

基于 HPLC-Q-TOF/MS 的白屈菜生物碱化学组成快速辨识研究

赵田园^{1,2}, 王 委³, 戚华文³, 刘艳芳^{2,3}, 金红利^{2,3}, 阎 松^{1*}

(1. 大连交通大学环境与化学工程学院, 辽宁 大连 116028; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 分离分析重点实验室, 辽宁 大连 116023; 3. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国医药城生物医药创新研究院, 江苏 泰州 225316)

摘要: 利用 HPLC-Q-TOF/MS 技术快速准确、系统全面的定性鉴定白屈菜中生物碱。采用 XCharge C18 色谱柱 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 以乙腈-0.1% 甲酸为流动相梯度洗脱; 流速 0.7 mL \cdot min⁻¹。根据一级质谱分子离子和二级质谱碎片离子, 归纳白屈菜生物碱的质谱裂解规律, 结合相关文献, 对白屈菜中生物碱进行系统的结构鉴定。为验证结果的准确性, 纯化制备其中 3 个生物碱并通过核磁技术鉴定化学结构。从白屈菜中鉴定出 21 个生物碱, 包含 1 个阿朴菲类生物碱、3 个普罗托品类生物碱、11 个苯并菲啶类生物碱以及 6 个原小檗碱类生物碱。其中 *N*-甲基罂粟碱 (**8**) 为白屈菜中首次报道, 二氢黄连碱 (**11**) 和去甲基白屈菜碱 (**12**) 为白屈菜中首次用该技术鉴定。制备化合物的化学结构鉴定结果与质谱定性结果一致。经验证, 该方法快速准确, 可为白屈菜化学成分的分析鉴定和提取分离提供依据。

关键词: HPLC-Q-TOF/MS; 白屈菜; 生物碱; 结构鉴定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)06-1273-09

Rapid identification of the alkaloids of *Chelidonium majus* L. by HPLC-Q-TOF/MS

ZHAO Tian-yuan^{1,2}, WANG Wei³, QI Hua-wen³, LIU Yan-fang^{2,3}, JIN Hong-li^{2,3}, YAN Song^{1*}

(1. College of Environmental and Chemical Engineering, Dalian Jiaotong University, Dalian 116028, China; 2. Key Lab of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 3. Innovation Institute of Medicine, China Medical City, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Taizhou 225316, China)

Abstract: A method was developed for the rapid and systematic identification of alkaloids in *Chelidonium majus* L. by HPLC-Q-TOF/MS. The separation was performed on an XCharge C18 column (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) with acetonitrile-0.1% formic acid in water by gradient elution. The flow rate was 0.7 mL \cdot min⁻¹. The primary mass spectrometer molecular ion and the secondary mass spectrometry fragment ion were determined. The mass spectrometric cleavage of alkaloids was determined and the structures were used to systematically identify the alkaloids in *Chelidonium majus* L. To verify the accuracy of the qualitative results, three alkaloids were purified and identified by NMR. Twenty-one alkaloids were identified from *Chelidonium majus* L., including one aporphine-type alkaloid, three protopine-type alkaloids, 11 benzophenanthrine-type alkaloids and six protoberberine-type alkaloids. (*S*)-*N*-methylstylopine (**8**) was first reported in *Chelidonium majus* L. and dihydrocoptisine (**11**) and norchelidonine (**12**) were identified for the first time in *Chelidonium majus* L. using this technique. The chemical structures of the purified compounds are consistent with the qualitative results of the mass spectrometric analysis. The method

收稿日期: 2020-01-05; 修回日期: 2020-03-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51408094).

*通讯作者 Tel: 15840840642, E-mail: 1159886936@qq.com;

Tel: 18698625669, E-mail: yansong209@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0009

is fast and accurate and can provide a basis for the identification and extraction of the chemical constituents of *Chelidonium majus* L.

Key words: HPLC-Q-TOF/MS; *Chelidonium majus* L.; alkaloid; structure identification

白屈菜是罂粟科白屈菜属植物白屈菜 (*Chelidonium majus* L.) 的干燥全草, 别名地黄连、牛金花、土黄连等^[1]; 味苦、性凉、有毒; 全草入药具有镇痛、止咳、利尿、解毒的功效, 主治胃痛、腹痛、肠炎、痢疾等^[2], 分布于东北、华北地区及长江中下游和四川、陕西、新疆等省区^[3]。国内外研究表明其主要有效成分是异喹啉类生物碱。目前发现的生物碱主要属于苯并菲啶类、原小檗碱类、普罗托品类、二聚苯并菲啶类等, 而异喹啉类生物碱中的二氢苯并菲啶类、阿朴菲类鲜有报道, 并且生物碱鉴定方法多为核磁共振等传统手段, 鉴定周期长且方法复杂。因此有必要对白屈菜中化学成分的鉴定进行进一步研究。本研究采用 HPLC-Q-TOF/MS 技术对白屈菜中的生物碱进行分析鉴定, 并对定性结果进行验证, 为其化学成分的进一步研究和药物基础研究提供科学依据。

材料与方法

仪器与试剂 岛津高效液相色谱 LC-20AD-四级杆飞行时间质谱仪 SCIEX 500B Q-TOF (美国 AB SCIEX 公司); Milli-Q gradient 超纯水仪 (德国默克公司); XS105DU 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司)。实验试剂: 乙腈, HPLC 级 (德国默克公司); 甲酸, HPLC 级, 纯度 $\geq 96\%$ (美国 Sigma Aldrich 公司)。样品来源: 白屈菜 (*Chelidonium majus* L.) 药材来自河北承德, 采购于云天中药材公司, 经大连化物所高级工程师杨小平鉴定为白屈菜全草。对照品来源: 实验室制备与核磁鉴定得到 *N*-甲基金罂粟碱 [(*S*)-*N*-methylstylopine], 纯度为 99.81%; 二氢黄连碱 (dihydrocoptisine), 纯度为 98.67%; 去甲基白屈菜碱 (norchelidonine), 纯度为 96.50%。

供试品溶液的制备 白屈菜药材采用高压渗漉柱用 70% 乙醇提取, 浓缩成浸膏状, 然后用二氯甲烷萃

取后浓缩制干得白屈菜总碱。取白屈菜总碱样品 10 mg 溶于 50% 乙腈-水 1 mL 中, 超声 5 min, 过 0.22 μm 膜, 稀释 10 倍后供试用。

对照品溶液的制备 取 *N*-甲基金罂粟碱、二氢黄连碱、去甲基白屈菜碱各 1 mg 溶于 50% 乙腈-水 1 mL 中, 超声 5 min, 过 0.22 μm 膜, 稀释 10 倍后作为对照品溶液。

液相色谱条件 色谱柱: XCharge C18 柱 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水 (抽滤过膜); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 300 nm; 流速: 0.7 mL \cdot min⁻¹; 进样量: 2 μL ; 洗脱条件 (0~30 min, 13%~20% A, 30~40 min, 20%~45% A, 40~60 min, 45%~70% A, 60~70 min, 70%~90% A)。

质谱条件 离子源: ESI 离子源; 正离子模式; 气帘气: 35 psi (1 psi \approx 6.9 kPa); Gas 1: 60 psi; Gas 2: 60 psi; 温度: 620 $^{\circ}\text{C}$; 离子化压力: 5 500 V, 去簇电压: 80 V; 全扫描范围: m/z 50~1 000; 裂解电压: 40 V。CE Spread: 20 V。

数据处理 处理液相色谱数据的软件为岛津 LCsolution, 处理质谱一级和二级碎片数据的软件为 SCIEX OS 软件, 根据得到的质谱碎片数据, 参考相关文献, 推测化合物结构并分类, 归纳化合物质谱裂解规律, 画图软件为 Chemdraw。

结果与讨论

1 HPLC-Q-TOF/MS 主要色谱峰的分析及鉴定

图 1 为白屈菜生物碱以 300 nm 为检测波长的高效液相色谱图, 共检测到 21 个生物碱化合物。根据归纳的质谱规律和对照品验证对检测到的生物碱类化合物进行定性分析。图 1 中各色谱峰的保留时间、光谱信息、二级质谱数据和表征结果见表 1。将以 21 个生物碱为例对白屈菜中生物碱进行结构鉴定。

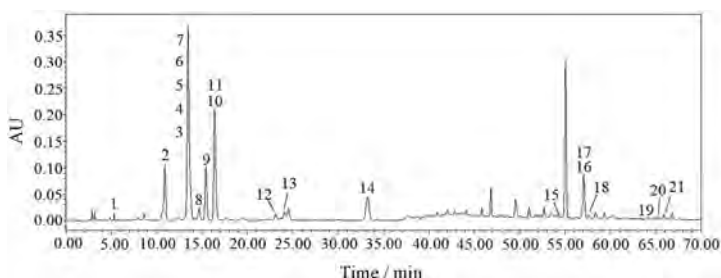


Figure 1 Representative base peak chromatograms of *Chelidonium majus* L. extract (300 nm). Chromatographic peaks 1–21 are identified alkaloids, and several unlabeled peaks are non-alkaloid components. The peak numbers were in accordance with Table 1

Table 1 Qualitative results of *Chelidonium majus* L. characteristic peak by HPLC-Q-TOF/MS. Twenty-one isoquinoline alkaloids including one aporphine-type alkaloids (No. 1), three protopine-type alkaloids(No. 2, 3, 6), and 12 benzophenanthrine-type alkaloids (No. 4, 5, 7, 12, 13, 15–20) and five protoberberine-type alkaloids (No. 8–11, 14, 21)

No.	t_R /min	Experimental mass (MS) m/z	Calculated mass m/z	Error (ppm)	Fragment ion (MS/MS) m/z	Compound	Formula
1	5.407	342.173 5	342.170 0	10.23	297, 282, 265, 237, 209, 181	Magnoflorine	$C_{20}H_{24}NO_4^+$
2	11.332	354.136 4	354.133 6	7.91	336, 306, 206, 189, 188, 165, 160, 149	Protopine	$C_{20}H_{19}NO_5$
3	13.131	370.168 9	370.164 9	10.81	352, 336, 206, 190, 188, 165, 160, 158	Allocryptopine	$C_{21}H_{23}NO_5$
4	13.181	354.135 9	354.133 6	6.49	336, 323, 305, 275	Chelidonine	$C_{20}H_{19}NO_5$
5	13.225	370.168 7	370.164 9	10.27	352, 336, 290, 275, 206, 188	Homochelidonine	$C_{21}H_{23}NO_5$
6	13.284	370.168 7	370.164 9	10.27	340, 339, 291, 290	Cryptopine	$C_{21}H_{23}NO_5$
7	13.286	370.124 8	370.128 5	-9.99	352, 339, 321, 291	Chelamine	$C_{20}H_{19}NO_6$
8	14.469	338.141 0	338.138 7	6.80	190, 188, 149	(S)-N-Methylstylopine	$C_{20}H_{20}NO_4^+$
9	15.159	324.125 4	324.123 0	7.40	307, 249, 188, 176, 149	Tetrahydrocoptisine	$C_{19}H_{17}NO_4$
10	16.262	320.093 9	320.091 7	6.87	318, 292, 277, 262	Coptisine	$C_{19}H_{14}NO_4^+$
11	16.268	322.119 1	322.117 4	5.28	294, 279, 264	Dihydrocoptisine	$C_{19}H_{16}NO_4^+$
12	23.859	340.125 4	340.127 9	-7.35	323, 322, 292	Norchelidonine	$C_{19}H_{17}NO_5$
13	24.238	332.095 5	332.091 7	11.44	317, 304, 274, 246	Sanguinarine	$C_{20}H_{14}NO_4^+$
14	33.343	336.125 7	336.123 0	8.03	321, 320, 306, 292, 278	Berberine	$C_{20}H_{18}NO_4^+$
15	54.377	380.079 5	380.079 2	0.78	348, 318, 290, 264	6-Methoxydihydrocheleryth	$C_{22}H_{21}NO_5$
16	57.187	348.088 5	348.086 6	5.46	333, 320, 319, 305, 275, 262	Oxysanguinarine	$C_{20}H_{13}NO_5$
17	57.229	348.127 3	348.123 0	12.35	333, 332, 318, 302, 290, 260	Chelerythrine	$C_{21}H_{18}NO_4^+$
18	57.333	364.120 5	364.117 9	7.14	349, 332, 306, 304, 291	6-Methoxydihydrosanguinarine	$C_{21}H_{17}NO_5$
19	64.351	350.141 1	350.138 7	6.85	335, 334, 319, 290	Dihydrochelerythrine	$C_{21}H_{19}NO_4$
20	65.823	334.109 5	334.107 4	6.29	319, 318, 304, 276, 232	Dihydrosanguinafine	$C_{20}H_{15}NO_4$
21	65.844	334.109 5	334.107 4	6.29	319, 304, 290, 276, 261	Corysamine	$C_{20}H_{16}NO_4^+$

1.1 苯并菲啶类生物碱

白屈菜中的白屈菜明碱、白屈菜红碱、血根碱等均为苯并菲啶类生物碱, 这类生物碱的质谱裂解规律为:

① 为大 π 共轭系统, 母核一般很难裂解, 仅有一些取代基的丢失; ② 如果含有羟基, 则会丢失此羟基或者一分子水形成 $[M-17]^+$ 或 $[M-18]^+$ 的离子碎片^[4]; ③ 如果存在邻二甲氧基, 则会失去1分子甲基后再失去1个氢从而形成亚甲二氧基; ④ 如果含有亚甲二氧基则会直接丢失1分子CO和2个氢从而形成一个稳定的三元氧环; ⑤ 如果含有甲氧基, 这个甲氧基会失去1分子甲基后形成羰基, 然后丢失一分子CO形成五元环; ⑥ 如果苯并菲啶类生物碱的5位或者6位含有甲氧基或者甲基, 则会直接失去这个甲氧基或者甲基而形成 $[M-31]^+$ 或者 $[M-15]^+$ 的质谱碎片^[5]。

1.1.1 六氢苯并菲啶类 六氢苯并菲啶类生物碱大多数都含有羟基, 较易丢失羟基或者一分子水形成相应的离子碎片。化合物**4**, 离子化分子量为 m/z 354.135 9 ($C_{20}H_{19}NO_5$), 此化合物碎片 m/z 336 $[M+H-H_2O]^+$ 是分子离子失去水分子所致, m/z 323 $[M+H-CO-3H]^+$ 表示存在亚甲二氧基, 直接丢失一分子CO和2H形成稳定的三元氧环, 通过剩余碎片 m/z 305 $[M+H-CO-3H-H_2O]^+$ 和 m/z 275 $[M+H-CO-3H-H_2O-CO-2H]^+$ 推测分子中存在两个亚甲二氧基, 参考文献[6], 推断化合物**4**

为白屈菜碱。化合物**5**, 离子化分子量为 m/z 370.168 7 ($C_{21}H_{23}NO_5$), 丢失一分子水后碎片为 m/z 352 $[M+H-H_2O]^+$, 碎片 m/z 336 $[M+H-H_2O-CH_3-H]^+$ 可推测此化合物中存在邻二甲氧基, m/z 290 $[M+H-H_2O-CH_3-H-CO-2H]^+$ 继续丢失CO和2个氢形成稳定三元氧环, 参考文献[7], 推断化合物**5**为高白屈菜碱。化合物**12**, 离子化分子量为 m/z 340.125 4 ($C_{19}H_{17}NO_5$), 失去羟基和1个氢后得到 m/z 323 $[M+H-OH]^+$ 和 m/z 322 $[M+H-OH-H]^+$ 的离子碎片, m/z 292 $[M+H-OH-H-CO-2H]^+$ 是丢失CO和2个氢形成稳定的三元氧环, 综上所述, 推断化合物**12**为去甲基白屈菜碱。化合物**7**, 离子化分子量为 m/z 370.124 8 ($C_{20}H_{19}NO_6$), m/z 352 $[M+H-H_2O]^+$ 为水分子的掉落, m/z 339 $[M+H-CO-3H]^+$ 和 m/z 291 $[M+H-CO-3H-H_2O-CO-2H]^+$ 为两个亚甲二氧基形成三元氧环, 参考文献[8], 推断化合物**7**为白屈菜明碱。白屈菜明碱二级质谱图见图2(a), 质谱裂解途径见图3。

1.1.2 二氢苯并菲啶类 二氢苯并菲啶类生物碱质谱裂解规律很明显, 会先失去5位或者6位的取代基形成较稳定的相对应的苯并菲啶类生物碱, 然后裂解规律就与相应的苯并菲啶类生物碱相似, 如6位的取代基为氢、甲基、羟基、甲氧基等则会相应的失去这些取代基。

化合物**15**, 离子化分子量为 m/z 380.079 5 ($C_{22}H_{21}NO_5$), 碎片 m/z 348 $[M+H-CH_3O-H]^+$ 先失去6

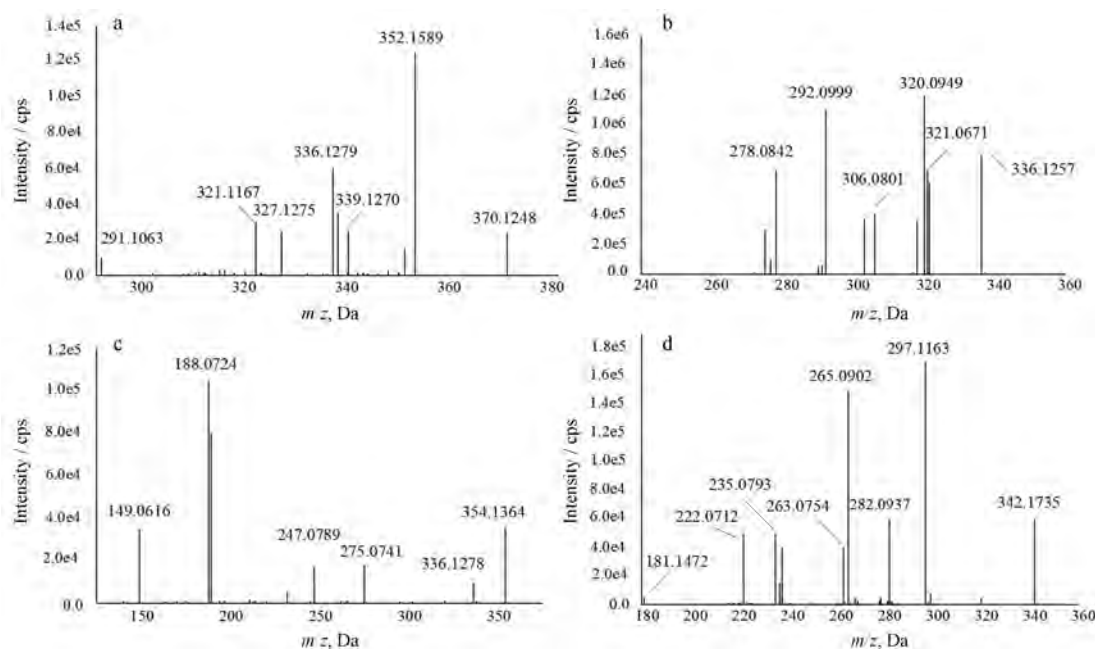


Figure 2 Fragment ions (MS/MS) mass spectrum of chelamine (a), berberine (b), protopine (c) and magnoflorine (d)

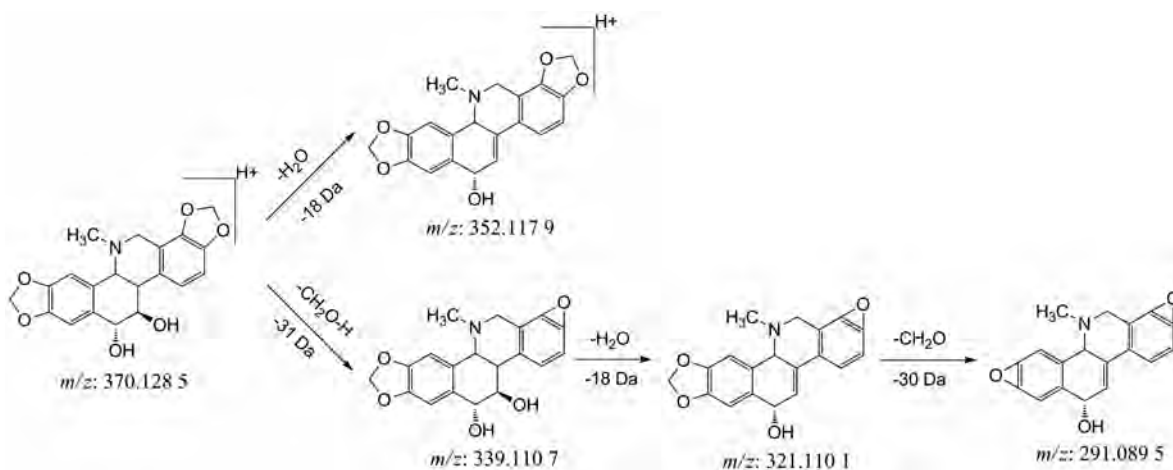


Figure 3 The mass cleavage pathway of chelamine

号位的甲氧基形成白屈菜红碱, m/z 318 $[M+H-CH_3O-H-2CH_3]^+$ 、 m/z 290 $[M+H-CH_3O-H-2CH_3-CO]^+$ 和 m/z 264 $[M+H-CH_3O-H-2CH_3-2CO+2H]^+$ 证明了裂解途径和白屈菜红碱相似, 参考文献[9], 推断化合物 15 为 6-甲氧基二氢白屈菜红碱。化合物 16, 离子化分子量为 m/z 348.086 6 ($C_{20}H_{13}NO_5$), 离子碎片 m/z 333 $[M+H-CH_3]^+$ 是丢失 5 号位的甲基形成, m/z 320 $[M+H-CO]^+$ 、 m/z 319 $[M+H-CO-H]^+$ 、 m/z 305 $[M+H-CO-CH_3]^+$ 和 m/z 275 $[M+H-2CO-CH_3-2H]^+$ 碎片裂解途径与血根碱一致, 参考文献[10], 推断化合物 16 为氧化血根碱。化合物 17, 离子化分子量为 m/z 348.127 3 ($C_{21}H_{18}NO_4^+$), 离子碎片显示有两种裂解途径, 一条为离子碎片 m/z 333 $[M+H-CH_3]^+$ 、 m/z 332 $[M+H-CH_3-H]^+$ 、 m/z 302 $[M+H-$

$CH_3-H-CH_2O]^+$ 邻二甲氧基丢失一个甲基后形成亚甲二氧基, 继续丢失一分子 CO 后形成稳定的三元氧环, 另一条为 m/z 318 $[M+H-2CH_3]^+$ 、 m/z 290 $[M+H-2CH_3-CO]^+$ 、 m/z 260 $[M+H-2CH_3-CO-CH_2O]^+$, 邻二甲氧基丢失两个甲基后形成两个羰基, 继续失去一个羰基后形成五元环, 参考文献[11], 推测化合物 17 为白屈菜红碱。化合物 18, 离子化分子量为 m/z 364.117 9 ($C_{21}H_{17}NO_5$), 失去 5 号位的甲基形成碎片离子 m/z 349 $[M+H-CH_3]^+$, 也会丢失 6 号位的甲氧基形成碎片 m/z 332 $[M+H-CH_3O-H]^+$, 碎片 m/z 304 $[M+H-CH_3O-H-CO]^+$ 表明有亚甲二氧基形成了三元氧环, 参考文献 [12], 推断化合物 18 为 6-甲氧基二氢血根碱。化合物 19, 离子化分子量为 m/z 350.138 7 ($C_{21}H_{19}NO_4$), 碎片离

子 m/z 335 $[M+H-CH_3]^+$ 和 m/z 334 $[M+H-CH_3-H]^+$ 为化合物丢失甲基形成, 碎片 m/z 319 $[M+H-H-2CH_3]^+$ 和 m/z 290 $[M+H-H-2CH_3-CO]^+$ 可以看出裂解与白屈菜红碱相似, 参考文献[4], 推测化合物 **19** 为二氢白屈菜红碱。化合物 **20**, 离子化分子量为 m/z 334.109 5 ($C_{20}H_{15}NO_4$), 离子碎片 m/z 318 $[M+H-H-CH_3]^+$, m/z 304 $[M+H-H-CO]^+$, m/z 276 $[M+H-H-2CO]^+$ 为丢失一个甲基和形成两个稳定的三元氧环, 参考文献[4], 推测化合物 **20** 为二氢血根碱。

1.1.3 苯并菲啶季铵类 苯并菲啶季铵碱自带一个电子, 在质谱分析中本身就呈离子化出现。化合物 **13**, 离子化分子量为 m/z 332.095 5 ($C_{20}H_{14}NO_4^+$), m/z 317 $[M-CH_3]^+$ 是分子离子失去氮甲基形成, m/z 304 $[M-CO]^+$ 和 m/z 274 $[M-2CO]^+$ 总共失去两分子 CO, 推测分子中存在两个亚甲二氧基, 参考文献[13], 推断化合物 **13** 为血根碱。

1.2 原小檗碱类生物碱

小檗碱、黄连碱、紫堇沙明碱等属于原小檗碱类生物碱, 这类生物碱的质谱裂解规律与苯并菲啶类生物碱相似, 不同的是: ① 如果 C-3 或 C-13 位含有羟基, 母核会直接失去 1 分子的 H_2O 从而形成 $[M-18]^+$ 的碎片; ② 由于 C-5,6 位碳碳单键的存在, 使母核很容易失去 2 个氢而形成稳定的大 π 共轭系统; ③ 裂解形成三元氧环后还可以继续丢失一分子 CO 发生分子重排, 母核会形成一个五元环; ④ 有些原小檗碱会发生 RDA 裂解与 α 裂解, 如四氢小檗碱^[14-17]。

化合物 **8**, 离子化分子量为 m/z 338.141 0 ($C_{20}H_{20}NO_4^+$), 产生了丰度较大的碎片 m/z 190 $[M-C_9H_9O_2]^+$ 和 m/z 149 $[M-C_{11}H_{12}NO_2]^+$, 表明化合物发生了 RDA 和 α 裂解, 综上所述, 推断化合物 **8** 为 *N*-甲基金罂粟碱。化合物 **10**, 离子化分子量为 m/z 320.093 9

($C_{19}H_{14}NO_4^+$), 母核失去两个氢形成稳定的大 π 离子碎片 m/z 318 $[M-2H]^+$, 碎片 m/z 292 $[M-CO]^+$ 和 m/z 262 $[M-CO-2H-CO]^+$ 可以推测为亚甲二氧基形成三元环后又丢失一分子 CO 形成稳定的五元环, 参考文献[11], 推断化合物 **10** 为黄连碱。化合物 **11**, 离子化分子量为 m/z 322.119 1 ($C_{19}H_{16}NO_4^+$), 碎片 m/z 294 $[M-CO]^+$ 和 m/z 264 $[M-CO-2H-CO]^+$ 表明有两个亚甲二氧基存在, 结合分子量和元素组成分析, 推测化合物 **11** 为二氢黄连碱。化合物 **9**, 离子化分子量为 m/z 324.125 4 ($C_{19}H_{17}NO_4$), 裂解途径比较特别, 碎片 m/z 176 $[M+H-C_9H_8O_2]^+$ 和 m/z 149 $[M+H-NC_{10}H_9O_2]^+$ 可以看出化合物发生了丰度较大的碎片裂解, 可能发生 RDA 裂解与 α 裂解, 结合参考文献[18], 推断化合物 **9** 为四氢黄连碱。化合物 **14**, 离子化分子量为 m/z 336.123 0 ($C_{20}H_{18}NO_4^+$), 碎片 m/z 320 $[M-CH_3-H]^+$ 为邻甲氧基形成亚甲二氧基, 碎片 m/z 306 $[M-2CH_3]^+$ 或 m/z 306 $[M-CH_2O]^+$ 表明有两种裂解途径, 失去两个甲基形成两个羰基或者亚甲二氧基, 形成稳定的三元氧环, 碎片 m/z 278 $[M-CH_2O-CO]^+$ 为三元氧环失去一分子 CO 发生分子重排形成五元环, 参考文献[15], 推测化合物 **14** 为小檗碱。化合物 **21**, 离子化分子量为 m/z 334.109 5 ($C_{20}H_{16}NO_4^+$), 碎片 m/z 319 $[M-CH_3]^+$ 为丢失一分子甲基, m/z 304 $[M-CH_2O]^+$ 为形成三元氧环, 结合参考文献[3], 推测化合物 **21** 为紫堇沙明碱。小檗碱二级质谱图见图 2(b), 质谱裂解途径见图 4。

1.3 普罗托品类生物碱

普罗托品类生物碱质谱裂解有如下规律: ① 普罗托品类生物碱母核大多是含有羰基的十元环, 该环一般会丢失羰基和一个氢形成两个六元环; ② 普罗托品类生物碱没有大 π 共轭体系, 母核易断裂发生 RDA 和 α 裂解, 裂解后的碎片会继续失去一些取代基碎片, 如丢失

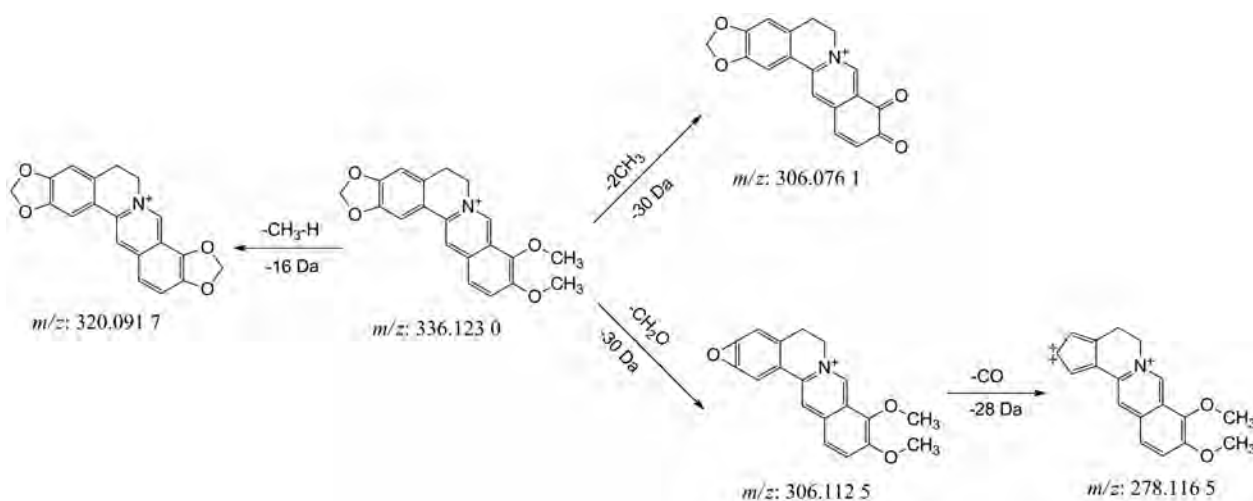


Figure 4 The mass cleavage pathway of berberine

羟基或水分子形成 $[M-17]^+$ 或者 $[M-18]^+$ 的碎片峰^[19,20]。

化合物 **2**, 离子化分子量为 m/z 354.133 6 ($C_{20}H_{19}NO_5$), 碎片 m/z 336 $[M+H-H_2O]^+$ 和 m/z 306 $[M+H-H_2O-CO-2H]^+$ 是化合物丢失羰基后形成六元环, 然后亚甲二氧基继续形成三元氧环, 碎片 m/z 206 $[M+H-C_9H_8O_2]^+$ 和 m/z 149 $[M+H-NC_{11}H_{12}O_3]^+$ 丰度较大, 为发生了 RDA 裂解, 碎片 m/z 165 $[M+H-NC_{11}H_{13}O_2]^+$ 为发生了 α 裂解, 碎片 m/z 189 $[M+H-C_9H_8O_2-OH]^+$ 、 m/z 188 $[M+H-C_9H_8O_2-H_2O]^+$ 、 m/z 160 $[M+H-C_9H_8O_3-CO-2H]^+$ 为 RDA 和 α 裂解后碎片丢失羰基、水分子和形成三元氧环, 参考文献[17], 推断化合物 **2** 为原阿片碱。化合物 **3**, 离子化分子量为 m/z 370.164 9 ($C_{21}H_{23}NO_5$), 碎片 m/z 352 $[M+H-H_2O]^+$ 和 m/z 336 $[M+H-H_2O-CH_3-H]^+$ 为化合物丢失羰基后又丢失 CH_4 形成亚甲二氧基, 碎片 m/z 206 $[M+H-C_9H_8O_3]^+$ 和 m/z 165 $[M+H-NC_{12}H_{15}O_2]^+$ 是发生了 RDA 和 α 裂解, 碎片 m/z 190 $[M+H-C_9H_8O_3-CH_3-H]^+$ 为 RDA 裂解后碎片又丢失 CH_4 形成亚甲二氧基, 参考文献[17], 推断化合物 **3** 为别隐品碱。化合物 **6**, 离子化分子量为 m/z 370.168 9 ($C_{21}H_{23}NO_5$), 碎片有 m/z 340 $[M+H-CO-2H]^+$ 、 m/z 339 $[M+H-CO-2H-H]^+$ 、 m/z 290 $[M+H-CO-2H-H-CH_2O-H_2O-CH_3-H]^+$, 结合文献[21], 推断化合物 **6** 为隐品碱。原阿片碱二级质谱图见图 2(c), 质谱裂解途径见图 5。

1.4 阿朴菲类生物碱

木兰花碱、紫堇碱、蝙蝠葛碱为阿朴菲类生物碱, 这一类生物碱的质谱裂解规律是如果有氮甲基存在, 这一类生物碱会失去 $(CH_3)_2NH$ 或者 CH_3NH_2 , 只有侧

链的断裂与重组, 不会形成丰度较大的碎片离子。

化合物 **1**, 离子化分子量为 m/z 342.173 5 ($C_{20}H_{24}NO_4^+$), 离子碎片 m/z 297 $[M+H-NC_2H_7]^+$ 侧链断裂后有两种裂解途径, 一种为碎片 m/z 265 $[M+H-NC_2H_7-CH_3-OH]^+$ 、 m/z 237 $[M+H-NC_2H_7-CH_3-OH-CO]^+$ 、 m/z 209 $[M+H-NC_2H_7-CH_3-OH-CO-C_2H_4]^+$ 显示的羟基与甲氧基形成稳定的三元氧环, 又继续丢失一分子 CO 形成母核的五元环, 随后侧链断裂; 另一种为离子碎片 m/z 181 $[M+H-NC_2H_7-CH_3-OH-2CO-C_2H_4]^+$ 显示的甲氧基丢失甲基后形成羰基, 羰基继续丢失一分子 CO 形成母核五元环, 两个羟基丢失一分子水形成五元氧环, 五元氧环断裂又形成一个羰基, 随后侧链断裂, 综上所述, 参考文献[12], 推断化合物 **1** 为木兰花碱。木兰花碱二级质谱图见图 2(d), 质谱裂解途径见图 6。

2 制备生物碱并验证质谱鉴定结果

以 *N*-甲基金罂粟碱 (峰 **8**)、二氢黄连碱 (峰 **11**) 和去甲基白屈菜碱 (峰 **12**) 等 3 个白屈菜中的化合物为例, 对其进行分离纯化和结构鉴定, 验证上节中定性结果的准确性。通过对比保留时间追踪目标化合物的方法从白屈菜三维馏分中成功得到 3 个单体化合物, 经冷冻干燥浓缩成粉末。从图 7 可以看出, 制备获得的生物碱与峰 **8**、**11** 和 **12** 的保留时间一致, 即为目标化合物, 而且其色谱纯度均大于 95%。液相分析结果见图 7。

色谱峰 **8**, 黄褐色粉末, $[M]^+$: 338.141 0, 计算所得分子式 $C_{20}H_{20}NO_4^+$, 338.138 7, 误差为 6.80×10^{-6} 。 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$): δ_H 7.10 (s, 1H), 7.01 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.92~6.86 (m, 2H), 6.14 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 6.06

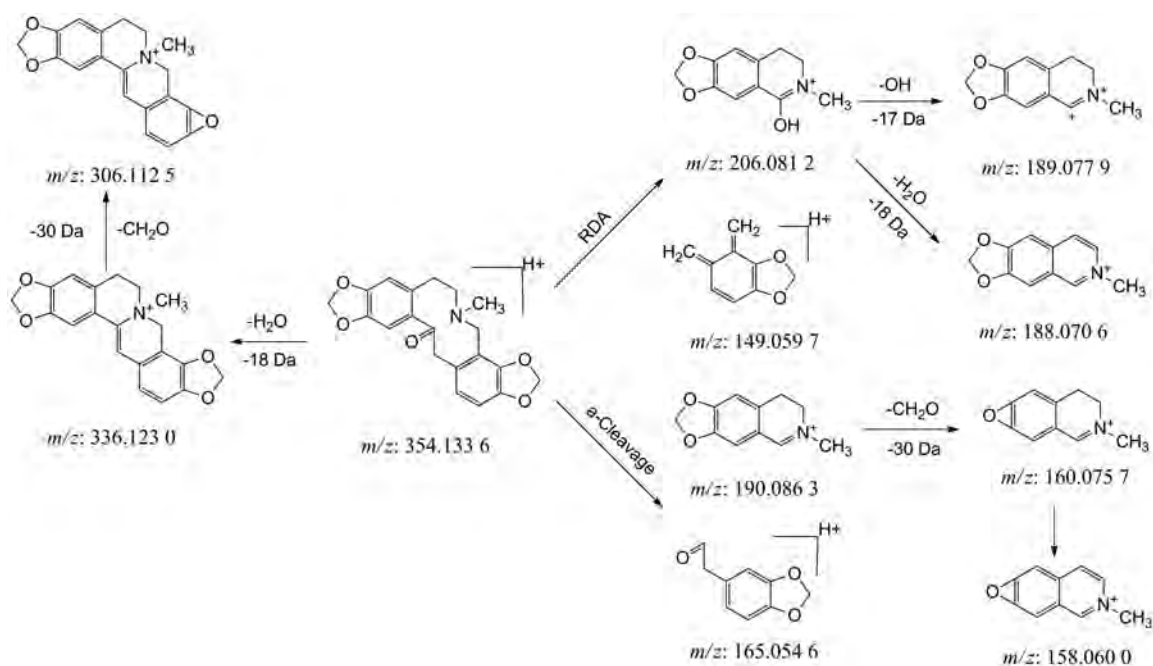


Figure 5 The mass cleavage pathway of protopine

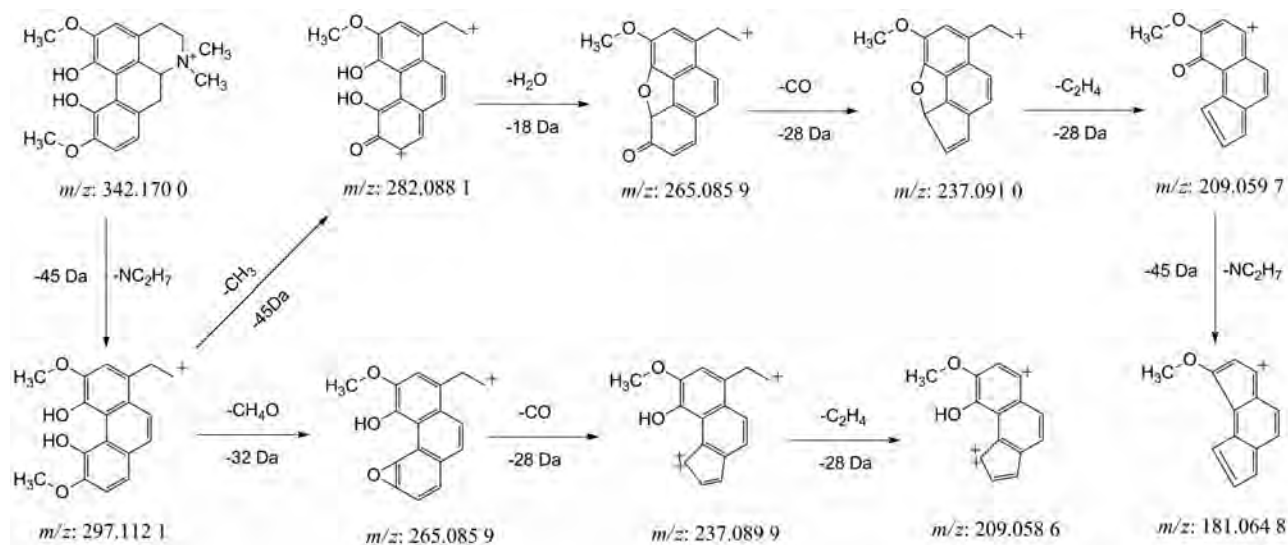


Figure 6 The mass cleavage pathway of magnoflorine

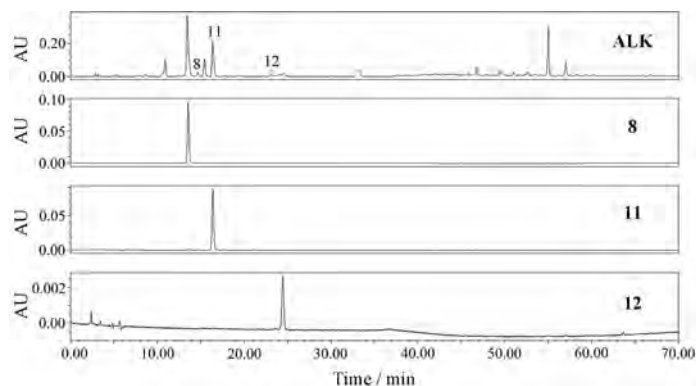


Figure 7 HPLC analysis of *Chelidonium majus* L. total alkaloids extract (ALK) and three alkaloids of (*S*)-*N*-methylstylopine (**8**), dihydrocoptisine (**11**) and norchelidonine (**12**)

(d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 5.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.86 (s, 1H), 3.27 (s, 1H), 3.09 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 17.6, 12.5$ Hz, 1H), 2.86 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_c 106.3 (d, C-1), 124.3 (s, C-1a), 147.5 (s, C-2), 144.3 (s, C-3), 108.9 (d, C-4), 123.4 (s, C-4a), 23.6 (t, C-5), 59.8 (t, C-6), 60.7 (t, C-8), 109.5 (s, C-8a), 147.8 (s, C-9), 146.3 (s, C-10), 109.1 (d, C-11), 122.3 (d, C-12), 124.7 (s, C-12a), 28.4 (t, C-13), 65.8 (d, C-13a), 102.0 (t, $-\text{OCH}_2\text{O}$), 102.4 (t, $-\text{OCH}_2\text{O}$), 39.3 (q, $-\text{N-CH}_3$)。以上数据与文献^[22]对比一致, 确定化合物**8**为*N*-甲基罂粟碱 [(*S*)-*N*-methylstylopine]。

色谱峰**11**, 褐色粉末, $[\text{M}]^+$: 322.119 1, 计算所得分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NO}_4^+$, 322.117 4, 误差为 5.28×10^{-6} 。 ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_c 104.0 (d, C-1), 124.5 (s, C-1a), 145.2 (s, C-2), 142.7 (s, C-3), 108.4 (d, C-4), 129.8 (s, C-4a), 29.4 (t, C-5), 48.7 (t, C-6), 48.6 (t, C-8), 109.9 (s, C-

8a), 147.5 (s, C-9), 146.9 (s, C-10), 107.6 (d, C-11), 116.2 (d, C-12), 129.1 (s, C-12a), 96.9 (d, C-13), 141.4 (s, C-13a), 101.3 (t, $-\text{OCH}_2\text{O}$), 101.5 (t, $-\text{OCH}_2\text{O}$)。以上数据与文献^[23]对比一致, 确定化合物**11**为二氢黄连碱 (dihydrocoptisine)。

色谱峰**12**, 淡黄色粉末, $[\text{M}+\text{H}]^+$: 340.125 4, 计算所得分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_5$, 339.127 9, 误差为 -7.35×10^{-6} 。 ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ_c 146.0 (s, C-1), 118.8 (s, C-1a), 147.2 (s, C-2), 110.0 (d, C-3), 121.8 (d, C-4), 127.6 (s, C-4a), 39.4 (d, C-5), 55.0 (d, C-6), 43.5 (t, C-8), 71.6 (d, C-9), 38.7 (t, C-10), 130.3 (s, C-10a), 107.2 (d, C-11), 143.1 (s, C-12), 144.9 (s, C-13), 109.2 (d, C-14), 132.0 (s, C-14a), 101.1 (t, $-\text{OCH}_2\text{O}$), 101.3 (t, $-\text{OCH}_2\text{O}$)。以上数据与文献^[24]对比一致, 确定化合物**12**为去甲基白屈菜碱 (norchelidonine)。上述3个生物碱化学结构见图8, 与上节中鉴定结果完全相同(表1)。

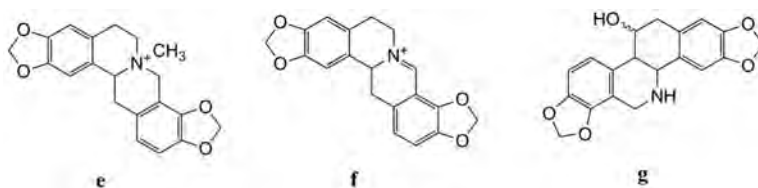


Figure 8 Three alkaloids chemical structures of (*S*)-*N*-methylstylopine (e), dihydrocoptisine (f) and norchelidonine (g)

小结

本实验通过 HPLC-Q-TOF/MS 技术对白屈菜中的生物碱进行分析鉴定, 通过对照品的裂解规律和文献核对, 推断出 21 个生物碱, 其中 *N*-甲基金粟罂碱为白屈菜中首次发现报道, 二氢黄连碱和去甲基白屈菜碱为首次在白屈菜中用该方法鉴定。该方法具有快速、准确、高效等特点, 可以同时得到化合物的保留时间、紫外光谱、相对分子质量及特征结构碎片等丰富的信息, 可以在缺乏对照品确认的情况下快速、准确地指认化学成分, 对天然产物复杂体系中成分的初步定性研究, 以及对生物碱分离纯化工作具有重要意义。

References

- [1] Yuan L. Research progress of comprehensive research in celandine [J]. *J Anhui Agric Sci (安徽农业科学)*, 2015, 43: 15-17, 34.
- [2] Zou X, Wang YM, Wang JQ, et al. Research progress on pharmacological activities of chelidonine [J]. *Drugs Clin (现代药物与临床)*, 2014, 29: 1326-1330.
- [3] Gu Y, Qian DW, Duan JA, et al. Establishment the UPLC specific chromatogram of *Chelidonium majus* L. and its alkaloids compositions analysis by Q-TOF/MS [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2010, 30: 780-786.
- [4] Yang Z, Qing ZX, Xiang F, et al. Identification of isoquinoline alkaloids in *Eomecon chionathe* by HPLC-Q-TOF/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2017, 39: 1439-1443.
- [5] Yu K, Zuo Z, Qin ZX, et al. Identification of alkaloids in *Macleaya cordata* stems based on mass fragmentation rules of isoquinoline alkaloids [J]. *Mod Chin Med (中国现代中药)*, 2016, 18: 296-302.
- [6] Zhou Q, Liu Y, Wang X, et al. A sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of five isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus* L. in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Mass Spectrom*, 2013, 48: 111-118.
- [7] Fleming M, Mcmanus H, Rudolph A, et al. Concise enantioselective total syntheses of (+)-homochelidonine, (+)-chelamidine, (+)-chelidonine, (+)-chelamine and (+)-norchelidonine by a PdII-catalyzed ring-opening strategy [J]. *Chemistry*, 2008, 14: 2112-2124.
- [8] Yang P, Qin ZX, Zuo Z, et al. Identification of isoquinoline alkaloids in *Chelidonium majus* by HPLC-Q-TOF/MS [J]. *Mod Chin Med (中国现代中药)*, 2017, 19: 174-182.
- [9] Xiao HJ. Study on the Chemical Constituents and Their Bioactivities from *Macleaya cordata* (博落回化学成分及其生物活性研究) [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2013.
- [10] Qing ZX, Cheng P, Liu XB, et al. Structural speculation and identification of alkaloids in *Macleaya cordata* fruits by high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with a screening procedure [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2014, 28: 1033-1044.
- [11] Qin ZX, Cheng P, Zeng JG, et al. Research progress on mass spectral fragmentation behaviour of alkaloids in *Macleaya cordata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2013, 44: 2929-2939.
- [12] Cai M, Zhou Y, Wang X, et al. Rapid structural characterization of isomeric benzo[c]phenanthridine alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 1931-1936.
- [13] Hoellinger H, Re M, Deroussent A, et al. Quantitative liquid chromatographic determination of sanguinarine in cell culture medium and in rat urine and plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 799: 195-200.
- [14] Wang D, Liu Z, Guo M, et al. Structural elucidation and identification of alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Mass Spectrom*, 2004, 39: 1356-1365.
- [15] Ma C, Fan M, Tang Y, et al. Identification of major alkaloids and steroidal saponins in rat serum by HPLC-diode array detection-MS/MS following oral administration of Huangbai-Zhimu herb-pair Extract [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22: 835-850.
- [16] Ding B, Zhou T, Fan G, et al. Qualitative and quantitative determination of ten alkaloids in traditional Chinese medicine *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45: 219-226.
- [17] Jeong EK, Lee SY, Yu SM, et al. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26: 1661-1674.
- [18] Wang HS, Yang HR. Studies on alkaloids of *Corydalis dasypterm Maxim* [J]. *Nat Prod Res Devel (天然产物研究与开发)*, 1997, 9: 37-39.

- [19] Liu Q, Zhou B, Wang X, et al. Establishment of a search library about benzyloquinoline alkaloids based on selective separation on the binaphthyl column and standard analysis on C18 column [J]. *J Sep Sci*, 2012, 35: 3317-3325.
- [20] Shi J, Zhang X, Ma Z, et al. Characterization of aromatase binding agents from the dichloromethane extract of *Corydalis yanhusuo* using ultrafiltration and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2010, 15: 3556-3566.
- [21] Li YW, Fang QC, et al. Isoquinoline alkaloids in *Corydalis esquirolii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 1991, 22: 486-488.
- [22] Azimova SS, Yunusov MS. *Natural Compounds Alkaloids* [M]. New York: Springer, 2013: 423.
- [23] Paulsen J, Yahyazadeh M, Hänsel S, et al. 13,14-Dihydrocoptisine-the genuine alkaloid from *Chelidonium majus* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 111: 149-153.
- [24] Daskalova E, Iskrenova E, Kiryakov HG, et al. Minor alkaloids of *Glaucium flavum* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27: 953-955.