

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的甘青乌头 抗乙酰胆碱酯酶活性成分分析

王月^{1,2}, 刘晓谦², 梁曜华², 冯伟红², 李春^{2*}, 王智民^{2*}

(1. 广东药科大学, 广州 510006;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的:明确甘青乌头抗乙酰胆碱酯酶的活性成分,为寻找新的抗阿尔茨海默病(AD)药物提供参考。方法:采用改良的Ellman's法筛选甘青乌头抗乙酰胆碱酯酶活性部位,超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对活性部位的化学成分进行分析,色谱条件为ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),流动相选择乙腈(A)-0.4%氨水溶液(B)梯度洗脱,流速0.4 mL·min⁻¹,柱温30℃。二氯甲烷萃取部位A相比比例随时间变化为0~3 min, 5%A; 3~7 min, 5%~20%A; 7~11.5 min, 20%~33%A; 11.5~15.5 min, 33%~50%A; 15.5~20.5 min, 50%~80%A; 20.5~23 min, 80%~85%A; 23~25 min, 85%~95%A。正丁醇萃取部位A相比比例随时间变化为0~2 min, 5%A; 2~8 min, 5%~20%A; 8~11 min, 20%~33%A; 11~15 min, 33%~95%A。质谱条件为电喷雾离子源,正离子全扫描模式采集数据,检测范围 m/z 100~1 500。结果:甘青乌头醇提物的二氯甲烷萃取部位和正丁醇萃取部位对乙酰胆碱酯酶均有一定的抑制作用,二者的半数抑制浓度分别为(64±4.4), (85.7±3.8) mg·L⁻¹。经UPLC-Q-TOF-MS/MS分析,从二氯甲烷萃取部位共推测出21个生物碱类成分,正丁醇萃取部位共推测出11个生物碱类成分;2个部位均含有的关附壬素为首次在甘青乌头中发现。结论:二萜生物碱是甘青乌头抗乙酰胆碱酯酶活性的主要药效物质,值得深入挖掘。

[关键词] 甘青乌头(榜嘎); 乙酰胆碱酯酶; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS); 二萜生物碱; 关附壬素; 二氯甲烷部位; 正丁醇部位

[中图分类号] R22;Q55;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0130-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211446

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210412.1056.003.html>

[网络出版日期] 2021-04-12 11:38

Anti-acetylcholinesterase Active Ingredients from *Aconitum tanguticum* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

WANG Yue^{1,2}, LIU Xiao-qian², LIANG Yao-hua², FENG Wei-hong², LI Chun^{2*}, WANG Zhi-min^{2*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines,
Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the anti-acetylcholinesterase active ingredients in *Aconitum tanguticum*, so as to lay the foundation for finding new anti-Alzheimer's disease (AD) drugs. **Method:** The anti-acetylcholinesterase active fractions of *A. tanguticum* were screened by the modified Ellman's method, and the chemical composition of the active fraction was analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). The chromatographic separation was

[收稿日期] 20210130(012)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT17039);北京市自然科学基金项目(7132152)

[第一作者] 王月,在读硕士,从事中药化学研究,E-mail:641198319@qq.com

[通信作者] *李春,研究员,从事中药化学研究,E-mail:cli@icmm.ac.cn;

*王智民,研究员,从事中药化学研究,E-mail:zmwang@icmm.ac.cn

performed on an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) with acetonitrile (A)-0.4% ammonia aqueous solution (B) as mobile phase for gradient elution, and the column temperature was set at 30 °C with the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. Phase A of the dichloromethane fraction changed with time as follows: 0-3 min, 5%A; 3-7 min, 5%-20%A; 7-11.5 min, 20%-33%A; 11.5-15.5 min, 33%-50%A; 15.5-20.5 min, 50%-80%A; 20.5-23 min, 80%-85%A; 23-25 min, 85%-95%A. Phase A of the *n*-butanol fraction changed with time as follows: 0-2 min, 5%A; 2-8 min, 5%-20%A; 8-11 min, 20%-33%A; 11-15 min, 33%-95%A. Mass spectrometry was performed on electrospray ionization, data were collected in positive ion mode, and the detection range was *m/z* 100-1 500. **Result:** Both the dichloromethane and *n*-butanol fractions had a certain inhibitory effect on acetylcholinesterase, their half inhibitory concentration (IC₅₀) values were (64±4.4) mg·L⁻¹ and (85.7±3.8) mg·L⁻¹, respectively. By UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis, a total of 21 alkaloids were identified from the dichloromethane fraction, and 11 alkaloids were identified from *n*-butanol fraction. Guan-fu base I, found in both fractions, was first discovered in *A. tanguticum*. **Conclusion:** Diterpene alkaloids are the main anti-acetylcholinesterase substances of *A. tanguticum*, which is worth further exploration.

[**Keywords**] *Aconitum tanguticum* (Bangge); acetylcholinesterase; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS); diterpene alkaloids; guan-fu base I; dichloromethane fraction; *n*-butanol fraction

阿尔茨海默病(AD)是人类面临的最具挑战性的疾病之一,当前全球有3 560万患者。据预测,到2050年AD患者将增加到1.154亿^[1]。现在,治疗AD的一线药物均为乙酰胆碱酯酶抑制剂,包括盐酸他克林、利凡斯的明、多奈哌齐、加兰他敏及美金刚,但这些药物都有一定的副作用,且只能延缓并不能逆转AD进程^[2]。尽管如此,乙酰胆碱酯酶抑制剂仍然是当下开发抗AD药物的主要靶点。生物碱类乙酰胆碱酯酶抑制剂被认为是结构种类最多、生物活性最强的一类抑制剂,是目前的研究热点。常见生物碱类乙酰胆碱酯酶抑制剂主要有甾体类、异喹啉类和吲哚类生物碱^[3-5]。但近年来陆续有人报道二萜生物碱在体内外均有抗乙酰胆碱酯酶活性。张全政^[6]对C₂₀-二萜生物碱进行了全合成研究,指出C₂₀-二萜生物碱具有抑制乙酰胆碱酯酶的生物活性。NESTEROVA等^[7]研究发现,预防性灌胃给予小鼠C₂₀-型二萜生物碱 songorine后可纠正由东莨菪碱导致的小鼠失忆,主要表现为小鼠有条件地被动逃避反应能力的提升和行为活动的正常化,其效果超过了阳性药 pyracetam,该活性可能和 songorine 的类胆碱样作用有关。从乌头中分离得到的新二萜生物碱 swatinine-C 和已知化合物 hohenackerine 对乙酰胆碱酯酶[半数抑制浓度(IC₅₀)分别为3.7,4.53 μmol·L⁻¹]和丁酰胆碱酯酶(IC₅₀分别为12.23,9.94 μmol·L⁻¹)有竞争性抑制活性^[8]。因此,从二萜生物碱中获得高效低毒的乙酰胆碱酯酶抑制剂具有理论可行性。

乌头属植物富含二萜生物碱。甘青乌头(藏族药名榜嘎)为乌头属植物,主产于青海、甘肃、四川和云南,具有清热解毒功效,临床上用其全草治疗传染病发热、肝胆热病、流行性感胃及食物中毒等^[9]。现代研究表明甘青乌头具有抗炎、抗菌、抗病毒和抗肿瘤等活性,化学成分主要含有二萜生物碱、黄酮和酚酸类成分,其中二萜生物碱类型主要有C₂₀海替生型,C₂₀海替定型和双二萜型,以及少量的C₁₉内酯型^[10]。基于前期研究基础和文献报道,本课题组推测甘青乌头生物碱部位应具有良好的抗乙酰胆碱酯酶活性。因此,本实验拟考察甘青乌头不同极性部位的抗乙酰胆碱酯酶活性,通过超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析各活性部位的化学成分,为寻找新的抗AD药物提供参考。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱系统和 Xevo G2-S QTOF 型高分辨飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司),Multiskan GO1510 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司),DY-CT-1 型超声波提取机(济宁东英自动化设备有限公司),R-220 型旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司),L535-1 型台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

碘代硫代乙酰胆碱(ATCh,批号100374702),乙酰胆碱酯酶(AChE,批号1003116537),5,5'-二硝代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB,批号1002747530)均购自 Sigma 公司;石杉碱甲(成都瑞芬思生物科技有限

公司,批号100243-201603,纯度 $\geq 98\%$),二甲基亚砜(DMSO,天津市精细化工研究所,批号20190218),磷酸盐缓冲液(PBS)和十二烷基硫酸钠(SDS)(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为SL29211101,F20091029),水为去离子水或屈臣氏纯净水,乙腈、氨水为色谱纯,其他试剂均为分析纯。甘青乌头购于青海三江宝商贸有限公司,经中国中医科学院中药研究所李春研究员鉴定为毛茛科植物甘青乌头 *Aconitum tanguticum* 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 甘青乌头醇提物的制备^[11] 取甘青乌头药材粗粉20.50 kg,分别加8,6,6倍量80%乙醇超声提取3次,每次40 min,每次提取完成后用纱布过滤,合并滤液,静置12 h,于3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min(离心半径7 cm),收集上清液,40 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥得浸膏,计算浸膏得率22.31%。

2.1.2 甘青乌头不同极性部位的制备 取甘青乌头醇提物适量,加水使溶解,得0.5 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘青乌头醇提物水溶液(以生药量计),加入适量盐酸溶液,调pH 2~3。将配制好的溶液用等体积二氯甲烷萃取4次,合并萃取液(下层)并减压回收溶剂得酸性萃取物406.31 g;剩余水部分(上层)加浓氨水调pH至10左右,依次用二氯甲烷和正丁醇萃取,合并各部分萃取液,减压回收溶剂得二氯甲烷萃取部位51.24 g,正丁醇萃取部位424.17 g。各部分浸膏于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

2.2 各部位乙酰胆碱酯酶活性抑制能力研究 采用改良的Ellman's法测定甘青乌头不同极性部位的乙酰胆碱酯酶抑制活性^[12]。将阳性药石杉碱甲和不同极性部位样品均溶于含2% DMSO的PBS(pH 8.0)中,二氯甲烷和正丁醇萃取部位初始质量浓度均为5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,甘青乌头醇提物、酸性萃取物和剩余水部位的初始质量浓度均为10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,样品均逐步按照2倍梯度稀释至7个质量浓度。于96孔板中每孔加入PBS 100 μL ,50 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰胆碱酯酶(溶于pH 7.5的PBS中)20 μL ,样品溶液20 μL ,1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATCh 20 μL 作为酶反应底物。在37 $^{\circ}\text{C}$ 温度下恒温培养30 min后加入4% SDS 20 μL 终止反应,加入0.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTNB 20 μL ,立即测定反应体系在405 nm处的吸光度 A ,按公式抑制率 $=[1-(A_{\text{样品}}-A_{\text{背景}})/A_{\text{空白}}]\times 100\%$ 计算乙酰胆碱酯酶抑制率,式中 $A_{\text{样品}}$ 表示加入样品的反应体系的 A , $A_{\text{背景}}$ 表示以PBS(pH 7.5)代替酶液的反应体系的 A , $A_{\text{空白}}$ 表示以样品

溶剂代替样品的反应体系的 A 。实验均重复3次,采用SPSS 22.0计算各样品的 IC_{50} , IC_{50} 越小,表示受试样品的乙酰胆碱酯酶活性抑制能力越高。结果显示,甘青乌头醇提物及其二氯甲烷萃取部位、正丁醇萃取部位、酸性萃取物和剩余水部位的 IC_{50} 分别为(7 775 $\pm$ 1 276.3), (64 $\pm$ 4.4), (85.7 $\pm$ 3.8), (629 $\pm$ 23.4), (1 875 $\pm$ 262) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,阳性药石杉碱甲的 IC_{50} =(0.10 $\pm$ 0.01) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。说明二氯甲烷萃取部位和正丁醇萃取部位是甘青乌头发挥抑制乙酰胆碱酯酶活性的活性部位^[13]。

2.3 供试品溶液的制备 分别取甘青乌头二氯甲烷萃取部位和正丁醇萃取部位116.0, 100.4 mg,各加入甲醇5 mL超声使溶解,经0.22 μm 微孔滤膜过滤,备用。

2.4 检测条件 色谱条件为ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.4%氨水溶液(B)梯度洗脱,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,流速0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量1 μL 。二氯甲烷萃取部位的A相比比例随时间变化程序设定为0~3 min, 5%A; 3~7 min, 5%~20%A; 7~11.5 min, 20%~33%A; 11.5~15.5 min, 33%~50%A; 15.5~20.5 min, 50%~80%A; 20.5~23 min, 80%~85%A; 23~25 min, 85%~95%A。正丁醇萃取部位A相比比例随时间变化为0~2 min, 5%A; 2~8 min, 5%~20%A; 8~11 min, 20%~33%A; 11~15 min, 33%~95%A。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式,离子源温度100 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度400 $^{\circ}\text{C}$,锥孔电压40 V,毛细管电压2.0 kV,锥孔气流速50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$,脱溶剂气流速700 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 。碎片离子碰撞能量20~50 eV,母离子碰撞能量6 eV,扫描范围 m/z 100~1 500。

2.5 不同部位化学成分的分析 采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对甘青乌头二氯甲烷萃取部位和正丁醇萃取部位的化学成分进行推测,根据保留时间(t_{R})和一级、二级质谱裂解规律,从二氯甲烷萃取部位推测出21个生物碱类成分;从正丁醇萃取部位推测出11个生物碱类成分,2个部位均检测到的关附壬素为甘青乌头中首次发现,见图1,2和表1,2。数据采集和分析采用MassLynx 4.1软件,将各色谱峰的紫外光谱、一级质谱和二级质谱给出的离子信息与文献值进行比较,进而对各色谱峰进行识别。

2.5.1 C_{20} 海替生型, C_{20} 海替定型及 C_{20} 阿替生型二萜生物碱 在二氯甲烷萃取部位中,化合物3在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 328.191 3, MS/MS产生碎片离子 m/z 310.181 3 [$\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$]⁺,通过与

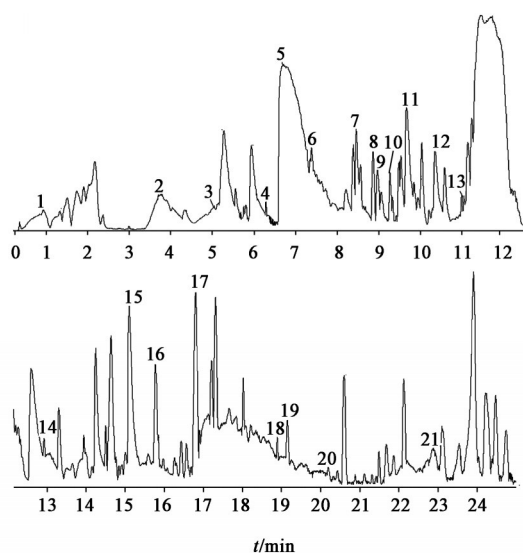


图1 甘青乌头二氯甲烷萃取部位UPLC-Q-TOF-MS/MS的BPI
Fig. 1 BPI chromatogram of dichloromethane fraction from *A. tanguticum* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

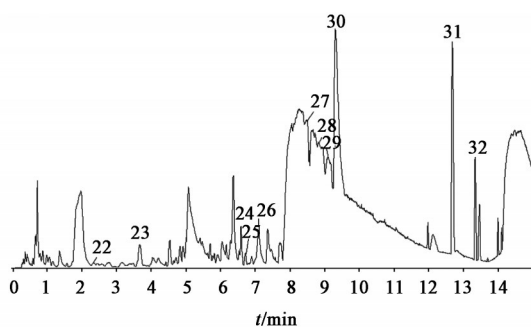


图2 甘青乌头正丁醇萃取部位UPLC-Q-TOF-MS/MS分析的BPI
Fig. 2 BPI chromatogram of *n*-butanol fraction from *A. tanguticum* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

文献[16]比对,推测其为 hetisinone。化合物6在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 416.244 7, MS/MS 产生碎片离子 m/z 328.228 0, 查阅文献[19], 推测其为 guan-fu base Z。化合物8在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 472.269 5, MS/MS 产生碎片离子 m/z 416.243 6 $[M+H-CO-CO]^+$, 314.213 1 $[M+H-CO-CO-CH_3CH_2CH(CH_3)COOH]^+$ 和 121.065 9, 查阅文献[20], 推测其为 tanguticuline C。化合物9在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 372.218 2, MS/MS 产生碎片离子 m/z 344.259 4 $[M+H-CO]^+$, 312.197 6 $[M+H-CH_3COOH]^+$, 查阅文献[21], 甘青乌头中相对分子质量为 371 Da 的二萜生物碱有 2 个, 分别为 13-*O*-acetylhetisine 和 11-acetylhetisine, 只根据质谱碎片无法确定其最终结构。化合物7在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 430.260 7, MS/MS 产生了碎片离子 m/z 328.192 5 $[M+H-C_5H_{10}O_2]^+$, 294.202 6; 化合物11在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 430.258 9,

MS/MS 产生碎片离子 m/z 310.181 7 $[M+H-2CH_3COOH]^+$, 292.179 3; 化合物12在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 430.260 2, MS/MS 产生碎片离子 m/z 400.250 4。查阅文献[20, 22-23], 甘青乌头中相对分子质量为 429 Da 有 3 个海替生型二萜生物碱, 分别为 关附甲素, dihydrogeyerine 和 tanguticuline B, 其中关附甲素和 tanguticuline B 的准分子离子峰分别为 m/z 430.222 8, 430.258 7。海替生型二萜生物碱质谱裂解规律^[34]为分子离子峰较强, 一般为基峰, 尤其是 C(14) 位无羟基取代者, 即使 C(2) 或 C(11) 位有含氧取代, 其分子离子峰仍然是最强峰; 当 C(1), C(6) 和 C(9) 位有含氧取代时, 则 M⁺ 强度减弱, 形成中强峰; 含 C(14)-OH 的海替生二萜生物碱, 若有 C(13) 位含氧取代, 而 C(1) 无氧取代时, 分子离子峰一般为基峰或强峰; 酰基取代的海替生型生物碱, 一般以丢失取代酰基, 母核丢失水、一氧化碳为主, 关附甲素结构式中含 C(14)-OH 和 C(13)-OAc (Ac 表示 CH₃CO⁻), 而 C(1) 无氧取代, 分子离子峰为基峰, 出现丢失 C(2)-OAc, 又丢失 OH 和 CO 的碎片离子峰。tanguticuline B 结构式中不含 C(14)-OH, 但含 C(9)-OH, M⁺ 强度减弱, 形成中强峰, 且丢失 C(2)-C₅H₁₀O₂ 得到 m/z 328.192 5 的碎片。dihydrogeyerine 结构式中均不含 C(14)-OH, 但含 C(6)-OH, M⁺ 强度减弱, 形成中强峰, 此外, 因为结构中含 C(13)-OH, 故出现 C(13)-OH 脱氢生成羰基再失去 CO 的碎片, 即 m/z 400.250 4 的碎片, 故推测化合物 7, 11, 12 分别为 tanguticuline B, 关附甲素和 dihydrogeyerine。

化合物13在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 477.314 1, MS/MS 产生碎片离子 m/z 459.303 1 $[M+H-H_2O]^+$, 209.134 4, 121.066 2, 查阅文献[18], 推测其为 navirine B。化合物19在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 346.274 6, MS/MS 产生碎片离子 m/z 296.200 0, 278.192 1, 查阅文献[11], 推测其为 dihydroatisine。在正丁醇萃取部位中, 化合物25在ESI⁺模式下得准分子离子峰 m/z 330.208 4, MS/MS 产生碎片离子 m/z 312.197 6, 294.186 3。化合物30在ESI⁺模式下得到了准分子离子峰 m/z 330.208 2, MS/MS 产生碎片离子 m/z 312.196 4。查阅文献[14], 甘青乌头中相对分子质量为 329 Da 有 3 个海替生型二萜生物碱, 分别为 delfissinol, 唐乌碱, hetisine, 只根据质谱碎片无法确定其最终结构。化合物 7, 11, 12 的质谱裂解途径见图 3~5。

表 1 甘青乌头二氯甲烷萃取部位中化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析
Table 1 UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of chemical constituents in dichloromethane fraction from *A. tanguticum*

化合物	<i>t_R</i> /min	分子式	[M+H] ⁺			碎片离子	名称
			<i>m/z</i> 实测值	<i>m/z</i> 理论值	δ /ppm		
1	0.938	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.123 6	166.123 2	2.4	122.069 0	大麦芽碱 ^[14]
2	3.769	C ₂₂ H ₂₉ NO ₅	388.213 3	388.211 4	2.3	328.191 3, 310.180 0	关附壬素 ^[15]
3	5.146	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	328.191 3	328.192 0	2.1	310.181 3	hetisinone ^[16]
4	6.287	C ₂₁ H ₃₁ NO ₅	378.227 3	378.228 0	-0.7	360.253 1, 346.161 7, 299.176 2	heterophyllidine ^[17]
5	6.643	C ₂₂ H ₃₃ NO ₂	344.258 2	344.259 0	-0.3	326.248 1	阿替生/isoatisine/chellespontine ^[14,18]
6	7.382	C ₂₄ H ₃₃ NO ₅	416.244 7	416.243 7	1.9	328.228 0	guan-fu base Z ^[19]
7	8.560	C ₂₅ H ₃₅ NO ₅	430.260 7	430.259 3	-2.2	328.192 5, 294.202 6	tanguticuline B ^[20]
8	8.855	C ₂₇ H ₃₇ NO ₆	472.269 5	472.269 9	-0.8	416.243 6, 314.213 1, 121.065 9	tanguticuline C ^[20]
9	9.054	C ₂₂ H ₂₉ NO ₄	372.218 2	372.217 5	1.9	344.259 4, 312.197 6	13- <i>O</i> -acetylhetisine/11-acetylhetisine ^[21]
10	9.267	C ₂₂ H ₃₃ NO ₂	344.260 4	344.259 0	4.1	328.197 8	阿替生/isoatisine/chellespontine ^[14,18]
11	9.673	C ₂₄ H ₃₁ NO ₆	430.258 9	430.259 3	-0.9	310.181 7, 292.179 3	关附甲素 ^[22]
12	10.356	C ₂₅ H ₃₅ NO ₅	430.260 2	430.259 3	2.1	400.250 4	dihydrogeyerine ^[23]
13	10.996	C ₃₀ H ₄₀ N ₂ O ₃	477.314 1	477.311 7	5.0	459.303 1, 209.134 4, 121.066 2	navirine B ^[18]
14	12.916	C ₂₂ H ₃₃ NO ₅	392.245 5	392.244 3	1.5	360.219 1, 342.208 5	异叶乌头碱 ^[14]
15	15.093	C ₄₀ H ₅₂ N ₂ O ₄	625.408 7	625.406 4	3.8	313.208 2	anthoroidine B ^[24]
16	15.840	C ₄₃ H ₅₈ N ₂ O ₇	715.438 6	715.438 1	-0.6	625.406 0, 593.280 9, 461.320 6, 358.226 9, 313.205 8, 296.204 4	trichocarpine A ^[25]
17	16.808	C ₂₁ H ₃₁ NO ₄	362.273 5	362.269 5	-1.4	344.214 2, 330.216 3	heterophylline ^[17]
18	18.878	C ₄₇ H ₅₆ N ₂ O ₅	729.448 7	729.447 9	-1.4	639.454 2, 365.227 5, 320.231 4, 296.203 3	navicularine B ^[26]
19	19.148	C ₂₂ H ₃₅ NO ₂	346.274 6	346.275 6	2.9	296.200 0, 278.192 1	dihydroatisine ^[11]
20	20.613	C ₄₉ H ₆₂ N ₂ O ₇	791.458 7	791.463 5	-5.0	639.437 0, 396.235 5, 296.225 5	tangirine ^[27]
21	22.876	C ₄₀ H ₅₀ N ₂ O ₄	623.458 3	623.457 7	1.0	459.337 0, 342.243 8, 280.208 4, 230.173 9	navicularine A/tanguticurine A ^[24,28]

表 2 甘青乌头正丁醇萃取部位中化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析
Table 2 UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of chemical constituents in *n*-butanol fraction from *A. tanguticum*

化合物	<i>t_R</i> /min	分子式	[M+H] ⁺			碎片离子	名称
			<i>m/z</i> 实测值	<i>m/z</i> 理论值	δ /ppm		
22	2.354	C ₂₀ H ₂₅ NO ₄	344.186 5	344.186 2	0.9	326.175 2, 121.065 4	tanguticuline E ^[20]
23	3.677	C ₂₀ H ₂₇ NO ₂	314.161 1	314.160 4	2.2	296.150 6, 121.006 1	venulol/9-hydroxynominine, tongolinine/tangutimine, naviculine A/naviculine B ^[29-32]
24	6.365	C ₂₁ H ₃₁ NO ₄	362.198 2	362.196 7	4.1	346.203 5, 330.208 1	heterophylline ^[17]
25	6.689	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	330.208 4	330.206 9	4.5	312.197 6, 294.186 3	delfissinol/唐乌碱/hetisine ^[14]
26	7.091	C ₂₂ H ₂₉ NO ₅	388.213 5	388.212 4	2.8	328.192 7, 310.193 1	关附壬素 ^[15]
27	8.271	C ₂₂ H ₃₃ NO ₂	344.259 8	344.259 0	2.3	326.248 4	阿替生/isoatisine/chellespontine ^[14,18]
28	8.656	C ₂₂ H ₃₃ NO ₂	344.260 3	344.259 0	3.8	326.248 4	阿替生/isoatisine/chellespontine ^[14,18]
29	9.097	C ₂₂ H ₃₃ NO ₂	344.259 7	344.259 0	0.6	326.247 7	阿替生/isoatisine/chellespontine ^[14,18]
30	9.332	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	330.208 2	330.206 9	4.5	312.196 4	delfissinol/唐乌碱/hetisine ^[14]
31	12.689	C ₂₂ H ₃₃ NO ₅	392.245 0	392.243 7	3.3	374.233 7, 360.218 7, 342.208 3	异叶乌头碱 ^[14]
32	13.343	C ₂₄ H ₃₅ NO ₆	434.256 3	434.254 3	4.6	371.242 7, 344.260 6, 309.701 0	6-乙酰异叶乌头碱 ^[33]

化合物 5 在 ESI⁺ 模式下得准分子离子峰 *m/z* 344.258 2, MS/MS 产生碎片离子 *m/z* 326.248 1。化合物 10 在 ESI⁺ 模式下准分子离子峰 *m/z* 344.260 4, MS/MS 产生碎片离子 *m/z* 328.197 8。查阅文献

• 134 •

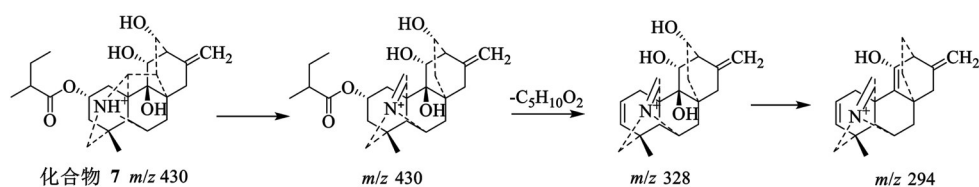


图3 tanguticuline B的质谱裂解途径

Fig. 3 MS fragmentation pathways of tanguticuline B

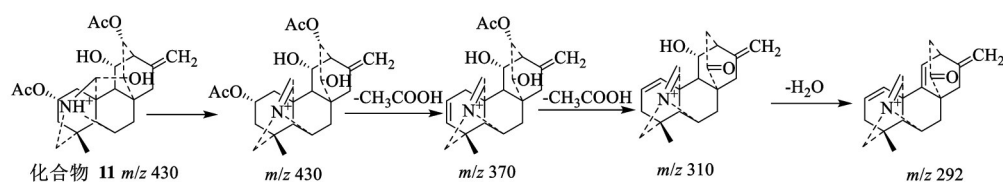


图4 关附甲素的质谱裂解途径

Fig. 4 MS fragmentation pathways of guan-fu base A

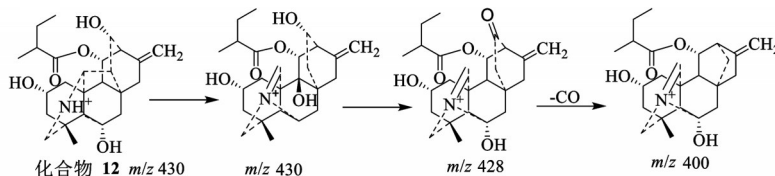


图5 dihydrogeyerine的质谱裂解途径

Fig. 5 MS fragmentation pathways of dihydrogeyerine

[14, 18, 20], 甘青乌头中相对分子质量为 343 Da 有 4 个 C_{20} 型二萜生物碱, 分别为阿替生, isoatisine, chellespontine 和 $3\alpha, 6\beta$ -dihydroxy-11-deoxy-13-dehydro-hetisine (tanguticuline E), 四者 $[M+H]^+$ 准分子离子峰分别为 m/z 344.259 5, 344.458 2, 344.259 0, 344.185 1。阿替生型二萜生物碱质谱裂解规律^[35-36]主要是丢失一分子水或者乙酸, 失去碎片的位置是环上连有羟基或乙酰氧基的碳原子; 或丢失取代基- C_3H_8 , 得到 m/z 300 的碎片离子。根据质谱中给出的信息, 无法确定二者最终结构。

在正丁醇萃取部位中, 化合物 23 在 ESI^+ 模式下得准分子离子峰 m/z 314.161 1, MS/MS 产生碎片离子 m/z 296.150 6 $[M+H-H_2O]^+$, 121.006 1, 查阅文献[29-32], 相对分子质量为 313 Da 的 C_{20} 型二萜生物碱目前存在 6 个同分异构体, 分别为 tongolnine, venulol, 9-hydroxynominine, tangutimine, naviculine A 和 B, 六者的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰分别为 m/z 314.201 3, 314.204 3, 314.204 2, 314.239 6, 314.212 0, 314.212 0, 只根据质谱碎片无法确定最终结构。化合物 22 在 ESI^+ 模式准分子离子峰 m/z 344.186 5, MS/MS 产生碎片离子 m/z 326.175 2 $[M+H-H_2O]^+$, 121.065 4; 化合物 27 在 ESI^+ 模式下得准分子离子峰 m/z 344.259 8, MS/MS 产生碎片离子 m/z 326.248 4 $[M+H-H_2O]^+$; 化合物 28 在 ESI^+ 模式下得准分子离

子峰 m/z 344.260 3, MS/MS 产生碎片离子 m/z 326.248 4 $[M+H-H_2O]^+$; 化合物 29 在 ESI^+ 模式下得准分子离子峰 m/z 344.259 7, MS/MS 产生碎片离子 m/z 326.247 7 $[M+H-H_2O]^+$ 。参考文献[14, 18, 20], 甘青乌头中已分离鉴定的相对分子质量为 343 Da 的二萜生物碱目前存在 4 个同分异构体, 分别为阿替生, isoatisine, chellespontine 和 tanguticuline E, 根据质谱中给出的信息, 推测化合物 22 为 tanguticuline E, 化合物 27~29 则无法确定最终结构。

2.5.2 双二萜型二萜生物碱 在二氯甲烷萃取部位中, 化合物 15 在 ESI^+ 模式下得准分子离子峰 m/z 625.408 7, MS/MS 产生碎片离子 m/z 313.208 2, 查阅文献[24], 推测其为 anthoroidine B。化合物 16 在 ESI^+ 模式下得准分子离子峰 m/z 715.438 6, MS/MS 产生碎片离子 m/z 625.406 0, 593.280 9, 461.320 6, 358.226 9 $[M+H-C_{20}H_{27}NO-CH_3COOH]^+$, 313.205 8, 296.204 4 $[M+H-C_{23}H_{33}NO_6]^+$, 查阅文献[25], 推测其为 trichocarpine A。化合物 18 在 ESI^+ 模式下准分子离子峰 m/z 729.448 7, MS/MS 产生碎片离子 m/z 639.454 2, 365.227 5, 320.231 4, 296.203 3 $[M+H-C_{27}H_{31}NO_4]^+$; 化合物 20 在 ESI^+ 模式下准分子离子峰 m/z 791.458 7, MS/MS 产生碎片离子 m/z 639.437 0 $[M+H-COC_6H_5-OCH_3-CH_3]^+$, 396.235 5, 296.225 5

$[M+H-C_{29}H_{37}NO_6]^+$; 化合物 **21** 在 ESI⁺ 模式下准分子离子峰 m/z 623.458 3, MS/MS 产生碎片离子 m/z 459.337 0, 342.243 8, 280.208 4, 230.173 9。查阅文献[24, 26-28], 推测二氯甲烷萃取部位化合物 **18**, **20**, **21** 分别为 navicularine B, tangirine, navicularine A 或 tanguticurine A。

2.5.3 C₁₉型二萜生物碱 在二氯甲烷萃取部位中, 化合物 **4** 在 ESI⁺ 模式下准分子离子峰 m/z 378.227 3, MS/MS 产生碎片离子 m/z 360.253 1 $[M+H-H_2O]^+$, 346.161 7, 299.176 2。查阅文献[17], 推测其为 heterophyllidine。化合物 **14** 在 ESI⁺ 模式下得准分子离子峰 m/z 392.245 5, MS/MS 产生碎片离子 m/z 360.219 1 $[M+H-CH_3OH]^+$, 342.208 5 $[M+H-CH_3OH-H_2O]^+$, 查阅文献[14], 推测为异叶乌头碱。化合物 **17** 在 ESI⁺ 模式下得准分子离子峰 m/z 362.273 5, MS/MS 产生碎片离子 m/z 344.214 2 $[M+H-H_2O]^+$, 330.216 3 $[M+H-CH_3OH]^+$, 通过查阅文献[17], 推测其为 heterophylline。在正丁醇萃取部位中, 化合物 **24** 在 ESI⁺ 模式下得准分子离子峰 m/z 362.198 2, MS/MS 产生碎片离子 m/z 346.203 5 $[M-CH_3]^+$, 330.208 1 $[M+H-CH_3OH]^+$, 查阅文献[17], 推测其为 heterophylline。化合物 **31** 在 ESI⁺ 模式下得准分子离子峰 m/z 392.245 0, MS/MS 产生碎片离子 m/z 374.233 7 $[M+H-H_2O]^+$, 360.218 7 $[M+H-CH_3OH]^+$, 342.208 3 $[M+H-CH_3OH-H_2O]^+$, 查阅文献[14], 推测其为异叶乌头碱。化合物 **32** 在 ESI⁺ 模式下得准分子离子峰 m/z 434.256 3, MS/MS 产生碎片离子 m/z 371.242 7 $[M+H-CH_3-OCH_3-OH]^+$, 344.260 6, 309.701 0, 查阅文献[33], 推测其为 6-乙酰异叶乌头碱。

2.5.4 甘青乌头中首次发现的化合物 在二氯甲烷萃取部位中, 化合物 **2** 在 ESI⁺ 模式下得准分子离子峰 m/z 388.213 3, MS/MS 产生碎片离子 m/z 328.191 3 $[M+H-CH_3COOH]^+$, 310.180 0 $[M+H-CH_3COOH-H_2O]^+$, 查阅文献[15], 推测其为关附壬素。在正丁醇萃取部位中, 化合物 **26** 在 ESI⁺ 模式下得准分子离子峰 m/z 388.213 5, MS/MS 产生碎片离子 m/z 328.192 7 $[M+H-CH_3COOH]^+$, 310.193 1 $[M+H-CH_3COOH-H_2O]^+$, 查阅文献[15], 推测二者均为关附壬素。

3 讨论

二萜生物碱是一类结构复杂且颇具分类价值的特征性化合物。已有文献表明 C₂₀ 型二萜生物碱在体内外均有抗 AD 活性, 且 C₂₀ 型二萜生物碱毒性

很小, 是开发新药的主要目标成分类型。甘青乌头富含 C₂₀ 型二萜生物碱, 故推测其可能有良好的抗乙酰胆碱酯酶活性。本文结果表明, 甘青乌头二氯甲烷萃取部位和正丁醇萃取部位均具有良好的抗乙酰胆碱酯酶活性, UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结果也显示这 2 个部位富含二萜生物碱, 证明了之前的推测正确, 为扩大榜嘎的应用范围奠定了基础。

通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析, 本文从甘青乌头醇提物的二氯甲烷萃取部位共推测出 21 个生物碱类成分, 从正丁醇部位推测出了 11 个生物碱, 这些成分均为甘青乌头中主要的二萜生物碱类成分。二氯甲烷部位和正丁醇部位共有 5 个生物碱类成分重合, 分别为阿替生或 isoatisine 或 chellespontine, heterophylline, 关附壬素, 异叶乌头碱; 二氯甲烷部位含有更多的双二萜型二萜生物碱, 这也是其与正丁醇部位生物碱组成上的最大差别。但由文献报道可知, 这些双二萜型二萜生物碱通常是由从榜嘎中已经分离得到的 2 个二萜生物碱(C₁₉ 型或 C₂₀ 型)通过碳氧键或碳碳键连接而成的, 故推测这些成分在与特定靶点结合发挥作用时, 可能与单个的二萜生物碱差别并不大, 这可能也是上述 2 个部位抗乙酰胆碱酯酶活性差别不大的原因。为进一步验证这一观点, 本课题组后期将对这 2 个部位的生物碱成分进行分离纯化和富集, 对单体化合物进行抗乙酰胆碱酯酶活性筛选, 以获得甘青乌头抗乙酰胆碱酯酶先导化合物。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] TEZEL G, TIMUR S S, BOZKURT İ, et al. A snapshot on the current status of Alzheimer's disease, treatment perspectives, *in-vitro* and *in-vivo* research studies and future opportunities[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2019, 67(10):1030-1041.
- [2] WANG Z Y, LIU J G, LI H, et al. Pharmacological effects of active components of Chinese herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease: a review[J]. Am J Chinese Med, 2016, 44(8):1525-1541.
- [3] 薛欣怡, 张翼, 刘亚月. 天然来源的乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选方法综述[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(5):892-897, 867.
- [4] 张东博. 药用植物中生物碱类乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2010.
- [5] 赖东海. 植物中生物碱类乙酰胆碱酯酶抑制剂的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2012.

- [6] 张全政. C₂₀-二萜生物碱的全合成研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2018.
- [7] NESTEROVA Y V, POVET'EVA T N, SUSLOV N I, et al. Correction of cholinergic abnormalities in mnestic processes with diterpene alkaloid songorine [J]. Bull Exp Biol Med, 2018, 165(1): 10-13.
- [8] AHMAD H, AHMAD S, SHAH S A A, et al. Selective dual cholinesterase inhibitors from *Aconitum laeve* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2018, 20(2): 172-181.
- [9] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京: 民族出版社, 1997: 65-66.
- [10] 杨丽华, 林丽美, 王智民, 等. 藏族药榜嘎研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 43-49.
- [11] 杨丽华, 李春, 林丽美, 等. 藏族药甘青乌头脂溶性生物碱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 32-36.
- [12] 齐博文, 莫婷, 张鑫, 等. 蛇足石杉内生真菌的分离鉴定及其代谢产物乙酰胆碱酯酶抑制活性及抗炎活性研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(15): 3213-3220.
- [13] 周思多, 王晓, 冯金红, 等. 基于微量筛选模型的48种中草药提取物乙酰胆碱酯酶抑制活性筛选及评价[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(2): 328-332.
- [14] 陈迪华, 宋维良. 甘青乌头的生物碱成分[J]. 中草药, 1985, 16(8): 2-6.
- [15] 周立红, 王乃利, 姚新生, 等. 中药关白附抗血小板聚集活性成分的研究[J]. 沈阳药学院学报, 1992, 9(4): 280-285.
- [16] PELLETIER S W, GLINSKI J A, JOSHI B S, et al. The diterpenoid alkaloids of *Delphinium tatsienense* Franch [J]. Heterocycles, 1983, 20(7): 1347-1354.
- [17] PELLETIER S W, ANEJA R. The diterpene alkaloids; three new diterpene lactone alkaloids from *Aconitum heterophyllum* Wall [J]. Tetrahed Lett, 1967, 6: 557-562.
- [18] ACQUA D S, SHRESTHA B B, GEWALI M B, et al. Diterpenoid alkaloids and phenol glycosides from *Aconitum naviculare* (Bruhl) Stapf [J]. Nat Prod Commun, 2008, 3(12): 1985-1989.
- [19] RENINECKE M G, WATSON W H, CHEN D C, et al. A 2-D NMR structure determination of guan-fu base Z, a new diterpene alkaloid from the Chinese herb Guan-Bai-Fu-Tzu (*Aconitum koreanum*) [J]. Heterocycles, 1986, 24(1): 49-61.
- [20] FAN X R, YANG L H, LIU Z H, et al. Diterpenoid alkaloids from the whole plant of *Aconitum tanguticum* (Maxim.) Stapf [J]. Photochemistry, 2019, 160: 71-77.
- [21] 黄圣卓, 曹金鑫, 蒋思萍, 等. 藏药船型乌头中的生物碱成分[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 655-657.
- [22] 李淑红. 唐古特乌头化学成分的研究[D]. 西宁: 青海师范大学, 2008.
- [23] GRINA J A, SCHROEDER D R, WYDALLIS E T, et al. Alkaloids from *Delphinium geyeri*: three new C₂₀-diterpenoid alkaloids [J]. J Org Chem, 1986, 51(3): 390-394.
- [24] 杨丽华, 王月, 刘晓谦, 等. 藏药甘青乌头中1个新的双二萜生物碱[J]. 药学学报, 2021, 56(5): 1429-1433.
- [25] LIN L, CHEN D L, LIU X Y, et al. Bis-diterpenoid alkaloids from *Aconitum tanguticum* var. *trichocarpum* [J]. Nat Prod Commun, 2009, 4(7): 897-901.
- [26] HE J B, LUAN J, LYU X M, et al. Navicularines A-C: New diterpenoid alkaloids from *Aconitum naviculare* and their cytotoxic activities [J]. Fitoterapia, 2017, 120: 142-145.
- [27] JOSHI B S, BAI Y L, CHEN D H, et al. Tangirine, a novel dimeric alkaloid from *Aconitum tanguticum* (Maxim.) stapf, W. T. Wang [J]. Tetrahed Lett, 1993, 34(47): 7525-7528.
- [28] 何江波. 四种植物及四种真菌化学成分研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2016.
- [29] 王海坝, 蒋山好, 杨培明, 等. 甘青乌头的生物碱[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(4): 13-15.
- [30] CAO J X, LI L B, REN J, et al. Two new C₂₀-diterpenoid alkaloids from the Tibetan medicinal plant *Aconitum naviculare* Stapf [J]. Helv Chim Acta, 2008, 91(10): 1954-1960.
- [31] ULUBELEN A, MERICLI A H, MERICLI F, et al. Two C₂₀ diterpenoid alkaloids from *Delphinium venulosum* [J]. Phytochemistry, 1992, 31(9): 3239-3241.
- [32] HE L, CHEN Y Z, DING L S, et al. New alkaloids tongolinine and tongolinine from *Delphinium tongolense* [J]. Chin Chem Lett, 1996, 7(6): 557-560.
- [33] DESAI H K, PELLETIER S W. ¹³C-NMR assignments for lactone-type norditerpenoid alkaloids [J]. J Nat Prod, 1993, 56(15): 2193-2197.
- [34] 陈东林, 王锋鹏. 二萜生物碱的质谱研究[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(4): 54-71.
- [35] 邢贝妮, 吴琼, 汤庆发, 等. 人工栽培关白附中二萜生物碱的HPLC-Q-TOF-MS鉴别[J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(2): 192-199.
- [36] 赵沛基, 范黎明, 沈月毛. 绣线菊二萜生物碱电喷雾质谱研究[J]. 质谱学报, 2004, 25(4): 235-249.

[责任编辑 刘德文]