

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对藏药宽筋藤中生物碱类成分的快速辨识

张武岗¹, 郎一帆², 姚云¹, 杨武亮², 杨世林¹, 陈海芳^{2*}, 冯育林^{1*}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱 (ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time of flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS) 对藏药宽筋藤 *Tinospora sinensis* 藤茎中生物碱类成分进行分析和鉴定。方法 采用色谱柱 Waters ACQUITY UPLC C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以流动相乙腈-0.1%甲酸水溶液进行梯度洗脱。使用电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式下采集数据; 通过测定宽筋藤生物碱对脂多糖诱导小鼠巨噬 RAW264.7 细胞释放一氧化氮的抑制能力, 评价其抗炎活性。结果 通过二级高分辨质谱分析结合对照品数据及相关文献, 共鉴定出 73 个生物碱, 包括 12 个原小檗碱型生物碱、23 个四氢原小檗碱型生物碱、20 个苄基异喹啉类生物碱、9 个阿朴啡类生物碱、9 个其他类生物碱。抗炎活性检测表明, 宽筋藤生物碱对脂多糖刺激的 RAW264.7 细胞的一氧化氮具有较强的抑制作用。结论 对藏药宽筋藤生物碱类成分进行较为全面系统地解析, 为药效物质基础研究及开发应用奠定基础。

关键词: UPLC-Q-TOF-MS/MS; 宽筋藤; 生物碱; 成分分析; 小檗碱; 巴马汀; 四氢巴马汀; 黄柏碱; 木兰花碱; 木兰箭毒碱
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)24-7977-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.004

Rapid identification of alkaloids component in Tibetan medicine *Tinospora sinensis* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technique

ZHANG Wu-gang¹, LANG Yi-fan², YAO Yun¹, YANG Wu-liang², YANG Shi-lin¹, CHEN Hai-fang², FENG Yu-lin¹

1. National Pharmaceutical Engineering Center (NPEC) for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Preparations, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** Ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) method was developed to analyze and identify the alkaloids from Tibetan medicine *Tinospora sinensis*. **Methods** The analysis was performed on a Waters ACQUITY UPLC C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with acetonitrile and 0.1% formic acid water solution as the mobile phase for gradient elution. The electrospray ion source (ESI) was adopted to collect the data in positive ionization mode. The anti-inflammatory effect of alkaloids from *Tinospora sinensis* was evaluated with the inhibition on the release of nitric oxide in RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. **Results** A total of 73 alkaloids, including 12 protoberberine-type alkaloids, 23 tetrahydroprotoberberine-type alkaloids, 20 benzyloisoquinoline alkaloids, 9 aporphine alkaloids and 9 other alkaloids were identified by secondary high resolution mass spectrometry combined with reference substances data and related literature. The results of anti-inflammatory activity showed that the alkaloids of *Tinospora sinensis* showed strong inhibition effect on the release of nitric oxide in RAW264.7 cell induced by lipopolysaccharide. **Conclusion** The established method

收稿日期: 2023-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81903917); 江西省中医药管理局科技计划项目 (2022Z023); 江西省自然科学基金项目 (20192BAB205109); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ2200908, GJJ170723); 江西中医药大学博士科研启动基金项目 (2018WBZR002); 江西中医药大学科技创新团队项目 (CXTD22001); 江西民族传统药现在科技与产业发展协同创新中心开放基金项目 (JXXT201402008); 中央引导地方科技发展资金项目 (20212ZDD02009)

作者简介: 张武岗 (1979—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药物质基础。Tel: (0791)87119632 E-mail: zwgchf98@foxmail.com

***通信作者:** 陈海芳 (1979—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量分析。Tel: (0791)87118658 E-mail: chenhf88@126.com

冯育林 (1977—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药物质基础。Tel: (0791)87119632 E-mail: fengyulin2003@Hotmail.com

systematically analyzed the alkaloids of the Tibetan medicine. It provides a reference for the subsequent study of material basis and development of *Tinospora sinensis*.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS/MS; *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr.; alkaloids; component analysis; berberine; palmatine; tetrahydropalmatine; phellodenine; magnoflorine; magnocurarine

宽筋藤(译名勒哲)为防己科植物中华青牛胆 *Tinospora sinensis* (Lour.) Merr. 的干燥茎藤, 收载于《藏药标准》, 具有舒筋活络、祛风止痛等功效, 常用于治疗跌打损伤、风湿痹痛等^[1]。现代临床研究表明, 宽筋藤对风湿性关节炎具有良好的治疗效果^[2-4], 生物碱是其主要的抗炎活性成分, 小檗碱^[5-6]、药根碱^[7]等能够明显改善大鼠类风湿性关节炎症状。但是, 目前对宽筋藤中生物碱类成分的报道仅有非洲防己碱、药根碱、四氢巴马汀、小檗碱、巴马汀等^[8-13], 未有全面分析, 为探寻宽筋藤中更多治疗风湿性关节炎的生物碱类成分, 本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析宽筋藤中生物碱类成分, 为宽筋藤的后续研究开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

Triple TOF 5600 Plus 型高分辨质谱仪、Analyst TF1.6、peakview 1.2 数据处理系统(美国 Sciex 公司); LC-30A 型超高效液相色谱仪, 包括 LC-30AD 高压输液泵、CBM-20A 系统控制器、SIL-30AC 自动进样器、DUG-20A5 在线脱气机、CTO-30A 柱温箱(日本岛津公司)。

1.2 材料与试剂

宽筋藤(批号 20150329)购自成都荷花中药材专业市场, 经江西中医药大学徐艳琴教授鉴定为防己科植物中华青牛胆 *T. sinensis* (Lour.) Merr. 的干燥茎藤。甲醇、乙腈(色谱纯)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 蒸馏水由屈臣氏集团提供; 其余试剂为分析纯。对照品小檗碱(批号 19072501)、巴马汀(批号 19022604)、四氢巴马汀(批号 16032710)、黄柏碱(批号 17112110)、木兰花碱(批号 18071701)、木兰箭毒碱(批号 20092304), 以上对照品质量分数均大于 98%, 购自成都曼斯特生物科技有限公司; 盐酸、三氯甲烷、浓氨水、无水乙醇均为分析级, 购自成都科隆化学有限公司; 地塞米松(批号 C100916501)购自上海麦克林生化科技有限公司; 脂多糖(批号 017M4112V)购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清(FBS, 批号 233473CP)、DEME 培养基(批号 L110KJ)购

自美国 Gibco 公司; 一氧化氮检测试剂盒(批号 20220312)购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称定各对照品适量, 用甲醇溶解制备对照品储备液。精密吸取各对照品储备液适量, 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 得小檗碱、巴马汀、四氢巴马汀、黄柏碱、木兰花碱、木兰箭毒碱质量浓度分别为 45.76、19.31、31.23、26.18、25.76 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

将宽筋藤药材 30 g 置于圆底烧瓶中, 加入 10 倍(300 mL) 70%乙醇, 加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩得到 1.92 g 浸膏。取浸膏加 20 mL 2%盐酸水溶液, 搅碎搅拌, 放置 4 h, 滤过, 滤液加浓氨水调 PH 至 9~10, 氯仿萃取, 回收氯仿, 得宽筋藤生物碱 0.12 g。

2.3 液相色谱条件

采用 Waters UPLC C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0.01~5 min, 5%~8% B; 5~20 min, 8%~15% B; 20~25 min, 15%~30% B; 25~38 min, 30%~95% B; 38~38.01 min, 95%~5% B; 38.01~40 min, 5% B。体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL 。

2.4 质谱条件

使用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 质量扫描范围为 m/z 100~1250; 喷雾电压 4500 V; 离子化温度 500 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞能量 35 eV; 气帘气 206.85 kPa; 雾化器和辅助气均为 344.75 kPa; 去簇电压 100 V; 数据采集时间 40 min。

2.5 数据处理

采用 AB Sciex 公司的软件 PeakView 1.6 中的 XIC Manager、Mass Calculators 和 Formula Finder 功能, 对 UPLC-Q-TOF-MS/MS 采集的数据进行处理。

2.6 抗炎活性研究

2.6.1 细胞活力实验 采用 CCK-8 法检测宽筋藤

生物碱对 RAW264.7 细胞的毒性。取对数生长期的 RAW264.7 细胞用含 10% FBS 培养液的 DMEM 培养基调整细胞密度至 1×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板中, 将含不同药物浓度宽筋藤生物碱的细胞培养液以 100 μ L/孔加入 96 孔板中, 另设对照组中加入无药物的细胞培养液, 每组 6 个复孔。于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养 24 h 后, 弃去上清液加入 10% 的 CCK-8 溶液, 每孔 100 μ L, 于酶标仪 450 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.6.2 抗炎活性检测 采用 Griess 法测定宽筋藤生物碱对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞产生一氧化氮的抑制作用。取对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板中 (5×10^4 个/孔), 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 24 h, 弃去旧培养基, 给药组分别加入 100 μ L 宽筋藤生物碱 (15.63、31.25、62.50、125.00 μ g/mL) 的 DMEM 培养基, 同时设置对照组 (仅培养液)、模型组 (仅培养液) 和地塞米松 (40 μ mol/L 地塞米松+培养液) 组, 培养 1 h 后, 除对照组外, 其余各组加入 100 μ L 的脂多糖 (1 μ g/mL)

溶液, 继续培养 24 h 后, 每孔吸取 50 μ L 上清液于新的 96 孔板中, 先后加入 Griess I 液 50 μ L 与 Griess II 液 50 μ L, 用酶标仪在 540 nm 处测其 A 值, 计算一氧化氮抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{模型}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{模型}} - A_{\text{对照}})$$

3 结果

3.1 生物碱成分的分析鉴别

为便于对宽筋藤生物碱的化学成分进行分析, 首先从 CNKI、GoogleScholar、scifinder 等数据库中检索宽筋藤化学成分, 再通过 chemspider、chembook、massbank、Pubmed 数据库等获取对应成分的化学成分信息, 包括化合物的名称、分子式、相对分子质量等信息, 以此建立宽筋藤的生物碱化合物数据库。在此基础上, 通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 正离子模式共检测出 89 个化合物, 鉴定出 73 个生物碱, 见表 1, 包括 12 个原小檗碱型生物碱、23 个四氢原小檗碱型生物碱、20 个苄基异喹啉类生物碱、9 个阿朴啡类生物碱、9 个其他类生物碱。宽筋藤提取液基峰图 (BPI) 如图 1 所示。

表 1 宽筋藤生物碱成分鉴定结果

Table 1 Results of identification of alkaloid constituents of *Tinospora sinensis*

峰号	tr/min	误差 ($\times 10^{-6}$)	m/z		碎片离子	化合物	分子式	分类	文献
			实测值	理论值					
1	1.18	3.9	182.081 9	182.081 2	147.045 1, 123.043 2	酪氨酸	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	O	14
2	1.18	-1.6	132.101 7	132.101 9	86.095 4, 69.071 0	亮氨酸	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	O	
3	1.30	-0.3	130.048 9	130.049 9	84.044 9, 56.050 9	焦谷氨酸	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$	O	
4	2.38	0.8	300.159 2	300.159 4	269.117 2, 237.090 8	甲基异乌药碱	$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	B	15-16
5	2.50	-0.8	300.122 8	300.123 0	75.063 8	未知	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_4$		
6	4.17	1.5	272.127 7	272.128 1	255.100 9	去甲乌药碱	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$	B	14, 16-17
7	4.17	0.7	330.170 2	330.170 0	299.127 9, 267.126 9	去甲基甜菜碱	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	B	
8	4.22	-0.8	286.142 8	286.143 2	269.172 9, 254.109 5	N-甲基去甲乌药碱	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	B	
9	4.23	-2.1	328.154 7	328.154 3	178.086 3, 163.062 6	左旋千金藤啶碱/金黄紫堇碱	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	C	14, 18-23
10	4.47	-1.0	386.160 7	386.159 8	206.117 1, 191.085 6	羟基甲氧基四氢小檗碱	$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_6$	C	
11	4.71	0.6	314.175 1	314.175 1	269.111 6	木兰箭毒碱*	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_3$	B	18-20, 24
12	4.72	0.4	328.154 1	328.154 3	192.113 6, 178.085 9	未知	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$		
13	4.98	-0.5	344.185 3	344.186 2	299.125 4, 267.101 0	tembetarine isomer	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NO}_4$	B	
14	5.10	0.8	314.174 4	314.175 1	269.117 3, 237.092 2	oblongine/lotusine 或其异构体	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_3$	B	16, 18, 24-25
15	5.19	0.7	328.154 1	328.154 3	283.134 0, 251.107 7	3-O-去甲基木兰花碱	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	D	
16	5.26	0.8	314.175 1	314.175 1	237.091 8	去甲亚美罂粟碱	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	B	17, 25
17	5.29	0.6	316.154 3	316.154 3	257.069 2, 229.071 9	norreticuline	$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	B	14, 17, 25
18	5.40	0	400.174 6	400.175 5	220.097 1	甲氧基羟基-N-甲基四氢小檗碱	$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_6$	C	18, 21, 24-26

续表 1

峰号	tr/min	误差 ($\times 10^{-6}$)	m/z		碎片离子	化合物	分子式	分类	文献
			实测值	理论值					
19	5.45	0.3	344.184 3	344.185 6	299.070 4, 267.100 1	tembetarine	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄	B	
20	5.48	-0.6	314.138 5	314.138 7	299.152 5, 283.133 9	N-阿魏酰酰胺异构体	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	O	
21	5.68	0.5	372.181 4	372.180 6	208.097 0	羟基四氢巴马汀	C ₂₁ H ₂₆ NO ₅	C	
22	5.70	-2.1	386.161 7	385.159 8	206.118 1, 191.093 7	羟基甲氧基四氢小檗碱	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆	C	
23	6.42	0.7	342.170 6	342.170 0	192.102 0, 177.085 9	四氢呋喃非洲防己碱/四氢呋喃药根碱	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	C	
24	6.43	0.3	300.160 7	300.159 4	269.117 4, 237.089 9	N-甲基衡州乌药碱	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	B	14-16, 18, 25
25	6.47	0.5	372.180 1	372.180 6	192.101 2, 177.078 5	羟基四氢假巴马汀碱	C ₂₁ H ₂₆ NO ₅	C	
26	6.70	4.5	354.130 0	354.133 6	338.138 5, 324.123 2	羟基非洲防己碱/羟基药根碱	C ₂₀ H ₂₀ NO ₅	A	26
27	6.89	-0.5	344.185 3	344.185 6	299.125 4, 267.101 0	N-甲基番荔枝碱	C ₂₀ H ₂₅ NO ₄	B	
28	7.06	0.2	342.169 9	342.170 0	297.112 0, 282.088 9	木兰花碱*	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	D	18, 21, 24-30
29	7.25	1.0	358.164 6	358.164 9	313.135 5, 281.109 4	未知	C ₂₀ H ₂₄ NO ₅		
30	7.27	0.0	372.180 4	372.180 6	208.097 2, 190.086 7	羟基四氢巴马汀	C ₂₁ H ₂₆ NO ₅	C	
31	7.27	-0.4	400.175 3	400.175 5	220.097 0	甲氧基羟基-N-甲基四氢小檗碱异构体	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	C	
32	7.48	1.0	386.195 0	386.195 8	368.188 0, 208.136 6	未知	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆		
33	7.58	0.8	314.175 1	314.175 1	269.114 8, 237.091 8	oblongine/lotusine or isomer	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃	B	16, 18, 24-25
34	7.64	0.7	330.168 9	330.170 0	299.127 5, 267.101 0	番荔枝碱	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	B	14, 19, 21-22, 25-27
35	7.65	0.9	342.170 2	342.170 0	311.128 5, 297.111 9	樟叶木防己碱	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	D	26
36	7.89	0.9	370.165 1	370.164 9	206.081 0, 191.058 3	未知	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅		
37	8.02	0.9	356.185 1	356.185 6	192.101 4, 177.078 0	N-甲基四氢呋喃非洲防己碱	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	C	
38	8.29	1.3	342.169 9	342.170 0	192.102 5, 178.086 1	黄柏碱*	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	C	24,30
39	8.31	0.3	386.160 0	386.159 8	222.103 1, 207.080 7	未知	C ₂₁ H ₂₃ NO ₆		
40	8.37	0.6	296.166 4	296.164 5	251.108 2, 236.082 6	annonamine or isomer	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂	D	
41	8.38	0.1	356.184 9	356.185 6	192.101 6, 177.078 2	N-甲基四氢呋喃药根碱	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	C	
42	8.40	-0.2	372.181 1	372.180 6	292.109 0, 192.102 1	羟基四氢巴马汀	C ₂₁ H ₂₆ NO ₅	C	
43	8.42	1.2	328.191 1	328.190 7	283.134 0, 251.107 7	甲基木兰箭毒碱	C ₂₀ H ₂₆ NO ₃	B	
44	8.43	0.6	342.170 3	342.170 0	192.102 3, 177.085 7	四氢呋喃非洲防己碱/四氢呋喃药根碱	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	C	
45	8.68	0.7	286.143 2	286.143 8	269.117 0, 237.090 9	衡州乌药碱	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	B	14, 16-17, 25
46	9.00	1.0	326.138 5	326.138 7	311.115 9, 310.106 8	未知	C ₁₉ H ₂₀ NO ₄		
47	9.13	-2.3	522.209 0	522.218 1	349.188 3, 312.129 7	未知	C ₂₂ H ₃₅ NO ₁₃		
48	9.28	0.8	344.185 8	344.186 2	313.142 0, 298.111 8	四氢罂粟碱	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄	B	14-17
49	9.49	4.0	354.136 0	354.133 6	272.128 1, 190.086 5	羟基四氢非洲防己碱/羟基四氢药根碱	C ₂₀ H ₂₀ NO ₅	C	
50	9.51	1.2	296.164 6	296.164 5	251.106 9, 219.075 0	annonamine or isomer	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂	D	
51	9.63	0.9	354.170 7	354.170 0	190.085 7, 175.063 0	N-甲基四氢小檗碱	C ₂₁ H ₂₄ NO ₄	C	14, 18-20, 23
52	9.82	-2.7	314.175 1	314.175 6	283.133 9, 251.107 2	armepavine	C ₁₉ H ₂₄ NO ₃	B	16
53	10.01	-2.9	354.132 5	354.133 6	190.086 5, 175.062 2	羟基四氢非洲防己碱/羟基四氢药根碱	C ₂₀ H ₂₀ NO ₅	C	
54	10.32	0.5	400.176 4	400.175 5	222.111 8, 206.117 3	未知	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆		
55	10.47	1.0	336.123 8	336.123 0	321.099 6, 320.091 6	小檗碱*	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	A	14, 18, 21-25, 28-29
56	10.72	0.9	356.185 6	356.185 6	192.102 1, 177.079 0	番荔枝宁	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	C	25
57	11.02	2.7	370.200 4	370.201 3	206.081 0, 191.058 3	N-甲基四氢巴马汀	C ₂₂ H ₂₈ NO ₄	C	23-25
58	11.61	-3.7	374.157 9	374.159 8	329.115 0, 314.045 8	chiloenamine	C ₂₀ H ₂₃ NO ₆	D	
59	11.91	-2.4	400.174 7	400.175 5	308.106 5, 206.116 5	未知	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆		

续表 1

峰号	tr/min	误差 ($\times 10^{-6}$)	m/z		碎片离子	化合物	分子式	分类	文献
			实测值	理论值					
60	11.96	0.7	324.123 6	324.123 0	309.100 9, 294.075 1	千金藤宁碱	C ₁₉ H ₁₈ NO ₄	A	26
61	12.17	-1.1	522.211 9	522.212 2	507.189 0, 437.215 3	未知	C ₂₉ H ₃₁ NO ₈		
62	12.52	-0.6	384.144 0	384.144 2	368.149 4, 340.153 9	二羟基巴马汀	C ₂₁ H ₂₂ NO ₆	A	
63	12.55	3.2	272.128 9	272.128 1	190.086 6, 182.069 8	未知	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃		
64	12.98	0.8	368.149 8	368.149 3	352.118 0, 324.123 3	甲氧基非洲防己碱	C ₂₁ H ₂₂ NO ₅	A	
65	13.42	-3.4	372.178 0	372.180 6	354.167 8, 208.099 1	羟基四氢巴马汀	C ₂₁ H ₂₆ NO ₅	C	
66	14.20	4.6	522.217 2	522.218 1	507.189 0, 437.215 3	未知	C ₂₂ H ₃₅ NO ₁₃		
67	14.83	1.0	356.185 6	356.185 6	192.101 5, 177.078 1	四氢巴马汀*	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	C	18-19, 23-25, 27-28, 30
68	15.01	-0.3	400.175 6	400.175 5	220.095 6, 218.081 3	甲氧基羟基-N-甲基四氢小檗碱异构体	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	C	
69	15.84	-1.1	344.186 0	344.186 2	267.136 5, 252.112 2	tembetarine isomer	C ₂₀ H ₂₆ NO ₄	B	
70	16.40	0.7	338.138 0	338.138 9	323.115 6, 322.107 4	非洲防己碱	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	A	18, 21, 24, 26, 29
71	16.70	1.0	370.200 4	370.201 3	206.117 3, 191.094 0	N-甲基四氢巴马汀	C ₂₂ H ₂₈ NO ₄	C	23-25
72	17.19	-0.2	282.148 3	282.148 9	265.122 3, 250.098 3	N-去甲基荷叶碱	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	B	25
73	17.25	0.9	338.138 1	338.138 9	323.115 7, 322.107 1	药根碱	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	A	18, 21-22, 24-29
74	17.60	-2.7	522.218 6	522.218 1	312.121 1, 298.110 3	未知	C ₂₂ H ₃₅ NO ₁₃		
75	18.52	-1.9	522.218 7	522.218 1	340.156 2, 312.123 3	未知	C ₂₂ H ₃₅ NO ₁₃		
76	19.24	1.2	296.165 8	296.164 5	251.106 7, 236.082 2	annonamine or isomer	C ₁₉ H ₂₂ NO ₂	D	
77	19.49	-3.5	336.121 5	336.123 0	321.100 1, 320.095 3	表小檗碱	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	A	18, 29
78	19.69	1.0	344.147 6	344.149 3	177.054 1, 149.059 3	N-阿魏酰甲氧基酯胺	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅	O	
79	22.68	1.2	352.154 2	352.154 3	337.132 5, 308.129 1	假巴马汀碱	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	A	
80	22.89	1.2	352.153 9	352.154 3	336.122 8, 320.126 6	巴马汀*	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	A	18, 22-29
81	23.62	5.0	330.138 9	330.133 6	300.125 7, 177.077 7	阿魏酰多巴胺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₅	O	
82	24.00	-0.9	350.137 4	350.138 7	334.105 1, 306.110 8	甲基小檗碱	C ₂₁ H ₂₀ NO ₄	A	25, 28-29
83	24.38	-4.2	336.122 0	336.123 0	320.073 1, 306.073 1	小檗碱异构体	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	A	
84	24.54	1.1	314.139 1	314.138 7	177.054 6, 149.059 7	阿魏酰酯胺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	O	27
85	25.49	4.2	344.149 4	344.149 3	177.054 7, 149.056 2	N-阿魏酰甲氧基酯胺	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅	O	
86	25.82	-1.3	520.197 6	520.196 6	488.195 3, 460.187 2	未知	C ₂₉ H ₂₉ NO ₈		
87	26.21	2.8	344.149 4	344.149 3	177.054 0, 149.059 8	N-阿魏酰甲氧基酯胺	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅	O	
88	27.71	0.6	294.113 3	294.112 5	249.091 5, 219.080 3	N-formylanonaine	C ₁₈ H ₁₆ NO ₃	D	27
89	27.97	1.2	308.128 0	308.128 1	249.091 0, 219.080 4	N-acetylanonaine	C ₁₉ H ₁₈ NO ₃	D	

“*”代表通过对照品鉴定 A-原小檗碱类生物碱 B-苄基异喹啉类生物碱 C-四氢原小檗碱类生物碱 D-阿朴啡类生物碱 O-其他类

“**”-The components were unambiguously identified by comparison with the reference standards A-protobberine alkaloids B-benzylisoquinoline alkaloids C-tetrahydroprotobberine alkaloids D-aporphine alkaloids O-other

3.2 原小檗碱类生物碱

原小檗碱类生物碱由于碳碳单键的存在,使母核很容易失去 2 个氢而形成稳定的大 π 共轭系统,所以原小檗碱类生物碱的母核一般不会发生裂解,主要碎片离子是由小分子取代基的掉落形成,很少存在低于 m/z 230 的产物离子。当取代基包含 2 个或多个甲氧基时,特征碎片离子为 $[M-CH_4]^+$ 、 $[M-CH_3]^+$ 和 $[M-2CH_3]^+$,如小檗碱和巴马汀。结

合碎片离子及文献,共鉴定出原小檗碱类生物碱共 12 个,分别为化合物 26、55、60、62、64、70、73、77、79、80、82 和 83。

化合物 55 为小檗碱,分子式为 C₂₀H₁₈NO₄,在正离子模式下,准分子离子峰为 m/z 336.123 8 $[M]^+$ 。小檗碱含有邻二甲氧基,产生了特征碎片离子 m/z 321.099 6 $[M-CH_3]^+$ 、320.091 6 $[M-CH_4]^+$ 、306.077 6 $[M-2CH_3]^+$,在二级质谱中还可以观察

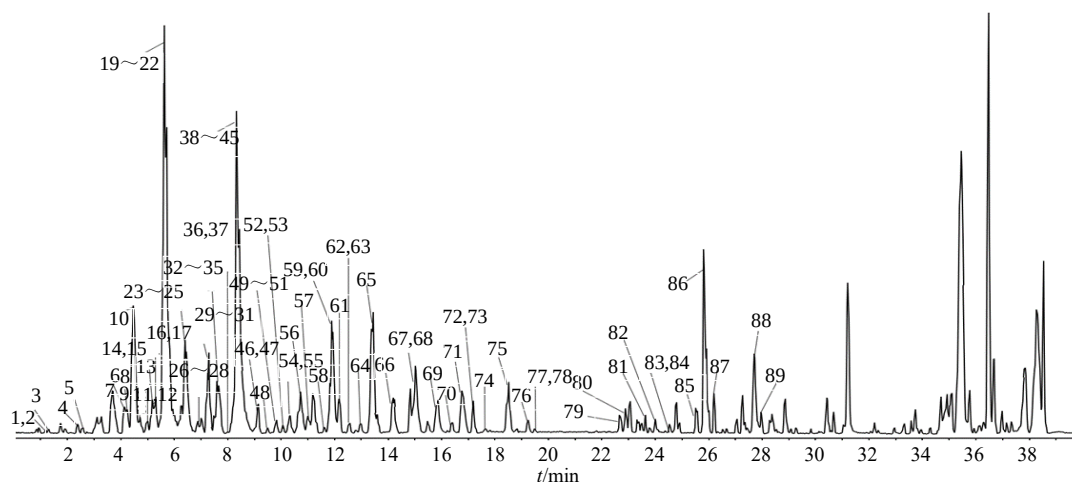


图 1 正离子模式下宽筋藤提取物的基峰图

Fig. 1 BPI chromatogram of the *Tinospora sinensis* extracts in positive mode

到由 m/z 320.091 6 $[M-CH_4]^+$ 相继失去 CO 和 CH_3 产生的碎片离子 m/z 292.096 2 $[M-CH_4-CO]^+$ 、277.074 1 $[M-CH_4-CO-CH_3]^+$ 和 249.078 5 $[M-CH_4-2CO-CH_3]^+$ 。其裂解途径见图 2。

化合物 **80** 为巴马汀，分子式为 $C_{21}H_{22}NO_4$ ，在正离子模式下，准分子离子峰为 m/z 352.153 9 $[M]^+$ 。在二级质谱中，可以观察到特征碎片离子 m/z 336.122 8 $[M-CH_4]^+$ ，以及由碎片离子 m/z 336.122 8 $[M-CH_4]^+$ 相继失去 CO 和 CH_4 的碎片离子 m/z 308.128 3 $[M-CH_4-CO]^+$ 、292.097 4 $[M-$

$2CH_4-CO]^+$ 。其裂解途径见图 3。

化合物 **70** 和 **73**：化合物 **70**，在正离子模式下，准分子离子峰为 m/z 338.138 0 $[M]^+$ ，分子式为 $C_{20}H_{20}NO_4$ 。在二级质谱中，可以观察到特征碎片离子 m/z 323.115 6 $[M-CH_3]^+$ 和 m/z 322.107 4 $[M-CH_4]^+$ ，表明该化合物取代基包含 2 个或多个甲氧基。同样可以观察到丢失了 CH_3 和 CH_4 的碎片离子 m/z 307.084 9 $[M-CH_4-CH_3]^+$ 以及丢失了 CH_4 、 CH_3 和 CO 的碎片离子 m/z 279.089 3 $[M-CH_4-CH_3-CO]^+$ ，结合文献报道^[18,21,24,26,29]推测化合物

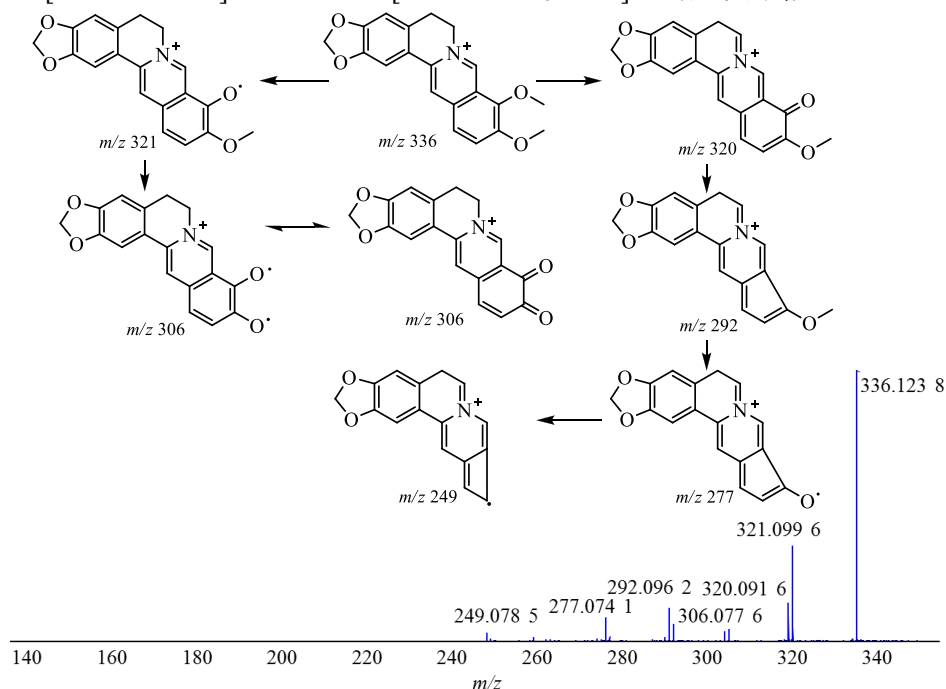


图 2 小檗碱的 MS/MS 图与裂解途径

Fig. 2 MS/MS spectrogram and fragmentation pathway of berberine

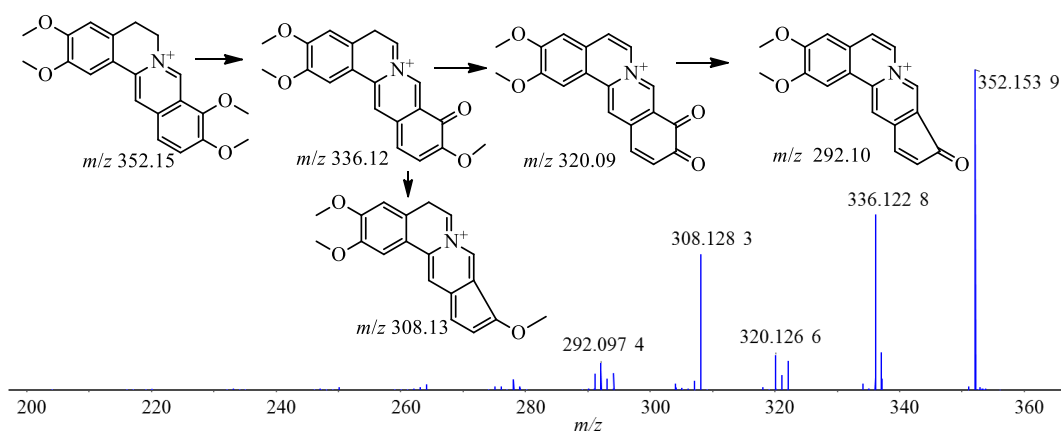


图 3 巴马丁的 MS/MS 图与裂解途径

Fig. 3 MS/MS spectrogram and fragmentation pathway of palmatine

70 为非洲防己碱, 可能的裂解途径见图 4。化合物 73 的二级碎片为 m/z 338.138 1, 323.115 7, 322.107 1, 307.084 3, 294.112 2, 279.089 0, 250.086 4, 其二级

碎片信息与非洲防己碱的二级碎片相同, 失去了一系列的 CH_4 、 CH_3 和 CO 。根据参考文献及此类化合物的裂解规律, 推测化合物 73 为药根碱。

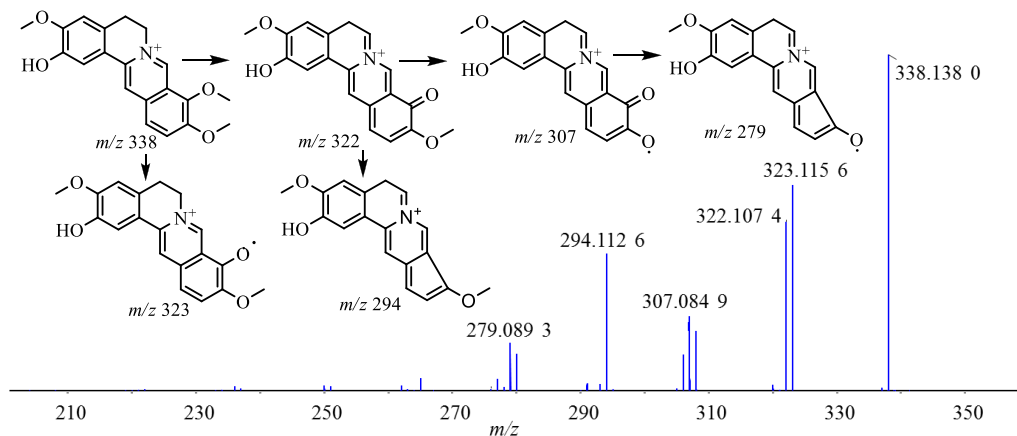


图 4 非洲防己碱的 MS/MS 图与裂解途径

Fig. 4 MS/MS spectrogram and fragmentation pathway of columbamine

3.3 四氢原小檗碱类生物碱

该类生物碱与原小檗碱类生物碱类似, 但无刚性 C 环结构, 在质谱中易发生 RDA 裂解并继续丢失一些取代基, 很少存在质荷比高于 m/z 200 的碎片离子。RDA 裂解产生高峰度的含氮碎片可作为四氢小檗碱型生物碱的特征碎片, 特征碎片离子与取代基的位置和类型有关。当在同一环上分别具有 2 个甲氧基、亚甲二氧基、1 个甲氧基和 1 个羟基时, 特征碎片离子分别为 m/z 192、176、178, 如四氢巴马汀和黄柏碱。结合碎片离子及文献, 共鉴定出四氢原小檗碱类生物碱 23 个, 分别为化合物 9、10、18、21~23、25、30、31、37、38、41、42、44、49、51、53、56、57、65、67、68 和 71。

化合物 67 为四氢巴马汀, 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$,

在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 356.185 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。四氢巴马汀在同一环上含有 2 个甲氧基, 会产生峰度较高的特征碎片离子 m/z 192.101 5 $[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2]^+$, 在二级质谱中还可以观察到由碎片离子 m/z 192.101 5 $[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2]^+$ 丢失 CH_3 后的碎片离子 m/z 177.078 1 $[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2-\text{CH}_3]^+$ 。其裂解途径见图 5。

化合物 38 为黄柏碱, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$, 在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 342.169 9 $[\text{M}]^+$ 。黄柏碱在同一环上含有 2 个甲氧基, 会产生峰度较高的特征碎片离子 m/z 192.102 5 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$, 在二级质谱中还可以观测到由碎片离子 m/z 192.102 5 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2]^+$ 相继失去 CH_2 和 CH_3 的碎片离子 m/z 178.086 1 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{CH}_2]^+$ 和碎片离子 m/z

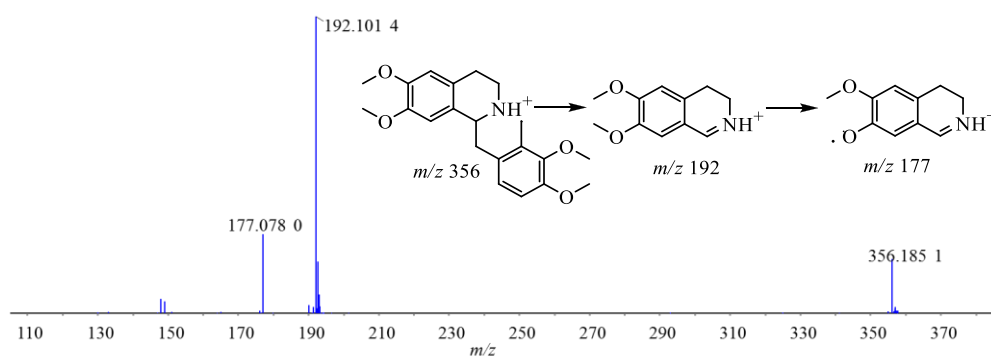


图 5 四氢巴马汀的 MS/MS 图与裂解途径

Fig. 5 MS/MS spectrogram and fragmentation pathway of tetrahydropalmatine

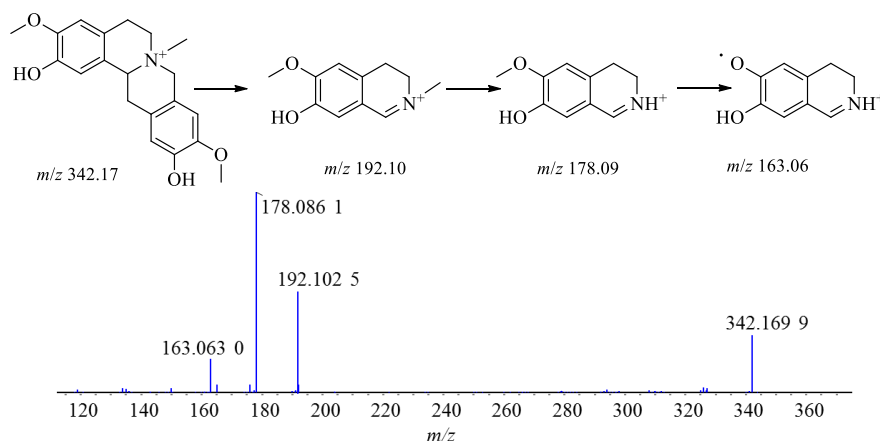


图 6 黄柏碱的 MS/MS 图与裂解途径

Fig. 6 MS/MS spectrogram and fragmentation pathway of phellodendrine

163.063 0 $[M - C_9H_{10}O_2 - CH_2 - CH_3]^+$ 。其裂解途径见图 6。

化合物 **23** 和 **44**: 化合物 **23**, 在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 342.170 6 $[M]^+$, 分子式为 $C_{20}H_{24}NO_4$ 。在二级质谱中, 观察到峰度较高的碎片离子 m/z 192.102 0, 表明该化合物在同一环上含有 2 个甲氧基, 且母核发生了裂解, 碎片离子 m/z 177.085 9 比 192.102 0 少 15, 推断为碎片离子 m/z 192.102 0 失去了中性碎片 CH_3 。同时, 化合物 **44** 的二级碎片为 342.170 3, 192.102 3, 177.085 7, 与化合物 **23** 的二级碎片离子相同, 因此推测化合物 **23** 和 **44** 为同分异构体, 为四氢呋喃非洲防己碱或四氢呋喃药根碱。

3.4 阿朴啡类型生物碱

该类生物碱具有联苯型四环结构, 与其他生物碱在结构上存在较大的差异, 若结构中存在氮甲基, 在质谱中会产生 $[M - NH_2CH_3]^+$ 、 $[M - NH(CH_3)_2]^+$ 等特征碎片离子, 同时也会出现 CH_3 、 CH_4 的分子丢失。阿朴啡类生物碱只有侧链的断裂与重组, 不

会形成 m/z 较低、丰度较大的碎片离子, 如木兰花碱。结合碎片离子及文献, 共鉴定出阿朴啡类生物碱 9 个, 分别为化合物 **15**、**28**、**35**、**40**、**50**、**58**、**76**、**88** 和 **89**。

化合物 **28** 为木兰花碱, 分子式为 $C_{20}H_{24}NO_4$, 在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 342.169 9 $[M]^+$ 。木兰花碱中含有 $NH(CH_3)_2$ 结构, 会产生特征离子碎片 m/z 297.112 0 $[M - NH(CH_3)_2]^+$, 在二级质谱中, 在二级质谱中还可以观察到由碎片离子 $[M - NH(CH_3)_2]^+$ 相继丢失 CH_3 和 OH 产生的碎片离子 m/z 282.088 9 $[M - NH(CH_3)_2 - CH_3]^+$ 、265.085 5 $[M - NH(CH_3)_2 - CH_3 - OH]^+$, 碎片离子 m/z 265.085 5 在断裂的过程中会发生异构化, 继续失去 CO 和 CH_3 形成的碎片离子 m/z 237.091 0 $[M - NH(CH_3)_2 - CH_3 - OH - CO]^+$ 和 m/z 222.067 5 $[M - NH(CH_3)_2 - CH_3 - OH - CO - CH_3]^+$ 。其裂解途径见图 7。

化合物 **40**、**50** 和 **76**: 化合物 **40**, 在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 296.166 4 $[M]^+$, 分子式

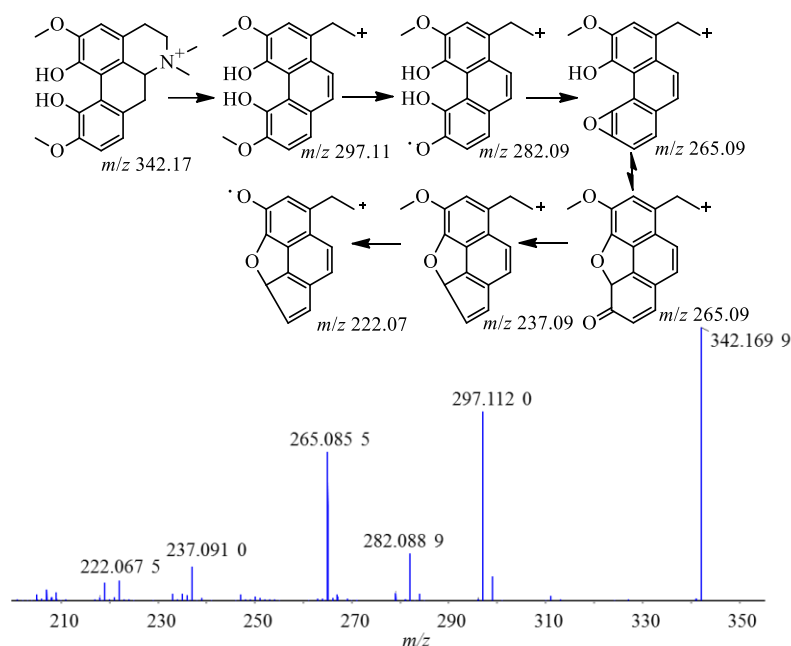


图 7 木兰花碱的 MS/MS 谱图与裂解途径

Fig. 7 MS/MS spectrogram and fragmentation pathway of magnoflorine

为 $C_{19}H_{22}NO_2$ 。在二级质谱中,观察到特征碎片离子 m/z 251.108 2 $[M-NH(CH_3)_2]^+$,碎片离子 m/z 251.108 2, 236.082 6, 219.079 2, 191.084 5,依次降低 15、17、28,推测依次掉落 CH_3 、 OH 和 CO ,与木兰花碱掉落顺序一致。同时,化合物 50 和 76 碎片离子与化合物 40 一致,因此推测化合物 40、50 和 76 为同分异构体,为 annonamine 或其异构体。

3.5 苄基异喹啉类生物碱

该类生物碱易出现氮甲基结构,同样在质谱中会产生 $[M-45]^+$ 、 $[M-31]^+$ 等特征碎片离子,如果还存在相邻的羟基和甲氧基,则还会失去 CH_3OH 从而形成 $[M-45-32]^+$ 或 $[M-31-32]^+$ 的碎片。该类生物碱会发生母核骨架断裂,根据苄基所连接基团的不同,形成 m/z 107、137、151 特征碎片,如木兰箭毒碱。结合碎片离子及文献,共鉴定出苄基异喹啉类生物碱 20 个,分别为化合物 4、6、7、8、11、13、14、16、17、19、24、27、33、34、43、45、48、52、69 和 72。

化合物 11 为木兰箭毒碱,分子式为 $C_{19}H_{24}NO_3$,在正离子模式下,准分子离子峰为 m/z 314.175 1 $[M]^+$ 。在二级质谱中,可以观察到母核断裂后的特征碎片离子 m/z 107.049 1、151.077 1,掉落氮甲基后的特征碎片离子 m/z 269.111 6 $[M-NH(CH_3)_2]^+$,木兰箭毒碱中存在相邻的羟基和甲氧基结构,则还会失去 CH_3OH 从而形成 m/z 237.089 5 $[M-$

$NH(CH_3)_2-CH_3OH]^+$ 。其裂解途径见图 8。

化合物 34: 在正离子模式下,准分子离子峰为 m/z 330.168 9 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{19}H_{23}NO_4$ 。在二级质谱中,碎片离子 m/z 192.100 6 为母核断裂所产生,且比母离子峰度高,碎片离子 m/z 299.127 5 比 m/z 330.168 9 少了 31,是母核发生 RDA 裂解丢失 NH_2CH_3 所产生,可确定是苄基异喹啉类生物碱。二级质谱得到 m/z 267.101 0 碎片,推测为化合物 34 在丢失 NH_2CH_3 的基础上丢失 CH_3OH 所致,其余碎片离子 m/z 192.100 6, 177.077 7 等推测为该化合物的母核裂解及裂解后丢失 CH_3 产生,结合文献推测该化合物为番荔枝碱^[14,19,21-22,25-27]。其裂解途径见图 9。

3.6 其他类生物碱

本实验还鉴定出 9 个其他类生物碱,分别为化合物 1、2、3、20、78、81、84、85 和 87。

3.7 宽筋藤生物碱的抗炎活性

3.7.1 宽筋藤生物碱对 RAW264.7 细胞活力的影响
采用 CCK-8 法检测不同浓度宽筋藤生物碱对 RAW264.7 细胞活力的影响,结果见表 2。在宽筋藤生物碱质量浓度为 7.83~500 $\mu g/mL$,RAW264.7 细胞的存活率高于 80%,表明宽筋藤生物碱对 RAW264.7 细胞的生长活性没有明显的抑制作用;宽筋藤生物碱在 1000 $\mu g/mL$ 时,对 RAW264.7 细胞活力产生显著的抑制作用 ($P<0.01$)。

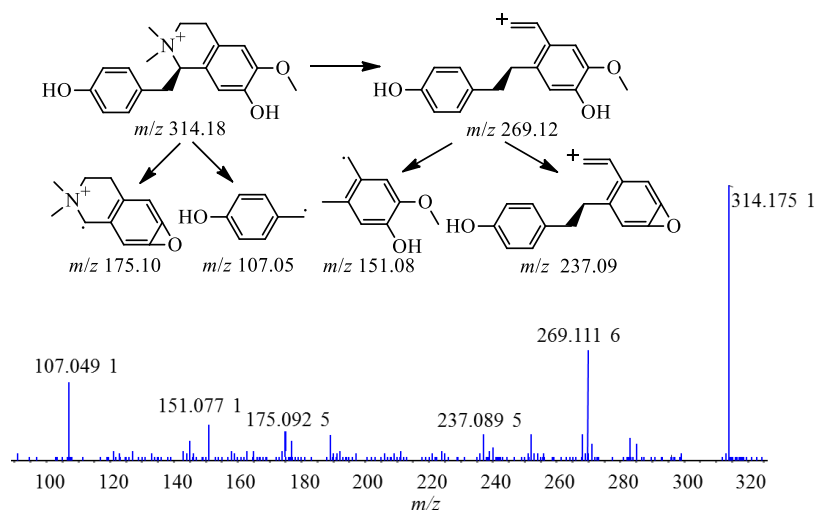


图 8 木兰箭毒碱的 MS/MS 图与裂解途径

Fig. 8 MS/MS spectrogram and fragmentation pathway of magnocurarine

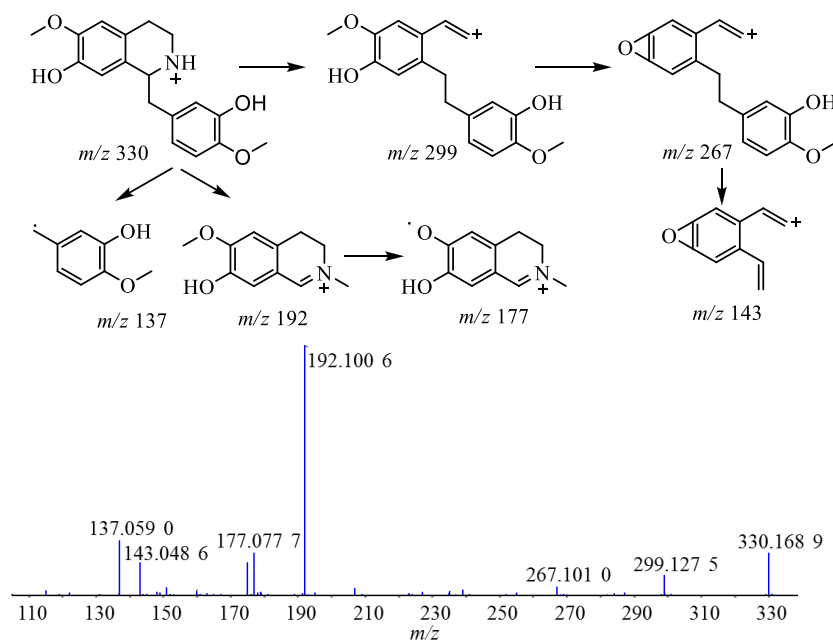


图 9 番荔枝碱的 MS/MS 图与裂解途径

Fig. 9 The MS/MS spectrogram and fragmentation pathway of reticuline

3.7.2 宽筋藤生物碱对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响 采用 Griess 法测定宽筋藤生物碱对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞产生一氧化氮的抑制作用, 结果见表 3。与模型组比较, 宽筋藤生物碱 15.63~125.00 $\mu\text{g/mL}$ 对脂多糖诱导 RAW264.7 分泌一氧化氮具有明显的抑制作用, 抑制率为 19.10%~97.01%, 并呈现出明显的剂量相关性, 其半数抑制浓度为 22.87 $\mu\text{g/mL}$ 。

4 讨论

近年来, 随着人们经济水平的提高, 骨质疏松

症、关节炎类疾病的发病率呈上升趋势, 且发病人群呈年轻化趋势, 给患者带来很大的困扰。藏药宽筋藤作为藏医药治疗此类疾病的临床常用药, 展现出良好的应用价值。

本研究首次采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对其生物碱类成分进行了全面分析。在实验过程中为了获取较好的分离效果, 针对有机相: 乙腈、甲醇; 水相: 水、0.1%甲酸水、0.2%甲酸水流动相进行了考察, 最终将 0.1%甲酸水溶液-乙腈确定为流动相。

基于化合物的结构多样性使得在单一质谱条件

表 2 不同浓度给药组对 RAW 264.7 细胞活力影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of different concentrations of drug groups on the viability of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%
对照	—	100.00
宽筋藤生物碱	1 000.00	26.78 $\pm$ 7.46**
	500.00	81.96 $\pm$ 2.98
	250.00	88.44 $\pm$ 10.48
	125.00	96.58 $\pm$ 18.04
	62.50	96.63 $\pm$ 6.04
	31.25	94.60 $\pm$ 6.83
	15.63	97.19 $\pm$ 14.71
	7.83	95.52 $\pm$ 18.43

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.001$ vs control group

表 3 不同浓度给药组对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞一氧化氮水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of different concentrations of drug groups on lipopolysaccharide induced nitric oxide release in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	一氧化氮抑制率/%
对照	—	—
模型	—	—
地塞米松	40.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	97.28 $\pm$ 0.21
宽筋藤生物碱	15.63 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	19.10 $\pm$ 3.75
	31.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	54.33 $\pm$ 8.36
	62.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	82.37 $\pm$ 4.15
	125.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	97.01 $\pm$ 0.33

下无法获得每个化合物的最优参数,因此,本实验以宽筋藤药材中已知的原小檗碱类生物碱(小檗碱、巴马汀)、四氢原小檗碱类生物碱(四氢巴马汀、黄柏碱)、阿朴啡类生物碱(木兰花碱)和苄基异喹啉类生物碱(木兰花毒碱)4 种类型生物碱为参照,通过对碰撞能量、碰撞能量范围、离子化温度、气帘气等参数进行优化,获取相应结构的最优碎片离子。同时结合保留时间、相对分子质量、二级质谱的碎片离子、相关文献,共推测鉴定出 73 个生物碱,包括 12 个原小檗碱型生物碱、23 个四氢原小檗碱型生物碱、20 个苄基异喹啉类生物碱、9 个阿朴啡类生物碱和 9 个其他类生物碱。

综上,本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对藏药宽筋藤生物碱类成分进行全面系统地解析,

为后续的深入研究提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 西藏自治区卫生局. 藏药标准 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1979: 77.
- [2] 华太. 风湿性关节炎 23 例藏药五味勒哲汤散治疗的效果 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(94): 39.
- [3] 夏吾杨本. 藏药五味勒哲汤散用于治疗风湿性关节炎临床研究 [J]. 双足与保健, 2017, 26(13): 167.
- [4] 东知多杰, 拉毛吉. 藏药五味勒哲汤散治疗风湿性关节炎的临床观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21(6): 15.
- [5] 王凤云, 戴岳, 俞桂新, 等. 生物碱治疗类风湿性关节炎的研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(3): 74-77.
- [6] Wang X, He X, Zhang C F, *et al.* Anti-arthritis effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 887-893.
- [7] Qiu H W, Sun S N, Ma X M, *et al.* Jatropha hydrochloride suppresses proliferation, migration, and secretion of synoviocytes *in vitro* and ameliorates rat models of rheumatoid arthritis *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1514.
- [8] 杨光忠, 李庆庆, 徐晓诗, 等. 藏药宽筋藤化学成分的研究 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2019, 38(4): 547-550.
- [9] 吴丽媛, 关世侠, 姜月霞, 等. 海南青牛胆化学成分与药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 177-180.
- [10] 郭凤霞. 宽筋藤化学成分研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [11] 孙雅婷, 王傲莉, 李达翔, 等. 青牛胆含氮类成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1287-1291.
- [12] 马亚娟, 白文婷, 朱小芳, 等. 青牛胆属药用植物研究进展 [J]. 中南药学, 2017, 15(12): 1733-1738.
- [13] 赵成刚. 青牛胆属植物化学成分及药理研究进展 [J]. 铜仁学院学报, 2013, 15(4): 136-139.
- [14] Morris J S, Dastmalchi M, Li J, *et al.* Plug-and-play benzylisoquinoline alkaloid biosynthetic gene discovery in engineered yeast [J]. *Methods Enzymol*, 2016, 575: 143-178.
- [15] Lin Z T, Yang R N, Guan Z, *et al.* Ultra-performance LC separation and quadrupole time-of-flight MS identification of major alkaloids in *Plumula Nelumbinis* [J]. *Phytochem Analysis*, 2014, 25(6): 485-494.
- [16] Deng X B, Zhu L P, Fang T, *et al.* Analysis of isoquinoline alkaloid composition and wound-induced variation in *Nelumbo* using HPLC-MS/MS [J]. *J Agr Food Chem*, 2016, 64(5): 1130-1136.
- [17] Loeffler S, Deus-Neumann B, Zenk M H. S-adenosyl-L-methionine: (S)-coclaurine-N-methyltransferase from *Tinospora cordifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(6): 1387-1395.

- [18] Zheng X J, Zheng W L, Zhou J J, *et al.* Study on the discrimination between *Corydalis Rhizoma* and its adulterants based on HPLC-DAD-Q-TOF-MS associated with chemometric analysis [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1090: 110-121.
- [19] 余坤, 左姿, 卿志星, 等. 基于异喹啉生物碱质谱裂解规律推断博落回茎中的生物碱 [J]. *中国现代中药*, 2016, 18(3): 296-302.
- [20] Zuo Z, Zheng Y J, Liang Z T, *et al.* Tissue-specific metabolite profiling of benzyloquinoline alkaloids in the root of *Macleaya cordata* by combining laser microdissection with ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2017, 31(5): 397-410.
- [21] Le P M, McCooeye M, Windust A. Application of UPLC-QTOF-MS in MS^E mode for the rapid and precise identification of alkaloids in goldenseal (*Hydrastis canadensis*) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406(6): 1739-1749.
- [22] Manosalva L, Mutis A, Diaz J, *et al.* Identification of isoquinoline alkaloids from *Berberis microphylla* by HPLC ESI-MS/MS [J]. *Boletin Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 2014, 13(4): 324-335.
- [23] Yuan L, Yin J, Tian M, *et al.* The classification and identification of complex chemical compositions in Yanhusuo herb using UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Anal Methods-UK*, 2016, 8(10): 2274-2281.
- [24] Xian X Y, Sun B H, Ye X T, *et al.* Identification and analysis of alkaloids in cortex *Phellodendron amurense* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry coupled with photodiode array detection [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(13): 1533-1545.
- [25] Yang S G, He J Y, Kang Y, *et al.* Structural characterisation of alkaloids in leaves and roots of *Stephania kwangsiensis* by LC-QTOF-MS [J]. *Phytochem Analysis*, 2018, 29(1): 101-111.
- [26] Zhang Y F, Shi Q R, Shi P Y, *et al.* Characterization of isoquinoline alkaloids, diterpenoids and steroids in the Chinese herb Jin-Guo-Lan (*Tinospora sagittata* and *Tinospora capillipes*) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multistage mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2006, 20(15): 2328-2342.
- [27] Bajpai V, Kumar S, Singh A, *et al.* Metabolic fingerprinting of dioecious *Tinospora cordifolia* (Thunb) Miers stem using DART TOF MS and differential pharmacological efficacy of its male and female plants [J]. *Ind Crop Prod*, 2017, 101: 46-53.
- [28] Le P M, McCooeye M, Windust A. Characterization of the alkaloids in goldenseal (*Hydrastis canadensis*) root by high resolution Orbitrap LC-MSⁿ [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(13): 4487-4498.
- [29] Zhong X L, Guo J, Wang L Y, *et al.* Analysis of the constituents in rat serum after oral administration of Fufang Zhenzhu Tiaozhi Capsule by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Chromatographia*, 2012, 75(3/4): 111-129.

[责任编辑 王文倩]