基于高分辨质谱数据库的黄连炮制前后生物碱变化规律

龙成燕，杨　炀，黄思行，张　莉，阳　勇，郭延垒*

重庆市中药研究院，重庆　400065

摘　要：目的　构建黄连 *Coptis chinensis* 生物碱类成分的高分辨质谱数据库（HR-MS-Database），研究不同炮制方法炮制前后黄连生物碱类化学成分的变化。**方法**　采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用（UPLC/Q-TOF-MS）技术手段，借助 SCIEX 公司 LibraryView 数据库平台，建立黄连生物碱类成分高分辨质谱数据库，并对不同黄连炮制品中炮制前后的生物碱类成分含量进行测定和差异分析。**结果**　建立黄连生物碱类成分高分辨质谱数据库，包含黄连生物碱类成分 31 种；对姜黄连、酒黄连、萸黄连及黄连生品 4 种样品测定结果显示，黄连炮制前后生物碱成分差异明显。黄连经姜炙后，药根碱、表小檗碱、非洲防己碱含量略有上升，黄连碱、小檗碱含量略有下降，巴马汀含量未见改变；萸黄连中药根碱、表小檗碱、小檗碱含量下降，黄连碱、巴马汀及非洲防己碱含量未见变化；而酒黄连中所测定的 6 种生物碱含量均显著提高（$P<0.05$）。**结论**　建立了一种黄连炮制前后生物碱类成分变化规律的快速识别方法，并定量了在黄连炮制前后含量变化显著的 6 种生物碱，为黄连炮制品的药效物质基础与质量控制标准研究提供参考。

关键词：黄连；生物碱；高分辨质谱；数据库；炮制品；药根碱；表小檗碱；小檗碱；黄连碱；巴马汀；非洲防己碱

中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2022)19 - 5972 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.004

Changing regularity of alkaloids from *Coptis chinensis* before and after processing based on HR-MS-Database

LONG Cheng-yan, YANG Yang, HUANG Si-xing, ZHANG Li, YANG Yong, GUO Yan-lei

Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective　To establish high-resolution mass spectrometry database (HR-MS-Database) of alkaloid constituents from *Coptis chinensis*, and explore alkaloids variation of *C. chinensis* treated by different processing methods. **Methods** Ultra-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry（UPLC-Q-TOF/MS）was used to create HR-MS-Database of alkaloid constituents from *C. Chinensis* by means of LibraryView database platform of SCIEX Corporation. And content determination and difference analysis of the alkaloids from *C. chinensis* before and after processing were conducted. **Results**　The HR-MS-Database of alkaloid constituents from *C. chinensis* containing 31 species of alkaloids was built. The determination results showed that the composition of alkaloids in four types of *Coptidis Rhizoma* (Huanglian) pieces (ginger juice stir-fried pieces, wine stir-fried pieces, evodiae juice stir-fried pieces, crude pieces) was obviously different. The contents of jatrorrhizine, epiberberine and columbamine in *Coptidis Rhizoma* pieces slightly increased by ginger juice stir-fried processing, but the contents of coptisine and berberine were slightly decreased, and the content of palmatine remained unchanged; contents of jatrorrhizine, epiberberine and berberine in evodiae juice stir-fried pieces were decreased, yet contents of coptisine, palmatine, columbamine still stayed stable. Moreover, the contents of six alkaloids (jatrorrhizine, epiberberine, berberine, coptisine, palmatine and columbamine) in wine stir-fried pieces obviously improved ($P < 0.05$). **Conclusion**　The study will provide an effective method for fast identification of alkaloid variation. It was found that the contents of six species of alkaloids from *C. chinensis* changed significantly before and after processing, which provided a reference for their pharmacodynamic material basis and quality control standard of processed *Rhizoma Coptis*.

Key words: *Coptis chinensis* Franch.; alkaloids; HR-MS; database; processed products; jatrorrhizine; epiberberine; berberine; coptisine; palmatine; columbamine

收稿日期：2022-02-21

基金项目：国家重大新药创制专项（2017ZX09101002-002-004）；重庆市科技局激励绩效引导专项（jbky20210019）；重庆市科技局自然科学基金（cstc2021jcyj-msxmX0885）；重庆市重点产业共性关键技术创新专项（cstc2016zdcy-ztzx10005）

作者简介：龙成燕（1993—），女，硕士，助理研究员，研究方向为中药药理学。E-mail: 1206900012@qq.com

***通信作者：**郭延垒，男，硕士，助理研究员，研究方向为中药药代动力学与代谢组学。E-mail: guoyanlei1210@cqacmm.com

黄连来源于毛茛科黄连属多年生植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall.的干燥根茎，以上 3 种分别习称“味连”“雅连”“云连”[1]。黄连味苦，性寒，归心、脾、胃、肝、胆、大肠经。具有清热燥湿、泻火解毒功效，用于治疗湿热痞满、呕吐吞酸、泻痢、黄疸、高热神昏、心火亢盛、心烦不寐、心悸不宁、血热吐衄、目赤、牙痛、消渴、痈肿疔疮；外治湿疹、湿疮、耳道流脓[2]。药理研究结果表明，黄连具有抗炎、抗病毒、抑菌及降血糖等药用、保健价值[3-7]。黄连的化学成分包括生物碱、木脂素、香豆素、黄酮、萜类、甾体、有机酸、挥发油、多糖等[5]，种类众多，其功效成分以生物碱类为主[8-11]。《中国药典》2020 年版黄连项下以小檗碱、巴马汀、表小檗碱、黄连碱作为黄连指标成分进行质量控制[1]。

生黄连苦寒之性较甚，过服或久服易伤脾胃，中医临床常使用姜黄连、酒黄连、萸黄连等黄连炮制品。黄连的不同炮制方法也各有侧重，酒黄连善清上焦火热，用于目赤，口疮[12]；姜黄连清胃和胃止呕，用于寒热互结、湿热中阻、痞满呕吐[13]；萸黄连舒肝和胃止呕[14]。有研究曾建立黄连生品、姜炙、醋炙、酒蒸、酒炙、萸炙等不同炮制品质量标准，结果表明在酒蒸、酒炙、萸炙与生品黄连饮片中，盐酸非洲防己碱等 6 种生物碱成分存在明显差异[15]。近年来，对黄连炮制的相关文献尽管较多，但大多围绕黄连的炮制工艺优化及炮制品的质量控制进行研究[16-19]。而对于化学成分复杂、炮制前后主要药效物质差异明显的黄连而言，以往的研究仍具有一定的局限性。

课题组结合前期研究，基于高分辨质谱（HR-MS）分析策略，建立黄连生物碱类成分的高分辨质谱数据库（HR-MS-Database），探索性的对黄连不同炮制品的成分变化进行分析，拓展了对黄连不同炮制品成分的认识，期望为黄连炮制品的质量控制及药效物质基础研究提供新的参考。

1 仪器与材料

Triple TOF 4600 高分辨质谱系统，API4000 三重四极杆质谱系统（美国 AB SCIEX 公司）；LC-30AD 型超高效液相色谱（日本 SHIMADZU 公司）；Allegra X-12 型离心机（美国贝克曼库尔特有限公司）；Elix10 型超纯水净化系统（美国 MILLIPOER 公司）；XS105DU 十万分之一精密电子天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司）；UC-2 型超声波清洗器（上海泰坦科技股份有限公司）。

对照品盐酸黄连碱（批号 6020-18-4）、小檗碱（批号 2086-83-1）、黄连碱（批号 3486-66-6）、硫酸黄连碱（批号 1198398-71-8）、格兰地新（批号 38691-95-1）、甲基黄连碱（批号 38763-29-0）、四氢黄连碱（批号 7461-02-1）、8-氧黄连碱（批号 19716-61-1）、异黄连碱（批号 30426-66-5）、北美黄连碱（批号 118-08-1）、去氢紫堇碱（批号 83218-34-2）、降氧化北美黄连次碱（批号 21796-14-5），购自上海源叶生物科技有限公司；表小檗碱（批号 6873-09-2）、巴马汀（批号 3486-67-7）、非洲防己碱（批号 3621-36-1）、药根碱（批号 3621-38-3），购自南京源植生物科技有限公司。所有对照品质量分数≥98%

甲酸（Sigma-Aldrich 公司，批号 156068）、乙腈（LC-MS 级，美国 Fisher 公司，批号 178508）、甲醇（LC-MS 级，美国 Fisher 公司，批号 146503）、水（LC-MS 级，美国 Fisher 公司，批号 L-12968）、盐酸（分析纯，重庆川东化工集团有限公司）。

黄连生品由重庆市中药研究院生药研究所瞿显友研究员团队提供，并经瞿显友研究员鉴定为黄连（味连）*C. chinensis* Franch.的干燥根茎。黄连炮制品姜黄连、酒黄连、萸黄连等黄连饮片由重庆市中药研究院药物化学研究所阳勇副研究员团队提供，按照《中国药典》2020 年版一部附录规定的炮制方法，采用同一批次黄连药材（味连）加工制备而成。

2 方法

2.1 黄连生物碱类成分高分辨质谱数据采集

2.1.1 定性用对照品溶液的制备 为获取黄连生物碱类成分的高分辨质谱图，精密称取对照品盐酸黄连碱、小檗碱、表小檗碱、巴马汀、非洲防己碱、药根碱、黄连碱、硫酸黄连碱、格兰地新、甲基黄连碱、四氢黄连碱、8-氧黄连碱、异黄连碱、北美黄连碱、去氢紫堇碱、降氧化北美黄连次碱各 10 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并定容、摇匀，制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品储备液，4 ℃避光保存，使用时根据高分辨质谱分析时所得的化合物分子离子峰的强度稀释至适当工作浓度。

2.1.2 色谱条件 LC-30AD 超高效液相色谱采用菲罗门 ACE Super C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，2.6 μm），流动相为含 0.1%甲酸水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱：0～0.50 min，10%B；0.50～9.00

min，10%～80% B，9.00～12.00 min，80% B；12.00～12.10 min，80%～10% B；12.10～15.00 min，10% B。体积流量 300 μL/min；柱温 30 ℃，进样体积 2 μL。

2.1.3 质谱条件 Triple TOF 4600 高分辨质谱系统采用 ESI-Positive 模式，质量采集扫描范围 *m/z* 50～1000；鞘气压力 379.225 kPa，辅助气压力 379.225 kPa，气帘气压力 172.375 kPa，雾化气温度 600 ℃；采用 TOF-MS-Product Ion-IDA 扫描模式，TOF/MS 一级预扫描和触发的二级扫描 Product Ion-IDA 离子累积时间分别为 200、100 ms，采用多重质量亏损和动态背景扣除作为二级触发条件，解簇电压 80 V，CE 碰撞能量为 35 eV，CES 碰撞能量叠加为（35±15）eV。采用利血平进行精确质量数实时校正，数据采集采用 Analyst TF 1.6.1，并采用 MasterView2.0 进行数据分析。

2.2 黄连生物碱成分 HR-MS Database 数据库设置

2.2.1 HR-MS-Database 数据库源数据采集与录入 基于 Analyst TF 1.6.1 工作站的 LibraryView 谱库编辑程序（SCIEX 公司），录入高分辨质谱仪器采集的各对照品数据信息，录入信息包括化合物CAS号、中文名称、英文名称、分子式、化学结构式、LC 分析条件、保留时间、高分辨质谱 MS 谱图、MS/MS 谱图、离子源、离子化模式、精确相对分子质量。

2.2.2 HR-MS-Database 数据库补充与扩展 为了充实 HR-MS-Database 数据库以扩大使用范围，基于 LibraryView 谱库编辑程序，通过查阅文献，收集整理黄连生物碱类化学成分，并将相关信息录入数据库以扩充相关数据，录入数据库信息包括化合物 CAS 号、中文名称、英文名称、分子式、化学结构式、理论离子化模式、精确相对分子质量。

2.2.3 HR-MS-Database 数据库主要参数设置与应用 数据库设置的主要参数包括：精确质量数、精确分子质量误差值、同位素分布比（F）、MS/MS 碎片纯净度（Purity）和综合打分结果（Fit）。应用 HR-MS-Database 数据库，样品进样后导入数据库，当给定参数误差值、F 和 Purity 同时为高可信度时，给出综合打分（Fit），打分值越高则结果可信度越高。同时，精确相对分子质量误差值通常作为重要参考，精确分子质量误差值用于判断测定结果与理论精确质量数的差异，＜5×10^{-6}：可信度高；5×10^{-6}～1×10^{-5}：可信度一般，需结合其他方式确证；＞1×10^{-5}，可信度低。当参数在多个打分均较高的平行结果中，则可以根据候选化合物的 MS/MS 裂解规律来确定或推断目标化合物的结构；对于同分异构体可结合保留时间参数进一步验证。

2.3 基于 HR-MS Database 数据库应用于黄连炮制前后生物碱类差异成分鉴定

2.3.1 定性用供试品溶液的制备 为比较黄连不同炮制品成分差异，将姜黄连、酒黄连、萸黄连饮片以及黄连生品分别干燥粉碎后过二号筛，取各饮片粉末 0.2 g，各平行 10 份。姜黄连、酒黄连、萸黄连以及黄连生品的样品编号分别为 Jiang_01～10、Jiu_01～10、Yu_01～10、SP_001～010。上述各样品分别置 100 mL 的具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 甲醇-盐酸（100∶1），称定质量，超声提取 30 min，放冷，提取 2 次，再次称定质量，甲醇-盐酸（100∶1）补足减失质量，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取上清液作为供试品溶液，待测。

2.3.2 黄连炮制前后样品高分辨质谱数据采集 为识别姜黄连、酒黄连、萸黄连饮片以及黄连生品之间的化学成分差异，按“2.1.2”和“2.1.3”项下色谱条件和质谱条件，通过 TOF-MS-Product Ion-IDA 扫描，获取待测样品全扫描数据。

2.3.3 聚类分析识别黄连炮制前后成分变化 为了识别黄连不同炮制前后成分的变化，基于高分辨质谱全扫描数据，采用 MarkerView（Version1.2.1，SCIEX）进行峰提取、峰匹配、峰识别以及归一化等预处理，通过单位质量峰面积的值，采用 Simca-P（Version 14.5，Umetrics）进行偏最小二乘法（partial least squares method，PLS-DA）多元变量统计分析。以 PLS-DA 方法建立姜黄连、酒黄连、萸黄连饮片以及黄连生品之间的分类模型，以 R^2_X、R^2_Y 和 Q^2 判断分类模型的精度，以 VIP（variable importance for the projection）值确定不同组间差异成分。

2.3.4 基于 HR-MS-Database 数据库的黄连生物碱类化学成分鉴定 以 PLS-DA 识别黄连炮制前后不同样品间差异成分为基础，结合黄连生物碱 HR-MS-Database 数据库，通过数据库的搜索、比对，鉴定出黄连炮制前后生物碱类差异成分。

为进一步明确黄连炮制前后生物碱变化规律，以文献报道较多的作为黄连质量标准与药理活性评价的指标性成分为依据，拟选择黄连碱、药根碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀及非洲防己碱等进行含量测定分析。同时，所选取的黄连碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀也是药典质量控制成分[1,20]。

2.4 黄连炮制前后生物碱类成分变化规律研究

2.4.1 供试品溶液的制备 将姜黄连、酒黄连、萸黄连饮片以及黄连生品分别干燥粉碎后过二号筛，取各饮片粉末 0.2 g，置 100 mL 的具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 甲醇-盐酸（100∶1），称定质量，超声提取 30 min，放冷，提取 2 次，再次称定质量，甲醇-盐酸（100∶1）补足失重，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取上清液作为供试品溶液，待测。

2.4.2 定量用对照品溶液的制备 取“2.1.1”项 1 mg/mL 的黄连碱、药根碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀及非洲防己碱对照品储备液，用于黄连生物碱类成分定量分析方法的建立。

2.4.3 色谱条件 LC-30AD 超高效液相色谱采用菲罗门 ACE Super C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，2.6 μm），流动相为 2 mmol/L 甲酸铵（含 0.2%甲酸）（A）-乙腈（B），采用梯度洗脱程序：0～0.50 min，15 %B；0.50～1.50 min，15%～90 % B，1.50～3.60 min，90 % B；3.60～3.70 min，90%～15% B；3.70～6.00 min，15% B。体积流量为 300 μL/min；柱温为 30 ℃，进样体积 2 μL。

2.4.4 质谱条件及系统适用性试验 API4000 三重四极杆质谱系统采用 ESI-Positive-MRM 模式，鞘气压力 379.225 kPa，辅助气压力 379.225 kPa，气帘气压力 172.375 kPa，雾化气温度 600 ℃，碰撞气（CAD）压力为 41.370 kPa，解离电压（CXP）为 15 V。分别精密吸取“2.4.1”与“2.4.2”项下供试品溶液和对照品溶液，并按“2.4.3”和“2.4.4”项下色谱条件和质谱条件进样分析，并记录谱图。

2.4.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.4.2”项下黄连碱、药根碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀及非洲防己碱的对照品储备液，置于同一 10 mL 量瓶中，得混合对照品溶液，并逐级稀释至 100、50、25、10、5、1、0.5 ng/mL 系列质量浓度，按“2.4.3”和“2.4.4”项下色谱条件和质谱条件依次进样测定，记录峰面积，以对照品质量浓度为横坐标（X），以峰面积为纵坐标（Y）建立标准曲线。

2.4.6 精密度试验 分别精密吸取“2.4.2”项下混合对照品溶液，并逐级稀释至 10 ng/mL，并按“2.4.3”和“2.4.4”项下色谱条件和质谱条件连续进样 6 次，记录峰面积，并计算各成分质量分数的 RSD。

2.4.7 重复性试验 取姜黄连样品 6 份，按“2.4.1”项下样品溶液制备，并按“2.4.3”和“2.4.4”项下色谱条件和质谱条件测定并计算各成分质量分数的 RSD。

2.4.8 加样回收率试验 取已测定的姜黄连样品 6 份，加入混合对照品溶液，按“2.4.1”项下样品溶液制备，并按“2.4.3”和“2.4.4”项下色谱条件和质谱条件测定并计算平均加样回收率和 RSD。

2.4.9 样品含量测定 按上述方法对黄连生品及姜黄连、酒黄连、萸黄连 4 种黄连饮片生物碱含量进行检测，数据采集采用 Analyst TF 1.6.1，并采用 SCIEX MultiQuant™进行数据分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组均数比较采用独立样本 t 检验：所有检验水平 $\alpha=0.05$（双侧），以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

3 结果与分析

3.1 黄连生物碱类成分 HR-MS-Database 数据库建立

黄连生物碱类成分数据库的构建是基于 SCIEX 公司 Analyst TF 1.6.1 工作站的 LibraryView 谱库编辑程序。数据库录入数据包括 2 类，一类为高分辨质谱仪器采集的对照品数据，另一类为来源于文献的收集整理。录入数据库的信息包括化合物 CAS 号、中文名称、英文名称、分子式、化学结构式、理论离子化模式、精确相对分子质量，对于来源于高分辨质谱仪器采集的对照品数据，软件后台还包括 LC 分析条件、保留时间、高分辨质谱 MS 谱图、MS/MS 谱图等信息。建立的黄连生物碱类成分数据库共包含黄连属生物碱 31 种（表 1）。

3.2 基于聚类分析的黄连炮制前后化学成分变化

通过 TOF-MS-Product Ion-IDA 扫描分析，将获取的 1544 个高分辨质谱全扫描数据进行 PLS-DA 的多元变量统计分析。基于 PLS-DA 方法建立姜黄连、酒黄连、萸黄连饮片、黄连生品之间的多元分类模型，模型评估参数[R^2_X=0.858、R^2_Y=0.985、Q^2=0.982]和 Score plot 图显示，4 种黄连饮片间化学成分存在明显差异（图 1）。基于 PLS-DA 分析结果，以 VIP 值大于 1 为判断指标，获取姜黄连、酒黄连、萸黄连饮片与黄连生品之间差异成分。

将差异成分进一步采用已建立的黄连生物碱类成分数据库进行比对分析，发现药根碱、盐酸黄连碱、小檗碱、去氢紫堇碱等多种黄连生物碱为差异性指标成分，表明不同炮制方法均对黄连中的化学成分存在一定影响，尤其是生物碱类成分。

3.3 6 种黄连生物碱类成分定量测定方法学考察

建立 6 种黄连生物碱类成分含量测定方法，结果显示系统适用性良好。取定量用对照品溶液，建

表 1 黄连生物碱成分 HR-MS-Database 数据库

Table 1 HR-MS-Database of alkaloid constituent in *C. chinensis*

序号	中文名称	英文名称	分子式	精确相对分子质量	CAS 号	离子模式	*m/z*
HL01	紫堇定	corydine	$C_{20}H_{23}NO_4$	341.162 7	476-69-7	＋H	342.170 0
HL02	异黄连碱#	isocoptisine	$C_{21}H_{17}NO_6$	379.105 6	30426-66-5	＋H	380.112 9
HL03	药根碱#	jatrorrhizine	$C_{20}H_{20}NO_4$	338.139 2	3621-38-3	＋H	339.146 5
HL04	氧化血根碱	oxysanguinarine	$C_{20}H_{13}NO_5$	347.079 4	548-30-1	＋H	348.086 7
HL05	黄连碱#	coptisine	$C_{19}H_{14}NO_4$	320.092 3	3486-66-6	＋H	321.099 6
HL06	盐酸黄连碱#	coptisine chloride	$C_{19}H_{14}ClNO_4$	355.061 1	6020-18-4	＋H	356.068 4
HL07	硫酸黄连碱#	coptisine sulfate	$C_{19}H_{15}NO_8S$	417.051 8	1198398-71-8	＋H	418.059 1
HL08	血根碱	sanguinarine	$C_{20}H_{14}NO_4^+$	332.092 3	2447-54-3	＋H	332.092 3
HL09	小檗亭	berberastine	$C_{20}H_{18}NO_5$	352.118 5	2435-73-6	＋H	353.125 8
HL10	小檗碱#	berberine	$C_{20}H_{18}NO_4$	336.123 6	2086-83-1	＋H	337.130 9
HL11	小檗红碱	berberrubine	$C_{19}H_{15}NO_4$	321.100 1	15401-69-1	＋H	322.107 4
HL12	小檗胺	berberamine	$C_{37}H_{40}N_2O_6$	608.288 6	478-61-5	＋H	609.295 9
HL13	唐松草定碱	thalifendine	$C_{19}H_{15}NO_4$	321.100 1	18207-71-1	＋H	322.107 4
HL14	四氢小檗碱	tetrahydroberberine	$C_{20}H_{21}O_4N$	339.147 1	522-97-4	＋H	340.154 3
HL15	四氢黄连碱#	tetrahydrocoptisine	$C_{19}H_{17}NO_4$	323.115 8	7461-02-1	＋H	324.123 0
HL16	去氢紫堇碱#	dehydrocorydaline	$C_{21}H_{18}NO_4$	348.123 6	83218-34-2	＋H	349.130 9
HL17	去甲血根碱	norsanguinarine	$C_{19}H_{11}NO_4$	317.068 8	522-30-5	＋H	318.076 1
HL18	木兰花碱	magnoflorine	$C_{20}H_{24}NO_4$	342.170 5	2141-09-5	＋H	343.177 8
HL19	降氧化北美黄连次碱#	noroxyhydrastineine	$C_{10}H_9NO_3$	191.058 2	21796-14-5	＋H	192.065 5
HL20	甲基小檗碱	worenine	$C_{21}H_{19}NO_4$	349.131 4	54260-72-9	＋H	350.138 7
HL21	甲基黄连碱#	methylcoptisine	$C_{20}H_{16}NO_4^+$	334.107 9	38763-29-0	＋H	334.107 9
HL22	格兰地新#	groenlandicine	$C_{19}H_{16}NO_4^+$	322.107 9	38691-95-1	＋H	322.107 9
HL23	非洲防己碱#	columbamine	$C_{20}H_{20}NO_4$	338.139 2	3621-36-1	＋H	339.146 5
HL24	表小檗碱#	epiberberine	$C_{20}H_{18}NO_4$	336.123 6	6873-09-2	＋H	337.130 9
HL25	北美黄连碱#	(-)beta-hydrastine	$C_{21}H_{21}NO_6$	383.136 9	118-08-1	＋H	384.144 2
HL26	巴马汀#	palmatine	$C_{21}H_{22}NO_4^+$	352.154 9	3486-67-7	＋H	352.154 9
HL27	thalifaurine	thalifaurine	$C_{19}H_{15}NO_4$	321.100 1	75491-95-1	＋H	322.107 4
HL28	8-氧化小檗碱	8-oxoberberine	$C_{20}H_{17}NO_5$	351.110 7	549-21-3	＋H	352.118 0
HL29	8-氧化黄连碱#	8-oxocoptisine	$C_{19}H_{13}NO_5$	335.079 4	19716-61-1	＋H	336.086 7
HL30	8-氧化表小檗碱	8-oxoepiberberine	$C_{20}H_{17}NO_5$	351.110 7	19716-60-0	＋H	352.118 0
HL31	6-丙酮基-5,6-二氢血根碱	6-acetonyl-5,6-dihydro-sanguinarine	$C_{23}H_{19}NO_5$	389.126 3	37687-34-6	＋H	390.133 6

#表示通过黄连生物碱类对照品比对确认

#identified by control substance

立标准曲线，结果见表 2，各测定成分线性关系良好。黄连碱、小檗碱、表小檗碱、巴马汀、非洲防己碱、药根碱 6 种黄连生物碱 6 次测定精密度 RSD 分别为 3.37%、0.90%、4.82%、2.86%、1.50%和 1.29%，表明检测精密度良好；黄连碱、小檗碱、表小檗碱、巴马汀、非洲防己碱、药根碱 6 种黄连生物碱 6 次测定重复性 RSD 分别为 2.96%、2.08%、0.80%、0.88%、1.39%和 4.91%，表明该方法重复性良好；取已测定的姜黄连样品 6 份测定黄连碱、小檗碱、表小檗碱、巴马汀、非洲防己碱、药根碱质量分数，6 种黄连生物碱平均加样回收率分别为 96.59 %、104.26%、102.50%、94.78%、89.47%和 95.82%，RSD 分别为 1.86%、1.33%、3.57%、1.67%、1.88%和 1.60%，表明本方法准确度良好。

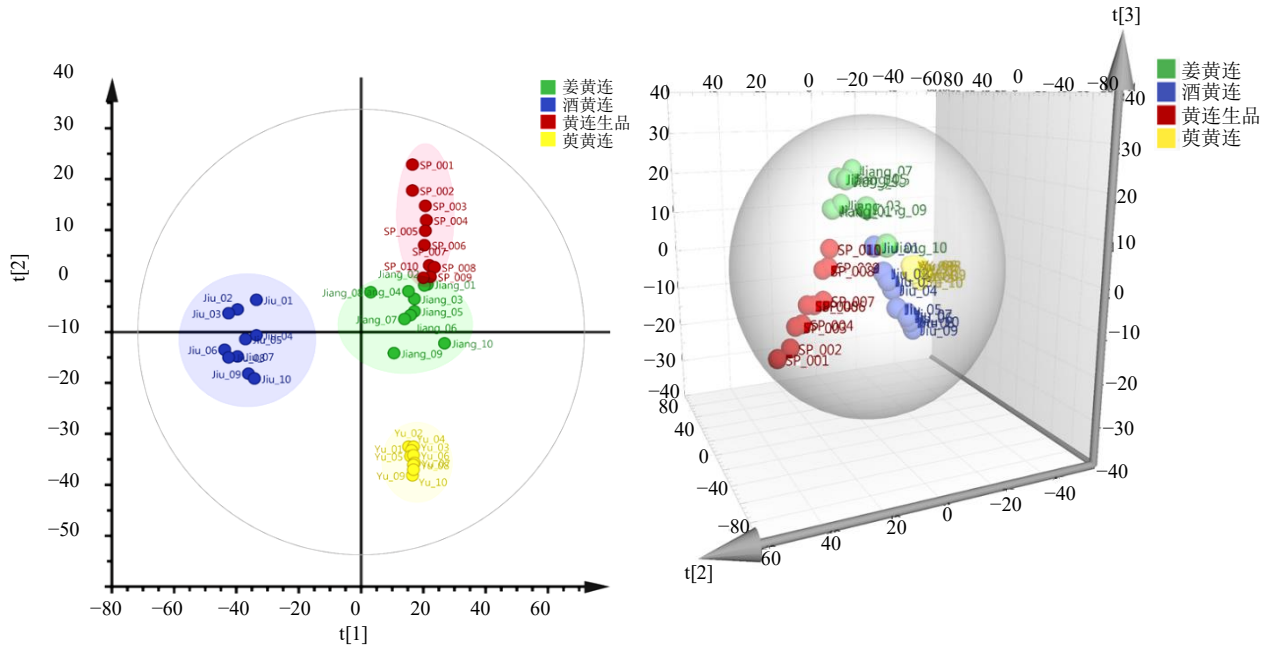


图 1 黄连炮制品高分辨质谱全扫描数据 PLS-DA 分析后的 Score plot 图

Fig. 1 Score plot chart of PLS-DA with HR-MS full scan for processed products of *C. chinensis*

表 2 黄连生物碱成分 MRM 定量分析

Table 2 MRM quantitative analysis of alkaloid constituents in *C. chinensis*

样品名称	称样量/mg	离子对	定量范围/(ng·mL^{-1})	标准曲线	r
黄连碱	10.29	*321.1/303.1	0.515～102.9	Y=6 985.32 X+337.12	0.999 6
小檗碱	11.14	*337.1/319.1	0.557～111.4	Y=2 516.11 X+106.47	0.999 8
表小檗碱	10.37	*337.1/281.1	0.514～103.7	Y=395.28 X+86.39	0.999 3
巴马汀	10.02	*352.2/308.1	0.501～100.2	Y=4 432.91 X+336.15	0.999 1
非洲防己碱	11.34	*339.2/323.1	0.567～113.4	Y=2 001.82 X+726.33	0.999 1
药根碱	10.66	*339.2/281.1	0.533～106.6	Y=98 255.34 X+496.58	0.999 6

*为定量离子对

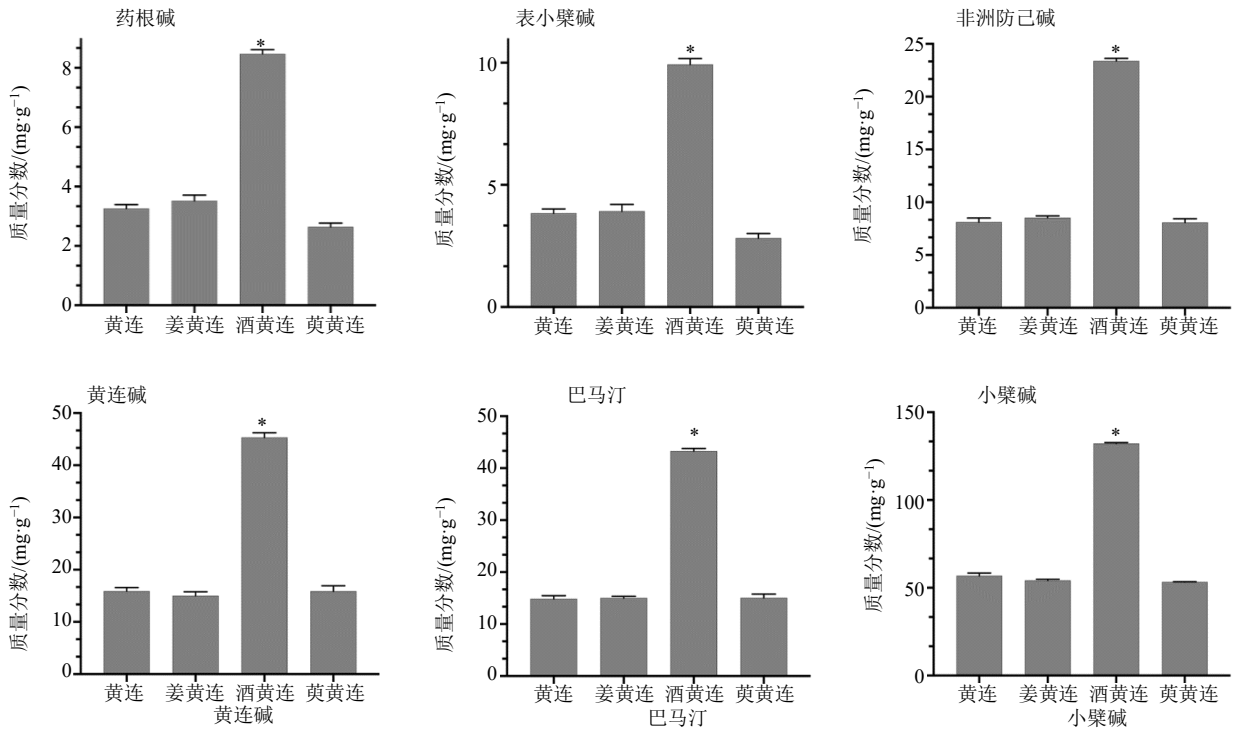
*quantitative ion pair

3.4 不同炮制方法的黄连饮片中 6 种生物碱含量变化

为进一步探讨黄连生品经不同炮制方法处理后的含量变化，本研究对黄连生品、姜黄连、酒黄连、萸黄连 4 种黄连饮片的 6 种生物碱（黄连碱、小檗碱、表小檗碱、巴马汀、非洲防己碱、药根碱）含量进行检测，结果显示（图 2），不同黄连炮制品中的生物碱含量具有一定差异，黄连经姜炙后，药根碱、表小檗碱、非洲防己碱含量略有上升，黄连碱、小檗碱含量略有下降，巴马汀含量未见改变；萸黄连中药根碱、表小檗碱、小檗碱含量下降，黄连碱、巴马汀及非洲防己碱含量未见变化；而酒黄连中所测定的 6 种生物碱含量均显著提高（P<0.05）。

4 讨论

黄连因苦寒性较甚，在临床上一般用其炮制品，但不同的炮制方法对黄连的关键活性成分造成了一定的影响。有学者采用高效液相色谱法分析了姜制黄连炮制前后药性、药效关系及有效成分含量，结果表示炮制前后黄连中生物碱含量及其物质群发生显著差异，导致姜黄连的药效和药性有所改变[21-23]。另外，有研究表明，黄连经吴茱萸炮制后，生物碱等苦寒之性的物质含量降低，而用黄酒、醋及胆汁炮制黄连后，炮制品的生物碱含量均比生黄连高[24-25]。生物碱作为黄连的主要活性成分，炮制工艺会影响其



*P<0.05

图 2　4 种黄连炮制品中的 6 种生物碱含量变化

Fig. 2　Determination results of six alkaloids in four types of processed products from *C. chinensis*

含量变化，加上黄连炮制品本身成分复杂，使得当前黄连及其制剂的质量控制方法无法做到全面的控制和反映黄连炮制品的质量。高分辨质谱技术因其快速、高灵敏度、高分辨率的特点，常作为当前天然产物的快速识别、筛查工具，以此为技术支撑构建具有高专属性的黄连生物碱类成分高分辨质谱数据库，必将为黄连炮制品质量的快速、准确鉴别提供有效的解决方法[26]。

同时，黄连中除小檗碱、巴马汀等主要生物碱类成分发挥着关键药用活性外，其他生物碱类成分的药理作用及其优势也正逐步得到体现，但黄连中其他生物碱类成分的检测分析技术还不够成熟，应用研究工作较少，无法真正利用和深度开发其新用途和新价值。本研究通过建立黄连生物碱类成分高分辨质谱数据库，有利于开展黄连生物碱类资源性化学成分的再认识，提高黄连资源产品价值和利用效益。

此外，本研究在黄连生物碱类成分高分辨质谱数据库基础上对酒黄连、萸黄连、姜黄连及黄连生品进行生物碱差异分析得知，4 种黄连制品中生物碱类成分差异明显，推测除所测定的药根碱、表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀及非洲防己碱 6 种生物碱有所不同外，其他生物碱类成分可能也是导致黄连炮制品差异的原因之一，建议对黄连中其他生物碱类成分进行更为深入的研究，以便获得黄连较全面的指标成分。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 316.

[2] 覃重真. 黄连炮制近年来研究概况 [J]. 时珍国医国药, 1998, 9(4): 343-344.

[3] Cok A, Plaisier C, Salie M J, *et al*. Berberine acutely activates the glucose transport activity of GLUT1 [J]. *Biochimie*, 2011, 93(7): 1187-1192.

[4] Park S M, Min B G, Jung J Y, *et al*. Combination of *Pelargonium sidoides* and *Coptis chinensis* root inhibits nuclear factor kappa B-mediated inflammatory response *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 20.

[5] 张瑞芬, 苏和. 黄连的药理研究进展 [J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(3): 114-117.

[6] 黄琨明, 杨志高, 刘爱云, 等. 中药饮片对多重抗生素耐药细菌的抑菌作用 [J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(13): 146-147.

[7] 蒙雨丹, 吴诗惠, 龚晓丽, 等. 衰老病理机制与川产道

地药材黄连的抗衰老效应研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(2): 208-213.

[8] Li Z F, Wang Q, Chen G, *et al*. A new pyrrolidine derivative from the rhizome of *Coptis chinensis* [J]. *Chem Nat Compd*, 2013, 49(3): 493-494.

[9] Teng H, Choi Y H. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of bioactive alkaloid compounds from *Rhizoma Coptidis* (*Coptis chinensis* Franch.) using response surface methodology [J]. *Food Chem*, 2014, 142: 299-305.

[10] 盖晓红, 刘素香, 任涛, 等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4919-4927.

[11] 郭颖媛, 冯强, 杨运霞, 等. 黄连素对感染幽门螺杆菌小鼠胃黏膜上皮细胞损伤的影响 [J]. 世界中医药, 2021, 16(18): 2702-2705.

[12] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 2405.

[13] 兰进, 杨世林, 郑玉权, 等. 黄连的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(12): 1139-1141.

[14] 张琪悦. 黄连炮制工艺探讨 [J]. 健康前沿, 2016, 23(2): 121.

[15] 赖先荣, 周邦华, 杜明胜, 等. 6 种黄连饮片中 6 种生物碱的 RP-HPLC 含量测定及与“治消渴”药效学的谱-效关系分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4579-4586.

[16] 闫丽丽. 不同炮制方法对黄连有效成分的影响研究 [J]. 农业科技与装备, 2020(1): 58-59.

[17] 王德珍, 易骏, 张翼, 等. 酒黄连、姜黄连、萸黄连最佳炮制工艺研究 [J]. 中药材, 2013, 36(1): 35-37.

[18] 卿大双, 罗维早, 孙建彬, 等. 一测多评法测定黄连及其炮制品中 6 种生物碱 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 324-329.

[19] 杨冰, 宁汝曦, 秦昆明, 等. 中药材产地加工与炮制一体化技术探讨 [J]. 世界中医药, 2020, 15(15): 2205-2209.

[20] 张平, 董澈, 苏畅, 等. RP-HPLC 法测定黄连上清胶囊中 6 个生物碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 513-519.

[21] 钟凌云, 王婷婷, 徐婷. “谱-效-性”关联分析探讨不同姜汁炮制黄连的作用差异 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20): 7-13.

[22] 贠亚波, 臧琛, 郭凤倩, 等. 辅料姜汁对黄连生物碱成分的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(5): 69-72.

[23] 王鑫, 袁金凤, 彭诗涛, 等. 多种统计方法比较黄连姜制工序中影响生物碱含量的因素 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(2): 265-271.

[24] 颜冬梅, 李娜, 方建和. 吴茱萸汁制对黄连中四种生物碱含量的影响 [J]. 江西中医药, 2016, 47(1): 60-62.

[25] 白而力. 不同辅料炮制对黄连生物碱类成分含量的影响 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(13): 38-39.

[26] 刘文欣, 冯芳. 基于高分辨质谱的中药体内代谢物鉴别策略 [J]. 广州化工, 2020, 48(6): 53-55.

[责任编辑 王文倩]