

基于UHPLC-QTOF-MS/MS技术的骆驼蓬化学成分分析及其神经保护活性

王宁宁¹, 魏冠华¹, 张智军¹, 房建国², Mohammad Umar Farooq³, Imtiaz Ahmad Qamar³, 刘映前¹, 杨志刚^{1*}

1. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 兰州大学化学化工学院, 甘肃 兰州 730000

3. 巴基斯坦农业研究中心, 巴基斯坦 伊斯兰堡

摘要: **目的** 基于UHPLC-QTOF-MS/MS技术对骆驼蓬 *Pegannum harmala* 化学成分进行分析, 并探讨其神经保护活性。**方法** 色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm), 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; 体积流量0.3 mL/min; 进样体积2 μL; 柱温35 °C。质谱系统采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式下检测。利用过氧化氢(H₂O₂)和6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的PC12细胞氧化损伤模型和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的BV2细胞神经炎症模型, 探讨骆驼蓬全草和种子的甲醇提取物以及去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱、哈尔满和去甲哈尔满4种骆驼蓬中主要生物碱的神经保护活性。**结果** 从骆驼蓬中共鉴别32个化学成分, 全草中主要含有脱氧鸭嘴花碱、鸭嘴花醇等喹啉酮类生物碱, 而种子中主要含有去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱等β-咪啉类生物碱。骆驼蓬全草、种子甲醇提取物和4种生物碱对LPS刺激诱导BV2细胞一氧化氮(NO)生成具有一定的抑制活性, 并对H₂O₂和6-OHDA诱导的PC12细胞损伤均具有明显的保护作用($P<0.01$)。**结论** 骆驼蓬全草和种子中的生物碱成分存在差异, 而且其所含的生物碱类化合物具有一定的神经保护作用, 为骆驼蓬的质量控制及药效物质基础研究提供了参考。

关键词: 骆驼蓬; UHPLC-QTOF-MS/MS; 生物碱; 神经保护活性; 去氢骆驼蓬碱; 骆驼蓬碱; 哈尔满; 去甲哈尔满

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)06-1688-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.011

Chemical constituents in *Pegannum harmala* based on UHPLC-QTOF-MS/MS and its neuroprotective activities

WANG Ning-ning¹, WEI Guan-hua¹, ZHANG Zhi-jun¹, FANG Jian-guo², Mohammad Umar Farooq³, Imtiaz Ahmad Qamar³, LIU Ying-qian¹, YANG Zhi-gang¹

1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

3. Pakistan National Agricultural Research Center, Islamabad, Pakistan

Abstract: Objective To analyze the chemical constituents of *Pegannum harmala* based on UHPLC-QTOF-MS/MS and explore its possible neuroprotective activities. **Methods** The chromatographic column was ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1mm, 1.6 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution (A) and 0.1% formic acid acetonitrile solution (B), followed by gradient elution. Volume flow was 0.3 mL/min; The injection volume was 2 μL. Column temperature was 35 °C. The mass spectrometry system used electrospray ion source (ESI), which was detected in positive ion mode. Then, the oxidative damage model induced by H₂O₂ and 6-OHDA in PC12 cells and the BV2 neuroinflammation model induced by LPS were established. The extracts of the aerial parts and seeds of *P. harmala*, and the four main alkaloids of harmine, harmaline, harman and norharman, were investigated on their neuroprotective activities. **Results** A total of 32 chemical constituents were identified from *P. harmala*. The aerial parts mainly contained quinazolinone alkaloids, such as peganol and deoxypeganine, while the seeds mainly contained β-carboline alkaloids, such as harmine and harmaline. The methanol extracts from the aerial parts, seeds and four main alkaloids showed certain inhibitory activity on NO production in BV2 cells stimulated by LPS. They also had obvious protective effects on

收稿日期: 2021-11-23

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项(2016YFE0129000); 甘肃省重点研发计划(18YF1WA115); 甘肃省自然科学基金项目(20JR5RA311)

作者简介: 王宁宁(1996—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础及代谢组学研究。Tel:18095859563 E-mail: wangnn19@lzu.edu.cn

*通信作者: 杨志刚, 副教授, 主要从事中药药效物质基础及代谢组学研究。Tel: (0931)8915202 E-mail: yangzg@lzu.edu.cn

PC12 cells induced by H₂O₂ and 6-OHDA ($P < 0.01$). **Conclusion** The alkaloid components in the aerial parts and the seeds are quite different, and the alkaloid compounds have certain neuroprotective effects. This study provides some reference for the quality control and the basic research of pharmacological substances of *P. harmala*.

Key words: *Pegannum harmala* L.; UHPLC-QTOF-MS/MS; alkaloids; neuroprotective activity; harmine; harmaline; harman; norharman

骆驼蓬 *Pegannum harmala* L. 为蒺藜科骆驼蓬属多年生草本植物, 其味苦、性温、有毒, 在我国西北干旱地区广泛分布^[1]。骆驼蓬全草和种子在维吾尔族、哈萨克族、蒙古族、藏族的传统医药中均可入药, 具有祛风止痛、镇咳平喘、温身通窍的功效, 临床主治关节骨痛、筋脉软弱、偏瘫健忘、神昏头痛、月经不调等症^[2]。骆驼蓬在巴基斯坦民间传统医药中也有应用, 主要用于血液净化、止痛麻醉、促进伤口愈合、糖尿病等^[3]。《中国民族药志》中记载, 骆驼蓬能解郁补脑, 用于精神郁闷、瘫痪、健忘、癫痫, 对神经系统相关疾病具有一定的治疗作用^[4]。骆驼蓬全草和种子中主要含有 β -咔啉和唑啉酮类生物碱成分, 且总生物碱是骆驼蓬子改善小鼠学习记忆的有效部位^[5]。张晓双等^[6]研究表明骆驼蓬总碱通过下调促凋亡蛋白 Bax 的表达, 上调抑凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的表达, 抑制海马神经细胞凋亡, 从而改善血管性痴呆性大鼠的学习记忆能力。此外, 诸多研究表明骆驼蓬属及其活性生物碱成分对神经系统具有广泛药理作用, 包括镇痛作用、幻觉作用、兴奋作用、神经保护作用^[7], 以及对胆碱酯酶和单胺氧化酶具有较强的抑制作用^[8]。

LC-MS 具有分离性能强、选择性好、灵敏度高的优势, 且 QTOF 获得的高分辨质谱信息有助于快速检索以鉴定代谢物, 对药用植物中复杂的微量成分分离分析具有重要的意义^[9]。为深入分析骆驼蓬不同部位的生物碱成分和活性差异, 本研究首先通过 UHPLC-QTOF-MS/MS 技术对骆驼蓬全草及种子中的化学成分进行鉴别分析, 并通过建立过氧化氢 (H₂O₂) 和 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 诱导的大鼠肾上腺嗜铬瘤 PC12 细胞氧化损伤模型和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小胶质 BV2 细胞神经炎症模型, 用骆驼蓬全草和种子的甲醇提取物, 及其去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱、哈尔满、去甲哈尔满 4 种生物碱干预, 探讨其神经保护活性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Agilent 1290 超高效液相色谱仪 (美国 Agilent

公司); Agilent 6560 离子淌度飞行时间质谱仪 (美国 Agilent 公司); 无水甲醇 (分析纯), 天津市富宇精细化工有限公司, 甲酸 (质谱级) 和乙腈 (质谱级), 德国 Merck 公司; 去离子水, 屈臣氏。UHPLC-QTOF-MS 分析对照品: 去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱、哈尔满、去甲哈尔满 (质量分数 $\geq 98\%$), 由兰州大学药学院刘映前教授提供。

本实验所用骆驼蓬全草样品采集于巴基斯坦和中国甘肃, 种子样品采集于中国新疆, 经兰州大学药学院杨志刚副教授鉴定为蒺藜科骆驼蓬 *P. harmala* L. 的种子及全草, 样品标本 (202010001) 保存于兰州大学药学院。

1.2 骆驼蓬的成分分析

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱、哈尔满、去甲哈尔满各 1.00 mg, 甲醇溶解后配成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 作为对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备 将骆驼蓬全草和种子粉碎后过 50 目筛, 得到粉末样品; 精密称取各样品粉末 0.20 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50 mL 甲醇, 称定质量; 超声处理 30 min (功率 600 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足质量; 静置 30 min 后取上清液 1.5 mL, 13 000 r/min 离心 2 min 后, 用 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。剩余样品溶液滤过, 浓缩至干, 用 DMSO 配制成相应的浓度, 用于活性测试样品。

1.2.3 UHPLC-QTOF-MS/MS 条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.6 μm), 流动相由 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) 组成。梯度洗脱: 0~1 min, 3%~5% B; 1~3 min, 5%~7% B; 3~7 min, 7%~20% B; 7~15 min, 20%~40% B; 15~22 min, 40%~100% B; 22~25 min, 100% B; 25.1~30 min, 100% B; 体积流量 0.3 mL/min; 进样体积 2 μL ; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱系统采用电喷雾离子源 (ESI), QTOF 操作模式为 Auto MS/MS, 扫描范围 m/z 50~1700。ESI 源参数: 干燥气 (N₂) 体积流量 10 mL/min; 干燥气温度 225 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气压力 172 kPa; 毛细管

电压 3500 V; 喷嘴电压 500 V; 毛细管出口电压 400 V; 碰撞能 10、20、40 eV; 正离子模式下检测。

1.2.4 数据采集与处理 液质数据采集及处理软件为 Agilent MassHunter (B.08.00, 美国安捷伦公司), Profinder (B.08.00, 美国安捷伦公司), Mass Profiler Professional (B.14.9, 美国安捷伦公司)。

1.2.5 化合物的鉴定 将 Agilent MassHunter 软件采集的数据导入 Profinder 软件进行数据预处理, 然后用 Mass Profiler Professional 软件进行 MS 数据统计分析, 对每组样品化合物出现频率过滤。根据精确的相对分子质量, 计算化合物可能的元素组成; 根据各成分的相对保留时间、二级特征碎片离子信息、质谱裂解规律, 并结合对照品指认和文献数据及 Metlin、MassBank、PubChem 等数据库比对二级质谱数据, 对化合物进行鉴定。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞培养 BV2 细胞和 PC12 细胞的培养基为含 10% 胎牛血清和 1% 抗生素 (青霉素和链霉素) 的 DMEM 高糖培养液, 在含 5% CO₂ 和 95% 空气的饱和水培养箱中 37 °C 恒温培养 24 h。

1.3.2 MTT 实验 采用 MTT 法评估细胞生存率。分别取对数期生长的 PC12、BV2 细胞混悬液 100 μL 接种于 96 孔板中进行细胞培养。待细胞贴壁后, 每孔中加入 10、20 μg/mL 浓度的药物样品 (骆驼蓬全草及种子甲醇提取物浸膏及其 4 种主要的生物碱: 去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱、哈尔满、去甲哈尔满) 培养 24 h, 再加入 MTT 20 μL 培养 4 h, 加入提取缓冲液 (由 10% 十二烷基硫酸钠、5% 异丁醇、0.1% HCl 水溶液组成), 孵育过夜。甲瓚结晶充分溶解后, 用酶标仪在 570 nm 下测定吸光度 (A)。

1.3.3 BV2 细胞抗炎活性 通过抑制 NO 生成实验评价抗炎活性。待 BV2 细胞贴壁后, 每孔加入 LPS (1 μg/mL) 诱导神经炎症模型, 同时加入不同浓度的药物样品培养 24 h。取各孔细胞上清培养液 50 μL 置于 96 孔板中, 加入 Griess 试剂, 混匀后静置。室温下避光反应 10 min, 用酶标仪在 570 nm 波长处测定 A。

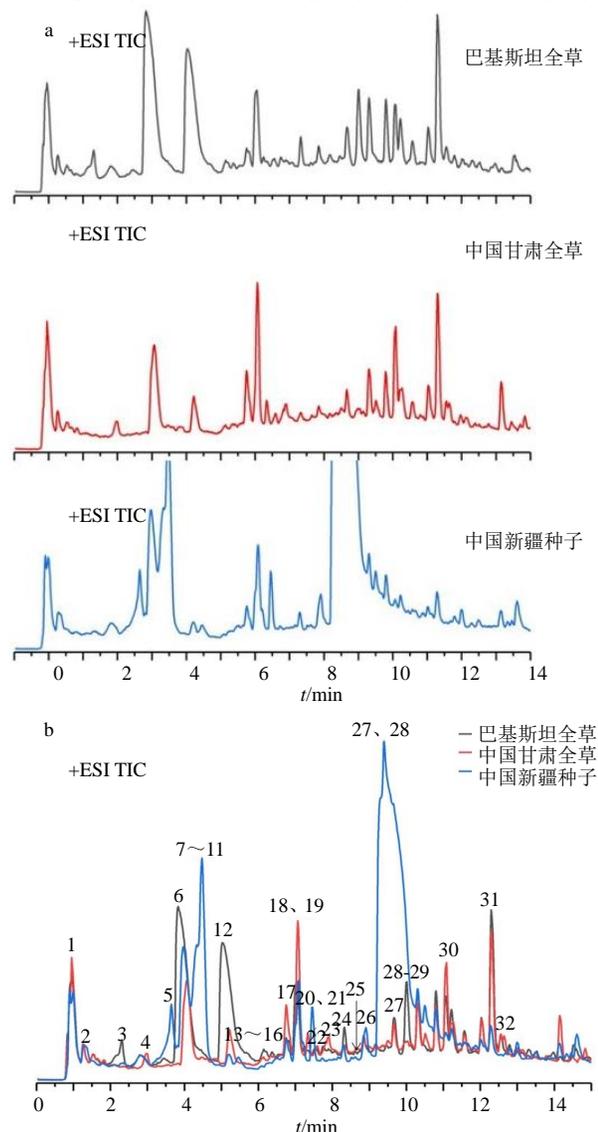
1.3.4 PC12 细胞氧化损伤保护活性 通过检测细胞活力变化评价药物对 H₂O₂、6-OHDA 诱导的 PC12 细胞氧化损伤模型的保护作用。PC12 细胞贴壁后, 每孔加入不同浓度的药物样品培养 24 h。更换细胞培养液, 每孔加入 H₂O₂ (终浓度 500 μmol/L)、6-OHDA (终浓度 200 μmol/L) 建立 PC12 细胞氧化

损伤模型。加入 MTT 继续培养 4 h, 每孔再加入 100 μL 提取缓冲液, 甲瓚结晶充分溶解后于 570 nm 波长处测定 A。

2 结果与讨论

2.1 化学成分鉴定

骆驼蓬样品正离子模式下的总离子色谱图如图 1, 所鉴别的化合物见表 1。此外, 将 Agilent Mass Hunter 软件采集一级质谱数据导入 Profinder 软件, 进行数据预处理后以 cef 格式文件导入 MPP 软件进



a-巴基斯坦和中国甘肃骆驼蓬全草、中国新疆骆驼蓬种子样品的总离子流图 b-3个样品的总离子流图对比分析图

a-TIC of the herbs from Pakistan and Gansu of China, and seeds from Xinjiang of China b-Comparative analysis of TIC of three samples

图 1 骆驼蓬全草和种子正离子模式下的总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatography (TIC) of herbs and seeds of *P. harmala* in positive ion mode

表 1 骆驼蓬中鉴别的主要化学成分
Table 1 Main compounds in *P. harmala*

编号	化合物名称	分子式	t_R /min	主要二级碎片离子 (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)		检测归属		
					理论值	实测值	S1	S2	S3
1	骆驼蓬酸	C ₆ H ₁₁ NO ₃	0.953	128.071 3, 100.076 3, 82.066 2	146.081 2	146.082 5	√	√	√
2	L-pipecolate	C ₆ H ₁₁ NO ₂	1.250	84.071 0	130.086 3	130.086 7	√	√	√
3	indole-3-acetaldehyde	C ₁₀ H ₉ NO	2.309	132.081 3, 117.057 9	160.075 7	160.076 0	√	√	√
4	vasicinol	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	2.838	187.087 3, 169.077 7	205.097 2	205.098 1	√	√	√
5	鸭嘴花碱	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	3.495	161.106 5, 120.044 6, 70.065 9	189.102 2	189.102 6	√	√	√
6	鸭嘴花醇	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	3.981	171.092 9, 154.066 3, 144.081 3, 118.066 2, 91.055 2	189.102 2	189.102 6	√	√	√
7	鸭嘴花碱二糖苷	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₁₁	4.491	351.154 3, 189.101 5, 171.091 8	513.207 9	513.208 1	√	√	√
8	鸭嘴花碱糖苷	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₆	4.591	189.094 3, 171.084 0	351.155 1	351.157 1	√	√	√
9	pegaharmine I	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	4.722	215.119 5, 188.094 2, 172.097 7, 160.065 1, 144.069 1	231.112 6	231.112 7	√	√	√
10	luotonin E	C ₁₉ H ₁₃ N ₃ O ₂	4.840	301.119 0, 283.104 5, 261.983 4, 231.112 3, 188.090 9	316.108 1	316.108 5	—	—	√
11	2-carboxyl-3,4-dihydroquinazoline	C ₉ H ₈ N ₂ O ₂	4.923	149.912 5, 131.060 1, 106.034 6	177.065 9	177.065 8	√	√	√
12	脱氧鸭嘴花碱	C ₁₁ H ₁₂ N ₂	5.221	144.069 7, 118.058 1, 106.067 3, 91.055 1	173.107 3	173.107 4	√	√	√
13	glycosides vasicinol	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₃	6.226	205.098 3, 188.073 5, 171.092 1	367.151 3	367.151	√	√	√
14	脱氧鸭嘴花酮碱	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	6.301	171.090 5, 144.081 0, 118.064 2	187.086 6	187.086	√	√	√
15	peganumalineF	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	6.590	231.112 1, 188.089 0, 170.079 0	261.123 4	261.125	√	√	√
16	tetrahydroharmane	C ₁₂ H ₁₄ N ₂	6.603	171.090 3, 144.077 5	187.123 0	187.124 3	√	√	√
17	鸭嘴花酮碱葡萄糖苷	C ₁₇ H ₂₁ N ₂ O ₇	7.069	203.048 3, 185.035 9	365.134 3	365.134 6	√	√	√
18	鸭嘴花酮碱	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂	7.003	185.072 6, 130.066 2	203.081 5	203.081 8	√	√	√
19	去甲骆驼蓬碱	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O	7.135	185.072 6, 160.076 7	201.102 2	201.103 8	√	√	√
20	二氢路因碱	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₇	7.204	231.113 7, 215.079 3	393.165 6	393.166 1	√	√	√
21	路因碱	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₇	7.235	229.093 3, 214.057 2	391.150 0	391.150 6	√	√	√
22	哈尔醇	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O	7.499	184.065 9, 181.076 6	199.086 6	199.087 2	√	√	√
23	去甲哈尔满	C ₁₁ H ₈ N ₂	8.163	142.066 1, 115.054 3	169.076 0	169.075 8	√	√	√
24	去氢骆驼蓬碱氮氧化物	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₂	8.342	214.074 4, 187.082 6	229.097 2	229.099 2	√	√	√
25	哈尔满	C ₁₂ H ₁₀ N ₂	8.824	168.078 1, 144.081 4, 115.055 3	183.091 7	183.092 8	√	√	√
26	dihydroharmane	C ₁₂ H ₁₂ N ₂	8.874	170.084 4, 144.081 5, 130.066 2	185.107 3	185.108 8	—	—	√
27	骆驼蓬碱	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O	9.929	200.095 8, 174.092 6	215.117 9	215.119 4	√	√	√
28	去氢骆驼蓬碱	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	10.012	198.080 2, 170.084 9, 144.080 6	213.102 2	213.103 6	√	√	√
29	3-hydroxylated harmine	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₂	10.510	215.076 9	229.097 2	229.098 8	√	√	√
30	脱乙酰基骆驼蓬苷	C ₄₀ H ₅₂ O ₂₄	11.072	447.133 8, 285.074 8	917.292 1	917.290 7	√	√	√
31	骆驼蓬苷	C ₄₂ H ₅₄ O ₂₅	12.310	651.203 5, 447.130 1, 285.076 5	959.302 7	959.301 9	√	√	√
32	harmalacidine	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	12.792	189.102 2, 162.091 7, 146.063 8, 128.999 5	217.097 2	217.097 0	—	—	√

S1-巴基斯坦全草 S2-中国甘肃全草 S3-中国新疆种子; √表示检测到该成分 —表示未检测到该成分

S1-the herbs from Pakistan S2-the herbs from Gansu of China S3-seeds from Xinjiang of China; √detected —not detected

行分子特征提取 (molecular feature extraction, MFE), 得出巴基斯坦、中国甘肃和新疆的骆驼蓬样品中化学成分数量, 结果见图 2。

2.1.1 β-咔啉类生物碱结构鉴定 β-咔啉类生物碱

是骆驼蓬中最主要的生物碱, 包括去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱、去甲骆驼蓬碱、哈尔满、去甲哈尔满、哈尔醇等^[2]。此类结构母核为吡啶并咪唑类, 正离子模式下易发生母核侧链 CH₃ (-15) 和 CO (-

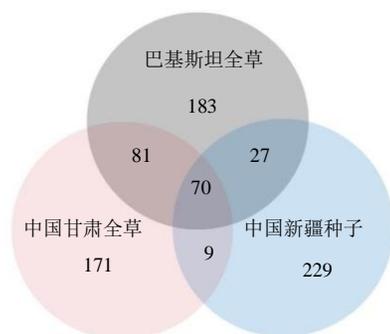


图2 骆驼蓬全草和种子的化学成分数量韦恩图

Fig. 2 Venn chart of chemical composition of herbs and seeds of *P. harmala*

28) 等中性碎片丢失, 母核裂解丢失 HCN (-27), 丢失 C_2H_4 (-28)、丢失 NH_3 (-18)、丢失 C_2H_3N (-41) 等^[10,16]。

化合物 23、25、27、28 的保留时间分别为 8.163、8.824、9.929、10.012 min, 正离子模式下分别产生 m/z 为 169.075 8、183.092 8、215.119 4、213.102 2 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 和对照品的保留时间、碎片信息及特征峰一致, 分别确定为去甲哈尔满、哈尔满、骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱。

化合物 19、20、21、22 和文献报道^[11-12]的准分子离子峰、二级特征质谱数据一致, 分别推测为去甲骆驼蓬碱、二氢路因碱、路因碱、哈尔醇。

化合物 9 的保留时间为 4.722 min, 根据准分子离子峰 m/z 231.112 7 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{13}H_{14}N_2O_2$, 在进一步的质谱裂解中, 可以看到有 m/z 为 198.925 4 (-31, $-OCH_3$)、214.119 5 (-17, $-OH$)、188.098 2 (-26, $-CN$)、172.097 7 (-16, $-NH_2$)、144.069 1 (-28, $-C_2H_4$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[13], 推测其为 peganharmane I。

化合物 15 的保留时间为 6.590 min, 根据准分子离子峰 m/z 261.123 7 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{14}H_{16}N_2O_3$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 231.112 1 (-30, $-CH_2O$)、188.089 0 (-43, $-CH_3CO$)、170.0790 (-18, $-NH_3$) 等, 结合文献报道^[14], 推测其为 peganumaline F。

化合物 16 的保留时间为 6.603 min, 根据准分子离子峰 m/z 187.123 1 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{12}H_{14}N_2$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 171.090 3 (-16, $-NH_2$)、144.077 5 (-27, $-CH_2CH$)、118.065 8 (-26, $C_8H_8N^+$)、106.064 4 ($C_7H_8N^+$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[15], 推测其为 tetrahydro

norharmane。

化合物 24 保留时间为 8.342 min, 根据准分子离子峰 m/z 229.098 8 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{13}H_{12}N_2O_2$ 。进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 214.074 4 (-15, $-CH_3$)、187.082 6 (-42, $-COCH_3$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[16], 推测为去氢骆驼蓬碱氮氧化物。

化合物 26 的保留时间为 8.874 min, 根据准分子离子峰 m/z 185.108 8 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{12}H_{12}N_2$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 170.084 4 (-15, $-CH_3$)、143.073 3 (-27, $-HCN$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[11], 推测其为 dihydroharmane。

化合物 32 的保留时间为 12.792 min, 根据准分子离子峰 m/z 217.097 0 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{12}H_{12}N_2O_2$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 189.102 2 (-28, $-CO$)、162.091 7 (-27, $-HCN$)、146.063 8 (-16, $-NH_2$)、128.999 5 (-18, $-H_2O$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[17], 推测其为 harmalacidine。

2.1.2 喹唑酮类生物碱结构鉴定 喹唑酮类生物碱是骆驼蓬全草及种子中另一类重要的生物碱, 如鸭嘴花碱 (vasicine)、去氧鸭嘴花碱 (deoxypeganine)、鸭嘴花碱酮 (vasicinone)、去氧鸭嘴花碱酮 (deoxyvasicinone)、骆驼宁碱等^[2]。

化合物 4 的保留时间为 2.838 min, 根据准分子离子峰 m/z 205.098 1 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{11}H_{12}N_2O_2$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 187.084 3 (-18, $-H_2O$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[13], 推测其为 vasicinol。

化合物 5 和 6 保留时间为 3.945 min 和 3.981 min, 正离子模式下首先产生 m/z 189.103 0 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 推测其分子式为 $C_{11}H_{12}N_2O$, 对母离子进行碰撞诱导解离产生 m/z 为 171.092 9 (-18, $-H_2O$)、144.081 2 ($C_{10}H_{10}N^+$)、118.066 2 ($C_8H_8N^+$)、91.055 2 ($C_7H_7^+$) 等二级碎片离子, 化合物 5 与文献报道数据一致^[18], 推测其可能为鸭嘴花碱, 而 6 为鸭嘴花醇。

化合物 7 的保留时间为 4.491 min, 根据准分子离子峰 m/z 513.208 1 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{29}H_{42}N_2O_{16}$, 进一步的质谱裂解中产生丢失 1 分子葡萄糖 m/z 为 351.154 3 (-162, $-Glu$) 的离子碎片, 再丢失 1 分子葡萄糖 m/z 为 189.101 5 (-162, $-Glu$) 的二级碎片离子, 结合文献报道^[19], 推测其为二糖

昔鸭嘴花碱,但糖具体的连接位置通过质谱尚无法确定。

化合物 **8** 的保留时间为 4.591 min, 根据准分子离子峰 m/z 351.147 1 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{17}H_{22}N_2O_6$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 189.094 3 (-162, -Glu), $[M+H-Glu-H_2O]^+$ 171.084 0 (-18, $-H_2O$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[19], 推测其为鸭嘴花碱糖苷。

化合物 **10** 的保留时间为 4.840 min, 根据准分子离子峰 m/z 316.128 5 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{19}H_{13}N_3O_2$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 301.119 0 (-15, $-CH_3$), 283.104 5 (-18, $-H_2O$), 261.983 4 (-55, $-C_4H_7$), 231.112 3 (-30, $-NH_2CH_2$), 188.090 9 (-128, $-C_8H_2NO$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[19], 推测其为 luotonin E。

化合物 **11** 的保留时间为 4.923 min, 根据准分子离子峰 m/z 177.065 8 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_9H_8N_2O_2$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 149.912 5 (-28, $-CO$), 131.060 1 (-18, $-H_2O$), 106.034 6 (-43, $-CH_3CO$) 等二级碎片离子, 结合文献报道^[21], 推测其为 2-carboxyl-3,4-dihydroquinazoline。

化合物 **17** 的保留时间为 7.069 min, 根据准分子离子峰 m/z 365.111 4 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{17}H_{21}N_2O_7$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 203.048 3 (-162, -Glu), 185.035 9 (-18, $-H_2O$) 等二级碎片离子, 结合文献^[19,21], 推测其为鸭嘴花酮碱葡萄糖苷。

化合物 **12**、**14**、**18** 和文献报道^[10]的准分子离子峰、二级特征质谱数据一致, 推测为脱氧鸭嘴花碱、脱氧鸭嘴花酮碱、鸭嘴花酮碱。

2.1.3 其他 化合物 **1** 和文献报道^[16]准分子离子峰、二级特征质谱数据一致, 推测其为骆驼蓬酸。

化合物 **2** 的保留时间为 1.400 min, 根据准分子离子峰 m/z 130.086 7 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_6H_{11}NO_2$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 112.063 7 (-18, $-H_2O$) 二级碎片离子, 通过比对 MassBank 数据库, 推测其为 *L*-pipecolate。

化合物 **3** 的保留时间为 2.181 min, 根据准分子离子峰 m/z 160.076 0 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{10}H_9NO$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 132.081 3 (-28, $-CO$), 117.057 9 (-15, $-CH_3$) 等二级碎片离子, 通过比对 MassBank 数据库, 推测其为 indole-3-acetaldehyde。

化合物 **13** 的保留时间为 6.226 min, 根据准分子离子峰 m/z 367.151 0 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{18}H_{18}N_6O_3$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 205.098 3 (-162, -Glu) 碎片离子, 结合文献报道^[21], 推测其为 glycosides vasicinol。

化合物 **30** 的保留时间为 11.072 min, 根据准分子离子峰 m/z 917.295 9 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{40}H_{52}O_{24}$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 447.133 8, 285.074 8 二级碎片离子, 结合文献报道^[16,20], 推测其可能为脱乙酰基骆驼蓬苷。

化合物 **31** 的保留时间为 12.312 min, 根据准分子离子峰 m/z 959.307 7 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_{42}H_{54}O_{25}$, 进一步的质谱裂解中产生 m/z 为 651.203 5, 447.130 1, 285.076 5 等二级碎片离子, 结合文献报道^[16], 推测其可能为骆驼蓬苷。

从表 1 和图 1 中可以看出, *L*-pipecolate、indole-3-acetaldehyde 首次在骆驼蓬中检测发现, luotonin E、dihydroharmane、harmalacidine 仅在种子中发现, 巴基斯坦和中国产骆驼蓬全草, 以及全草和种子间的成分差异较大, 鸭嘴花碱、鸭嘴花醇、脱氧鸭嘴花碱、鸭嘴花酮碱、骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱、脱乙酰基骆驼蓬苷、骆驼蓬苷等生物碱的含量差异较大。此外, 从骆驼蓬全草和种子的化学成分韦恩图(图 2)中可以看出, 巴基斯坦产地和中国甘肃产骆驼蓬全草, 以及中国新疆产骆驼蓬种子中的特有的代谢产物数量分别为 183、171 和 229, 而 3 者共有的代谢物数量是 70, 进一步说明不同部位、不同产地骆驼蓬成分差异较大。根据二级质谱数据对 3 个产地样品的化学成分进行鉴别, 已鉴别出的 32 个化合物的详细信息见表 1。中国和巴基斯坦在骆驼蓬全草传统药效的应用上有差异, 不同部位的应用也有差异^[21], 可能和这些生物碱类有效成分的种类和含量相关, 但仍需要扩大样本量深入探讨其药效物质成分-生物活性-作用机制之间的关联。

2.2 细胞活性实验结果

2.2.1 BV2 细胞活性结果 BV2 细胞是中枢神经系统最主要的免疫细胞, 炎症反应在神经退行性疾病进程中发挥重要作用^[22-23]。BV2 细胞存活率结果显示(图 3-a), 与空白组相比, 骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱、去甲哈尔满、种子总浸膏在 10、20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 BV2 细胞均无明显的损伤作用; 哈尔满和全草总浸膏在 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, BV2 细胞存活率下降, 有明显的损伤作用。LPS 作用于 BV2 细胞后 NO 的

释放量会增加，所有样品对 LPS 诱导的 BV2 细胞表现出一定的浓度依赖性抑制炎症相关因子 NO 释放（图-3b）。

2.2.2 PC12 细胞活性结果 PC12 细胞常用于研究多巴胺能神经元病理和药理作用，神经毒素 6-OHDA 和 H₂O₂ 可诱导 PC12 细胞氧化应激凋亡，可用于模拟诱导帕金森病^[24]。PC12 细胞 MTT 活性结果如图 4-a 所示，与空白组相比，骆驼蓬碱、去

氢骆驼蓬碱、去甲哈尔满、种子总浸膏和全草总浸膏在 10、20 μg/mL 时，对 PC12 细胞均无明显的损伤作用，哈尔满则对 PC12 细胞有较为明显的损伤作用。不同样品对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化损伤结果如图 4-b 所示，与 H₂O₂ 诱导组相比，骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱、去甲哈尔满、种子总浸膏和全草总浸膏在 20 μg/mL 质量浓度下，对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞均具有明显保护作用（*P* < 0.01）。不同样品对

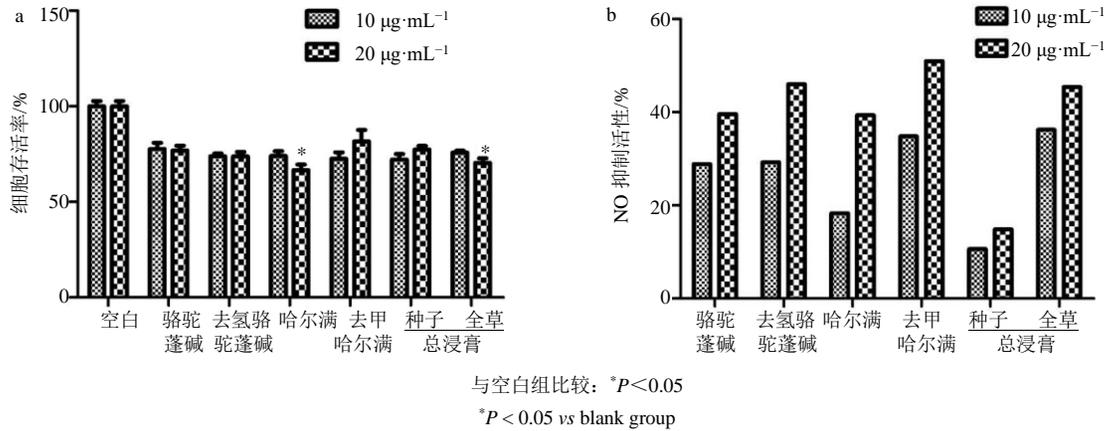
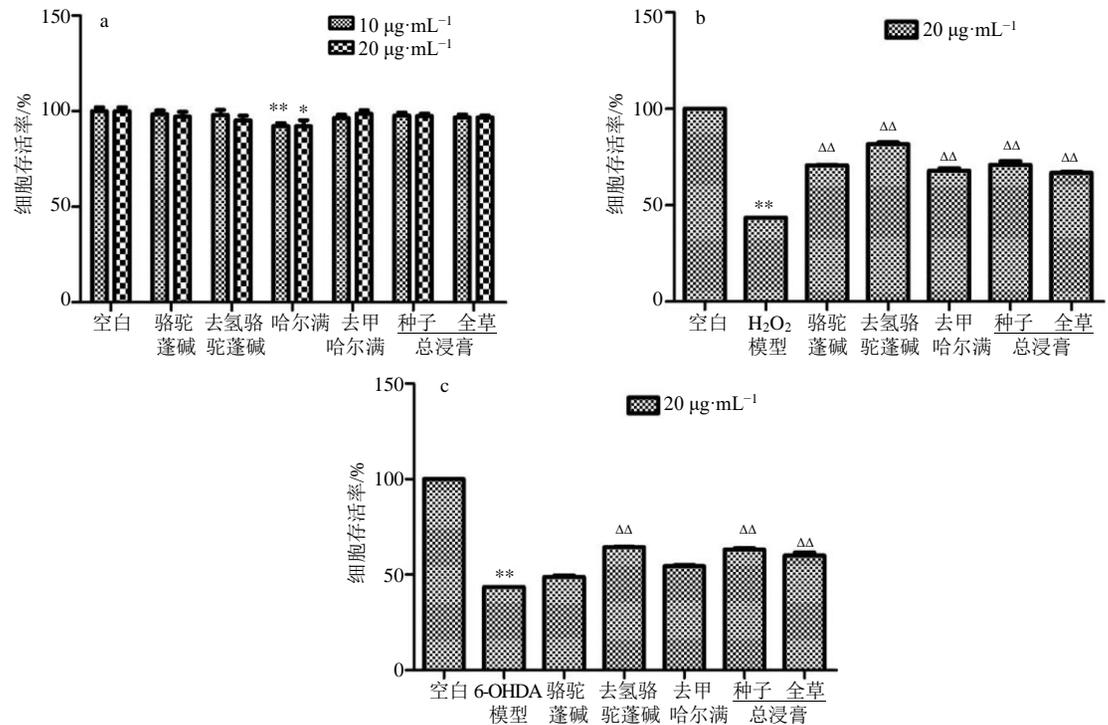


图 3 BV2 细胞存活率 (a) 和 NO 抑制活性 (b) 结果

Fig. 3 Cell viability (a) and NO inhibitory activity (b) of BV2 cells



与空白组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01; 与 H₂O₂ 或 6-OHDA 诱导组比较: ΔΔ*P* < 0.01
P* < 0.05 *P* < 0.01 vs blank group; ΔΔ*P* < 0.01 vs H₂O₂ or 6-OHDA induced group

图 4 MTT (a)、H₂O₂ 诱导 (b)、6-OHDA (c) 诱导的 PC12 细胞实验结果

Fig. 4 Experimental results of MTT (a), H₂O₂-induced PC12 cells (b) and 6-OHDA-induced PC12 cells (c)

6-OHDA 诱导的 PC12 细胞氧化损伤结果如图 4-c 所示,与 6-OHDA 模型组相比,去氢骆驼蓬碱、种子总浸膏和全草总浸膏在 20 μg/mL 下,对 6-OHDA 诱导的氧化损伤的 PC12 细胞均具有明显的保护作用 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究采用 UHPLC-QTOF-MS/MS 技术,对骆驼蓬不同部位全草、种子的甲醇提取物分别进行了正、负离子模式的质谱扫描,结果发现,其中主要的生物碱类化学成分在正离子模式下的响应优于负离子模式,筛选的化合物数量更多,故主要对正离子模式下采集的二级质谱数据中化合物成分进行了分析。从骆驼蓬样品中共鉴别出 32 个化学成分,巴基斯坦和中国产骆驼蓬全草,以及骆驼蓬全草和种子间的成分存在差异。全草中主要含鸭嘴花醇、脱氧鸭嘴花碱等喹唑酮类生物碱,而种子中主要含有去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱等 β-吡啶类生物碱,这与文献报道一致^[25]。结果证实骆驼蓬提取物及部分 β-吡啶类化合物在细胞水平上具有一定的神经保护活性。但也有研究表明 β-吡啶类生物碱对 PC12 细胞能够产生细胞毒作用,且其细胞毒性作用机制与 2、9 位的 N 甲基化具有一定的相关性^[26]。骆驼蓬种子提取物、骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱及去甲哈尔满对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症因子 NO 的生成具有抑制作用,但是哈尔满和全草总浸膏在 20 μg/mL 有一定的细胞毒性。张晓双等^[27]研究表明骆驼蓬总生物碱可通过上调海马突触素 (synaptophysin, syn)、微管相关蛋白-2 (microtubule-associated protein-2, MAP-2) 蛋白表达,并且抑制一氧化氮合酶活性,改善血管痴呆性大鼠的学习记忆能力。

本研究建立的骆驼蓬化学成分分析的液质方法,有助于了解骆驼蓬不同药用部位生物活性成分及其神经保护活性。然而,由于种子中 2 种主要的生物碱骆驼蓬碱和去氢骆驼蓬碱的含量较高且结构相近,通过优化梯度条件、改变柱温等而未能将其分开。此外,骆驼蓬具有神经保护活性和神经毒性更深层次的机制仍需通过更多的实验进一步论证。综上所述,本研究为骆驼蓬的质量控制及药效物质基础研究提供了一定的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 43 卷) [M]. 北京:科学出版社, 1997: 123.

[2] 赵婷, 王长虹, 王峥涛. 骆驼蓬属植物中生物碱类化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(5): 333-339.

[3] 张凯雪, 包芳, 杨志刚. 巴基斯坦药用植物资源 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(2): 1-8.

[4] 刘勇民. 中国民族药志 (第 1 卷) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 369-373.

[5] 何丹丹, 张磊, 刘力, 等. 骆驼蓬子总生物碱改善小鼠学习记忆能力 [J]. 中成药, 2015, 37(3): 478-482.

[6] 张晓双, 孙建宁, 于慧灵. 骆驼蓬总碱对血管性痴呆大鼠学习记忆的影响 [J]. 中药材, 2015, 38(11): 2353-2357.

[7] Yang Y D, Cheng X M, Liu W, et al. Potent AChE and BChE inhibitors isolated from seeds of *Peganum harmala* Linn by a bioassay-guided fractionation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 279-286.

[8] Herraiz T, González D, Ancín-Azpilicueta C, et al. B-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(3): 839-845.

[9] 徐天润, 刘心昱, 许国旺. 基于液相色谱-质谱联用技术的代谢组学分析方法研究进展 [J]. 分析测试学报, 2020, 39(1): 10-18.

[10] 李娜, 李圣坤, 张前亮, 等. 骆驼蓬中主要生物碱的电喷雾多级质谱裂解行为研究 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2013, 43(6): 909-911.

[11] 高简, 张亚丽, 苗祥贞, 等. 基于 LTQ-orbitrap 高分辨质谱的骆驼蓬子中生物碱类成分鉴定及裂解途径分析 [J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 89-96.

[12] Wang Z Y, Kang D, Jia X, et al. Analysis of alkaloids from *Peganum harmala* L. sequential extracts by liquid chromatography coupled to ion mobility spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1096: 73-79.

[13] Wang K B, Li D H, Bao Y, et al. Structurally diverse alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(2): 551-559.

[14] Wang K B, Hu X, Li S G, et al. Racemic indole alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* [J]. *Fitoterapia*, 2018, 125: 155-160.

[15] 樊峥嵘, 姚新生. 骆驼蓬属(*Peganum*)植物成分及药理作用 [J]. 沈阳药学院学报, 1992, 9(2): 144-151.

[16] 环敦涵, 李曼琳, 邢建国, 等. 基于色谱-质谱联用技术的复方木尼孜其颗粒化学成分分析与鉴定 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1366-1375.

[17] Lamchouri F, Toufik H, Elmalki Z, et al. Quantitative structure-activity relationship of antitumor and neurotoxic β-carbolines alkaloids: Nine harmine derivatives [J]. *Res Chem Intermed*, 2013, 39(5): 2219-2236.

- [18] Deng G, Liu W, Ma C, *et al.* *In vivo* and *in vitro* metabolism and pharmacokinetics of cholinesterase inhibitor deoxyvasicine from aerial parts of *Peganum harmala* Linn in rats via UPLC-ESI-QTOF-MS and UPLC-ESI-MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 236: 288-301.
- [19] Zhu Y P, Fei Z, Liu M C, *et al.* Direct one-pot synthesis of luotonin F and analogues via rational logical design [J]. *Org Lett*, 2013, 15(2): 378-381.
- [20] 李越鲲. 骆驼蓬地上部分化学成分的研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [21] Li S, Cheng X, Wang C. A review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of the genus *Peganum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 203: 127-162.
- [22] Orihuela R, McPherson C A, Harry G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 649-665.
- [23] 王蕾, 李鹏飞, 李帆, 等. 失笑散降低氧糖剥夺再灌注 BV2 细胞损伤及 NLRP3 的表达 [J]. 世界中医药, 2021, 16(24): 3601-3605.
- [24] Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway [J]. *Exp Neurol*, 2002, 175(2): 303-317.
- [25] 王长虹, 刘军, 郑立明, 等. 不同产地骆驼蓬不同药用部位中生物碱的含量分析 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(3): 211-215.
- [26] Cobuzzi R J Jr, Neafsey E J, Collins M A. Differential cytotoxicities of *N*-methyl-beta-carbolinium analogues of MPP⁺ in PC12 cells: Insights into potential neurotoxicants in Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 1994, 62(4): 1503-1510.
- [27] 张晓双, 孙建宁, 郭洁, 等. 骆驼蓬总碱对血管性痴呆大鼠学习记忆的研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 75-78.

[责任编辑 王文倩]