

苦参不同组织中生物碱类成分的 LC-MS 分析

张晓雪¹, 杜宇¹, 张泽坤¹, 王雯静¹, 张蓓蓓¹, 张明亮¹, 海丽娜², 王阳¹, 葛祥宇¹, 史社坡^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029

2. 北京振东光明药物研究院有限公司, 北京 100085

摘要: 目的 通过对苦参 *Sophora flavescens* 不同组织样品中生物碱类成分的 LC-MS 分析, 探讨苦参中生物碱类成分的质谱裂解规律及其在不同样品中的异同。方法 首先利用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 对 5 年生苦参根中的生物碱类成分进行全面的鉴定分析。再利用 UPLC-QQQ-MS/MS 技术, 对苦参无菌幼苗不同组织部位(根、茎、叶)、苦参愈伤组织中的生物碱类成分进行定量分析, 比较各样品中生物碱类成分的异同。结果 从 5 年生苦参根中共鉴定出 47 个生物碱类成分; 利用 UPLC-QQQ-MS/MS 对其中 17 个主要的生物碱类成分进行了定量分析, 发现不同苦参样品中生物碱类成分差异明显, 其中苦参无菌幼苗各组织部位中生物碱的含量相对较高。结论 建立了一种苦参生物碱类成分快速定性定量分析方法, 从 5 年生苦参根中快速鉴定出 47 种生物碱; 通过对苦参不同组织样品中 17 个生物碱类成分的定量分析, 为后续利用比较转录组测序技术, 挖掘并鉴定苦参中生物碱类成分生物合成关键酶的研究奠定基础。

关键词: 苦参; 生物碱; 定性定量分析; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS; UPLC-QQQ-MS/MS

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)08-2388-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.005

LC-MS analysis of quinolizidine alkaloids in different tissues of *Sophora flavescens*

ZHANG Xiao-xue¹, DU Yu¹, ZHANG Ze-kun¹, WANG Wen-jing¹, ZHANG Bei-bei¹, ZHANG Ming-liang¹, HAI Li-na², WANG Yang¹, GE Xiang-yu¹, SHI She-po¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Beijing Zhendong Guangming Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Beijing 100085, China

Abstract: Objective To explore the mass spectrometric cleavage patterns of the alkaloids in *Sophora flavescens* and their variation in different *S. flavescens* samples, including aseptic seedlings (roots, leaves, and stems) and callus, by LC-MS analysis, so as to provide the basis for the identification of the key enzymes involved in the biosynthetic pathway of *S. flavescens* alkaloids using comparative transcriptome sequencing approach. **Methods** UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS was used to comprehensively identify the alkaloids in the roots of 5-year-old *S. flavescens*. UPLC-QQQ-MS/MS was used to quantify the alkaloids in different tissues (roots, stems, leaves) of *S. flavescens* aseptic seedling and callus. **Results** A total of 47 alkaloids components were identified from the roots of 5-year-old *S. flavescens*, and 17 of them were quantified by UPLC-QQQ-MS/MS. The results revealed that the alkaloids in different *S. flavescens* samples were significantly different, and the content of alkaloids in tissues of *S. flavescens* aseptic seedling was relatively high. **Conclusion** In this study, a rapid qualitative and quantitative method for the alkaloids in *S. flavescens* was developed, resulting in the identification of 47 alkaloids from *S. flavescens* roots, and 17 alkaloids in different *S. flavescens* tissue samples were quantified, which are helpful to the subsequent mining and identification of key enzymes involved in the biosynthesis of alkaloids in *S. flavescens* by using comparative transcriptome sequencing technology.

Key words: *Sophora flavescens* Ait.; quinolizidine alkaloids; qualitative and quantitative analysis; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS; UPLC-QQQ-MS/MS

收稿日期: 2022-10-28

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (7192112)

作者简介: 张晓雪 (1996—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药活性成分发现及生物合成。E-mail: zhangxx19962021@163.com

*通信作者: 史社坡 (1976—), 男, 研究员, 研究方向为中药活性成分发现及生物合成。E-mail: shishepo@163.com

苦参为豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 具有清热燥湿、杀虫、利尿之功效^[1]。现代研究发现, 苦参的主要药理作用有抗心律失常、抗心肌纤维化、抗肿瘤、抗炎、抗病原微生物、抗肝损伤以及调节免疫系统和神经系统等^[2-4]。此外, 苦参还广泛应用于消毒洗涤产品、农药和兽药等^[5]。化学成分研究表明, 苦参中含有生物碱、黄酮、苯丙素、萜类等, 其中生物碱类成分被认为是苦参中主要的活性物质, 具有抗肝损伤、抗肝纤维化、抗肿瘤、保护心血管系统等药理作用^[6-7]。目前, 已从苦参中分离出约 60 个苦参生物碱, 根据其结构类型, 主要为苦参碱型(四环)、金雀花碱型(四环或三环)以及苦参碱二聚体等^[8]。由于苦参中生物碱很多结构的紫外吸收弱, 因而分析检测具有一定的困难, 虽然目前有相关文献报道利用液相色谱-质谱联用技术对苦参中的生物碱类成分进行分析鉴定, 如利用 UPLC-Q-Exactive MS 方法从苦参药材中鉴定出 16 个生物碱^[9], 该报道为目前从苦参中同时检出生物碱最多的文献, 但与苦参中所含结构丰富的生物碱相比, 利用该方法鉴定出的生物碱数目相对较少, 苦参中仍然还有相当数目的生物碱类成分没有被有效的检测并鉴定。因此, 建立一个能够相对全面地反映苦参中生物碱类成分组成的方法非常必要。

另一方面, 随着生物技术和基因测序技术的快速发展, 在阐明生物合成机制的基础上利用合成生物学策略开展药用植物中重要的活性成分的合成生物学研究备受关注, 对于实现中药资源的可持续开发利用和创新药物研发具有非常重要的意义^[10-16]。苦参中的生物碱类成分如苦参碱、氧化苦参碱、金雀花碱等均具有独特的结构母核和生物活性, 但其生物合成途径和相关催化酶的报道却非常有限^[17-18]。因此, 利用 LC-MS 对不同苦参样品中的生物碱类成分进行较全面的定性定量分析, 探讨苦参中生物碱类成分在不同苦参样品中的分布及含量差异, 将为后续利用转录组测序技术对苦参中参与生物碱类成分生物合成相关基因的挖掘和鉴定奠定基础, 为苦参生物碱的合成生物学研究、苦参的定向育种研究等提供参考。

鉴于上述背景, 本研究将基于质谱裂解规律及特征离子的非靶向质谱筛查策略对苦参中的生物碱类成分进行全面的定性定量分析。利用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 技术从 5 年生苦参根中鉴定出 47 种生物碱, 是迄今为止从苦参中同时检出生物碱类成分最多的报道; 同时利用 UPLC-QQQ-MS 技术

对苦参无菌幼苗不同组织部位(根、茎、叶)、苦参愈伤组织中的 17 个生物碱类成分进行定量分析, 明确其在各样品中的含量差异。本研究结果不仅为利用 LC-MS 技术快速、较全面的分析苦参药材中的生物碱类成分提供重要参考, 同时为后续利用比较转录组测序技术挖掘苦参生物碱生物合成关键酶奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Q-Exactive-Orbitrap 四级杆串联静电场轨道阱高分辨质谱仪配置电喷雾离子源和 Vanquish Horizon UPLC 超高效液相色谱系统(Thermo Scientific, 美国); Agilent 6460 Triple Quad 质谱仪配置电喷雾离子源和 Agilent 1290 高效液相色谱系统(Agilent, 美国); RXZ 型智能人工气候箱(宁波江南仪器厂); XS105 型十万分之一电子分析天平(Mettler Toledo, 瑞士); Talpha2-4 LD plus 冷冻干燥机(Chris, 德国); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); R-210 型旋转蒸发器(北京赛美思仪器设备有限公司); 800Y 型多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司); YT-CJ-2N 型超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司)。

1.2 材料

苦参碱(批号 T22M10F88874, 分子式 $C_{15}H_{24}N_2O$)、氧化苦参碱(批号 G14N11L130769, 分子式 $C_{15}H_{24}N_2O_2$)、槐定碱(批号 F18F7S9784, 分子式 $C_{15}H_{24}N_2O$)、槐果碱(批号 M15GB141286, 分子式 $C_{15}H_{22}N_2O$)、氧化槐果碱(批号 P22J10S91312, 分子式 $C_{15}H_{22}N_2O_2$)、N-甲基金雀花碱(批号 RJ0110FA14, 分子式 $C_{12}H_{16}N_2O$)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$; 甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵为色谱纯; 水为 Milli-Q 超纯水; 其余试剂均为分析纯。

苦参植株采自江西赣州文山苦参种植基地, 为 5 年生植株, 经北京中医药大学史社坡研究员鉴定为豆科植物苦参 *S. flavescens* Ait.。苦参种子采自山西省长治市武乡县, 由北京振东光明药物研究院有限公司提供。

2 方法

2.1 苦参无菌幼苗培养

苦参种子 50 °C 烫种 12 h 后, 用水洗净, 吸干水分。在超净工作台中依次进行以下灭菌操作: 75% 乙醇浸泡 30 s; 灭菌双蒸水冲洗 3 次; 2.5% 次氯酸钠浸泡 15 min; 灭菌双蒸水冲洗 3 次。灭菌后的苦

参种子转入 MS 培养基, 于人工气候箱中 25 ℃, 40%光照, 50%湿度, 16 h 光照, 8 h 黑暗培养。待种子发芽后继续培养 14 d。

2.2 苦参愈伤组织培养

从 5 年生苦参植株中挑选鲜嫩的叶片, 洗净后, 吸干水分。在超净工作台中依次进行以下灭菌操作: 75%乙醇浸泡 30 s; 灭菌双蒸水冲洗 3 次; 2.5%次氯酸钠浸泡 15 min; 灭菌双蒸水冲洗 3 次。灭菌后的苦参叶切成约 0.5 cm×0.5 cm 的小片备用。将切成小片的叶片接种于 MS 培养基 (2 mg/L 2,4-D、1 mg/L 6-BA)。接种后在室温下暗培养 28 d 后观察愈伤组织生成情况, 将成功诱导的愈伤组织继代培养, 后续每 28 天继代 1 次。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 分别精密称取苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱、氧化槐果碱、*N*-甲基金雀花碱对照品适量于 5 mL 具塞量瓶中, 加甲醇溶解定容, 摇匀, 即得苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱、氧化槐果碱、*N*-甲基金雀花碱浓度为 10 mmol/L 的标准品储备液, -20 ℃冷藏备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 将苦参根洗净、干燥、粉碎过筛 (100 目) 后, 称取 0.3 g 于 50 mL 锥形瓶中, 加入 100%甲醇 10 mL, 超声提取 30 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀药渣再依次使用 50%甲醇 (2%甲酸水)、2%甲酸水, 按上述流程各提取 1 次, 合并 3 次上清液, 以 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 37 ℃水浴旋干, 甲醇复溶至终质量浓度为 0.01 g/mL (以药材干质量计), 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 即得苦参根样品。平行制备 3 份样品, -20 ℃冷藏备用。

依次取“2.1”项下培养 7 d 的苦参无菌幼苗根、茎叶 (幼苗早期, 茎叶分化不是非常明显, 故没有将茎、叶分开), 14 d 的苦参无菌幼苗根、茎、叶, 冷冻干燥后, 精密称取, 按照苦参根生物碱提取方法提取生物碱, 甲醇复溶, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得各苦参无菌幼苗供试品溶液。平行制备 3 份样品, -20 ℃冷藏备用。

取“2.2”项下的苦参愈伤组织, 冷冻干燥后, 精密称取, 按照苦参根生物碱提取方法提取生物碱, 甲醇复溶, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得苦参愈伤组织样品。平行制备 3 份样品, -20 ℃冷藏备用。在苦参无菌幼苗各组织样品和苦参愈伤中加入内标 (1 mmol/L 石杉碱丙), 利用 UPLC-QQQ-MS/MS 技术使用内标法对苦参生物碱进行定量分析。

2.4 色谱及质谱条件

2.4.1 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 分析 色谱条件: 采用 Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱 (Waters, 美国); 流动相为 5 mmol/L 乙酸铵 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~3 min, 3% B; 3~8 min, 3%~20% B; 8~23 min, 20%~45% B; 23~33 min, 45%~65% B; 33~35 min, 65%~100% B; 35~40 min, 100% B; 40~45 min, 3% B); 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 ℃, 进样量 2 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源正负离子检测模式; 鞘气流速 35.0 L/min; 鞘气温度 350 ℃; 离子源温度 350 ℃; 离子源电压 3.5 kV; 饱和辅助气体积流量 15 L/min; 裂解电压 300 V; 雾化气为氮气; 质谱数据采集范围 m/z 100~1100。

2.4.2 UPLC-QQQ-MS/MS 分析 色谱条件: 采用 Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱 (Waters, 美国); 流动相为 5 mmol/L 乙酸铵 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~3 min, 3% B; 3~8 min, 3%~20% B; 8~23 min, 20%~45% B; 23~25 min, 45%~100% B; 25~27 min, 100% B; 27~30 min, 3% B); 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温为 40 ℃, 扫描波长为 190~800 nm, 进样量为 2 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源正离子检测模式 (ESI⁺); 鞘气体积流量 11.0 L/min; 鞘气温度 250 ℃; 毛细管电压 3.5 kV; 雾化气压力 0.31 MPa; 干燥气体积流量 5.0 L/min; 干燥气温度 300 ℃; 扫描方式为多反应离子检测 (MRM); 毛细管出口电压 120 V; 碰撞能量 20 V; 碰撞池加速电压 3 V; 质谱数据采集范围 m/z 100~1100。

3 结果

3.1 苦参根中苦参生物碱类化合物定性分析

苦参根中分离到的生物碱为喹诺里西啶类生物碱, 按其骨架类型主要有苦参碱型如苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱等; 金雀花碱型如金雀花碱、*N*-甲基金雀花碱、臭豆碱、羽扇豆碱等。化合物结构母核不同, 质谱中的裂解途径及形成的碎片有一定的差别。根据 6 个标准品的质谱数据 (图 1) 结合样品中各生物碱的质谱碎片 (表 1) 对苦参生物碱类成分的质谱裂解规律进行总结。

苦参碱型生物碱质谱裂解规律: 根据苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱、氧化槐果碱标准品的质谱数据 (图 1), 苦参碱型生物碱在正离子模式下易生成 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 一级质谱中多

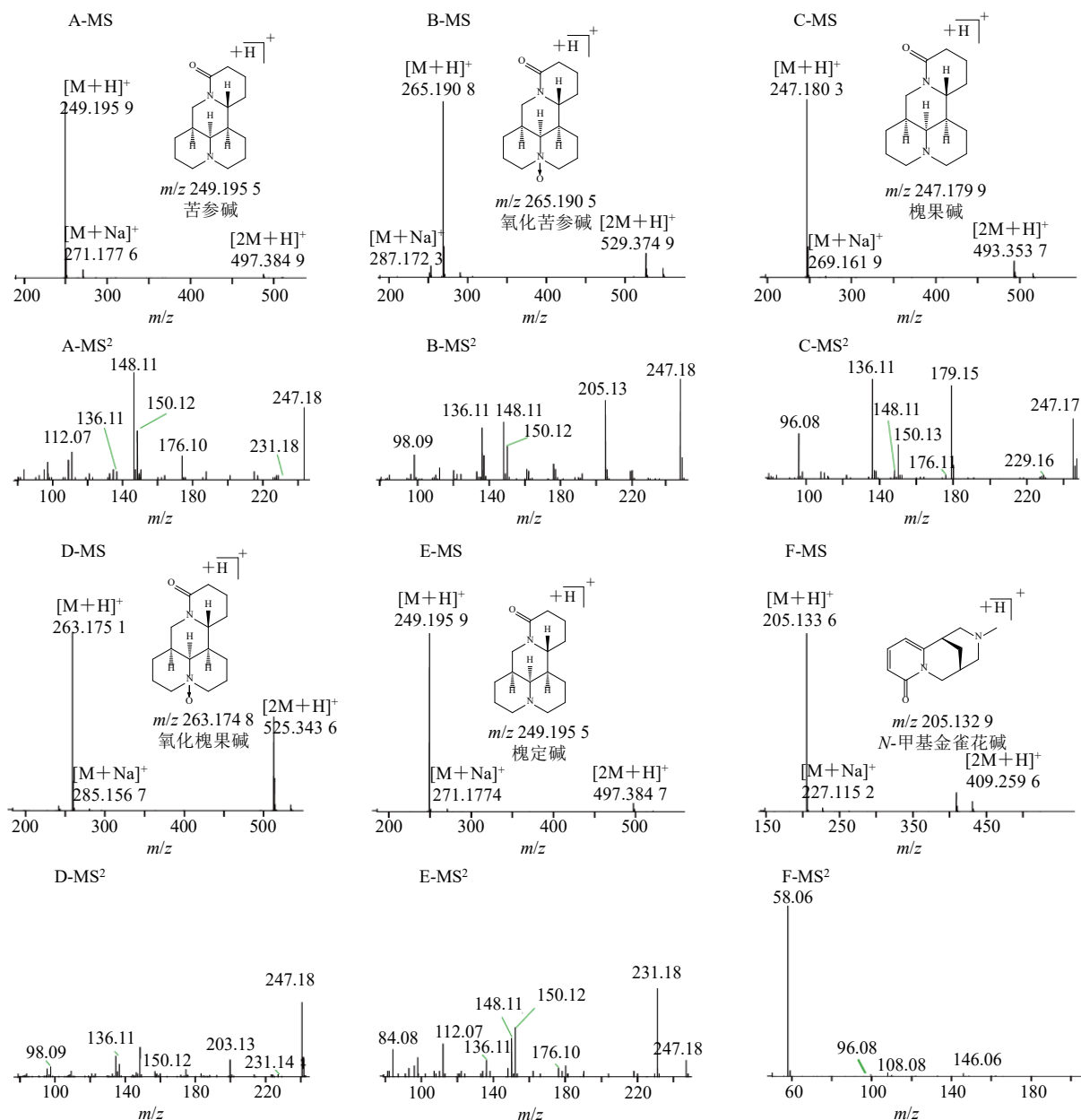


图 1 6 个苦参生物碱对照品质谱图

Fig. 1 Mass spectra of six authentic alkaloids from *S. flavescens*

伴随有 $[2M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰。易形成分子内氢键及发生 C 环断裂形成 m/z 247.18 $[M+H-2H]^+$ 、 m/z 148.11 $[M+H-C_5H_{11}NO]^+$ 、 m/z 150.12 $[M+H-C_5H_9NO]^+$ 、 m/z 231.18 $[M+H-2H-H_2O]^+$ 、 m/z 112.07 $[M+H-C_8H_{15}NO]^+$ 、 m/z 136.11 $[M+H-C_6H_9NO]^+$ 、 m/z 176.10 $[M+H-C_3H_7NO]^+$ 等特征碎片离子峰 (图 2-A)。其他苦参碱型生物碱从结构上看主要是在苦参碱的基础上, 进一步发生氧化脱氢、羟基化等简单修饰, 根据此特点再将其相对分子质量与苦参碱相对分子质量进行对比, 结合质谱裂解

规律, 对于指定质谱峰是否为苦参碱型生物碱具有一定的参考意义。例如苦参碱氮氧化物氧化苦参碱 (图 1-B、2-B) 和氧化槐果碱 (图 1-D) 的一级质谱中出现较高丰度的二倍体加和离子 $[2M+H]^+$, 易脱水形成分子内氢键, 出现特征离子峰 m/z 247.18 或 245.18 $[M+H-H_2O]^+$, 随后 D 环断裂, 形成 m/z 205.13 或 203.13, 相对分子质量的不同是由于 D 环双键的存在, 据此也可以依据特征碎片判断结构母核上的取代情况。

金雀花碱型生物碱质谱裂解规律: 金雀花碱型

表 1 苦参根中生物碱的 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 分析
Table 1 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS analysis of alkaloids in *S. flavescens* root

峰号	<i>t_R</i> /min	分子式	分子离子峰 (<i>m/z</i>)		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS ² (按丰度大小排列)	鉴定
			理论值	实测值			
1	3.49	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	281.185 9	281.185 8	-0.39	281.18, 98.09, 263.17, 148.11, 136.11, 150.12, 279.17	二羟基羽扇豆碱异构体 ^[19]
2	4.46	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	281.185 9	281.185 9	-0.07	281.18, 98.09, 263.17, 148.11, 136.11, 84.08, 150.12	二羟基羽扇豆碱异构体 ^[19]
3	6.46	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂	221.127 8	221.128 7	3.75	221.12, 162.09, 132.12, 131.12, 132.62, 84.08	氧化 <i>N</i> -甲基金雀花碱异构体 ^[19]
4	6.86	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	265.190 5	265.190 9	1.56	265.19, 98.09, 247.18, 148.11, 84.08	羟基羽扇豆碱异构体 ^[19]
5	7.63	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	279.170 3	279.170 2	-0.39	279.17, 172.07, 160.07, 261.15, 231.14, 243.14, 96.08	羟基氧化槐果碱异构体 ^[20]
6	7.80	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	261.159 7	261.159 7	0.04	261.15, 216.13, 98.09, 243.14, 189.05, 131.04, 148.11	脲酰叶碱异构体 ^[20]
7	8.12	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	281.185 9	281.185 8	-0.39	281.18, 205.13, 263.17, 164.10, 152.10, 245.16, 148.11	二羟基氧化苦参碱异构体 ^[21]
8	8.31	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	249.195 5	249.196 1	2.36	249.19, 98.09, 231.18, 96.08, 247.18, 136.11	羽扇豆碱异构体 ^[20]
9	8.34	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O	209.164 2	209.165 0	3.44	150.12, 136.11, 172.07, 98.09	kushenine isomer ^[21]
10	8.58	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	265.190 5	265.191 0	1.90	265.19, 110.09, 98.09, 96.08, 164.10, 247.18, 84.08	氧化苦参碱异构体 ^[20]
11	8.58	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	261.159 7	261.159 7	0.15	98.09, 261.15, 150.12, 177.13, 148.11, 243.14	脲酰叶碱异构体 ^[20]
12	8.77	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	281.185 9	281.185 8	-0.28	281.18, 263.17, 245.16, 148.11, 112.07, 136.11, 247.18	氧化槐醇异构体 ^[20]
13	8.99	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	279.170 3	279.170 2	-0.18	279.17, 261.15, 203.11, 166.12, 152.10, 96.08, 148.07	羟基氧化槐果碱异构体 ^[20]
14	9.06	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	261.159 7	261.159 6	-0.31	261.15, 243.14, 136.11, 215.11, 148.11, 150.12, 122.09	羟基氧化槐胺碱异构体 ^[20]
15	9.22	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	245.164 8	245.164 8	-0.08	245.16, 189.05, 175.12, 131.04, 148.11, 84.08	槐胺碱异构体 ^[23]
16 ^a	9.28	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	249.195 5	249.196 1	2.36	249.19, 136.11, 114.09, 98.09, 247.18, 148.11, 231.18	槐定碱
17	9.54	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	281.185 9	281.185 9	0.04	281.18, 166.12, 263.17, 98.06, 112.07, 148.11, 245.16, 162.09, 146.09, 221.12, 136.11	二羟基羽扇豆碱异构体 ^[19]
18	10.09	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	249.195 5	249.196 3	2.92	98.09, 249.19, 231.18, 148.11, 136.11, 96.08, 150.09	羽扇豆碱异构体 ^[20]
19	10.12	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	247.179 9	247.180 4	2.14	247.18, 148.11, 176.10, 150.12, 98.06, 112.07, 98.09	槐果碱异构体 ^[20,22]
20	10.38	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O	209.164 2	209.165 1	4.25	133.10, 91.05, 105.07, 150.12, 122.09, 192.13, 84.08	flavascensine isomer ^[20]
21 ^a	10.67	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	265.190 5	265.190 9	1.79	265.19, 247.18, 205.13, 148.11, 136.11, 150.12	氧化苦参碱
22	10.74	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	247.179 9	247.180 5	2.50	247.18, 148.11, 150.12, 176.10, 136.11, 112.17	槐果碱异构体 ^[20,22]
23 ^a	10.86	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	263.174 8	263.175 3	1.99	263.17, 245.16, 136.11, 150.12, 203.11, 138.12, 98.09, 177.13	氧化槐果碱
24	10.86	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	245.164 8	245.164 8	0.16	245.16, 177.13, 150.12, 110.05, 96.04, 148.11, 122.09	槐胺碱异构体 ^[23]
25	11.24	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	249.195 5	249.196 1	2.32	249.19, 98.09, 136.11, 84.08, 166.12, 96.08, 231.18, 148.11	羽扇豆碱异构体 ^[20]
26 ^a	12.50	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	205.132 9	205.133 8	4.19	205.13, 58.06, 175.08, 108.08	<i>N</i> -甲基金雀花碱
27	12.63	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	263.174 8	263.175 3	1.76	263.17, 231.14, 98.09, 261.15, 122.06, 84.08, 96.08, 245.16	黄叶槐碱异构体 ^[20]
28	12.76	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	261.159 7	261.159 6	-0.42	261.15, 243.14, 215.15, 187.12, 188.13, 131.04, 96.08, 114.09	羟基氧化槐胺碱异构体 ^[20]
29	13.08	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	247.179 9	247.180 5	2.50	98.09, 247.18, 148.11, 112.07, 150.12, 136.11, 176.10	去氢羽扇豆碱异构体 ^[21]

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	分子离子峰 (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	MS ² (按丰度大小排列)	鉴定
			理论值	实测值			
30	13.57	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	281.185 9	281.185 8	-0.28	281.18, 150.12, 148.11, 263.17, 217.16, 98.09, 86.06	二羟基氧化苦参碱异构体 ^[21]
31	13.70	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	265.190 5	265.191 0	2.01	265.19, 219.18, 148.11, 150.12, 247.18, 136.11, 84.08, 205.13	羟基羽扇豆碱异构体 ^[21]
32	13.79	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	247.179 9	247.180 5	2.54	148.11, 247.18, 176.10, 150.12, 98.06, 136.11, 175.03	槐果碱异构体 ^[20,22]
33	13.95	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	261.159 7	261.159 7	-0.08	261.15, 148.07, 132.04, 243.14, 96.08, 189.10, 160.07	羟基氧化槐胺碱异构体 ^[20]
34	14.66	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	265.190 5	265.191 0	2.01	265.19, 164.10, 263.17, 112.07, 245.16, 96.08, 148.11	氧化苦参碱异构体 ^[20]
35	15.37	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	261.159 7	261.159 7	0.04	261.15, 243.14, 96.08, 193.13, 177.10, 148.07, 150.09	羟基氧化槐胺碱异构体 ^[20]
36	15.98	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	245.164 8	245.164 9	0.41	98.09, 245.16, 99.09, 70.06, 148.11, 96.08, 150.12	臭豆碱异构体 ^[20]
37	16.53	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	263.174 8	263.175 3	1.76	263.17, 195.14, 152.10, 261.15, 96.08, 166.12, 134.09	羟基槐果碱异构体 ^[20]
38 ^a	16.59	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	249.195 5	249.196 0	1.76	249.19, 148.11, 247.18, 150.12, 112.07, 176.10, 98.06	苦参碱
39	16.79	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O	243.149 1	243.149 1	0.04	243.14, 186.09, 70.06, 187.09	去氢槐胺碱异构体 ^[21]
40	17.33	C ₁₅ H ₂₆ N ₂	235.216 8	235.216 9	0.26	235.21, 98.09, 233.20, 134.09, 70.06, 229.96, 86.31	金雀花碱异构体 ^[19]
41 ^a	17.58	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	247.179 9	247.180 5	2.30	247.18, 179.15, 136.11, 245.16, 96.08, 150.12, 148.11	槐果碱
42	17.64	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	265.190 5	265.190 9	1.79	265.19, 150.12, 148.11, 247.18, 112.07, 98.06, 176.10	氧化苦参碱异构体 ^[20]
43	18.15	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	261.159 7	261.159 7	-0.08	261.15, 96.08, 243.14, 84.08, 148.11, 215.11, 189.05	脛酸叶碱异构体 ^[20]
44	19.36	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	245.164 8	245.164 7	-0.29	245.16, 98.09, 122.06, 148.07, 150.12, 227.15, 228.13	槐胺碱异构体 ^[23]
45	19.42	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	247.179 9	247.180 6	2.74	247.18, 245.16, 179.15, 136.11, 98.09, 150.12, 148.11	槐果碱异构体 ^[20,22]
46	27.52	C ₁₂ H ₁₀ N ₂	183.091 6	183.092 0	1.97	183.09, 115.05, 142.06, 168.06,	harman isomer ^[23]
47	27.87	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	245.164 8	245.164 8	-0.08	98.09, 245.16, 70.06, 203.11, 58.06	槐胺碱异构体 ^[23]

^a 表示化合物与对照品比对确认^a means the compound is confirmed by comparison with the standard

生物碱多呈线型排列的三环或四环化合物。根据 *N*-甲基金雀花碱对照品的质谱数据 (图 1-F), 金雀花碱型生物碱在正离子模式下易生成 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 一级质谱中多伴随有 $[2M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰。*N*-甲基金雀花碱为 D 环开环的金雀花碱型生物碱, 其由于 *N* 上的甲基, 出现特征碎片离子 m/z 58.06 (强峰), C 环裂解的同时生成 m/z 146.06 的特征碎片离子峰; B 环裂解生成 m/z 96.08 的特征碎片离子峰, 其质谱裂解途径见图 2-C。据此可推断四环金雀花碱也易发生 B 环或 C 环的裂解, B 环发生裂解, 生成含有 A、B 环或 A 环的离子 m/z 136.11 和 m/z 98.09。

依“2.3.2”项下方法制备苦参根供试品溶液, 以“2.4.1”项下色谱质谱条件进样分析, 得到苦参根提取液正离子模式下的总离子流图, 见图 3。样品经 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 进行一级及二

级质谱数据采集, 获得提取液中各色谱峰的保留时间、准分子离子峰及 MS/MS 碎片离子的精确相对分子质量; 利用 Thermo Xcalibur 3.0 对各峰对应的精确相对分子质量进行分析, 预测准分子离子峰, 根据苦参生物碱类化合物二级质谱的特征碎片离子、丢失基团、质谱裂解规律, 对化合物进行鉴定, 从苦参根甲醇提取物中共鉴定出 47 个生物碱类化合物, 其中包括 25 个苦参碱型生物碱、17 个金雀花碱型生物碱, 以及 5 个其他类型生物碱, 结果见表 1。通过与对照品比对, 峰 16、21、23、26、38、41 依次鉴定为槐定碱、氧化苦参碱、氧化槐果碱、*N*-甲基金雀花碱、苦参碱、槐果碱。

峰 5、7、10、12~16、19~24、28、30、32~35、37~39、41、42、44、45 在正离子模式下均生成 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 误差在 $\pm 5.0 \times 10^{-6}$ 内; 一级质谱中有较强的二聚体加和离子、钠加和

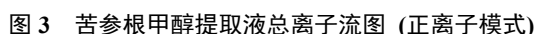
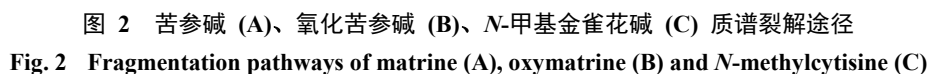


Fig. 3 Total ion chromatography of methanol extract of *S. flavescens* root (positive ion mode)

位置；羟基化苦参碱易生成脱水峰，可根据碎片峰的强度判断羟基取代的相对位置及个数。根据以上质谱裂解特征，初步推断以上化合物均为苦参碱型生物碱，各化合物的质谱数据及名称见表 1。

峰 1~4、6、8、9、11、17、18、25、26、29、31、36、43、47 在正离子模式下均生成 $[M+H]^+$

的准分子离子峰, 误差在 $\pm 5.00 \times 10^{-6}$ 内; 一级质谱中生成二聚体加和离子、钠加和离子; 二级质谱中可见高丰度的金雀花碱型生物碱特征离子由于 C 环裂解生成的 m/z 98.09 $[M+H-C_9H_{12}NO]^+$ 以及分子离子峰失去 1 分子 H_2O 产生 $[M+H-H_2O]^+$ 特征碎片离子, 分子离子峰失去 1 分子 C_3H_9NO 产生 $[M+H-C_3H_9NO]^+$ 碎片离子; 此外, 羟基化的金雀花碱易于失去羟基, 生成特征碎片离子。根据以上金雀花型生物碱的质谱裂解特征, 初步推断以上化合物均为金雀花碱型生物碱, 各化合物的质谱数据及名称见表 1。

3.2 不同苦参组织样品中生物碱的定量分析

按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 利用 UPLC-QQQ-MS 在多反应检测模式 (MRM) 下, 通过质谱条件和碰撞能量等的优化, 根据“2.4.2”项色谱质谱条件, 选择合适的定量离子对 (表 2) 对包括苦参无菌苗根、苦参无菌苗茎、苦参无菌苗叶、正常苦参愈伤组织中的 17 个生物碱进行定量分析。结果表明 17 个定量生物碱在苦参无菌幼苗中的含量明显高于苦参愈伤组织, 且氧化苦参碱在各组织样品中含量最高, 同时也发现羟基取代的苦参生物碱在茎叶中的含量普遍高于苦参根。结果见图 4。

表 2 苦参生物碱定量分析离子对信息

Table 2 Quantitative analysis of ion pair information for *S. flavescens* alkaloid

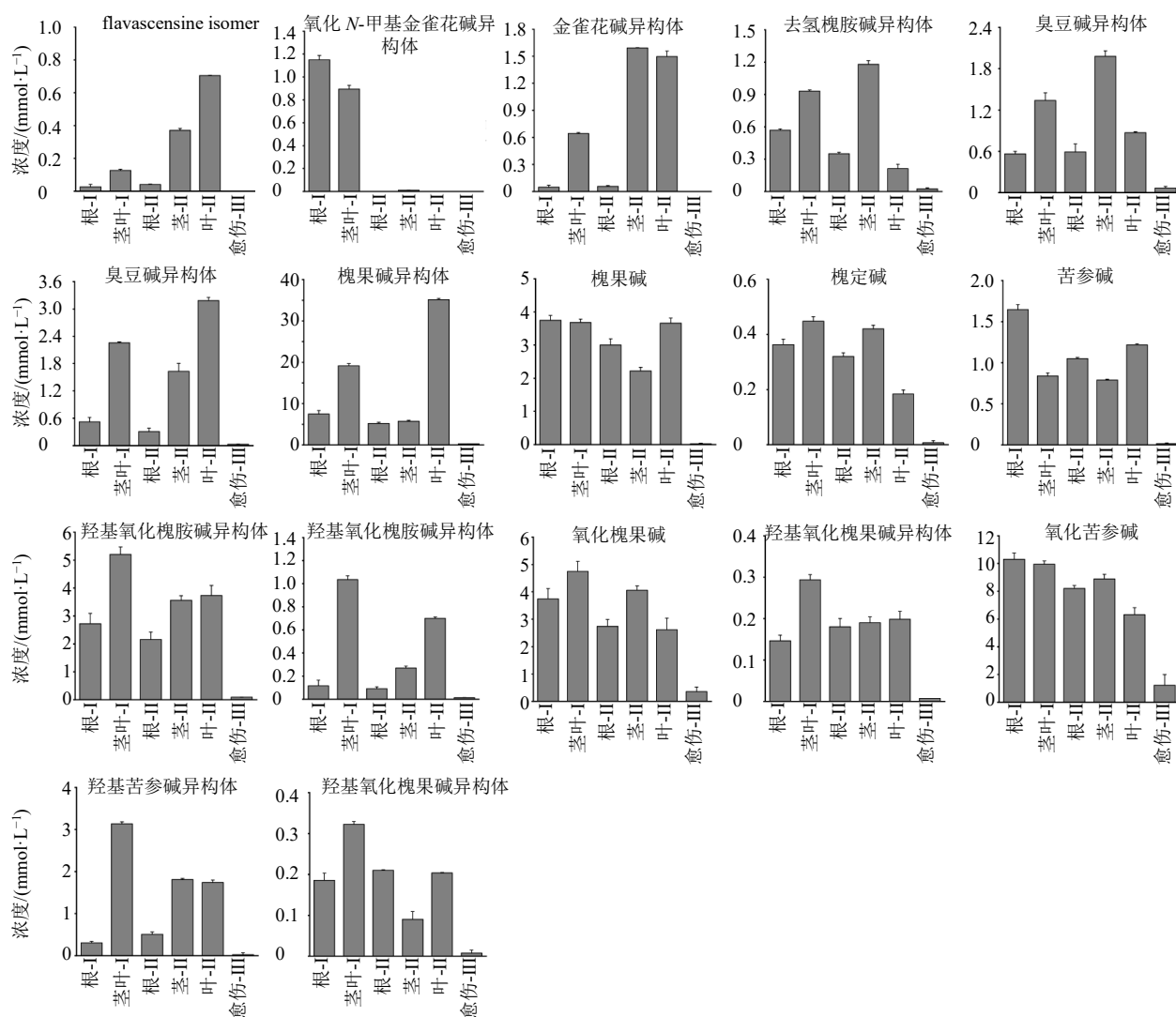
编号	化合物名称	分子式	t_R/min	定量离子对 (m/z)
1	flavascensine isomer	$C_{12}H_{20}N_2O$	9.21	209.2/105.1
2	氧化 <i>N</i> -甲基金雀花碱异构体	$C_{12}H_{16}N_2O_2$	10.95	221.1/162.1
3	金雀花碱异构体	$C_{15}H_{26}N_2$	13.97	235.2/98.1
4	去氢槐胺碱异构体	$C_{15}H_{18}N_2O$	13.31	243.1/186.1
5	臭豆碱异构体	$C_{15}H_{20}N_2O$	10.32	245.2/148.1
6	臭豆碱异构体	$C_{15}H_{20}N_2O$	14.24	245.2/148.1
7	槐果碱异构体	$C_{15}H_{22}N_2O$	10.22	247.2/148.1
8	槐果碱	$C_{15}H_{22}N_2O$	12.12	247.2/179.2
9	槐定碱	$C_{15}H_{22}N_2O$	7.22	249.2/150.1
10	苦参碱	$C_{15}H_{22}N_2O$	10.68	249.2/150.1
11	羟基氧化槐胺碱异构体	$C_{15}H_{20}N_2O_2$	7.83	261.2/243.2
12	羟基氧化槐胺碱异构体	$C_{15}H_{20}N_2O_2$	14.74	261.2/243.2
13	氧化槐果碱	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	9.79	263.2/136.1
14	羟基氧化槐果碱异构体	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	14.95	263.2/195.1
15	氧化苦参碱	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	9.33	265.2/205.1
16	羟基苦参碱异构体	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	12.67	265.1/148.1
17	羟基氧化槐果碱异构体	$C_{15}H_{22}N_2O_3$	8.34	279.2/261.2

4 讨论

由于苦参生物碱分离鉴定困难, 已有的文献报道方法中对苦参生物碱的鉴定不够全面, 且以分析药材为主, 暂无分析苦参愈伤组织及无菌苗的报道^[24-25]。鉴于此, 本研究采用 UPLC-Q-Exactive- Orbitrap MS 技术结合特征离子和中性丢失的非靶向质谱筛查策略对苦参根甲醇提取物中的苦参生物碱类成分进行快速的筛查和鉴定, 具有通用性强、效率高等优势, 有利于苦参粗提物或未知样品苦参生物碱类成分的分析 and 鉴定。结合 MS、MS²、相关文献和质谱裂解途径对可能的化合物进行确认, 通过对苦参生物碱类成分质谱裂解规律和 6 个生物碱对照品质谱裂解的分析, 获得了代表苦参生物碱类成分母核特征的特异性离子、质谱裂解规律及中性丢失, 据此, 从苦参根甲醇提取物中共鉴定出 47 个苦参生物碱类

成分, 实现了对 5 年生苦参根中生物碱类成分较全面的定性分析, 该方法与目前文献报道相比, 鉴定出的苦参生物碱类成分数目显著增加。

本研究也建立了一种 HPLC-QQQ-MS/MS 同时测定不同苦参组织样品中 17 种苦参生物碱类成分含量的方法, 综合考虑不同成分的结构和极性特点, 采用 MRM 扫描模式, 正离子模式检测, 各成分均有较好的响应。本研究所测定的 17 种生物碱中包括同分异构体, 每对同分异构体共用 1 个离子对, 通过优化流动相种类及洗脱条件, 均获得了良好的分离和响应, 各色谱峰的分离度和峰形良好。17 种化学成分含量的同时测定在 15 min 内即可完成, 且测定结果准确、稳定性良好, 可用于苦参生物碱含量的测定。在进行测定成分的选择时, 首先将苦参中含量高且药理活性显著的成分纳入指标内; 同时基



I-种子发芽后继续培养 1 周取样 II-种子发芽后继续培养 2 周取样 III-苦参愈伤组织

I-the inoculated aseptic seedling sampled for 1 week after germination II-the inoculated aseptic seedling sampled for 2 weeks after germination
III-callus of *S. flavescens*

图 4 苦参不同组织定量分析结果 ($n = 3$)

Fig. 4 Quantitative analysis of different tissues from *S. flavescens* ($n = 3$)

于本研究对苦参根的定性研究, 以及苦参根中同分异构体的普遍存在使得大部分生物碱的峰无法分离, 最终定量 17 种苦参生物碱。17 种生物碱包含苦参药材中的主要成分及活性成分, 包括苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱、槐定碱、金雀花碱等。不同苦参样品的含量测定结果表明, 不同苦参生物碱在各个苦参组织样品中的含量存在差异。苦参碱型和金雀花碱型生物碱在苦参无菌苗和愈伤组织中均有积累, 但愈伤组织中生物碱含量较低, 说明正常的愈伤组织合成苦参碱的能力较弱, 需要对其培养条件进行不断的优化, 才有望提高其合成生物碱的能力; 苦参无菌苗和 5 年生苦参根相

比, 前者由于没有发生严重的木质化, 因而生物碱含量相对最高, 且不同组织的生物碱含量具有明显差异。

由于苦参生物碱类成分结构多样、活性显著, 使其具有广泛的应用前景。阐明苦参生物碱类成分的生物合成机制, 具有重要的学术和应用价值, 但目前与苦参生物碱类成分生物合成相关酶的报道很少^[26]。本研究, 苦参无菌苗和苦参愈伤组织中也含有苦参生物碱类成分, 且含量在不同样品中具有明显的差异, 与苦参根相比, 更容易从苦参无菌苗、愈伤组织中获得满足转录组测序的高质量 RNA, 为后续利用比较转录组测序技术挖掘苦参药用活性成

分生物合成途径中的关键酶基因, 提供了理想的差异样本, 为探讨苦参中生物碱类成分的生物合成途径及相关催化酶奠定坚实基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] He X, Fang J, Huang L, *et al.* *Sophora flavescens* Ait.: Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172: 10-29.
- [2] 张钟媛. 苦参的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(6): 104-106.
- [3] 丁大力, 沈学彬, 姚佳慧, 等. 中药治疗肺纤维化的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 7006-7024.
- [4] 张元元, 李旭, 廖子君, 等. 基于网络药理学预测苦参治疗肝癌的分子机制 [J]. 世界中医药, 2021, 16(5): 751-757.
- [5] 李丽娜, 纪明山, 宿宗艳. 农用杀菌剂苦参应用研究进展 [J]. 农药, 2006, 45(9): 581-583.
- [6] 张丽华, 陈邦恩, 潘明佳. 苦参碱药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 1000-1003.
- [7] Luo D, Lin Q, Tan J L, *et al.* Water-soluble matrine-type alkaloids with potential anti-neuroinflammatory activities from the seeds of *Sophora alopecuroides* [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 116: 105337.
- [8] 李凡, 杨远贵, 谷丽华, 等. 苦参的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(10): 84-100.
- [9] 李晓娜, 董馨, 包保全, 等. 基于 Q-Exactive 高分辨质谱的蒙中药材苦参化学成分快速分析鉴定 [J]. 中药材, 2019, 42(1): 103-109.
- [10] Wei S Y, Yang Y H, Yin T M. The chromosome-scale assembly of the willow genome provides insight into Salicaceae genome evolution [J]. *Hortic Res*, 2020, 7: 45.
- [11] Chaw S M, Liu Y C, Wu Y W, *et al.* Stout camphor tree genome fills gaps in understanding of flowering plant genome evolution [J]. *Nat Plants*, 2019, 5(1): 63-73.
- [12] Jia H M, Jia H J, Cai Q L, *et al.* The red bayberry genome and genetic basis of sex determination [J]. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17(2): 397-409.
- [13] Istvánek J, Jaros M, Kreněk A, *et al.* Genome assembly and annotation for red clover (*Trifolium pratense*; Fabaceae) [J]. *Am J Bot*, 2014, 101(2): 327-337.
- [14] Yamashiro T, Shiraishi A, Satake H, *et al.* Draft genome of *Tanacetum cinerariifolium*, the natural source of mosquito coil [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18249.
- [15] Gao J Q, Li Y X, Yu W, *et al.* Rescuing yeast from cell death enables overproduction of fatty acids from sole methanol [J]. *Nat Metab*, 2022, 4(7): 932-943.
- [16] Sun C H, Tian W Y, Lin Z, *et al.* Biosynthesis of pyrroloindoline-containing natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2022, 39(9): 1721-1765.
- [17] Cai X H, Zhang H Y, Xie B. Matrine-family alkaloids: Versatile precursors for bioactive modifications [J]. *Med Chem*, 2020, 16(4): 431-453.
- [18] Wei G F, Chen Y Z, Guo X T, *et al.* Biosyntheses characterization of alkaloids and flavonoids in *Sophora flavescens* by combining metabolome and transcriptome [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 7388.
- [19] Hwang I M, Lee H W, Lee H M, *et al.* Rapid and simultaneous quantification of five quinolizidine alkaloids in *Lupinus angustifolius* L. and its processed foods by UPLC-MS/MS [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(33): 20825-20830.
- [20] Liu G Q, Dong J, Wang H, *et al.* Characterization of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(5): 1065-1072.
- [21] 李晓娜, 董馨, 李娜, 等. 四味土木香散化学成分 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 高分辨质谱快速分析鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 121-131.
- [22] Dong Y Q, Jia G X, Hu J W, *et al.* Determination of alkaloids and flavonoids in *Sophora flavescens* by UHPLC-Q-TOF/MS [J]. *J Anal Methods Chem*, 2021, 2021: 9915027.
- [23] 李壮壮, 常晓燕, 金唯一, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 的和血止痒方化学成分表征 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(9): 1542-1553.
- [24] Zhang X, Cui Z, Wang D, *et al.* High performance liquid chromatographic fingerprint evaluation of the quinolizidine alkaloids from commercial *Radix Sophorae Flavescentis* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(3): 171-182.
- [25] Wu Z J, Sun D M, Fang D M, *et al.* Analysis of matrine-type alkaloids using ESI-QTOF [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2013, 341/342: 28-33.
- [26] Mancinotti D, Frick K M, Gen F F. Biosynthesis of quinolizidine alkaloids in lupins: mechanistic considerations and prospects for pathway elucidation [J]. *Nat Prod Rep*, 2022, 39(7): 1423-1437.

[责任编辑 王文倩]