

八味地黄汤各药味对附子生物碱影响的电喷雾质谱研究

许庆轩, 王 勇, 宋凤瑞, 刘春明, 刘志强*, 刘淑莹*

(中国科学院长春应用化学研究所 新药研究实验室, 吉林 长春 130022)

摘要:目的 以八味地黄汤为研究对象, 考察各药味对附子生物碱的影响规律, 揭示附子配伍组方的科学内涵, 为科学阐释八味地黄汤配伍规律提供化学依据。方法 利用电喷雾质谱技术分别对八味地黄汤, 附子加山茱萸、山药、肉桂、丹皮、泽泻、地黄、茯苓共煎液以及次乌头碱加山茱萸、山药共煎液进行系统考察。结果 次乌头碱加山药、山茱萸, 附子加山药等共煎液中次乌头碱含量较高; 八味地黄汤、附子加山茱萸共煎液中次乌头碱含量较低; 肉桂、丹皮、泽泻、地黄、茯苓等对附子生物碱的影响不明显。结论 八味地黄汤中乌头碱和中乌头碱水解和溶出比较完全, 次乌头碱的含量较少, 次乌头碱的减少是由于水解以及溶出受到抑制导致。其中山茱萸对制附子起减毒作用, 其减毒机制主要是抑制了制附子中次乌头碱的溶出。而山药则能导致附子毒性增加。

关键词: 八味地黄汤; 附子; 山茱萸; 次乌头碱; 电喷雾质谱

中图分类号: R284.1; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)04-0519-04

Effect of various ingredients in Bawei Dihuang Decoction on release of aconitine alkaloids by ESI-MS spectrometry

XU Qing-xuan, WANG Yong, SONG Feng-rui, LIU Chun-ming, LIU Zhi-qiang, LIU Shu-ying

(Laboratory of New Drug Research, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract: Objective To explore the roles of various ingredients used in the preparation of Bawei Dihuang Decoction (BDD) for the purpose to enlighten the scientific basis in the research and development of BDD in traditional Chinese medical practice. **Methods** BDD was prepared by decocting a prescription containing *Cortex cinnamomi* (CC), *Radix Aconiti Lateralis Preparata* (RALP), *Radix Rehmanniae* (RR), *Fructus Corni* (FC), *Rhizoma Dioscoreae* (RD), *Cortex Moutan* (CM), *Rhizoma Alismatis* (RA), and *Poria* with boiling water. Similarly, a 1:1 mixture of RALP with each of the above mentioned ingredients and of hypaconitine with FC and RD, individually was prepared to obtain test samples for ESI-MS study. **Results** The hypaconitine in the codecoction of hypaconitine + RD, + FC, RALP + RD was higher; in BDD and codecoction of RALP + FC was lower; while CC, CM, RA, and *Poria* showed indistinct effect on RALP alkaloids. **Conclusion** Hydrolysis and dissolution of aconitine and mesaconitine were relatively complete in BDD. Because of hydrolysis and dissolution being inhibited during codecoction, the amount of hypaconitine in BDD is little. FC in BDD can make RALP toxicity decrease by inhibiting hypaconitine dissolution from RALP, while RD can make the RALP toxicity increase.

Key words: Bawei Dihuang Decoction (BDD); *Radix Aconiti Lateralis Preparata* (RALP); *Fructus Corni* (FC); hypaconitine; electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)

八味地黄汤出自《金匱要略》, 由熟地、山茱萸、山药、茯苓、丹皮、泽泻、肉桂、附子组成, 主治肾阳不足引起的腰酸膝冷、肢冷、浮肿、小腹涨满、小便不利或频数、痰饮、喘咳诸症。目前对其丸剂、汤剂的药理和临床研究已经取得很大进展^[1,2], 但对其药效物质基础及其配伍规律的研究甚少。附子是常用中药, 常与甘草、干姜等配伍使用。甘草、干姜和防己配伍使

用有助于附子中剧毒的双酯型生物碱的水解^[3~5]。乌头碱类二萜生物碱在电喷雾质谱条件下可形成相对丰度较强的质子化分子, 每个离子峰代表1种生物碱, 其归属可通过文献和串联质谱数据确定。离子峰的相对丰度可以近似地反映出同类生物碱的量^[6~8], 质谱图中准分子离子峰的种类和丰度具有很好的重复性, 并且电喷雾质谱法操作简便, 测定快

收稿日期: 2004-07-21

基金项目: 国家科技重大基础研究前期研究专项资助项目(2003CCA03100); 国家自然科学基金资助项目(30271600, 39930210)

作者简介: 许庆轩(1970—), 男, 山东, 单县人, 博士研究生, 1994年毕业于哈尔滨师范大学化学系, 1999年考入中国科学院长春应用化学研究所, 从事药物质谱研究。Tel: (0431) 5262613

* 通讯作者

速、灵敏,与高效液相色谱和薄层色谱法相比大大提高了复方体系的研究效率^[9]。本实验采用电喷雾质谱技术,对八味地黄汤及其中药味与附子的共煎液中生物碱进行了研究,从化学角度阐明了八味地黄汤的配伍组方的科学内涵。

1 材料和方法

1.1 仪器与材料:菲尼根 MATLQC 电喷雾质谱(ESI-MS)(San Jose, CA, USA),所用试剂均为分析纯。山茱萸、山药、地黄、肉桂、牡丹皮、泽泻、茯苓以及制附子均购自吉林大药房,经过长春中医学院金东明教授鉴定。乌头碱(批号 0720-9807)、中乌头碱(批号 0799-9403)和次乌头碱(批号 0798-9403)对照品购自中国药品生物制品检定所。

1.2 共煎液和单煎液的制备:将肉桂 3 g、制附子 3 g、地黄 9 g、山茱萸 12 g、山药 12 g、牡丹皮 9 g、泽泻 9 g、茯苓 9 g 加 10 倍量水浸泡 30 min 后,急火煮沸,中火煎煮 1 h,滤过,收集滤液,滤渣加 8 倍量蒸馏水同法处理 2 次,合并 3 次滤液,浓缩,即得 50 mL 八味地黄汤煎煮液。同法制备制附子单煎液及其与其余 7 味药(质量比均为 1:1 比例)的共煎液,并测定各煎液的 pH 值。上述各煎液分别加入 200 mL 无水乙醇,24 h 后滤过,减压蒸出乙醇,膏状物用 50 mL 蒸馏水溶解,用氨水调至 pH 10,分别用 50 mL 氯仿萃取 3 次,合并氯仿溶液,得各煎液生物碱溶液。取 1.35 mg 次乌头碱对照品与 4.5 g 山茱萸共煎 1 h,1.23 mg 次乌头碱对照品与 4.5 g 山药共煎 1 h,共煎液按照上法制备山茱萸加次乌头碱、山药加次乌头碱共煎液生物碱溶液。

1.3 制附子中生物碱的提取:4.5 g 制附子用 200 mL 95%乙醇超声提取 1 h,冷浸 12 h,滤过,药渣同法重复提取 2 次,合并乙醇溶液,作为制附子乙醇冷浸液。减压蒸出乙醇,浸膏按照 1.2 项下方法处理,得制附子生物碱氯仿溶液。

1.4 制附子与山茱萸共煎后附子药渣和八味地黄汤煎煮后附子药渣中生物碱的提取:将制附子与山茱萸共煎后药渣中的附子用蒸馏水洗净,晾干,按照 1.3 项下方法提取,得到制附子与山茱萸共煎后制附子中生物碱的氯仿溶液。同法得到八味地黄汤煎煮后附子药渣中生物碱的氯仿溶液。

1.5 电喷雾质谱分析:分别取上述生物碱溶液 2 mL 用甲醇稀释 10 倍后,供电喷雾质谱仪分析。喷雾电压为 5.0 kV,毛细管温度设为 150 ℃,注射泵进样速度为 2 μL/min。对乌头碱、中乌头碱、次乌头碱对照品以及制附子乙醇提取液中的生物碱进行多

级串联质谱研究。为了便于比较各煎煮液品中生物碱的量,所用样品均为生物碱的氯仿溶液,电喷雾质谱条件一致。

2 结果和讨论

2.1 制附子中生物碱的电喷雾质谱研究:制附子乙醇冷浸液电喷雾质谱见图 1-A。 m/z 616、632、646 离子的多级串联质谱图(图略)与次乌头碱、中乌头碱和乌头碱对照品的串联质谱图(图略)完全相同,根据文献报道^[10~13]证明它们分别对应次乌头碱、中乌头碱和乌头碱这 3 种双酯型生物碱,是制附子中的主要毒性成分。 m/z 574~610 的离子峰为单酯型生物碱的质子化峰,分别对应苯甲酰中乌头原碱(benzoylmesaconine, m/z 590)、苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine, m/z 574)和苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine, m/z 604),它们分别由相应的双酯型生物碱通过 C₈ 酯键水解而生成^[12]。 m/z 800~900 的质谱峰对应的是酯类生物碱的质子化峰^[10,12,13],它们分别为双酯型生物碱的 C₈ 位被长链脂肪酸所取代而形成的酯。它们在二级串联质谱中均失去长链脂肪酸而不失去醋酸,生成与双酯型生物碱完全相同的离子^[10]。在低质量区还观察到 m/z 454、438 两种离子,分别为附子灵(fuziline)、尼奥灵(neoline)^[11,12]。 m/z 700、770 离子可能是新化合物。

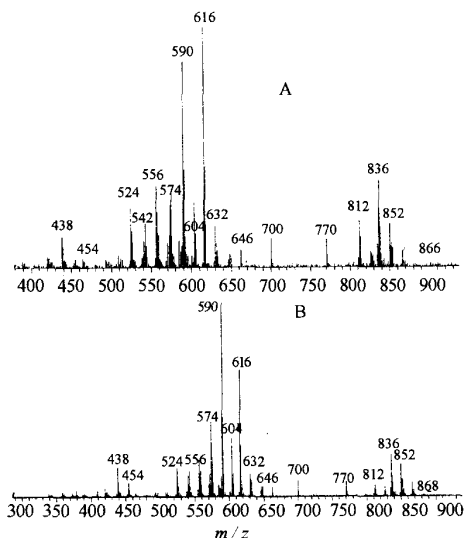


图 1 制附子乙醇冷浸液(A)和水单煎液(B)的电喷雾质谱图

Fig. 1 ESI-MS chromatogram of RALP cold-extracted by ethanol (A) and water decoction (B)

从图 1-A 可以看出,制附子中毒成分乌头碱、中乌头碱相应离子峰的相对丰度虽然较低,但次乌头碱所对应的质子化峰的相对丰度却很高,在谱

中为基峰,说明附子经过炮制,乌头碱和中乌头碱大部分水解,但是次乌头碱不易水解,成为制附子的主要毒性成分,这也与液相色谱-质谱联用的分析结果一致^[14],表明制附子在临床应用中减低毒性的关键在于控制次乌头碱的量。

2.2 制附子单煎液中生物碱的电喷雾质谱研究:见图 1-B。制附子经单煎后,单酯型生物碱苯甲酰中乌头原碱(m/z 590)的质子化峰变为基峰,而次乌头碱质子化峰相对降低,说明制附子中双酯型生物碱在煎煮过程中发生了进一步的水解,即煎煮过程也是附子减毒增效的过程。

2.3 八味地黄汤及其中各药味与附子共煎液中生物碱的电喷雾质谱研究:八味地黄汤的电喷雾质谱图见图 2-A,与制附子单煎液比较,其中双酯型生物碱(m/z 646、632、616)较低,说明八味地黄汤中双酯型生物碱水解相对比较完全,或者它们的溶出较少,毒性较低。制附子分别与肉桂、泽泻、丹皮、地黄、茯苓共煎时,其双酯型生物碱的相对丰度并没有发生明显变化(图略),说明它们对制附子中双酯型生物碱的影响很小。但是,当山药与制附子共煎时,次乌头碱的质子化峰为基峰(图 2-B),说明山药可能抑制了制附子中次乌头碱的水解,导致制附子毒性增强。为了进一步验证该结论,实验对山药与次乌头碱对照品的共煎液进行了电喷雾质谱研究(质谱图略),结果发现次乌头碱的质子峰是基峰,其水解产物的相对丰度较低,水解程度较低,可以说明山药的确能够抑制次乌头碱的水解。

制附子与山茱萸共煎液中次乌头碱的相对丰度较低,说明山茱萸能够降低共煎液中的次乌头碱,具有很好的减毒作用,但其减毒机制并不清楚。电喷雾质谱图见图 2-C。

在八味地黄汤中生物碱的电喷雾质谱图中几乎观察不到乌头碱和中乌头碱的质子化峰,而在其他共煎液的电喷雾质谱图中乌头碱和中乌头碱的质子化峰则比较明显,说明八味地黄汤中乌头碱和中乌头碱的减少可能是多味中药作用的结果,并非是其其中某一味中药单独导致的,但其作用机制尚不清楚。

制附子经过煎煮后药渣残留的生物碱以脂类生物碱为主,在其电喷雾质谱图中观察不到双酯型生物碱,说明制附子经过煎煮双酯型生物碱溶出比较完全^[7]。然而在煎煮后的八味地黄汤附子药渣的电喷雾质谱图中仍然可以看到较强的次乌头碱质子峰,但没有发现乌头碱和中乌头碱的质子峰(图 3),说明在煎煮过程中八味地黄汤中有大量的次乌头碱

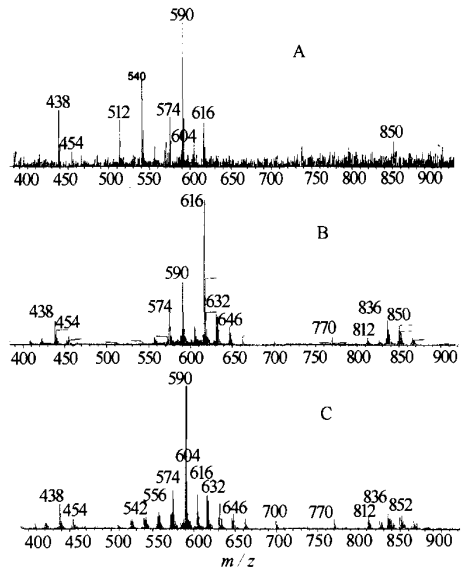


图 2 八味地黄汤(A)、制附子与山药(B)和制附子与山茱萸(C)的电喷雾质谱

Fig. 2 ESI-MS chromatogram of BDD (A), RALP+RD (B), and RALP+FC (C)

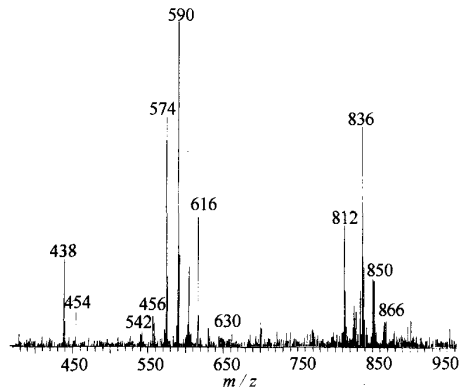


图 3 八味地黄汤中附子药渣的电喷雾质谱图

Fig. 3 ESI-MS chromatogram of RALP residue in BDD

没有溶出,而乌头碱和中乌头碱溶出和水解两个过程都比较完全。另外,在八味地黄汤和八味地黄汤煎煮后附子药渣的电喷雾质谱中次乌头碱的丰度都比制附子乙醇提取液中次乌头碱的丰度低,说明八味地黄汤在煎煮过程中次乌头碱的减少是由于水解和抑制溶出导致的。

2.4 山茱萸与附子配伍减毒机制的研究:体系的酸性越强,次乌头碱的水解越困难^[8]。制附子与山茱萸、山药、茯苓、地黄、丹皮、泽泻、肉桂共煎液的 pH 值分别为 3.51、3.47、4.11、4.40、4.34、4.27、4.32。其中制附子与山茱萸、山药共煎液的酸性较强,说明山茱萸和山药均不能促进制附子中次乌头碱的水解。为了对这一结论进行验证,实验对山茱萸与次乌

头碱对照品的共煎液进行了电喷雾质谱研究,结果发现次乌头碱水解程度并不大(图4),说明山茱萸在与制附子配伍过程中,其主要减毒机制并不是促进次乌头碱的水解,而很可能是在共煎的过程中抑制了次乌头碱等双酯型生物碱的溶出。

制附子与山茱萸共煎后附子药渣乙醇提取液的电喷雾质谱图中次乌头碱的相对丰度较高(图5),进一步证明山茱萸在与附子配伍过程中,其对附子减毒的机制是在共煎的过程中抑制了次乌头碱的溶出。但山茱萸成分比较复杂,何种成分抑制了次乌头碱的溶出有待进一步研究。

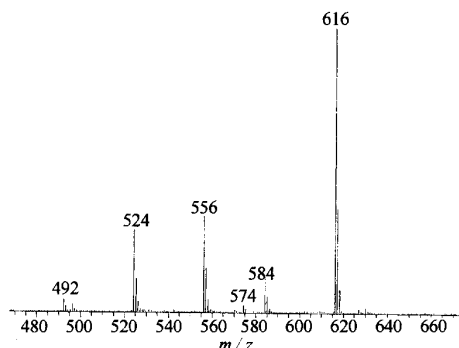


图4 山茱萸与次乌头碱对照品共煎液电喷雾质谱图

Fig. 4 ESI-MS chromatogram of FC and hyaconitine codecoction

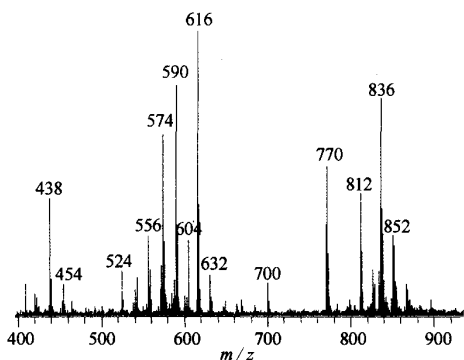


图5 制附子与山茱萸共煎后的电喷雾质谱

Fig. 5 ESI-MS chromatogram of RALP+FC codecoction

3 结论

利用电喷雾质谱技术研究了八味地黄汤及其各药味与制附子共煎液中生物碱的变化规律,结果发现八味地黄汤中乌头碱和中乌头碱水解和溶出比较完全,次乌头碱的量却较少,次乌头碱的减少是由于水解和溶出受到抑制两种原因导致的。其中汤剂中山茱萸对制附子起减毒作用,其减毒机制主要是抑制了制附子中次乌头碱的溶出。山药与制附子

共煎液的酸性较强,严重抑制了次乌头碱的水解,从而可能导致体系毒性的增强。

References:

- [1] Wu J C, Luo Z G, Yu Y S, et al. Research of inhibition experiment of Guifu Dihuang Soup to small mice hepatocellular carcinoma hyperplasia [J]. *J Qiannan Med Coll Nation Minor* (黔南民族医学学报), 2001, 14(1): 1-3.
- [2] Wang X L, Li Y C, Hou Y C. Jingguishenqi Pill has anti-aging effect [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2000, 21 (10): 1209-1211.
- [3] Lü L, Si Y S, Zhu Y M, et al. Effect of herbs in SINI TANG on alkaloids of aconite [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (Suppl): 79-31.
- [4] Huang L S, Zhao W C, Xia Y F. Effect of methods on the content of alkaloids and glycyrrhetic acid in Sini Injection [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, 30 (5): 332-334.
- [5] He W, Qin L, Si S Y. Determination of aconitine and tetrandrin in separate and compatible decoction of *Radix Aconitine* and *Radix Stephaniae Tetrandrae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (7): 600-602.
- [6] Tang L, Kebrale P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrospray solution [J]. *Anal Chem*, 1993, 65: 3654-3668.
- [7] Wang Y, Shi L, Jin D M, et al. Stripping and hydrolyzing balance of aconitic alkaloids in processing of Sini Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (4): 311-314.
- [8] Wang Y, Liu Z Q, Song F R, et al. Study on the combination principles about aconite roots by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2003, 38 (6): 451-454.
- [9] Xu Y J, Song F R, Zhao X F, et al. Studies on antishock effect of active constituents in GINGSENG SINI TANG [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 392-394.
- [10] Wang Y, Liu Z Q, Song F R, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the aconitines in the roots of aconitine [J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 2002, 16 (?): 2075-2082.
- [11] Wang J Z, Han G Y. Studies on alkaloids isolated from jianyou fuzi (*Aconitum carmichaeli* Debx) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1985, 20 (1): 71-73.
- [12] Sun W X, Liu X Y, Liu Z Q, et al. Study of *Aconitum* alkaloids from aconite roots in *Aconitum carmichaeli* Debx using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 1998, 12: 821-825.
- [13] Sun W X, Song F R, Cui M, et al. Simultaneous determination of lipo-alkaloids extracted from *Aconitum carmichaeli* using electrospray ionization mass spectrometry and multiple tandem mass spectrometry [J]. *Planta Med*, 1999, 65: 432-435.
- [14] Wang Y Z, Ding C X, Liu J Q, et al. Determination of aconitine alkaloids in *Aconitum* plants and related Chinese patent medicines by liquid chromatograph/mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2001, 29 (4): 391-395.