

· 基础研究 ·

基于UHPLC-QTOF/MS的博落回花中 生物碱类化学成分研究[△]

黄嘉璐¹, 刘秀斌¹, 郑亚杰¹, 邹超兰^{1,2}, 唐昭山³, 曾建国^{1,2*}

(1. 湖南农业大学 兽用中药资源与中兽药创制国家地方联合工程研究中心, 湖南 长沙 410128;

2. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208; 3. 湖南美可达生物资源股份有限公司, 湖南 长沙 410005)

[摘要] 目的: 利用高通量、高灵敏和快速的UHPLC-QTOF/MS技术开展博落回花中的微量生物碱类成分的定性研究, 阐明博落回花中生物碱类化学成分的种类和种类, 为博落回植物的安全性提供科学依据。方法: 采用UHPLC-QTOF/MS技术, 借助数据挖掘方法发现和识别出博落回花中的微量生物碱类化学成分, 对其高分辨一级和二级质谱数据进行解析, 并与数据库进行比对, 完成对微量生物碱类化学成分的结构推测和确认。结果: 从博落回花中共鉴定了22个生物碱类化合物, 主要化学成分为普洛托品类生物碱(原阿片碱、别隐品碱)和四氢原小檗碱类生物碱(*N*-甲基刺罂粟碱、*N*-甲基四氢小檗碱)。结论: 该研究结果为博落回植物的更全面、客观的品质评价和安全性评价提供了充分的科学依据。

[关键词] 博落回花; 生物碱; UHPLC-QTOF/MS; 定性分析

Identification of Alkaloids in Flowers of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. by UHPLC-QTOF/MS

HUANG Jialu¹, LIU Xiubin¹, ZHENG Yajie¹, ZOU Chaolan^{1,2}, TANG Zhaoshan³, ZENG Jianguo^{1,2*}

(1. Horticulture & Landscape College of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

3. Micollta Bioresource Inc., Changsha 410005, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the minor alkaloids in the flower of *Macleaya cordata* by using the ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF/MS) for safety evaluation of *M. cordata*. **Methods:** The alkaloids were found and identified through the serious data mining, structural speculation on basis of the careful analysis of the MS and MS/MS data, and confirmed by comparison with the reference standards and library. **Results:** There were total 22 alkaloids found in the flower of *M. cordata* including protopines and tetrahydroprotonerberines, the main alkaloids including protopine, allocryptopine, *N*-methyltetrahydroberberine, *N*-methyltetrahydropapaverine. **Conclusion:** The results provide sufficient scientific evidence for evaluating its quality and safety of the flowers from *M. cordata* comprehensively and objectively.

[Keywords] Flowers of *Macleaya cordata*; alkaloid; UHPLC-QTOF/MS; qualitative analysis

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.10.005

博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 为罂粟科博落回属多年生草本植物, 全草皆可入药, 但有一定毒性^[1-3]。博落回主要分布在我国长江以南、南岭以北的山坡、路边及沟边, 花期为6—7月^[4]。博落回作为有毒蜜源植物^[5-7], 国内文献中报道的多起食用蜂蜜中毒事件, 因在有毒蜂蜜中发现博落回花

粉, 怀疑博落回是蜂蜜中毒性成分的来源^[8-10]。本研究团队基于前期对博落回植物化学成分的安全性评价研究^[11], 结合有关文献^[12-13], 认为食用蜂蜜导致中毒的根本原因与博落回没有关系。对于博落回在食品安全国家标准(GB 14963-2011)中明确被禁止作为蜜源植物的规定, 作者认为可商榷分类且不纳

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(31600238); 湖南省教育厅科学研究项目(16C0769); 湖南省研究生科研创新项目(CX2014B302); 湖南省科技重点计划(2016SK3002)

* [通信作者] 曾建国, 博士生导师, 教授, 研究方向: 中药资源与综合利用; Tel: (0731)84673824, E-mail: zengjianguo@hunau.edu.cn

入危险级别。博落回中生物碱类成分被认为是主要的毒性成分,然而迄今仅有博落回果荚、茎、叶和根中化学成分及其毒性的研究报道^[14-17],博落回花中化学成分的种类和含量还尚未见报道。

UHPLC-QTOF/MS技术因具有分析速度快、灵敏度高和专属性强等特点,在中药材等复杂样品中微量或痕量成分分析方面具有显著的优势。本研究利用UHPLC-QTOF/MS开展博落回花中生物碱类化学成分的定性分析研究,为阐明博落回花中生物碱类等化学成分,以及博落回植物的品质评价和安全性评价提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290 超高效液相色谱仪-6530 四极杆飞

行时间质谱仪(UHPLC-QTOF MS, 美国 Agilent 公司),配有电喷雾离子源(ESI),数据采集和数据处理软件为 Masshunter; METTLER TOLEDO 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器); MI-Q 超纯水机(贝徕美生物公司); 0.22 μm 有机相/水相通用针式滤器及液相样品瓶(北京八方世纪科技有限公司); 无菌注射器(圣光医用制品); 50 mL 离心管(CORNING CentriStar 公司)。

1.2 试剂与试剂

博落回花采自国家中药材生产(湖南)技术中心,经湖南农业大学曾建国教授鉴定为博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 的花。甲醇(色谱纯,美国 Merck); 甲酸(色谱纯,美国 TEDIA); 水为 Milli-Q 超纯水; 生物碱对照品来源详见表 1。

表 1 生物碱对照品来源信息

编号	名称	药品批号	供应商
1	去甲基衡州乌药碱	14110621	上海同田生物技术股份有限公司
2	3-羟基-N-甲基衡州乌药碱	H946495	加拿大 TRC
3	衡州乌药碱		实验室自制
4	(s)-N-甲基衡州乌药碱		实验室自制
5	网脉荔枝碱	BBP01159	云南西力生生物技术有限公司
6	金黄紫堇碱	BBP03263	中国食品药品检定研究院
7	碎叶紫堇碱		实验室自制
8	四氢非洲防己碱	00019368-326	上海同田生物技术股份有限公司
9	原阿片碱	110853-201404	中国食品药品检定研究院
10	刺罂粟碱	00019368-326	美国 Chromadex
11	别隐品碱	24240-04-8	湖南美可达生物资源有限公司
12	(s)-cis-N-甲基刺罂粟碱		实验室自制
13	四氢小檗碱	8-GUY-124-1	加拿大 TRC
14	(s)-cis-N-甲基四氢小檗碱		实验室自制
15	血根碱	510001-201101	中国食品药品检定研究院
16	盐酸巴马汀	10732-201510	中国食品药品检定研究院
17	盐酸小檗碱	110713-201212	中国食品药品检定研究院
18	白屈菜红碱	111718-201402	中国食品药品检定研究院
19	6-丙酮基二氢血根碱		实验室自制
20	二氢白屈菜红碱	11-31	湖南美可达生物资源有限公司
21	二氢血根碱	090219	湖南美可达生物资源有限公司
22	6-氰基二氢血根碱		实验室自制

2 方法

2.1 色谱及质谱检测条件

色谱条件: 华谱 XAqua C₁₈ 色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸-水, B 为 0.1% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱见表 2; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 1 μL; 检测波长: 287 nm。

表 2 梯度洗脱色谱条件

t/min	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~1	95~90	5~10
1~7	90~70	10~30
7~20	70~40	30~60
20~25	40~5	60~95
25~30	5~5	95~95
30~30.1	5~95	95~5
30.1~35	95~95	5~5

质谱条件: 扫描模式: ESI + 全扫描模式; 毛细管电压: 3500 V; 干燥气温度: 345 °C; 干燥气体流量: 10 L·min⁻¹; 脱溶剂温度: 350 °C; 扫描范围 m/z : 100~1200 Da; 二级裂解电压: 20~45 eV。参比溶液中含嘌呤(C₅H₄N₄, m/z : 121.050 873) 和 HP-0921(C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄, m/z : 922.009 798)。

2.2 样品预处理

于 6 月上旬摘取新鲜博落回花, 立即放入液氮中冷却, 用液氮磨成粉状后进行供试溶液制备。

2.3 供试品溶液的制备

称取液氮研磨成粉状的博落回花约 1.0 g, 置于具塞玻璃锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 30 °C 超声 30 min, 静置后取上清液 6500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 继续取上清液过 0.22 μm 有机相膜于液相小瓶内, 备用。

2.4 对照品溶液的制备

取上述对照品各约 5 mg, 精密称定, 分别加入甲醇超声溶解后定容至 25 mL, 吸取适量用甲醇稀释制成约 1 μg·mL⁻¹ 的单标溶液。

2.5 数据挖掘方法

供试品溶液按 2.1 项中 LC-MS 条件进行分析检测, 利用 Agilent MassHunter workstation Software(version B. 05. 00) 软件完成数据采集与处理。将全扫描

模式的一级高分辨质谱数据通过 MassHunter 软件中分子特征查找(Find by Molecular Feature, MFE) 功能, 对博落回花样品中所含的未知化合物进行查找。MFE 参数设置: 正离子形态为 M⁺、[M + H]⁺ 或 [M + Na]⁺; 电荷数为 1~2, 化合物最低绝对峰高为 3000 counts; 保留时间范围设定为 3~27 min; 化合物同位素质量偏差范围为 0.002 5 Da; 目标化合物类型为小分子有机化合物。

对疑似生物碱类成分的推测, 在 MFE 查找出的化合物列表中, 首先通过与随行的空白样品数据进行比对, 去除干扰信息。接着与文献报道的以及课题组前期整理的博落回生物碱类成分数据库中的质谱数据的精确分子量、二级质谱数据进行比对, 对可能的生物碱类成分进行初步确认。最后对可能的生物碱类成分通过与其对应的对照品进行 LC-MS/MS 确认, 对它们的 M⁺ 或 [M + H]⁺ 的精确分子量 (m/z)、保留时间和 MS/MS 谱进行对比分析, 若查找化合物的 m/z 及保留时间与生物碱对照品的偏差分别在 0.001 0 Da 和 0.15 min 内, 则可初步确定该化合物与生物碱对照品为同一化合物, MS/MS 谱可进一步提高化合物推测结果的准确度。

3 结果与分析

3.1 分析条件的建立

在本课题组前期工作基础上^[18], 本研究对色谱分离条件进行了优化, 保证色谱图上色谱峰具有好的峰形和分离。如图 1 所示, 在总离子流中各色谱峰分离度适中, 主要色谱峰均达到基线分离, 色谱峰信号响应良好。

3.2 数据挖掘

对 UHPLC-QTOF/MS 采集的博落回花的一级质谱数据利用 MFE 进行化合物查找, 共发现了 331 个化合物信号。将发现的这些化合物信号, 与空白样品和对照样品的质谱数据进行比对, 剔除了来自溶剂等背景干扰信号; 结合文献报道^[19] 及课题组前期整理的质谱数据库中的生物碱类化合物的 M⁺、[M + H]⁺ 及 [M + Na]⁺ 等精确质量数, 对样品的一级质谱数据进行提取离子操作, 共发现了 22 个可能的生物碱类化学成分, 详细数据见表 3。

3.3 生物碱类成分推测结果的确认

通过购买或实验室合成获取了上述推测的 22 个

生物碱类化合物的对照品或纯品。通过UHPLC-QTOF MS/MS对样品中发现的可能生物碱类化合物与其对应的标准品或纯品进行比较分析,重点比较提取离子色谱峰的保留时间、一级质谱的精确质量数、

二级质谱中产物离子的质量数和丰度等信息(见图2)的一致性。结果,上述推测的22个生物碱类化合物信息与对照品或纯品相一致(见表3),表明本研究推测的结果是准确的和可靠的。

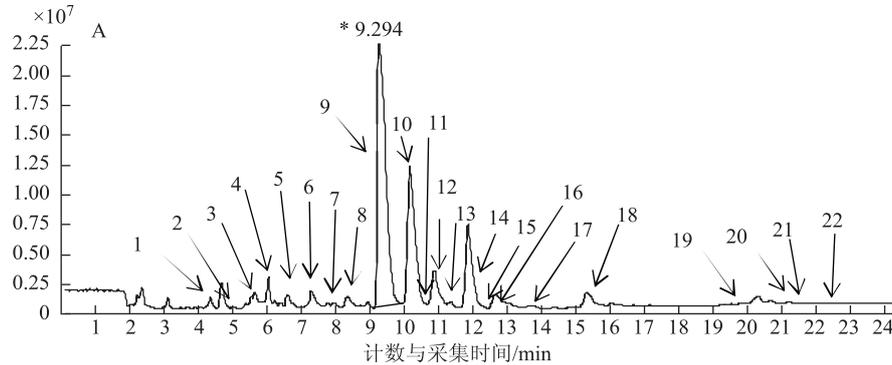


图1 博落回花 UHPLC-QTOF MS 总离子流图

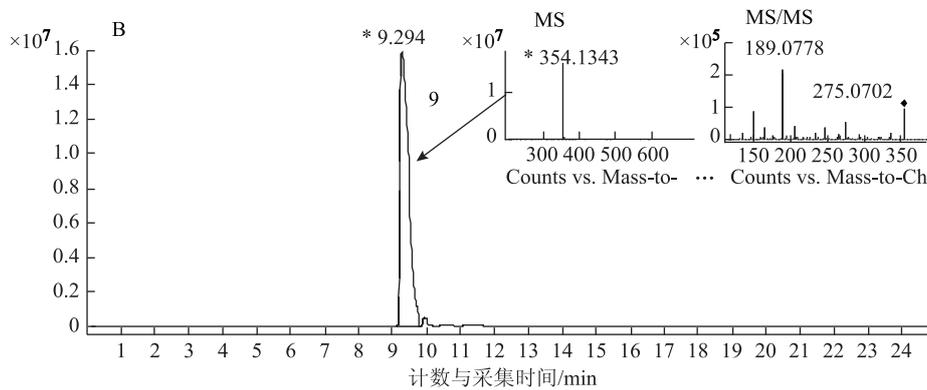


图2 化合物9提取离子色谱图及相关质谱图

表3 博落回花中生物碱类化合物的UHPLC-QTOF/MS定性分析结果

色谱峰编号	t_R/min	$[M+H]^+/M^+$ (m/z)	质量偏差	元素组成	MS/MS [m/z , 丰度(%)]	化合物名称
1	4.542	272.1278	-1.102	$C_{16}H_{17}NO_3$	123(6.28), 161(7.25), 143(9.86), 115(12.55), 107(100.00)	去甲基衡州乌药碱
2	5.277	316.1526	-7.908	$C_{18}H_{21}NO_4$	137(19.45), 175(20.76), 143(45.26), 192(58.14), 123(100.00)	3-羟基-N-甲基衡州乌药碱
3	5.828	286.1437	-0.699	$C_{17}H_{19}NO_3$	209(6.89), 194(7.11), 143(10.66), 115(10.44), 107(100.00)	衡州乌药碱
4	6.029	300.1597	0.999	$C_{18}H_{21}NO_3$	237(9.69), 209(10.14), 175(10.47), 143(12.51), 107(100.00)	(S)-N-甲基衡州乌药碱
5	6.622	330.1699	-0.303	$C_{19}H_{23}NO_4$	177(18.66), 175(21.29), 143(35.73), 137(65.43), 192(100.00)	网脉荔枝碱
6	7.315	328.1546	0.914	$C_{19}H_{21}NO_4$	91(3.58), 119(3.64), 151(10.45), 163(12.56), 178(100.00)	金黄紫堇碱
7	7.966	326.1389	0.613	$C_{19}H_{19}NO_4$	155(15.01), 171(16.16), 151(24.32), 170(46.74), 178(100.00)	碎叶紫堇碱
8	8.517	342.1703	0.877	$C_{20}H_{23}NO_4$	176(2.43), 165(2.53), 151(6.56), 163(12.08), 178(100.00)	四氢非洲防己碱
9	9.294	354.1343	1.977	$C_{20}H_{19}NO_5$	206(17.60), 275(21.72), 149(37.98), 188(93.66), 189(100.00)	原阿片碱

表3(续)

色谱峰编号	t_R/min	$[M+H]^+/M^+$ (m/z)	质量偏差	元素组成	MS/MS[m/z , 丰度(%)]	化合物名称
10	10.179	370.164 8	-0.270	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	352(16.67), 206(31.41), 290(35.38), 189(46.93), 188(100.00)	别隐品碱
11	10.521	324.124 2	3.702	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	174(4.18), 91(9.03), 119(9.67), 149(29.55), 176(100.00)	刺罂粟碱
12	10.880	338.138 2	-1.479	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	191(4.24), 219(4.30), 188(9.25), 149(13.59), 190(100.00)	(S)- <i>cis</i> -N-甲基刺罂粟碱
13	11.682	340.153 5	-2.352	C ₂₀ H ₂₁ NO ₄	91(2.31), 165(2.32), 119(2.90), 149(7.73), 176(100.00)	四氢小檗碱
14	11.874	354.169 6	-1.129	C ₂₁ H ₂₄ NO ₄	188(3.00), 339(3.39), 306(3.41), 338(7.33), 190(100.00)	(S)- <i>cis</i> -N-甲基四氢小檗碱
15	12.676	332.091 9	-1.204	C ₂₀ H ₁₄ NO ₄	244(34.76), 218(37.78), 246(52.87), 317(59.66), 274(100.00)	血根碱
16	12.976	352.154 8	1.420	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺	320(18.28), 322(29.22), 337(39.81), 308(58.59), 336(100.00)	盐酸巴马汀
17	13.703	336.122 7	-0.893	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	304(20.08), 306(30.96), 321(46.03), 292(73.01), 320(100.00)	盐酸小檗碱
18	15.340	348.122 8	-0.575	C ₂₀ H ₁₃ NO ₅	304(48.71), 333(58.73), 290(65.83), 332(73.82), 305(100.00)	白屈菜红碱
19	19.899	390.132 9	-1.794	C ₂₃ H ₁₉ NO ₅	274(2.84), 333(3.75), 317(4.19), 304(5.71), 332(100.00)	6-丙酮基二氢血根碱
20	21.144	350.138 7	0.000	C ₂₁ H ₁₉ NO ₄	320(8.96), 319(14.23), 318(19.82), 335(22.26), 334(100.00)	二氢白屈菜红碱
21	21.837	334.106 9	-1.497	C ₂₀ H ₁₅ NO ₄	333(3.96), 276(8.98), 304(9.41), 319(34.86), 318(100.00)	二氢血根碱
22	22.557	359.102 0	-1.671	C ₂₁ H ₁₄ N ₂ O ₄	314(36.08), 329(37.57), 344(40.72), 153(41.17), 318(100.00)	6-氰基二氢血根碱

在假定所有生物碱类化合物的质谱信号响应一致的前提下,对发现的22个化合物的提取离子色谱图进行比较分析(图1),发现博落回花中所含的生物碱类次生代谢产物主要有原阿片碱(9)、别隐品碱(10)、(s)-*cis*-N-甲基刺罂粟碱(12)和(s)-*cis*-N-甲基四氢小檗碱(14)等。

4 讨论

博落回中主要含有生物碱、黄酮、三萜等类次生代谢产物^[14,20-21],其中生物碱类成分既是有效活性成分也是毒性成分^[22-24]。博落回安全性研究发现,博落回总碱的小鼠经口给药的急性毒性试验LD₅₀值为1657 mg·kg⁻¹^[12];博落回生物碱硫酸盐是博落回果荚提取物精制而成的,主要含有血根碱和白屈菜红碱,该药品通过小鼠经口给药的急性毒性试验的LD₅₀值,水溶液为900 mg·kg⁻¹,水混悬液为1043 mg·kg⁻¹^[13];博落回提取物PE₅₀(主要含有原阿片碱和别隐品碱)的小鼠经口给药的急性毒性试验LD₅₀值为426.1 mg·kg⁻¹,属中等毒性^[11]。

本研究发现博落回花中主要含有原阿片碱和别

隐品碱等普洛托品类生物碱,以及四氢原小檗碱类生物碱(N-甲基刺罂粟碱、N-甲基四氢小檗碱)。由于该类生物碱具有一定的毒性,按有毒蜜源植物标准,应在博落回花期采取相应措施以达到减少蜜蜂采集该植物花蜜的目的。但该类生物碱毒性与相关植物如雷公藤、钩吻相比较低得多,因此建议考虑对有毒蜜源标准进行危险分级,以免误导毒源的判定。在蜜蜂采集博落回花蜜后,经过自身生物作用和贮存期间的物理或化学变化,需要进一步对残留在蜂蜜中的生物碱含量进行定量分析,继而才能精准地对博落回作为有毒蜜源植物做出更为客观的毒性评价。博落回植物为全草入药,对其花中化学成分的阐明,可为该植物的全面品质评价提供很好的参考依据。

参考文献

- [1] 朱雅碧.博落回中毒致心律失常1例[J].浙江中西医结合杂志,2003,13(4):56-57.
- [2] 张在友,曾春莲.博落回致迟发性恶性心律失常二例[J].右江医学,2002,30(6):564.

- [3] 罗友鲜,王学胜,曾君洋.博落回中毒致严重室性心律失常5例报告[J].贵州医药,2001,25(9):838.
- [4] 彭海鹏.博落回的开发利用[J].中国野生植物资源,2003,22(3):58.
- [5] 刘炳仑.我国14种有毒蜜粉源植物的花粉形态[J].中国养蜂,1995(3):21-23.
- [6] 刘炳仑.我国14种有毒蜜源植物及其花粉形态(一)[J].蜜蜂杂志,1995(2):24-25.
- [7] 姚海春,姚京辉,陈云.有毒蜜粉源植物的人蜂中毒机理及防治[J].蜜蜂杂志,2011(4):38-40.
- [8] 杨治高.一起蜜渣中毒的流行病学调查[J].江西医药,1982(增刊1):24-25.
- [9] 周勇亚.蜂蜜中毒14例临床分析[J].中级医刊,1982(12):38-41.
- [10] 陈宏标,张永杰,吴生根,等.2014年福建省某村庄一起野蜂蜜食物中毒事件调查[J].中国食品卫生杂志,2016,28(3):392-395.
- [11] 高凯.PE50对动物腹泻的药效学研究[D].长沙:湖南农业大学,2014.
- [12] 王超,朱艳华,阎雪莹,等.博落回总碱半数致死量测定[J].中国民族民间医药,2010(17):14.
- [13] 王大菊,周诗其,叶冬青,等.博落回急性及亚慢性毒性试验[J].华中农业大学学报,1993,12(6):612-616.
- [14] 卿志星,徐玉琴,杨鹏,等.博落回果荚中生物碱的研究[J].中药材,2016,39(2):312-314.
- [15] 彭懿,左姿,卿志星,等.基于HPLC-Q-TOF/MS技术鉴定博落回叶中化学成分[J].中南药学,2016,14(5):465-470.
- [16] 左姿,郑亚杰,梁之桃,等.博落回根中生物碱的组织化学定位研究[J].中草药,2016,47(10):1785-1790.
- [17] 黄敬,曾建国,罗卫梅,等.HPLC法同时测定博落回不同部位原阿片碱、别隐品碱的含量[J].湖南中医药大学学报,2010,30(1):41-42.
- [18] Qing Z X,Xu Y Q,Yang P, et al. Mass spectrometry-guided isolation of two new benzoquinoline alkaloids from [J]. Nat Prod Res,2015,30(9):1030.
- [19] Farrow S C,Hagel J M,Facchini P J. Transcript and metabolite profiling in cell cultures of 18 plant species that produce benzyloquinoline alkaloids [J]. Phytochemistry,2012,77(5):79-88.
- [20] 邹惠亮,付书娜,张杨梅,等.博落回非生物碱类化学成分研究[J].中药材,2016,39(3):559-561.
- [21] 王珂佳,刘芸.药用植物博落回研究进展[J].河南农业,2015(7):62-64.
- [22] Sai C M,Li D H,Li S G, et al. Racemic alkaloids from *Macleaya cordata*: structural elucidation, chiral resolution, and cytotoxic, antibacterial activities [J]. Rsc Adv,2016,6(47):41173-41180.
- [23] 邹惠亮,李红玉,余绍福,等.博落回的生物碱成分及细胞毒活性研究[J].中国中药杂志,2015,40(3):458-462.
- [24] Yu X L,Gao X L,Zhu Z X, et al. Alkaloids from the Tribe *Bocconieae*(*Papaveraceae*): A Chemical and Biological Review[J]. Molecules,2014,19(9):13042-13060.

(收稿日期 2017-02-20)

(上接第1370页)

- [9] 辛天怡,雷美艳,宋经文.中药材DNA条形码鉴定研究进展[J].中国现代中药,2015,17(2):170-176.
- [10] Chen S,Pang X,Song J, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA[J]. Biotechnol Adv,2014,32(7):1237-1244.
- [11] 李骁,赵龙,王佩,等.野豌豆属蒙药药用植物的rDNA-ITS序列分析[J].中草药,2015,46(12):1814-1818.
- [12] 樊杰,白妍,束明月.远志属7种药用植物ITS1和ITS2序列分析[J].中草药,2015,46(4):562-565.
- [13] 张忠廉,宋美芳,李海涛,等.千斤拔属药用植物DNA条形码鉴定研究[J].中草药,2015,45(1):118-122.
- [14] 夏至,高致明,张红瑞,等.黄芩及其同属近缘种的DNA条形码鉴定研究[J].中草药,2014,45(1):107-112.
- [15] 朱鹏程,柳亦松,黄鹏,等.博落回SSR引物的开发以及遗传多样性分析[J].生命科学研究,2013,17(2):120-124.

(收稿日期 2017-02-20)