·药学基础·

荷叶和莲子心“同源异效”的物质基础分析

刘静，陈莎*，刘安*
（中国中医科学院 中药研究所，北京 100700）

［摘要］ **目的：**阐明影响同源药材荷叶和莲子心药效差异的关键活性物质，分析二者“同源异效”的物质基础。**方法：**利用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术定性分析荷叶、乳汁（莲叶柄中的汁液）和莲子心中的主要生物碱类成分，选择Waters XBridge C_{18}色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm），流动相0.1%氨水溶液（A）-乙腈（B）梯度洗脱（0~13 min，35%~60%B；13~20 min，60%~80%B；20~20.1 min，80%~95%B；20.1~25 min，95%B；25~25.1 min，95%~35%B；25.1~40 min，35%B），电喷雾离子源（ESI），正离子模式，质谱扫描范围*m/z* 100~1 000，并对其主要生物碱进行代谢网络的构建。**结果：**从荷叶中鉴定出了5种生物碱（*N*-去甲基荷叶碱，*O*-去甲基荷叶碱，番荔枝碱，荷叶碱和莲碱），从乳汁中鉴定出了6种生物碱（荷叶碱，norisoliensinine，6-hydroxynorisoliensinine，莲心碱，异莲心碱和甲基莲心碱）以及从莲子心中鉴定出了8种生物碱（莲心季铵碱，去甲基乌药碱，*N*-甲基乌药碱，原荷叶碱，*dl*-杏黄罂粟碱，莲心碱，异莲心碱和甲基莲心碱），构建了双苄基异喹啉类生物碱（莲心碱、异莲心碱和甲基莲心碱）以及阿朴啡类生物碱（荷叶碱，*N*-去甲基荷叶碱，*O*-去甲基荷叶碱，莲碱和番荔枝碱）等末端生物碱的生物合成通路。**结论：**荷叶中荷叶碱等5种阿朴啡类生物碱和莲子心中莲心碱等3种双苄基异喹啉类生物碱是造成荷叶和莲子心“同源异效”的物质基础。荷叶和莲子心中生物碱的代谢来源于同一化合物（*S*）-*N*-甲基乌药碱，通过两类不同酶的作用进行两类生物碱的合成。合成的生物碱具有不同的结构，造成了不同组织间化学成分的差异，从而产生不同的药效。

［关键词］ 荷叶；莲子心；生物碱；乳汁；超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨率质谱（UPLC-Q-TOF-MS/MS）；同源异效；物质基础

［中图分类号］ R22；R28；O657；Q945.31 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903（2020）22-0131-09

［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.20201548

［网络出版地址］ http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200428.1547.003.html

［网络出版日期］ 2020-4-28 15:53

Material Basis Analysis of "Homologous and Different Effect" of Lotus Leaf and Lotus Plumule

LIU Jing，CHEN Sha*，LIU An*
（*Institute of Chinese Materia Medica*，*China Academy of Chinese Medical Sciences*，*Beijing* 100700，*China*）

［**Abstract**］ **Objective**：To elucidate the key medicinal substances that cause the difference of efficacy between lotus leaf and lotus plumule，and to analyze their material basis of "homologous and different effect". **Method**：UPLC-Q-TOF-MS/MS technique was used to identify the main alkaloids in lotus leaf，lotus latex（juice in lotus petiole）and lotus plumule，chromatographic separation was achieved on a Waters XBridge C_{18} column（4.6 mm×150 mm，5 μm），and gradient elution was performed with 0.1% ammonia aqueous solution（A）-acetonitrile（B）as mobile phase（0-13 min，35%-60%B；13-20 min，60%-80%B；20-20.1 min，80%-95%B；20.1-25 min，95%B；25-25.1min，95%-35%B；25.1-40 min，35%B）. Data acquisition was carried out in electrospray ionization（ESI）under the positive ion mode，the scanning range was *m/z* 100-1 000. Besides，

［收稿日期］ 20200218（022）

［基金项目］ 国家“重大新药创制”科技重大专项（2018ZX09735002-001，2019ZX09201005）

［第一作者］ 刘静，在读硕士，从事莲代谢组学研究，E-mail：jingliu_06@163.com

［通信作者］ *陈莎，博士，副研究员，从事药用植物代谢组学及中药物质基础研究，E-mail：schen@icmm.ac.cn；
*刘安，博士，研究员，从事中药化学研究，Tel：010-64014411-2938，E-mail：aliu@icmm.ac.cn

the metabolic network of the main alkaloids was constructed. **Result**: A total of 5 alkaloids (*N*-nornuciferine, *O*-nornuciferine, anonaine, nuciferine and roemerine) were identified from lotus leaf, 6 alkaloids (nuciferine, norisoliensinine, 6-hydroxynorisoliensinine, liensinine, isoliensinine and neferine) in lotus latex, and 8 alkaloids (lotusine, norcoclaurine, *N*-methylcoclaurine, pronuciferine, armepavine, liensinine, isoliensinine and neferine) in lotus plumule. Also, the biosynthetic pathways of the terminal alkaloids of bisbenzylisoquinoline alkaloids (liensinine, isoliensinine and neferine) and aporphine alkaloids (*N*-nornuciferine, *O*-nornuciferine, anonaine, nuciferine and roemerine) was conducted. **Conclusion**: Five aporphine alkaloids in lotus leaf and three bisbenzylisoquinoline alkaloids in lotus plumule are the material basis for "homologous and different effect" of lotus leaf and lotus plumule. The metabolism of alkaloids in lotus leaf and lotus plumule is derived from the same compound of (*S*)-*N*-methylcoclaurine, and two types of alkaloids are synthesized through the action of two different enzymes. The synthetic alkaloids have different structures, resulting in different chemical composition between different tissues, thus producing different efficacy between lotus leaf and lotus plumule.

[**Key words**] lotus leaf; lotus plumule; alkaloids; lotus latex; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS); homologous and different effect; material basis

莲为莲科莲属多年生水生草本，有2个种——中国莲和美洲黄莲[1]，产于我国南北各省。自生或栽培在池塘或水田内，在朝鲜、日本、印度、越南等均有分布。2015年版《中国药典》收录了荷叶、莲房、莲须、莲子、莲子心、藕节6味中药[2]。传统中药中有一种普遍的现象——同基原多部位入药，功效不同，即来源于同一种药用植物的不同器官、组织，甚至是不同发育阶段的组织因其具有不同的功效而形成多味中药。但目前关于中药“同源异效”的物质基础并不明确。莲具有多个药用部位，如荷叶、莲子、莲子心、莲须、莲花、莲藕、荷梗等[3-6]，是“同源异效”中药中的典型。

荷叶为睡莲科植物莲的干燥叶，味苦，性平，归肝、脾、胃经。莲子心为睡莲科植物莲的成熟种子中的干燥幼叶及胚根，味苦，性寒，归心、肾经。荷叶和莲子心均来源于莲，但其在药用上却有显著区别。2015年版《中国药典》记载[2]荷叶有清暑化湿、升发清阳、凉血止血的功效，用于暑热烦渴、暑湿泄泻、脾虚泄泻、血热吐衄、便血崩漏；而莲子心有清心安神、交通心肾、涩精止血的功效，用于热入心包、神昏谵语、心肾不交、失眠遗精、血热吐血。现代研究表明，二者均含有较多的生物碱类和黄酮类成分，但化学成分却有着较大的区别。荷叶中的生物碱主要为阿朴啡类生物碱，包括荷叶碱，*N*-去甲基荷叶碱，*O*-去甲基荷叶碱等，还含有很多单苄基异喹啉类生物碱，如衡州乌药碱，*N*-甲基衡州乌药碱等[7]；莲子心中则主要为双苄基异喹啉类生物碱，研究重点在莲心碱、异莲心碱和甲基莲心碱等[8]。同时，2015年版《中国药典》分别以荷叶碱和莲心碱作为荷叶和莲子心的指标成分。另外，二者的药理作用也有很大不同。莲子心的药理研究较多集中在双苄基异喹啉生物碱上，主要药理作用体现在抗癌、降压、抗心律失常、抗氧化、抗纤维化、降血脂、抗炎和保护中枢神经系统等方面[4,8]；荷叶的药理作用则主要体现在降脂减肥、抑菌、抗氧化、抑制脂肪肝等方面[9-11]。说明荷叶和莲子心物质基础的差异决定了二者药效的不同。例如，荷叶的主要成分荷叶碱具有抗氧化、抑制脂肪肝等作用，因而荷叶具有降脂减肥的功效；而莲子心的主要成分莲心碱和甲基莲心碱等具有抗心律失常、保护中枢神经系统等作用，因而莲子心具有清心安神的功效。

现代研究表明中药药效的不同主要是由其化学成分的差异引起的，尤其是其次生代谢产物的差异，而次生代谢产物的产生主要是由于植物自身的生长发育和与环境的相互作用。莲的多部位入药是“同源异效”中药中的典型，其功效的分化可能与其物质基础的差异密切相关，而其本质差异可能是由于不同部位代谢网络存在差异[12]。目前造成莲中荷叶和莲子心不同药效的物质基础尚不清楚，研究这一现象具有重要意义。因此，本研究拟通过液质联用技术定性分析荷叶、乳汁和莲子心中的生物碱成分，并对其主要生物碱进行了生物代谢途径的推测，以期从现代科学的角度揭示荷叶和莲子心“同源异效”的物质基础，为荷叶和莲子心的合理应

用提供科学的实验依据。

1 材料

1290型高效液相色谱仪(包括二极管阵列检测器(DAD)和6540 Q-TOF LC/MS型四极杆飞行时间串联质谱仪(包括Qualitative Analysis B.07.00数据分析软件)购自美国安捷伦公司,BS201S型1/1万电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。*N*-去甲基荷叶碱、荷叶碱对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为B21944,BCY-000419,纯度依次为≥98%,≥97%),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈为质谱纯,氨水为色谱纯,其他试剂均为分析纯。药用植物莲采自于中国中医科学院中药研究所无锡莲种质资源圃,在相同条件下培育于无锡基地(中国江苏,东经31°57′,北纬120°29′),经中国科学院武汉植物园徐立铭高级工程师鉴定,荷叶为睡莲科植物莲*Nelumbo nucifera*的新鲜叶,莲子心为睡莲科植物莲*N. nucifera*的成熟种子中的新鲜幼叶及胚根。

2 方法

2.1 取样 对于每片荷叶,在荷叶辐射静脉的中部或外边缘进行一次穿孔取样,直径2 cm,并且位置对称固定。莲植株中流动的汁液,贯穿在整个植株中,截断叶杆快速滴取至2 mL离心管中。将获得的荷叶和乳汁立即冷冻在液氮中,–80 ℃冷冻保存,待测。

2.2 对照品溶液的制备 取各对照品适量,精密称定,加甲醇配制成每1 mL分别含荷叶碱74.3 μg和*N*-去甲基荷叶碱54.7 μg的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 样品加液氮研磨后置于1.5 mL离心管中,精密称定。加入弹珠,60 Hz粉碎2 min,加入混合溶剂[0.3 mol·L^{-1}盐酸-甲醇(1∶1),下同]1 mL,60 Hz混匀2 min,转移至15 mL离心管中,加入混合溶剂8 mL,超声处理20 min。离心(转速5 000 r·min^{-1},时间10 min,离心半径15 cm,下同),倒出上清液至新的15 mL离心管中。沉淀加混合溶剂5 mL,混匀,超声20 min,离心;2次上清液混合,加混合溶剂定容至14 mL,经0.22 μm微孔滤膜滤过,待测。

2.4 UPLC-Q-TOF-MS/MS定性分析荷叶、乳汁和莲子心中生物碱类成分

2.4.1 色谱条件 选择Waters XBridge C_{18}色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相0.1%氨水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~13 min,35%~60%B;13~20 min,60%~80%B;20~20.1 min,80%~95%B;20.1~25 min,95%B;25~25.1 min,95%~35%B;25.1~40 min,35%B),流速0.5 mL·min^{-1},柱温30 ℃,进样量2 μL,荷叶、乳汁和莲子心样品的检测波长分别为272,280,282 nm。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子检测模式,质谱扫描范围*m/z* 100~1 000,干燥器温度350 ℃,干燥器流速8 L·min^{-1},雾化器压力设定310.3 kPa,鞘气温度350 ℃,鞘气流速11 L·min^{-1},毛细管压力3.5 kV,喷嘴电压500 V,破碎电压135 V,Auto MS/MS模式,二级碰撞能量20 V。

3 结果与分析

3.1 线性关系考察 将*N*-去甲基荷叶碱、荷叶碱混合对照品溶液依次稀释2倍,得到7份不同质量浓度的混合对照品溶液,按**2.4.1**项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得二者回归方程分别为*Y*=52.664*X*–0.581(*r*=0.999 9),*Y*=71.323*X*+1.719(*r*=0.999 9),线性范围依次为0.854~54.667,1.161~74.333 mg·L^{-1}。

3.2 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液适量,按**2.4.1**项下条件连续进样6次,计算*N*-去甲基荷叶碱和荷叶碱峰面积的RSD分别为0.07%和0.1%,表明仪器精密度良好。

3.3 重复性试验 取同一批荷叶粉末,平行6份,精密称定,按**2.3**项下的方法制备样品溶液,按**2.4.1**项下条件测定,结果*N*-去甲基荷叶碱和荷叶碱的平均质量分数分别为0.03%和0.10%,RSD分别为1.7%和1.2%,表明该方法重复性良好。

3.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于制备后0,2,4,8,12,24 h按**2.4.1**项下条件测定,计算*N*-去甲基荷叶碱和荷叶碱峰面积的RSD分别为0.5%和0.2%,表明供试品溶液在24 h内基本保持稳定。

3.5 质谱定性 采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术,通过对多个数据库(中国知网,万方数据知识服务平台,PubChem,ChemSpider,MassBank等)进行检索,根据化学成分保留时间(t_R),准分子离子峰和二级碎片离子峰等质谱信息,并结合相关文献资料,定性分析了荷叶中5种生物碱、乳汁中6种生物碱以及莲子心中8种生物碱,化合物的具体信息见表1。结果发现,荷叶中5种生物碱均为阿朴啡类生物碱(包括*N*-去甲基荷叶碱,*O*-去甲基荷叶碱,番荔枝碱,荷叶碱和莲碱);乳汁中6种生物碱分别为5种双苄基异喹啉类生物碱(包括norisoliensinine,莲心碱,异莲心碱,6-hydroxynorisoliensinine和甲基莲心

碱)和1种阿朴啡类生物碱(荷叶碱);莲子心中8种生物碱分别为3种双苄基异喹啉类生物碱(包括莲心碱、异莲心碱以及甲基莲心碱),4种单苄基异喹啉类生物碱(莲心季铵碱,去甲基乌药碱,*N*-甲基乌药碱以及*dl*-杏黄罂粟碱)和1种阿朴啡类生物碱(原荷叶碱)。

表1 荷叶、乳汁和莲子心中生物碱类成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定

Table 1 Identification of alkaloids in lotus leaf, lotus latex and lotus plumule by UPLC-Q-TOF-MS/MS

组织	化合物	t_R/min	$[M+H]^+$ *m/z*	MS/MS *m/z*	分子式	化合物
荷叶	**1**	6.04	282.148 9	251.106 8 $[M+H-CH_3NH_2]^+$, 219.080 5 $[M+H-CH_3NH_2-CH_3OH]^+$	$C_{18}H_{19}NO_2$	*N*-去甲基荷叶碱 *N*-nornuciferine
	2	8.55	282.145 9	265.122 4 $[M+H-NH_3]^+$, 250.098 8 $[M+H-NH_3-CH_3]^+$	$C_{18}H_{19}NO_2$	*O*-去甲基荷叶碱 *O*-nornuciferine
	3	9.57	266.114 9	249.090 9 $[M+H-NH_3]^+$, 219.079 6 $[M+H-NH_3-CH_2O]^+$	$C_{17}H_{15}NO_2$	番荔枝碱 anonaine
	4	11.42	296.164 0	265.122 5 $[M+H-CH_3NH_2]^+$, 250.099 1 $[M+H-CH_3NH_2-CH_3]^+$	$C_{19}H_{21}NO_2$	荷叶碱 nuciferine
	5	12.57	280.132 0	249.090 8 $[M+H-CH_3NH_2]^+$	$C_{18}H_{17}NO_2$	莲碱 roemerine
乳汁	**1**	11.40	296.156 2	265.122 5 $[M+H-CH_3NH_2]^+$, 250.099 1 $[M+H-CH_3NH_2-CH_3]^+$	$C_{19}H_{21}NO_2$	荷叶碱 nuciferine
	2	11.64	597.285 8	475.231 2 $[M+H-C_6H_4(OH)CH_2-CH_3]^+$, 192.148 0 $[M+H-C_6H_4(OH)CH_2-CH_3-C_{10}H_{11}NO-C_6H_4O_2CH_2]^+$	$C_{36}H_{40}N_2O_6$	norisoliensinine
	3	12.14	597.285 2	475.231 3$[M+H-C_6H_4(OH)CH_2-CH_3]^+$, 192.111 1$[M+H-C_6H_4(OH)CH_2-CH_3-C_{10}H_{11}NO-C_6H_4O_2CH_2]^+$	$C_{36}H_{40}N_2O_6$	6-hydroxynorisoliensinine
	4	12.05	611.300 8	489.237 3 $[M+H-C_6H_4(OH)CH_2-CH_3]^+$, 206.117 0 $[M+H-C_6H_4(OH)CH_2-CH_3-C_{10}H_{11}NO-C_6H_4O_2CH_2]^+$	$C_{37}H_{42}N_2O_6$	莲心碱 liensinine
	5	15.36	611.300 0	475.222 0 $[M+H-C_6H_4(OCH_3)CH_2-CH_3]^+$, 192.101 8 $[M+H-C_6H_4(OCH_3)CH_2-CH_3-C_{10}H_{11}NO-C_6H_4O_2CH_2]^+$	$C_{37}H_{42}N_2O_6$	异莲心碱 isoliensinine
	6	17.83	625.319 5	594.275 8 $[M+H-NH_2CH_3]^+$, 489.229 8 $[M+H-C_6H_4(OCH_3)CH_2-CH_3]^+$, 206.114 0 $[M+H-C_6H_4(OCH_3)CH_2-CH_3-C_{10}H_{11}NO-C_6H_4O_2CH_2]^+$	$C_{38}H_{44}N_2O_6$	甲基莲心碱 neferine
莲子心	**1**	3.78	314.175 3	269.111 2 $[M-CH_3CH_2NH_2]^+$, 107.043 5(C_7H_7O)	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	莲心季铵碱 lotusine
	2	6.50	272.128 2	255.099 2 $[M+H-NH_3]^+$, 237.091 6 $[M+H-NH_3-H_2O]^+$, 107.048 7(C_7H_7O)	$C_{16}H_{17}NO_3$	去甲基乌药碱 norcoclaurine
	3	7.98	300.157 6	269.115 5 $[M+H-CH_3NH_2]^+$, 237.089 3 $[M+H-CH_3NH_2-CH_3OH]^+$, 209.094 3 $[M+H-CH_3NH_2-CH_3OH-CO]^+$, 107.047 7($C_7H_7O$)	$C_{18}H_{21}NO_3$	*N*-甲基乌药碱 *N*-methylcoclaurine
	4	8.45	312.158 6	283.131 9 $[M+H-H-CO]^+$, 269.116 3 $[M+H-CH_2=NCH_3]^+$, 254.092 9 $[M+H-CH_2=NCH_3-CH_3]^+$, 238.097 9 $[M+H-CH_2=NCH_3-OCH_3]^+$	$C_{19}H_{21}NO_3$	原荷叶碱 pronuciferine
	5	8.87	314.172 7	283.127 0 $[M+H-NH_2CH_3]^+$, 252.108 2 $[M+H-NH_2CH_3-OCH_3]^+$, 107.043 5(C_7H_7O)	$C_{19}H_{23}NO_3$	*dl*-杏黄罂粟碱 armepavine
	6	12.00	611.309 1	580.265 9 $[M+H-NH_2CH_3]^+$, 568.265 4 $[M+H-CH_2=N-CH_3]^+$, 489.234 2 $[M+H-C_6H_4(OH)CH_2-CH_3]^+$, 206.111 6 $[M+H-C_6H_4(OH)CH_2-CH_3-C_{10}H_{11}NO-C_6H_4O_2CH_2]^+$, 107.043 8($C_7H_7O$)	$C_{37}H_{42}N_2O_6$	莲心碱 liensinine
	7	15.31	611.312 0	580.268 6 $[M+H-NH_2CH_3]^+$, 568.268 4 $[M+H-CH_2=N-CH_3]^+$, 475.221 5 $[M+H-C_6H_4(OCH_3)CH_2-CH_3]^+$, 192.100 8 $[M+H-C_6H_4(OCH_3)CH_2-CH_3-C_{10}H_{11}NO-C_6H_4O_2CH_2]^+$, 121.063 6($C_8H_9O$)	$C_{37}H_{42}N_2O_6$	异莲心碱 isoliensinine
	8	17.85	625.328 4	594.286 4 $[M+H-NH_2CH_3]^+$, 582.285 6 $[M+H-CH_2=N-CH_3]^+$, 489.239 2 $[M+H-C_6H_4(OCH_3)CH_2-CH_3]^+$, 206.118 1 $[M+H-C_6H_4(OCH_3)CH_2-CH_3-C_{10}H_{11}NO-C_6H_4O_2CH_2]^+$, 121.065 1($C_8H_9O$)	$C_{38}H_{44}N_2O_6$	甲基莲心碱 neferine

阿朴啡类生物碱按结构可分为3个类别：①典型的阿朴啡类生物碱，在A环或N上出现取代，如荷叶碱，*N*-去甲基荷叶碱和*O*-去甲基荷叶碱等；②A环上形成亚甲二氧桥结构，如番荔枝碱和莲碱等；③非典型的阿朴啡类结构，如原阿朴啡型骨架的原荷叶碱等。对于典型的阿朴啡类生物碱，A环上主要发生甲氧基（OCH_3）或羟基（OH）取代，N上主要发生CH_3取代。二级质谱裂解规律[12-13]显示，如果是邻位甲氧基和羟基取代，MS就会显示出较强的CH_3OH和CO碎片丢失；如果是邻位甲氧基取代，MS就会显示出较强的CH_3和OCH_3碎片丢失；并且N基团处通常会发生α裂解，丢失NH_3，CH_3NH_2等碎片[14]。荷叶碱是典型的邻位甲氧基取代，显示丢失CH_3NH_2和CH_3碎片，得到2个响应较高的碎片265.122 5 $[M-CH_3NH_2]^+$和250.099 1 $[M-CH_3NH_2-CH_3]^+$。同理，结合光谱数据和文献[15]，可初步鉴定荷叶中化合物**4**和乳汁中化合物**1**均为荷叶碱，荷叶中化合物**1**和化合物**2**分别为*N*-去甲基荷叶碱和*O*-去甲基荷叶碱。对于A环上形成亚甲二氧桥结构的阿朴啡类生物碱，MS裂解通常会丢失CH_2O和CO碎片，N原子通常会发生α裂解，丢失NH_3，CH_3NH_2等碎片。荷叶中化合物**3**依次丢失NH_3和CH_2O，化合物**5**丢失碎片CH_3NH_2，结合光谱数据和文献[14]，可初步鉴定荷叶中化合物**3**和化合物**5**分别为番荔枝碱和莲碱。对于非典型的阿朴啡类生物碱，主要是B环发生逆-狄尔斯-阿尔德反应（RDA）裂解丢失CH_2=N-R基团，莲子心中化合物**4**丢失CO，CH_2=NCH_3，CH_3和OCH_3等碎片，根据裂解碎片和文献[16]，可初步鉴定莲子心中化合物**4**为原荷叶碱。见表1。

单苄基异喹啉类生物碱以1-苄基异喹啉为母核，MS裂解特征主要是由N原子发生α裂解产生四氢异喹啉离子和互补的苄基离子[17]。正离子模式下常常丢失CH_3NH_2，NH_3，CH_3OH，OCH_3，CO和H_2O等中性分子碎片[18]。结合光谱数据和文献[19-21]，可初步鉴定莲子心中化合物**1**~**3**和化合物**5**分别为莲心季铵碱，去甲基乌药碱，*N*-甲基乌药碱和*dl*-杏黄罂粟碱。见表1。双苄基异喹啉类生物碱的裂解规律[19,22-24]有以下3点：①非耦合的苄基和异喹啉基团断裂产生2个碎片离子；②N基处发生α裂解丢失中性碎片CH_2=N-CH_3（*m*/*z* 43）或NH_2CH_3（*m*/*z* 31）；③异喹啉基团碎片进一步断裂重排生成联苯化合物。乳汁中化合物**2**，**3**的母离子和裂解碎片十分相似，均是通过苄基和异喹啉基团断裂以及异喹啉基团碎片的进一步断裂重排，分别得到2个响应较高的碎片，结合裂解碎片和这2种化合物的色谱流出先后规律[12]，可初步鉴定乳汁中化合物**2**，**3**分别为norisoliensinine和6-hydroxynorisoliensinine。同理，结合裂解碎片和相关文献[25]，可初步鉴定莲子心中化合物**6**~**8**和乳汁中化合物**4**~**6**依次为莲心碱、异莲心碱和甲基莲心碱。见表1。

3.6 荷叶、乳汁、莲子心中生物碱的代谢途径 荷叶、乳汁和莲子心中的生物碱成分主要是苄基异喹啉类生物碱。但本研究表明荷叶中的生物碱主要为阿朴啡类生物碱，乳汁中的生物碱主要为双苄基异喹啉类生物碱，莲子心中的生物碱主要为双苄基异喹啉类生物碱和单苄基异喹啉类生物碱。阿朴啡类生物碱和双苄基异喹啉类生物碱的合成途径都是由多巴胺（dopamine）和4-羟基苯乙醛（4-hydroxyphenylacetaldehyde）在去甲乌药碱合成酶（NCS）的催化下通过发生曼尼西反应缩合而成[26-27]。然后在一系列具有催化活性的酶[去甲乌药碱-6-*O*-甲基转移酶（6-OMT），乌药碱*N*-甲基转移酶（CNMT），（*S*）-*N*-甲基乌药碱-3′-羟化酶（NMCH），3′-羟基-*N*-甲基乌药碱-4′-*O*-甲基转移酶（4′-OMT）]的作用下产生中心分支点中间体（*S*）-网状番荔枝碱[（*S*）-reticuline]。（*S*）-网状番荔枝碱经过不同的反应形成各种骨架结构，包括吗啡、可待因、小檗碱、原阿朴啡类生物碱等[28-29]。笔者认为双苄基异喹啉类生物碱的生物合成不是由（*S*）-网状番荔枝碱产生的，而是由生成（*S*）-网状番荔枝碱的前体（*S*）-*N*-甲基乌药碱产生的。（*S*）-*N*-甲基乌药碱在细胞色素P450酶的催化下发生酚氧基偶联反应生成不同的双苄基异喹啉类生物碱[30-31]。而阿朴啡类生物碱的最初合成途径是由（*S*）-网状番荔枝碱在紫堇块茎碱合成酶（CTS）的催化下生成紫堇块茎碱（corytuberine），然后紫堇块茎碱经过一系列反应生成各种阿朴啡类生物碱。目前莲中的阿朴啡类生物碱（*N*-去甲基荷叶碱，*O*-去甲基荷叶碱，荷叶碱，番荔枝碱和莲碱）的生物合成途径仍存在争议。有学者通过研究这5种最主要的阿朴啡类生物碱的结构，认为其可能是由紫堇块茎碱发生氧化、去羟基化和去甲基化等反应产生，也有研究表明其是从去甲乌药碱开始进入荷叶阿朴啡类生物碱的合成[32-34]。乳汁中的生物碱主要是双苄基异喹啉类生物碱，结合化合物的结构，推测荷叶和莲子心生物碱的代谢是开始于同一物质（*S*）-*N*-甲基乌药碱，通过细胞色素P450单加氧酶80A（CYP80A）在莲子心

中进行了 C-O 偶联形成了双苄基异喹啉类生物碱以及 CYP80G 在荷叶中进行了 C-C 偶联形成了阿朴啡类生物碱。

通过对荷叶、乳汁和莲子心中生物碱的解析，并结合苄基异喹啉类生物碱的生物合成过程，笔者构建了莲中主要的双苄基异喹啉类生物碱和阿朴啡类生物碱的代谢通路图，见图 1。结果发现(*S*)-*N*-甲基乌药碱可能是最重要的中间体，在 CYP80A 和 CYP80G 的作用下可以分别生成相应的双苄基异喹啉类生物碱和阿朴啡类生物碱，并且在一系列酶的催化下完成 3 种双苄基异喹啉类生物碱和 5 种阿朴啡类生物碱之间的转化。

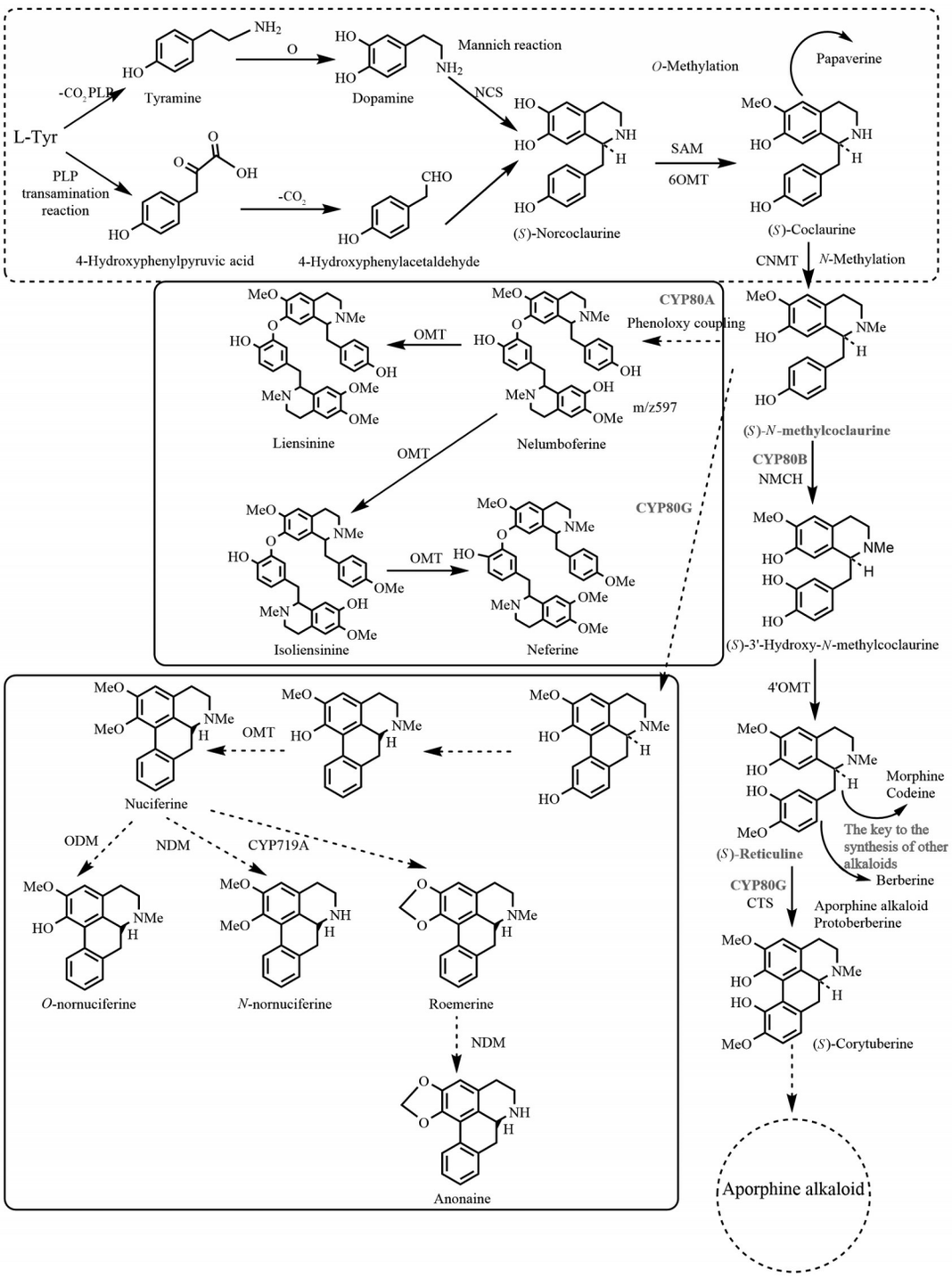

图 1　莲中生物碱类化合物的代谢通路

Fig. 1　Metabolic pathways of alkaloids in lotus

4 讨论

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术定性分析了荷叶、乳汁和莲子心中的生物碱类成分，结果表明荷叶中的生物碱主要为阿朴啡类生物碱，包括*N*-去甲基荷叶碱，*O*-去甲基荷叶碱，荷叶碱，番荔枝碱和莲碱等；莲子心中的生物碱主要为双苄基异喹啉类生物碱和单苄基异喹啉类生物碱；乳汁中的生物碱主要为双苄基异喹啉类生物碱，包括norisoliensinine，6-hydroxynorisoliensinine，莲心碱，异莲心碱和甲基莲心碱等。

目前普遍认为中药的差异多是由其有效成分造成的，中药功效的多样性可能是由多种成分共同作用的结果。荷叶和莲子心的药效成分的差异主要体现在所含的苄基异喹啉类生物碱的种类和含量不同。ONO等[35]研究发现荷叶提取物能够影响小鼠的消化系统，抑制脂质和碳水化合物的吸收，加速脂质代谢并且上调能量消耗，有助于抑制肥胖。AGNIHOTRI等[36]研究发现莲碱具有抗真菌和抗疟活性，并且通过对化合物的结构和其活性的关联分析后发现，阿朴啡类生物碱C-1和C-2位的取代基对抗疟活性起着至关重要的作用。ZHAO等[37]评估了莲中甲基莲心碱的潜在抗纤维化特性，结果表明甲基莲心碱在体内外均可减轻博来霉素诱导的肺纤维化，其作用基础可能与其抗炎、抗氧化以及抑制细胞因子的活性有关。JUNG等[38]研究发现莲子心中的甲基莲心碱能够显著改善失忆动物的认知障碍，其抗遗忘作用可能是通过抗氧化和抗炎作用以及抑制胆碱酯酶(ChEs)和β位淀粉样前体蛋白裂解酶1(BACE1)介导的。SUGIMOTO等[39]通过研究莲子心对小鼠中枢神经系统的影响，发现莲子心三氯甲烷提取物(主要生物碱为甲基莲心碱)能够抑制小鼠的自发活动，并且甲基莲心碱在小鼠迷宫试验中表现出了抗焦虑作用，其可能参与莲子心的镇静作用。还有学者研究发现莲心碱能有效改善心律失常[40]，并且对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用[41]。前人的研究结果表明荷叶碱等阿朴啡类生物碱具有降脂的功效，这类成分可能是荷叶具有减肥作用的物质基础之一；莲心碱、甲基莲心碱等双苄基异喹啉类生物碱具有降压、抗心律失常的作用，这类成分可能是莲子心具有清心安神功效的物质基础之一。提示荷叶和莲子心中主要成分和药效的差异可能具有相关性。

现代研究表明，植物代谢产物的差异往往是由代谢网络通路中相关基因的差异表达造成的。因此，研究苄基异喹啉类生物碱的代谢通路及其通路中相关酶在不同部位的差异表达，能够进一步揭示“同源异效”中药的物质基础。本文研究了苄基异喹啉类生物碱的代谢途径，这有助于更好地理解和阐释莲中不同部位的代谢网络通路差异，从而阐明荷叶和莲子心不同药效的物质基础。

有研究表明生物碱的生物合成和积累发生在植物的所有器官中，其中涉及到韧皮部的3个细胞型——乳汁管、筛分子和伴胞[42]。在罂粟中，生物碱的生物合成基因在伴胞中表达。生物碱生物合成酶在伴胞中聚集，随后转移到筛分子中参与生物碱的生物合成，在筛分子中合成的生物碱最终转移到乳汁管中存储起来[43]。关于莲中生物碱的来源和流向尚无深入阐释，DENG等[44]推测双苄基异喹啉类生物碱主要在荷叶中合成，然后通过韧皮部易位作用经乳汁转移到莲子心中。结合植物自身的结构特点以及莲中生物碱的生物合成和代谢规律，笔者认为莲的叶柄可能充当了一个桥梁的作用。由于植物中不同酶的作用以及不同外在环境的差异，在植物不同部位合成的生物碱具有不同的结构，这造成了不同植物组织间化学成分的差异，从而产生不同药效。

本文通过液质联用技术鉴定了荷叶、乳汁和莲子心中的生物碱成分，并进一步分析了其主要生物碱的生物代谢途径，从现代科学角度阐释了荷叶和莲子心“同源异效”的物质基础，但莲中生物碱类化合物的代谢通路仍有待深入研究。后续将挖掘莲中生物碱类化合物代谢通路中的关键功能基因，以期阐释荷叶和莲子心“同源异效”的分子基础。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会.中国植物志：27卷[M].北京：科学出版社，1979：3.
[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[M].北京：中国医药科技出版社，2015：273-276.
[3] CHEN S, FANG L, XI H, et al. Simultaneous qualitative assessment and quantitative analysis of flavonoids in various tissues of lotus (*Nelumbo nucifera*) using high performance liquid chromatography coupled with triple quad mass spectrometry[J].Anal Chim Acta, 2012, 724: 127-135.
[4] 袁志鹰，黄惠勇，谢梦洲.莲的化学成分及药理研究进展[J].亚太传统医药，2018，14(11)：73-76.
[5] SUZUKI H, SASAKI R, OGATA Y, et al. Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid

chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. Phytochemistry, 2008, 69(1): 99-111.

[6] 刘淑萍, 樊淑彦, 侯海妮, 等. 荷叶化学成分及药理作用研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2004, 25(4): 254-256.

[7] 陈曦, 戚进. 荷叶中黄酮和生物碱的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18): 211-214.

[8] 秦宁, 闵清, 胡文祥. 莲子心化学成分及药理作用研究进展[J]. 微波化学, 2018, 2(3): 63-69.

[9] 王福刚, 曹娟, 刘斌, 等. 荷叶的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2339-2340.

[10] 周健鹏. 荷叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 天津药学, 2014, 26(2): 65-68.

[11] 任贻军, 张宏琳, 高逢喜. 荷叶的药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(20): 75-76.

[12] 单锋. 荷叶, 莲子心药效分化的分子机理研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.

[13] STÉVIGNY C, JIWAN J L, ROZENBERG R, et al. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(5): 523-528.

[14] YAN R, WANG W, GUO J, et al. Studies on the alkaloids of the bark of *Magnolia officinalis*: isolation and on-line analysis by HPLC-ESI-MS^n[J]. Molecules, 2013, 18(7): 7739-7750.

[15] LUO X B, CHEN B, LIU J J, et al. Simultaneous analysis of *N*-nornuciferine, *O*-nornuciferine, nuciferine, and roemerine in leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2005, 538(1/2): 129-133.

[16] 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 239.

[17] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 225, 232.

[18] HU Y M, SU G H, SZE S C, et al. Quality assessment of Cortex Phellodendri by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2010, 24(4): 438-453.

[19] ZHOU M, JIANG M, YING X, et al. Identification and comparison of anti-inflammatory ingredients from different organs of lotus *Nelumbo* by UPLC/Q-TOF and PCA coupled with a NF-κB reporter gene assay[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81971.

[20] SCHMIDT J, BOETTCHER C, KUHNT C, et al. Poppy alkaloid profiling by electrospray tandem mass spectrometry and electrospray FT-ICR mass spectrometry after [*ring*-$^{13}C_6$] -tyramine feeding [J]. Phytochemistry, 2007, 68(2): 189-202.

[21] KASHIWADA Y, AOSHIMA A, IKESHIRO Y, et al. Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(2): 443-448.

[22] LIN Z, YANG R, 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.

[23] DO T C M V, NGUYEN T D, TRAN H, et al. Analysis of alkaloids in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves by non-aqueous capillary electrophoresis using ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. J Chromatogr A, 2013, 1302: 174-180.

[24] LIU Y N, SONG X, YAN R Q, et al. Development and validation of a UPLC-DAD-MS method for characterization and quantification of alkaloids in Menispermi Rhizoma and its preparations [J]. J Food Drug Anal, 2013, 21(2): 206-218.

[25] TOMITA M, FURUKAWA H, YANG T H, et al. On the alkaloids of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Ⅷ. Studies on the alkaloids of loti embryo. (1). Structure of isoliensinine, a new biscoclaurine type alkaloid [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1965, 13(1): 39-43.

[26] CHOW Y L, SATO F. Metabolic engineering and synthetic biology for the production of isoquinoline alkaloids [J]. Biotech Med Plant, 2013, doi: 10.1007/978-3-642-29974-2_14.

[27] SAMANANI N, LISCOMBE D K, FACCHNI P J. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis[J]. Plant J, 2004, 40(2): 302-313.

[28] GLENN W S, PUNGUPHAN W, O′CONNOR S E. Recent progress in the metabolic engineering of alkaloids in plant systems [J]. Curr Opin Biotechnol, 2013, 24(2): 354-365.

[29] HAGEL J M , FACCHINI P J. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world[J]. Plant Cell Physiol, 2013, 54(5): 647-672.

[30] MINAMI H, KIM J S, IKEZAWA N, et al. Microbial

production of plant benzylisoquinoline alkaloids [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(21): 7393-7398.

[31] ZIEGLER J, FACCHINI P J. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 735-769.

[32] YANG M, ZHU L, LI L, et al. Digital gene expression analysis provides insight into the transcript profile of the genes involved in aporphine alkaloid biosynthesis in lotus (*Nelumbo nucifera*) [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 80.

[33] LISCOMBE D K, FACCHINI P J. Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis [J]. Curr Opin Biotechnol, 2008, 19(2): 173-180.

[34] MENÉNDEZ-PERDOMO I M, FACCHINI P J. Benzylisoquinoline alkaloids biosynthesis in sacred lotus [J]. Molecules, 2018, 23(11): E2899.

[35] ONO Y, HATTORI E, FUKAYA Y, et al. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 106(2): 238-244.

[36] AGNIHOTRI V K, ElSOHLY H N, KHAN S I, et al. Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity [J]. Phytochem Lett, 2008, 1(2): 89-93.

[37] ZHAO L, WANG X, CHANG Q, et al. Neferine, a bisbenzylisoquinline alkaloid attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 627(1/3): 304-312.

[38] JUNG H A, JIN S E, CHOI R J, et al. Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1 [J]. Life Sci, 2010, 87(13/14): 420-430.

[39] SUGIMOTO Y, FURUTANI S, ITOH A, et al. Effects of extracts and neferine from the embryo of *Nelumbo nucifera* seeds on the central nervous system [J]. Phytomedicine, 2008, 15(12): 1117-1124.

[40] DONG Z X, ZHAO X, GU D F, et al. Comparative effects of liensinine and neferine on the human ether-a-go-go-related gene potassium channel and pharmacological activity analysis [J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(3/4): 431-442.

[41] WANG J L, NONG Y, JIANG M X. Antiarrhythmic action of liensinine [J]. J Tongji Med Univ, 1992, 21(5): 317-319.

[42] LEE E J, HAGEL J M, FACCHINI P J. Role of the phloem in the biochemistry and ecophysiology of benzylisoquinoline alkaloid metabolism [J]. Front Plant Sci, 2013, 4: 182.

[43] BEAUDOIN G A, FACCHINI P J. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy [J]. Planta, 2014, 240(1): 19-32.

[44] DENG X, ZHU L, FANG T, et al. Analysis of isoquinoline alkaloid composition and wound-induced variation in Nelumbo using HPLC-MS/MS [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(5): 1130-1136.

[责任编辑　刘德文]