

使用 UPLC/Q-TOF-MS/MS 快速鉴定芪苈强心胶囊有效部位中的二萜类生物碱

乔莉^{1,2}, 贾继明^{2*}, 王宗权², 王贵金², 朱慧明², 孟作环²

1. 河北中西医结合医药研究院, 河北 石家庄 050035

2. 河北以岭医药研究院有限公司, 河北 石家庄 050035

摘要: 目的 明确芪苈强心胶囊中的药效物质成分。方法 采用 UPLC 串联 Q-TOF-MS/MS 对芪苈强心胶囊有效部位中的二萜类生物碱类成分进行了研究, 使用质谱分析软件中的目标化合物筛查法, 通过保留时间、精确相对分子质量和二级质谱裂解碎片鉴定监测到的化学成分。结果 从芪苈强心胶囊中共鉴定了 20 个二萜类生物碱, 其中双酯型生物碱 6 个, 单酯型生物碱 14 个。结论 本方法可以简单快捷地鉴定中药复方中的目标成分, 为芪苈强心胶囊成分的明确和质量控制提供参考。

关键词: 芪苈强心胶囊; 二萜类生物碱; 双酯型生物碱; 单酯型生物碱; UPLC/Q-TOF-MS/MS

中图分类号: R286.0 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)24-3452-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.005

Rapid identification of diterpenoid alkaloids in active fraction of Qili Qiangxin Capsule by UPLC/Q-TOF-MS/MS

QIAO Li^{1,2}, JIA Ji-ming², WANG Zong-quan², WANG Gui-jin², ZHU Hui-ming², MENG Zuo-huan²

1. Department of Collateral Theory, Combination of TCM with Western Medicine Academy of Hebei, Shijiazhuang 050035, China

2. Yiling Medical Research Academy, Co., Shijiazhuang 050035, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in Qili Qiangxin Capsule (QQC) and to clear its material basis for efficacy. **Methods** A rapid ultra-performance liquid chromatography/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS/MS) method was established to identify the diterpenoid alkaloids in the active fraction of QQC. Using target compound screening method, the structures of monitored chemical constituents were identified by retention time, exact relative molecular mass, and cleavage fragments of MS/MS. **Results** Twenty diterpenoid alkaloids were identified using XIC Manager, including 6 diester-diterpenoid alkaloids and 14 monoester-diterpenoid alkaloids. **Conclusion** This method is simple and rapid for the identification of the constituents in QQC and the results are useful for the quality control of QQC.

Key words: Qili Qiangxin Capsule; diterpenoid alkaloids; diester-diterpenoid alkaloids; monoester-diterpenoid alkaloids; UPLC/Q-TOF-MS/MS

芪苈强心胶囊是近年来在国内首先运用络病理论指导研发的治疗慢性充血性心力衰竭的中药新药, 是中医药防治心血管疾病的重大创新。其组成为黄芪、附子、人参、丹参、葶苈子、泽泻、红花、玉竹、陈皮、桂枝、香加皮 11 味中药^[1]。方中的附子 *Aconiti Lateralis Radix Preparata* 是毛茛科乌头属植物乌头的干燥侧根, 有毒, 并具有镇痛、消炎、强心和抗癌等广泛的药理作用。在本方配伍中与黄芪共用, 益气温阳而促进心功能, 均为君药。二萜类生物碱是附子的主要化学成分, 按取代基结构不

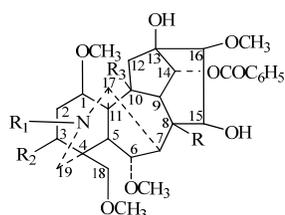
同分为 3 类: 单酯型生物碱、双酯型生物碱和脂型生物碱 (图 1)^[2], 这些也有可能是芪苈强心胶囊的药效物质成分。前期对于芪苈强心胶囊的有效部位成分的研究中, 并未检出附子中的二萜生物碱类成分^[2]。而二萜类生物碱是否在芪苈强心胶囊中存在, 是否经过加工后仍以原形态存在, 有没有受到复方中物质的相互作用的影响, 是本次研究的重要目的。本实验使用 UPLC/Q-TOF-MS/MS 对芪苈强心胶囊有效部位中的 C₁₉-二萜类生物碱进行了检测和鉴定, 为其物质基础的研究提供有力的佐证。

收稿日期: 2013-08-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 资助项目 (2012CB518606); 国家青年科学基金项目 (81102768)

作者简介: 乔莉 (1979—), 女, 高级工程师, 博士, 从事中药新药研发和有效成分研究工作。Tel: (0311)85901304 E-mail: ql200207@163.com

*通信作者 贾继明 (1966—), 男, 高级工程师, 博士。Tel: (0311)85901304 E-mail: jjm_0451@163.com



$R_1 = \text{CH}_3$ 或 C_2H_5 ; $R_2 = \text{H}$ 或 OH ; $R_3 = \text{H}$ 或 OH
 $R = \text{CH}_3\text{COO}$ (双酯型生物碱)
 或 OH (单酯型生物碱)
 或 fatty acyl (脂型生物碱)

图1 C_{19} -二萜类生物碱的结构

Fig. 1 Structure of C_{19} -diterpenoid alkaloids

1 仪器与材料

Shimadzu UFLC 超高效液相色谱; AB SCIEX Triple TOFTM 5600 质谱系统; Brownlee SPP 液相柱 (美国 PE 公司, 100.0 mm × 2.1 mm, 2.7 μm)。Waters Oasis HLB SPE 小柱 (60 mg)。

芪苈强心胶囊由河北以岭药业有限公司提供, 批号 100102。对照品乌头碱 (批号 110720-201111, 20 mg/支) 购自中国食品药品检定研究院。

2 方法

2.1 样品制备

芪苈强心胶囊内容物 1.2 g, 50% 甲醇超声提取 30 min, 提取液蒸干。取干燥样品 10 mg, 加 5 mL

甲醇, 超声溶解后, 离心, 取上清液 500 μL, 加 500 μL 水后, 过固相萃取 (SPE) 柱, 再用 90% 甲醇 1 mL 洗脱, 收集流液, 40 °C 水浴吹干, 以 200 μL 甲醇-水 (50 : 50) 复溶, 进样分析。

2.2 分析条件

色谱条件: 流动相: 水 (含 0.1% 三氟乙酸) (A) - 甲醇 (B)。体积流量 0.5 mL/min。进样体积 10 μL。梯度洗脱程序: 0~2 min, 10% B; 2~13 min, 10%~40% B; 13~19 min, 40%~70% B; 19~20 min, 70%~100% B。柱温 40 °C。

质谱条件: 离子化模式为 ESI, 正、负离子扫描, 毛细管电压为 3.5 kV, CE 电压为 45 V, 除溶剂气体为氮气 (900 L/h), 除溶剂温度为 550 °C, 离子源温度为 120 °C, 质核比扫描范围 m/z : 50~1 300, 扫描模式: IDA; 动态背景扣除 (DBS) 开启; 扫描周期: 1 s; 数据处理: PeakView SoftwareTM 数据处理软件。

3 结果与讨论

将可能的目标化合物化学式导入数据处理软件 XIC Manager, 经过精确质量数对比、离子碎片分析以及与对照品对照, 鉴定了 20 个乌头碱类的化合物。包括 6 个双酯型二萜生物碱和 14 个单酯型二萜生物碱。结果见表 1、图 2。

表 1 采用 UPLC/Q-TOF-MS/MS 从芪苈强心胶囊中鉴定出的 20 个化合物的质谱数据

Table 1 Identification and structural characterization of 20 compounds detected in QQC by UPLC/Q-TOF-MS/MS

峰号	t / min	测得相对分子质量 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$	偏差	分子式	鉴定化合物
1	4.79	486.268 9	-2.3	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_9$	中乌头原碱
2	5.22	408.272 7	-1.6	$\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_5$	卡马乌头原碱
3	5.23	638.271 2	-2.1	$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_{13}$	杰斯乌头碱
4	6.01	500.284 4	-1.4	$\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_9$	乌头原碱
5	6.90	470.274 0	-2.1	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_8$	次乌头原碱
6	7.28	454.280 8	-1.3	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_7$	附子灵
7	7.70	438.283 9	-0.7	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_6$	尼奥灵
8	7.95	422.287 7	-2.4	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_5$	塔拉地萨敏
9	9.17	452.298 4	-2.9	$\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_6$	查斯曼丁
10	10.06	464.298 1	-3.2	$\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NO}_6$	14-乙酰塔拉地萨敏
11	11.37	606.286 4	-3.5	$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_{11}$	10-羟基-14-苯甲酰中乌头原碱
12	13.57	590.294 1	-2.6	$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_{10}$	14-苯甲酰中乌头原碱
13	14.19	646.318 6	-1.2	$\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{NO}_{11}$	乌头碱
14	14.27	604.309 7	-3.3	$\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$	14-苯甲酰乌头原碱
15	14.79	574.297 8	-2.7	$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_9$	14-苯甲酰次乌头原碱
16	15.09	588.313 0	-3.6	$\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_9$	14-苯甲酰去氧乌头原碱
17	15.62	632.302 6	-3.0	$\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_{11}$	中乌头碱
18	16.06	662.313 6	-5.0	$\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{NO}_{12}$	10-羟基乌头碱
19	16.38	616.309 0	-4.7	$\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$	次乌头碱
20	16.78	630.323 8	-3.9	$\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{NO}_{10}$	去氧乌头碱

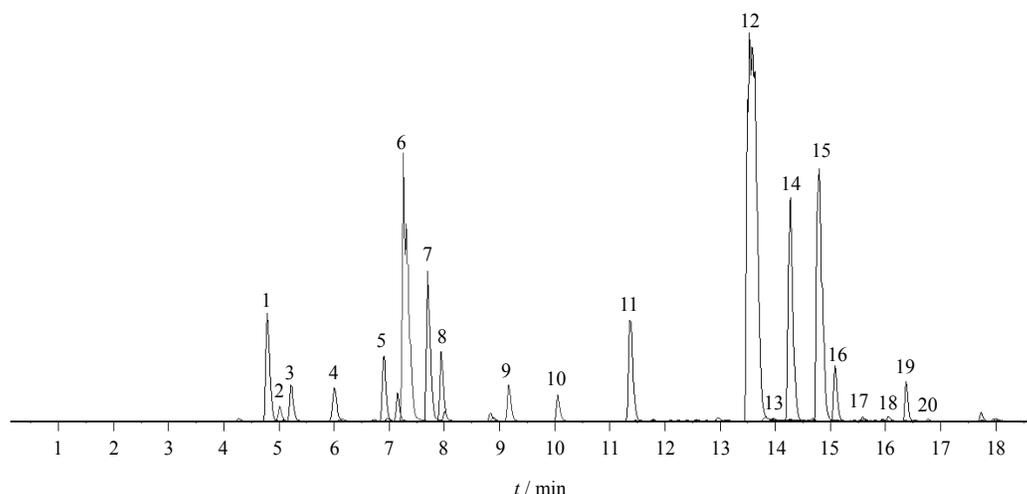


图2 20个乌头碱类化合物的提取离子色谱图

Fig. 2 Extracted ion chromatogram of 20 aconitin compounds

3.1 双酯型生物碱

双酯型生物碱是未经炮制的附子中的主要成分，也是毒性成分，但是在炮制以后大部分会水解生成单酯型生物碱，毒性降为之前的1/200^[3]。

化合物13的质谱图给出646.3186的准分子离子峰，使用Fomular Finder，根据二萜生物碱的一般结构限定C个数 ≤ 50 、H ≤ 200 、N、O ≤ 20 ，推测其可能的化学式为 $C_{34}H_{47}NO_{11}$ 。MS/MS谱中有 m/z 554.2709 $[M+H-AcOH-CH_3OH]^+$ ，105.0332 $[C_7H_5O]^+$ ，经与乌头碱对照品对照， t_R 、精确相对分子质量均一致，鉴定为乌头碱^[4,5]。

化合物17的质谱图给出 m/z 632.3026的准分子离子峰，使用Fomular Finder推测其可能的化学组成为 $C_{33}H_{45}NO_{11}$ ，MS/MS谱中有 m/z 572.2832 $[M+H-AcOH]^+$ ，540.2532 $[M+H-AcOH-CH_3OH]^+$ ，512.2636 $[M+H-AcOH-CH_3OH-CO]^+$ ，105.0336 $[C_7H_5O]^+$ 的碎片离子，经与文献对照鉴定为中乌头碱^[4,5]。

化合物19的质谱图给出 m/z 616.3090的准分子离子峰，使用Fomular Finder推测其可能的化学组成为 $C_{33}H_{45}NO_{10}$ ，MS/MS谱中有 m/z 584.2851 $[M+H-CH_3OH]^+$ ，556.2891 $[M+H-AcOH]^+$ ，524.2636 $[M+H-AcOH-CH_3OH]^+$ ，496.2669 $[M+H-AcOH-CH_3OH-CO]^+$ ，105.0337 $[C_7H_5O]^+$ 的碎片离子，经与文献对照鉴定为次乌头碱^[4,6]。

化合物20的质谱图(图3)给出 m/z 630.3238的准分子离子峰，使用Fomular Finder推测其可能的化学组成为 $C_{34}H_{47}NO_{10}$ ，MS/MS谱中有 m/z

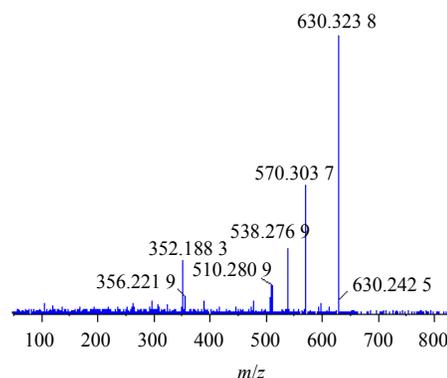


图3 化合物20的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectrum of compound 20

570.3037 $[M+H-AcOH]^+$ ，538.2769 $[M+H-AcOH-CH_3OH]^+$ ，510.2809 $[M+H-AcOH-CH_3OH-CO]^+$ ，506.2556 $[M+H-AcOH-2CH_3OH]^+$ 的碎片离子，经与文献对照推断为去氧乌头碱^[7]。

同样方法并结合文献鉴定出化合物3(m/z 638.2712)、18(m/z 662.3136)分别为杰斯乌头碱和10-羟基乌头碱^[4,5]。

3.2 单酯型生物碱

双酯型生物碱经水解或者降解后会产生单酯型生物碱，C₈位的R基由乙酰基变为羟基或是形成8,9位双键。

化合物1的质谱图给出 m/z 486.2689的准分子离子峰，利用Fomular Finder结合乌头类生物碱的一般结构，推断其可能的化学组成为 $C_{24}H_{40}NO_9$ 。MS/MS谱中有 m/z 468.2605 $[M+H-H_2O]^+$ ，

454.244 7 $[M+H-CH_3OH]^+$, 436.233 1 $[M+H-H_2O-CH_3OH]^+$, 422.219 0 $[M+H-2CH_3OH]^+$, 404.207 3 $[M+H-H_2O-2CH_3OH]^+$ 的碎片离子, 结合文献报道以及乌头碱类化合物的断裂规律推断为中乌头原碱^[5, 8-9]。

化合物 4 给出 m/z 500.284 4 的准分子离子峰, 利用 Fomular Finder 推断其可能的化学组成为 $C_{25}H_{42}NO_9$ 。MS/MS 谱中有 m/z 468.260 5 $[M+H-H_2O]^+$, 454.244 7 $[M+H-CH_3OH]^+$, 436.233 1 $[M+H-H_2O-CH_3OH]^+$, 422.219 0 $[M+H-2CH_3OH]^+$, 404.207 3 $[M+H-H_2O-2CH_3OH]^+$ 的碎片离子, 结合文献以及乌头碱类化合物的断裂规律推断为乌头原碱^[9]。同样方法鉴定出化合物 5 (m/z 470.274 0) 为次乌头原碱^[10]。

化合物 12 给出 m/z 590.294 1 的准分子离子峰, Fomular Finder 结合乌头类生物碱的一般结构, 推断其可能的化学分子式为 $C_{31}H_{43}NO_{10}$ 。MS/MS 谱中有 m/z 572.285 1 $[M+H-H_2O]^+$, 558.268 5 $[M+H-CH_3OH]^+$, 540.257 3 $[M+H-H_2O-CH_3OH]^+$, 526.242 9 $[M+H-2CH_3OH]^+$, 508.232 1 $[M+H-H_2O-2CH_3OH]^+$, 105.033 1 $[C_7H_5O]^+$, 77.039 2 $[C_6H_5]^+$ 的碎片离子, 结合文献报道推断为 14-苯甲酰中乌头原碱^[4, 7-9] (图 4)。具有类似碎片的还有化合物 11 (m/z 606.286 4)、14 (m/z 604.309 7)、15 (m/z 574.297 8)、16 (m/z 588.313 0), 分别鉴定为 10-羟基-14-苯甲酰中乌头原碱、14-苯甲酰乌头原碱、14-苯甲酰次乌头原碱和 14-苯甲酰去氧乌头原碱^[2, 7, 9]。

3.3 其他生物碱

化合物 2 给出 m/z 408.272 7 的准分子离子峰,

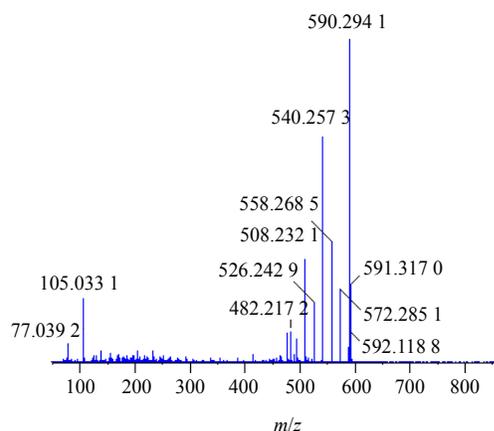


图 4 化合物 12 的二级质谱图

Fig. 4 MS/MS spectrum of compound 12

利用 Fomular Finder 推断可能的化学式为 $C_{23}H_{37}NO_5$ 。MS/MS 谱中有 m/z 390.262 6 $[M+H-H_2O]^+$, 372.254 1 $[M+H-2H_2O]^+$, 358.237 3 $[M+H-H_2O-CH_3OH]^+$, 结合文献鉴定为卡马乌头原碱^[5] (图 5)。同样结合相应碎片信息和文献鉴定化合物 6 (m/z 454.280 8)、7 (m/z 438.283 9)、8 (m/z 422.287 7)、9 (m/z 452.298 4)、10 (m/z 464.298 1) 分别为附子灵、尼奥灵、塔拉地萨敏、查斯曼丁和 14-乙酰塔拉地萨敏^[5]。

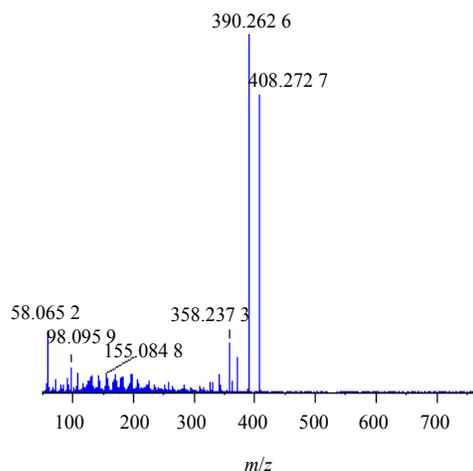


图 5 化合物 2 的二级质谱图

Fig. 5 MS/MS spectrum of compound 2

3.4 裂解机制

根据文献报道, 通过分析 3 种双酯碱 (乌头碱、中乌头碱和次乌头碱) 及其水解产物的多级质谱, 其裂解机制呈现很大的规律性, 脱掉的中性分子以水、甲醇和一氧化碳为主^[6]。在本实验的研究中验证了这一点。附子中的 C_{19} -二萜类生物碱在质谱中裂解均为失去中性分子, 除了脱掉水、甲醇和一氧化碳外, 双酯型生物碱还可能脱掉一分子的乙酸, 这种规律有助于今后对该类型生物碱进行质谱解析和鉴定。

参考文献

- [1] 吴以岭. 络病学 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2006.
- [2] 康利平, 赵阳, 余河水, 等. 采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 鉴别芪苈强心胶囊有效部位中的化学成分 [J]. 药学学报, 2011, 46(10): 1231-1236.
- [3] 李娅萍, 田颂九, 王国荣. 乌头类药物的化学成分及分析方法概况 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 659-662.
- [4] 越皓, 皮子凤, 宋凤瑞, 等. 生附片化学成分的研究 [J]. 化学学报, 2008, 66(2):

- 211-215.
- [5] Yan G L, Sun H, Sun W J, *et al.* Rapid and global detection and characterization of *aconitum* alkaloids in Yin Chen Si Ni Tang, a traditional Chinese medical formula, by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and automated data analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53: 421-431.
- [6] 李 铮, 谭 鹏, 王春国, 等. 乌头碱、中乌头碱、次乌头碱及水解产物的电喷雾质谱裂解机制研究 [J]. 现代仪器, 2011, 17(2): 41-42.
- [7] 王 勇, 石 磊, 金东明, 等. 四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的溶出和水解平衡 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 311-314.
- [8] 王 勇, 宋凤瑞, 金东明, 等. 复方中药四逆汤中乌头碱类二萜生物碱的电喷雾串联质谱研究 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(1): 85-89.
- [9] 刘永刚, 于达亮, 陈玉娟, 等. HPLC-ESI-MSⁿ 法研究乌头碱在水中的化学反应 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(2): 153-156.
- [10] 郝瑞云, 刘永刚, 张宏桂, 等. HPLC-MSⁿ 法研究次乌头碱在水中的化学反应 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(8): 539-542.