

人工栽培关白附中二萜生物碱的 HPLC-Q-TOF-MS 鉴别

邢贝妮¹, 吴琼¹, 汤庆发², 刘静涵¹, 梁敬钰^{1*}, 杨春华^{3,4**}

(¹中国药科大学天然药物化学教研室,南京 210009; ²南方医科大学中医药学院,广州 510515; ³中国药科大学药物科学研究院,南京 210009; ⁴美国佐治亚州立大学生物系,亚特兰大 30303)

摘要 建立了快速鉴定 3 年生人工栽培的关白附中二萜生物碱类化学成分的分析方法。采用碱化乙醚超声提取关白附药材粉末,提取物以流动相定容制备供试液;样品用 Zorbax-SB C₁₈ 柱分离,以含 0.2% 甲酸和 0.1% 三乙胺的缓冲溶液/乙腈为流动相,梯度洗脱,应用 ESI-Q-TOF 检测,正离子模式下采集数据;根据色谱峰的准确分子量、液相色谱保留时间以及质谱裂解方式比较等方法鉴别化合物。结果表明,借助 HPLC-Q-TOF-MS 方法从关白附中分离检测出 60 个成分,根据保留时间和二级质谱裂解规律鉴定了其中 26 个二萜生物碱,为人工栽培关白附的化学成分鉴定和未知化合物发现提供了一种快速方法。与此同时总结了 C₂₀-二萜生物碱(Hetisine 型、Atisine 型)及 C₁₉二萜生物碱(Lycoctonine 型)在 ESI 正离子模式下的质谱裂解规律。

关键词 关白附;二萜生物碱;HPLC-Q-TOF-MS

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2014)02-0192-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140211

Identification of diterpenoid alkaloids in the roots of cultured *Aconitum coreanum* by HPLC-Q-TOF-MS

XING Beini¹, WU Qiong¹, TANG Qingfa², LIU Jinghan¹, LIANG Jingyu^{1*}, YANG Chunhua^{3,4**}

¹Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; ²School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ³Pharmaceutical Research Institute, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; ⁴Department of Biology, Georgia State University, Atlanta, GA 30303, USA

Abstract Our research tentatively summarized the fragment pathways of three different types of diterpenoid alkaloids under electrospray positive mode and established a rapid method for identifying diterpenoid alkaloids in the roots of cultured *Aconitum coreanum* (Lèvl.) Rapaics. The powder of the roots was extracted with diethyl ether. After removing the diethyl ether under reduced pressure, the extract was dissolved in 0.1% formic acid aqueous solution, separated on HPLC by using an Agilent Zorbax SB-C₁₈ reverse-phase column with a gradient elution of aqueous solution (containing 0.2% formic acid, 0.1% triethylamine) and acetonitrile, and then detected by Q-TOF mass spectrometer equipped with electrospray ionization source operated in positive ion mode. Compounds in the roots of *Aconitum coreanum* were identified by the accurate molecular weight obtained by HRMS, comparison of the MS fragment pathways and LC retention time with those of reference standards. As a result, 60 compounds were tentatively detected, 26 of which were assigned to known diterpenoid alkaloids. This established method is an accurate and effective way to identify the known constituents and discover the unknown ones from *Aconitum coreanum*.

Key words *Aconitum coreanum*; diterpenoid alkaloids; HPLC-Q-TOF-MS

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81202431); the Natural Science Foundation of

* 收稿日期 2013-11-15 通信作者 * Tel: 025-83271415 E-mail: jyliang08@126.com

** E-mail: ychjnjcpt@gmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81202431);广东省自然科学基金资助项目(No. S2012010009576);中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室资助项目(No. JKQG 201118)

Guangdong Province (No. S2012010009576); the Project Program of State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University (No. JKQG 201118)

关白附为毛茛科乌头属植物黄花乌头 (*Aconitum coreanum* (Lévl.) Rapaics) 的干燥块根, 主要分布于我国河北、辽宁、吉林等地, 具有祛风痰、定惊痛、散寒止痛之功效, 临床用于治疗心痛血痹、口眼歪斜、中风痰壅、风湿痹痛、皮肤湿痒等症^[1]。关白附的主要有效成分是二萜生物碱, 目前已经从中分离得到 30 余个成分, 分属 C₂₀-二萜生物碱(包括 Hetisine 型、Atisine 型) 和 C₁₉-二萜生物碱(Lycoctonine 型)。其主要成分——关附甲素(2,11-二乙酰,14-羟基 hetisine), 具有显著的抗心律失常作用, 已成功开发成我国拥有自主知识产权的一类新药——盐酸关附甲素注射液^[2]。

HPLC-MS 联用技术结合了高效液相色谱强大的分离能力及质谱的高鉴别特点, 不但可以对已知成分进行定性定量分析, 也可以通过质谱给出的分子量和裂解碎片信息, 结合同类已知化合物的裂解规律, 对未知成分进行初步判别^[3-5]。中药成分复杂, 提取分离难度大, HPLC-MS 联用技术尤其适合对复杂样品的分析, 因此在中药研究领域得到了广泛的应用。

目前对关白附化学成分的研究主要集中在其药效活性成分的鉴定和定量方面, 不能全面反映关白附药材物质基础及成分多样性^[6-10]。本研究首先用已有的化学对照品进行电喷雾质谱裂解实验,

初步总结了不同类型二萜乌头生物碱的电喷雾质谱裂解规律, 在此基础上采用高效液相色谱-电喷雾四极杆飞行时间质谱(HPLC-ESI-Q-TOF-MS)联用技术尝试对吉林省人工栽培关白附中的化学成分进行分析, 初步表征了 60 个成分, 通过高分辨质谱技术、二级质谱技术以及保留时间比较进一步鉴定了其中的 26 个二萜生物碱, 为关白附的药效物质研究奠定了基础。

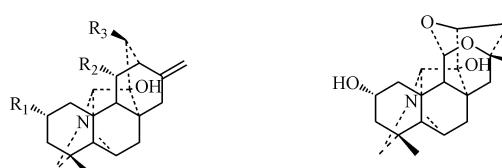
1 材 料

1.1 药品与试剂

乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司), 其他试剂均为市售分析纯。

化学对照品关附甲素(GFA)、关附胺醇(GFAA)、关附己素(GFF)、关附己素(GFP)、关附子素(GFK)、关附辛素(GFH)、次乌头碱(hypaconitine)和中乌头碱(mesaconitine)为实验室自制对照品, 结构经 UV、IR、NMR、MS 鉴定, 纯度经 HPLC 峰面积归一化法测得大于 98%, 结构式见图 1。

关白附药材(3 年生, 批号 1201-1205)由吉林敖东洮南药业股份有限公司采收于吉林省关白附人工栽培基地, 采收时间: 2012 年 10 月中旬, 经中国药科大学秦民坚教授鉴定为毛茛科乌头属植物关白附 (*Aconitum coreanum* (Lévl.) Rapaics) 的块根。

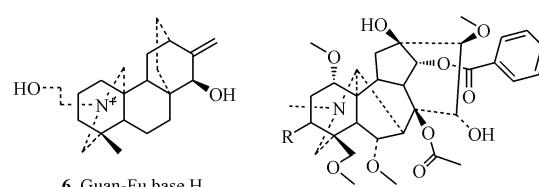


1 Guan-Fu base A (GFA): R₁=R₃=Ac, R₂=H

2 Guan-Fu aminol alcohol (GFAA): R₁=R₂=R₃=H

3 Guan-Fu base F (GFF): R₁=isobutyryl, R₂=H, R₃=Ac

4 Guan-Fu base base P (GFP): R₁=isobutyryl, R₂=Ac, R₃=Ac



6 Guan-Fu base H

7 Hypaconitine: R=H

8 Mesaconitine: R=OH

Figure 1 Structures of the authentic compounds

1.2 仪 器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Q-TOF MicroTM 质谱仪, Masslynx 4.1 工作站(美国 Waters 公司); AE 241 型电子天平(瑞士 Metter 公司); KQ-250DE 型医用数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); 旋转蒸发仪(瑞士

Büchi 公司)。

2 方 法

2.1 样品制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取关附甲素、关附胺醇、关附己素、关附己素、关附子素、关附辛素,

次乌头碱和中乌头碱对照品适量,精密称定,用流动相A相溶解,制成 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液及 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的单独对照品溶液。

2.1.2 样品溶液的制备 取过60目筛的关白附药材粉末约 1.0 g ,精密称定,加入氨水饱和乙醚 50 mL ,超声提取 30 min ,过滤,减压浓缩,加入流动相A相定容至 50 mL ,过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,即得。

2.2 对照品质谱直接进样条件

离子源参数:ESI(+),毛细管电压: 2 500 V ;样品锥孔电压: 30 V ;提取锥孔电压: 3 V ;源温度: $100\text{ }^{\circ}\text{C}$;去溶剂温度: $200\text{ }^{\circ}\text{C}$;锥孔气流速: 50 L/h ,去溶剂气体流速: 300 L/h ,碰撞气:高纯氩,碰撞电压: $45\sim145\text{ V}$; $30\text{ }\mu\text{L/min}$ 流动注射进样, $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ GFAA(m/z 346, 201 8)作为LockSpray校正液实时校正。

2.3 液质联用条件

2.3.1 液相分离 色谱柱:Zorbax-SB C₁₈柱($3.0\text{ mm}\times250\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$);流动相A: 0.2% 甲酸, 0.1% 三乙胺的缓冲溶液,流动相B:乙腈,梯度洗脱($0\text{ min}, \text{B}:10\%$; $40\text{ min}, \text{B}:27\%$; $85\text{ min}, \text{B}:50\%$);柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;流速: 0.4 mL/min ;二极管阵列检测器(DAD)检测波长为 205 nm ;进样体积为: $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源带LockSpray校正,正离子模式,氮气为雾化气,高纯氩为碰撞气;毛细管电压: 3 000 V ,样品锥孔电压: 30 V ,提取锥孔电压: 3 V ,碰撞电压: 6 V ,离子源温度: $100\text{ }^{\circ}\text{C}$;去溶剂气体温度: $200\text{ }^{\circ}\text{C}$;锥孔气流速: 50 L/h ;去溶剂气体流速: 400 L/h ;扫描质谱范围 m/z 105~1 000;Lock Mass参照溶液为: $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 关附胺醇溶液($\text{M}+\text{H}]^{+}$ 346, 201 8)。

2.4 成分检测与鉴定

分别取各对照品溶液,按“2.2”项下方法进行检测,采集质谱图,在线观察图谱中的分子离子峰,调节源参数,使分子离子峰响应最强且峰型对称,逐渐调大碰撞气体电压,使分子离子峰丰度为最大碎片离子峰丰度的 10% ,固定参数,采集 1 min 以上,通过Masslynx软件叠加图谱。

取供试品溶液,按“2.3”项下方法进行检测,采集得到总离子流图,通过Masslynx软件扣除溶剂峰背景,解析各色谱峰对应质谱图中的主要离子,通过LockSpray校准得到高分辨质谱数据,计算出同位素峰相对丰度比与分子式理论同位素峰

相对丰度比的拟合程度,结合高分辨质谱数据和同位素拟合度,根据测量值与理论值的偏差小于 5 和同位素拟合度小于 1.0 的原则,最终计算出可能的化合物分子式,文献检索匹配的已知化合物,进行初步的鉴定。从 $10\sim150\text{ V}$ 以 10 V 为步长逐步调节碰撞气体电压,其余参数按“2.3”项下的条件操作,得到带二级质谱裂解信息的总离子流图。

3 结果

一级质谱 关附甲素、关附胺醇、关附己素、关附乙素、关附子素、次乌头碱和中乌头碱对照品的准分子离子峰均较强,得到清楚的 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 峰,关附辛素由于是季胺盐,直接观察到分子离子峰 $[\text{M}]^{+}$ 。

药材的HPLC-MS联用 色谱条件采用 0.1% 甲酸- 0.2% 三乙胺缓冲溶液-乙腈梯度洗脱,经优化后,关白附中二萜生物碱成分能够得到较好的分离;质谱采用信号峰响应较强的正离子模式,在关白附药材HPLC-Q-TOF/MS色谱图中共表征了60个成分(图4),通过相对分子质量测定和计算,在质谱裂解图分析的基础上对化合物进行归类,以及对照化合物保留时间,初步鉴定其中26个二萜生物碱(表1),其中20个为Hetisine型C₂₀-二萜生物碱,1个Atisine型C₂₀-二萜生物碱,5个Lycoctonine型C₁₉-二萜生物碱。

3.1 Hetisine型C₂₀-二萜生物碱的HPLC-Q-TOF-MS分析

峰9在ESI⁺模式下得到 m/z 346 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ (C₂₀H₂₈NO₄),其二级质谱得到 m/z 328 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{+}$, $310[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^{+}$, $282[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^{+}$ 的碎片峰,通过比较对照品的保留时间及查阅文献^[11],鉴定其为关附胺醇(GFAA)。峰22在ESI⁺模式下得到 m/z 346 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ (C₂₀H₂₈NO₄),其二级质谱得到 m/z 310 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^{+}$, $282[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^{+}$ 的碎片离子峰,通过精确的分子质量、对照品的保留时间及参考文献信息^[12],可以鉴定该化合物为关附子素(GFK)。关白附中存在的多为14位-OH取代的Hetisine型生物碱,以结构简单的关附胺醇(14-OH Hetisine)为例,其分子无酰基取代,结构较稳定,需要较高的碰撞裂解能量(90 V),母核主要以中性丢失脱H₂O和脱CO为主,基峰为脱2分子H₂O和1分子CO的 m/z 282峰,高丰度

峰有脱2分子 H_2O 的 m/z 310峰。GFK是GFAA在酸性加热条件下的重排产物,同样,都有很高强度的碎片 m/z 282,但是脱2分子水的碎片 m/z 310的丰度没有关附胺醇的裂解质谱强,提示可能与前者有不同的裂解途径。

根据上述对无酰基取代的 Hetisine 型生物碱的二级质谱分析,可以看出 m/z 310,282 为主要离子碎片。通过对其他峰的 MS^2 分析,发现峰 4、5 和 7 均可见这些特征碎片,峰 5 在 ESI^+ 模式下得到 m/z 328[$\text{M} + \text{H}$]⁺($\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NO}_3$) 的离子峰,根据文献报道,推断其为 Hetisinone^[13]。峰 4 和 7 得到相同的离子峰和碎片峰,考虑其互为同分异构体,比对文献,并对其极性大小进行分析,推断为关附 T 素(GFT)和关附 U 素(GFU)^[14]。峰 6 虽未见特征碎片离子,但其裂解途径与上述化合物一致,可能因该化合物 14 位未有-OH 取代,结合精确分子量推断为 Hetisine^[15]。

峰 14 在 ESI^+ 模式下得到 m/z 430[$\text{M} + \text{H}$]⁺, $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{NO}_6$ 的离子峰,对 m/z 430 进行 MS^2 分析分别得到 m/z 370[$\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{COOH}$]⁺, $310[\text{M} + \text{H} - 2\text{CH}_3\text{COOH}]^+$, $292[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}]^+$, $264[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$ 的碎片峰,经过与对照品保留时间及参考文献相关信息的对照^[16],鉴定其为关附甲素(GFA)。峰 28 在 ESI^+ 模式下得

到 m/z 458[$\text{M} + \text{H}$]⁺($\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{NO}_6$),其二级质谱得到 m/z 380[$\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$, $310[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{COOH} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH}]^+$, $292[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{COOH} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH} - \text{H}_2\text{O}]^+$, $264[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{COOH} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}]^+$ 的碎片峰,经过与对照品、二级质谱信息及文献数据比对^[17],鉴定该化合物为关附己素(GFF)。峰 42 在正离子模式下其相对分子质量为 500([$\text{M} + \text{H}$]⁺, $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{NO}_7$),二级质谱显示其碎片离子分别为 m/z 412[$\text{M} + \text{H} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH}]^+$, $352[\text{M} + \text{H} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH} - \text{CH}_3\text{COOH}]^+$, $310[\text{M} + \text{H} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH} - 2\text{CH}_3\text{COOH}]^+$, $292[\text{M} + \text{H} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O}]^+$, $264[\text{M} + \text{H} - (\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH} - \text{CH}_3\text{COOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}]^+$ 的碎片峰,根据对照片的保留时间及二级质谱信息,比对参考文献数据^[18],判断其为关附己素(GFP)。

酰基取代的 Hetisine 型生物碱以关附甲素(二乙酰取代),及关附己素和关附己素(混合酰基取代)为例,一般以脱去取代酰基,以及 Hetisine 母核脱 H_2O , CO 为主,高丰度的为脱去所有取代酰基的 m/z 310 峰,脱去酰基和 H_2O 形成的 m/z 292 峰,以及进一步脱 CO 形成的 m/z 264 峰。本文将以典型化合物关附甲素为例对这类化合物可能的裂解途径进行总结(图 2)。

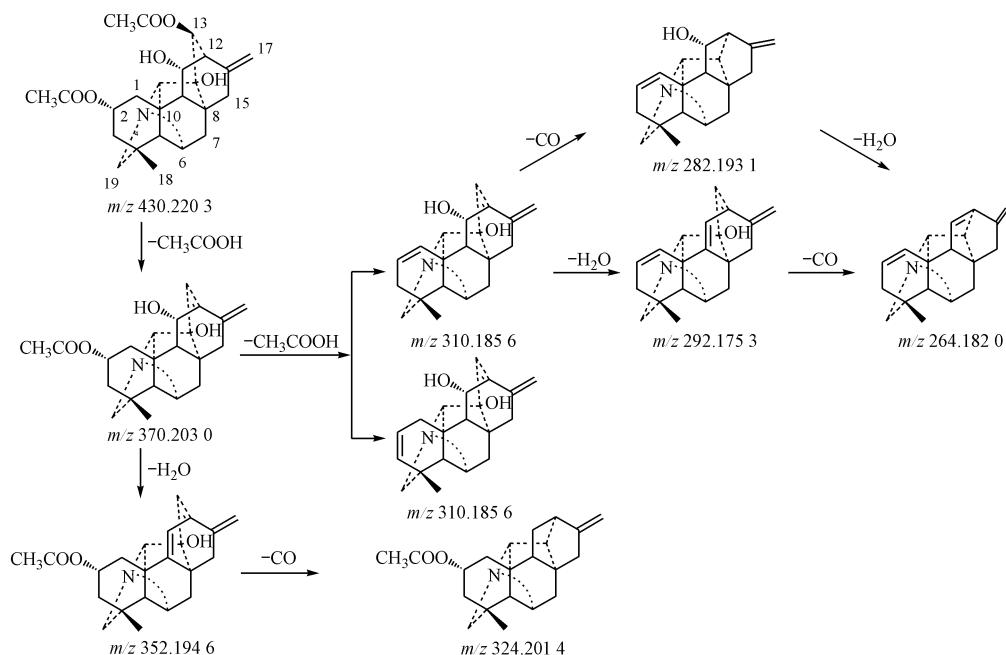


Figure 2 Fragmentation pathway of GFA

根据上述对酰化取代的 Hetisine 型生物碱的二级质谱分析,发现 m/z 310, 292, 264 为特征离子碎片。通过对其他峰的 MS² 分析,可以观察到峰 11、15、24、27、29、30、35 和 39 均出现了这些碎片离子,可以初步推断其为有酰化取代的 Hetisine 型生物碱。以峰 11 为例,在 ESI⁺ 模式下得到 m/z 388 [M + H]⁺ ($C_{22}H_{34}NO_2$), 其二级质谱得到 m/z 328 [M + H - CH₃COOH]⁺, 310 [M + H - CH₃COOH - H₂O]⁺, 292 [M + H - CH₃COOH - H₂O - CO]⁺ 的碎片峰,参考文献[16],推测其为关附壬素(GFI)。采用类似的方法,通过比较给出的母离子和二级质谱信息,峰 15 推测为 acoridine^[19], 峰 24, 27 为关附申素(GFA₁)或其异构体^[20], 峰 29 为关附辰素(GFO)^[21], 峰 30 为关附午素(GFQ)^[22], 峰 35 为关附庚素(GFG)^[23], 峰 39 为关附未素(GFR)^[24]。峰 10 和峰 34, 均出现 [M - 16]⁺ 的碎片峰,裂解途径和常规酰化取代的 Hetisine 型生物碱一致,推测其可能是一类特殊的氮氧化生物碱,峰 10 为关附己素氮氧化物(2-isobutyryl-14-hydroxy-hetisine N-

oxide)^[25], 峰 34 为关附 Z 素氮氧化物(2-isobutyryl-13-acetyl-14-hydroxy-hetisine N-oxide)^[26]。峰 32 未观察有特征碎片离子,裂解途径也与这类化合物不同,考虑到可能是其母核未有酰化基团,加之 17 位有杂环侧链而产生了其他的裂解途径,化合物 32 的 m/z 475 [M + H]⁺ 峰,裂解与文献[27]中报道一致,可推断为 coryphine。

3.2 Atisine 型 C₂₀-二萜生物碱的 HPLC-Q-TOF-MS 分析

峰 20 在 ESI⁺ 模式下得到 m/z 344 [M]⁺ ($C_{22}H_{34}NO_2$), 其二级质谱得到 m/z 326 [M - H₂O]⁺, 300 [M - C₃H₈]⁺, 282 [M - C₃H₈ - H₂O]⁺ 的碎片峰,经与 GFH 对照品保留时间进行对照,参考文献[28],鉴定其为关附辛素。因关附辛素的二级 MS 裂解所需碰撞能量高达 145 V, 提示该结构可能比上述 Hetisine 型化合物都要稳定,其高丰度的峰集中在质荷比低于 m/z 200 的低质量区,属于母核碎裂的复杂裂解,其可能的裂解途径见图 3。

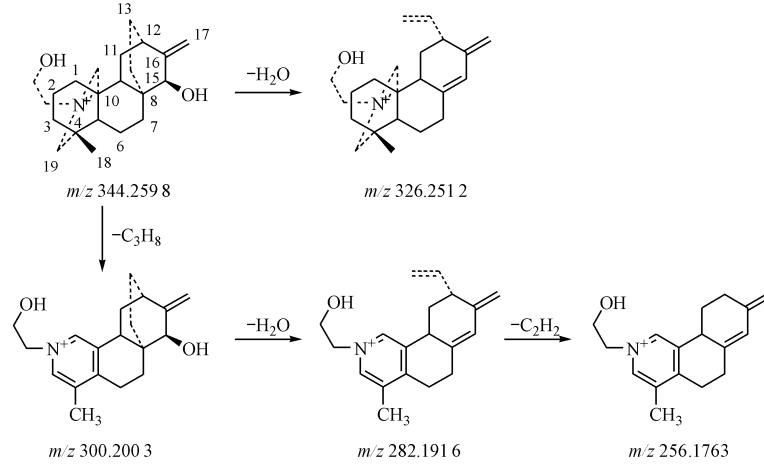


Figure 3 Fragmentation pathway of GFH

3.3 Lycocotonine 型 C₁₉-二萜生物碱的 HPLC-Q-TOF-MS 分析

峰 44 在 ESI⁺ 模式下得到 m/z 616 [M + H]⁺ ($C_{33}H_{46}NO_{10}$), 其二级质谱得到 m/z 556 [M + H - CH₃COOH]⁺, 524 [M + H - CH₃COOH - CH₃OH]⁺, 464 [M + H - CH₃COOH - 2CH₃OH - CO]⁺, 338 [M + H - CH₃COOH - 3CH₃OH - C₆H₅COOH - CO]⁺ 的碎片峰,经与 Hypaconitum 对照品保留时间进行对照,根据参考文献报道^[29], 鉴定其为次乌头碱。峰 45 在 ESI⁺ 模式下得到 m/z 632

[M + H]⁺ ($C_{33}H_{46}NO_{11}$), 其二级质谱得到 m/z 572 [M + H - CH₃COOH]⁺, 540 [M + H - CH₃COOH - CH₃OH]⁺, 512 [M + H - CH₃COOH - CH₃OH - CO]⁺, 354 [M + H - CH₃COOH - C₆H₅COOH - 3CH₃OH]⁺ 的碎片峰,经与 Mesaconitum 对照品保留时间进行对照,根据参考文献报道^[29], 鉴定其为中乌头碱。以次乌头碱和中乌头碱为例,其质谱图中出现脱去取代基和中性小分子的 m/z 338 信号,未出现酰基取代的 C₂₀-二萜生物碱的 m/z 264, 292 信号。峰 8 的 m/z 408 为 [M + H]⁺ 峰,其二级质谱可得到

m/z 390 [M + H - CH₃OH]⁺, 372 [M + H - CH₃OH - H₂O]⁺, 358 [M + H - 2CH₃OH]⁺, 326 [M + H - 3CH₃OH]⁺的碎片峰, 裂解途径与文献中报道一

致^[29], 可推断为 isotalatisidine。采用类似的方法, 通过比较给出的母离子及二级质谱信息, 推测峰 18 为 condelphine^[13], 峰 21 为 talatisamine^[29]。

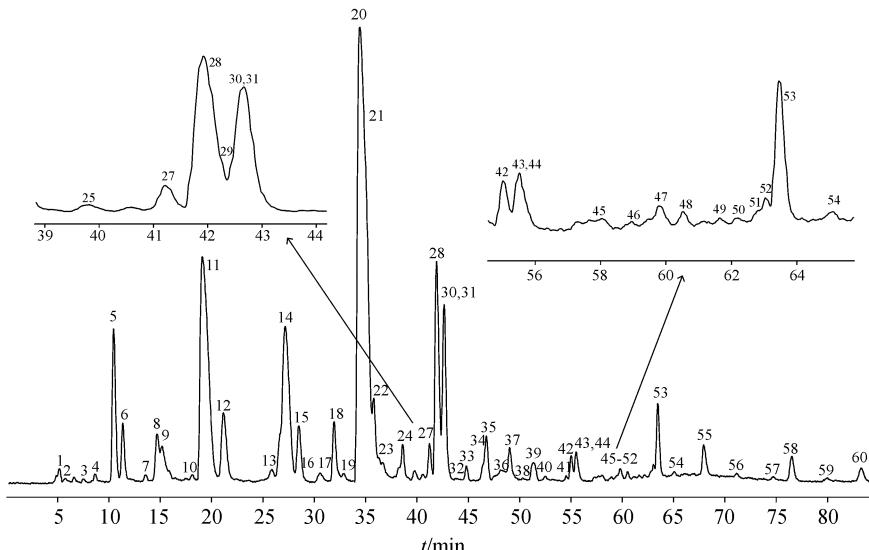


Figure 4 Positive total ion chromatogram of extracts of *Aconitum coreanum* in HPLC-ESI(+) -MS

Table 1 Identification of diterpenoid alkaloids in *Aconitum coreanum*

Peak	t_R /min	[M + H] ⁺ Formula	[M + H] ⁺ Ion (m/z)	Calculated (m/z)	Error	Characterization	Major fragment ions of [M + H] ⁺ (m/z)
4	8.67	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄	344.185 3	344.186 2	-2.6	Guan-Fu base T	310,282,256
5	10.48	C ₂₀ H ₂₆ NO ₃	328.190 9	328.191 3	-1.1	Hetisinone	310,282
6	21.19	C ₂₀ H ₂₈ NO ₃	330.206 2	330.206 9	-2.2	Hetisine	312,294,292,284
7	13.61	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄	344.186 2	344.186 2	0	Guan-Fu base U	310,282,256
8	14.69	C ₂₃ H ₃₈ NO ₅	408.274 3	408.275 0	-1.7	Isotalatisidine	408,362,344,316
9	15.14	C ₂₀ H ₂₈ NO ₄	346.200 3	346.201 8	-4.4	GFAA *	328,310,282
10	17.56	C ₂₄ H ₃₄ NO ₆	432.2374	432.238 6	-2.8	2-Isobutyryl-14-hydroxy-hetisine N-oxide	368,326,308,280
11	19.07	C ₂₂ H ₃₀ NO ₅	388.212 0	388.212 4	-1.0	Guan-Fu base I	350,328,292,264
14	27.20	C ₂₄ H ₃₂ NO ₆	430.222 8	430.223 0	-0.4	Guan-Fu base A *	370,310,292,264
15	28.46	C ₂₃ H ₃₂ NO ₅	402.228 5	402.228 0	1.1	Acoridine	328,310,292,264
18	31.90	C ₂₅ H ₄₀ NO ₆	450.284 7	450.285 6	-1.9	Condelpine	432,372,314,247
20	34.44	C ₂₂ H ₃₄ NO ₂ *	344.258 0	344.259 0	-2.8	Guan-Fu base H *.*	326,300,282,256
21	34.94	C ₂₄ H ₄₀ NO ₅	422.290 0	422.290 6	-1.5	Talatisamine	422,392,362,332
22	35.82	C ₂₀ H ₂₈ NO ₄	346.201 0	346.201 8	-2.4	Guan-Fu base K *	310,282
24	41.21	C ₂₄ H ₃₂ NO ₆	430.221 7	430.223 0	-2.9	Guan-Fu base A ₁ /Isomer of Guan-Fu base A ₁	370,310,292,264
28	41.90	C ₂₆ H ₃₆ NO ₆	458.253 7	458.254 3	-1.2	Guan-Fu base F *	380,292,264
27	38.57	C ₂₄ H ₃₂ NO ₆	430.260 0	430.259 3	1.5	Guan-Fu base A ₁ /Isomer of Guan-Fu base A ₁	370,310,292,264
29	42.60	C ₂₅ H ₃₄ NO ₆	444.238 0	444.238 6	-1.4	Guan-Fu base O	370,310,292,264
30	42.66	C ₂₂ H ₂₈ NO ₅	386.197 0	386.196 7	0.7	Guan-Fu base Q	348,310,292,264
32	43.73	C ₃₁ H ₄₃ N ₂ O ₂	475.332 0	475.332 5	-1.0	Coryphine	448,433,359
34	46.61	C ₂₆ H ₃₆ NO ₇	474.249 7	474.249 2	1.1	2-Isobutyryl-13-acetyl-14-hydroxy-hetisine N-oxide	398,326,308,280
35	46.76	C ₂₆ H ₃₄ NO ₇	472.234 3	472.233 5	1.6	Guan-Fu base G	374,310,292,264
39	51.36	C ₂₇ H ₃₆ NO ₇	486.246 9	486.249 2	-4.7	Guan-Fu base R	352,310,292,264
42	55.02	C ₂₈ H ₃₈ NO ₇	500.363 8	500.264 8	-2.1	Guan-Fu base P *	412,352,310,264
44	55.56	C ₃₃ H ₄₆ NO ₁₀	616.312 0	616.312 2	-0.3	Hypaconitum *	556,524,464,338
45	58.07	C ₃₃ H ₄₆ NO ₁₁	632.305 1	632.307 1	-3.1	Mesaconitum *	572,512,354

* Identified by the accurate molecular weight obtained by HRMS, LC retention time with those of reference standards and comparison of MS fragment pathways.

^a The molecule ion M⁺ was detected in the spectra of peak 20

4 讨 论

本实验将碰撞电压自 10 V 逐步增加将至 150 V(间隔 10 V)对 9 个对照品质谱裂解进行分析,除关附辛素外的 9 个样品在 45 V 均观察到较好的质谱裂解图,关附辛素自 120 V 以上才开始裂解,145 V 观察到较多的碎片信息。因此,在后续的 LC-MS 测试中,分别采用了 45 V 和 145 V 对提取物进行碎片离子分析。因为实验所用的仪器不具备基于信号引导触发的多级质谱裂解功能,所以实验经多次重复进样调整参数才得以完成。

在药材的前处理方法上,本实验分别采用 0.1 mol/L HCl 水溶液、70% 乙醇、95% 乙醇、碱化乙酸乙酯及碱化乙醚作为提取溶剂制备供试品,经 LC-MS,LC-UV 和 TLC 测试比较,发现 70% 乙醇的提取物杂质最多,碱化乙醚做溶剂可以提取得到较多生物碱和较少的其他杂质成分,故最终采用碱化乙醚作为提取溶剂。

流动相的选择分别尝试了乙腈-水、乙腈-甲酸溶液、乙腈-三乙胺溶液等不同流动相及梯度洗脱比例,结果发现用乙腈做有机相,水相中添加三乙胺可以有效改善色谱峰拖尾,加入甲酸可提高质谱响应;实验还考察了甲酸、三乙胺的添加量对分离效果的影响,结果发现甲酸浓度为 0.1%、三乙胺浓度为 0.2% 时,梯度洗脱基线平稳,色谱峰分离效果最好。质谱检测分别比较了正、负离子两种电喷雾扫描,结果发现正离子模式下质谱响应更强,故选择正离子模式进行分析。在正离子模式下流动相中的三乙胺(相对分子质量 101)对实验有较强的背景干扰,质谱扫描范围设为 105 ~ 1000,以减小背景噪音。

经文献检索,已报道的 30 余个已知二萜类生物碱均来自野生采集的黄花乌头块根,本文首次鉴定了人工栽培的关白附药材中的 26 个二萜类生物碱成分,其余 34 个峰,经质谱裂解规律判断大部分属于 Hetisine 型 C₂₀-二萜生物碱,经文献检索未能与分子式相同的已知化合物相匹配,提示关白附可能还有大量的 Hetisine 型 C₂₀-二萜生物碱存在,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Yan TL, Cheng SM, Song DP, et al. The standard cultivating tech-

- nique of *Aconitum coreanum* (Lèvl.) Rapaics [J]. *Res Inform Tradit Chin Med*(中药研究与信息),2005,7(6):31~34.
- [2] Fan XR, Chen YJ, Xing JL, et al. Blocking effects of acehytisine on pacemaker currents (If) in sinoatrial node cells and human HCN4 channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes [J]. *J Ethnopharmacol*,2012,139(1):42~51.
- [3] Guo N, Fan B, Peng J, et al. Ultra-performance LC/TOF MS analysis of fruits of *Ligustrum lucidum* for metabolomic research [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2010,16(10):131~133.
- [4] Chen T, Yao WF, Zhang L, et al. UPLC-TOF-MS based metabolomic study of CCl₄-induced rat-plasma liver injury [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2010,16(18):98~101.
- [5] Ni SM, Qian DW, Shang EX, et al. Analysis of chemical composition of dachuanxiang fang by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2010,16(1):39~45.
- [6] A JY, Wang GJ, Liu XQ, et al. Study on the metabolites of guanfu base A hydrochloride in rat urine by high performance liquid chromatograph-mass spectrum [J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报),2002,37(4):283~287.
- [7] Li XT, Wang GJ, Wang SJ, et al. Studies on pharmacokinetics of Guanfu alcohol-amine, a metabolite of Guanfu Base A, in Rats [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报),2005,36(2):142~145.
- [8] Li XT, Wang GJ, Wang SJ, et al. Studies on pharmacokinetics of guanfu base I, a metabolite of guanfu base A [J]. *Chin Pharmacol Bull*(药理学通报),2005,21(3):366~368.
- [9] Wu MS, Wang GJ, Cai XH, et al. Determination of guanfu base A hydrochloride in plasma and its pharmacokinetic in dogs [J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报),2002,37(7):551~554.
- [10] Wu Q, Yang CH, Liu JH, et al. Simultaneous determination of Guanfu Base A, Guanfu Base I and Guanfu Base H in radix *Aconitum coreanum* (Lèvl.) Rapaics by RP-HPLC [J]. *Prog Pharm Sci*(药学进展),2011,35(5):230~233.
- [11] Bessonova IA. Alkaloids of *Aconitum coreanum* IX. Tangutisine and 2, 11, 13-triacetyl-14-hydroxyhetisine [J]. *Chem Nat Compd*,1999,35(1):103~104.
- [12] Yang CH, Liu JH, Xiang BR, et al. Guan Fu base K, new diterpene alkaloid from *Aconitum coreanum* [J]. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药),2002,33(3):201~203.
- [13] Han Y, Liu JH, Wang MS. Chemical constituents of Korean monkshood (*Aconitum coreanum*) [J]. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药),1994,25(12):619~625.
- [14] Tang Q, Liu J, Xue J, et al. Preparative isolation and purification of two new isomeric diterpenoid alkaloids from *Aconitum coreanum* by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr B*,2008,872(2):181~185.

- [15] Tashkhodzhaev B, Yusupova M, Salimov BT, et al. Crystal and molecular structure of the hydrochloride of the diterpene alkaloid hetisine [J]. *J Incl Phenom Molec Rec Chem*, 1992, **14**(3):311–316.
- [16] Reinecke MG, Minter DE, Chen DC, et al. Alkaloids of the Chinese herb Guan-Bai-Fu (*Aconitum koreanum*); Guan-Fu bases Y and A [J]. *Tetrahedron*, 1986, **42**:621–626.
- [17] Liu JH, Hao ZG, Zhao SX. Identification of the structure of Guan fu base F [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1988, **3**:238–239.
- [18] Yang CH, Zhang HJ, Liu JH. Alkaloid constituents from root of *Aconitum coreanum* [J]. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2004, **35**(12):1 328–1 330.
- [19] Bessonova IA, Samusenko LN, Yunosov MS, et al. Alkaloids of *Aconitum coreanum* VI. Structure of acoridine [J]. *Chem Nat Compd*, 1991, **27**(1):79–81.
- [20] Zhan ZJ, Ma LF, Zhang XY, et al. A new hetisine-type diterpenoid alkaloid from *Aconitum coreanum* [J]. *J Chem Res*, 2009;20–21.
- [21] Liu JH, Hao ZG, Zhou HM, et al. A diterpenoid alkaloid of *Aconitum coreanum* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1993, **24**(1):63–64.
- [22] Tang QF, Yang CH, Liu JH, et al. A new hetisine-type alkaloid from the stems and leaves of *Aconitum coreanum* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2005, **40**:640–643.
- [23] Miao ZC, Feng R, Liu JH, et al. Selective long-range DEPT, 1-D COSY and 1-D relay COSY NMR studies on guan-fu base G [J]. *Chin J Magn Reson* (波谱学杂志), 1991, **8**:371–378.
- [24] Li Y, Liang S. Studies on chemical constituents from leaves and stems of *Aconitum coreanum* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, **34**(10):1 220–1 222.
- [25] Yusipova IM, Tashkhodzhaev B, Bessonova IA, et al. Alkaloids of *Aconitum coreanum*. III. 13-Acetyl-14-hydroxy-2-isobutyrylhetisine N-oxide [J]. *Chem Nat Compd*, 1990, **26**(3):314–318.
- [26] Bessonova IA, Samusenko LN, Yunusov MS, et al. Alkaloids of *Aconitum coreanum*. IV. 14-hydroxy-2-isobutyrylhetisine N-oxide [J]. *Chem Nat Compd*, 1990, **26**(3):318–320.
- [27] Bessonova IA, Yagudaev MR, Yunusov MS. Alkaloids of *Aconitum coreanum* VIII. Structure of coryphidine [J]. *Chem Nat Compd*, 1992, **28**(2):209–212.
- [28] Razakova DM, Bessonova IA, Yunosov MS. Atisine chloride and isoatisine from *Aconitum coreanum* and *A. rotundifolium* [J]. *Chem Nat Compd*, 1988, **24**(2):266–267.
- [29] Hu R, Zhao J, Qi LW, et al. Structural characterization and identification of C₁₉-and C₂₀-diterpenoid alkaloids in roots of *Aconitum carmichaeli* by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, **23**(11):1 619–1 635.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2014 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中医学、药剂学、药物分析、药物生物技术、药理学、药代动力学等学科的原创研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库:《中文核心期刊要目总览》、中国科技论文统计源数据库、中国科学引文数据库等列为药学类核心期刊,屡获国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010年连续3次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国知网,中国学术期刊(光盘版)电子杂志社《中国学术期刊影响因子年报(2010版)》公布的最新数据,《中国药科大学学报》复合影响因子为1.171,位居中国药学学术期刊第4位。学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,96页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

ISSN:1000-5048

国内邮发代号:28-115

定 价:30元/期,全年180元

地 址:南京童家巷24号

邮政编码:210009

电 话:025-83271566/562

传 真:025-83271279

E-mail:xuebao@cpu.edu.cn

<http://www.zgykdxxb.cn>