

## 蒙药嘎日迪五味丸中二萜生物碱的 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析

王 勇<sup>1</sup>, 夏 博<sup>1</sup>, 邓晓春<sup>1</sup>, 刘淑莹<sup>2</sup>

(1. 深圳大学生命科学学院, 广东 深圳 518060; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022)

**摘要:** 采用基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF)对蒙药嘎日迪五味丸中的生物碱进行分析和鉴定。通过准确的相对分子质量测定,在嘎日迪五味丸中检测到了双酯型生物碱、单酯生物碱型和脂类生物碱共 21 种乌头生物碱,为复方中药中乌头生物碱成分的分析提供了一种新的思路。

**关键词:** 辅助激光解吸电离-飞行时间质谱; 嘎日迪五味丸; 二萜生物碱

**中图分类号:** O 657.63    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-2997(2009)02-78-05

## Analysis of Aconitum Alkaloids in Mongolian Medicine Garidi Wuweiwan by MALDI-TOF-MS

WANG Yong<sup>1</sup>, XIA Bo<sup>1</sup>, DENG Xiao-chun<sup>1</sup>, LIU Shu-ying<sup>2</sup>

(1. College of Bioscience, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

**Abstract:** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry was used for the analysis of the aconitum alkaloids in Mongolian medicine Garidi Wuweiwan (GRDWWW). By exact molecular weight determination, 21 kinds of aconitum alkaloids including monoester-diterpenoid alkaloids, diester-diterpenoid alkaloids, and lipo-alkaloids are detected in GRDWWW. This study is expected to provide a new method for comprehensive analysis alkaloids of proprietary Chinese medicines.

**Key words:** MALDI-TOF-MS; Garidi wuweiwan; diterpenoid alkaloids

川乌、草乌、附子具有祛风除湿、温经止痛的作用,其有效成分双酯型生物碱具有镇静、镇痛、强心、抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[1]</sup>,但同时具有神经系统毒性,而且治疗剂量与中毒剂量接近,因此需

炮制后使用<sup>[2]</sup>。在炮制过程中,双酯型生物碱的 C<sub>8</sub> 位乙酰基水解为羟基,成为毒性很小但有镇痛活性的单酯型生物碱。高效液相色谱法(HPLC)被广泛用于分析和检测各种乌头属植

物和药材中的乌头生物碱,但由于中药复方的复杂性和难以取得全部色谱标准品,HPLC法最多只能分析乌头碱、中乌头碱和次乌头碱及它们各自的水解产物共 6 种生物碱<sup>[3]</sup>,不能全面的反映饮片和中成药中乌头生物碱的实际分布。Kido 等<sup>[4]</sup>利用酶联免疫分析法测定乌头中的生物碱,其灵敏度高,但该抗体不能区分乌头碱与中乌头碱、次乌头碱或辽乌头碱。

质谱法被认为是解决中药复杂体系分离分析的最有利手段。液相色谱-质谱技术被广泛用于中药复方中化学成分的研究<sup>[5]</sup>;电喷雾多级串联质谱为分析乌头生物碱的结构积累了翔实的实验数据<sup>[6-7]</sup>;而 MALDI-TOF 质谱的特点是几乎不产生碎片离子,对样品中杂质的耐受量较大、分析通量大,特别适于快速分析像乌头生物碱这样质谱研究基础好的体系,该技术曾用于乌头属植物中乌头生物碱的分析<sup>[8]</sup>。值得注意的是,尽管含乌头碱的中成药种类繁多,疗效各异,但目前尚无利用质谱技术分析中成药中乌头生物碱的报道。

嘎日迪五味丸为常用蒙药,去湿除痛,疗效独特,该药由制草乌、诃子、麝香、水菖蒲和木香五味单味药组成,其中制草乌和麝香为“主药”。近年来有文献报道了利用 HPLC 法测定嘎日迪五味丸中乌头碱的含量,但未分析其他乌头碱<sup>[9]</sup>。本工作利用 MALDI-TOF 质谱技术对嘎日迪五味丸中的乌头生物碱进行分析检测,为该药的药效物质基础和质量分析提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

DE-STR 飞行时间质谱仪:美国生物应用系统公司产品;AB204-E 电子分析天平:梅特勒-托利多仪器上海有限公司产品;Eyela N-1001 型旋转蒸发仪;25410E-DTH 超声破碎仪:Branson Ultrasonics 公司产品;Millipore 高纯水机。

乙醇、氯仿、和氨水均为分析纯,乙腈为色谱纯,水为 18.2 MΩ·cm 高纯水。嘎日迪五味丸(批准文号:Z15020392);内蒙古蒙药股份有限公司产品。

质谱条件:激光源为 337 nm 氮激光器,基质为  $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸,检测模式为正离子反射式,加速电压 20 kV,延迟时间 210 ns,检测范围  $m/z$  500~1 000,利用乌头碱标准品进行

外标法校准。

### 1.2 样品溶液配制

取 1 g(10 粒)嘎日迪五味丸,用 250 mL 无水乙醇 50 °C 下超声提取 1 h,旋转蒸发仪蒸干,加入 40 mL pH 10 的氨水,溶解残渣后分别用氯仿萃取 3 次,每次 40 mL,合并氯仿层,蒸干后用乙腈定容为 20 mL,得到生物碱的乙腈溶液,该乙腈溶液经 1:1 高纯水稀释后,取 1  $\mu$ L 点板上样,进行质谱分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 嘎日迪五味丸中的二萜生物碱

将中成药用无水乙醇沉淀,可以有效地排除蛋白质、多糖等大分子对生物碱分析的影响,在碱性条件下用氯仿萃取是提取生物碱的通用方法。乌头碱类二萜生物碱容易质子化,每种生物碱对应一个准分子离子峰  $[M+H]^+$ 。

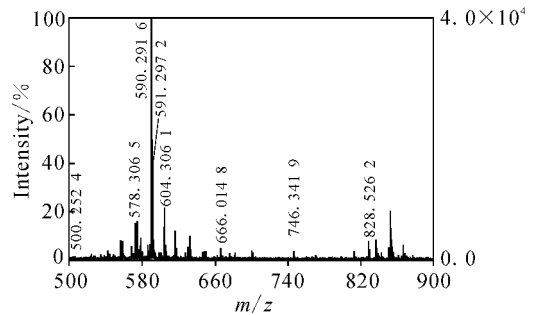


图 1 嘎日迪五味丸中生物碱的基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱图

Fig. 1 MALDI-TOF-MS of aconitum alkaloids from Garidi Wuweiwan

在  $m/z$  500~900 区域内,观察到一系列离子峰,因为附子和乌头中生物碱的植物化学工作和相关质谱研究已很充分,所以可通过质荷比确定各质谱峰的归属,结果列于表 1。根据二萜骨架上 C<sub>8</sub> 位取代基为羟基、乙酰基或长链脂肪酰基,嘎日迪五味丸中的生物碱可分为单酯型生物碱、双酯型生物碱和脂类生物碱 3 类。除了乌头碱( $m/z$  646)、次乌头碱( $m/z$  616)、中乌头碱( $m/z$  632)及它们的水解产物苯甲酰乌头原碱( $m/z$  604)、苯甲酰次乌头原碱( $m/z$  574)和苯甲酰中乌头原碱( $m/z$  590)这 6 种常见成分外,还发现了 2 种相对含量很低的双酯型生物碱:去氧乌头碱( $m/z$  630)和 10-OH-中乌头碱( $m/z$

648)。此外,还观察到了各单酯型生物碱的脱甲醇及脱水产物( $m/z$  542~572),而在相同的电离和检测条件下的其他中成药(如金匮肾气丸,示于图 2)中,没有检测到这一系列离子,所以认为它们来源于制草乌炮制过程而不是电离过程。值得注意的是,在嘎日迪五味丸中还检测到了 8 种  $C_8$  位为长链脂肪酰基的脂类生物碱,它们以乌头碱、次乌头碱、中乌头碱和去氧乌头碱 4 种双酯型乌头碱为母核,  $C_8$  位取代基则主要为棕榈酰基和亚油酰基。脂类生物碱在乌头属植物中屡被发现,亦可由乌头碱经肠道代谢生成,其毒性介于双酯型生物碱和单酯型生物碱之间,在蒙药中检测到该类生物碱有可能与蒙药独特的疗效相关。

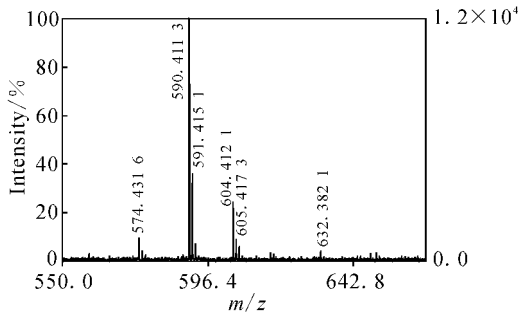


图 2 金匮肾气丸中总生物碱的基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱图  
Fig. 2 MALDI-TOF-MS of aconitum alkaloids from Jinkuishenqiwan

## 2.2 分析结果的重现性

实验发现,生物碱的氯仿溶液蒸发非常快,

与基质形成的共晶晶型差,灵敏度和重复性不好,而在 50% 乙腈溶液中结晶较好,实验结果稳定。由于基质辅助激光解析电离中结晶状态的不均一,不同测试点的结果会有所差异,因此本实验平行测定 7 次,各离子峰的相对丰度的平均值列于表 2。可以看出,尽管每次激光激发所得的各离子峰的相对丰度不同,但基本稳定,苯甲酰中乌头原碱为基峰,单酯型生物碱是最主要的成分,双酯型生物碱中只有次乌头碱的相对丰度超过 5%,其他双酯型生物碱的丰度平均值在 2%~4% 之间,该结果与电喷雾电离质谱分析四逆汤中的分析结果相近<sup>[10]</sup>。MALDI-TOF 质谱不仅可以定性分析嘎日迪五味丸中的生物碱,各质谱峰的相对丰度对其定量分析也有一定参考意义,各质谱峰的丰度在多次测量中虽有差异,但平均值的相对大小基本稳定,只是脂碱相对丰度的标准偏差较大,图 1、图 2 中所示为信号较强的质谱图。

本研究给出了一种中成药嘎日迪五味丸中生物碱的分析方法,经简单的分离提取后,可以快速灵敏地定性分析乌头生物碱,质谱峰的相对丰度可反映各成分的相对含量。但是,对另一种含有制川乌的治疗癌症疼痛的中成药“天蟾胶囊”应用该方法分析,不能得到质谱信号,生物碱提取液在靶板上不能形成良好的晶型。从结晶状态观察,含有严重的盐类干扰,说明应用软电离质谱方法分析中成药中生物碱的关键在于能否在提取完全生物碱的同时,有效地去除抑制乌头生物碱电离的化学成分,对于这类中成药采用液质联用技术可能更为合适。

表 1 嘎日迪五味丸中生物碱成分的 MALDI-TOF-MS 分析结果

Table 1 Analysis results of Raridi wuweiwan by MALDI-TOF-MS

化合物	分子式	理论值 $[M+H]^+$	实测值 $[M+H]^+$	误差/ $\mu$
单酯型生物碱 Monoester-diterpenoid alkaloids				
脱甲醇苯甲酰次乌头原碱 De-methanol benzoylhyaconine	$C_{30}H_{39}O_8N$	542.275	542.298	0.023
脱水苯甲酰次乌头原碱 Dehydrated benzoylhyaconine	$C_{31}H_{41}O_8N$	556.291	556.279	-0.012
脱甲醇苯甲酰中乌头原碱 De-methanol benzoylmesaconine	$C_{30}H_{39}O_9N$	558.270	558.295	0.025
脱水苯甲酰中乌头原碱 Dehydrated benzoylmesaconine	$C_{31}H_{41}O_9N$	572.286	572.282	-0.004
苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhyaconine	$C_{31}H_{43}O_9N$	574.301	574.285	-0.016
脱水苯甲酰乌头原碱 Dehydrated benzoylaconine	$C_{32}H_{43}O_9N$	586.302	586.295	-0.007
苯甲酰中乌头原碱 Benzoylmesaconine	$C_{31}H_{43}O_{10}N$	590.297	590.292	-0.005
苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine	$C_{32}H_{45}O_{10}N$	604.312	604.306	-0.006

续表

化合物	分子式	理论值[M+H] <sup>+</sup>	实测值[M+H] <sup>+</sup>	误差/u
双酯型生物碱 Diester-diterpenoid alkaloids				
次乌头碱 Hypaconitine	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> O <sub>10</sub> N	616.312	616.304	-0.008
去氧乌头碱 Deoxyaconitine	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> O <sub>10</sub> N	630.328	630.325	-0.003
中乌头碱 Mesaconitine	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> O <sub>11</sub> N	632.307	632.305	-0.002
乌头碱 Aconitine	C <sub>34</sub> H <sub>47</sub> O <sub>11</sub> N	646.323	646.319	-0.004
10-OH-中乌头碱 10-OH-Mesaconitine	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> O <sub>12</sub> N	648.302	648.298	-0.004
脂类生物碱 Lipo-alkaloids				
8-棕榈酰-苯甲酰次乌头原碱 8-Pal-benzoylhypaconine	C <sub>47</sub> H <sub>73</sub> O <sub>10</sub> N	812.531	812.534	0.003
8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱 8-Pal-benzoylmesaconine	C <sub>47</sub> H <sub>73</sub> O <sub>11</sub> N	828.526	828.526	0
8-亚油酰-苯甲酰次乌头原碱 8-Lino-benzoylhypaconine	C <sub>49</sub> H <sub>73</sub> O <sub>10</sub> N	836.531	836.537	0.006
8-棕榈酰-苯甲酰乌头原碱 8-Pal-benzoylaconine	C <sub>48</sub> H <sub>75</sub> O <sub>11</sub> N	842.542	842.545	0.003
8-亚油酰-苯甲酰去氧乌头原碱 8-Lino-benzoyldeoxyaconine	C <sub>49</sub> H <sub>71</sub> O <sub>11</sub> N	850.510	850.527	0.017
8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱 8-Lino-benzoylmesaconine	C <sub>49</sub> H <sub>73</sub> O <sub>11</sub> N	852.526	852.528	0.002
8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱 8-Lino-benzoylaconine	C <sub>50</sub> H <sub>75</sub> O <sub>11</sub> N	866.541	866.541	0
8-油酰-苯甲酰乌头原碱 8-Ole-benzoylaconine	C <sub>50</sub> H <sub>77</sub> O <sub>10</sub> N	868.557	868.540	-0.017

表 2 各质谱峰的 7 次测定丰度平均值

Table 2 The arithmetic mean of relative abundance of all MS peaks

化合物	相对丰度							平均值	标准偏差
	1	2	3	4	5	6	7		
脱甲醇苯甲酰次乌头原碱 De-methanol benzoylhypaconine	4.08	5.75	3.93	4.4	5.58	4.37	4.56	4.69	0.71
脱水苯甲酰次乌头原碱 Dehydrated benzoylhypaconine	8.34	6.79	8.18	5.44	7.81	6.08	6.07	7.11	1.09
脱甲醇苯甲酰中乌头原碱 De-methanol benzoylmesaconine	8.26	5.07	10.77	11.46	5.96	5.1	10.42	7.77	2.6
脱水苯甲酰中乌头原碱 Dehydrated benzoylmesaconine	15.42	14.67	14.2	17.2	8.18	18.24	10.54	14.7	3.22
苯甲酰次乌头原碱 Benzoylhypaconine	16.21	15.69	11.15	16	13.34	18.53	16.61	15.2	2.34
脱水苯甲酰乌头原碱 Dehydrated benzoylaconine	6.31	5.22	4.89	6.75	6.79	2.31	3.65	5.38	1.55
苯甲酰中乌头原碱 Benzoylmesaconine	100	100	100	100	100	100	100	100	0
苯甲酰乌头原碱 Benzoylaconine	21.91	22.85	19.89	20.61	18.14	20.97	22.31	20.7	1.49
次乌头碱 Hypaconitine	3.23	16.7	12.05	7.75	6.45	3.37	11.51	8.26	4.8
去氧乌头碱 Deoxyaconitine	5.82	5.2	4.03	3.36	6.77	2.14	10.23	4.55	1.55
中乌头碱 Mesaconitine	10.21	7.7	10.77	3.28	8.55	2.13	5.51	7.11	3.29
乌头碱 Aconitine	3.76	5.83	4.89	3.96	3.92	2.61	5.51	4.16	1
10-OH-中乌头碱 10-OH-Mesaconitine	3.97	4.03	3.17	3.29	6.02	1.2	3.62	3.61	1.43
8-棕榈酰-苯甲酰次乌头原碱 8-Pal-benzoylhypaconine	3.81	4.18	8.2	2.73	4.29	0	0	3.87	2.43
8-棕榈酰-苯甲酰中乌头原碱 8-Pal-benzoylmesaconine	8.21	9.86	14.64	7.71	4.67	2.02	4.14	7.85	3.97
8-亚油酰-苯甲酰次乌头原碱 8-Lino-benzoylhypaconine	8.74	10.09	16.02	4.54	3.31	2.71	4.2	7.57	4.66
8-棕榈酰-苯甲酰乌头原碱 8-Pal-benzoylaconine	3.31	5.17	6.66	4.21	4.14	1.42	0	4.15	1.61
8-亚油酰-苯甲酰去氧乌头碱 8-Lino-benzoyldeoxyaconine	5.56	2.73	8.82	6.42	3.36	1.42	2.43	4.72	2.49
8-亚油酰-苯甲酰中乌头原碱 8-Lino-benzoylmesaconine	20.55	11.13	22.73	13.9	7.04	0	6.46	12.6	7.74
8-亚油酰-苯甲酰乌头原碱 8-Lino-benzoylaconine	6.56	5.26	10.05	6.87	4.23	0	3.41	5.5	3.04
8-油酰-苯甲酰乌头原碱 8-Ole-benzoylaconine	3.26	2.89	6.82	2.78	2.44	2.36	0	3.43	1.55

## 参考文献:

- [1] AMERI A. The effects of *Aconitum* alkaloids on the central nervous system[J]. *Progress in Neurobiology*, 1998, 56(2): 211-235.
- [2] 越 皓, 皮子凤, 赵宇峰, 等. 电喷雾串联质谱分析附子炮制中的化学成分变化[J]. *分析化学*, 2007, 35(7): 959-963.
- [3] XIE Y, JIANG Z H, ZHOU H, et al. Simultaneous determination of six *Aconitum* alkaloids in proprietary Chinese medicines by high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1 093(1/2): 195-203.
- [4] KIDO K, EDAKUNI K, MORINAGA O, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for aconitine-type alkaloids using an anti-aconitine monoclonal antibody [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 616(1):109-114.
- [5] 越 皓, 皮子凤, 宋凤瑞, 等. 生附片化学成分的 HPLC/ESI-MS<sup>n</sup> 研究[J]. *化学学报*, 2008, 66(2):211-215.
- [6] 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 Spectrom*, 2002, 16(22): 2 075-2 282.
- [7] WANG Y, SHI L, SONG F R, et al. Exploring the ester-exchange reactions of diester diterpenoid alkaloids in the aconite decoction process by electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(4): 279-284.
- [8] WU W, LIANG Z T, ZHAO Z Z, et al. Direct analysis of alkaloid profiling in plant tissue by using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2007, 42: 58-69.
- [9] 图 雅, 张贵君, 王淑敏, 等. 高效液相色谱法测定蒙药嘎日迪五味丸中乌头碱的含量[J]. *中国中医药科技*, 2008, 15(4):281-282.
- [10] 王 勇, 石 磊, 金东明, 等. 四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的溶出和水解平衡[J]. *中草药*, 2003, 34(4): 311-314.

## 仪器信息网“资讯中心”改版上线

始终密切关注分析测试及仪器行业动态、发展的仪器信息网“新闻”栏目(<http://www.instrument.com.cn/news/>),从开办之初就受到各方好评。而栏目的健康发展,更离不开广大用户的热心支持。为了将最新的行业发展动态及时传递给用户,使本栏目达到更好的信息资源共享效果,仪器信息网近期对“新闻”栏目进行了全面改版升级,推出了“资讯中心”栏目。用户只要点击仪器信息网首页导航栏中的“新闻”栏目,或者点击首页右侧“业界要闻”栏目的“更多要闻”,就可进入“资讯中心”。

本次改版主要目的是针对网友反映的新闻不易查找、对新闻类别不易把握等原因,通过“厂商动态”与“新闻”的合并,使参展商动态与新闻结合统一,不但提高了资讯栏目的信息量,也方便广大网友浏览。此外,本次改版,栏目还增加了分析测试中心(实验室动态)的相关新闻,并增加了《仪器新视界》电子期刊订阅和在线阅读入口,从而使资讯更全面、沟通更方便、链接更简单、信息更专业。

在把“厂商动态”与“新闻”合并之后,最新推出的“资讯中心”栏目包含 14 个新闻类别:政府要闻、方法标准、战略合作、新品发布、科技前沿、本网速递、实验室动态、展会信息、讲座培训、销售亮点、产品促销、产品代理、迁址信息、行业百态。

原新闻类别中的“市场商机”与厂商动态中的“获奖风采”由于信息量较小,并入“行业百态”并将“热点应用”、“专题资讯”及“人物专访”从资讯栏目移出,各自成立了单独的新栏目。

至此,新版“资讯中心”使仪器信息网的新闻资讯更集中、更系统、更鲜明。想要体验仪器信息网新版“资讯中心”,敬请点击:<http://www.instrument.com.cn/news/>。