

四逆汤中脂类生物碱来源于酯交换反应的研究

王 勇¹, 宋凤瑞², 刘志强², 刘淑莹^{2*}

(1. 深圳大学生命科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室, 广东 深圳 518060; 2. 中国科学院
长春应用化学研究所 新药研究室, 吉林 长春 130024)

摘要:目的 研究附子中脂类生物碱(脂碱)的溶解性, 确定四逆汤中脂碱的来源。方法 利用电喷雾离子阱质谱分析比较生附子、四逆汤、煎煮后生附子药渣、生附子与半夏共煎液中的生物碱。结果 在四逆汤中检测到少量脂碱, 在生附子与半夏共煎液中未检测到脂碱, 脂碱成为煎煮过生附子中的主要生物碱。结论 脂碱在加热条件下也不溶于水, 在四逆汤中检测到的脂碱来源于双酯型生物碱的酯交换反应。

关键词: 四逆汤; 附子; 电喷雾串联质谱; 酯交换反应

中图分类号: R 284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)01-0051-04

L ipo-alkaloids in SiniDecoction stemmed from ester-exchange reactions

WANG Yong¹, SONG Feng-rui², LIU Zhi-qiang², LIU Shu-ying²

(1. Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2. The New Drug Laboratory of Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130024, China)

Abstract: **Objective** To study the solubility of lipo-alkaloids from prepared aconite root (*Radix Aconiti Lateralis Preparata*) and identify the sources of lipo-alkaloids in SiniDecoction. **Methods** The electrospray ionization mass spectrometry was employed to analyze the alkaloids in crude aconite roots, SiniDecoction, the gruffs of concocted aconite roots and the decoction of prepared aconite root and pinellia tuber (*Rhizoma Pinelliae*). **Results** Lipo-alkaloids were observed in SiniDecoction, however, no lipo-alkaloids were found in the decoction of aconite roots with pinellia tuber. Lipo-alkaloids were the dominant components in the gruffs of concocted aconite roots. **Conclusion** Lipo-alkaloids are barely soluble in boiling water. The alkaloids existed in the SiniDecoction stem from the ester-exchange reactions of diester-diterpenoid alkaloids and fatty acid in the boiling water.

Key words: SiniDecoction; prepared aconite root (*Radix Aconiti Lateralis Preparata*); ESI/MSⁿ; ester-exchange reaction

一般认为, 乌头碱类双酯型(C₈ 位乙酰基, C₁₄ 位苯甲酰基)二萜生物碱及其煎煮后的水解产物苯甲酰单酯型生物碱是附子的主要活性成分。1982 年 Kitagawa 等利用柱色谱分离和气相色谱-质谱联用技术在川乌中发现了一类双酯型生物碱的 C₈ 位乙酰基被亚油酸等长链脂肪酰基取代所形成的衍生物, 命名为脂类生物碱(脂碱)^[1]。笔者利用电喷雾质谱(ESI/MS)技术分析附子、草乌、草乌花和雪上一枝蒿, 除检测到双酯型生物碱外, 还发现了一系列脂碱, 并且以一种双酯型生物碱为母体可以衍生出多种脂碱^[2~4]。巧合的是, 笔者发现双酯型生物碱除发生水解反应, 还发生酯交换反应生成脂碱^[5]。

徐雅鹃等在人参四逆汤中检测到 3 种脂碱^[6], 但在附子复方汤剂中是否含有其他脂碱和复方中脂

碱来源于溶解或化学反应或二者兼有等问题仍不清楚。四逆汤由附子、干姜和甘草组成, 是中医经典方剂。本实验以四逆汤为研究对象, 利用电喷雾质谱方法分析和对比生附子、四逆汤、煎煮后附子和附子半夏共煎液中的生物碱, 通过比较各生物碱相对量的变化, 证明脂碱的不溶性, 即复方中的脂碱来源于双酯型生物碱的酯交换反应。

1 仪器与试剂

美国 Finnigan LCQ 电喷雾质谱仪。

生附子购于四川江油, 炙甘草、干姜、半夏购于长春市药店, 经长春中医学院中药鉴定室姜大成教授鉴定。试剂均为分析纯。乌头碱对照品购于中国药品生物制品检定所, 批号 0720-9807。

2 方法

* 收稿日期: 2005-03-25

基金项目: 深圳市科技计划资助项目(200528)

2.1 生附子中生物碱的提取: 2 g 生附子用 100 mL 无水乙醇浸泡 48 h, 乙醇提取液用甲醇稀释 10 倍后, 电喷雾质谱仪检测。

2.2 煎煮液中生物碱的提取: 分别取 3 g 生附子; 3 g 生附子、6 g 炙甘草和 4 g 干姜; 3 g 生附子和 3 g 半夏。分别用 200 mL 蒸馏水煎煮两次, 每次 40 min, 煎煮液合并, 总体积为 50 mL。向煎煮液中加入 200 mL 无水乙醇, 24 h 后抽滤分离多糖等大分子, 乙醇溶液减压蒸干后用 50 mL 蒸馏水溶解, 用氨水调至 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。

2.3 仪器条件: 毛细管温度为 180 °C, 喷雾电压为 5 kV, 鞘气 (氮气), 毛细管电压为 38 V, 注射泵流速为 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

3 结果和讨论

3.1 生附子中的二萜类生物碱: 电喷雾多级串联质谱技术可以快速、灵敏地分析生物碱类天然产物。乌头生物碱在电喷雾电离条件下形成质子化分子, 利用该技术直接分析生附子乙醇提取液, 不仅发现了已有报道的生物碱, 还发现了一系列新生物碱^[2], 见图 1。生附子中的双酯型生物碱包括次乌头碱 (m/z 616)、中乌头碱 (m/z 632)、乌头碱 (m/z 646)、10-OH-中乌头碱 (m/z 648) 和 10-OH-乌头碱 (m/z 662)。附子中主要的脂碱包括 8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱 (m/z 828)、8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱 (m/z 852)、8-油酰-苯甲酰中乌头原碱 (m/z 854)、8-棕榈酰-苯甲酰乌头碱 (m/z 842) 和 8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 866)。图 1 中, 中乌头碱为基峰, 提示它在生附子中质量分数高。在脂碱中, 8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱等中乌头碱所对应的脂碱 (m/z 828、852、854) 质量分数最高。

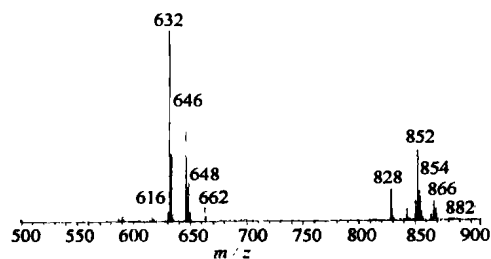


图 1 生附子中生物碱的 ESIMS 图

Fig. 1 ESIMS Spectrum of alkaloids from crude

Radix Aconitii Lateralis Preparata

3.2 四逆汤中的二萜类生物碱: 四逆汤中生物碱的 ESIMS 见图 2, m/z 590 作为基峰被检测, 通过电喷雾串联质谱分析, 确定其为苯甲酰中乌头原碱

(benzoylmesaconine, BM, m/z 590), 其他单酯型生物碱包括苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhyapaconine, BH, m/z 574) 和苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine, BA, m/z 604)。在双酯型生物碱中, 仅观察到次乌头碱 (HA, m/z 616)、10-OH-中乌头碱 (10-OH-MA, m/z 648) 和 10-OH-乌头碱 (10-OH-AC, m/z 662)。脂碱的离子峰丰度也显著降低, 分别为: 8-棕榈酰-苯甲酰次乌头原碱 (m/z 812)、8-亚油酰-苯甲酰次乌头原碱 (m/z 836)、8-油酰-苯甲酰次乌头原碱 (m/z 838)、8-棕榈酰-苯甲酰去氧乌头原碱 (m/z 826)、8-亚油酰-苯甲酰去氧乌头原碱 (m/z 850)、8-油酰-苯甲酰去氧乌头原碱 (m/z 852)、8-棕榈酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 842)、8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 866)、8-油酰-苯甲酰乌头原碱 (m/z 868)、8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱 (m/z 828)、8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱 (m/z 852) 和 8-油酰-苯甲酰中乌头原碱 (m/z 854), 生附子四逆汤中生物碱的组成与制附子四逆汤基本相近^[7]。比较图 1 和图 2, 不难发现在生附子中次乌头碱的质量分数很低, 也几乎观察不到以次乌头碱为母核的脂碱 (m/z 812、836、838), 但在四逆汤中它们的质量分数却显著增加, 这是因为次乌头碱比中乌头碱和乌头碱更容易生成脂类生物碱, 这与使用对照品得到的结果一致^[8]。

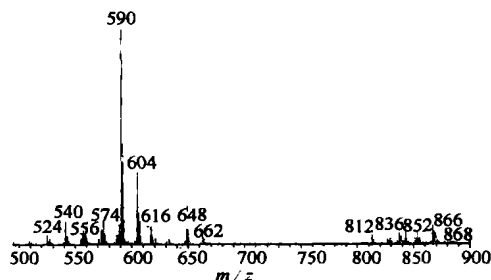


图 2 四逆汤中生物碱的 ESIMS 图

Fig. 2 ESIMS Spectrum of alkaloids in Sini Decoction

3.3 脂类生物碱的难溶性: 曾以制附子四逆汤为体系说明脂碱的难溶性^[8], 现对生附子四逆汤进一步说明。在复方中检测到的脂类生物碱种类多于生附子, 提示复方中的脂类生物碱至少不完全来自于生物碱的溶出。而脂碱的量较低的原因可能是脂碱溶出后大部分水解为单酯型生物碱, 或者脂碱在煎煮过程中的溶出率很低。如为后者所致, 则脂碱将仍残留在药材组织中, 因此利用 ESIMS 对四逆汤中附子的药渣进行分析。见图 3。可见, 脂碱的量最高, 单酯型生物碱次之, 还检测出 HA (m/z 616)、10-OH-MA (m/z 648) 和 10-OH-AC (m/z 662) 等双酯型

生物碱,但其量较低。这些结果说明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。因为双酯型生物碱与酯碱在结构上的唯一差别在于 C_8 位取代基是长链脂肪酰基或乙酰基,所以 C_8 位长链脂肪酰基显著降低脂碱的水溶性。比较图 1 和图 3,四逆汤中的脂碱和生附子组织中的脂碱在组成上亦有差别,酯交换反应不仅发生在煎煮液中,也发生在附子的药材组织中。

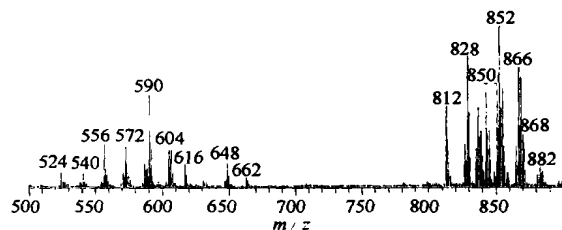


图 3 煎煮后生附子药渣中生物碱的 ESIMS 图

Fig. 3 ESIMS Spectrum of alkaloids in gruffs of crude *Radix Aconiti Lateralis Preparata* boiled from *Sin i*Decoction

4 四逆汤中脂碱完全来源于酯交换反应的证据

因为中药复方煎煮过程是否生成新物质一直是人们关注的热点,关系到有效成分或先导化合物的发现,因此四逆汤中的脂碱在多大程度上来源于溶出对理解含附子和乌头碱类中药复方的化学基础具有实际意义。曾以制附子为体系定性地说明脂碱的难溶性,同时,在生附子中次乌头碱及以其为母核的脂碱的量很低,但在四逆汤中的量却较高,这也表明脂碱是在煎煮过程中产生。但这些尚无法说明四逆汤中的脂碱在多大程度上来源于溶解和化学反应。解决此问题的关键是如何找到在加热煎煮附子过程中不发生酯交换反应的体系,这样就可以简单地研究脂碱的溶出性。因此通过控制反应条件在纯水和复方中药中都找到了这样的体系。

将双酯型生物碱对照品和脂肪酸在纯水中加热,发现在弱酸性条件下 (pH 5~6),双酯型生物碱不仅会水解为单酯型生物碱,还有一部分转化成脂碱,即 C_8 乙酰基不仅水解为羟基,还有一部分被脂肪酰基取代。而四逆汤的 pH 值为 5.31,也为弱酸性,与模拟体系相符。

另一方面,研究表明,在较强酸性条件下 ($pH < 4$),乌头碱等双酯型生物碱与长链脂肪酸在纯水中即使加热沸腾 2 h 也不发生酯交换反应生成脂碱(数据未给出)。半夏因含有有机酸而其煎煮液呈酸性,因此,分析了生附子和半夏的共煎液,测得它们共煎液的 pH 值是 3.65。对共煎液中的生物碱进行电喷

雾质谱分析,见图 4。双酯型生物碱只有少部分发生水解,仍是该共煎液中的主要生物碱,更重要的是,没有检测到任何脂碱。将生附子在 0.1 mol/L 盐酸加热 40 min 后用 ESIMS 检测,也没有发现脂碱(图 5)。这些说明在酸性条件下,双酯型生物碱不仅

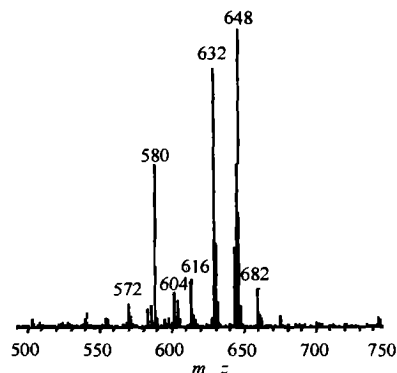


图 4 附子和半夏共煎液中生物碱的 ESIMS 图

Fig. 4 ESIMS Spectrum of alkaloids in concoction of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* and *Rhizoma Pinellae*

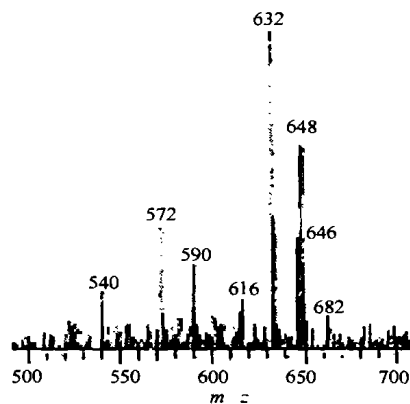
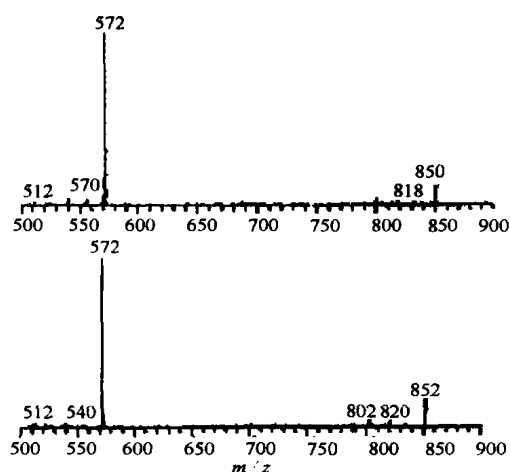


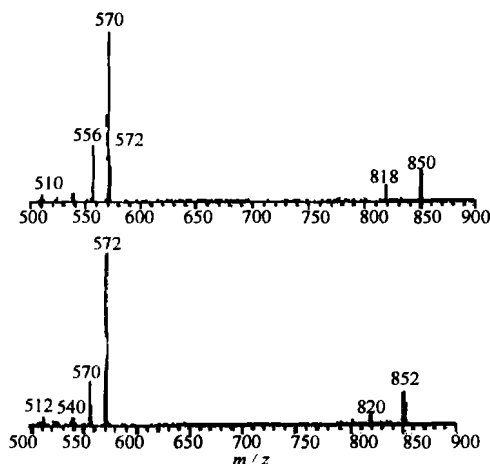
图 5 附子在 0.1 mol/L 盐酸煎煮液中生物碱的 ESIMS 图

Fig. 5 ESIMS Spectrum of alkaloids in decoction of *Radix Aconiti Lateralis Preparata* in 0.1 mol/L HCl

未转化成脂碱,生附子中的脂碱也没有溶出,否则在煎煮液中应检测到由于溶出的贡献而产生的脂碱。由于溶出主要受加热时间、水的体积和煎煮次数等因素影响,并且也难以找到弱酸性抑制脂碱溶出的化学解释,所以认为脂碱在弱酸 (pH 1~4) 条件下的不溶性可以作为其在中药复方 (pH 5~6) 中不溶的证据。另一方面,电喷雾串联质谱也可以进一步说明在生附子四逆汤和生附子中检测到的脂碱虽然质荷比相同,但组成不同,这里以两种离子为例,见图 6 和图 7。在生附子中, m/z 850 离子主要由 8-亚麻

图 6 生附子中 m/z 850 和 852 离子的二级串联质谱Fig. 6 MS² Spectrum on m/z 850 and 852 ions in crude

Radix Aconiti Lateralis Preparata

图 7 四逆汤中 m/z 850 和 852 离子的二级串联质谱Fig. 7 MS² Spectrum on m/z 850 and 852 ions
in Sini Decoction

酰-苯甲酰中乌头原碱组成(串联质谱中对应 m/z 572 离子), 8-亚油酰-苯甲酰去氧乌头原碱(对应 m/z 572 离子)的量很低, m/z 852 离子则对应单一的 8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱, 正如在前面分析的, 生附子中的脂碱与和它具有相同母核的双酯型生物碱在质量分数上具有正相关性; 但煎煮后, 这种

相关性发生明显变化, m/z 850 离子分别对应 8-亚油酰-苯甲酰去氧乌头原碱、8-亚麻酰-苯甲酰中乌头原碱和 8-十九碳二烯酰-苯甲酰次乌头原碱(对应 m/z 558 离子) 3 种脂碱, m/z 852 离子对应 8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱、8-油酰-苯甲酰中乌头原碱(对应 m/z 570 离子)和 8-十九碳-烯酰-苯甲酸次乌头原碱(对应 m/z 556 离子) 3 种脂碱。

由于脂碱在复方中的量很低, 结构又十分相似并且没有对照品, 所以采用传统的植物化学分离方法和常用的高效液相色谱法都难以对它们进行分析, 而且在处理过程中还可能造成脂碱的损失。本实验利用电喷雾质谱方法分析和对比不同的附子体系中乌头类生物碱的质量分数, 可以证明四逆汤中的脂类生物碱来源于剧毒性双酯型生物碱的酯交换反应, 也为含附子类中药复方的物质基础研究提供参考。

References:

- [1] Kitagawa D I, Yoshikawa M, Chen Z L, et al. Four new lipo-alkaloids from *Aconiti tuber* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30: 758-761.
- [2] Wang Y, Liu Z Q, Song F R, et al. Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the aconitines in the roots of aconite [J]. *Rapid Commun Mass Spectrum*, 2002, 16, 2075-2282.
- [3] Wang Y, Liu S Y. Study of *Aconitum* alkaloids using mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrum Soc* (质谱学报), 2002, 23 (2): 112-119.
- [4] Wang Y, Liu Z Q, Song F R, et al. Analysis of *Aconitum* alkaloids in the roots of *Baishan Aconitum* by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrum Soc* (质谱学报), 2002, 23 (3): 160-163.
- [5] Wang Y, Shi L, Song F R, et al. Exploring the reaction of ester exchange for diester-diterpenoid alkaloids in the process of decocting aconite by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrum*, 2003, 17 (4): 279-284.
- [6] Xu Y J, Song F R, Zhao H F, et al. Studies on antishock effect of active constituents in Ginseng Sini Tang [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (5): 392-394.
- [7] Wang Y, Song F R, Jin D M, et al. Studies on the *Aconitum* alkaloids in the Sini Concoction by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2004, 25 (1): 85-89.
- [8] 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.

欢迎订阅《中草药》杂志 2004 年增刊

为了加速中药现代化进程, 促进中药产业的技术创新, 我部编辑出版了以“新技术在中药现代化中的应用”为主要内容的增刊。该增刊共收载论文 120 篇, 总字数约 50 万字, 每本定价 60 元, 另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅, 款到寄刊。

编辑部地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编: 300193

网址: www.tjpr.com

电话: (022) 27474913 23006821

传真: (022) 23006821

E-mail: zcyzjb@tjpr.com