

毛细管电泳-质谱联用技术及其在中草药分析中的应用

李奕黎 刘虎威*

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘要 本文对毛细管电泳-质谱联用这一强有力的分析技术作了简要介绍,并综述了该技术在中草药分析中的应用。

关键词 毛细管电泳 质谱 中草药 分析

1 概述

质谱(MS)法灵敏度高,专属性强,能提供分子结构信息,是毛细管电泳(CE)非常理想的一种检测器。CE的高分离效率与MS的高鉴定能力结合,使得能用nL级样品进行分子结构分析和分子量的准确测定,成为微量样品,特别是生物样品分离分析的强有力的工具,近年来,越来越受到人们的关注^[1]。

80年代初,通过热喷雾接口,实现了HPLC与MS的耦合^[2]。随后,各种LC-MS的接口陆续出现。但是,对于GC-MS的耦合,所有LC-MS的接口都不能直接加以利用。主要原因有两个:一是CE流速太慢(典型值为10~100nL/min),不能满足各种接口对流速的要求(2~10 μ L/min);二是由于毛细管出口端不在缓冲液中,所以必须解决CE操作中的电接触问题。

1984年,在MS中提出了电喷雾电离(ESI)技术^[3],溶液在高电场中从毛细管末端以1~10 μ L/min的流速喷射进入MS检测器。接着,Whitehouse等人^[4]的LC-ESI-MS接口问世。基于Whitehouse等人的LC-MS接口,Smith等^[5]将CE分离毛细管的出口端作喷射源,首先实现了CE-ESI-MS的在线偶耦合。

GE-MS在线结合的仪器主要包括三个部分:即CE系统,CE-MS接口和MS检测器。CE和MS已有成熟的商品仪器,LC-MS接口亦较成熟。但是,CE-MS结合的效果如何,即不降低CE的分离效率,又满足MS分析进样要求,达到MS仪器的质量分辨率和检测灵敏度,则完全有赖于接口性能的完善。因此,近年来CE-MS的检测法的研究主要集中在接口的设计与性能的提高方面。

2 CE-MS 接口

目前较成熟的CE-MS接口主要有以下几种:电喷雾(ESI)接口,连续流-快原子轰击(CF-FAB)接口和离子喷雾(IS)接口。现已有几家公司陆续推出了几种商品接口,可将现有的商品CE和MS仪器联接。由于电喷雾为最常用的接口技术,所以我们主要对它作进一步介绍。

ESI属于大气压电离技术,它的显著特点是电离效率高(大于20%~50%),产生高丰度的分子离子,而碎片离子很少,对非挥发性的高聚物分子亦适用。对于高聚物(如蛋白质),由ESI产生的离子电荷数与其分子量有线性关系^[6]。因为MS测量的是质荷比(m/z),所以ESI产生的离子的 m/z 都落在常规质谱仪的 m/z 范围内。用具有常规 m/z 的MS仪器(如四极杆质谱)就可以测定分子量非常大的生物大分子,这是ESI接口的一大优点。

前文中曾指出,任何CE-MS接口都必须解决毛细管末端的电接触问题,提供分离电流回路。第一个CE-ESI-MS的接口是用金属银沉积在熔融石英毛细管末端构成^[5]。金属化的毛细管末端离MS进样孔1~2cm,其间有3~6kV的电位差。它既构成分离电流回路,又充当电喷雾源。这种设计虽然解决了CE中的电接触问题,但还受到CE流速慢的限制,所以离子喷雾的稳定性差。而且这种特殊的毛细管柱使用寿命短。后来,人们对其进行了一系列的改进。现在使用最广泛的接口叫作鞘液体接口,其示意图如图1所示^[7]。金属接口(喷雾杆)具有三层套管结构:内层中插入普通毛细管,与最初设计不同的是中间层采用了液体鞘流技术,鞘液体从中间层流出,与毛细管中流出的液体(流速一般为10~

100nL/min) 混合, 解决了毛细管末端电接触的问题, 同时可以控制鞘液体流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$ 数量级), 以增大进入 ESI 的液体量, 补给足够的液体基质, 形成稳定的电喷雾。外层引入雾化气体氮气, 以辅助喷雾的形成。在质谱仪入口处的大气压区加有几千伏的电压 (3 ~ 5kV), 它的作用不仅是使液体在电场作用下喷射产生多电荷微滴 (小于 $1\mu\text{m}$), 而且让这些微滴带上大量电荷, 使它们在库仑爆炸力的作用下崩解成更小的液体微滴。荷电微滴在毛细管末端和 MS 进样孔之间漂移过程中, 从质谱进样孔中逆向导入高温 ($100^\circ\text{C} \sim 300^\circ\text{C}$) 的干燥气氮气, 加速微滴溶剂的蒸发, 最终将溶液中的荷电待测物有效的转换成气相进入质谱检测器, 并减小进入真空室时膨胀形成的溶剂球团。

鞘液体是影响电喷雾生成的重要因素。为了有利电喷雾的生成, 鞘液体应该具有以下物理性质: 如较低的表面张力, 较低的导电性和高的挥发性。常用的鞘流液体为水、甲醇、乙腈、异丙醇和丙酮, 加入一定的电解质如甲酸、乙酸、甲酸铵、乙酸铵等。

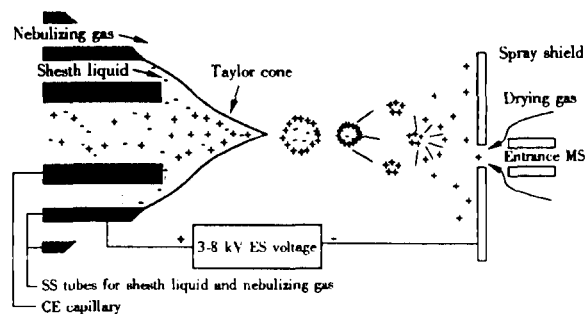


图 1 用于 CE-MS 的常压电喷雾离子化接口的原理示意图

3 CE-MS 在中草药分析中的应用

自 CE-ESI-MS 诞生以来, 它的应用多集中在多肽和蛋白质的分析方面。然而随着中草药在世界上许多国家得到越来越多的重视, 人们开始把这一技术应用在中草药成分的分析研究中, 特别是中草药中生物碱的分析上。

Henion 等^[8]人首次用 CE-MS 技术, 对几种草药中的多种异喹啉生物碱进行了分离, 并用四氢小檗碱作内标, 对小檗碱和巴马亭进行了定量分

析。Unger 等^[9]用 CE-MS, 在 0.1mol/L 乙酸铵 ($\text{pH}3.1$): 乙腈 (1:1) 的缓冲体系中, 对四种类型的生物碱: 单萜吲哚生物碱、氢化小檗碱类生物碱、 β -咔啉生物碱和异喹啉生物碱进行了分离分析, 并讨论了生物碱结构对电泳淌度的影响。Sturm 等^[10]用 $0.07 \sim 0.1\text{mol/L}$ ($\text{pH}3.0$ 或 4.0) 甲酸铵 (含 10% 甲醇或 20 ~ 60% 乙腈) 作 CE 分离条件, 0.005mol/L 甲酸的乙腈溶液为鞘流液体, 对异喹啉类生物碱进行了分离, 然后用该方法对多种药用植物甲醇提取液中的异喹啉生物碱进行检测和鉴定。Madteus 等^[11]用 0.04mol/L 的乙酸铵; 在 $\text{pH}8.5$ 的电泳条件下, 用 CE-ESI-MS 分离分析了莨菪碱和莨菪胺, 并用于实际样品的分析。台湾的 Chen 等人^[12]则将 CE 与多级 MS 相连即用 CE-ESI-MS-MS 技术, 分析中药中的黄连碱, 小檗碱和巴马亭, 并以此对真假中成药进行鉴别。由于使用了 MS-MS 联用技术, 可以追踪碎片离子的母离子, 从而对化合物进行更加确切的指认。

以上的研究都是以正离子检测模式对弱碱性化合物的分析。Armendia 等^[13]则报道了采用 CE-MS 技术以负离子检测模式分析黄酮类化合物, 在定量的同时对每种成分的结构进行了解析。

我们课题组建立了一种 CE-ESI-MS 分析中药中的粉防己碱和防己诺林碱含量的方法^[14], 并比较了熔融石英毛细管和 PVA 涂层毛细管在定量分析中的性质差异。然后我们在背景电解质 0.1mol/L 甲酸和鞘液体为 0.005mol/L 甲酸铵 50% 甲醇溶液的条件下, 成功地对中药中的粉防己碱和防己诺林碱进行含量测定。使用质谱的 SIM (m/z 305 为粉防己碱的特征离子, m/z 312 为防己诺林碱的特征离子) 模式代替紫外-可见检测, 可获得更宽的线性范围和灵敏度 20 倍的提高。而且用此方法分析实际样品时, 可以避免由于样品本底复杂所带来的干扰。图 2 所示为粉防己碱和防己诺林碱在未涂层毛细管上的 CE-ESI-MS 分析结果, 说明了在中草药定量分析上的可行性和优越性。

我们还分别用直接 ESI-MS 和 CE-ESI-MS 联用的方法对茶叶中的儿茶素类化合物进行了定性分析^[15]。直接 ESI-MS 法可用于对茶叶中的主要成分进行简单、快速的定性指认。而 CE 与 ESI-MS 联用则提供了一种对分子量相同, 不能由质谱分离的儿茶素化合物进行电泳分离的方法。充分

体现了 CE-ESI-MS 这种二维分离技术的优越性。使用 CE-ESI-MS 的另一个优点在于可以通过增加碎裂电压,使分析物离子进行碰撞诱导解离反应,这样就可以根据产生的碎片离子,对样品中化合物进行准确指认,并且有可能用来鉴定未知化合物的结构。我们研究了碎裂电压对碰撞诱导解离反应及碎片离子和准分子离子丰度的影响。这些结果说明 CE-ESI-MS 联用技术特别适合于复杂样品如中药和其他天然食品,饮料的分析。

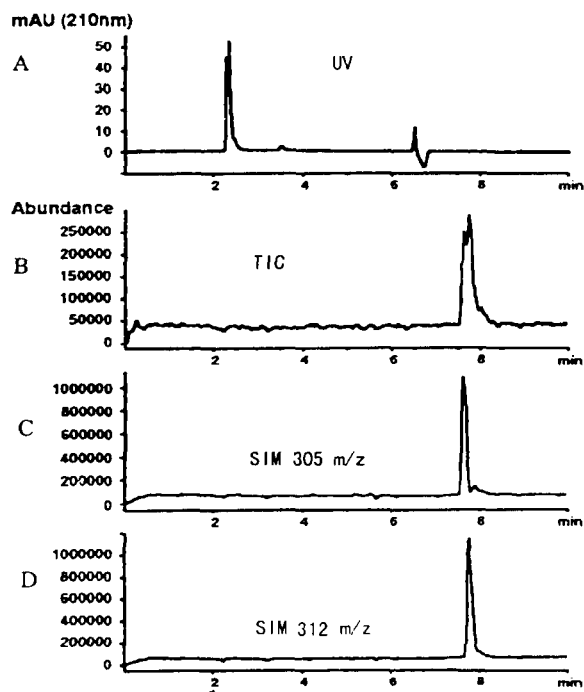


图2 粉防己碱和防己诺林碱在未涂层毛细管上的 CE-ESI-MS 分析结果
A. UV-Vis 210nm 检测;
B. 总离子流色谱图;
C. SIM 305 m/z 粉防己碱的质量色谱图;
D. SIM 312 m/z 防己诺林碱的质量色谱图。

参考文献

1. 邓延倬、何金兰, 高效毛细管电泳, 北京: 科学出版社, 1996
2. Yergey A. E., Edmonds C. G., Lewis I. A. S., Vestal M. L., Modern Analytical Chemistry, Plenum Press New York, 1990
3. Yamashita M., Fenn J. B., J. Phys. Chem., 1984, 88: 4671.
4. Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B., Anal. Chem., 1985, 57: 675
5. Olivares J. A., Nguyen N. T., Yonker C. R., Smith R. D., Anal. Chem., 1987, 59: 1230
6. Loo J. A., Udseth H. R., Smith R. D., Anal. Biochem., 1989, 179: 404
7. Smith R. D., Barinaga C. J., Udseth H. R. Anal. Chem., 1988, 60: 1948
8. Henion JD, Mordehal A. V. and Cal, J. Anal Chem., 1994, 66: 2103
9. Unger M., Stockigt, D., Belder, D and Stockigt, J. J. Chromatogr. A, 1997, 767: 263
10. Sturm S., Stuppner H. Electrophoresis, 1998, 19: 3026
11. Mateus L, Cherkaoui S, Christen P, Veuthey J-L. Electrophoresis, 1999, 20: 3402
12. Chen Y. R., Wen K. C, Her G. R. J. Chromatogr. A, 2000, 866: 273
13. Aramendia M. A., Garcia I., Lafont F., J Chromatogr A, 1995, 707: 327
14. Yi Li, Gordon A. Ross, Huwei Liu, Quantitative Analysis of Tetrandrine and Fangchinoline in Traditional Chinese Medicine by CE/ESI/MS, (submitted)
15. Yi Li, Gordon A. Ross, Huwei Liu, Analysis of Catechins in Tea by CE-ESI-MS, (submitted).

Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry and its Application in Analysis of Chinese Herbal Medicines

YiLi YanLi HuweiLiu

(Department of Chemistry Peking University Beijing 100871)

Abstract Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS), a powerful combined analytical method, was briefly introduced and its applications in the analysis of Chinese herbal medicines was reviewed with 15 references.

Key words capillary electrophoresis Mass spectrometry Analysis Chinese herbal medicines.