

## 平贝母水煎液化学成分的 LC-MS<sup>n</sup> 分析

佟晓琳<sup>1,2</sup>, 聂颖兰<sup>1</sup>, 马琰岩<sup>1</sup>, 彭娟<sup>1</sup>, 张海鸣<sup>1</sup>, 闫寒<sup>1</sup>, 范斌<sup>1</sup>, 孙健<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 医学实验中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;  
2. 云南中医学院, 昆明 650021)

**[摘要]** **目的:**为深入研究平贝母水煎液内的化学成分,采用水煎煮法对平贝母鳞茎进行提取,运用液相色谱-离子阱质谱联用仪(LC-MS<sup>n</sup>)建立一种方法对平贝母水煎液中的化学成分进行分析。**方法:**通过 LC-MS<sup>n</sup> 联用技术判定平贝母水煎液内成分,采用 Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×50 mm 1.8 μm),乙腈-0.1% 氨水梯度洗脱模式,ESI 离子源,正离子模式下采集数据。根据平贝母水煎液内成分和对照品之间的总离子流图、多级质谱图、质谱碎片信息进行对比以及成分标准质谱裂解规律测定平贝母水煎液中的化学成分。**结果:**从平贝母水煎液中共分离出 22 个峰,鉴别出 19 个生物碱成分,发现 3 个未知生物碱成分。**结论:**实验结果表明,LC-MS<sup>n</sup> 方法适用于平贝母中生物碱成分的常规分析,可进一步提高对平贝母药效物质基础的认识,为平贝母的化学成分研究和质量控制建立了实验和理论基础。

**[关键词]** 平贝母; 液质联用; 化学成分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0045-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210045

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160829.1653.008.html>

**[网络出版时间]** 2016-08-29 16:53

## LC-MS<sup>n</sup> Analysis of Chemical Constituents of Fritillaria Ussuriensis Bulbus Water Solution

TONG Xiao-lin<sup>1,2</sup>, NIE Ying-lan<sup>1</sup>, MA Yan-yan<sup>1</sup>, PENG Juan<sup>1</sup>, ZHANG Hai-ming<sup>1</sup>,  
YAN Han<sup>1</sup>, FAN Bin<sup>1</sup>, SUN Jian<sup>1\*</sup>

(1. *Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China;*  
2. *Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To study the chemical constituents in Fritillaria Ussuriensis Bulbus water solution, extract Fritillaria Ussuriensis Bulbus by the method of water solution, and establish LC-ESI-TRAP-MS (LC-MS<sup>n</sup>) method to analyze the chemical components in Fritillaria Ussuriensis Bulbus water solution. **Method:** LC-MS<sup>n</sup> method was used to determine the chemical components in Fritillaria Ussuriensis Bulbus on Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> column (2.1 mm×50 mm 1.8 μm), with acetonitrile-0.1% ammonia as the mobile phase for gradient elution. Data were collected with positive ESI source. Structures of the components were elucidated by comparing the total ion chromatogram, multi-stage mass spectrogram, and mass spectrometry fragment information between Fritillaria Ussuriensis Bulbus water solution and control products and by referring to the compound standard mass spectrometry fragmentation rules. **Result:** The 22 peaks were found in this study; 19 alkaloid components were identified; and 3 unknown alkaloid components were found from Fritillaria Ussuriensis Bulbus water solution. **Conclusion:** LC-MS<sup>n</sup> method is suitable for the routine analysis of alkaloid components in Fritillaria Ussuriensis Bulbus and also can help to improve the understanding of its pharmacodynamic action, providing experimental and

**[收稿日期]** 20151120(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102672);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(ZZ2015007);中央本级重大增减支项目(2060302)

**[第一作者]** 佟晓琳,在读硕士,从事物质分析方面研究,Tel:15010818718,E-mail:tongxiaolin90@163.com

**[通讯作者]** \*孙健,博士,副研究员,从事物质分析方面研究,Tel:010-64089535,E-mail:sunjiankw@163.com

theoretical basis for the study of chemical components and quality control of *Fritillaria Ussuriensis* Bulbus.

[Key words] *Fritillaria Ussuriensis* Bulbus; LC-MS; chemical components

平贝母最早记载于《神农本草经》，被历版《中国药典》<sup>[1]</sup> 记载为常用药材，其功效主要为清热化痰、止咳润肺，用于风热或痰热咳嗽、肺痈吐脓、癰疽瘦瘤、疮痈肿毒等<sup>[2]</sup>，近年来药理及化学研究表明多种甾体类生物碱为贝母类药材的主要药效成分<sup>[3]</sup>。目前，关于平贝母的研究多集中于栽培、药理学方面的研究，生物碱的含量测定等<sup>[4-6]</sup> 也有报道，但对其多种成分分析方面研究严重不足，为了较全面的了解平贝母的化学成分，本研究采用高效液相色谱仪串联质谱方法研究平贝母甾体生物碱的裂解行为，鉴定其水煎液中的化学成分，平贝母中的主要成分为异甾体类生物碱，具有相似的结构骨架，综合文献报道，总体上可以分为瑟文型、藜芦胺型、介藜芦型和平贝酮型<sup>[7]</sup>。根据本课题研究结果分析，平贝母内多数生物碱属于瑟文型，另外在本实验中还检测到平贝母内其他种类成分的存在，进一步提高对平贝母药效物质基础的认识，为开发利用平贝母资源提供参考。

## 1 材料

平贝母购于河北神农(北京)药业有限公司，符合 2015 年版《中国药典》一部有关各项规定，由中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定为百合科植物平贝母 *Fritillariae ussuriensis* 的干燥鳞茎。对照品贝母素甲(批号 80022-091012)，贝母素乙(批号 110751-200608)，贝母辛(批号 80022-091012)，西贝母碱(批号 110767-201208)，西贝母碱苷(批号 111917-201202)均购自中国食品药品检定研究院(纯度均 > 98%)。甲醇、乙腈、氨水等均为色谱纯，蒸馏水自制。

1200 系列高效液相仪(配二元梯度泵、柱温箱和自动进样器)，6320 型离子阱质谱仪(美国 Agilent 公司)；Milli-Q 系列超纯水净化系统，AnkeTGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)；BT25S 型分析天平(赛多利斯)；SCQ-200 型超声波清洗器(上海声谱超声波设备厂)。

## 2 方法与结果

**2.1 平贝母供试品制备** 取平贝母饮片 10 倍量蒸馏水浸泡 12 h，煎煮 1 h，倾出第 1 次煎煮液，4 层纱布过滤；药渣中加入 6 倍量水，再次加热煎煮 1 h，倾出第 2 次提取液，4 层纱布过滤，合并 2 次滤液，经旋转蒸发仪浓缩，4 °C 冰箱保存备用，进样前

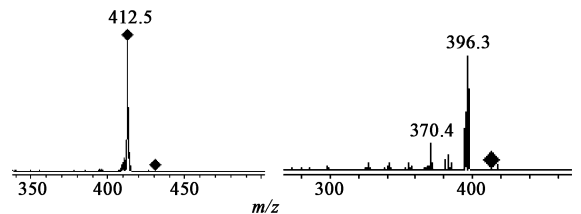
14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min，0.22 μm 微孔滤膜过滤。

**2.2 对照品溶液制备** 称取对照品贝母素甲、贝母素乙、西贝母碱、西贝母碱苷、贝母辛各约 1 mg，精密称定，加 50% 甲醇配制成 1 g·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液，再将各储备液稀释至 100 μg·L<sup>-1</sup>，0.22 μm 微孔滤膜过滤。

**2.3 分析条件** 液相条件：Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm 1.8 μm)，柱温 40 °C。流动相乙腈(A)-0.1% 氨水(B)梯度洗脱(0~4 min, 40% A; 4~40 min, 40%~100% A)，进样量 5 μL，分析时间 40 min，流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>。

质谱条件：采用多反应监测方式(MRM)，正离子扫描，扫描范围 *m/z* 50~800。离子源 ESI，离子源温度 350 °C，干燥气流量 10 mL·min<sup>-1</sup>，雾化气 40 Pa，碰撞裂解气氦气(纯度 > 99.9%)。Agilent Data Analysis 软件对数据进行分析处理。

**2.4 平贝母生物碱 ESI-TRAP-MS 裂解特征** 以贝母素乙为例，研究 ESI-TRAP-MS 裂解特征，贝母素乙属瑟文型生物碱，该化合物在 C20 位上的羟基易结合 H<sup>+</sup>，从而离子化形成 [M + H]<sup>+</sup> 信号 *m/z* 430，其二级质谱图中最大特征离子为 *m/z* 412，可以看出在二级碰撞时 C3 处含有羟基的生物碱容易丢失 H<sub>2</sub>O 分子；继续电离则进一步脱 CH<sub>4</sub> 生成 *m/z* 396 离子，脱 O = C = CH<sub>2</sub> 生成离子 *m/z* 370。贝母素乙质谱见图 1，裂解途径见图 2。经与 EIC 质谱图对比，同时对比各成分的相对分子质量及质谱裂解规律，参考文献报道<sup>[2,8]</sup>，鉴别出药材内成分。



A. 二级质谱; B. 三级质谱

图 1 贝母素乙质谱

Fig. 1 Mass spectrum of peiminine

**2.5 平贝母内化学成分定性分析** HPLC-ESI-TRAP-MS 对平贝母生物碱成分进行定性分析。色谱峰一级质谱以 [M + H]<sup>+</sup> 信号为主。贝母属植物主要成分为具有相似结构骨架的异甾体类生物碱，

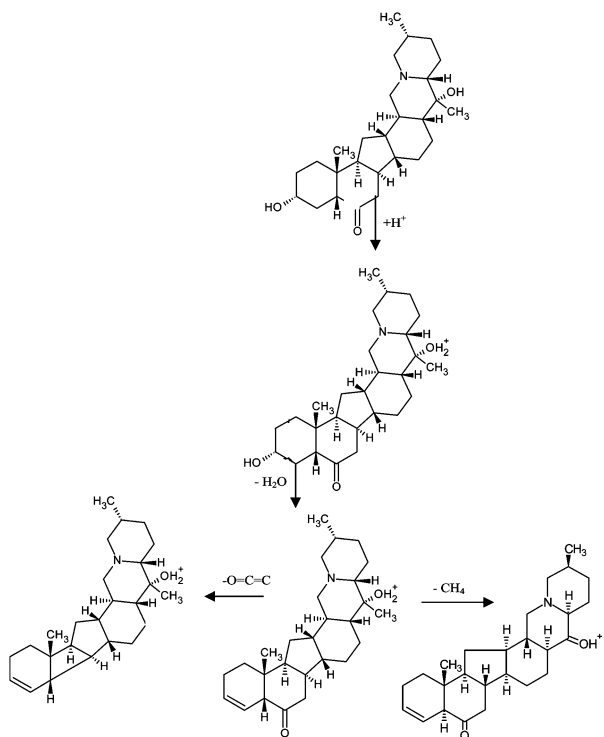


图 2 贝母素乙二级裂解情况

Fig. 2 Proposed fragmentation pathways of peiminine

母核骨架为 27 个碳原子,皆为五元或六元碳环或杂环<sup>[7-9]</sup>。综合文献报道,平贝母内多数生物碱属于瑟文型,如本文鉴定的 19 个化合物中贝母素甲、贝母素乙、西贝母碱,异贝母素甲,去氢鄂贝定碱,鄂贝定碱,西贝母碱均属于瑟文型,而平贝宁昔属藜芦胺型,贝母辛属介藜芦碱型,平贝酮为迄今仅从平贝母中分得的唯一 1 个平贝酮型生物碱,另外还有其他种类化合物如平贝啶昔等<sup>[7]</sup>。根据相同类别的异甾体类生物碱具有相似的质谱裂解规律,本实验通过与对照品对照,或由准分子离子峰、多级质谱碎片信息对比文献报道<sup>[10-14]</sup>,推测出色谱峰的可能组成,鉴定了 19 个生物碱成分,另外还有 3 种成分在总离子流图中有明显色谱峰,但尚未见到文献报道,分子量和裂解特征符合异甾体类生物碱类裂解特征,相关结果正在进一步研究。质谱数据见表 1。总离子流图见图 3。

**2.6 同分异构体的鉴定** 本文鉴定的 19 个生物碱成分中有 4 对成分为同分异构体,分别是贝母素甲与异贝母素甲,西贝母碱与贝母素乙,鄂贝定碱、平贝酮与 puqiedine,去氢鄂贝定碱与 puqiedinone。相似的平贝母生物碱贝母素甲和异贝母素甲在 HPLC-ESI-TRAP-MS 的研究中发现,丢失相对质量分数 18 Da 是 2 种生物碱在二级质谱中共同的碎片离子,根据平贝母生物碱的裂解规律,推断其丢失的

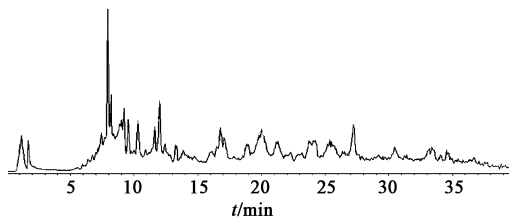


图 3 平贝母水煎液化学成分的 LC-MS<sup>n</sup> 总离子流色谱

Fig. 3 LC-MS<sup>n</sup> total ion chromatograms of extracts Fritillaria Ussuriensis Bulbus water

碎片分子为 H<sub>2</sub>O 分子,产生了碎片离子  $m/z$  414,另外还出现了丢失 -CH<sub>4</sub> 的 398 Da 的离子,而这些离子都是贝母素甲和异贝母素甲的特征碎片离子。2 种化合物多级质谱中这些子离子的产生表明二者具有相似的骨架结构。事实上贝母素甲与异贝母素甲具有相同的骨架结构,只是 C3 上的羟基构型不同,然而 HPLC-ESI-TRAP-MS 又达不到对此方面的识别,因此通过与对照品贝母素甲对比,进行贝母素甲与异贝母素甲的指认,同理推测出化合物西贝母碱与贝母素乙。由于缺失鄂贝定碱,平贝酮,puqiedine,去氢鄂贝定碱和 puqiedinone 对照品,所以并不能明确的分离出这 4 种成分,但根据前期文献报道<sup>[5]</sup>的保留时间及多级质谱碎片特点,推测本文中 4 种成分分别为去平贝酮,氢鄂贝定碱,puqiedinone,鄂贝定碱和 puqiedine。

### 3 讨论

依据 2015 年版《中国药典》<sup>[1]</sup>记载,贝母具有清热、润肺、化痰、止咳作用。平贝母的乙醇提取物有显著镇咳作用<sup>[3]</sup>,但平贝母的药效成分、质量控制、多种成分分析方面研究严重不足,因此对平贝母成分分析及鉴定等方面的研究显得尤为重要。

根据本课题研究,采用 HPLC-ESI-TRAP-MS 方法获得的多级质谱信息提供了更多的结构信息来明确的识别出目标成分,观察到 LC-ESI-TRAP-MS 法对甾体类生物碱成分的定性分析较传统的 LC 或 LC-MS 方法更为有效。因此 HPLC-ESI-TRAP-MS 可能变成一个识别、确认、食品和药用植物中的甾体生物碱成分上非常有用的技术,成为一个有价值的分析工具。

为了建立敏感的分析方法,通过多次试验对流动相及色谱柱进行优化而得到预期的峰形及分离效果,由于贝母内化学成分以生物碱为主,检测中生物碱色谱峰常出现拖尾现象,因此,在本研究中,将水相加入 0.1% 氨水时发现可缓解拖尾现象,进而优化色谱峰峰形和信噪比。正离子与负离子条件分别

表 1 平贝母水煎液内 LC-MS<sup>n</sup> 数据及成分分析

Table 1 Precursor and product ions of 22 compounds of *Fritillaria Ussuriensis* Bulbus water extracts

No.	保留时间 /min	准分子离子峰 <i>m/z</i>	多级离子碎片 <i>m/z</i>	推测化合物名称
1	11.0	480.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 462.6, [MS] <sup>3</sup> 444.5, 426.5	平贝碱乙
2	11.4	424.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 406.4, [MS] <sup>3</sup> 388.3, 363.3	未知
3	12.0	428.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 410.5, [MS] <sup>3</sup> 393.5, 351.4, 337.4	贝母辛
4	12.4	478.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 460.5, [MS] <sup>3</sup> 442.6, 424.1	平贝碱丙
5	12.6	624.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 606.5, 588.5, [MS] <sup>3</sup> 444.5, 426.5,	平贝啶甙
6	13.5	422.4 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 404.4, [MS] <sup>3</sup> 386.4, 361.3	未知
7	13.9	608.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 590.6, [MS] <sup>3</sup> 428.5, 410.5	平贝宁苷
8	16.6	592.9 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 574.4, [MS] <sup>3</sup> 412.4, 394.4	西贝母碱苷
9	16.8	464.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 444.5, [MS] <sup>3</sup> 426.6, 408.5	平贝碱甲
10	18.9	410.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 394.4, [MS] <sup>3</sup> 380.6, 338.4	黑龙贝母碱
11	19.6	446.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 428.5, [MS] <sup>3</sup> 412.4, 396.4	平贝宁苷元
12	19.8	432.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 414.6, [MS] <sup>3</sup> 398.5, 386.4	贝母素甲
13	20.4	578.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 416.5, [MS] <sup>3</sup> 398.5, 346.5,	平贝碱甙
14	21.3	430.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 412.5, [MS] <sup>3</sup> 384.4	西贝母碱
15	23.8	432.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 414.6, [MS] <sup>3</sup> 398.5, 372.4	异贝母素甲
16	25.4	430.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 412.5, [MS] <sup>3</sup> 396.4, 370.4	贝母素乙
17	26.4	416.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 398.5, [MS] <sup>3</sup> 380.4, 271.2	平贝酮 或 鄂贝定碱 或 puqiedine
18	27.3	504.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 486.5, [MS] <sup>3</sup> 468.4, 426.5, 359.4	未知
19	30.4	416.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 398.6, [MS] <sup>3</sup> 380.4	平贝酮 或 鄂贝定碱 或 puqiedine
20	32.1	414.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 396.5, [MS] <sup>3</sup> 386.4, 271.2	去氢鄂贝定碱 或 puqiedinone
21	33.1	414.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 396.5, [MS] <sup>3</sup> 386.4, 271.2	去氢鄂贝定碱 或 puqiedinone
22	37.3	416.5 [M + H] <sup>+</sup>	[MS] <sup>2</sup> 398.6, [MS] <sup>3</sup> 380.4	平贝酮 或 鄂贝定碱 或 puqiedine

检测,结果显示正离子有较好的离子响应,因此选用正离子方式检测各成分。

本研究通过 HPLC-ESI-TRAP-MS 对平贝母生物碱成分进行定性分析。与现有对照品比对及其化合物的多级裂解规律对平贝母水煎液中的成分进行确定。此方法可以快速准确地指认出平贝母内的已知成分。此外本研究还发现,平贝母内异甾体类生物碱成分二级裂解大多以脱水为主,所以脱水后的二级碎片质谱峰有较高丰度,通过此规律可以快速准确地指认出平贝母内化学成分,为今后平贝母质量控制研究及定性分析提供了理论前提。

本课题以现代分析技术 LC-MS/MS 为依托,对平贝母整体的物质基础进行分析,通过对平贝母化学成分的质谱分析及成分的鉴定,为平贝母药材及其制剂定性等分析标准的制定提供了相关性的科学依据。该分析方法可以快速预测平贝母中的未知化学成分,为平贝母的后续化学成分研究提供一种高

效、可靠的追踪检测手段。

[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,2015:138-139.

[2] 尚志钧,刘晓龙. 贝母药用历史及品种考察[J]. 中华医史杂志,1995, 25(1): 38-42.

[3] 李萍,季晖. 贝母类中药的镇咳祛痰作用的研究[J]. 中国药科大学学报, 1993, 24(6): 360-362.

[4] 夏德豪,程昆隆,肖新月,等. 平贝母中总生物碱含量测定方法学研究[J]. 中国药事, 2007, 21(9): 756-756.

[5] 李兴斌,高燕飞,李吉良. 平贝母化学成分及药理活性研究进展[J]. 中医中药信息, 2004, 21(4): 28-29.

[6] 于晓琳. 贝母的药理作用研究概况[J]. 中草药, 2000, 31(4): 313-315.

[7] 刘建梅. 贝母生物碱组分的制备与质量评价方法建立[D]. 上海:华东理工大学,2013.

- [ 8 ] Li H J, Jiang Y, Li P, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria species* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(45): 7109-7122.
- [ 9 ] 文娟. 异甾体生物碱的分离及衍生物的合成[D]. 成都:西南交通大学,2007.
- [10] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999 测量不确定度评定与表示[S]. 北京:中国计量出版社, 2000.
- [11] 徐东铭,张本,祁彦. 平贝母生物碱研究 II [J]. 中草药,1983,14(2):7-8.
- [12] 徐东铭,黄恩喜,许卯力,等. 平贝母茎叶生物碱成分的研究[J]. 中药中药杂志,1986,11(11):40-41.
- [13] Zhou J L, Li P, Li H J. et al. Development and validation of a liquid chromatography/electrospray. Ionization time-of-flight mass spectrometry method for relative and absolute quantification of steroidal alkaloids in *Fritillaria species* [J]. J Chromatogr A, 2008, 1177(1): 126-137.
- [14] Yun Y G, Jeon B H, Lee J H, et al. Verticinone induces cell cycle arrest and apoptosis in immortalized and malignant human oral keratinocytes[J]. Phytother Res,2008,22(3):416-423.

[责任编辑 顾雪竹]

## 欢迎订阅《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中华中医药学会、中国中医科学院中药研究所主办的学术刊物。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目包括复方配伍专论、方剂学研究、药剂与炮制、资源与鉴定、化学分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、中医传承及相关综述等。目前为 CSCD 来源期刊、中文核心期刊、科技核心期刊、RCCSE 中国学术期刊排行榜核心期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为中国中医药优秀期刊及中国学术期刊优秀期刊。

本刊为半月刊,16 开本,234 页,标准刊号 ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号 2-417;国外由中国国际图书贸易集团有限公司办理发行,代号 SM4655,欢迎订阅。读者还可通过本刊编辑部办理邮购,地址:北京市东城区东直门内南小街 16 号,收件人:《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编 100700,Tel:(010)84076882,E-mail:syfjx\_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。