

# 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术对黄连须生物碱类成分及其裂解规律的分析

郝艺铭<sup>1</sup>, 霍金海<sup>1</sup>, 王涛<sup>2</sup>, 孙国东<sup>1</sup>, 王伟明<sup>1\*</sup>(1.黑龙江省中医药科学院中药研究所, 哈尔滨 150036; 2.绵阳市农业科学研究院中药材研究所, 四川 绵阳 621000)

**摘要:** **目的** 应用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术(ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)分析黄连须中生物碱类成分, 并对其中主要类型生物碱的裂解规律进行解析。**方法** 采用 Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱, 质谱采用电喷雾离子源, 正负离子模式下采集数据, 在 Peakview 2.0/masterview 1.0 软件中依据自建的黄连化学成分数据库筛查化合物, 通过精确质量数及比对 Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 software 所含的 1 000 余种中草药对照品二级谱图进行裂解规律分析。**结果** 鉴定并推断出黄连须中 19 个生物碱类成分, 并对其中原小檗碱型、氧化小檗碱型及普罗托品型生物碱的裂解规律进行了分析。**结论** 该法为黄连须成分研究提供了依据, 证明了黄连须的利用价值, 并对其进一步开发利用奠定了基础。

**关键词:** 黄连须; 超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术; 生物碱; 裂解规律

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)21-2582-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.21.004

引用本文: 郝艺铭, 霍金海, 王涛, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术对黄连须生物碱类成分及其裂解规律的分析[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2582-2586.

## Analysis of Alkaloids and Their Fragmentation Behavior of Coptis Rootlet by UPLC-Q-TOF-MS

HAO Yiming<sup>1</sup>, HUO Jinhai<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, SUN Guodong<sup>1</sup>, WANG Weiming<sup>1\*</sup>(1.Institute of Chinese Materia Medica, Heilongjiang Academy of Chinese Medicine Sciences, Harbin 150036, China; 2.Institute of Chinese Medicinal Materials, Mianyang Academy of Agricultural Sciences, Mianyang 621000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To analysis alkaloids and their fragmentation behavior of Coptis rootlet by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry(UPLC-Q-TOF-MS). **METHODS** The separation was performed on the chromatographic column of Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> by gradient elution with 0.1% formic acid water(A) and 0.1% formic acid acetonitrile(B). An electrospray ion source was used for mass spectrometry to collect data in both positive and negtive ion mode. Screening compounds in the Peakview 2.0/masterview 1.0 software based on the self-built Coptis chemistry database. The secondary spectra of more than 1 000 kinds of Chinese herbal medicine reference substances contained in Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 software were analyzed by accurate mass number and comparison. **RESULTS** Nineteen alkaloids in Coptis rootlet were identified and inferred, and the fragmentation behavior of protoberberine, oxidized berberine and protopine alkaloids were analyzed. **CONCLUSION** This method provides a basis for the study of the constituents of Coptis rootlet, which proves the utilization of Coptis rootlet and lays a foundation for its further development and utilization.

**KEYWORDS:** Coptis rootlet; UPLC-Q-TOF-MS; alkaloids; fragmentation behavior

黄连为毛茛科植物黄连(*Coptis chinensis* Franch.)、三角叶黄连(*Coptis deltoidea* C.Y.Cheng et Hsiao.)或云连(*Coptis teeta* Wall.)的干燥根茎, 在我国已沿用 2 000 多年, 具有清热燥湿、泻火解毒的功效<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明其在抗菌、降糖、抗氧化等方面也具有显著作用<sup>[2-4]</sup>。

黄连根茎在临床中被广泛使用<sup>[5]</sup>, 其有效成分主要为异喹啉类生物碱<sup>[6]</sup>, 如小檗碱、黄连碱、巴马汀及药根碱等。黄连须常常被丢弃, 然而有研究表明, 黄连副产物中仍含有大量有效成分<sup>[7]</sup>, 如果将黄连须中生物碱成分进一步有效利用, 将有利于中药植物资源综合利用, 对于提高农民种植

基金项目: 国家中药材产业技术体系(CARS-21)

作者简介: 郝艺铭, 男, 硕士生 Tel:15774630480 E-mail: hym1346010402@163.com \*通信作者: 王伟明, 女, 博士, 研究员 Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

中药材收入及延伸中药产业链等方面均具有重要意义。目前课题组已将黄连须用于相关日化产品开发,如抗菌洗手液、漱口水及湿巾抗菌成分添加剂等,然而现有的黄连须有效成分的深入研究相对较少,因此建立黄连须生物碱类物质快速分析的新方法,对于黄连须药理活性物质的深入研究及未来开发利用都具有重要参考价值。

超高效液相色谱-飞行时间质谱 (ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 技术以其高分辨、高灵敏度等优势已被广泛用于物质化学成分鉴别<sup>[8-11]</sup>。本实验采用该技术可快速筛查黄连须生物碱类成分,并根据精确质量数及比对 Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 software 数据库(该数据库包含 1 000 余种中草药对照品的二级谱图信息)中对照品二级镜像图对原小檗碱型、氧化小檗碱型及普罗托品型生物碱的裂解规律进行分析,为黄连须生物碱类成分的深入研究奠定基础。

## 1 仪器、试剂与材料

ExionLC AD 超高效液相色谱仪、Triple-TOF™ 5600+型质谱仪、Peakview 2.0/Masterview 1.0 software、Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 software 均来自美国 AB SCIEX 公司; KQ-800KDB 型超声波清洗器(浙江昆山超声仪器有限公司)。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

3 年生黄连药材采自四川省绵阳市,经黑龙江省中医药科学院霍金海副研究员鉴定为毛茛科黄连属植物黄连(*Coptis chinensis* Franch.)的须根,通风处阴干后用于样品制备。

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的制备

取黄连须粉末(过 2 号筛) 0.8 g,精密称定,加甲醇 25 mL 超声处理(功率 800 W,频率 40 kHz) 40 min,补足甲醇,摇匀过滤,取续滤液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

### 2.2 色谱条件

Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), AQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> VanGuard Pre-Column 预柱(2.1 mm×5 mm, 1.7 μm),流动相 A 为 0.1%甲酸-水, B 为 0.1%甲酸-乙腈,梯度洗脱(0~5 min, 95%→70%A; 5~

15 min, 70%→50%A; 15~22 min, 50%→0%A; 22~23 min, 0%A; 23~23.1 min, 0%→95%A; 23.1~25 min, 95%A),流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 °C,进样量 5 μL。

### 2.3 质谱条件

ESI 离子源在正、负离子模式下采集数据,正负离子源电压分别为 5 500 V/-4 500 V,离子源温度 550 °C,裂解电压分别为 80 V/-80 V,碰撞能量分别为 35 eV/-35 eV,碰撞能量扩展为 15 eV。雾化气为氮气,辅助气 Gas1、Gas2 压力为 379.2 kPa,气帘气压力为 241.3 kPa。一级质谱母离子与子离子扫描范围为 80~1 500 Da。

### 2.4 数据分析

查阅国内外文献并结合 TCMSP 数据库,将黄连化学成分汇总,建立包含 36 种黄连生物碱成分的一级质谱数据库,包括化合物分子式、分子量、中英文名称、CAS 号等信息,结合 Peakview 2.0/masterview 1.0 软件进行目标筛查。另外,根据 Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 software 数据库中对照品二级碎片镜像图对非目标化合物进行比对筛查(该数据库包含了 1 000 余种中草药对照品的二级谱图信息)。正负离子模式下,大多数化合物会产生[M+H]<sup>+</sup>或[M-H]<sup>-</sup>分子离子,依据精确质量数及同位素丰度比确定化合物分子式,进一步与对照品数据库比对保留时间及二级碎片相似度,对所筛查化合物进行结构鉴定,推断裂解规律。

## 3 结果与讨论

### 3.1 UPLC-Q-TOF/MS 分析

黄连中有效成分主要为异喹啉类生物碱<sup>[12-13]</sup>,如小檗碱、黄连碱、巴马汀及药根碱等,因此本实验对黄连须中生物碱成分进行筛查。按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”和“2.3”项下色谱、质谱条件对黄连须进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析,正负模式下所得基峰离子色谱图见图 1。本方法鉴定并推断出黄连须中 19 个生物碱类化合物,其成分鉴定结果见表 1。

### 3.2 不同类型生物碱裂解规律解析

**3.2.1 原小檗碱型生物碱裂解规律解析** 对于以异喹啉为母核的原小檗碱型生物碱,若 R<sub>1</sub> 为 -OCH<sub>3</sub>,例如 Palmatine,其在高能碰撞下会失去端基上的 -CH<sub>3</sub>,与 R<sub>2</sub> 环合形成 1,3-二氧五元环。若 R<sub>3</sub> 为 -OCH<sub>3</sub>,例如 Berberine、Jatrorrhizine、

表 1 黄连须生物碱成分鉴定结果

Tab. 1 Identification of alkaloid constituents of Coptis rootlet

序号	鉴定结果	保留时间/min	选择离子	测定值/ m/z	计算值/ m/z	误差/ ppm	分子式	主要碎片离子	物质鉴定来源
1	Noroxyhydrastinine	3.8	[M+H] <sup>+</sup>	192.065 2	192.065 52	-1.7	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	192, 174, 163, 192	黄连
2	Phellodendrin	4.0	[M] <sup>-</sup>	340.153 7	340.154 33	-1.9	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	342, 340, 325, 310, 282, 267, 252, 224	黄连、对照品
3	Magnoflorine	4.1	[M] <sup>+</sup>	342.168 1	342.169 98	-5.5	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	342, 297, 282, 265, 237, 222	黄连、对照品
4	Protopine	4.3	[M+H] <sup>+</sup>	354.133 2	354.133 60	-1.1	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	354, 339, 324, 310	对照品
5	Dehydrocheilanthifoline	4.4	[M] <sup>-</sup>	321.100 7	321.099 56	3.6	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	321, 193, 178, 134	黄连
6	Tetrahydropalmatine	4.5	[M+H] <sup>+</sup>	356.183 8	356.185 64	-5.2	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	356, 206, 190	黄连
7	Beberrubine	4.5	[M] <sup>+</sup>	322.108 3	322.107 38	2.9	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>	322, 307, 279, 250	黄连、对照品
8	Corydaldine	4.6	[M-H] <sup>-</sup>	206.082 5	206.081 17	6.5	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	206, 164, 147, 103, 91	黄连
9	Coptisine	5.8	[M] <sup>+</sup>	320.092 3	320.091 73	1.8	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub>	320, 292, 277, 262, 249, 234	黄连、对照品
10	Jatrorrhizine	6.0	[M] <sup>+</sup>	338.139 1	338.138 68	1.2	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub>	338, 323, 308, 294, 280	黄连、对照品
11	Canadine	6.3	[M-H] <sup>-</sup>	338.141 2	338.138 68	7.5	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	338, 323, 308, 293, 264	黄连
12	Phacanthine	6.5	[M-H] <sup>-</sup>	621.299 0	621.295 91	5.0	C <sub>38</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	621, 371	黄连、对照品
13	Palmatine	7.0	[M] <sup>+</sup>	352.152 6	352.154 33	-4.9	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub>	352, 337, 322, 308, 294	黄连、对照品
14	13-Methylberberrubine	7.3	[M+H] <sup>+</sup>	336.123 3	336.123 03	0.8	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>	336, 320, 306, 304, 292, 278	黄连
15	Berberine	7.3	[M+H] <sup>+</sup>	336.122 8	336.123 03	-0.7	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub>	336, 320, 306, 304, 292, 278	黄连、对照品
16	Worenine	8.1	[M] <sup>+</sup>	334.105 0	334.107 38	-7.1	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>	334, 319, 304, 290, 277	黄连
17	Allocoptopine	14.9	[M] <sup>+</sup>	369.159 0	369.157 07	5.2	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub>	369, 354, 338, 323, 307	黄连
18	Coptisinone	17.8	[M+H] <sup>+</sup>	336.086 4	336.086 65	-0.7	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub>	336, 308, 293, 278	黄连
19	Oxyberberine	18.1	[M+H] <sup>+</sup>	352.115 2	352.117 95	-7.8	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	352, 337, 322, 308, 294	黄连

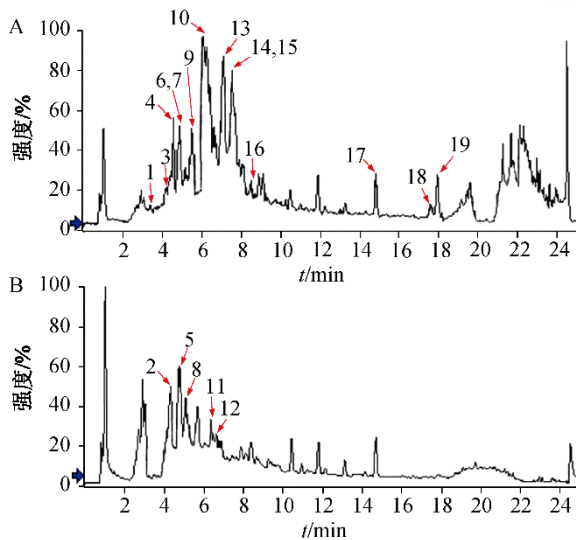


图 1 黄连须供试品正(A)、负(B)离子模式下的基峰离子色谱图

Fig. 1 Base peak chromatogram of Coptis rootlet in positive (A) and negative (B) ion mode

Palmatine; 若 R<sub>6</sub> 为 -CH<sub>3</sub>, 例如 Worenine、13-Methylberberrubine, 它们端位的 -CH<sub>3</sub> 都会脱落。另外, 1,3-二氧五元环的一侧苯环开裂, 丢失 -CO 碎片, 高能碰撞下继续失去 -CH<sub>2</sub> 碎片, 最后形成 277/278 碎片离子<sup>[14-15]</sup>, 原小檗碱型生物碱裂解规律见图 2。

以小檗碱为例, 对原小檗碱型生物碱裂解规律进行分析。小檗碱: 分子式 C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>, 在正离

子模式下产生准分子离子 336[M]<sup>+</sup>, 此碎片丰度比较小, 其在高能碰撞下失去端基上的甲基并发生氢重排产生丰度比较高的碎片离子 320[M-CH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>。该碎片一方面可失去端基位的甲基, 形成 306[M-CH<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>碎片离子; 另一方面, 也可一侧苯环开裂, 丢失 -CO 碎片, 形成 292[M-CH<sub>4</sub>-CO]<sup>+</sup>碎片离子, 继续又连续失去侧环 -CH<sub>2</sub> 碎片, 形成 278[M-CH<sub>4</sub>-CO-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>碎片离子。根据目标筛查并结合相关数据库推断该化合物为小檗碱, 其二级质谱图见图 3, 可能的裂解途径见图 4。

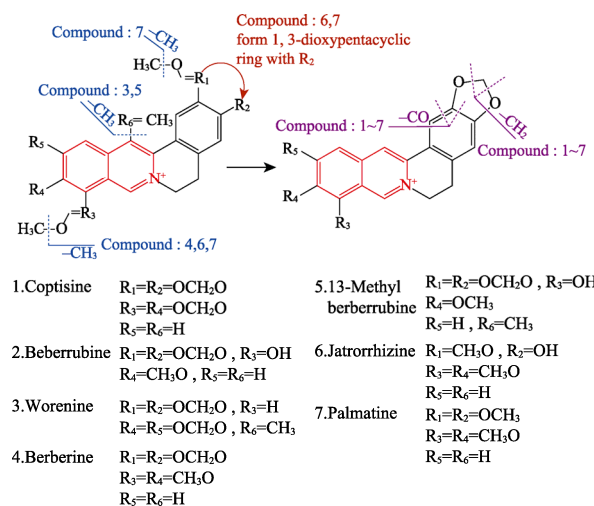


图 2 原小檗碱型生物碱裂解规律

Fig. 2 Fragmentation behavior analysis of protoberberine alkaloids

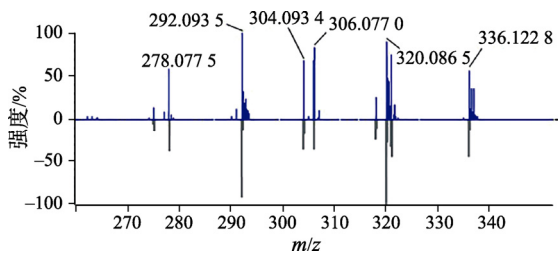


图3 小檗碱二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectrograms of Berberine

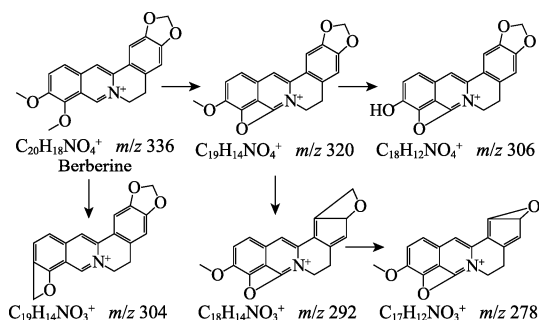


图4 小檗碱裂解规律

Fig. 4 Fragmentation behavior of Berberine

**3.2.2 氧化小檗碱型生物碱裂解规律解析** 如果异喹啉母核被氧化, 在高能碰撞下它的异喹啉结构断裂, 失去-CO 碎片, 例如化合物 Oxyberberine、Coptisinone、Noroxyhydrastinine、Corydaldine, 其二级质谱图见图5, 裂解规律见图6。

**3.2.3 普罗托品型生物碱裂解规律解析** 普罗托品型生物碱结构中无大  $\pi$ -共轭体系<sup>[16]</sup>, 母核易断裂发生  $\alpha$ -裂解形成小分子片段, 并且失去 O 原子或一分子 H<sub>2</sub>O, 分别形成 M-16、M-18 的碎片峰。原阿片碱和别隐品碱二级质谱图见图7, 裂解规律见图8。

#### 4 结论

本实验采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术, 依据所建立的黄连生物碱数据库及 Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 software 对照品数据库对黄连须生物碱类物质进行了系统筛查。鉴定并推断出 19 种生物碱, 其中由对照品非目标分析出的 Protopine 在黄连成分中未见文献报道, 根据此结果, 本实验采用该方法进一步对黄连成分进行了分析, 由对照品二级碎片及精确质量数比对发现黄连中也有普罗托品成分存在, 然而目前仅限于质谱分析, 在今后工作中需进一步对该成分进行分离鉴定, 因此本实验也对未来黄连中新成分的研究提供方向。

另外, 黄连生物碱类化合物相关质谱解析已有文献报道, 但仅限于常见物质的研究, 并未

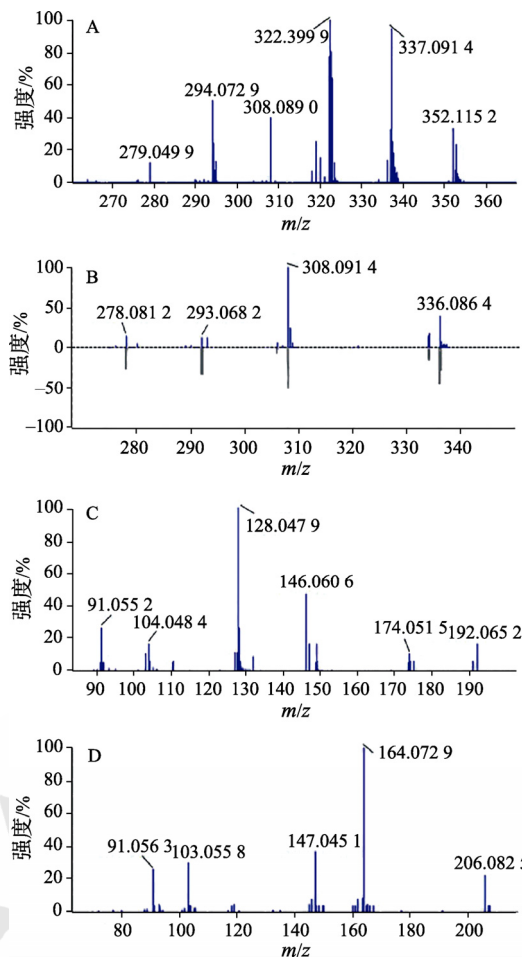


图5 氧化小檗碱型生物碱二级质谱图

A-Oxyberberine; B-Coptisinone; C-Noroxyhydrastinine; D-Corydaldine.

Fig. 5 MS/MS spectrograms of isoquinoline oxide alkaloids A-Oxyberberine; B-Coptisinone; C-Noroxyhydrastinine; D-Corydaldine.

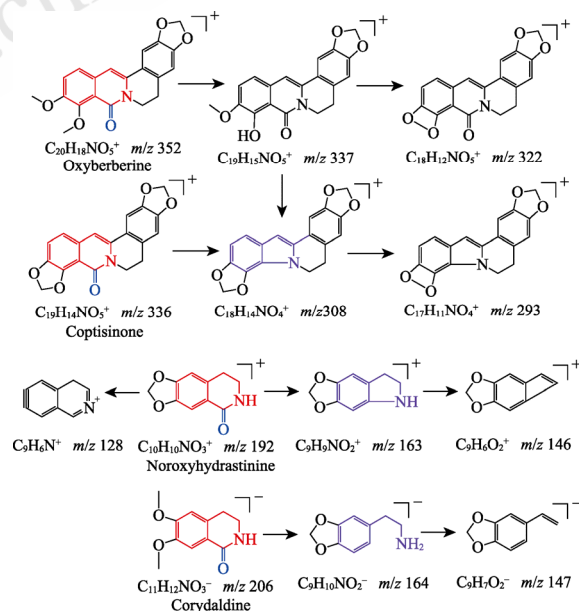


图6 氧化小檗碱型生物碱裂解规律

Fig. 6 Fragmentation behavior of isoquinoline oxide alkaloids

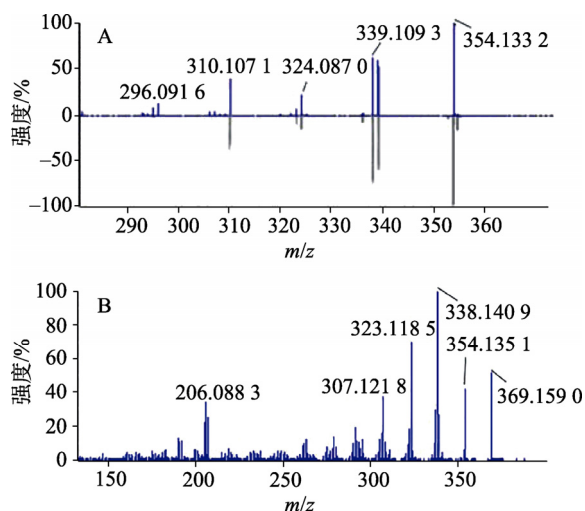


图7 普罗托品型生物碱二级质谱图

A-Protopine; B-Allocryptopine.

Fig. 7 MS/MS spectromograms of protopine alkaloids

A-Protopine; B-Allocryptopine.

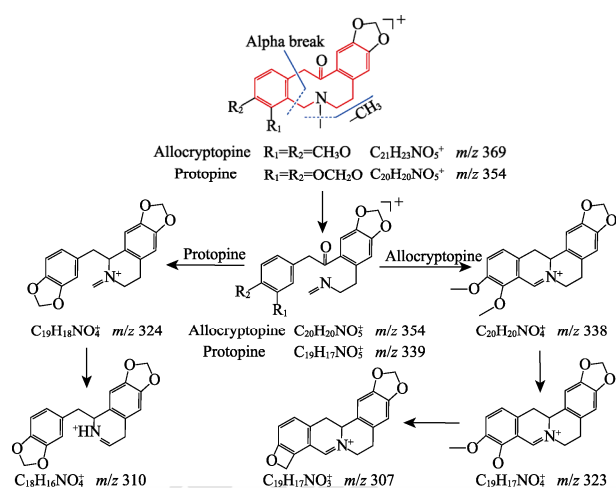


图8 普罗托品型生物碱裂解规律

Fig. 8 Fragmentation behavior of protopine alkaloids

对不同类型生物碱裂解规律进行总结。本实验将所筛选的生物碱成分分为原小檗碱型、氧化小檗碱型及普罗托品型 3 大类, 对生物碱裂解规律进行了系统分析, 并找出不同生物碱裂解途径的相关性, 为植物中化学成分的相互转化提供参考。本实验为黄连须生物碱类成分筛查提供了策略, 为其成分研究提供了依据, 同时也证明了黄连须的利用价值, 对其进一步开发利用奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] ZHANG Y, LI X, ZOU D, et al. Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(7): 2559-2565.
- [2] NIU H X, DUAN Q J, SHI G X, et al. Inhibitory effect of

extract of *Coptidis Rhizoma* on invasion of *Candida albicans* hyphae in vitro [J]. China J Chine Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(1): 125-130.

- [3] ZHEN Z, CHANG B, LI M, et al. Anti-diabetic effects of a *Coptis chinensis* containing new traditional Chinese medicine formula in type 2 diabetic rats [J]. Am J Chin Med, 2011, 39(1): 53-63.
- [4] JIANG S, WANG Y H, REN D Y, et al. Antidiabetic mechanism of *Coptis chinensis* polysaccharide through its antioxidant property involving the JNK pathway [J]. Pharm Biol, 2015, 53(7): 1022-1029.
- [5] YI L, LIANG Z T, PENG Y, et al. Histochemical evaluation of alkaloids in rhizome of *Coptis chinensis* using laser microdissection and liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Drug Test Anal, 2015, 7(6): 519-530.
- [6] LEE H S. Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(24): 7013-7016.
- [7] YUAN L, TU D, YE X, et al. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of *Coptis chinensis* franch inflorescence [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2006, 61(3): 139-144.
- [8] HE X, YANG X, ZHANG J, et al. Simultaneous determination of five constituents in Qiangli Tianma Duzhong capsules by UPLC-Q-TOF/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(8): 1140-1144.
- [9] QIN W H, YANG Y, LI Q, et al. Analysis of chemical compositions from Nepal *Cordyceps* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(13): 1574-1581.
- [10] ZHANG N, GAO X, ZHOU Y, et al. Rapid identification of chemical components in Xingbei Zhike Keli by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. China J Chine Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43(22): 4439-4449.
- [11] CHEN Y C, QIAN J H, WANG B H, et al. Analysis of components absorbed into plasma of the drug pair of *Ramulus cinnamomi* and *Paeoniae Radix Alba* by UPLC-Q/TOF-MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(12): 1707-1711.
- [12] WANG W, ZHANG Q W, YE W C, et al. Isoquinoline alkaloids from the rhizoma of *Coptis chinensis* [J]. Chin J Nat Med, 2007(5): 348-350.
- [13] JANG M H, KIM H Y, KANG K S, et al. Hydroxyl radical scavenging activities of isoquinoline alkaloids isolated from *Coptis chinensis* [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(3): 341-345.
- [14] SHIM H J, LEE J Y, KIM B, et al. General fragmentations of alkaloids in electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Mass Spectrom Lett, 2013, 4(4): 79-82.
- [15] JEONG E K, LEE S Y, YU S M, et al. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012, 26(15): 1661-1674.
- [16] QING Z X, CHENG P, LIU X B, et al. Systematic identification of alkaloids in *Macleaya microcarpa* fruits by liquid chromatography tandem mass spectrometry combined with the isoquinoline alkaloids biosynthetic pathway [J]. J Pharmaceut Biomed, 2015(103): 26-34.

收稿日期: 2019-09-17

(本文责编: 沈倩)