

基于 HPLC-Q-TOF-MS 研究 6 种乌头生物碱类成分的裂解途径

孙 蕾^{1,2}, 王少辰^{1,2}, 孙明谦², 刘建勋²

1. 北京中医药大学, 北京 100029

2. 中国中医科学院西苑医院, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091

摘要: **目的** 研究 6 种乌头类生物碱(乌头碱、次乌头碱、中乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰中乌头原碱)的质谱裂解途径。**方法** 采用高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS)对该类化合物进行分析。**结果** 在正离子模式下, 乌头类生物碱的主要裂解途径是连续丢失 CH₃OH 与 H₂O。双酯型生物碱也可以在 C-8 位置断裂, 失去 CH₃COOH 分子形成明显的特征碎片离子, 从而实现与单酯型生物碱的区分。**结论** 此质谱裂解途径可为乌头类生物碱的结构鉴定提供依据, 采用 HPLC-Q-TOF-MS 技术可以高效地分析中药中乌头类生物碱类化学成分, 有利于化合物的分析和鉴定。

关键词: 乌头碱; 次乌头碱; 中乌头碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 苯甲酰中乌头原碱; 高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱; 裂解途径

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)16-2827-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.008

Fragmentation pathways of six aconitine alkaloids using HPLC-Q-TOF-MS technology

SUN Lei^{1,2}, WANG Shao-chen^{1,2}, SUN Ming-qian², LIU Jian-xun²

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

Abstract: Objective To study the fragmentation pathways of six aconitine-type alkaloids (aconitine, hypaconitine, mesaconitine, benzoylaconitine, benzoylhypaconitine, and benzoylmesaconitine) in mass spectra (MS). **Methods** The samples were analyzed by liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS). **Results** In positive mode, The typical fragmentation pathways of the six aconitine-type alkaloids were mainly continuous loss of CH₃OH and H₂O. The characteristic fragmentation pathway of diester-diterpene type aconitine was losing an acetic acid molecule from C-8 position; However this fragmentation could not be observed in MS of mono-ester aconitine alkaloids. **Conclusion** The study on fragmentation pathways could be adopted for the structural identification of the six aconitine-type alkaloids.

Key words: aconitine; hypaconitine; mesaconitine; benzoylaconitine; benzoylhypaconitine; benzoylmesaconitine; liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry; fragmentation pathways

乌头类生物碱为乌头属中药的主要活性成分和毒性成分, 属于二萜类生物碱, 根据其结构可分为单酯型生物碱、双酯型生物碱和脂型生物碱^[1-2]。乌头属中药中主要有效成分为剧毒的双酯型生物碱, 如乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)、中乌头碱(mesaconitine)。中医临床使用炮制的方

法使中药材减毒增效, 在炮制过程中, 双酯型生物碱可以水解去掉 1 个酯基, 转化成单酯型乌头生物碱, 如苯甲酰乌头原碱(benzoylaconine)、苯甲酰次乌头原碱(benzoylhypaconine)和苯甲酰新乌头原碱(benzoylmesaconine), 或继续水解去掉 2 个酯基转化为乌头原碱。炮制水解使得乌头属中药的毒性大大

收稿日期: 2015-12-24

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2015CB554405)

作者简介: 孙 蕾(1991—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药分析。Tel: (010)62835618 E-mail: lei_blossom@126.com

降低,但其药理活性亦随之减弱或消失^[3-5]。因此,本实验对双酯型和单酯型生物碱的代表成分进行研究。

四级杆-飞行时间(Q-TOF)串联质谱具有选择性强、灵敏度高的特点,能得到数据完整且高品质的质谱图,可以测得化合物的精确质量(质量误差小于百万分之二),可以利用该特点在复杂的样品中提取出高专属性的成分进行定性或定量分析^[6-8]。乌头类生物碱的质谱裂解途径研究已经有部分报道^[9-11],但这些研究中多采用电喷雾串联质谱的方法,相较于四级杆-飞行时间串联质谱得到的碎片相对分子质量不够精确,对水解产物质谱裂解规律的阐释也不够深入。本研究采用高灵敏度 HPLC-Q-TOF-MS 对 6 种乌头类生物碱(图 1 和表 1)的质谱裂解规律进行深入的探讨,在正离子模式下,乌头类生物碱的

主要裂解途径是连续丢失 CH₃OH 与 H₂O。双酯型生物碱也可以在 C-8 位置断裂,失去 CH₃COOH 分子形成明显的特征碎片离子,与单酯型生物碱有明显区分。此发现为生物样品中乌头类生物碱的快速定性和定量鉴别提供依据。

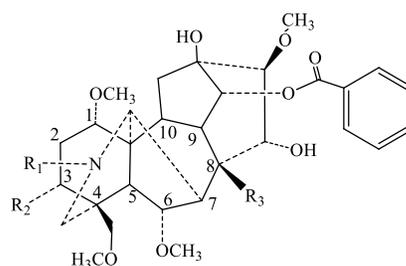


图 1 两类乌头类生物碱的母核结构

Fig. 1 Nucleus structure of two kinds of aconitine-type alkaloids

表 1 2 类乌头类生物碱的结构

Table 1 Structures of two kinds of aconitine-type alkaloids

类型	名称	R ₁	R ₂	R ₃	分子式	相对分子质量	[M+H] ⁺ (m/z)
双酯型	乌头碱 (AC)	C ₂ H ₅	OH	CH ₃ COO	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	645.74	646.322 2
生物碱	次乌头碱 (HA)	CH ₃	H	CH ₃ COO	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	615.71	616.311 6
	中乌头碱 (MA)	CH ₃	OH	CH ₃ COO	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	631.71	632.306 5
单酯型	苯甲酰乌头原碱 (BAC)	C ₂ H ₅	OH	OH	C ₃₂ H ₄₅ NO ₁₀	603.71	604.311 6
生物碱	苯甲酰次乌头原碱 (BHA)	CH ₃	H	OH	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	573.68	574.301 1
	苯甲酰中乌头原碱 (BMA)	CH ₃	OH	OH	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	589.67	590.296 0

1 仪器与试剂

Agilent 1200 series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配备二元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器以及在线分析软件等; Agilent 6250 series Q-TOF 质谱仪(美国 Agilent 公司); 乙腈、甲醇均为色谱纯,购于美国 Fisher 公司; 甲酸为分析纯,购于 J. T. BAKER 公司; 纯净水购于中国娃哈哈有限公司。对照品乌头碱(批号 110720-200410,质量分数为 98%)、乌头次碱(批号 110798-201308,质量分数为 98.6%)、中乌头碱(批号 110799-201307,质量分数为 98.3%)、苯甲酰乌头原碱(批号 111794-200901,质量分数为 98.6%)、苯甲酰次乌头原碱(批号 111796-200901,质量分数为 99.5%)、苯甲酰中乌头原碱(批号 111795-201303,质量分数为 96.3%)均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法

2.1 样品溶液的制备

取乌头碱、乌头次碱、中乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰中乌头原碱对照

品适量,用甲醇溶解配制成质量浓度分别为 10 μg/mL 的混合溶液。

2.2 LC-Q-TOF-MS 实验条件

雾化气和干燥气均为氮气,碰撞气为氦气。采集模式为正离子,毛细管电压为 3 500 eV,雾化温度为 350 °C,干燥气为 10.0 L/min,雾化气为 206.85 kPa。质谱扫描范围为 m/z 80~1 000,数据储存模式为 centroid。离子源采用双 ESI 喷雾,质谱采集数据通过 2 个已知的标准品 [Hexakis (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine 和 7H-嘌呤,对应 m/z 922.009 80 和 121.050 9] 进行实时校正。参比液通过 Agilent isocratic 泵以 0.01 mL/min 的速度喷入质谱。Auto MS/MS 实验采用 CID 碰撞的方式。

液相色谱为美国 Agilent 1200 HPLC 系统,液相分离采用 RP 色谱柱 (Atlantis, T3, 150 mm×2.1 mm, 3 μm, Waters, IELAND),流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈溶液 (B),梯度洗脱: 0~30 min, 12%~30% B, 30 min 停止,以 12% B 平衡 5 min。体积流量为 0.25 mL/min,柱温 35 °C,

进样体积为 5 μ L。

3 结果

正离子模式下, LC-MS 检测的 6 种生物碱的总离子流图如图 2 所示。初步对 6 种生物碱的质谱裂

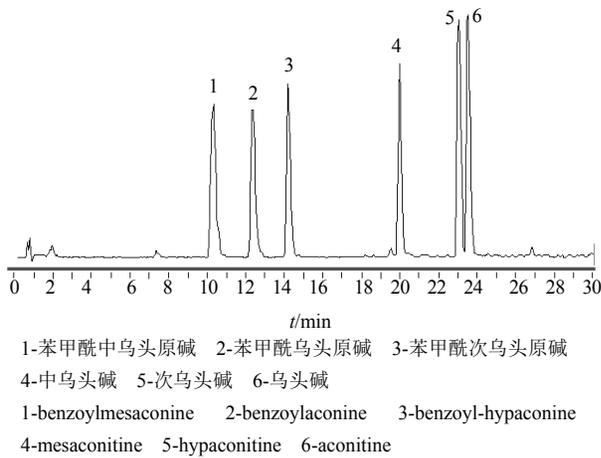


图 2 LC-MS 检测 6 种生物碱的总离子流图

Fig. 2 TIC of six aconitine-type alkaloids determined by LC-MS

解途径进行总结, 由于母核中甲氧基和羟基较多, 因此这类成分最常见的质谱碎裂途径就是不断失去 CH_3OH 与 H_2O 。乌头碱等双酯型乌头类生物碱与苯甲酰乌头原碱等单酯型乌头类生物碱之间结构上的主要区别就是在 C-8 位上相差 1 个乙酰基, 这使得两类生物碱在质谱裂解途径上呈现出明显的区分^[12-13]。本实验以中乌头碱与苯甲酰乌头原碱为例进行阐释。

中乌头碱的分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 632.306 5 ($+3.96 \times 10^{-6}$)。如图 3-A 所示, 离子强度最高的碎片离子为 m/z 572.291 5, 由 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 失去 1 分子 CH_3COOH 生成。低峰度的碎片离子 m/z 582.276 3 是由乌头碱失去 1 分子 CH_3OH 与 H_2O 形成的。质谱中较高峰度的离子主要来自于碎片离子 m/z 572.291 5, 失去 1 分子水可形成碎片离子 m/z 554.276 8, 失去 1 分子 CH_3OH 则形成碎片离子 m/z 540.266 4。而 m/z 540.266 4 失去 1 分子水可形成碎片离子 m/z 522.256 5, 也可失去 CO 形成碎片离子 m/z 512.269 6, 其继续失去 1 分子 CH_3OH 则生成碎片 m/z 480.239 7。如图

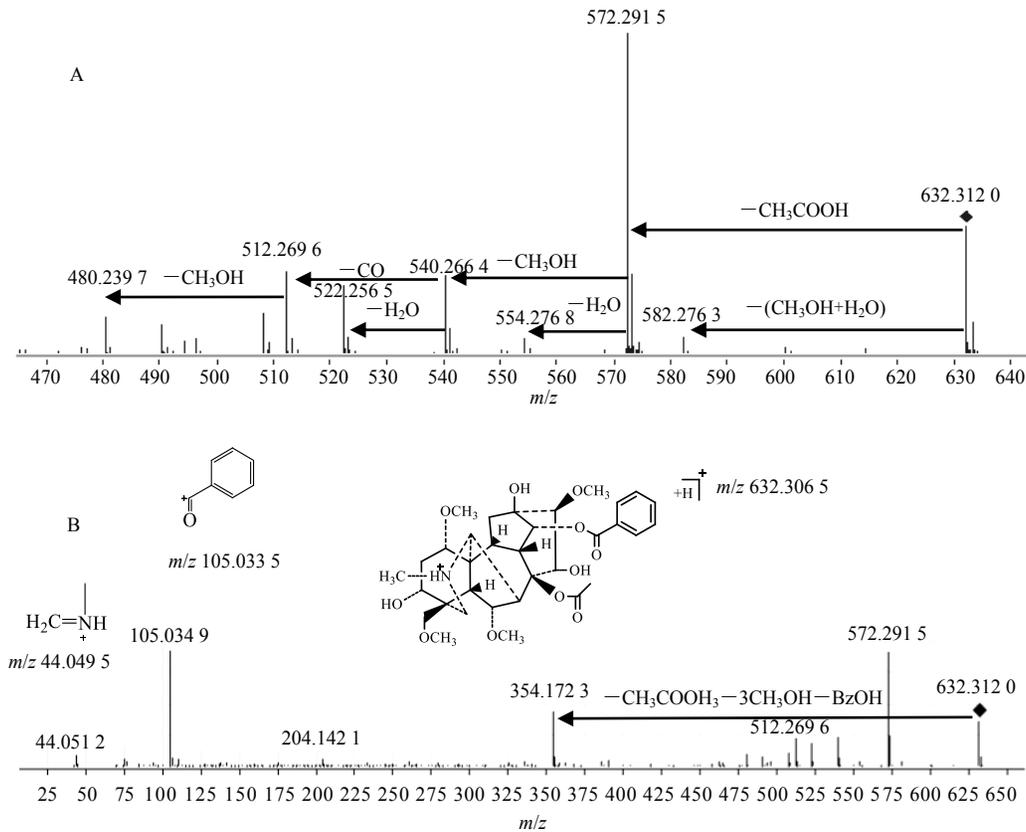


图 3 中乌头碱的 MS/MS 质谱图

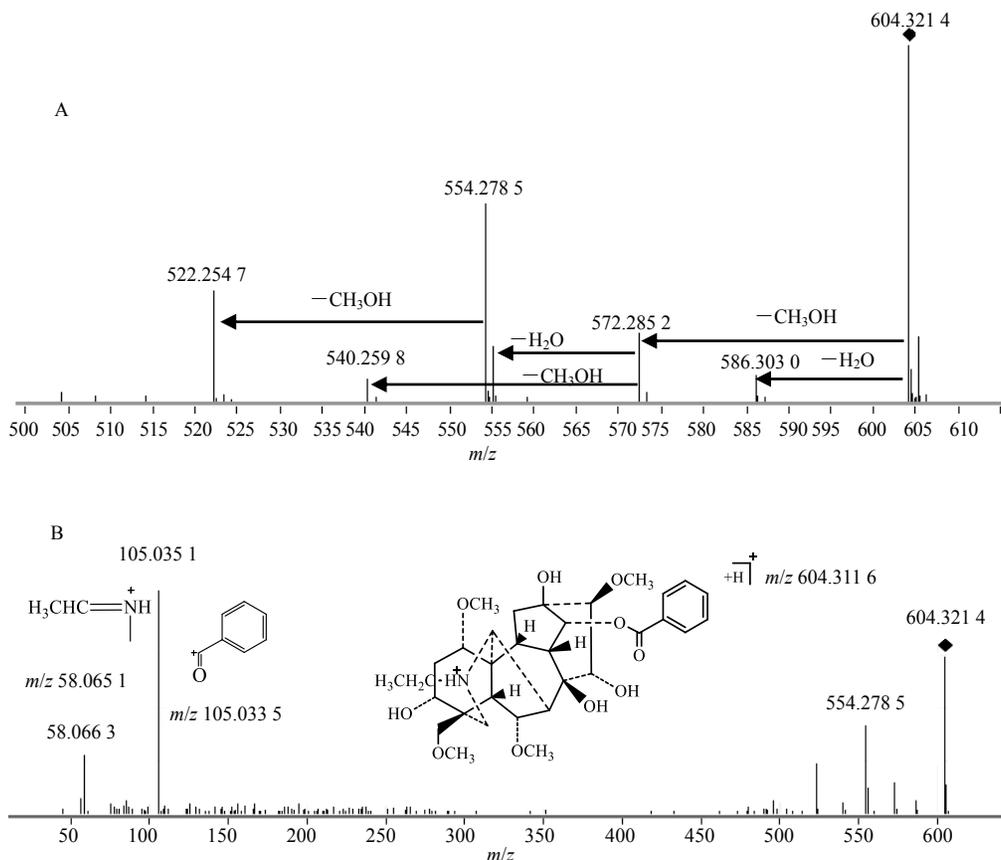
Fig. 3 MS/MS spectra of mesaconitine

3-B 所示, 中质量区的碎片 m/z 354.172 3 是由碎片离子 m/z 572.291 5 失去侧链苯甲酸与甲醇形成。低质量区的碎片 m/z 105.034 9 为乌头碱侧链苯甲酰的碎片离子, 而乌头碱上的氮原子, 可发生连续断裂生成碎片 m/z 44.051 2。

苯甲酰乌头碱的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 604.313 2 ($+2.65 \times 10^{-6}$), 如图 4-A 所示, 离子强度最高的碎片离子 m/z 554.278 5 由 $[M+H]^+$ 失去 1 分子 CH_3OH 与 H_2O 生成。由于结构上的差异, 单酯型生物碱的 MS/MS 质谱图中没有失去 CH_3COOH 的碎片, 但在双酯型生物碱的质谱中这种碎片丰度最高, 并因此产生一系列丰度较高的碎片, 这是两种类型生物碱的重要区别。苯甲酰乌头碱的碎片主要来自于失去 CH_3OH 与 H_2O 。准分子离子失去 1 分子 H_2O 生成碎片 m/z 586.303 0, 也可失去 1 分子 CH_3OH 生成碎片 m/z 572.285 2。碎片 m/z 572.285 2 失去 1 分子 CH_3OH 生成碎片 m/z 540.259 8, 失去 1 分子 H_2O 生成碎片 554.278 5, 继续失去 1 分子 CH_3OH 形成碎片离子 m/z 522.254 7。如图 4-B 所示,

低 m/z 区的碎片与中乌头碱的裂解途径相同, 主要是苯甲酰侧链和氮原子的质谱裂解。低质量区的碎片 m/z 105.035 1 为侧链苯甲酰的碎片离子, 而苯甲酰乌头碱上的氮原子, 发生连续断裂生成碎片 m/z 58.060 3。

与中乌头碱的质谱裂解不同, 苯甲酰乌头碱并未出现失去苯甲酰侧链后生成的碎片离子, 其在中等质量的 m/z 300~400 区域并未出现明显碎片, 而中乌头碱则出现失去苯甲酸等的高峰度碎片, 其他的 4 种生物碱也出现了相同情况, 2 类生物碱呈现出明显的区别。这说明双酯型生物碱更容易失去苯甲酰侧链而形成稳定的碎片离子, 这也是 2 种生物碱的又一重要区别。此外, 由于中乌头碱的 N 原子上连有甲基, 经过连续的碎裂, 在质谱中可产生 m/z 44.051 2 的碎片离子峰, 见图 3-B, 而苯甲酰乌头碱的 N 原子上连有乙基, 经过连续的碎裂, 在质谱中可产生 m/z 58.066 3 的碎片离子峰, 见图 4-B, 这种裂解途径可以在结构鉴定中判断氮原子上的取代基, 为未知生物碱结构的判定提供参考。6 种乌头类生物碱的主要碎片归纳见表 2。



A-fragmentation pathways of benzoyleaconitine B-representative fragment ions of benzoyleaconitine

图 4 苯甲酰乌头原碱的 MS/MS 质谱图
Fig. 4 MS/MS spectra of benzoyleaconitine

表 2 2 种乌头类生物碱的主要碎片离子

Table 2 Main fragment ions of two kinds of aconitine-type alkaloids

碎片离子	AC	HA	MA	BAC	BHA	BMA
[M+H] ⁺	646.325 9	616.316 8	632.309 0	604.313 2	574.303 0	590.318 0
[M+H-CH ₃ OH] ⁺		584.279 0		572.285 2	542.272 0	558.272 7
[M+H-H ₂ O] ⁺				586.303 0		572.280 1
[M+H-CH ₃ OH-H ₂ O] ⁺	596.285 2		582.276 3	554.278 5	524.260 2	540.265 6
[M+H-2CH ₃ OH] ⁺		492.236 2		540.259 8	510.244 9	526.242 5
[M+H-2CH ₃ OH-H ₂ O] ⁺				522.254 7		508.235 6
[M+H-3CH ₃ OH] ⁺		460.204 2				494.224 5
[M+H-CH ₃ COOH] ⁺	586.298 2	556.284 3	572.291 5			
[M+H-CH ₃ COOH-CH ₃ OH] ⁺	554.272 6	524.258 8	540.266 4			
[M+H-CH ₃ COOH-H ₂ O] ⁺			554.276 8			
[M+H-CH ₃ COOH-CH ₃ OH-H ₂ O] ⁺	536.257 2		522.256 5			
[M+H-CH ₃ COOH-CH ₃ OH-CO] ⁺	526.271 8	496.264 8	512.269 6			
[M+H-CH ₃ COOH-2CH ₃ OH-CO] ⁺	494.244 6	464.238 4	480.239 7			
[M+H-CH ₃ COOH-2CH ₃ OH-H ₂ O] ⁺	476.235 8		490.225 7			
[M+H-CH ₃ COOH-CH ₃ OH-BzOH] ⁺		402.230 5				
[M+H-CH ₃ COOH-CH ₃ OH-BzOH-CO] ⁺	404.243 1		390.230 2			
[M+H-CH ₃ COOH-2CH ₃ OH-BzOH] ⁺		370.200 9				
[M+H-CH ₃ COOH-3CH ₃ OH-BzOH] ⁺	368.185 8	338.183 3	354.172 3			
[M+H-CH ₃ COOH-3CH ₃ OH-BzOH-H ₂ O] ⁺			336.157 9			
[M+H-CH ₃ COOH-3CH ₃ OH-BzOH-CO] ⁺		310.172 0				
Bz	105.033 6	105.033 1	105.034 9	105.035 1	105.033 2	105.035 1
N-R	58.066 0	44.050 1	44.051 2	58.066 3	44.049 8	44.051 0

4 讨论

本研究利用高效液相色谱对 6 种乌头类生物碱实现了较好的分离,并进一步通过高分辨的飞行时间质谱得到其分子离子和碎片离子的准确结构信息。利用以上实验结论并结合之前的文献报道,较为详尽地解析了 6 种乌头类生物碱的质谱裂解规律。以 CH₃COOH 分子中性丢失的裂解途径区分双酯型与单酯型乌头类生物碱,同时可通过低质量区离子碎片推断 N 原子上连接基团的类型,从而为未知生物碱的结构判定提供依据。本研究对乌头类生物碱质谱裂解规律的总结,为利用质谱裂解方式初步确定乌头类生物碱的结构类型、利用 LC-MS 研究药材炮制过程中乌头类双酯型生物碱水解转化规律、乌头类生物碱在体内代谢规律的解析以及对其他天然药物中同类生物碱的质谱研究提供参考。

参考文献

[1] 刘文龙, 刘志强, 宋凤瑞, 等. 乌头类双酯型生物碱组分转化为单酯型水解型及脂型生物碱组分的研究 [J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(3): 717-720.
 [2] 谭 鹏, 邓欣祺, 李 飞, 等. 乌头碱电喷雾质谱裂解机制的研究 [J]. 中国测试, 2014, 40(1): 43-46.
 [3] 孙 兰, 周海燕, 赵润怀, 等. HPLC 法同时测定附子中 6 种单酯和双酯型生物碱 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 131-134.
 [4] 刘 芳, 于向红, 李 飞, 等. HPLC 测定附子及其炮制品中 3 种双酯型生物碱的含量 [J]. 中国中药杂志,

2006, 31(14): 1160-1162.
 [5] 贾雪岩, 林 华, 沈玉巧, 等. 附子新型炮制品中乌头类生物碱测定及其强心作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 224-229.
 [6] 张小龙, 吴先富, 王 昆, 等. HPLC-QTOF-MS 法测定风湿骨痛胶囊中 9 个乌头类生物碱的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 414-419.
 [7] 张小平, 蒋可志, 吕惠卿, 等. HPLC-QTOF-MS 鉴定条叶榕根茎乙酸乙酯提取物中的主要化学成分 [J]. 质谱学报, 2015, 36(4): 310-320.
 [8] Sun M Q, Liu J X, Lin C R, et al. Alkaloid profiling of the traditional Chinese medicine *Rhizoma corydalis* using high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 4(3): 208-216.
 [9] 陈玉娟, 王会堂, 凡炼炼. 乌头碱的质谱裂解行为分析 [J]. 科技创新导报, 2010, (21): 7-8.
 [10] 陈莘莘, 赵 宁, 徐秀玲, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法分析新乌头碱在大鼠尿液中的代谢产物 [J]. 药理学报, 2010, 45(8): 1043-1047.
 [11] 李坤平, 高崇凯, 李卫民. 牡荆苷和异鼠李素-3-O-β-芸香糖苷的电喷雾飞行时间质谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 180-184.
 [12] 彭蜀莹, 沈建华, 叶 阳. 4 种百部生物碱的质谱行为研究 [J]. 分析化学研究报告, 2006, 30(4): 497-502.
 [13] 刘淑莹, 宋凤瑞, 刘志强. 中药质谱分析 [M]. 北京: 科学出版社, 2012.