

· 基础研究 ·

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的皖贝母生物碱类
化学成分分析[△]李莉娅¹, 蒲婧哲², 张亚中^{1,2*}, 杨青山^{1,3,4}, 程杰², 胡冲²

1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012;

2. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230000;

3. 安徽省中医药科学院 中药资源保护与开发研究所, 安徽 合肥 230012;

4. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012

[摘要] 目的: 采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对皖贝母醇提取物的生物碱类化学成分进行分析鉴定。方法: 采用CORTECS C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸和10 mmol·L⁻¹甲酸铵水溶液, 梯度洗脱, 流速为0.40 mL·min⁻¹, 进样体积为2 μL。质谱使用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式扫描采集数据。结果: 通过二级高分辨质谱分析结合对照品数据及相关文献, 共鉴定出皖贝母醇提取物中14个化合物的结构, 包括生物碱类成分12个、非生物碱类2个, 其中8个成分为首次从皖贝母中鉴定出来。结论: 采用UPLC-Q-TOF-MS/MS建立了快速分析皖贝母中生物碱类化学成分的方法, 该法快速、准确, 为皖贝母生物碱化学成分鉴定提供了新的策略, 并为皖贝母质量控制和物质基础研究提供了参考。

[关键词] 皖贝母; 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法; 生物碱

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)05-0792-07

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20210902005

Analysis of Alkaloids from Bulbs of *Fritillaria anhuiensis* Based on UPLC-Q-TOF-MS/MSLI Li-ya¹, PU Jing-zhe², ZHANG Ya-zhong^{1,2*}, YANG Qing-shan^{1,3,4}, CHENG Jie², HU Chong²

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230000, China;

3. Institute of Conservation and Development of Traditional Chinese Medicine Resources, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

4. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei 230012, China

[Abstract] **Objective:** To analyze and identify the alkaloid components from the alcoholic extract of bulbs of *Fritillaria anhuiensis* by ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). **Methods:** The chromatographic separation was conducted on a CORTECS C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm) with gradient elution of acetonitrile-0.1% formic acid and 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate solution as mobile phases at a flow rate of 0.40 mL·min⁻¹ and an injection volume of 2 μL. The mass spectrometry was performed using an electrospray ionization (ESI) source with positive ion mode scan for data acquisition. **Results:** By combining the secondary high-resolution mass spectrometry with the control data and related literature, we identified the structures of 14 compounds, including 12 alkaloids and 2 non-alkaloids, among which 8 components were identified for the first time from bulbs of *F. anhuiensis*. **Conclusion:** The method is rapid and accurate, which provides a new strategy for the identification of alkaloid components from bulbs of *F. anhuiensis*, and provides technical support for their further quality control and material basis research.

[Keywords] bulbs of *Fritillaria anhuiensis*; UPLC-Q-TOF-MS/MS; alkaloids

[△] [基金项目] 国家重点研发计划项目(2019YFC1711500)

* [通信作者] 张亚中, 博士, 主任中药师, 研究方向: 中药质量分析; E-mail: 13956985695@139.com

皖贝母, 又称安徽贝母, 为百合科植物安徽贝母 *Fritillaria anhuiensis* S. C. Chen et S. P. Yin 的干燥鳞茎, 其味甘、苦, 性微寒, 具有清热化痰、止咳定喘的功效, 主治痰热咳嗽、气逆喘哮, 主要分布于安徽大别山区的金寨、舒城、霍山、霍邱等地^[1], 当地中医历来用以代替川贝母入药, 1990年被批准为 I 类新药 (中药材)。

现代化学和药理学研究表明, 甾体生物碱是贝母类药材的主要活性成分, 也是特征性成分之一。目前, 国内对皖贝母的生物碱类成分研究报道较少。1986年, 李清华等^[2]从皖贝母中分离出4个生物碱类成分, 通过光谱数据及与对照品比对, 推断为浙贝乙素 (verticinone)、贝母辛 (peimisine)、异浙贝甲素 (isoverticine) 及皖贝甲素 (wanpeinin A)。吴宗好等^[3]发现皖贝母生物碱的含量较川贝母、浙贝母高。药理学研究也发现在止咳、平喘、祛痰等药理作用方面, 皖贝母的效力都与川贝母及浙贝母相当, 甚至优于两者^[4-5]。明确皖贝母药材中生物碱类化学成分对于进一步有效评价和控制其药材质量及研究其药效物质基础具有重要意义。

四级杆飞行时间串联质谱法 (Q-TOF-MS/MS) 是近年来发展起来的较为高端的串联质谱技术。四级杆不用采用狭缝, 具有较高灵敏度; 飞行时间则可以获得母离子和产物离子准确的相对分子质量; 串联质谱在预先没有色谱或其他分离手段的情况下直接对粗样品进行明确的检测^[6]。Q-TOF-MS/MS 与超高液相色谱法 (UPLC) 联用时, 可实现快速、高效鉴定天然药物中复杂庞大的化合物体系。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对皖贝母药材进行检测, 通过与对照品或文献报道比对, 鉴定其中的化学成分, 识别并鉴定了14个主要色谱峰, 其中8个生物碱类成分为首次从皖贝母中鉴定出, 为阐明皖贝母的药效物质基础、提高其质量控制水平提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC™型超高效液相色谱仪、Xevo G2 Q-ToF型质谱仪 (美国 Waters 公司), 配置标准电喷雾离子源 (ESI)、MsFrontier 7.0 软件; Milli-Q 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司); ML204 型万分之一电子天平、XP26 型百万分之一天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; Elmasonic S 30H 型超

声波清洗器 (德祥科技有限公司)。

1.2 试药

皖贝母药材8批, 批号及产地分别为 WB-1 (霍山县太阳乡)、WB-2 (霍山县烂泥坳乡)、WB-3 (霍山县太阳乡)、WB-4 (舒城县晓天镇)、WB-5 (岳西县沈桥乡)、WB-6 (岳西县沈桥乡)、WB-7 (金寨县张冲乡)、WB-8 (金寨县张冲乡), 由安徽省食品药品检验研究院张亚中主任中药师鉴定为百合科植物安徽贝母 *Fritillaria anhuiensis* S. C. Chen et S. P. Yin 的干燥鳞茎; 对照品梭砂贝母酮 (批号: 11J-STG-28-6, 纯度: 98%, Panphy Chemicals Corporation 公司); 贝母辛 (批号: 111892-201402, 纯度: 100%, 中国食品药品检定研究院); 色谱级异丙醇和甲酸铵购自国药集团化学试剂有限公司; 色谱级甲醇, 质谱级甲酸、乙腈购自美国 Fisher 公司; 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

2 方法

2.1 液相色谱条件

CORTECS C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 柱温为 35 °C; 流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸和 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~20 min, 15%~25%A; 20~30 min, 25%~50%A; 30~32 min, 50%~20%A); 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 进样量为 2 μL。

2.2 质谱条件

ESI 正电离子模式, 毛细管电压为 3 kV, 锥孔电压为 30 V, 离子源温度为 120 °C, 脱溶剂气温度为 350 °C, 脱溶剂气流量为 500 L·h⁻¹; 碰撞电压为 50~90 V; 碰撞气体为氩气; 扫描时间为 0.2 s; 质量扫描范围为 *m/z* 100~1500; 采集过程中采用亮氨酸脑啡肽进行实时校准。

2.3 对照品溶液制备

精密称取梭砂贝母酮、贝母辛对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 40 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液制备

取皖贝母粉末 (过四号筛) 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加氨水 4 mL, 碱化 30 min; 加异丙醇-甲醇 (1:1) 混合溶液 20 mL, 超声处理 (360 W, 50 Hz) 30 min, 滤至 25 mL 量瓶中, 用异丙醇-甲醇 (1:1) 混合溶液洗涤药渣 2~3 次, 加异丙醇-甲醇 (1:1) 至刻度, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 即得。

2.5 样品分析

取供试品、对照品溶液,按2.1、2.2项下条件进样分析。查阅文献,总结贝母属植物中化合物信息,包括分子结构式、相对分子质量、结构信息等,结合MarkerLynx XS应用软件对质谱数据进行分析,建立皖贝母生物碱类化合物的一、二级质谱数据库。通过文献查阅,再结合MS Frontier 7.0软件分析,总结皖贝母中已知生物碱的质谱碎裂规律,推测皖贝母中可能存在的化合物结构。

3 结果

3.1 皖贝母生物碱类化学成分分析

结果显示,皖贝母生物碱类化学成分在正离子模式下大多具有较好的响应,因此采用正离子模式进行质谱分析。在正离子模式下,准分子离子峰一般为 $[M+H]^+$ 。正离子模式下皖贝母UPLC-Q-TOF-

MS/MS的总离子流色谱见图1。以MarkerLynx XS应用软件对质谱数据进行分析,结合相关文献数据及部分对照品的质谱信息,共鉴定和推测了皖贝母中化学成分14个,其中生物碱类成分12个、非生物碱类成分2个。化合物6和10经与对照品比对确认,分别为贝母辛和梭砂贝母酮,结果见表1^[7-11]。

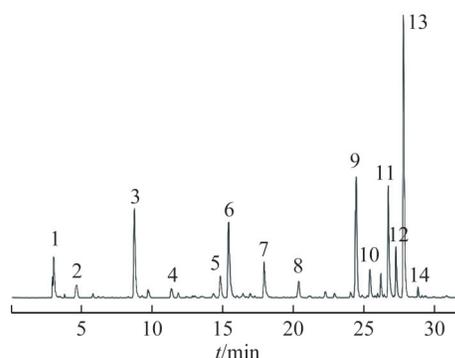


图1 皖贝母正离子模式下UPLC-Q-TOF-MS/MS的总离子流色谱图

表1 正离子模式下皖贝母化学成分UPLC-Q-TOF-MS/MS分析结果

峰号	t_r /min	分子式	$[M+H]^+$ (m/z)			主要碎片离子	成分
			实测值	理论值	误差 ($\times 10^{-6}$)		
1	3.02	$C_2H_{10}N_5$	104.098 2	104.093 6	4.4	175.109 7、381.066 0	
2	4.68	$C_{12}H_{16}N_3O_2$	234.124 8	234.124 3	2.1	112.887 2、124.105 7	
3	8.75	$C_{33}H_{51}NO_8$	590.369 6	590.369 3	0.5	428.309 7、142.068 1、114.082 1、157.091 0、183.107 8、221.121 9、449.274 8	peimisine-3-O-glucoside ^[10-11]
4	11.37	$C_{33}H_{55}NO_8$	594.400 4	594.400 6	-0.3	432.342 3、414.330 8、112.103 3、98.975 6	zhebeinoside ^[7]
5	14.84	$C_{27}H_{45}NO_3$	432.342 0	432.347 7	-1.3	414.331 6、105.061 4、112.886 4、98.976 8、81.058 6	puqiedine-7-ol ^[8-9]
6	15.45	$C_{27}H_{41}NO_3$	428.315 9	428.316 4	-1.1	410.300 5、114.082 4、337.212 0、81.063 1	贝母辛 (peimisine)
7	17.94	$C_{34}H_{57}NO_7$	592.422 1	592.421 3	1.3	142.149 9、430.362 1、412.354 6、576.389 6	puqietinonide ^[8-9]
8	20.39	$C_{33}H_{53}NO_7$	576.390 0	576.390 0	0	414.331 2、396.320 6、98.087 1	伊贝碱苷A (yibeinoside A) ^[8-9]
9	24.47	$C_{33}H_{55}NO_7$	578.405 8	578.405 6	0.3	416.347 1、398.335 7、98.975 6	湖贝甲素苷 (hupcheninoside) ^[8-9]
10	25.44	$C_{27}H_{43}NO_2$	414.337 3	414.337 2	0.2	396.325 1、105.061 2、119.075 0、147.117 5	梭砂贝母酮 (delavinione)
11	26.74	$C_{28}H_{47}NO_2$	430.364 0	430.368 5	1.1	105.061 0、107.076 5、109.092 4、142.151 5、199.134 3、98.083 2	puqietinone ^[8-9]
12	27.28	$C_{27}H_{45}NO_3$	432.342 2	432.347 7	1.3	414.331 4、112.102 7、398.299 3、176.113 8	异浙贝素碱 (isovericine) ^[8-9]
13	27.82	$C_{27}H_{45}NO_2$	416.348 0	416.352 8	-1.5	105.060 9、119.076 6、398.336 9、356.284 8、220.196 8、171.107 6、145.092 3	puqiedine ^[8-9]
14	28.84	$C_{27}H_{45}NO_2$	416.347 7	416.352 8	5.1	398.332 2、220.200 4、145.092 9、131.078 1、119.075 8、107.076 9、105.060 3、98.975 6	ebeicidine ^[8-9]

化合物3~14(图2)为皖贝母中生物碱类化学成分,按其结构类型可将其分为甾体生物碱(化合物3~6、8~10、12~14)和异甾体生物碱(化合物7、11)2类,其中化合物4、5、8~10、12~14又属于甾体生物碱的瑟文型(Cevanine group),化合物3、6为甾体生物碱的介藜芦型(Jervine group),化合物7、11为异甾体生物碱的裂环茄碱型(secosolanidine group);皖贝母中生物碱类化合物多以甾体类生物碱为主且多为瑟文型。化合物3、6、9、11、13在该色谱条件下峰面积较大。其中化合物3、5、7~11、13为首次从皖贝母中鉴定出。

3.2 3个代表性皖贝母生物碱化合物的质谱分析

瑟文型生物碱碎裂规律以化合物12为例进行说明。化合物12的分子组成为 $C_{27}H_{45}NO_3$,正离子模式下经一级质谱扫描得到准分子离子峰 m/z 432.3422 $[M+H]^+$,在二级质谱中 $[M+H]^+$ 分子离子有多条碎裂路径:路径A通过氢重排和碱性碳骨架断裂形成丰度较高的 m/z 112.1027碎片离子;路径B经脱 CH_3 、D环断裂、脱 H_2O 后形成 m/z 176.1138碎片离子;路径C经脱 CH_3 和 H_2O 形成特征碎片 m/z 398.2993;路径D经脱 H_2O 获得 m/z 414.3314的碎片信息。在化合物12中能观察到 m/z 176.1138,而化合物5、

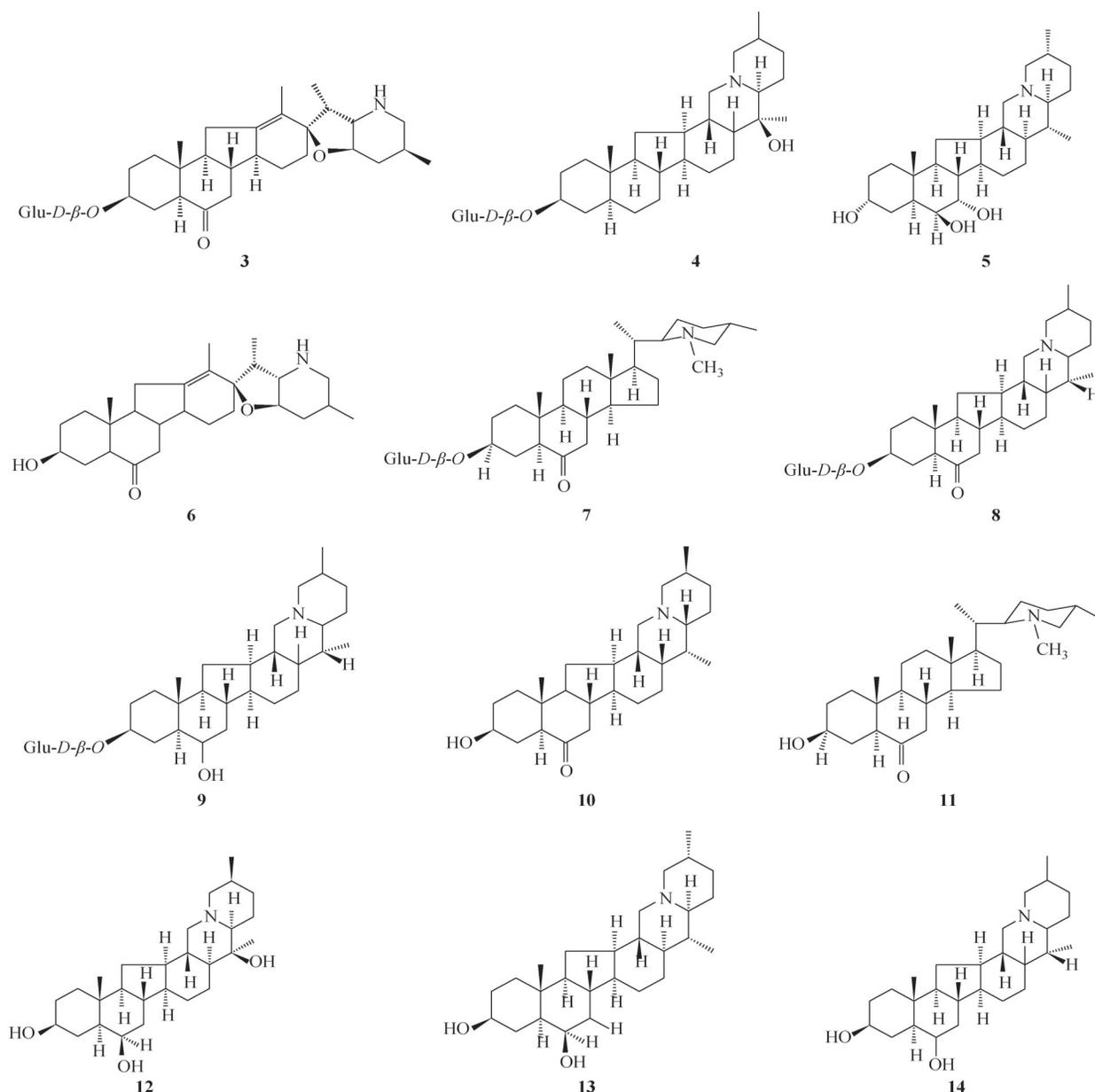


图2 皖贝母中生物碱类化合物结构式

8、9、13、14中均未观察到 m/z 176.1138 碎片离子,由此可以得出 m/z 176.1138 碎片离子的形成与 C-20 位的羟基有关。结合相关文献报道,推测化合物 12 为异浙贝母碱。质谱碎裂途径见图 3。

介藜芦型生物碱碎裂规律以化合物 6 为例进行说明。化合物 6 的分子组成为 $C_{27}H_{41}NO_3$, 在一级质谱中出现准分子离子为 m/z 428.3159 $[M+H]^+$, 二级碎片离子中相对丰度较高的主要有 m/z 410.3005、337.2120、114.0824、81.0631 等。 m/z 410.3005 为准分子离子 $[M+H]^+$ 脱去 1 分子 H_2O 而形成; $[M+H]^+$ 可通过 2 条碎裂途径得到 m/z 337.2120, 2 条碎裂路径均为 $[M+H]^+$ 连续丢失 1 分子 H_2O 和 $C_4H_{11}N$ 基团,不同之处在于脱去 H_2O 和 $C_4H_{11}N$ 基团的顺序; m/z 114.0824 的产生是 C-17 和 C-23 位的 C 之间存在 O 桥,导致 E 环断裂损失 $C_{21}H_{30}O_2$ 形成; m/z 81.0631 碎片离子的产生也有 2 条裂解路径,可由 F 环开裂丢失 NH_4 基团后, E 环在开裂丢失 $C_{21}H_{30}O_3$ 基团后形成;也可由 E、F 环同时开裂先后脱去 $C_{21}H_{30}O_3$ 和 NH_4 基团而形成。再结合其他二级碎片离子及对照品,可推测化合物 6 为贝母辛。质谱碎裂途径见图 4。

化合物 7 为首次从皖贝母中鉴定出,属于裂环

茄碱型生物碱。化合物 7 的分子组成为 $C_{34}H_{57}NO_7$, 其准分子离子 m/z 592.4221 $[M+H]^+$, $[M+H]^+$ 脱去糖苷或葡萄糖中性丢失后形成的特征碎片分别是 m/z 430.3648、412.3546; m/z 576.3896 碎片则是由于 C=O 断裂,脱去 O 所形成。化合物 7 为葡萄糖苷类生物碱具有一定的稳定性,相对于其他生物碱类结构二级碎片离子较少。查阅相关文献,化合物 7 一级、二级质谱碎片离子与本实验中所得到的碎片离子基本一致,推测化合物 7 为 puqietinonoside。质谱碎裂途径见图 5。

4 讨论

皖贝母中的甾体生物碱类大多结构相似,为使这些结构相似的成分能够得到良好的检测和分离,本实验考查了乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液、乙腈-0.1% 甲酸和 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液等不同流动相和洗脱梯度,同时考查了 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、CORTECS™ C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)、CORTECS C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm) 等不同色谱柱,实验结果表明,使用乙腈-0.1% 甲

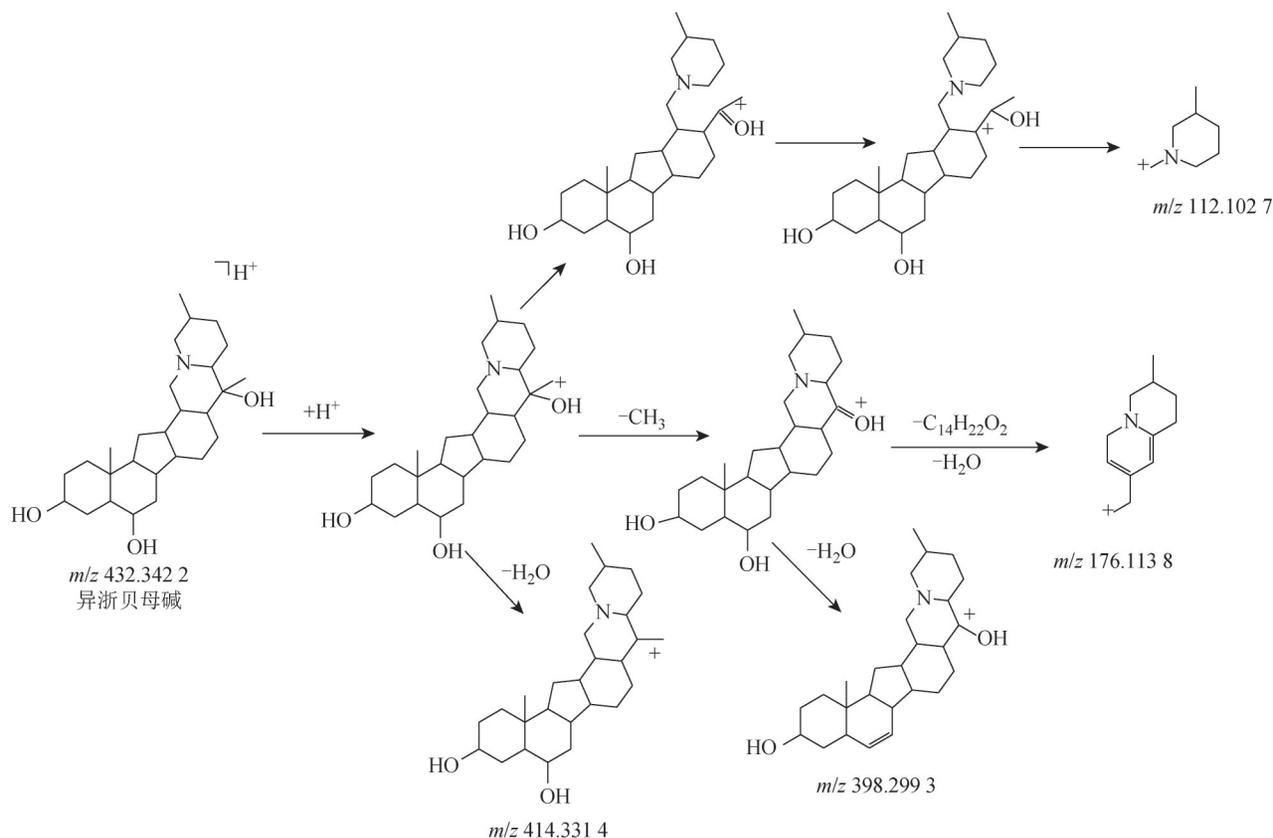


图3 异浙贝母碱质谱碎裂途径

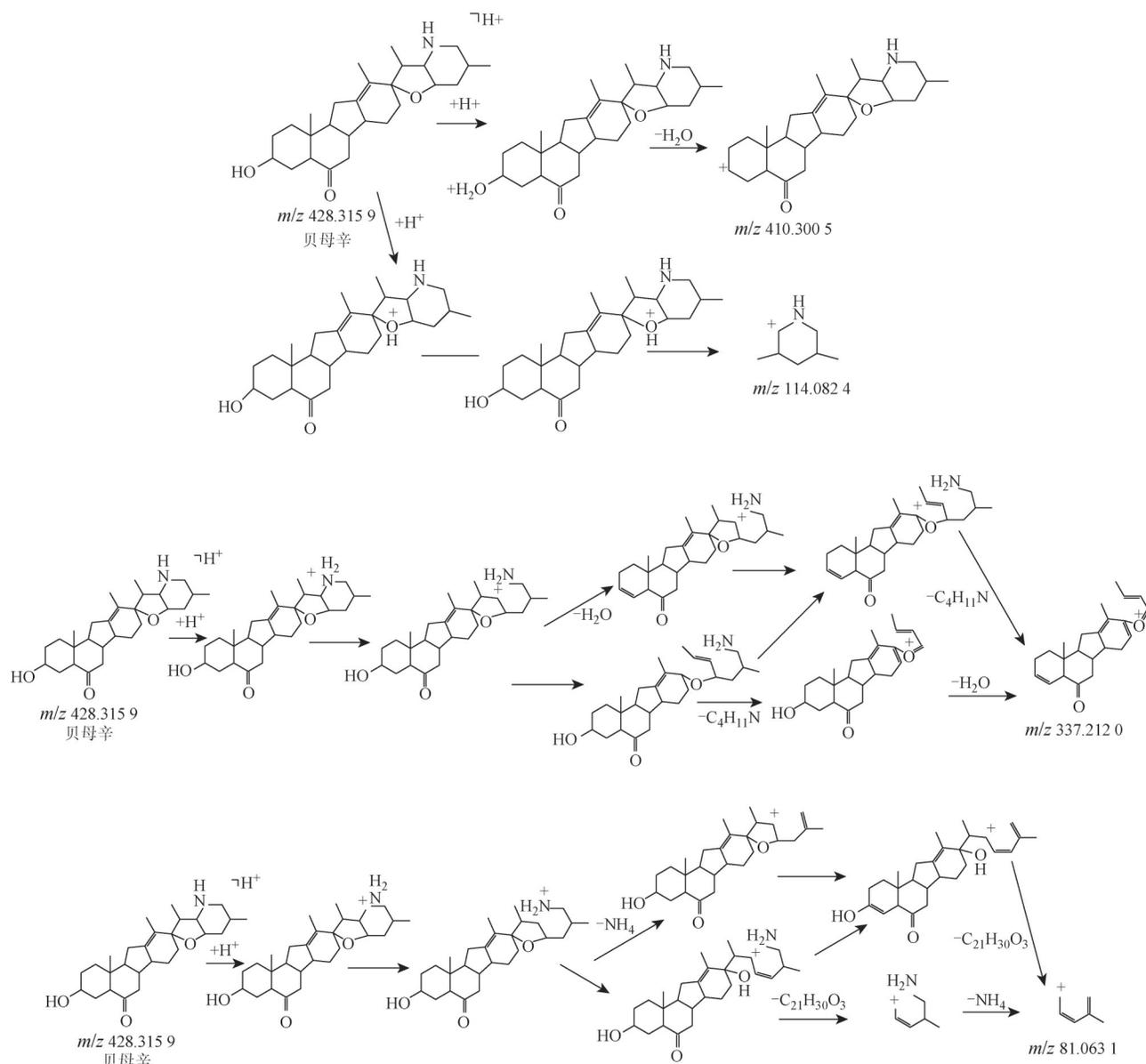


图4 贝母辛质谱碎裂途径

酸和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液、CORTECS C_{18} 色谱柱 ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$) 色谱柱和 2.1 项下的色谱条件, 可以将皖贝母中生物碱类成分很好地分离。同时本实验对质谱条件也进行了一定的优化, 分别进行了在正、负离子 2 种模式的测定, 结果表明, 皖贝母中生物碱类化合物在正离子模式下响应较好, 对锥孔电压和碰撞能量也进行了一定优化, 因为其对获得二级碎片信息的影响很大。考虑到灵敏度和获得最多的碎片信息, 锥孔电压设置为 30 V , 碰撞电压设置为 $50 \sim 90 \text{ V}$ 。在皖贝母醇提物的基峰色谱图中发现, 有一些响应较好的色谱峰未能鉴定出, 提示皖贝母还有一

些未知成分, 有待进一步研究。

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对皖贝母生物碱类化学成分进行研究。通过高分辨质谱中精确分子质量信息归属出元素组成, 进一步对二级质谱裂解碎片进行分析, 结合对照品及相关文献共鉴定出 12 个生物碱类化学成分, 其中 8 个生物碱类化学成分为首次从皖贝母药材中鉴别出。皖贝母中生物碱类化合物多以甾体类瑟文型生物碱为主, 且其种类及含量分布均与贝母属其他贝母具有一定差异^[3,8], 也为皖贝母从贝母属形态分类学上作为独立的一个种提供了理论支撑。本研究结果为皖贝母生物碱类化学成分和药效物质基础研究提供参考。

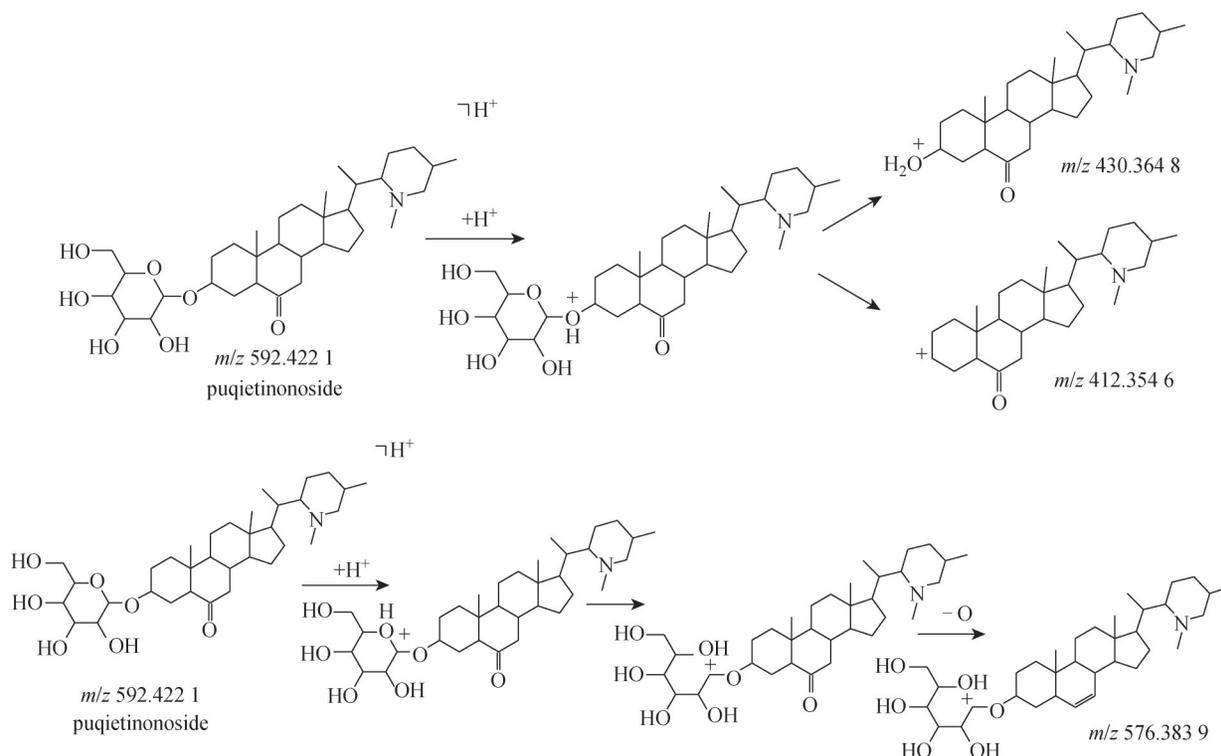


图5 puqietinonoside 质谱碎裂途径

参考文献

- [1] 安徽省药品监督管理局. 安徽省中药饮片炮制规范 2019版[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 2019:36.
- [2] 李清华, 吴宗好. 安徽贝母生物碱的分离和结构鉴定[J]. 药学学报, 1986, 21(10):767-771.
- [3] 吴宗好, 李清华. 皖贝母与浙贝母、川贝母有效成分生物碱的对比分析[J]. 中草药, 1993, 24(7):351-353.
- [4] 汪丽燕, 韩传环, 王萍. 皖贝与川贝和浙贝止咳祛痰的药理作用比较[J]. 安徽医学, 1993, 14(3):57-58.
- [5] 韩传环, 周晓琳. 皖贝精的药效学研究[J]. 中药药理与临床, 1995, 11(6):27-28.
- [6] SILVERSTEIN R M, WEBSTER F X, KIEMLE D J, 等. 有机化合物的波谱解析[M]. 上海:华东理工大学出版社, 2017:9-12.
- [7] 周建良, 刘伟, 郭增喜, 等. 基于快速液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱的浙贝母特征图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17):2832-2837.
- [8] ZHOU J L, XIN G Z, SHI Z Q, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(45):7109-7122.
- [9] ZHOU J L, LI P, LI H J, et al. Development and validation of a liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry method for relative and absolute quantification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species [J]. J Chromatogr A, 2008, 1177(1):126-137.
- [10] MOHAMMAT A, YILI A, AISA H A. Rapid quantification and quantitation of alkaloids in Xinjiang *Fritillaria* by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Molecules, 2017, 22(5):719.
- [11] ZHANG Q J, ZHENG Z F, YU D Q. Steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria unibracteata* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2011, 13(12):1098-1103.

(收稿日期: 2021-09-02 编辑: 田苗)