

蒙药草乌芽中药效组分的电喷雾串联质谱分析

图 雅^{1,2}, 张贵君^{1*}, 刘志强³, 王淑敏⁴

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 内蒙古民族大学蒙医药学院, 内蒙古 通辽 028000; 3. 中国科学院长春应用化学研究所 新药研究室, 吉林 长春 130032; 4. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117)

摘要:目的 分析蒙药草乌芽的药效组分。方法 利用电喷雾串联质谱技术对蒙药草乌芽的乙醇提取液进行了直接分析鉴定。结果 ES/MS 可以给出相对分子质量信息, ES/MSⁿ 方法则可以从复杂体系中获得结构信息, 在草乌芽中发现乌头碱、中乌头碱、次乌头碱及它们的水解产物和脂类生物碱等 15 种二萜类生物碱。结论 草乌芽中的药效组分二萜类生物碱为首次报道, 这些生物碱的结构相似, 在电喷雾串联质谱中碎裂方式相同, 因此根据电喷雾串联质谱结果确定了这些生物碱的结构。

关键词: 草乌芽; 电喷雾串联质谱; 二萜类生物碱;

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)05-0694-04

Analysis on active components alignment in dried seedling of *Aconitum kusnezof fii* by ES/MSⁿ

TU Ya^{1,2}, ZHANG Gui-jun¹, LIU Zhi-qiang³, WANG Shu-min⁴

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. College of Mongolian Medicine, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China;

3. Department of New Drug Research, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130032, China; 4. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract : **Objective** To analyze the active components alignment in the dried seedling of *Aconitum kusnezof fii*. **Methods** The ethanol extract in the dried seedling of *A. kusnezof fii* was analyzed by the method of ES/MSⁿ. **Results** The information of molecular weight and structure could be obtained by using ES/MS and ES/MSⁿ, respectively, and 15 kinds of diterpenoid alkaloids including aconitine (AC), mesaconitine (MA), hyaconitine (HA), their hydrolysis products, and lipo-alkaloids were simultaneously determined. **Conclusion** The diterpenoid alkaloids in the dried seedling of *A. kusnezof fii* are reported for the first time as its bioactive components. These alkaloids structures are identified by ES/MSⁿ because their structures and the fragmentation regularity are similar.

Key words : the dried seedling of *Aconitum kusnezof fii* Reichb.; ES/MSⁿ; diterpenoid alkaloids

蒙药草乌芽为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezof fii* Reichb. 的干燥幼苗, 载于《认药白晶鉴》; 具有杀菌、消炎、清热、止痛的功效^[1]。草乌芽的化学成分未见研究报道, 本实验利用电喷雾串联质谱对蒙药草乌芽中的生物碱进行分析。电喷雾电离 (ESI) 具有高灵敏度、特异性强、操作简便快速等优点, 利用电喷雾质谱技术研究草乌芽生物碱, 不仅可以从一级谱中得到相对分子质量信息, 还可以利用串联质谱的高选择性增强分析方法的可靠性和进

一步获得结构信息^[2]。

1 仪器与材料

LCQ 电喷雾质谱仪 (美国 Finnigan 公司); 无水乙醇、甲醇为分析纯; 乌头碱对照品购于中国药品生物制品检定所; 测试植物采自内蒙古通辽市罕山, 经张贵君教授鉴定为北乌头 *A. kusnezof fii* Reichb. 的干燥幼苗。

2 实验条件

毛细管温度 180 , 喷雾电压 4.8 kV, 离子透

* 收稿日期: 2008-08-10

基金项目: 国家教育部科学技术研究重点项目 (00167); 国家自然科学基金地区科学基金项目 (30860391)

作者简介: 图雅, 女, 2005 级博士研究生, 内蒙古民族大学蒙医药学院副教授。

* 通讯作者 张贵君 E-mail: guijunzhang@163.com

镜补偿电压 15 V,碰撞能 25 % ~ 43 %,氮气流速 60 unit,毛细管电压 38 V,注射泵流速 2 μ L/min。

3 实验方法

分别称取乌头碱、中乌头碱和次乌头碱对照品 1 mg,溶解于 50 mL 无水乙醇中;5 g 草乌芽浸于 20 mL 无水乙醇中。取上述乙醇溶液和提取液用甲醇稀释 100 倍后分别进行 ESI-MS 分析。

4 结果和讨论

4.1 草乌芽中生物碱的电喷雾质谱研究:图 1 为草乌芽乙醇提取液的 ESI-MS 全谱,由图 1 可观察到 m/z 616, 632, 646, 588, 590, 648, 662, 688, 704, 828, 842, 866, 868, 882, 852 离子。电喷雾质谱为软电离技术,在一级谱中不产生碎片,每个峰代表一种化学成分,因此从电喷雾质谱一级谱的数据可以获得各种生物碱类化合物的相对分子质量信息。结合文献^[3,4],可以推断 m/z 646, 632, 616, 648, 662 离子分别对应双酯型生物碱乌头碱 (aconitine, AC)、中乌头碱 (mesaconitine, MA)、次乌头碱 (hypoaconitine, HA)、北乌头碱 (beiwutine) 和 10-羟基乌头碱 (aconifine);低质量区的 m/z 590 和 588 等弱峰分别对应单酯型生物碱苯甲酰中乌头原碱 (benzoylmesaconine) 和苯甲酰脱氧乌头碱 (benzoyldeoxyaconine),它们分别与相应的双酯型生物碱的结构差别仅在于 C_8 位的羟基^[5];另外,还发现了 m/z 688 和 704 等很弱的峰以及 m/z 828, 842, 852, 866, 868, 882 等多个峰,对照文献数据^[3,6],初步推断可能分别是三酯型和酯型生物碱。因为这些化学成分在草乌芽中首次报道,仅仅根据相对分子质量确定是不够的,所以通过串联质谱获取它们的结构信息十分必要。草乌芽中生物碱类化合物的化学结构见图 2。

4.2 草乌芽中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究:为进一步确认草乌芽中的生物碱类化合物,首先

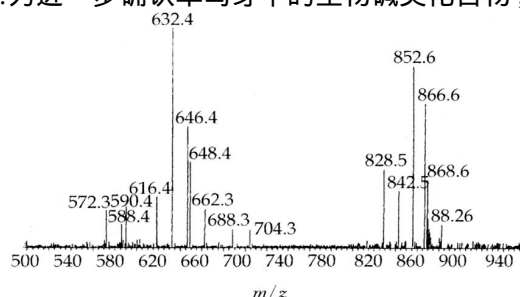
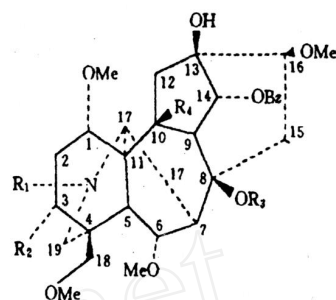


图 1 草乌芽中乙醇提取物的 ESI-MS 质谱

Fig 1 ESI-MS Spectrum of ethanol extract from dried seedling of *A. kusnezoffii*



生物碱	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	[M+H] ⁺
乌头碱	Et	OH	Acetyl	H	646
中乌头碱	Me	OH	Acetyl	H	632
次乌头碱	Me	H	Acetyl	H	616
苯甲酰中乌头原碱	Me	OH	H	H	590
苯甲酰去氧乌头原碱	Et	H	H	H	588
10-羟基-乌头碱	Et	OH	Acetyl	OH	662
3-乙酰乌头碱	Et	Oacetyl	Acetyl	H	688
3-乙酰-10-羟基乌头碱	Et	Oacetyl	Acetyl	OH	704

图 2 草乌芽中生物碱结构

Fig 2 Structures of aconitum alkaloids in dried seedling of *A. kusnezoffii*

对乌头碱、中乌头碱和次乌头碱对照品的甲醇溶液进行了电喷雾串联质谱研究,主要质谱碎裂数据见表 1。实验结果表明,在二级串联质谱中均从 C_8 位失去醋酸(相对分子质量 60),生成相对丰度较强的离子^[6]。乌头碱、中乌头碱和次乌头碱在三级串联质谱中均能失去 CH_3OH 、 CO 和 C_6H_5OOH 等中性分子。此外,乌头碱和中乌头碱还能失去 H_2O ,而次乌头碱则没有失 H_2O 反应。从图 2 可知,次乌头碱与乌头碱和中乌头碱的结构差别是 C_3 位不含羟基,表明乌头碱和中乌头碱在三级质谱中失去的水来自 C_3 位的羟基,也说明 C_3 与 C_{13} 和 C_{15} 位羟基断裂有明显的不同, C_3 位的羟基较易以脱水形式失去,而 C_{15} 位的羟基以失去 CO 方式断裂。另外, C_{14} 位取代基仅在三级串联质谱才失去,说明 C_{14} 取代基与环结合较强。图 1 中的 m/z 616, 632 和 646 离子的串联质谱图分别与次乌头碱、中乌头碱和乌头碱对照品的串联质谱图完全相同,进一步说明它们分别对应这 3 种双酯型生物碱。北乌头碱和 10-羟基乌头碱的串联质谱相似,说明 C_{10} 位羟基对生物碱的串联质谱无影响。

图 1 中, m/z 588 和 590 离子分别对应苯甲酰脱氧原乌头原碱和苯甲酰中乌头原碱^[5];对比 m/z 590 离子的二级质谱分别与中乌头碱对照品的二级质谱(图2)可见, m/z 590 离子在二级质谱中未失去

表 1 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱[M + H]⁺ 离子质谱数据

Table 1 MS² and MS³ Spectra of [M + H]⁺ ions for AC, MA, and HA

	乌头碱	次乌头碱	中乌头碱	乌头碱
MS ²	MH ⁺	616(18)	632(24)	646(42)
	MH ⁺ -60	556(100)	572(100)	586(100)
MS ³	MH ⁺ -60	556(8)	572(10)	586(30)
	MH ⁺ -60-8	—	554(5)	568(4)
	MH ⁺ -60-32	524(100)	540(66)	554(50)
	MH ⁺ -60-32-18	—	522(28)	536(16)
	MH ⁺ -60-32-28	496(80)	512(100)	526(100)
	MH ⁺ -60-32 * 2	492(8)	508(8)	522(3)
	MH ⁺ -60-32 * 2-18	—	490(6)	504(2)
	MH ⁺ -60-32 * 2-28	464(6)	480(6)	494(5)
	MH ⁺ -60-32 * 3-122	338(18)	354(16)	368(18)

醋酸(相对分子质量 60)生成相应的离子,但却观察到了失去水(相对分子质量 18)生成 m/z 572 离子,三级串联质谱与中乌头碱对照品的三级串联质谱(表 1)完全相同,表明在二级串联质谱中, m/z 590 离子生成的 m/z 572 离子与中乌头碱对照品离子生成的 m/z 572 离子结构完全相同,说明 m/z 590 离子所对应的化合物是苯甲酰中乌头原碱。用相同的方法进一步确定了 m/z 588 离子所对应的化合物是苯甲酰脱氧原乌头原碱,它们是相应的双酯型生物碱通过 C₈ 位水解失去乙酰基的产物,属单酯型生物碱,其相应的化学结构见图 2。

在图 1 中, m/z 688 和 704 处存在 2 个弱峰。图 3 为 m/z 704 离子的串联质谱,与草乌花中 3-乙酰基-10-羟基-乌头碱的串联质谱^[6] 完全相同,由于生物碱的串联质谱与其结构密切相关,同时根据生物碱的来源,可以确定该离子就是 3-乙酰基-10-羟基-乌头碱离子。同理,可以确定 m/z 688(串联质谱未列出)为 3-乙酰乌头碱。

脂类生物碱的结构与双酯型和三酯型生物碱的结构相似,在 ESFMS² 中,乌头碱类二萜生物碱的 C₈ 位乙酰基或脂肪酰基以中性羧酸分子的形式丢

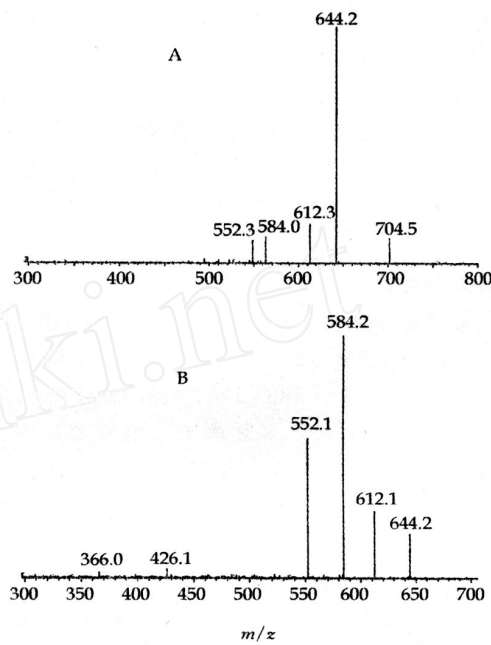


图 3 草乌芽的 m/z 704 离子的 ESFMS² (A) 和 ESFMS³ (B) 的 ESFMS 图像

Fig 3 ESFMS Spectrum of ESFMS² (A) and ESFMS³ (B) spectra of ion at m/z 704 for dried seedling of *A. kusnezofii*

失,这作为特征断裂可用于识别 C₈ 位基团^[6],检测到的子离子则可反映出母核的结构。它们的三级串联质谱与相应的双酯型和三酯型生物碱的三级串联质谱也完全相同。通过在串联质谱中所失去的质量数以及生成的子离子的种类,可以确定脂类生物碱的结构。例如,图 4a~c 分别是 m/z 852, 868 和 828 离子的 ESFMS,它们分别丢失 280 Da(亚油酸), 296 Da(十九碳 1 烯酸)和 256 Da(棕榈酸),得到 m/z 572 离子,说明它们分别对应 8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱、8-十九 1 烯酰苯甲酰中乌头原碱和 8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱,草乌芽中总脂类生物碱见表 2。

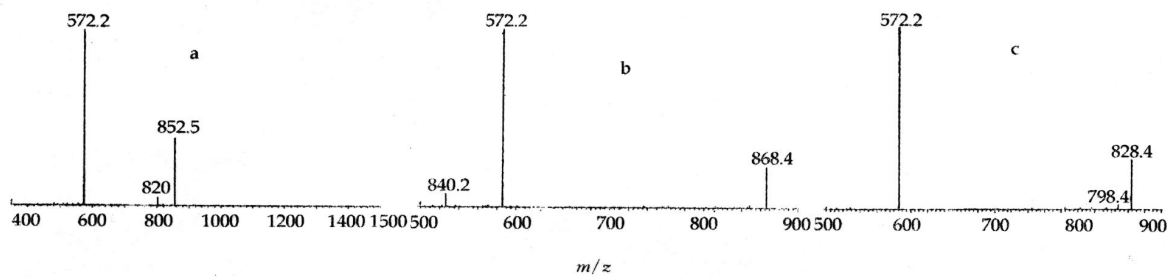


图 4 脂类生物碱在 m/z 852(a), m/z 868 (b) 和 m/z 828(c) 的 ESFMS²

Fig 4 ESFMS² Spectra of liporalkaloids in m/z 852 (a), m/z 868 (b), and m/z 828 (c)

表 2 草乌芽中的脂类生物碱

Table 2 Lipoalkaloids in dried seedling of *A. kusnezofii*

脂类生物碱	母核离子	中性离子	子离子
8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱(8-pal-benzoylmesaconine)	828	256	
8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱(8-lino-benzoylmesaconine)	852	280	572
8-十九-1-烯酰-苯甲酰中乌头原碱(8-ndr-benzoylmesaconine)	868	296	
8-棕榈酰-苯甲酰乌头原碱(8-pal-benzoylaconine)	842	256	
8-O-亚油酰-苯甲酰乌头原碱(8-O-lino-benzoylaconine)	866	280	586
8-O-十九-1-烯酰-苯甲酰乌头原碱(8-O-ndr-benzoylaconine)	882	296	

5 结论

利用电喷雾质谱直接分析草乌芽中二萜类生物碱混合物,它们的二级串联质谱丢失中性脂肪酸的特征可以用来推测其结构,为该药材的快速鉴定提供了一种有效的方法。该方法样品处理简单,分析速度快且灵敏度高,充分发挥了串联质谱适合做混合物分析鉴定的优点。

参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.《中华本草》(蒙药卷)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
[2] Isao K, Masayuki Y, Zhao L C, et al. 4Newlipo-alk aloids from aconiti tuber [J]. Chem Pharm Bull, 1982, 30 (2):

758-761.
[3] 任玉琳,黄兆宏,贾世山. 蒙药草乌花中三酯型二萜生物碱的分离和鉴定 [J]. 药学报, 1999, 34(11): 873-876.
[4] Sun W X, Liu S Y, Liu Z Q, et al. A study of aconitum alkaloids from aconite roots in *Aconitum carmichaeli* Debx using matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1998, 12 (13): 821-824.
[5] 周远鹏,陈迪华,刘文化,等. 乌头碱及其类似物的毒性和对心脏收缩功能的影响 [J]. 药学报, 1984, 19(9): 641-646.
[6] Sun W X, Song F R, Cui M, et al. Simultaneous determination of Lipo-Alk aloids extracted from *Aconitum carmiechaeli* using electrospray ionization mass spectrometry and multiple tandem mass spectrometry [J]. Planta Med, 1999, 65: 432.

桤柳抗肿瘤萜类成分研究

王 斌¹,姜登钊²,李国强²,管华诗^{2*}

(1. 浙江海洋学院食品与药学院、医学院,浙江 舟山 316004; 2. 中国海洋大学 医药学院,山东 青岛 266003)

摘要:目的 对桤柳 *Tamarix chinensis* 抗肿瘤化学成分进行分离和鉴定。方法 使用硅胶、Sephadex L H-20、ODS 和 HPLC 分离、纯化,利用 NMR 技术确定结构。采用 MTT 法和 SRB 法测定了所得化合物的抗肿瘤活性。结果 分离鉴定了 10 个萜类化合物,分别为白桦脂醇(betulin,)、白桦脂酸(betulinic acid,)、羽扇豆醇(lupeol,)、24-亚甲基环阿尔廷醇(24-methylene-cycoartanol,)、杨梅二醇(myricadiol,)、异杨梅二醇(isomyricadiol,)、异油桐醇酸(isoaleuritolic acid,)、isoaleuritolic acid 3-*p*-hydroxycinnamate()、20-羟基齐墩果酸(maslinic acid,)和植醇(phytol,)。结论 化合物 、 和 首次从桤柳属中分离得到,其他化合物均为首次从该种中得到。体外抗肿瘤活性实验显示在 50 μg/ mL 下,化合物 ~ 、 和 对人肺癌细胞 A-549,化合物 对人肝癌细胞株 BEL-7402 显示有意义的细胞毒性。

关键词:桤柳;萜类;抗肿瘤活性

中图分类号:R284. 1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)05-0697-05

桤柳,又名西河柳,本草记载始于《日华子》,名赤桤木。以桤柳为名则见于《本草图经》“柳华”条下,云:“杰桤木,生河西沙地,皮赤,叶细,即是今所谓桤柳者,又名春柳。”其作为药材,是指桤柳科植物桤柳 *Tamarix chinensis* Lour. 的嫩枝叶,于未开花时采收、阴干。桤柳味甘、辛,性平,归肺、胃、心经。有疏风、解表、透疹之功效。主治麻疹不透,风湿痹

痛^[1]。桤柳煎剂灌胃给药,对四氯化碳诱发的急性肝炎小鼠有保肝作用^[2]。另有报道,桤柳 70 %乙醇提取物具有解热、镇痛之功效^[3]。桤柳主产于辽宁、河北、河南、山东、江苏。此外,分布于内蒙古、宁夏、甘肃、青海等地的多枝桤柳 *T. ramosissima* Ledeb.,在产地亦作桤柳使用^[4]。文献报道^[5,6],从该种植物中分离得到了山柰酚-4-⁴甲醚、槲皮素-3',

* 收稿日期:2008-07-23
基金项目:国家海洋局 908 专项(908-01-ST12,908-02-05-04);863 重点项目(2007AA091701)
作者简介:王 斌(1977—),男,博士,讲师。 Tel:15957099697 E-mail:binwang4159@hotmail.com