

• 制剂与质量 •

草乌花煎煮过程中三酯型乌头生物碱的酯交换反应

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 130022)

摘要:目的 研究草乌花煎煮过程中脂类生物碱的变化。方法 利用电喷雾离子阱质谱分析, 比较草乌花乙醇提取液、草乌花单煎液和草乌花煎煮后残渣中的生物碱。结果 在草乌花单煎液中易溶于水的别那宁质量分数显著提高, 未检测到脂肪酸酯型生物碱, 三酯型脂类生物碱成为煎煮过草乌花中的主要生物碱。结论 在草乌花煎煮过程中, 双酯型和三酯型乌头生物碱除发生水解反应外, 还发生酯交换反应生成双酯型和三酯型脂类生物碱。三酯型乌头生物碱的 C₈ 位乙酰基被各种长链脂肪酰基取代的酯交换反应为首次报道。

关键词: 草乌花; 酯交换反应; 电喷雾串联质谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)08-1156-03

Ester-exchange reactions for triester aconitines in decocting flowers
of *Aconitum kusnezoffii*WANG Yong¹, SONG Feng-rui², LIU Zhi-qiang², LIU Shu-ying²

(1. Key Laboratory of Microorganism and Genetic Engineering of Shenzhen City, College of Life Science, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; 2. New Drug Laboratory of Changchun Institute of Applied Chemistry, Changchun 130022, China)

Abstract: Objective To study how and why the lipo-alkaloids changed in decocting the flowers of *Aconitum kusnezoffii* (FAK). **Methods** The alkaloids in ethanol extract of FAK, FAK decoction, and the residues of decocted FAK were analyzed and compared by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MSⁿ). **Results** No lipo-alkaloids were detected in FAK decoction, however, triester-lipo-alkaloids become the dominant components in the residues of FAK decoction. **Conclusion** Besides hydrolysis reactions, ester-exchange reactions happen for diester-aconitines and triester-aconitines in the decocting of FAK. It is the first time to report that C₈-acetyl is displaced by long chain fatty acyl for triester-aconitines in the ester-exchange reactions.

Key words: the flowers of *Aconitum kusnezoffii* Reichb.; ester-exchange reaction; ESI-MSⁿ

草乌花 (the flower of *Aconitum kusnezoffii* Reichb., FAK) 是常用的蒙药, 可不经炮制直接使用。任玉琳等^[1]从草乌花中分离出次乌头碱、中乌头碱、10-OH-中乌头碱、3-乙酰-中乌头碱、3-乙酰-乌头碱、3-乙酰-10-OH-乌头碱 6 种 C₁₉二萜类生物碱和别那宁。近来, 电喷雾电离多级串联质谱 (ESI-MSⁿ) 被广泛用于分析生药及其煎煮液中的 C₁₉二萜生物碱。笔者应用 ESI-MSⁿ 不仅在附子和草乌花中发现了一系列新的乌头生物碱, 还证实了双酯型二萜生物碱在煎煮过程中发生酯交换反应生成双酯型脂类乌头生物碱^[2~4]。由于乌头生物碱骨架相同, 结构相似, 电离效率接近, 质谱峰的相对丰度可表示各

生物碱质量分数^[5]。草乌花煎煮液中的成分与草乌花 (醇提液) 显著不同, 本研究表明原因在于发生了双酯和三酯型乌头生物碱的酯交换反应, 并提示该反应有可能也发生在草乌中。

1 仪器与材料

美国 Finnigan LCQ 电喷雾质谱仪 (ESI-MSⁿ)。草乌花购于内蒙古呼和浩特市药店, 经长春中医药大学中药鉴定室姜大成教授鉴定为草乌 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的花序。试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 仪器条件: 毛细管温度 180 ℃; 喷雾电压 5 kV; 鞘气为氮气; 体积流量 60 L/h; 毛细管电压 38

收稿日期: 2005-10-21

基金项目: 深圳市科技计划资助项目 (200528)

作者简介: 王 勇 (1970—), 男, 吉林省四平人, 博士, 副教授, 从事质谱学和中药化学研究。

Tel: (0755) 26535432 E-mail: wyong@szu.edu.cn

V;碰撞能 42%;注射泵体积流量 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

2.2 溶液的制备:3 g 草乌花直接用 50 mL 无水乙醇提取,提取液用甲醇稀释 100 倍后进行电喷雾质谱;草乌花 4 g,用 150 mL 蒸馏水分别煎煮 3 次,急火加热沸腾后中火加热保持沸腾,每次 40 min,所得草乌花残渣用蒸馏水清洗滤过 3 次,晾干后用 50 mL 无水乙醇提取;所有实验均重复 3 次。

2.3 草乌花乙醇提取液和草乌花煎煮液中的生物碱:草乌花乙醇提取液的 ESI-MS 见图 1。图可分为 m/z 300~400,600~710,800~950 3 个区域。第一区域为质子化别那宁(m/z 360)和乙酰别那宁(m/z 402);第二区域为双酯和三酯型乌头生物碱,都具有 C_8 位乙酰基, C_{14} 位苯甲酰基的乌头碱骨架,三酯型生物碱的 C_3 位亦为乙酰基;在 m/z 800~900 区域,检测到了一系列双酯型脂类生物碱(diester-lipo-alkaloids),而在 m/z 900~950 区域,则对应以乌头碱等为母核, C_3 位为乙酰基, C_8 位为脂肪酰基的一系列三酯型脂类生物碱(triester-lipo-alkaloids)^[3]。质谱峰丰度提示,在草乌花中双酯型和三酯型乌头生物碱是主要成分,三酯型脂类生物碱的量较低。

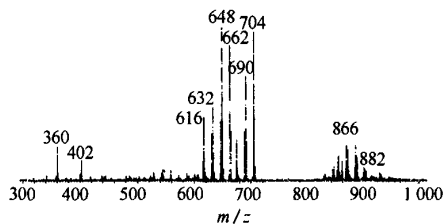


图 1 草乌花乙醇提取液的电喷雾质谱图

Fig. 1 ESI-MS Spectrum of ethanol extract of FAK

草乌花煎煮液的 MSI-MS 全谱见图 2。经串联质谱分析,在草乌花的水煎液中检测到别那宁、11-乙酰别那宁、乌头原碱、3-乙酰乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和双酯型生物碱 6 类生物碱^[6]。值得注意的是,与草乌花或附子单煎液不同^[7],在草乌花单煎液中未检测到脂类生物碱。另一方面,对比图 1 和图 2,不难发现别那宁和 3-乙酰-别那宁的质量分数显著提高,这与乌头碱类生物碱的水解产物(m/z 486~606 区域)应成为草乌花煎煮液中主要成分的预期不符,提示在煎煮过程中,部分双酯型和三酯型二萜生物碱发生酯交换反应生成了脂类生物碱。笔者曾用分析煎煮后残留生物碱的方法证明附子中的双酯型生物碱在煎煮过程中会发生酯交换反应^[4],现用相同方法证明三酯型生物碱发生的酯交换反应。

2.4 煎煮后草乌花中的残留生物碱与酯交换反应:

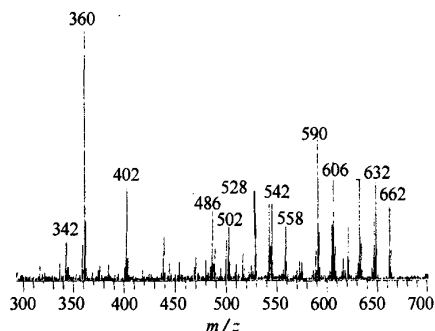


图 2 草乌花煎煮液中生物碱的电喷雾质谱图

Fig. 2 ESI-MS Spectrum of alkaloids in FAK decoction

见图 3。与煎煮前相比,三酯型脂类生物碱(m/z 900 以上区域)的丰度普遍增加,3-乙酰-8-棕榈酰-10-OH-苯甲酰乌头原碱作为基峰(m/z 900)被检测,而其只能由 3-乙酰-8-乙酰-10-OH-苯甲酰乌头原碱(m/z 704)经酯交换反应转化而来(棕榈酰基取代乙酰基,质荷比增加 196 单位),其他脂碱类同;在双酯型脂碱中,8-棕榈酰-苯甲酰次乌头原碱(m/z 812)在煎煮前观测不到,煎煮后其质量分数也显著升高。这些结果说明草乌花组织中的双酯型生物碱和三酯型生物碱除溶出后发生水解反应外,大部分未溶出而直接在草乌花组织上发生了酯交换反应,而脂类生物碱难溶于水,因此仍残留在药渣组织中。由于是草乌花单煎液,所以可以推断发生酯交换反应的长链脂肪酸必来源于草乌花自身,三酯型脂类生物碱的升高程度大于双酯型脂碱的原因应在于三酯型乌头生物碱比双酯型乌头碱更难溶于水,因而更容易发生酯交换反应。

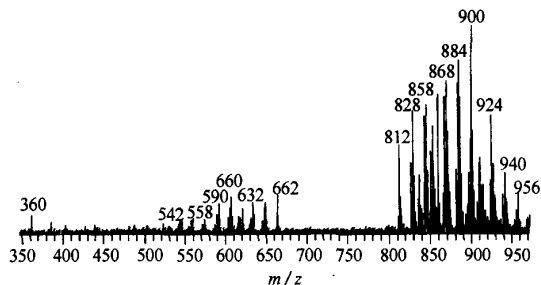


图 3 煎煮后草乌花中残留生物碱的电喷雾质谱图

Fig. 3 ESI-MS Spectrum of alkaloids in residues of decocted FAK

为进一步验证三酯型生物碱的酯交换反应,将 4 g 草乌花与 1 g 棕榈酸共煎后,分析草乌花组织上残留的生物碱,见图 4。在低质量分数区域无明显变化,但对应棕榈酸型脂类生物碱的 m/z 812、842、886、900 的质量分数明显增高,这些离子在二级串

联质谱中都失去一分子棕榈酸,说明棕榈酸取代乙酸发生了酯交换反应。对比图3和图4,一个明显的变化是 m/z 940离子消失。图5和图6是煎煮后草乌花残渣中检测到的 m/z 900、940离子的二级串联质谱,失去一分子棕榈酸相对分子质量为(256)和一分子十九碳一烯酸(相对分子质量为296)是它们的特征断裂,进一步说明了这两种离子分别对应3-乙酰-8-棕榈酰-10-OH-苯甲酰乌头原碱和3-乙酰-8-十九碳一烯酰-10-OH-苯甲酰乌头原碱。在煎煮液中存在大量棕榈酸的情况下,发生了棕榈酸与十九碳一烯酸的竞争反应,因此,在草乌花与棕榈酸共煎后的药渣中只检测到3-乙酰-8-棕榈酰-10-OH-苯甲酰乌头原碱(图4)。

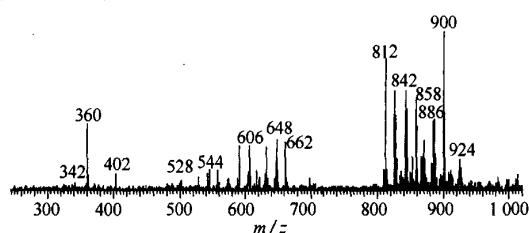


图4 与棕榈酸共煎煮后的草乌花药渣中残留生物碱的电喷雾质谱图

Fig. 4 ESI-MS Spectrum of alkaloids in residues of FAK decocted with palmitic acid

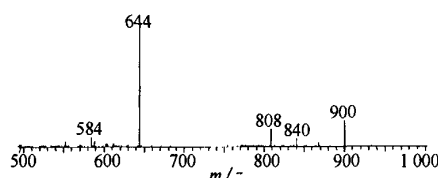


图5 煎煮后草乌花残渣中检测到的 m/z 900离子的电喷雾二级串联质谱图

Fig. 5 Tandem mass spectrum (MS^2) of m/z 900 ions detected in residues of decocted FAK

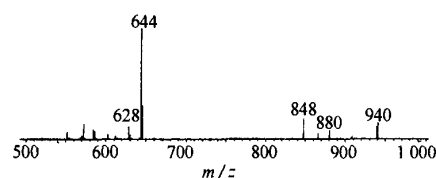


图6 煎煮后草乌花残渣中检测到的 m/z 940离子的电喷雾二级串联质谱图

Fig. 6 Tandem mass spectrum (MS^2) of m/z 940 ions detected in residues of decocted FAK

肪酰基取代生成三酯型脂类生物碱,该反应发生在药材组织中而非煎煮液中。该结构可以很好地解释草乌花可以不经炮制而直接使用的民间经验,因为有很大部分的双酯型和三酯型生物碱经酯交换反应生成了不溶于水的脂类生物碱。在草乌中也存在少量三酯型乌头生物碱(数据未给出),提示该反应也有可能发生在草乌的煎煮过程中。

References:

- [1] Ren Y L, Huang Z H, Jia S S. Isolation and identification of triester-diterpenoid from the flowers of *Aconitum kusnezoffii* Reichb. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1999, 34 (11): 873-876.
- [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 Spectr*, 2002, 16: 2075-2282.
- [3] Wang Y, Song F R, Xu Q X, et al. Characterization of aconitum alkaloids in the flowers of *Aconitum kusnezoffii* by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Mass Spectr*, 2003, 9: 962-970.
- [4] 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 Spectr*, 2003, 17: 279-284.
- [5] Wang Y, Shi L, Jin D M, et al. Striping and hydrolyzing balance of aconitum alkaloids in processing of Sini Decoction [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (4): 311-314.
- [6] Wang Y, Liu Z Q, Song F R, et al. Study on *Aconitum* diterpenoid alkaloids from flowers of *Aconitum kusnezoffii* and its decoction by ESI-MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, 38 (4): 290-293.
- [7] Wang Y, Song F R, Jin D M, et al. Studies on the *Aconitum* alkaloids in the Sini Decoction by electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2004, 25 (1): 85-89.

3 讨论

采用电喷雾质谱技术结合植物化学分离方法,利用酯交换反应的特点和电喷雾串联质谱适合分析乌头碱及其衍生物结构的优点,首次发现草乌花中的三酯型生物碱在煎煮过程中C₈乙酰基可以被脂

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青