DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.01.042

基于 UHPLC－Q－Exactive Focus－MS/MS 技术对陕产附子中生物碱类成分的快速辨识

李莎莎[1],李芳[1],张景霞[2],李凡[1],毛阿娟[1],李雅娟[3],陈曦[4],韩昕[4],王卫锋[1]
[1.陕西省中医药研究院,陕西 西安 710003;2.西安国际医学中心有限公司,陕西 西安 710119;
3.树兰(安吉)医院,浙江 湖州 313399;4.陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046]

摘要:目的 采用超高效液相色谱－四级杆－静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC－Q－Exactive Focus－MS/MS)对陕产附子中的生物碱类成分进行分析和鉴定。方法 采用 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),以乙腈－0.1%甲酸水溶液进行梯度洗脱。使用电喷雾离子源(ESI),正离子模式扫描,扫描范围 m/z 100～1500。结果 通过二级高分辨质谱分析结合对照品及相关文献,共鉴定出228个生物碱类成分,包括 C_{18} 类21种、C_{19} 类145种[双酯型生物碱(DDAs)42种、单酯型生物碱(MDAs)47种、醇胺型生物碱(ADAs)42种、脂类(Lipo－As)14种]、C_{20} 类27种以及其他35种,其中28个化合物为首次从附子或该植物中鉴定出。结论 对附子生物碱类成分进行了较为全面系统的解析,为后续药效物质基础研究及应用开发奠定基础。

关键词:UPLC－Q－Exactive Focus－MS/MS;陕产附子;生物碱;成分分析
中图分类号:R284 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)01-0231-10

Rapid Identification of Alkaloids Components in Shaanxi－produced Crude Fuzi(Aconiti Lateralis Radix Praeparata) Based on UHPLC－Q－Exactive Focus－MS/MS Technique

LI Shasha[1],LI Fang[1],ZHNAG Jingxia[2],LI Fan[1],Mao Ajuan[1],LI Yajuan[3],CHEN Xi[4],HAN Xin[4],WANG Weifeng[1]
[1.Shaanxi Provincial Traditional Chinese Medicine Research Institute,Xi'an 710003,Shaanxi,China;
2.Xi'an International Medical Center,Xi'an 710119,Shaanxi,China;
3.Shulan(Anji) Hospital,Huzhou 313399,Zhejiang,China;
4.Shaanxi University of Chinese Medicine,Xianyang 712046,Shaanxi,China]

Abstract:*Objective* Ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole/electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry(UHPLC－Q Exactive Focus MS/MS) method was developed to rapidly analyze and identify the alkaloids from Shaanxi－produced crude Fuzi(Aconiti Lateralis Radix Praeparata). *Method* The chromatographic separation was performed on the Waters Acquity UPLC BEH C_{18} column(2.1 mm×50 mm,1.7 μm) with acetonitrile－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 modes,and the detection range was *m/z* 100～1500. *Results* The chemical constituents were identified and confirmed by analyzing the mass data from the reference substances and literature. A total of 228 alkaloids were identified,including 21 C_{18} alkaloids,145 C_{19} alkaloids[42 diester diterpenoid alkaloids(DDAs),47 monoester diterpenoid alkaloids(MDAs),42 aminoalcohol－diterpenoid alkaloids(ADAs),14 lipo alkaloids(Lipo－As)],27 C_{20} alkaloids and 35 others,28 of them were discovered for the first time. *Conclusion* The established method systematically analyzed the alkaloids of Shaanxi－produced crude Fuzi(Aconiti Lateralis Radix Praeparata). It provides a reference for the subsequent study of material basis and development of Shaanxi－produced crude Fuzi(Aconiti Lateralis Radix Praeparata).

Keywords:UHPLC－Q Exactive Focus MS/MS;Shaanxi－produced crude Fuzi(Aconiti Lateralis Radix Praeparata);alkaloids;component analysis

---

基金项目:陕西省重点研发计划项目(2024SF－YBXM－481);陕西省中医药管理局中医药全省性专款专项(2021－QYZL－01);陕西省中医药研究院"苗圃培育计划"项目(2021－16)

作者简介:李莎莎(1988－),女,陕西丹凤人,助理研究员,硕士,研究方向:中药新药。
通讯作者:王卫锋(1968－),男,陕西蓝田人,主任药师,硕士,研究方向:中药新药。E-mail:554974456@qq.com。

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 侧根(子根)的加工品,其味辛、甘,性大热;有毒,归心、肾、脾经,始载于《神农本草经》,列于下品,具有回阳救逆,补火助阳及散寒止痛的功效[1],具有“百药之长”“回阳救逆第一要药”“乱世之良将”等美称,附子主产于四川、陕西、湖北、湖南和云南等地,其中四川江油及陕西汉中是附子的传统产区,陕西汉中作为附子的适生区,2009 年获国家地理标志产品保护[2]。在首批公布的一百首经典名方中,真武汤、温脾汤、实脾散、附子汤、桂枝芍药知母汤及地黄饮子中均含有附子。

附子大热,药性峻烈,而且有毒,古今医学家视其为虎狼之药,有“最有用而最难用当推附子”之说[3]。附子的减毒机理主要为毒性成分双酯型生物碱经加热水解为毒性较小的单酯型生物碱,再进一步水解为几乎无毒的醇胺型生物碱[4]。附子总生物碱是附子的主要有效成分,是目前附子中研究最多、特征最为明显的化学成分。此类化合物具有代表性的“效 - 毒”“药 - 证”辨证关系,其含有效物质、毒性物质的种类多少和含量高低等都会影响相关药物的疗效[5]。因此,建立一种灵敏、快速、简便的数据分析方法,对附子中生物碱类成分的全面分析和鉴定、科学阐述其药效物质基础及质量控制具有重要意义。故本研究拟采用超高效液相色谱 - 四级杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC - Q - Exactive Focus - MS/MS)技术对附子中生物碱类成分进行分析鉴定,以期为该药材的质量评价及合理开发利用提供依据。

1 仪器与材料

UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪和 UHPLC - Q - Exactive Focus - MS/MS 型质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),Peak View 数据处理软件,BT25S 型电子分析天平和 BS210S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),KQ - 5200E 台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

乌头碱/Aconitine(批号 CHB180408,≥98%)、新乌头碱/Mesaconitine(批号 CHB180311,≥98%)、次乌头碱/Hypaconitine(批号 CHB180524,≥98%)、苯甲酰新乌头原碱/Benzoylmesaconine(批号 CHB180310,≥98%)、苯甲酰乌头原碱/Benzoylaconitine(批号 CHB180309,≥98%)、苯甲酰次乌头原碱/Benzoylhypacoitine(批号 CHB180307,≥98%)、塔拉地萨敏/Talatisamine(批号 CHB201206,≥98%)、尼奥灵/Neoline(批号 CHB201211,≥98%)、乌头原碱/Aconine(批号 CHB210112,≥98%)、宋果灵/Songorine(批号 CHB201220,≥98%)、去甲猪毛菜碱/Salsolinol(批号 CHB210112,≥98%),上述 11 种对照品购自成都克洛玛科技有限公司;新乌头原碱/Mesaconine(批号 JOT - 0454,99.54%)、多根乌头碱/Karacoline(批号 JOT - 10438,98.52%)、次乌头原碱/Hypaconine(批号 JOT - 10413,97.50%)、附子灵/Fuziline(批号 JOT - 11436,99.21%),均购自成都格利普生物科技有限公司;乙腈、甲酸为色谱级;水为屈臣氏蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

泥附子样品课题组于 2020 年 6 月下旬—2020 年 8 月上旬在陕西省汉中地区实地采集,经王卫锋主任药师鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

取药材粉末(过 3 号筛)约 2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入氨试液 3 mL,精密加入异丙醇 - 乙酸乙酯(1∶1)混合溶液 50 mL,称定,超声处理 30 min,放冷,混合溶液补足减失质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL,40 ℃以下减压回收至干,残渣用甲醇溶解于 25 mL 容量瓶中,滤过,续滤液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2 对照品溶液制备

分别精密称取乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头碱、苯甲酰次乌头碱、苯甲酰新乌头碱、乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱、附子灵、尼奥灵、塔拉萨敏、多根乌头碱、宋果灵对照品适量,加甲醇使溶解,制成混合溶液,即得。

2.3 色谱及质谱条件

2.3.1 色谱条件 采用 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 50 mm,1.7 μm),流动相为乙腈(A) - 0.1% 甲酸水(B),梯度洗脱(0 ~ 20 min,2% →35% A;20 ~ 23 min,35% A→58% A;23 ~ 35 min,58% A→100% A;35 ~ 40 min,2% A),流速 0.3 mL · min^{-1},柱温 30 ℃,进样量 1 μL。

2.3.2 质谱条件 采用加热电喷雾离子源,正离子监测模式。喷雾电压为 3.0 kV,毛细管温度 350 ℃,雾化温度 320 ℃。扫描模式 Full MS/dd - MS^2,Full MS 分辨率 35 000,dd - MS^2 分辨率 17 500,扫描范围 m/z 100 ~ 1500;碰撞能量(CE)设定 20 eV。数据分析采用 Xcalibur 4.0 软件。

2.4 化学成分数据库的建立

借助 CNKI、Pubmed 等数据库检索附子相关文献,全面收集并整理附子所含化合物的名称、分子式、分子量等相关信息,建立附子化学成分信息数据库。借助 Chemical Book 或 Chem Spider 等网络数据库信息,计算正离子模式($[M + H]^+$)下的质荷比数值。

3 结果

3.1 化学成分的鉴定与分析

取泥附子供试品及对照品溶液,按照“2.3”项下条件对供试品溶液和对照品溶液进行检测,获得供试品溶液正离子模式下的总离子流图。见图 1。

本实验中共鉴定了 228 种化合物,其中包括 C_{18} 类 21 种、C_{19} 类 145 种[双酯型生物碱(DDAs) 42 种、单酯型生物碱(MDAs) 47 种、醇胺型生物碱(ADAs) 42 种、14 种脂类(Lipo - As)]、C_{20} 类 27 种以及其他 35 种,其中 15 个化合物通过相应对照品的保留时间、精确相对分子质量和二级质谱图比对,鉴定其结构,见图 2;其他化合物根据测得的各色谱峰的保留时间、准分子离子峰及碎片离子精确相对分子质量信息,采用 Xcalibur 4.0 软件对数据进行分析整理,以实际测得的相对分子质量与理论相对分子质量二者偏差 < 5 ppm 的原则对预测的化学成分进行筛选和初步鉴定,结合建立的附子化学成分数据库对目标化合物进行匹配,对色谱峰进行解析,通过高分辨质谱提供的信息对供试品所含化学成分进行鉴定。

二萜类生物碱是附子中的主要活性成分,也是其主要的毒性成分。附子二萜生物碱根据母核结构中碳原子个数的不同,

可分为 C_{18} 型、C_{19} 型以及 C_{20} 型。见图 3。C_{18} 型生物碱根据 C7 位上是否存在含氧基团分为高乌宁碱型(lappaconines)和冉乌宁碱型(ranaconines)两大类。C_{19} 型生物碱根据 C7 位上是否存在含氧基团分为 aconitine、lycoctonines、pyro - type、lactone - type、7,17 - seco - type 和 rearranged type[6]。C_{18} 型生物碱即 C_{19} 型生物碱失去 C18 位的碳原子,而 C_{19} 型生物碱则是由 C_{20}

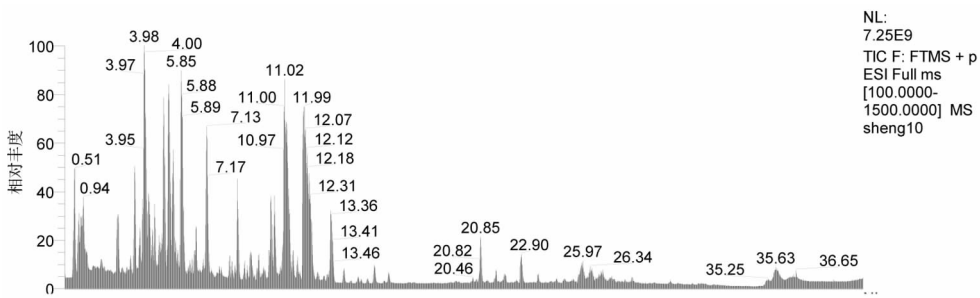


图 1 附子总离子流图

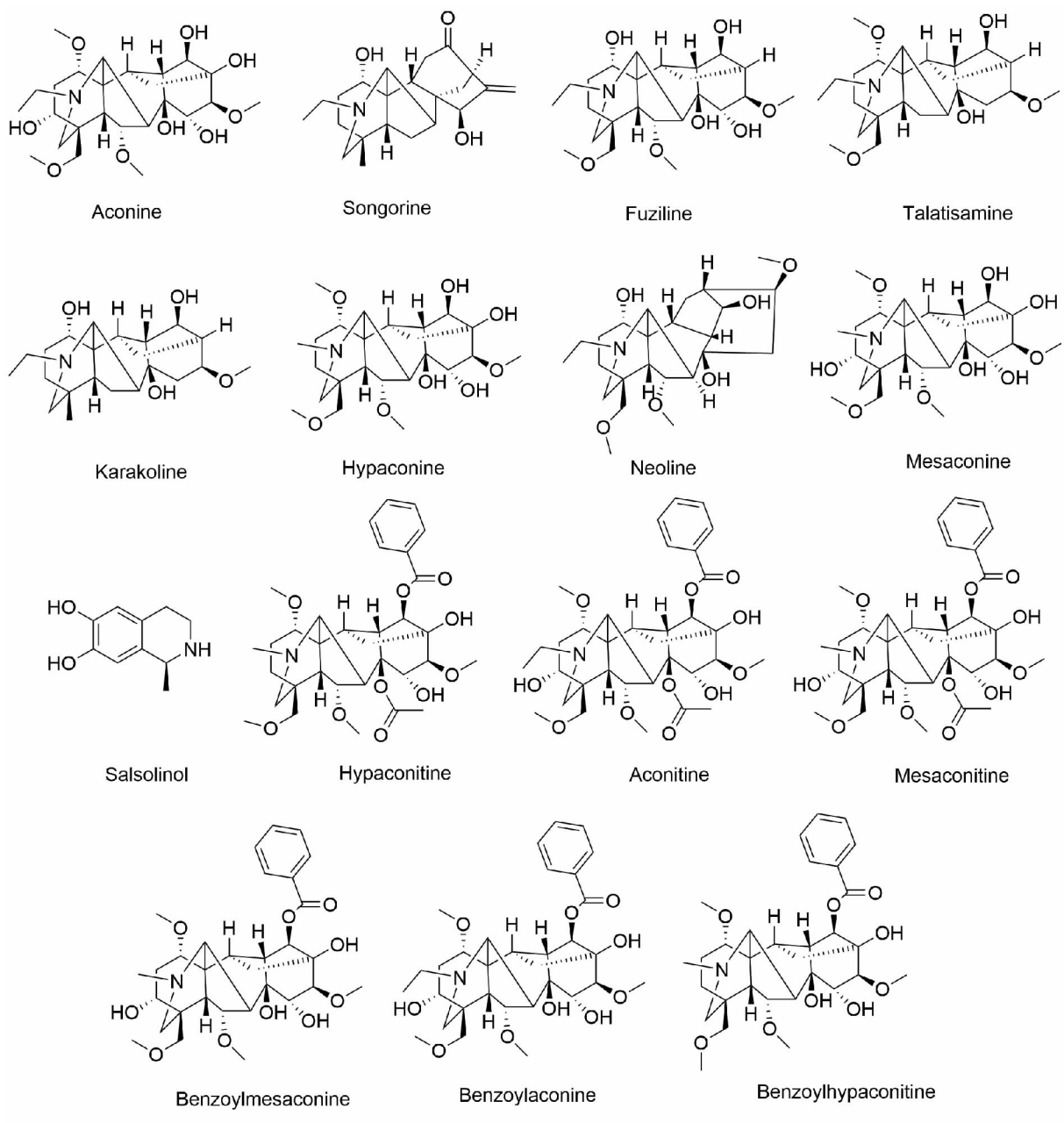


图 2 附子中对照品结构图

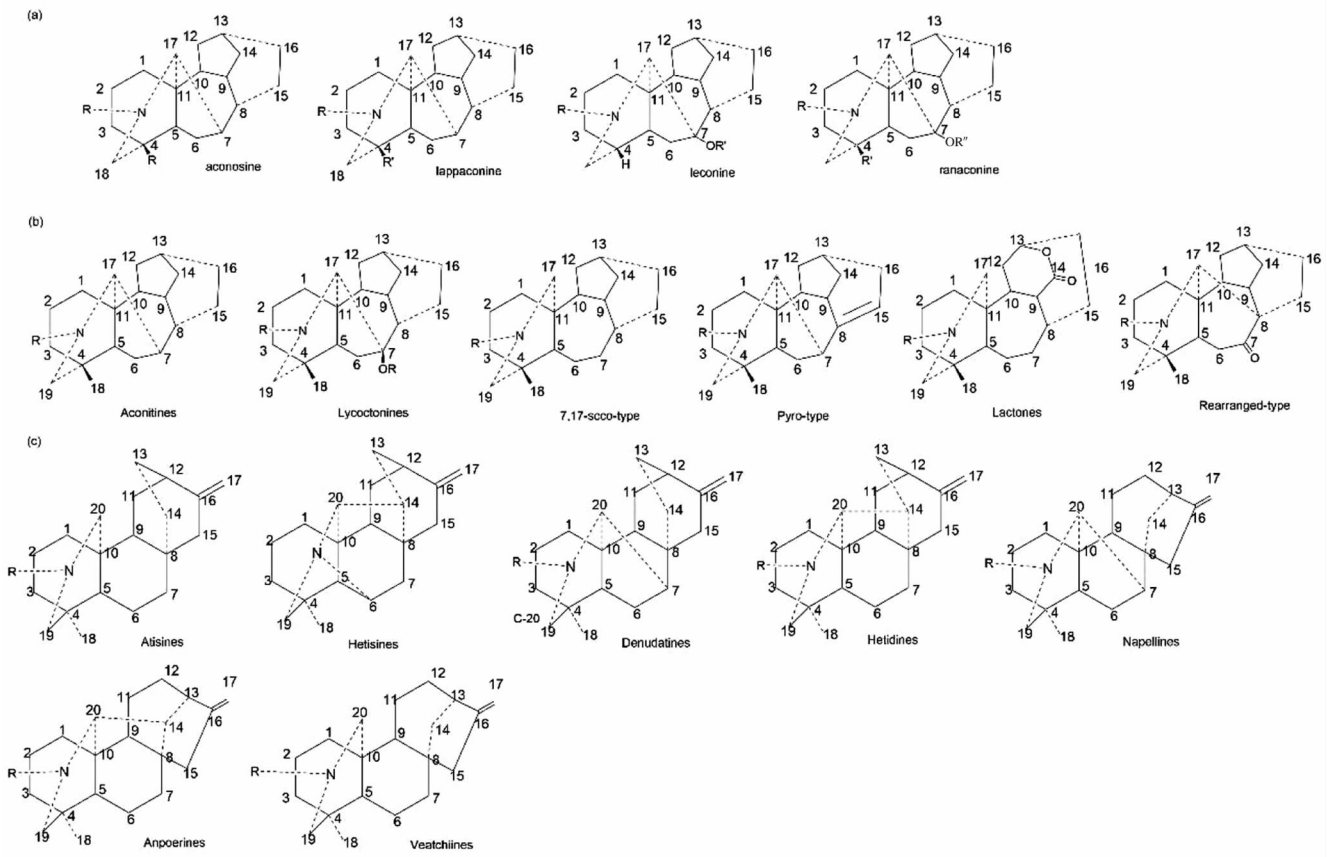


图3 C_{18}型(a)、C_{19}型(b)和C_{20}型(c)二萜生物碱基本类型

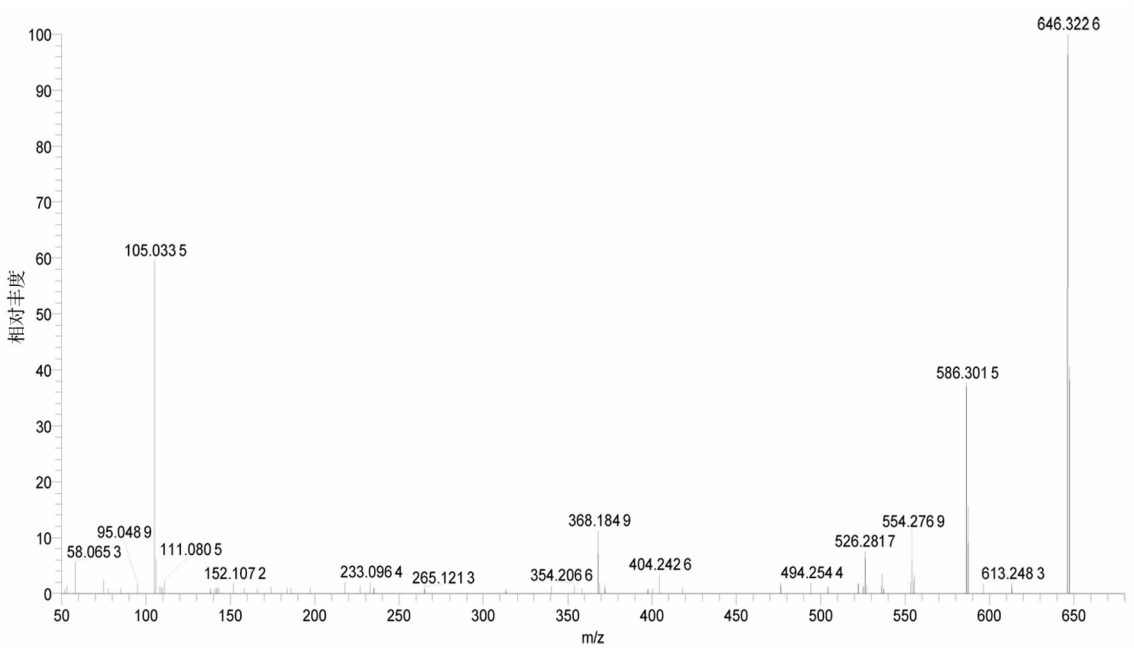


图4 aconitine的二级质谱图

型生物碱碱化而来[7]。

3.2 C_{19}型生物碱

C_{19}型生物碱是附子中分离得到数量最多的一类生物碱，其结构以乌头碱骨架为主，在C1、6、8、14、16、18位上通常有含氧基团取代。MDAs的14α－OH多被苯甲酰基、乙酰基或桂皮酰基所酯化；DDAs的8β－OH和14α－OH多被常见有机酸同时酯化，母核中其他位置的取代多与MDAs相似，C1和C6均被α－OMe取代、C16被β－OMe取代，C8被OMe取代；而ADAs的C1、C6通常被α型含氧基团取代，C16被β型甲氧基或羟基取代[8]。上述3种生物碱因具有相同的母核结构，其

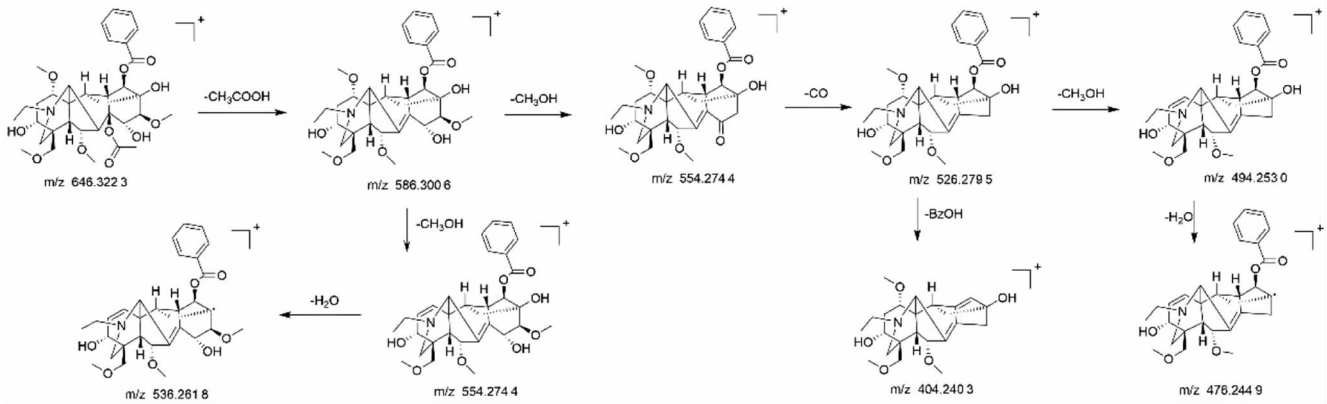


图 5 aconitine 的裂解规律

裂解规律存在共性,但取代基的不同则造成二级碎片离子不同。

3.2.1 双酯型生物碱 DDAs 是附子中的主要活性成分,也是毒性成分。本实验中共鉴定出的 DDAs 有 42 种。这类化合物裂解时容易丢失取代基上的 AcOH、CH_3OH、CO、H_2O、BzOH 等中性分子,此类生物碱的特征碎片离子是 C8 位置断裂,失去 CH_3COOH[9]。化合物 M181、M191 及 M192 经与对照品比对,分别鉴定为 mesaconitine、hypaconitine、aconitine。

以保留时间为 12.28 min 的化合物 M192 为例,在正离子模式下,其准分子离子峰为 *m/z* 646.3221[M + H]$^+$,推测分子式为 $C_{34}H_{47}NO_{11}$,其裂解规律为:在二级质谱中直接失去 1 分子 CH_3COOH 得到 *m/z* 586.3005[M + H - AcOH]$^+$,再连续丢失 CH_3OH、CO 或者组合丢失得到 *m/z* 554.2747[M + H - AcOH - CH_3OH]$^+$、*m/z* 526.2783[M + H - AcOH - CH_3OH - CO]$^+$、*m/z* 494.2530[M + H - AcOH - $2CH_3OH$ - CO]$^+$ 的碎片离子,再在 *m/z* 526.2783[M + H - AcOH - CH_3OH - CO]$^+$ 的基础上失去一分子苯甲酰基得到 *m/z* 404.2426[M + H - AcOH - CH_3OH - CO - BzOH]$^+$ 及 105.0335[C_7H_5O]$^+$ 离子碎片(图 4、图 5),经与对照品比对,鉴定其为 aconitine。化合物 M148 与 M192 互为同分异构体,具有相同的分子式 $C_{34}H_{47}NO_{11}$,主要的碎片离子有 *m/z* 586.3063[M + H - AcOH]$^+$、*m/z* 554.2745[M + H - AcOH - CH_3OH]$^+$ 及 105.0335[C_7H_5O]$^+$ 等,但未出现 *m/z* 526.2783[M + H - AcOH - CH_3OH - CO]$^+$ 碎片离子,说明其 C15 位上没有 - OH,当 C14 位上脱去 - CH_3OH 时,不形成烯醇式结构,不能发生互变而脱去 CO,根据参考文献[10],推测其可能为(-)-(A-b)-14α-benzoyloxy-N-ethyl-3α,10β,13β,15α-tetrahydroxy-1α,6α,8β,16β,18-pentamethoxyaconitane。其中化合物 M160、M189 首次在该植物中发现[9]。

3.2.2 单酯型生物碱 MDAs 是由 DDAs 水解而来,其结构特点是 DDAs C8 位上 β-OH 未被酯化,仅在 C14 位存在 1 个酯键,故可以 CH_3COOH 分子的丢失来区分 DDAs 和 MDAs,此外该类化合物均含有 1α-OH(OMe)和 16β-OMe,其裂解规律与 DDAs 的类似[11],本实验中共鉴定了 47 种。其中化合物 127、140、165 经与对照品比对,分别鉴定为 benzoylmesaconine、benzoylhypaconine、benzoylaconine。为清楚该类化合物的裂解规律,以化合物 140 为例,保留时间在 9.73 min,在正离子模式下,其准分子离子峰为 *m/z* 574.3008[M + H]$^+$,推测分子式为 $C_{31}H_{43}NO_9$,主要碎片离子有 *m/z* 542.2746[M + H - CH_3OH]$^+$、*m/z* 510.2490[M + H - $2CH_3OH$]$^+$、*m/z* 478.2230

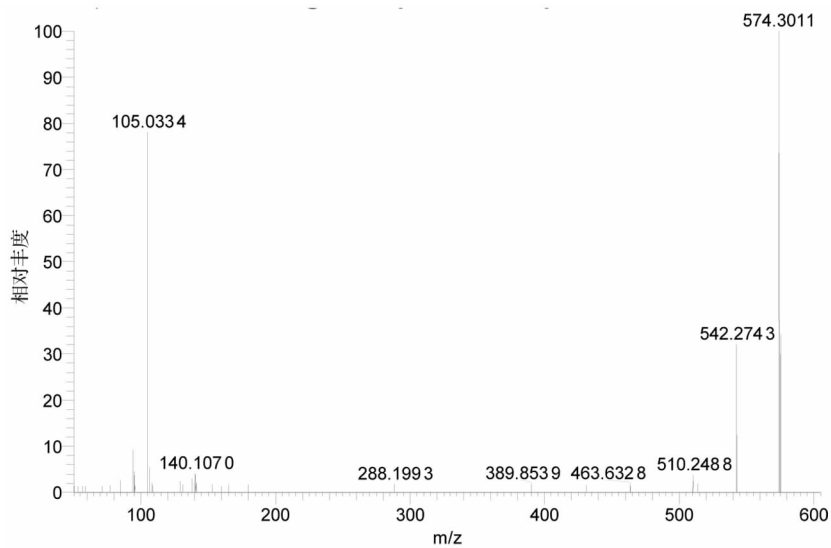


图 6 benzoylhypaconine 的二级质谱图

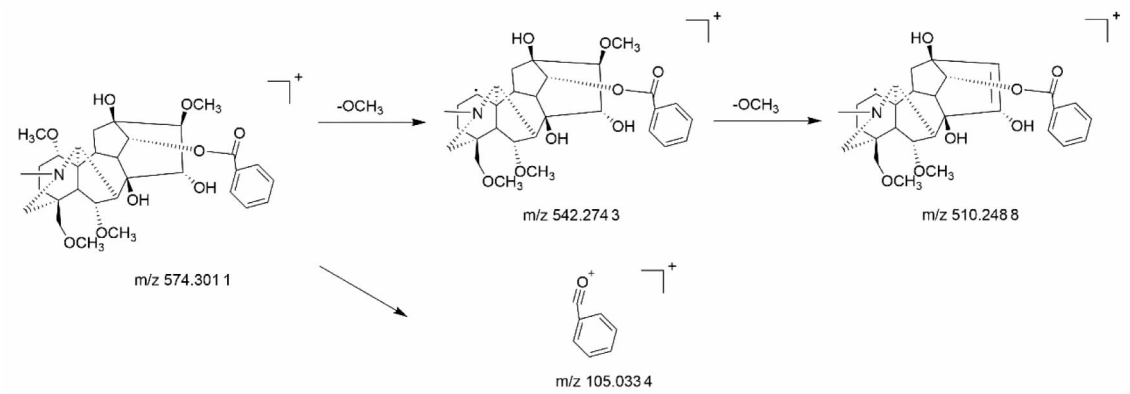


图 7 benzoylhypaconine 的裂解规律

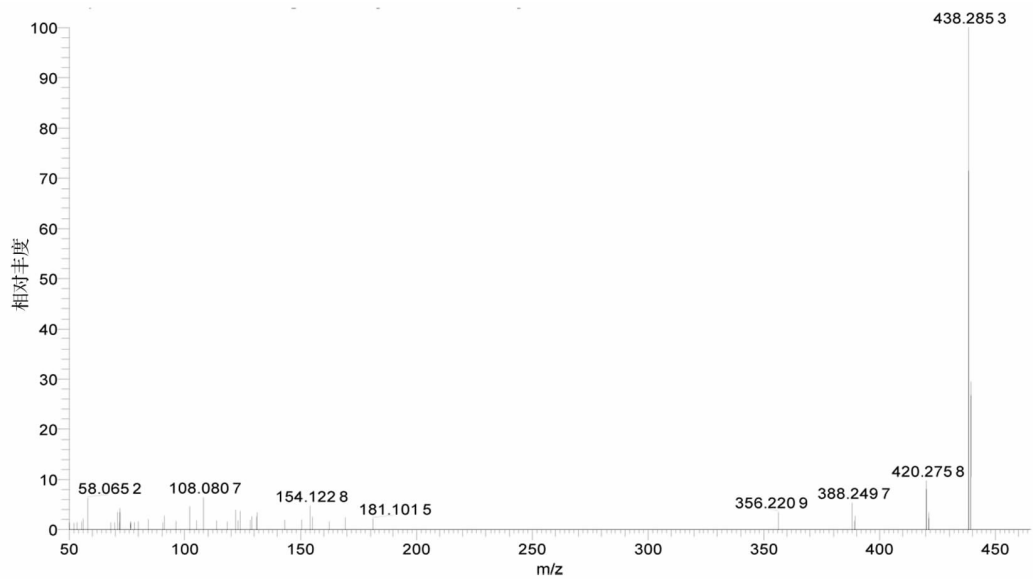


图 8 neoline 的二级质谱图

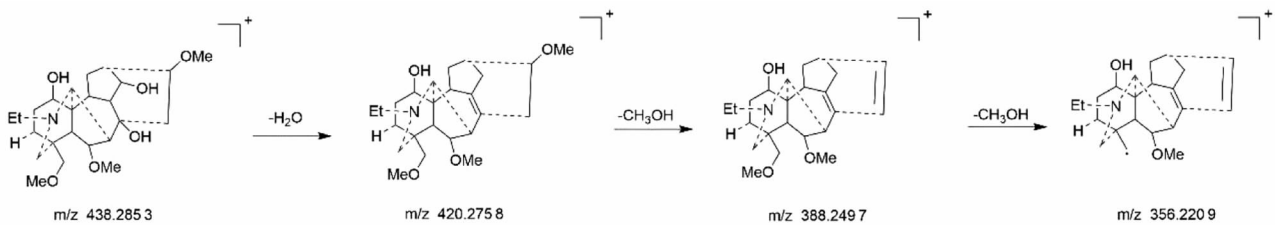


图 9 neoline 的裂解规律

$[M+H-3CH_3OH]^+$ 及 105.033 5 $[C_7H_5O]^+$ 等(图 6、图 7),经对照品比对,鉴定其为 benzoylhypaconine。其他 MDAs M102、M110、M119、M125、M134、M151、M162、M166、M184、M204、M208 均有类似的裂解规律。化合物 M127 的准分子比 M140 多 16,即 C2 位上比 M140 多了一个 O。化合物 M108 比化合物 M127 多了一个 O,通过与文献[11]对比,推测其为 10 - OH - benzoylmesaconine。化合物 M173 比化合物 M140 的 C1 位少了 CH_3OH,通过与文献[11]对比,推测其为 straconitine B。化合物 M177 的准分子离子峰为 *m/z* 618.327 3 $[M+H]^+$,保留时间为 10.98 min,推测分子式为 $C_{33}H_{47}NO_{10}$,主要有 *m/z* 586.301 5 $[M+H-CH_3OH]^+$、*m/z* 568.290 1 $[M+H-CH_3OH-H_2O]^+$、*m/z* 536.264 6 $[M+H-2CH_3OH-H_2O]^+$ 及 105.033 5 $[C_7H_5O]^+$ 等离子碎片,与 aconitine 相比,C8 位上差一个乙酰基,通过与文献[11]对比,推测其可能为 N - methyl - benzoylaconitine。通过与文献[11]对比,化合物 M184 比化合物 M177 的 C18 位少了 $-CH_3OH$ 取代。其中化合物 M71、M90、M109、M146、M182、M207、M210 首次在附子中发现[9,12],化合物 M106 首次在该植物中发现[13]。

3.2.3 *醇胺型生物碱* 该类化合物多从 DDAs 和 MDAs 水解而来,是附子中主要无毒的活性成分,其 C8 位及 C14 位均未有酯型取代基,故没有 CH_3COOH 中性离子的丢失及 $[C_7H_5O]^+$ (*m/z* 105)特征离子峰产生,但其仍会丢失 H_2O、CH_3OH、CO 等中性离子,从而产生相应的离子峰,本实验中共鉴定了 42 种。化合物 M30、M34、M43、M54、M55、M62、M80 经

与对照品比对,分别鉴定为 mesaconine、karakoline、aconine、hypaconine、fuziline、neoline、talatisamine。以保留时间为 5.33 min 的化合物 M62 为例,在正离子模式下,其准分子离子峰为 *m/z* 438.285 3[M+H]$^+$,推测分子式为 $C_{24}H_{39}NO_6$,主要碎片离子有 *m/z* 420.275 8[M+H−H_2O]$^+$、*m/z* 388.249 7[M+H−H_2O−CH_3OH]$^+$、*m/z* 356.220 9[M+H− H_2O−3CH_3OH]$^+$及 *m/z* 58.065 3[C_3H_8N]$^+$等(图 8、图 9),经对照品比对,鉴定其为 neoline。化合物 53、77 与化合物 62 的裂解方式相似,其二级谱图中同样可观察到 *m/z* 420.274 8、*m/z* 388.248 4、*m/z* 356.223 2 及 *m/z* 58.065 3 等离子碎片,相比之下,化合物 53 与化合物 77 还有 *m/z* 406.258 8 的特征二级碎片离子,根据质谱数据结合文献报道[14] 及 Clog P 值,推测其分别为 10-Hydroxytalatizamine、Subcusine。其中化合物 M51、M78 首次在附子中发现[9,15],化合物 M101、M120 为该植物中首次发现[13,16]。

3.2.4 脂型生物碱 这类生物碱是附子中特有的一类活性成分,它是 DDAs C8 位上的乙酰基被脂肪酰基取代所形成的,本实验中共鉴定了 14 种。该类化合物的主要裂解规律是先脱去 C8 位对应的长链脂肪酸后,再与其相对应的 DDAs 裂解规律一致。以保留时间 26.34 min 为例,在正离子模式下,M218 的准分子离子峰为 *m/z* 866.541 3[M+H]$^+$,推测分子式为 $C_{50}H_{75}NO_{11}$,主要碎片离子有 *m/z* 586.300 8[M+H−$(CH_2)_{16}$COOH]$^+$、*m/z* 554.273 6[M+H−$(CH_2)_{16}$COOH−CH_3OH]$^+$、*m/z* 536.264 5[M+H−$(CH_2)_{16}$COOH−CH_3OH−H_2O]$^+$、*m/z* 526.280 9[M+H−$(CH_2)_{16}$COOH−CH_3OH−C_2H_2]$^+$、*m/z* 494.252 9[M+H−$(CH_2)_{16}$COOH−CH_3OH−C_2H_2−CH_3OH]$^+$、*m/z* 404.246 1[M+H−$(CH_2)_{16}$COOH−CH_3OH−C_2H_2−BzOH]$^+$及 105.033 6[C_7H_5O]$^+$等(图 10、图 11),该化合物与乌头碱具有相似的化学结构,根据文献[14],推测其可能为8-lino-benzoylaconine。其他长链脂型生物碱也有类似的裂解规律,根据文献[12] 报道,依次被鉴定为 8-linolen-benzoylhypaconine、8-linolen-benzoyldeoxyaconine、8-lino-benzoylmesaconine、8-lino-benzoylhypaconine、8-lino-benzoyldeoxyaconine、8-pal-benzoylmesaconine、8-ole-benzoylmesaconine、8-lino-benzoyl-3,13-deoxyaconine、8-pal-benzoylhypaconine、8-ole-benzoylhypaconine、8-pal-benzoyldeoxyaconine、8-str-benzoylhypaconine、14-benzoylaconine-8-oleate。其中 14-benzoylaconine-8-oleate 为首次在该植物中检测到[17]。

3.3 C_{18}型生物碱

C_{18}型生物碱与 C_{19}型生物碱结构上最大的区别是 C4 位上无 C18,而是多被氢、羟基、酯基所取代,根据 C4 和 C7 位上取代基的不同,可分为 aconosine 型、lappaconine 型、leuconine 型和 ranaconitine 型[18]。本实验中共鉴定了 21 种。以保留时间为 8.59 min 的化合物 M124 为例,在正离子模式下,其准分子离子峰为 *m/z* 585.317 4[M+H]$^+$,推测分子式为 $C_{32}H_{44}N_2O_8$,其裂解规律为:在二级质谱中失去 1 分子 H_2O 得到 *m/z* 567.306 2[M+H−H_2O]$^+$,连续失去 CH_3OH 得到 *m/z* 535.279 8[M+H−H_2O−CH_3OH]$^+$、*m/z* 503.257 2[M+H−H_2O−2CH_3OH]$^+$,再丢失一分子 $C_9H_9O_3N$ 得到 *m/z* 324.196 4[M+H−H_2O−CH_3OH−$C_9H_9O_3N$]$^+$;或者 C4 位上的取代基 $C_9H_9O_3N$ 直接断裂得到 *m/z* 179.085 4[$C_9H_9O_3N$]$^+$和 *m/z* 406.258 4[M+H−$C_9H_9O_3N$]$^+$,前者丢失一分子 H_2O 得到 *m/z* 162.054 9[$C_9H_9O_3N$−H_2O]$^+$,后者失去 H_2O、CH_3OH 或者连续丢失得到 *m/z* 388.247 5[M+H−$C_9H_9O_3N$−H_2O]$^+$、*m/z* 356.222 0[M+H−$C_9H_9O_3N$−H_2O−CH_3OH]$^+$和 *m/z* 324.196 4[M+H−$C_9H_9O_3N$−H_2O−2CH_3OH]$^+$等碎片离子(图 12、图 13),根据文献[19],推测其可能为 lappaconitine(高甲乌素)。

3.4 C_{20}类生物碱

该类化合物具有抗肿瘤、抗血小板聚集等药理作用,相比

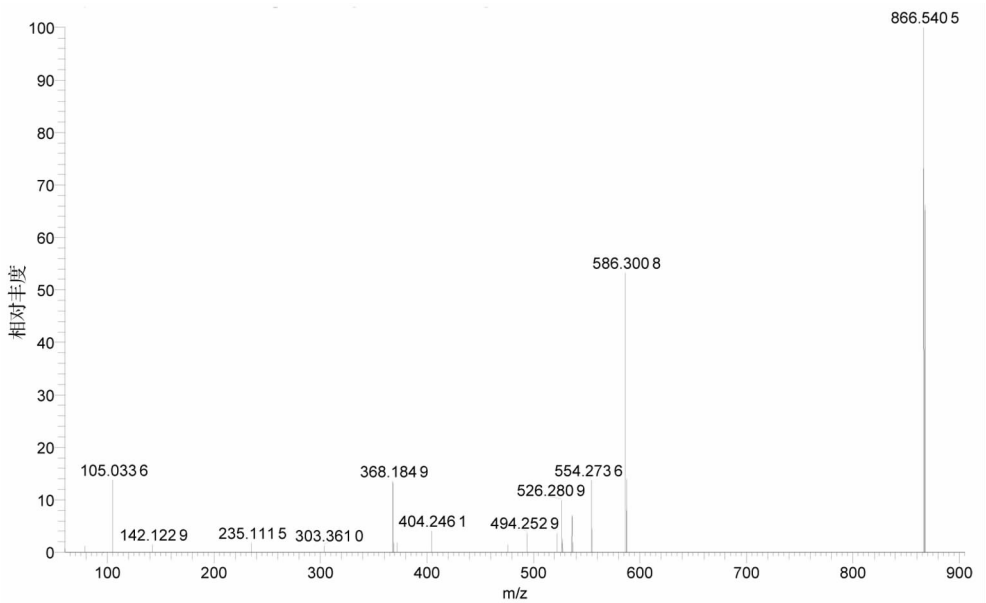


图 10 8-lino-benzoylaconine 的二级质谱图

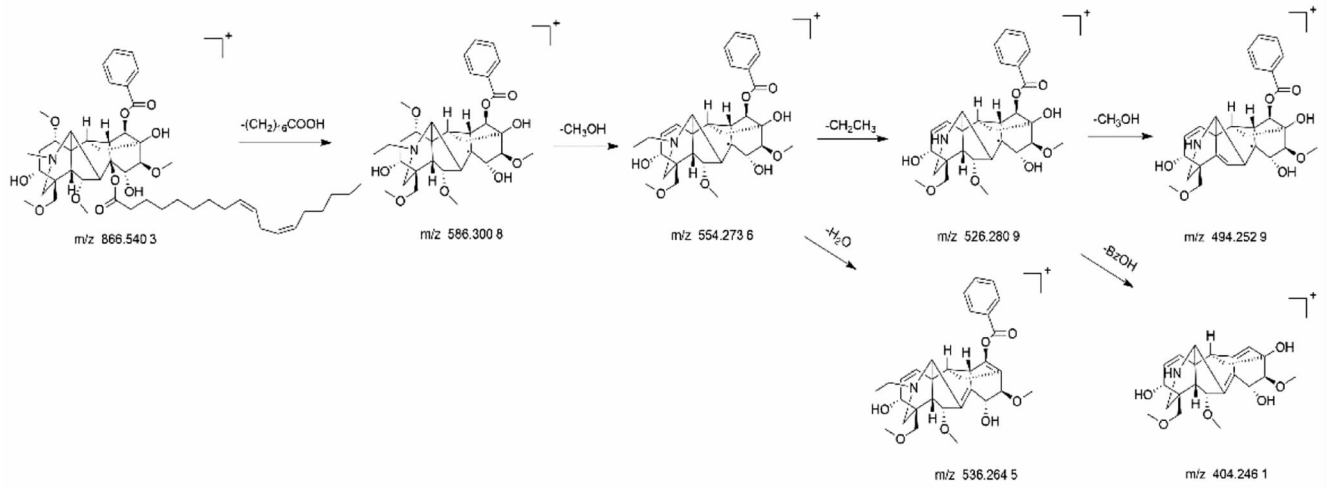


图 11 8 – lino – benzoylaconine 的裂解规律

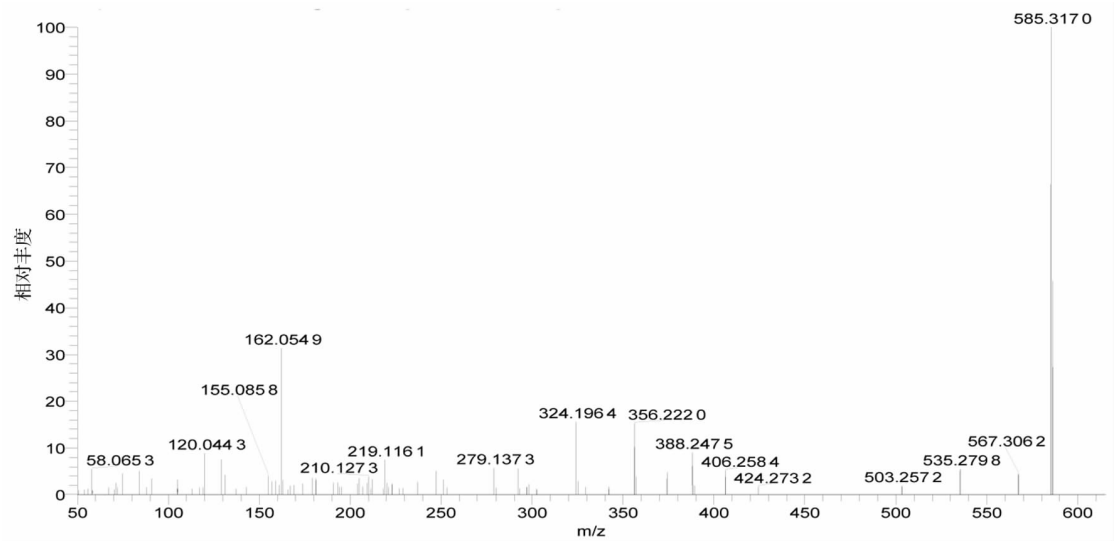


图 12 lappaconitine 的二级质谱图

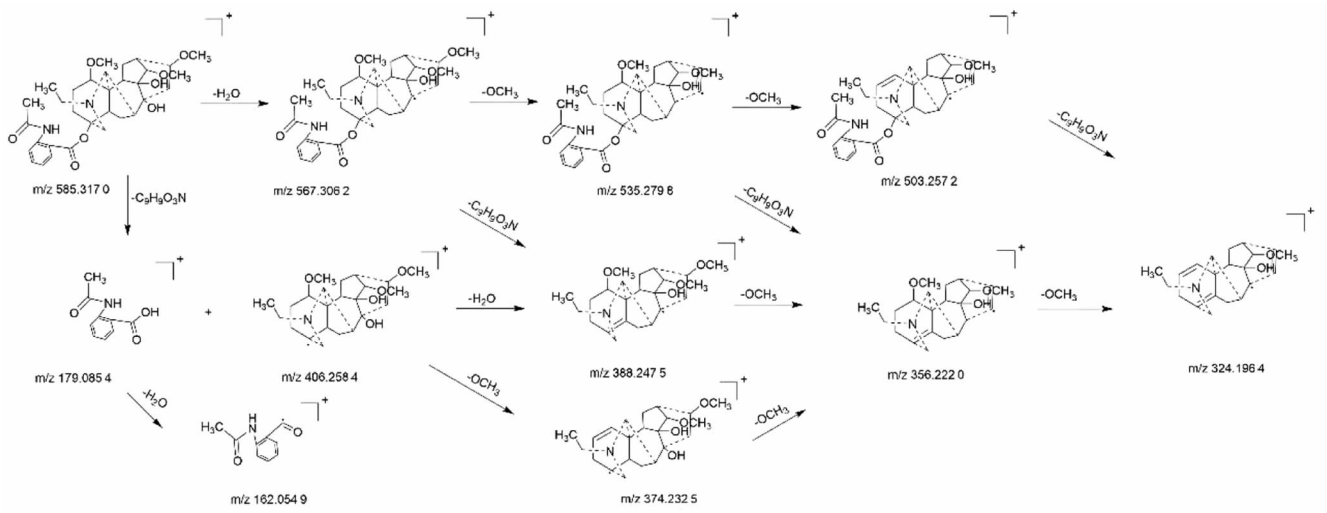


图 13 lappaconitine 的裂解规律

C_{19}型生物碱而言,这类生物碱的毒性明显较低,其裂解方式与C_{19}型生物碱相比,并没有明显的特征性片段,只是 CH_3OH、H_2O、CH_3COOH 等中性分子的连续丢失。本研究中共鉴定 27 种。以保留时间为 4.20 min 的化合物 M38 为例,在正离子模式下,其准分子离子峰为 *m/z* 358.237 4$[M+H]^+$,推测分子式为 $C_{22}H_{31}NO_3$,其裂解规律为:在二级质谱中失去 1 分子 H_2O

得到 *m/z* 340.226 9[M + H − H_2O]$^+$,经与对照品比对及参考文献[20],鉴定为 songorine,其裂解途径如图 14。保留时间为 8.28 min 的化合物 M122,其准分子离子峰为 *m/z* 444.274 4[M + H]$^+$,推测分子式为 $C_{26}H_{37}NO_5$,主要碎片离子有 *m/z* 426.263 8[M + H − H_2O]$^+$、*m/z* 398.271 0[M + H − H_2O − CO]$^+$、*m/z* 342.205 7[M + H − H_2O − CO − C_4H_7O]$^+$、*m/z* 324.195 5[M + H − H_2O − CO − C_4H_7O − H_2O]$^+$ 及 *m/z* 158.096 2[$C_{11}H_{12}N$]$^+$;而化合物 M123 的主要碎片离子有 *m/z* 340.190 8[M + H − H_2O − CO − C_4H_7O]$^+$、*m/z* 322.180 3[M + H − H_2O − CO − C_4H_7O − H_2O]$^+$ 和 *m/z* 158.096 3[$C_{11}H_{12}N$]$^+$,与化合物 M122 相比少了 2 个 H,参考文献[21]可知,是化合物 M123 C19 位的 OH 被 C = O 取代所得。其中化合物 M16、M17、M81、M83、M198 首次在附子中发现[22-24],化合物 M94、M95、M100、M129 首次在该植物中发现[25]。

3.5 其他

化合物 2 的准分子离子峰为 *m/z* 196.133 2[M + H]$^+$,推测分子式为 $C_{11}H_{17}NO_2$,其裂解规律为:在二级质谱中失去 1 分子 $C_3H_9NH_2O$ 得到 *m/z* 137.059 7[M + H − C_3H_9N]$^+$,再失去 1 分子 H_2O 得到 *m/z* 119.049 0[M + H − C_3H_9N − H_2O]$^+$,再失去 1 分子 CO 得到 *m/z* 91.054 1[M + H − C_3H_9N − H_2O − CO]$^+$等离子碎片(图 15、图 16),根据参考文献[14],推测其可能为 coryneine。化合物 M29、M41 首次在附子中发现[9,20],化合物 M136 首次在该植物中发现。

4 讨论与结论

附子作为传统大宗中药,其有效性和安全性对临床应用具有重大意义,明确附子的毒性和药效相关成分十分必要。课题组前期通过单因素结合 Box − Behnken 响应面法对附子的炮制工艺进行了优化[2-3],同时对附子中 6 种酯型生物碱进行了含量测定[26]。为了更好地挖掘附子中的生物碱类成分,本研究在前期基础上,通过改变流动相和优化质谱参数深入分析附子中的化学成分。对有机相:甲醇、乙腈;水相:水、0.1% 甲酸水、0.2% 甲酸水进行考察,最终确定乙腈 −0.1% 甲酸水为流动相。

附子中生物碱成分发生质谱裂解时,通常丢失其母核上的取代基,如 CO、H_2O、CH_3OH、CH_3COOH 等,会产生[M + H − CO]$^+$、[M + H − H_2O]$^+$及[M + H − AcOH − CH_3OH − CO]$^+$、[M + H − CH_3OH − H_2O]$^+$等特征性碎片离子;由于生物碱类成分 C3、C8、C14 位中常存在 AcOH、C_6H_5COOH 以及 CH_3OH 等基团取代,故而在正离子模式下,可检测到[M + H − AcOH]$^+$、[M + H − C_6H_5COOH]$^+$、[M + H − CH_3OH]$^+$及[M + H − AcOH − CH_3OH]$^+$等碎片离子,以 CH_3COOH 分子的

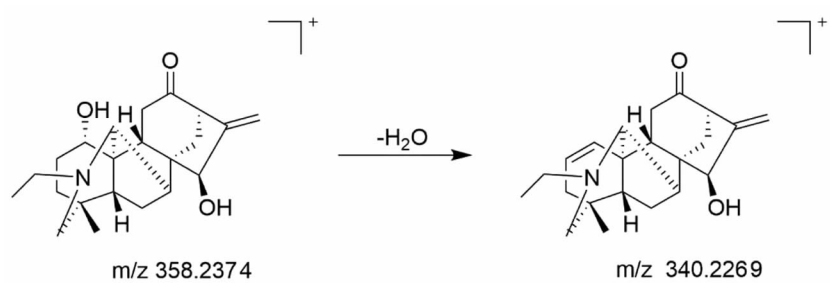


图 14 songorine 的裂解规律

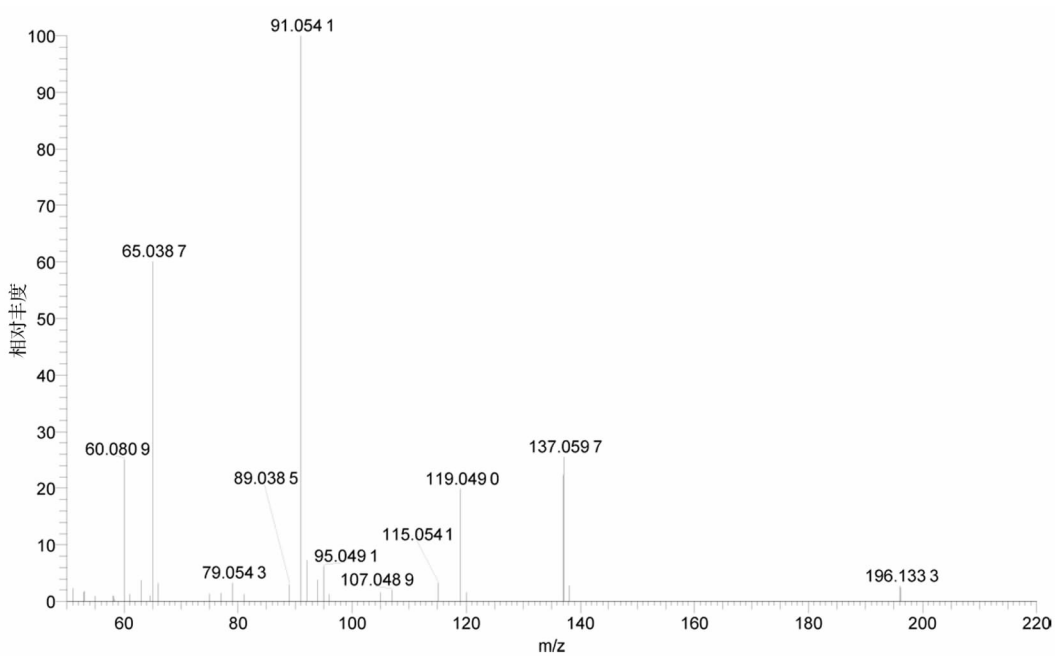


图 15 coryneine 的二级质谱图

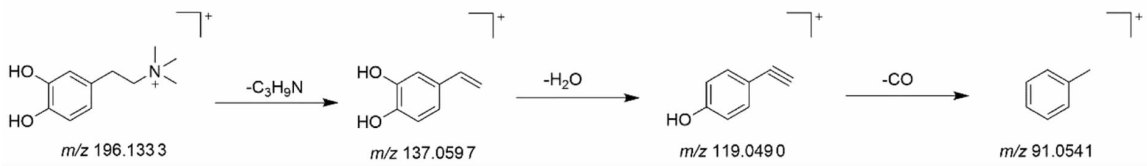


图 16 coryneine 的裂解规律

丢失来区分双酯型和单酯型生物碱；含有苯甲酰基的成分则易产生 *m/z* 105$[C_7H_5O]^+$特征离子峰；在氮原子连有乙基的情况下，化合物的母核可产生 *m/z* 58$[C_3H_8N]^+$特征离子峰，这与宋书祎等[27]的研究结果一致，此特征性离子碎片可为生物碱的鉴别提供依据。

此外，附子中某些已知成分在此次分析中并未检测到，可能与电喷雾离子源(ESI)的离子化效率有关，一些难以区分的同分异构体的精确结构仅仅依靠质谱信息进行确认存在一定的局限性，还需进一步结合核磁等波谱技术进行确证。

综上所述，本研究运用 UHPLC－Q－Exactive Focus－MS/MS 对附子中生物碱类成分进行了鉴别分析，通过精确的分子离子和离子碎片信息，结合对照品数据和相关文献报道，从附子中分离和鉴定出 228 个生物碱类成分，包括 C_{18}类 21 种、C_{19}类 145 种(DDAs 42 种、MDAs 47 种、ADAs 42 种、14 种 Lipo－As)、C_{20}类 27 种以及其他 35 种，其中 28 个化合物为首次从附子或该植物中鉴定出，为进一步丰富和完善附子的化学成分库，为附子的质量控制和药效物质基础研究奠定了基础。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：200.
[2] 李凡，张景霞，王卫锋，等. 陕产附子泡胆工艺的改进和优化研究[J]. 环球中医药，2023，16(5)：867－874.
[3] 李凡，张景霞，王卫锋，等. Box－Behnken 响应面法优化附子的蒸制及干燥工艺[J]. 特产研究，2023，45(2)：20－25.
[4] 蒲婷婷，王宇飞，周忠瑜，等. 附子品质评价及影响因素研究进展[J]. 世界科学技术－中医药现代化，2022，24(11)：4189－4198.
[5] 陆超颖，丁梦磊，蔡淑慧，等. 附子生物碱类成分分析及其抗肿瘤机制初探[J]. 南京中医药大学学报，2021，37(5)：720－729.
[6] WADA K，GOTO M，OHKOSHI E，et al. Bioactivity inspired C19－diterpenoid alkaloids for overcoming multidrug－resistant cancer[J]. J Nat Med，2022，76(4)：796－802.
[7] 安婧娴，刘芳，刘芳，等. 近年来乌头属植物二萜生物碱化学成分及其镇痛活性研究进展[J]. 中南药学，2016，14(5)：521－525.
[8] 张晓晨，郑清阁，杨菁华，等. 附子 C_(19)二萜生物碱结构及活性研究进展[J]. 中草药，2020，51(2)：531－541.
[9] 戴胜云，崔议方，徐静，等. 草乌、川乌及附子中生物碱类成分的 UHPLC－Q－Exactive Orbitrap MS/MS 对比分析[J]. 中国中药杂志，2023，48(1)：126－139.
[10] 兰先明，宋书祎，徐静，等. 基于 UHPLC－Q－Exactive Orbitrap MS/MS 的川乌生物碱成分分析[J]. 中国药学杂志，2022，57(14)：1161－1172.
[11] LIU S，LAI C，LONG Y，et al. The global profiling of alkaloids in Aconitum stapfianum and analysis of detoxification material basis against Fuzi[J]. J Chromatogr A，2021，1652(prepublish)：462362.
[12] 范倩，陈雪冰，汪玉梅，等. 基于 UPLC－Q－TOF－MS/MS 及 GNPS 技术的炮附片二萜类生物碱成分[J]. 中山大学学报(自然科学版)，2021，60(3)：30－44.
[13] LIU W Y，HE D，ZHAO D K，et al. Four new C19－diterpenoid alkaloids from the roots of Aconitum ouvrardianum[J]. J Asian Nat Prod Res，2019，21(1)：9－16.
[14] LEI H，ZHANG Y，YE J，et al. A comprehensive quality evaluation of Fuzi and its processed product through integration of UPLC－QTOF/MS combined MS/MS－based mass spectral molecular networking with multivariate statistical analysis and HPLC－MS/MS[J]. J Ethnopharmacol，2021，266：113455.
[15] ZHAO D，SHI Y，ZHU X，et al. Identification of potential biomarkers from *Aconitum carmichaelii*，a traditional chinese medicine，using a metabolomic approach[J]. Planta Med，2018，84(7)：434－441.
[16] 熊娇，刘王艳，何丹，等. 直缘乌头地上部分二萜生物碱成分研究[J]. 中草药，2019，50(10)：2279－2284.
[17] 单连海，陈琳，周先礼. 多根乌头中二萜生物碱成分[J]. 天然产物研究与开发，2019，31(9)：1573－1579.
[18] 张琴，徐斌，贾琦，等. C18 型二萜生物碱化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药，2016，38(5)：1109－1114.
[19] ZHANG L，MIAO X，LI Y，et al. Toxic and active material basis of *Aconitum sinomontanum* Nakai based on biological activity guidance and UPLC－Q/TOF－MS technology[J]. J Pharm Biomed Anal，2020，188：113374.
[20] 叶协滔，钟凌云，张大永，等. 基于 UPLC/Q－TOF－MS/MS 分析川乌生品及其不同炮制品化学成分差异[J]. 中华中医药杂志，2021，36(10)：5837－5842.
[21] LIU S，DENG P，LONG Y，et al. Two new alkaloids from fuzi and their metabolites study[J]. Chem Biodivers，2021，18(10)：e2100388.
[22] LIU H，SHAO S，XIA H，et al. Denudatine－type diterpenoid alkaloids from an aqueous extract of the lateral root of *Aconitum carmichaelii*[J]. J Asian Nat Prod Res，2021，23(7)：615－626.
[23] GUO Q，XIA H，WU Y，et al. Structure，property，biogenesis，and activity of diterpenoid alkaloids containing a sulfonic acid group from *Aconitum carmichaelii*[J]. Acta Pharm Sin B，2020，10(10)：1954－1965.
[24] YU Y，WU S，ZHANG J，et al. Structurally diverse diterpenoid alkaloids from the lateral roots of *Aconitum carmichaelii*. Debx. and their anti－tumor activities based on in vitro systematic evaluation and network pharmacology analysis[J]. RSC Adv，2021，11(43)：26594－26606.
[25] REN M Y，YU Q T. Anticancer Activities of C_{18}－，C_{19}－，C_{20}－，and bis－diterpenoid alkaloids derived from genus aconitum[J]. Molecules，2017，22(2)：267.
[26] 李凡，田浩，马杰，等. 陕西汉中不同产区泥附子中酯型生物碱类成分的测定[J]. 西北药学杂志，2022，37(2)：6－10.
[27] 宋书祎，兰先明，徐静，等. 附子二萜类生物碱 UHPLC－Q－Exactive Orbitrap MS 的系统分析鉴定[J]. 药物分析杂志，2023，43(6)：918－929.