

## 乌头碱类双酯型二萜生物碱水解反应的电喷雾质谱分析

包 懿<sup>1,2</sup>, 宋凤瑞<sup>1</sup>, 刘志强<sup>1</sup>, 刘淑莹<sup>1</sup>, 殷 军<sup>2</sup>

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 绿色化学与过程实验室, 吉林 长春 130022;

2. 沈阳药科大学, 中药学院生药实验室, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 阐明了乌头碱类双酯型二萜生物碱水解反应过程, 确定水解反应的类型以及最佳水解条件。利用电喷雾离子阱质谱分析比较了生川乌提取液, 制川乌提取液及其水解反应提取液中生物碱的差异。生川乌炮制后生物碱大多数由双酯型水解转化为单酯型, 水解反应最容易发生的位置在 C<sub>8</sub> 位, 水解反应的类型是烷氧键发生断裂的酯的碱性水解。

**关键词:** 乌头碱类二萜生物碱; 双酯型二萜生物碱; 电喷雾质谱; 水解反应

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2009)01-01-05

## Analysis on Hydrolyzation of Aconitum Diester Diterpenoid Alkaloids by Electrospray Ionization Mass Spectrometry

BAO Yi<sup>1,2</sup>, SONG Feng-rui<sup>1</sup>, LIU Zhi-qiang<sup>1</sup>, LIU Shu-ying<sup>1</sup>, YIN Jun<sup>2</sup>

(1. *Green Chemistry and Process Laboratory of Changchun Institute of*

*Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;*

2. *College of Traditional Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*)

**Abstract:** The hydrolyzation process of aconitum diterpenoid alkaloids was studied, and the reaction type was defined according to its optimized experimental conditions. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was introduced to compare the difference in alkaloids types among the extraction of crude aconite roots and prepared aconite roots. After processing of crude aconite roots, most of the diester diterpenoid alkaloids converted to the monoester form, while C<sub>8</sub> was the major location for such reaction. It is a typical alkali-catalyzed hydrolysis derived from the decomposition of the alkoxy chain.

**Key words:** aconitum diterpenoid alkaloids; diester diterpenoid alkaloids; electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS); hydrolysis

收稿日期: 2008-04-18; 修回日期: 2008-07-11

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30672600, 30472134)项目, 973 中医理论专项(2006CB504706)资助

作者简介: 包 懿(1981~), 男(蒙古族), 内蒙古人, 硕士研究生, 从事中药化合物提取分离与分析领域研究。

E-mail: baoyi81@126.com

通信作者: 宋凤瑞(1962~), 女(汉族), 吉林人, 博士, 研究员, 从事中药质量标准及药物质谱研究。E-mail: songfr@ciac.jl.cn

乌头碱类二萜生物碱是乌头属植物中主要的活性成分,具有镇痛、消炎、强心和抗癌等药理作用<sup>[1-3]</sup>。乌头碱类二萜生物碱主要有 3 类:单酯型二萜生物碱、双酯型二萜生物碱和脂型二萜生物碱,其结构示于图 1。其中双酯型二萜生物碱的毒性最大,在乌头属中药材的生品中含量最高,所以生品都需要通过炮制以达到减毒增效的目的,然后再经中医临床使用<sup>[4]</sup>。一般认为,水解反应是炮制过程中发生的重要化学反应。

电喷雾电离(ESI)是近年来发展起来的一种软电离技术,在分析生物碱方面具有灵敏度高、特异性强、操作简单快速、能部分表征结构等优点。利用电喷雾质谱技术研究川乌中的生物碱,不仅可以从一级谱中得到相对分子质量的信息,还可以进行碰撞诱导解离获取生物碱碎片离子的信息,从而获取更多的结构信息。此外,在进行结构分析过程中,样品不需分离,可以避免植物中微量成分的丢失<sup>[5]</sup>。

本工作以双酯型二萜生物碱为研究对象,利用电喷雾质谱技术对其水解过程进行跟踪分析,对水解条件进行优化,以阐明生川乌炮制过程中双酯型二萜生物碱水解的化学反应机理,并用质谱串联技术对其进行论证。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与药材

Finnigan LCQ™ 电喷雾质谱仪;美国 Thermo-Finnigan 公司产品。

生川乌:四川江油饮片厂产品;制川乌:四川江油饮片厂产品,经过长春中医药大学王淑敏教授鉴定;乌头碱、中乌头碱和次乌头碱对照品:中国药品生物制品检定所产品;甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

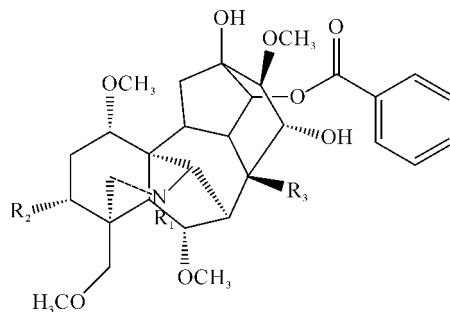
### 1.2 样品的制备

**1.2.1 总生物碱的制备** 将生川乌、制川乌各 10 g 粉碎成粗粉,用 10 倍量的乙醇浸泡提取 3 次,浓缩后用无水乙醇醇沉后浓缩,50 °C 蒸干。总生物碱的提取物用甲醇定容至 10 mL,电喷雾质谱仪检测。

**1.2.2 双酯型二萜生物碱粗提物的制备** 取生川乌中总生物碱粗提物于环己烷-乙醇-水(2:1:1)溶剂系统进行萃取,将萃取后的下层溶液浓缩,50 °C 蒸干,用甲醇定容至 10 mL,电喷雾质谱仪检测。

**1.2.3 单酯型二萜生物碱粗提物的制备** 取制川乌中总生物碱粗提物于环己烷-乙醇-水(2:1:1)溶剂系统进行萃取,将萃取后的下层溶液浓缩,50 °C 蒸干,再将其调制成 pH 9~10 的水溶液,100 °C 水浴加热 3 h 后,用氯仿萃取,将氯仿在 60 °C 蒸干得浸膏。取浸膏用甲醇定容至 10 mL,电喷雾质谱仪检测。在该质谱条件下,氯仿溶液对离子化效率没有影响。

**1.2.4 对照品溶液的制备** 取 1.5 mg 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱对照品,分别用甲醇定容至 10 mL,电喷雾质谱仪检测。



生物碱	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
双酯型二萜生物碱	甲基或乙基	羟基或氢	乙酰氧基
单酯型二萜生物碱	甲基或乙基	羟基或氢	羟基
脂型二萜生物碱	甲基或乙基	羟基或氢	脂肪酰氧基

图 1 乌头中乌头类二萜生物碱的结构

Fig. 1 Structure of aconitum alkaloids in radix aconite lateralis preparata

### 1.3 质谱条件

毛细管温度 180 °C; 喷雾电压 5 kV; 离子透镜补偿电压 15 V; 碰撞能量 20%~42%; 壳气为氮气; 毛细管电压 38 V; 注射泵流速 3  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

## 2 结果与讨论

川乌中的乌头生物碱包括单酯型二萜生物碱(monoester-diterpenoids, MDAs), 双酯型二萜生物碱(diester-diterpenoids, DDAs)和脂型二萜生物碱(lipo-alkaloids)。单酯型二萜生物碱包括苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine, BH), 苯甲酰中乌头原碱(benzoylmesaconine, BM)和苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine, BA)等; 双酯型二萜生物碱包括乌头碱(aconitine, AC), 中乌头碱(mesaconitine, MA)和次乌头碱(hypaconitine, HA)等; 脂型二萜生物碱是双酯型二萜生物碱的  $\text{C}_8$  位被脂肪酰基取代所形成的一类生物碱。通过分析比较生川乌和制川乌中生物碱的类型和相对含量, 了解了双酯型二萜生物碱结构上的差异和反应条件的变化对水解反应的影响, 并利用双酯型二萜生物碱的 3 种对照品及其水解产物的电喷雾质谱检测和双酯型二萜生物碱的质谱裂解规律对水解反应机理进行论证。

### 2.1 川乌中总二萜生物碱的电喷雾质谱分析

乌头碱类二萜生物碱在电喷雾质谱条件下形成质子化分子, 通过质荷比和相关文献数据可以初步确定各离子峰的归属, 通过串联质谱可进一步确定其结构<sup>[6]</sup>。制川乌乙醇提取液的电喷雾质谱图示于图 2a, 从中可以观察到以下质子

化的生物碱分子: 苯甲酰次乌头原碱( $m/z$  574)、苯甲酰中乌头原碱( $m/z$  590)、苯甲酰乌头原碱( $m/z$  604)、乌头碱( $m/z$  646)、中乌头碱( $m/z$  632)、次乌头碱( $m/z$  616)。除检测到以上生物碱外, 还发现一系列生物碱( $m/z$  800~900), 它们是以双酯型二萜生物碱为母核,  $\text{C}_8$  上乙酰基被棕榈酰基、亚油酰基或油酰基等脂肪酰基取代后衍生出的一类生物碱<sup>[7-9]</sup>。生川乌乙醇提取液的电喷雾质谱图示于图 2b, 其中各质谱峰所代表的质子化生物碱分子与制川乌相同, 只是相对含量有所差异。在图 2a 中  $[\text{BM} + \text{H}]^+$  ( $m/z$  590) 是基峰, 而图 2b 中的基峰是  $[\text{HA} + \text{H}]^+$  ( $m/z$  616)。这些生物碱的基本母核类似, 电离效率相近, 所以它们质谱峰的相对丰度可以近似的看作是它们的相对含量, 所得数据具有很好的重现性<sup>[10]</sup>。

### 2.2 川乌中单酯型与双酯型二萜生物碱的电喷雾质谱分析

比较图 2a、图 2b 发现, 生川乌经过炮制后生成制川乌, 其相对含量最大的双酯型二萜生物碱在炮制过程中大部分水解成单酯型二萜生物碱。通过比较水解前后各个生物碱的质量数, 不难发现水解后每个双酯型二萜生物碱的质量数少了 42, 转化成相对应的单酯型二萜生物碱。在一定条件下, 双酯型二萜生物碱除了发生水解反应外, 还发生酯交换反应, 生成新的酯型二萜生物碱<sup>[11]</sup>。为排除干扰, 先除去酯型二萜生物碱。制川乌与生川乌乙醇提取液除去酯型二萜生物碱后的电喷雾质谱图, 分别示于图 3a、图 3b。

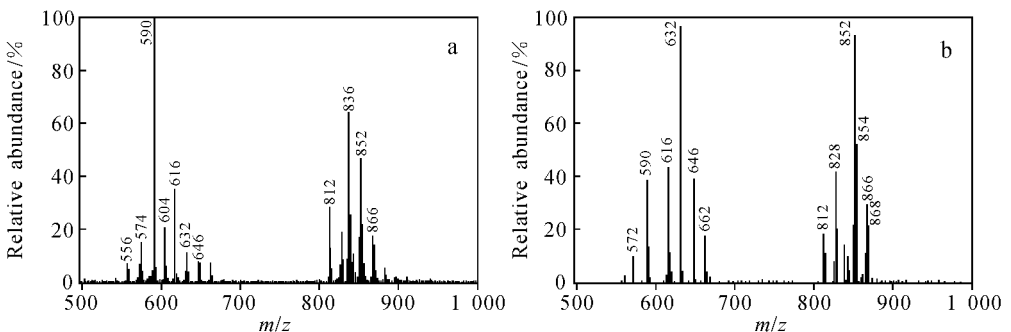


图 2 制川乌(a)与生川乌(b)提取液电喷雾质谱图

Fig. 2 ESI-MS spectra of extraction from prepared aconite roots(a) and crude aconite roots(b)

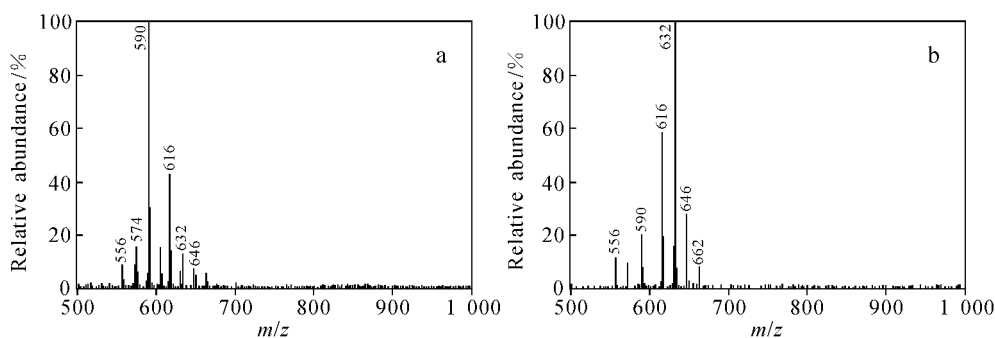


图 3 制川乌(a)与生川乌(b)中单酯型与双酯型二萜生物碱的电喷雾质谱图

Fig. 3 ESI-MS spectra of monoester and diester diterpenoid alkaloids from prepared aconite roots(a) and crude aconite roots(b)

### 2.3 双酯型二萜生物碱水解过程的研究

一般来讲,酯的水解形式主要分成酸性水解和碱性水解。在酸性条件下,酯水解是酯化的逆反应,是可逆的;而在碱性条件中,酯水解是不可逆的,碱在反应中不只是催化剂,而且是参加反应的试剂,其反应完全、速度快,是常用的方法<sup>[12]</sup>。研究表明,双酯型二萜生物碱在弱酸性

条件下(pH 5~6)发生不完全水解,而在较强酸性条件下(pH < 4),加热沸腾 2 h 也只有少部分发生水解<sup>[13]</sup>。先假设双酯型二萜生物碱的水解在碱性条件下为宜,进而可以推断出 C<sub>8</sub> 位酯键的水解是烷氧键发生断裂的酯的碱性水解形式,其反应过程示于图 4。

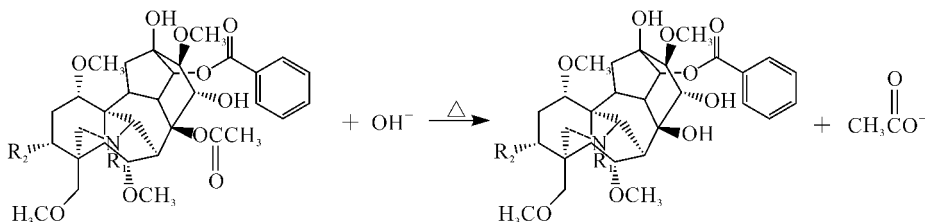


图 4 双酯型二萜生物碱的碱性水解反应过程

Fig. 4 Alkali-catalyzed hydrolysis procedure of diester diterpenoid alkaloids

为了验证上述推断,利用碱性水解法对双酯型二萜生物碱粗提物进行水解实验,最后用电喷雾质谱分析,其谱图示于图 5。从图 5 可以看出,没有检测到任何双酯型二萜生物碱,仅发现苯甲酰次乌头原碱( $m/z$  574)、苯甲酰中乌头原碱( $m/z$  590)、苯甲酰乌头原碱( $m/z$  604)等单酯型二萜生物碱。

为了再进一步验证该推断,针对双酯型二萜生物碱进行电喷雾二级串联质谱 MS<sup>2</sup> 分析,结果发现双酯型二萜生物碱的质子化分子全部裂解为相对分子质量为 60 的中性碎片,疑为脱掉一分子的乙酸,其谱图示于图 6。而双酯型二萜生物碱的分子结构中能脱掉一分子乙酸的位置只能在 C<sub>8</sub> 位。再利用双酯型二萜生物碱的 3 种

对照品进行碱性水解,电喷雾质谱分析说明,在

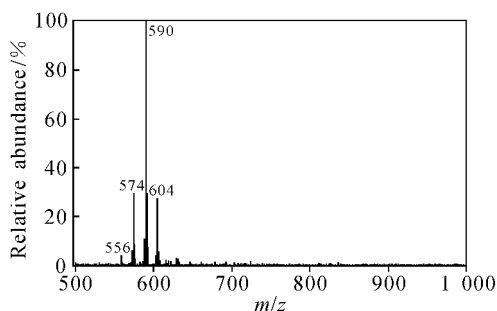


图 5 双酯型二萜生物碱水解后氯仿提取液的电喷雾质谱图

Fig. 5 ESI-MS spectra of chloroform extract from hydrolysis products of diester diterpenoid alkaloids

碱性条件下水解完全,这与上述的推断结果相一致。

### 3 结 论

综上所述,通过对双酯型二萜生物碱的水解条件考察,发现了川乌在炮制过程中减毒增效的机理,在炮制过程中双酯型二萜生物碱大部分发生水解反应,降低了双酯型二萜生物碱的含量,生成毒性更小的单酯型二萜生物碱,从而达到了

减毒增效目的。更重要的是,本研究利用碱性水解法重点考察了川乌中 pH 值的范围在双酯型二萜生物碱水解反应中的影响,最后确定水解反应的类型,进一步阐述了双酯型二萜生物碱水解反应的理论基础。

因此,本研究结果不仅对各类型生物碱的提取方法和中药炮制机理的研究有重要的理论依据,对揭示中药复方配伍规律同样具有参考价值。

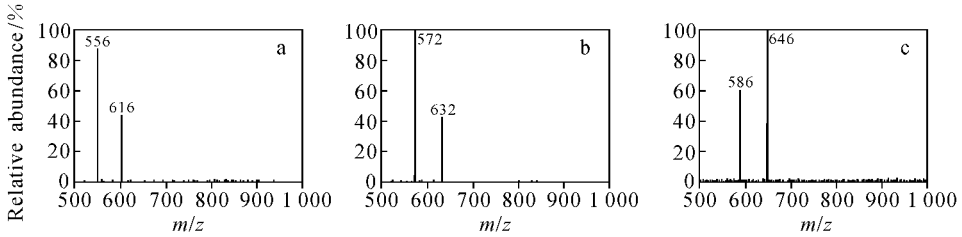


图 6 双酯型二萜生物碱的  $m/z$  616 离子(a)、 $m/z$  632 离子(b)和  $m/z$  646 离子(c)二级串联质谱图

Fig. 6 ESI-MS/MS spectra of the ion at  $m/z$  616(a),  $m/z$  632(b) and  $m/z$  646(c)

### 参考文献:

- [1] SUZUKI Y, OYAMA T, ISHIGE A, et al. Antinociceptive mechanism of the aconitine alkaloids mesaconitine and benzoylmesaconine [J]. *Planta Med*, 1994, 60: 391-394.
- [2] DESAI H K, HART B P, CALDWELL R W, et al. Certain norditerpenoid alkaloids and their cardiovascular action[J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(6): 743-748.
- [3] AMERI A. Inhibition of stimulus-triggered and spontaneous epileptiform activity in rat hippocampal slices by the aconitum alkaloid mesaconitine [J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, 342(2/3): 183-191.
- [4] 张聿梅, 鲁 静, 蒋 渝, 等. 川乌和制川乌中单酯及双酯型生物碱成分的含量测定[J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(7): 807-812.
- [5] 王 勇, 宋凤瑞, 金东明, 等. 复方中药四逆汤中乌头碱类二萜生物碱的电喷雾串联质谱研究[J]. *高等学校化学学报*, 2004, 25(1): 85-89.
- [6] 许庆轩, 王 勇, 刘志强, 等. 草乌中二萜类生物碱的电喷雾串联质谱研究[J]. *高等学校化学学报*, 2005, 26(4): 638-641.
- [7] 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: 2 075-2 282.

- [8] 王 勇, 刘淑莹. 乌头碱类生物碱的质谱研究进展[J]. *质谱学报*, 2002, 23(2): 112-119.
- [9] 王 勇, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 白山草乌中二萜生物碱的电喷雾串联质谱分析[J]. *质谱学报*, 2002, 23(3): 160-163.
- [10] TANG L, KEARLE P. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution[J]. *Anal Chem*, 1993, 65(24): 3 654-3 668.
- [11] 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.
- [12] 倪沛洲. 有机化学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 301-302.
- [13] 王 勇, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 四逆汤中脂类生物碱来源于酯交换反应的研究[J]. *中草药*, 2006, 37(1): 51-54.