

[J]. 中草药, 2014, 45(4): 466-470.

[10] 孙琳, 黄松, 赖小平. HPLC 法测定不同产地及品种木豆叶中牡荆苷的含量[J]. 中药材, 2011, 34(1): 31-32.

[11] 佟美鸿, 刘威, 付玉杰, 等. HPLC 法测定木豆中牡荆苷和异牡荆苷含量[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(6): 34-38.

[12] 季兴跃, 薛司徒, 李卓荣. 木豆叶主要活性成分及其药理作用的研究进展[C] //2010 年中国药学会大会暨第十届中国药师周. 北京: 中国药学会, 2010: 9.

[13] 李公营, 唐洪梅, 岳振文, 等. 岭南常见中药木豆叶牡荆苷的 HPLC 含量测定[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(6): 474-476.

[14] 张俊清, 李海龙, 谭银丰, 等. 木豆叶的质量评价研究[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1723-1725.

[15] 黄松, 孙琳, 赖小平, 等. 海南产木豆叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2010, 34(5): 699-702.

HPLC-Q-TOF/MS 法鉴定血水草中的异喹啉类生物碱

杨鹏¹, 卿志星¹, 向峰¹, 曾建国^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208; 2. 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)

摘要: **目的** 利用 HPLC-Q-TOF/MS 法鉴定血水草 *Eomecon chionathe* Hance 中的异喹啉类生物碱。**方法** 血水草甲醇提取液的分析采用 XAqua C₈ 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 甲酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 284 nm。结合对照品的二级质谱数据及相关文献, 推测异喹啉类生物碱的结构。**结果** 从中鉴定出 19 个生物碱, 其中 14 个 (木兰箭毒碱、博落回碱、6-羟甲基二氢血根碱、6-羟甲基二氢白屈菜红碱、6-甲氧基二氢血根碱、6-甲氧基二氢白屈菜红碱、6-丙酮基二氢血根碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱、6-乙酰基二氢血根碱、6-乙酰基二氢白屈菜红碱、6-羧甲基二氢血根碱、6-羧甲基二氢白屈菜红碱、二氢血根碱、二氢白屈菜红碱) 为首次在血水草中发现。**结论** 该方法快速准确, 可为血水草化学成分的提取分离和药效物质基础的研究提供依据。**关键词:** 血水草; 异喹啉类生物碱; HPLC-Q-TOF/MS
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)07-1439-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.025

Identification of isoquinoline alkaloids in *Eomecon chionathe* by HPLC-Q-TOF/MS

YANG Peng¹, QING Zhi-xing¹, XIANG Feng¹, ZENG Jian-guo^{1,2*}
(1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. National and Provincial Union Engineering Research Center for Veterinary Herbal Medicine Resources and Initiative, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

KEY WORDS: *Eomecon chionathe* Hance; isoquinoline alkaloids; HPLC-Q-TOF/MS

血水草 *Eomecon chionathe* Hance 为罂粟科血水草属植物, 别名水黄连、土黄连、广扁线等, 是我国独有品种, 广泛分布于浙江、四川、湖南、湖北等地^[1-2], 所含生物碱具有抑菌^[3]、防治日本血吸虫^[4]和杀螺^[5-6]作用, 但其种类较少^[7] (血根碱、白屈菜红碱、原阿片碱、别隐品碱、氧化血根碱、白屈菜红默碱), 故有必要对该类成分作进一步挖掘, 为其药理活性的研究奠定基础。HPLC-Q-TOF/

收稿日期: 2016-07-24
基金项目: 长沙市科技计划重点项目 (K1308182-21)
作者简介: 杨鹏 (1990—), 男, 硕士生, 研究方向为中药化学与分析。E-mail: 137292113@qq.com
* 通信作者: 曾建国 (1965—), 男, 教授, 研究方向为中药资源与开发。Tel: (0731) 84673824, E-mail: ginkgo@world-way.net

MS 技术具有高分辨率、高灵敏度、无需对照品的特点,已广泛应用于中药化学成分分析、药物代谢动力学、代谢组学等研究领域。因此,本实验采用该方法对血水草中的生物碱进行鉴定,以期为其分离纯化和药效物质基础阐明提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1290 HPLC 串联 6530 Q-TOF/MS 仪(美国 Agilent 公司);ML 204/02 精密天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。乙腈、甲酸为色谱纯(德国 Merck 公司);甲醇为色谱纯(安徽时联特种溶剂股份有限公司);水为 Milli-Q 超纯水。原阿片碱、别隐品碱、血根碱、白屈菜红碱、6-羟甲基二氢血根碱、6-羟甲基二氢白屈菜红碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱、二氢血根碱、二氢白屈菜红碱均由本实验室分离得到,含有量均大于 98%。血水草采自国家中药材生产(湖南长沙)技术中心基地,经湖南农业大学曾建国教授鉴定为正品。

2 方法

2.1 供试品溶液制备 取血水草干燥粉末 1.0 g,置于 150 mL 锥形瓶中,50 mL 甲醇超声(600 W、40 kHz)60 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2 色谱条件 XAqua C₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.1% 甲酸-水, B 为乙腈,梯度洗脱(0~10 min, 5%~36% B; 10~20 min, 36% B; 20~25 min, 36%~55% B; 25~50 min, 55%~90% B);体积流量 0.3 mL/min;检测波长 284 nm;柱温 30 ℃;进样量 1 μL。

2.3 质谱条件 ESI 离子源,正离子检测模式;干燥器温度 300 ℃,体积流量 8 L/min;雾化器压力 3.8 × 10³ kPa;脱溶剂温度 350 ℃,体积流量 12 L/min;毛细管电压 3 500 V;锥孔电压 100 V;扫描范围 *m/z* 120~1 200;二级裂解电压 15~35 eV。

3 结果

总离子流图见图 1,最终推断出 19 个生物碱结构,其二级质谱数据见表 1。

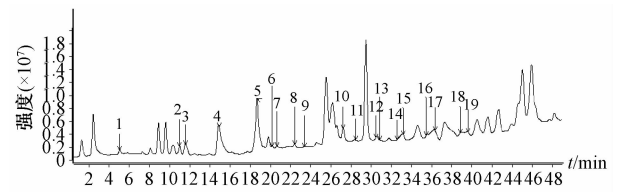


图 1 样品总离子流图
Fig. 1 Total ion current chromatogram of samples

表 1 生物碱二级质谱数据
Tab. 1 Second-order MS data of alkaloids

峰号	<i>t_R</i> /min	[<i>M</i>] ⁺ 或[<i>M</i> + <i>H</i>] ⁺ <i>m/z</i>	特征离子 MS/MS <i>m/z</i>	化合物
1	5.542	314.175 4	314,269,175,107	木兰箭毒碱
2*	11.125	354.133 2	354,336,206,188,165	原阿片碱
3*	11.632	370.164 8	370,352,206,189,181	别隐品碱
4*	14.895	332.092 0	332,317,304,274	血根碱
5*	18.644	348.122 8	348,333,318,290	白屈菜红碱
6	20.271	362.102 5	362,347,334,330	博落回碱
7	20.439	348.086 2	348,333,320,305	氧化血根碱
8*	22.311	364.117 2	364,346,331,318,275	6-羟甲基二氢血根碱
9*	23.214	380.148 6	380,362,347,334,289	6-羟甲基二氢白屈菜红碱
10	27.134	364.117 6	364,349,332,304	6-甲氧基二氢血根碱
11	28.202	380.148 2	380,365,348,318	6-甲氧基二氢白屈菜红碱
12	30.311	390.133 2	390,375,332,304	6-丙酮基二氢血根碱
13*	30.641	406.164 5	406,391,348,318	6-丙酮基二氢白屈菜红碱
14	32.402	376.117 2	376,365,332,304	6-乙酰基二氢血根碱
15	33.113	392.149 0	392,377,348,318	6-乙酰基二氢白屈菜红碱
16	35.216	392.112 5	392,377,374,332,304	6-羧甲基二氢血根碱
17	36.174	408.143 7	408,393,390,348,318	6-羧甲基二氢白屈菜红碱
18*	38.634	334.107 2	334,319,318,304	二氢血根碱
19*	39.482	350.138 4	350,335,334,319	二氢白屈菜红碱

注: * 为对照品
3.1 苯并菲啶类生物碱 血根碱和白屈菜红碱都具有大 π 共轭体系,母核较稳定,仅有部分取代

基的裂解。分子离子失去氮甲基形成 M-15 的碎片峰,血根碱 7,8 位是亚甲二氧基失去 CO 形成 *m/z*

304 的碎片峰,继续失去 2H 和 CO 形成 m/z 274 的碎片峰;白屈菜红碱 7, 8 位是甲氧基失去 2 个甲基自由基形成 m/z 318 的碎片峰,接着继续失去 CO 形成 m/z 290 的碎片峰,其相邻的甲氧基也可以失去 CH_4 形成 m/z 332 的碎片峰,裂解方式与血根碱相似。血根碱和白屈菜红碱质谱图见图 2, 质谱裂解途径见图 3, 推定化合物 4~6 为苯并菲啶类生物碱。

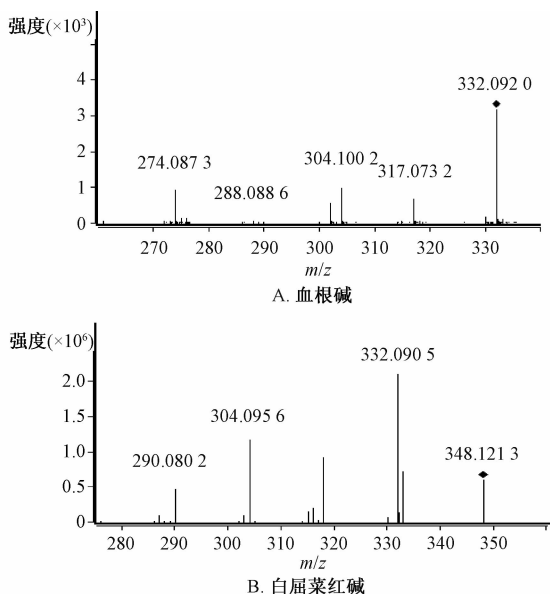


图 2 苯并菲啶类生物碱质谱图

Fig. 2 MS chromatograms of benzophenanthrine-type alkaloids

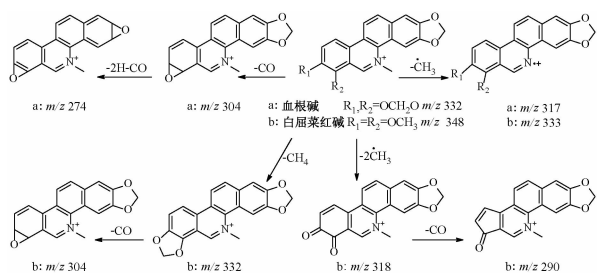
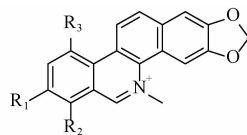


图 3 苯并菲啶类生物碱质谱裂解途径

Fig. 3 MS fragmentation pathways of benzophenanthrine-type alkaloids

化合物 4 和 5 离子化相对分子质量分别为 m/z 332.092 0 ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_4^+$) 和 m/z 348.122 8 ($\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$), 与血根碱和白屈菜红碱对照品相似, 而且总离子流图保留时间和二级特征碎片离子也相似, 推定前者为血根碱, 后者为白屈菜红碱。化合物 6 离子化相对分子质量为 m/z 378.133 2 ($\text{C}_{22}\text{H}_{20}$

NO_5^+), 分子离子失去氮甲基形成 m/z 363 的碎片峰, 接着失去 10 位上甲氧基的甲基, 形成 m/z 348 的碎片峰, 特征碎片峰与血根碱相似, 推定为博落回碱^[8]。化合物结构见图 4。



- 4: 血根碱 $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{OCH}_2\text{O}, \text{R}_3 = \text{H}$ m/z 332
5: 白屈菜红碱 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{OCH}_3, \text{R}_3 = \text{H}$ m/z 348
6: 博落回碱 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_3$ m/z 378

图 4 苯并菲啶类生物碱结构

Fig. 4 Structures of benzophenanthrine-type alkaloids

3.2 二氢苯并菲啶类生物碱 二氢血根碱脱氢形成 m/z 332 的碎片峰; 6-羟甲基二氢血根碱失去 CH_3OH 形成 m/z 332 的碎片峰, 或失去水形成 m/z 346 的碎片峰, 其中前者的裂解方式与血根碱相同。二氢白屈菜红碱脱氢和 6-丙酮基二氢白屈菜红碱失 CH_3COCH_3 形成 m/z 348 的碎片峰; 6-羟甲基二氢白屈菜红碱失去 CH_3OH 形成 m/z 348 的碎片峰, 或失去水形成 m/z 362 的碎片峰, 其中前者的裂解方式与白屈菜红碱相同。二氢苯并菲啶生物碱对照品二级质谱图见图 5, 质谱裂解途径如图 6, 推定化合物 7~19 为二氢苯并菲啶类生物碱。

化合物 8、9、13、18、19 与对照品精确相对分子质量、总离子流图保留时间和二级质谱图相似, 推定化合物 8 为 6-羟甲基二氢血根碱, 9 为 6-羟甲基二氢白屈菜红碱, 13 为 6-丙酮基二氢白屈菜红碱, 18 为二氢血根碱, 19 为二氢白屈菜红碱。结合对照品的质谱裂解规律, 10~12、14、15 与血根碱和白屈菜红碱的区别是首先失去 6 位取代基, 得到 m/z 332 和 m/z 348 的碎片峰; 10 和 11 失去 CH_3OH , 与 8 和 9 的区别只是没有失去 H_2O 的碎片峰, 推定前者为 6-甲氧基二氢血根碱, 后者为 6-甲氧基二氢白屈菜红碱^[9]; 12 失去 CH_3COCH_3 后与血根碱对照品特征碎片相似, 推定为 6-丙酮基二氢血根碱^[9]; 14 和 15 失去 CH_3COH 后与血根碱和白屈菜红碱特征碎片相似, 推定前者为 6-乙酰基二氢血根碱, 后者为 6-乙酰基二氢白屈菜红碱^[10]; 16 和 17 首先形成 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 的碎片峰, 或失去 CH_3COOH 后形成 m/z 332 和 m/z 348 的碎片峰, 其余与血根碱和白屈菜红碱对照品的裂解方式相似, 推定前者为 6-羧甲基二氢血根碱, 后者为 6-羧甲基二氢白屈菜红碱^[9]。7 分子离

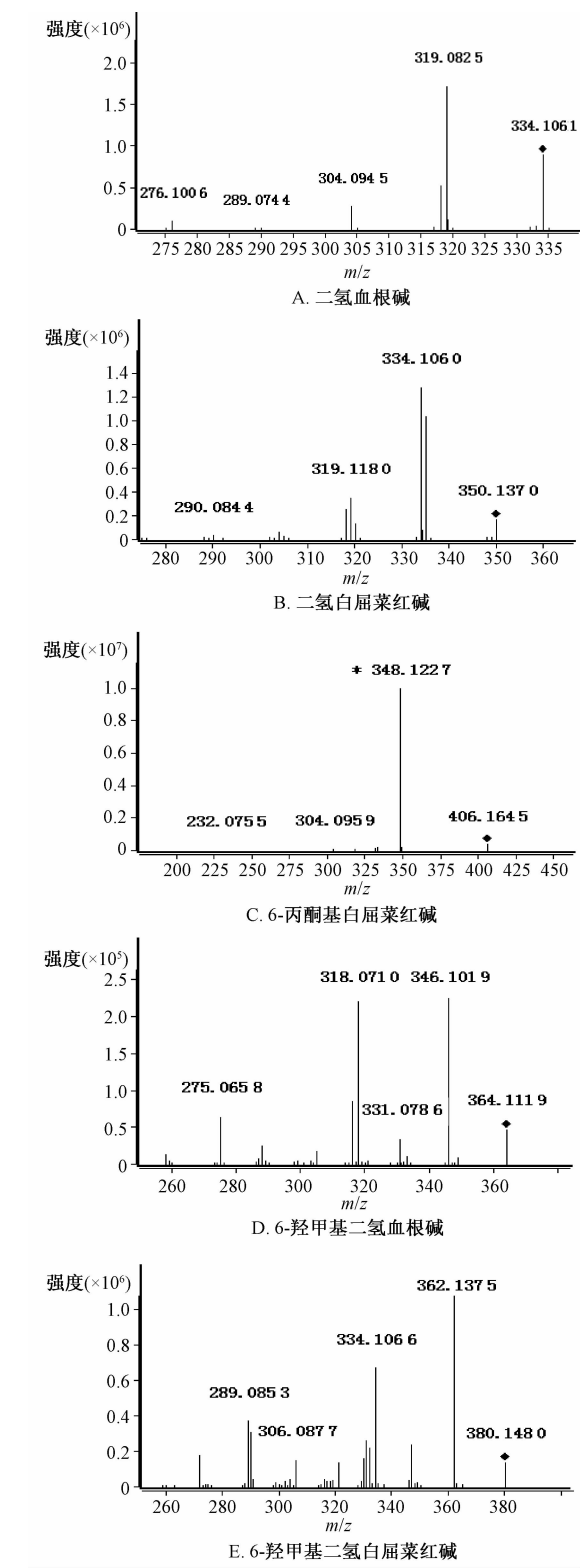


图 5 二氢苯并菲啶类生物碱质谱图

Fig. 5 MS chromatograms of dihydrobenzophenanthridine-type alkaloids

子峰失去 CO 形成 M-28 的碎片峰，其余与血根碱对照品裂解方式相似，推定为氧化血根碱^[11]。化

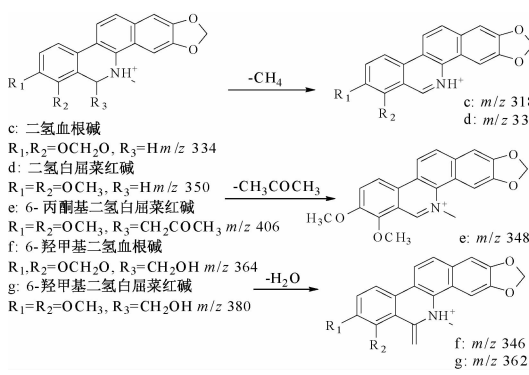


图 6 二氢苯并菲啶类生物碱质谱裂解途径
Fig. 6 MS fragmentation pathways of dihydrobenzophenanthridine-type alkaloids

合物结构见图 7。

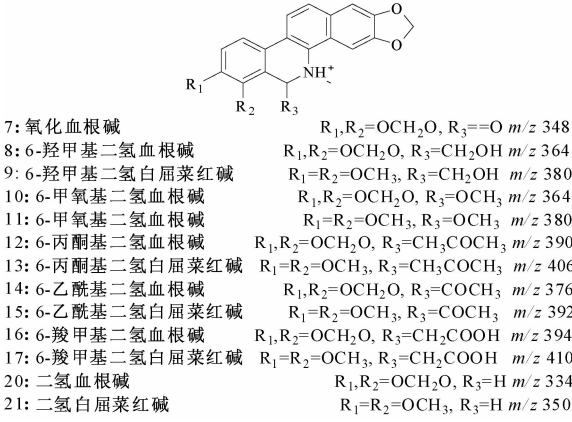


图 7 二氢苯并菲啶类生物碱结构
Fig. 7 Structures of dihydrobenzophenanthridine-type alkaloids

3.3 普罗托品类生物碱 原阿片碱和别隐品碱结构中无大 π 共轭体系，母核易断裂发生 RDA 裂解和 α 裂解形成小分子片段，然后失去 H_2O 形成 M-18 的碎片峰。其中，前者发生 RDA 裂解形成 m/z 206、149 的碎片峰， α 裂解形成 m/z 190、165 的碎片峰；后者发生 RDA 裂解形成 m/z 206、165 的碎片峰， α 裂解形成 m/z 190、181 的碎片峰，两者二级质谱图见图 8，质谱裂解途径见图 9。化合物 2 和 3 的精确相对分子质量、保留时间和特征碎片离子与原阿片碱和别隐品碱相同，推定前者为原阿片碱，后者为别隐品碱。

3.4 苄基异喹啉类生物碱 化合物 1 的离子化相对分子质量为 m/z 314.1756 ($C_{16}H_{24}NO_3^+$)，分子离子失去一分子 $(CH_3)_2NH$ 形成 m/z 269 的碎片峰，分别发生 α 裂解形成 m/z 175 的碎片离子、 β

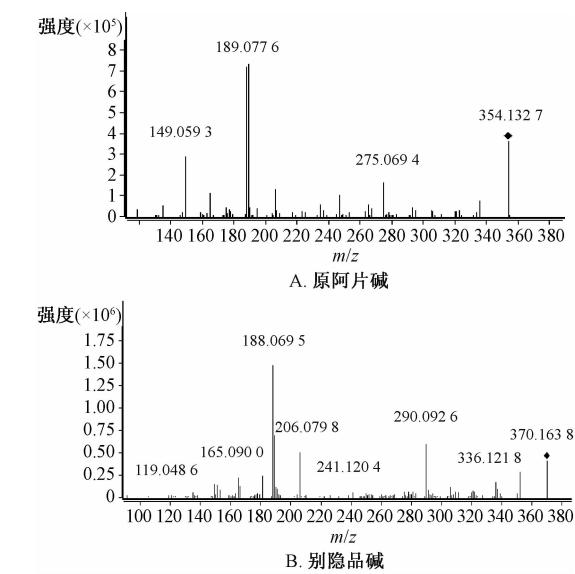


图 8 原阿片碱和别隐品碱质谱图
Fig. 8 MS chromatograms of protopine and allcryptine

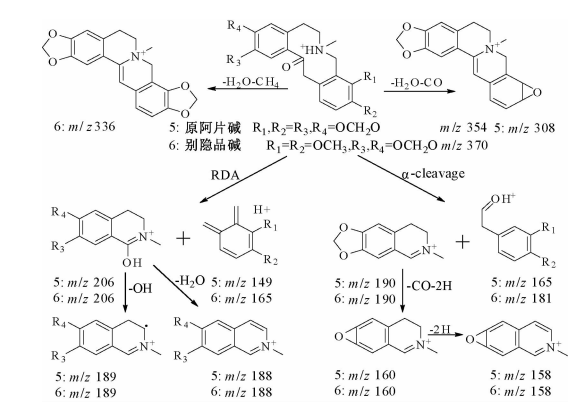


图 9 原阿片碱和别隐品碱质谱裂解途径
Fig. 9 MS fragmentation pathways of protopine and allcryptine

裂解形成 m/z 107 的碎片离子, 推定为木兰箭毒碱^[12], 质谱裂解途径见图 10。

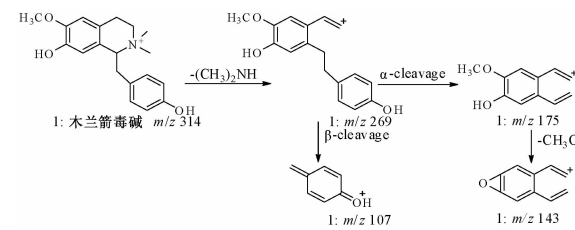


图 10 木兰箭毒碱质谱裂解途径
Fig. 10 MS fragmentation pathway of magnocurarine

4 结论

本实验通过 HPLC-Q-TOF/MS 法对血水草中的生物碱进行分析, 通过对照品的裂解规律和文献核

对, 推断出 19 个生物碱, 其中木兰箭毒碱、博落回碱、6-羟甲基二氢血根碱、6-羟甲基二氢白屈菜红碱、6-甲氧基二氢血根碱、6-甲氧基二氢白屈菜红碱、6-丙酮基二氢血根碱、6-丙酮基二氢白屈菜红碱、6-乙酰基二氢血根碱、6-乙酰基二氢白屈菜红碱、6-羧甲基二氢血根碱、6-羧甲基二氢白屈菜红碱、二氢血根碱、二氢白屈菜红碱为首次在血水草中发现。该方法具有快速、准确、无需对照品等特点, 对天然产物复杂体系中活性成分的初步定性研究, 以及以异喹啉生物碱为原料的产品开发具有重要意义。

参考文献:

[1] 曾建飞. 中国植物志: 第 32 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 76.

[2] 刘年猛, 彭 飞, 周天达, 等. 血水草的生药鉴定[J]. 中药材, 2001, 24(1): 21-23.

[3] 孙文霞, 袁仕善, 黄琼瑶, 等. 血水草生物碱及其血根碱抑菌作用的研究[J]. 实用预防医学, 2010, 17(9): 1864-1866.

[4] 黄琼瑶, 彭 飞, 刘年猛, 等. 血水草生物碱杀灭钉螺及日本血吸虫尾蚴的实验研究[J]. 实用预防医学, 2003, 10(3): 289-291.

[5] 周 兵, 邹 有, 闫小红, 等. 血水草提取物对福寿螺的杀螺效果[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(7): 1390-1393.

[6] 黄琼瑶, 刘年猛, 彭 飞, 等. 血水草生物碱杀螺、杀蚴作用的研究[J]. 热带病与寄生虫学, 2003, 1(4): 216-219.

[7] 杜方麓, 陈胜璜, 阳长明, 等. 血水草的化学成分研究[J]. 中草药, 1993, 24(4): 177-179.

[8] Chen Y Z, Liu G Z, Shen Y, et al. Analysis of alkaloids in *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2104-2110.

[9] 肖会君, 段宏泉. 博落回化学成分及其活性研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2013.

[10] Cai M, Zhou Y, Wang X L, et al. Rapid structural characterization of isomeric benzo [c] phenanthridine alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(12): 1931-1936.

[11] Qing Z X, Cheng P, Zeng J G, et al. Structural speculation and identification of alkaloids in *Macleaya cordata* fruits by high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with a screening procedure[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2014, 28(9): 1033-1044.

[12] Li Y B, Zhang T J, Zhang X L. Chemical fingerprint analysis of *Phellodendri amurensis* Cortex by ultra performance LC/Q-TOF-MS methods combined with chemometrics[J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(21): 3347-3353.