汤由制附子、炙甘草、干姜 3 味中药组成, 是中医临床的经典方剂, 乌头生物碱是其中主要活性成分。电喷雾质谱技术在药物分析中被广泛应用^[3]。本实验以四逆汤为体系, 采用电喷雾质谱技术研究了溶出和水解这两种因素对复方中乌头生物碱的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂: 美国 Finnigan LCQ 电喷雾质谱仪。仪器条件: 毛细管温度: 180 °; 喷雾电压: 5 kV; 鞘气(氮气)流速: 60 L/h; 毛细管电压: 38 V; 注射泵流速: 3 μ L/min。制附子、炙甘草和干姜购于长春市药店, 乌头碱(0720-9807)、中乌头碱(799-9403)和次乌头碱(798-9403)对照品购于中国药品生物制品检定所, 其他试剂均为分析纯。

1.2 生物碱的提取

1.2.1 制附子中生物碱的提取: 取 5 g 制附子, 100 mL 无水乙醇浸泡 48 h, 提取液用甲醇稀释 5 倍后, 得 0.01 g 生药/mL 溶液, 电喷雾质谱仪检测。

1.2.2 四逆汤中生物碱的提取: 取 6 g 制附子、6 g

* 收稿日期: 2002-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271600)

* 通讯作者

炙甘草和 4 g 干姜, 200 mL 蒸馏水煎煮 3 次, 每次 40 min, 浓缩至 45 mL。向煎煮液中加入 180 mL 无水乙醇, 静置, 24 h 后抽滤分离多糖等大分子, 溶液减压蒸干后用 50 mL 蒸馏水溶解, 氨水调至 pH=10, 氯仿萃取 (30 mL × 3) 后合并。氯仿溶液用甲醇稀释 5 倍后电喷雾质谱仪检测。

1.2.3 制附子煎煮后药渣中残留生物碱的提取: 将上述四逆汤中的制附子从药渣中挑出, 蒸馏水洗净后用 10 mL 无水乙醇浸泡 48 h, 得残留生物碱的乙醇提取液, 该溶液用甲醇稀释 5 倍后电喷雾质谱仪检测。

1.2.4 3 种对照品的水溶性和热稳定性: 称取 1.16 mg 乌头碱、0.92 mg 中乌头碱和 0.89 mg 次乌头碱, 氯仿定容于 50 mL 容量瓶中, 该溶液以甲醇稀释 10 倍后用电喷雾质谱仪检测; 取 5 mL 混合生物碱氯仿溶液, 用 5 mL 蒸馏水萃取 3 次, 取水层以甲醇稀释 3 倍, 用电喷雾质谱仪检测; 另取 5 mL 混合生物碱氯仿溶液, 减压蒸干后用 100 mL 蒸馏水溶解, 加热 15 min 后, 用甲醇稀释 2 倍, 采用电喷雾质谱仪检测。

2 方法和结果

附子中的乌头生物碱包括双酯型二萜生物碱 (diester-diterpenoid alkaloids, DDA) 和脂类生物碱 (脂碱, lipo-alkaloids)^[4]。DDA 包括乌头碱 (aconitine, AC)、中乌头碱 (mesaconitine, MA) 和次乌头碱 (hypoconitine, HA) 等。脂碱是 DDA 的 C₈ 位上乙酰基被棕榈酰基、亚油酰基或油酰基等脂肪酰基取代所形成的衍生物。GC-MS 技术证明 DDA 煎煮后水解为单酯型生物碱 (monoester-diterpenoid alkaloids, MDA)^[5], 但附子中脂碱在复方中变化规律的研究以及 DDA 结构的差异对水解反应的影响未见报道。我们通过分析和比较制附子、复方和煎煮后的制附子中生物碱的相对含量试回答以上问题, 并利用 3 种对照品验证生物碱的结构与稳定性的关系。

2.1 制附子中生物碱的 ESI-MS 分析: 见图 1。由图 1 所见, 在制附子乙醇提取液的电喷雾质谱图中观察到以下质子化的生物碱分子: 苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypaconine, BH, m/z 574)、苯甲酰中乌头原碱 (benzoylmesaconine, BM, m/z 590)、苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine, BA, m/z 604)、HA (m/z 616)、去氧乌头碱 (DA, m/z 630)、AC (m/z 646)、8-棕榈酰-苯甲酰次乌头原碱 (HAP, m/z 812)、8-亚油酰-苯甲酰次乌头原碱 (HAL,

m/z 836)、8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱 (MAL, m/z 852) 和 8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱 (ACL, m/z 866)。 m/z 770 离子的归属尚未确定。这些生物碱结构相似, 所以电离效率相近, 其质谱峰的相对丰度可以近似地反映它们的相对含量。 $[HA + H]^+$ (m/z 616) 是基峰, 说明 HA 是制附子中主要的双酯型生物碱, 这也与液相色谱-质谱联用的分析结果一致^[8]。

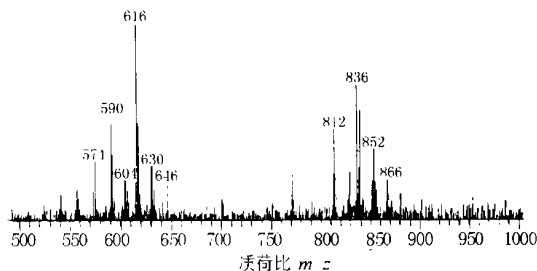


图 1 制附子乙醇提取液的电喷雾质谱

Fig. 1 ESI-MS of ethanol extract of prepared aconite roots

2.2 四逆汤中生物碱的 ESI-MS 分析: 见图 2。由图 2 可见, 四逆汤中的二萜生物碱可以分为 3 类, 即 MDA (m/z 500 ~ 600), DDA (m/z 600 ~ 700) 和脂碱 (m/z 800 ~ 900)。MDA 在四逆汤中含量较高, $[BH + H]^+$ (m/z 590) 是基峰; 双酯型生物碱的含量次之, $[HA + H]^+$ 的丰度为 25%, 并且没有观察到 DA 和 AC。值得注意的是, 在四逆汤中发现了少量的脂类生物碱 (丰度 < 10%), 部分该类生物碱在人参四逆汤中虽有报道, 但未分得纯品^[6]。

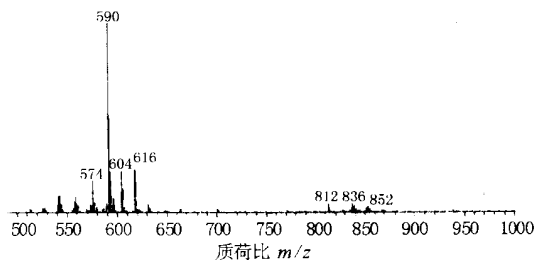


图 2 四逆汤中乌头生物碱的电喷雾质谱

Fig. 2 ESI-MS of aconitic alkaloids in Sini Decoction

2.3 制附子煎煮后药渣中残留生物碱的 ESI-MS 分析: 在四逆汤中的脂碱的相对含量低于附子, 一种可能是脂碱因为其长链脂肪酰基的存在而难溶于水。为验证该假设, 将与炙甘草和干姜共煎后的制附子挑出后提取其中的生物碱。由图 3 可见, 脂碱的含量最高, MDA 次之, 未检测出 HA。这些结果说明在煎煮过程中脂碱成为煎煮后附子中的主要生物碱, 在煎煮过程中不易溶出, 而大部分的 HA 已溶出。不难看出生物碱二萜骨架上 C₈ 位取代基是长链脂肪

酰基或乙酰基, 显著影响水溶性, 复方中 HA 的含量低于制附子中相应的生物碱的原因在于水解, 脂碱的含量低则由溶出平衡所决定。

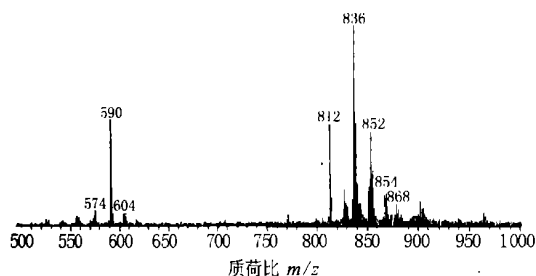


图 3 煎煮后制附子乙醇提取液的电喷雾质谱

Fig. 3 ESI-MS of ethanol extract of residues of prepared aconite roots after decocting

2.4 次乌头碱、中乌头碱和乌头碱的水溶性差异: 据报道生附子所含的 DDA 中 MA 和 AC 的含量较高^[7], 而在制附子和含有制附子的中成药中, HA 含量较高^[8]。本实验在制附子中也主要检测到 HA。为说明这种现象是具有必然性还是可能存在样品差异, 为制附子的质量控制提供依据, 下面从水溶性和水解性两个方面进行分析。

因为在煎煮过程中, 附子中 DDA 溶出的同时还伴随水解反应, 比较它们的水溶性较困难, 所以通过比较 HA 与 MA 和 AC 在氯仿层的分子离子峰丰度(图 4)和它们在水萃取层的分子离子峰丰度(图 5)考察它们的水溶性差异。在图 4 中, $[AC+H]^+$ $[MA+H]^+$ $[HA+H]^+$ 的丰度比是 100 70 67, 而它们的物质的量比是 100 79 77, 这表明对于生物碱来说, 可以用分子离子峰的丰度定性地反映出它们的相对含量。由图 5 可见, $[AC+H]^+$ $[MA+H]^+$ $[HA+H]^+$ 的丰度比变为 100 80 90, $[AC+H]^+$ 仍为基峰, 但 MA 和 HA 的含量有所增加, 特别是 HA 含量增加较多, 说明 HA 比 MA 和 AC 更易溶于水, 水溶性差异不是制附子中 HA 含量较高的原因。

2.5 次乌头碱、中乌头碱和乌头碱的水解性差异: 为比较 3 种对照品在水中的稳定性, 将生物碱的氯仿溶液减压蒸干后用蒸馏水溶解, 加热 15 min 后进行 ESI-MS 分析(图 6)。加热后, 乌头碱和中乌头碱显著减少, $[AC+H]^+$ $[MA+H]^+$ $[HA+H]^+$ 的丰度比变为 45 35 100, 即基峰由加热前的 $[AC+H]^+$ 变为 $[HA+H]^+$ 。可见, HA 比 AC 和 MA 具有更高的热稳定性, 由于 HA 的 C₃ 位是-H, 而 AC 和 MA 的 C₃ 位是-OH, 说明结构上的差异对它们的化学稳定性影响较大, 进而影响平衡移动和

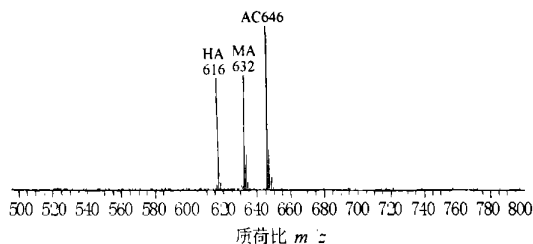


图 4 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱混合对照品 (氯仿溶液) 的电喷雾质谱

Fig. 4 ESI-MS of mixed of reference substances aconitine, mesaconitine and hyaconitine ($CHCl_3$)

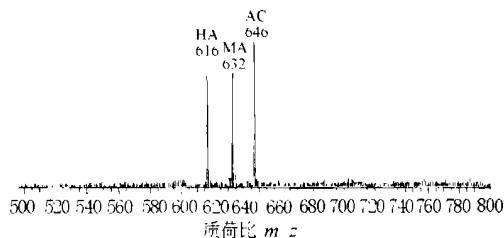


图 5 混合对照品氯仿液水萃取层的电喷雾质谱

Fig. 5 ESI-MS of mixed reference substances in H_2O extract layer of $CHCl_3$

它们在药材组织中的剩余量, HA 成为制附子中主要的 DDA, 具有化学上的必然性。

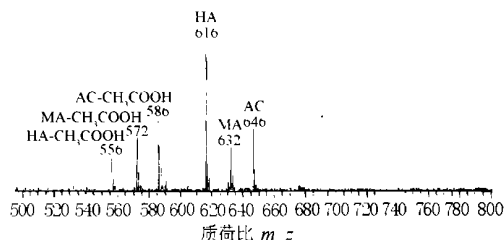


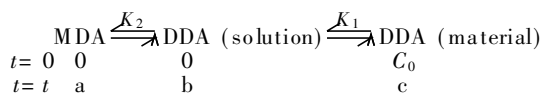
图 6 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱混合对照品加热 20 min 后的电喷雾质谱

Fig. 6 ESI-MS of mixed referene substances of aconitine, mesaconitine and hyaconitine decocted in 20 min

3 讨论

传统的植化分离方法已从含有附子的复方中分离出苯甲酰中乌头碱和乌头碱^[9], 但对其他单酯和双酯型生物碱报道较少, 并且该方法从乌头属植物中难以得到脂类生物碱的纯品^[10], 从水煎液中分离出脂碱的难度更大。由于脂碱结构非常相近, 在液相色谱上也较难分开, 因此, 电喷雾质谱是较合适的分析四逆汤中乌头类生物碱的方法, 各质子化分子离子峰的归属可通过串联质谱进一步证明(文中未给出)。由于同时检测生物碱, 分子离子峰的丰度可以半定量地反映出生物碱含量的变化。

为讨论方便,可以近似认为煎煮过程中只发生 MDA 的溶出、脂碱的溶出和 DDA 的溶出及水解反应 3 种情况,下面以 DDA 为例列出平衡方程。



$$c = C_0 - a - b \quad K_2 = \frac{b}{a} \quad K_1 = \frac{C_0 - a - b}{b}$$

$$K_1 K_2 = \frac{C_0 - a - K_2 a}{a}$$

$$a = \frac{C_0}{K_2 + K_1 K_2 + 1} = \frac{1}{K_2(1 + K_1) + 1} C_0 \quad (1)$$

$$b = \frac{K_2}{K_2(1 + K_1) + 1} C_0 \quad (2)$$

$$c = \frac{K_1 K_2}{K_2(1 + K_1) + 1} C_0 \quad (3)$$

上式中设 C_0 为 DDA 的初始浓度,即附子中的 DDA 全部溶解且不发生水解反应的理论浓度,未加热时, $t=0$; 加热 t 时间后,煎煮液中苯甲酰单酯型生物碱、双酯型生物碱和药材组织中未煎出的双酯型生物碱浓度分别为 a , b 和 c 。固定投药量和最后的煎煮体积,则 C_0 为定值。如果已知双酯型乌头碱的溶出平衡常数 K_1 和水解平衡常数 K_2 ,则可推导出 t 时刻 a , b 和 c 的值。调整 K_1 、 K_2 的值,还可以用以上平衡表示单酯型生物碱和脂碱的溶出过程。

但因为复方体系和煎煮过程非常复杂,即使单一生物碱的 K_1 和 K_2 的精确值也很难确定,对每种组分都确定出其 K_1 和 K_2 难度更大。但可以根据组分是否易溶出和是否稳定估计平衡常数的值进行半定量分析。如果生物碱容易溶出和水解,则 K_1 和 K_2 的值都很小,根据以上公式, c 值将很小, b 次之, a 最大,这种情况对 MA 和 AC 适用;如果生物碱容易溶出但较难水解,则 K_1 小,但 K_1 和 K_2 较大, b 和 c

的值将增加, a 减小,这对 HA 适用;如果生物碱不易溶出, K_1 较大,这适用于脂碱,结合图 3 和公式 (3),还可以推测脂碱应不易水解,否则平衡将向左移动。可见,附子中生物碱在复方中的变化可半定量地表示出来,这对理解煎煮过程中的平衡非常有益。

References:

- [1] Chu M Q, Gu H C, Liu G J. Effect of temperature on concentration of active components extracted from medicinal herb [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 22-23.
- [2] Li Y R, Zheng Q. Simulation and optimization of herb extraction process [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(7): 399-401.
- [3] Stefanowicz P, Prasain J K, Yeboah K F, et al. Detection and partial structure elucidation of basic taxoids from *Taxus wallichiana* by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(15): 3583-3589.
- [4] Kitagawa I, Yoshikawa M, Zhou L C, et al. Four new lipoidal alkaloids from *Aconiti tuber* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30: 758-761.
- [5] Ito K, Ohyama Y, Konishi Y, et al. Method for the simultaneous determination of aconitine alkaloids and their hydrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry in human serum [J]. *Planta Med*, 1997, 63: 75-79.
- [6] Xu Y J, Song F R, Zhao H F, et al. Studies on antishock effect of active constituents in Renshen Sini Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 392-394.
- [7] Wang J Z, Han G Y. Study on alkaloids in *Aconitum carmichaeli* Debx. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1985, 20(1): 71-73.
- [8] Wang Z J, He S J, Xu S Q. Determination of aconitine alkaloids in *Aconitum* plants and related Chinese patent medicines by liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2001, 29(4): 391-395.
- [9] Zhang Y Z, Ding C X, Liu J Q, et al. Studies on chemical constituents of Zhentong Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 32(2): 106-109.
- [10] Peng C S, Wang F P. Advances in chemistry of norditerpenoid alkaloid. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(12): 932-938.

均匀设计优选微波辅助萃取何首乌中有效成分的研究

王娟^{1,2}, 沈平², 沈永嘉^{1*}

(1. 华东理工大学化学与制药学院, 上海 200237; 2. 国家中药制药工程技术研究中心, 上海 201203)

摘要:目的 研究微波辅助萃取何首乌的提取工艺。方法 以总蒽醌和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙炔-2-O-β-D-葡萄糖苷(二苯乙炔苷)的含量为指标,通过均匀设计的方法,采用连续微波辐射方法进行微波萃取工艺的优化。结果 微波功率、微波辐射时间、溶剂浓度、溶剂用量、原料浸泡时间对何首乌中有效成分的提取具有交互作用,优选出的最佳工艺条件为:微波功率 340 W、微波辐射时间 10 min、溶剂乙醇浓度 95%、固液比为 1:5、浸泡时间 1 h。结论 通过验证实验表明,所建立的数学模型是合理的。

* 收稿日期: 2002-08-13

基金项目: 国家重点科技攻关项目 (99-929-02-14)

作者简介: 王娟 (1966—), 女, 副教授, 在读博士, 研究方向为中药的研究与开发。

Tel: (021) 50801190 E-mail: jwang@necm.tcm.com